



**INSTITUTO POTOSINO DE INVESTIGACIÓN  
CIENTÍFICA Y TECNOLÓGICA, A.C.**

**POSGRADO EN CIENCIAS EN BIOLOGÍA MOLECULAR**

**El silenciamiento local controla la respuesta al  
estrés oxidante y la resistencia multifarmacológica  
de *Candida glabrata***

Tesis que presenta  
**Emmanuel Orta Zavalza**

Para obtener el grado de  
**Doctor en Ciencias en Biología Molecular**

**Director de la Tesis:**  
**Dr. Alejandro De Las Peñas Nava**

*San Luis Potosí, S.L.P., 31 de Enero de 2014*



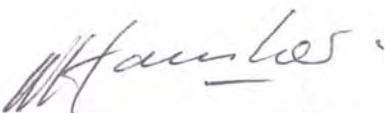
## Constancia de aprobación de la tesis

La tesis ***“El silenciamiento local controla la respuesta al estrés oxidante y la resistencia multifarmacológica de *Candida glabrata*”*** presentada para obtener el Grado de Doctor en Ciencias en Biología Molecular fue elaborada por **Emmanuel Orta Zavalza** y aprobada el **treinta y uno de enero del dos mil catorce** por los suscritos, designados por el Colegio de Profesores de la División de Biología Molecular del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C.

\_\_\_\_\_  
**Dr. Alejandro De Las Peñas Nava**  
Director de la tesis

  
\_\_\_\_\_  
**Dra. Lina Raquel Riego Ruiz**  
Miembro del Comité Tutorial

\_\_\_\_\_  
**Dr. J. Sergio Casas Flores**  
Miembro del Comité Tutorial

  
\_\_\_\_\_  
**Dr. Wilhelm Ludwig Hansberg y Torres**  
Miembro del Comité Tutorial



## Créditos Institucionales

Esta tesis fue elaborada en el Laboratorio de **Microbiología Molecular** de la División de Biología Molecular del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C., bajo la dirección del **Dr. Alejandro De Las Peñas Nava** y apoyada por el proyecto: **SEP-CB-2010-01-153929** de **CONACYT**.

Durante la realización del trabajo el autor recibió una beca académica del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología **233455** y del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A. C.



# Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C.

## Acta de Examen de Grado

El Secretario Académico del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C., certifica que en el Acta 062 del Libro Primero de Actas de Exámenes de Grado del Programa de Doctorado en Ciencias en Biología Molecular está asentado lo siguiente:

En la ciudad de San Luis Potosí a los 31 días del mes de enero del año 2014, se reunió a las 12:00 horas en las instalaciones del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C., el Jurado integrado por:

<b>Dr. Alejandro De Las Peñas Nava</b>	<b>Presidente</b>	<b>IPICYT</b>
<b>Dra. Lina Raquel Riego Ruiz</b>	<b>Secretaria</b>	<b>IPICYT</b>
<b>Dr. J. Sergio Casas Flores</b>	<b>Sinodal</b>	<b>IPICYT</b>
<b>Dr. Wilhelm Ludwig Hansberg y Torres</b>	<b>Sinodal externo</b>	<b>UNAM</b>

a fin de efectuar el examen, que para obtener el Grado de:

**DOCTOR EN CIENCIAS EN BIOLOGÍA MOLECULAR**

sustentó el C.

**Emmanuel Orta Zavalza**

sobre la Tesis intitulada:

*El silenciamiento local controla la respuesta al estrés oxidante y la resistencia multifarmacológica de Candida glabrata*

que se desarrolló bajo la dirección de

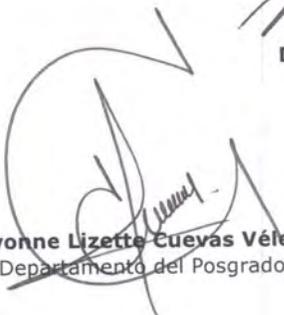
**Dr. Alejandro De Las Peñas Nava**

El Jurado, después de deliberar, determinó

**APROBARLO**

Dándose por terminado el acto a las 13:35 horas, procediendo a la firma del Acta los integrantes del Jurado. Dando fe el Secretario Académico del Instituto.

A petición del interesado y para los fines que al mismo convengan, se extiende el presente documento en la ciudad de San Luis Potosí, S.L.P., México, a los 31 días del mes de enero de 2014.

  
**Mtra. Ivonne Lizette Cuevas Vélez**  
Jefa del Departamento del Posgrado

  
**Dr. Marcial Bonilla Marín**  
Secretario Académico



Para:

Celia y Manuel. *Con cariño y gratitud eterna.*

Nayeli y Josué. *Hermanos por siempre.*

Silvia, Alicia y Edmundo. *Por su enseñanza alegre.*

Cristina y Sergio. *Con gratitud inmensa*

Amor bello, Lizbeth. *Te amo*

## **Agradecimientos**

Enorme gratitud al Dr. Alejandro De Las Peñas Nava y la Dra. Irene Beatriz Castaño Navarro por su confianza, su apoyo incondicional y estimulante asesoría.

A los miembros del comité de evaluación, la Dra. Lina Raquel Riego Ruiz, el Dr. J. Sergio Casas Flores, el Dr. Jorge Luis Folch Mallol y el Dr. Wilhelm Hansberg Torres, por sus pertinentes observaciones, sus comentarios y enriquecedoras aportaciones.

A nuestros técnicos de laboratorio, la Dra. Ma Guadalupe Gutiérrez-Escobedo, la Dra. Candy Yuriria Ramírez-Zavaleta y el Dr. Omar Elind Arroyo-Helguera. Sus valiosas enseñanzas, disposición, dedicación y esfuerzo contribuyeron enormemente a la realización de este trabajo.

A todos los profesores investigadores del IPICYT, en especial al Dr Rubén López-Revilla y el Dr. Luis Salazar-Olivo, por permitirnos trabajar en su laboratorio al inicio del doctorado.

A todos mis compañeros del laboratorio, pero en especial a mis amigos: Marcela, Jacqueline, Guadalupe, Gehenna, Israel, Alejandro, Jefté y Luis.

A mi amor bello, Lizbeth.

Al enorme apoyo que me otorgó el IPICYT, a través de su personal, sus instalaciones y las valiosas enseñanzas de su profesorado.

Al CONACYT.

# Contenido

Constancia de aprobación de la tesis.....	ii
Créditos Institucionales .....	iii
Acta de examen .....	iv
Dedicatorias .....	v
Agradecimientos.....	vi
Lista de tablas .....	x
Lista de figuras.....	xi
Acrónimos y abreviaturas.....	xiii
Glosario.....	xvi
Resumen.....	xviii
Abstract.....	xix
1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1. Las micosis.....	1
1.2. Las candidiasis.....	1
1.3. <i>Candida glabrata</i> : un patógeno emergente .....	3
1.4. Características de <i>C. glabrata</i> .....	5
1.5. La interacción de <i>C. glabrata</i> con el hospedero.....	5
1.6. Adherencia y colonización del hospedero .....	7
1.7. El reconocimiento de <i>C. glabrata</i> por las células de la inmunidad innata.....	13
1.8. Los mecanismos de <i>C. glabrata</i> para evadir la respuesta inmune.....	17
1.9. La respuesta a estrés oxidante de <i>C. glabrata</i> .....	20
1.10. La resistencia farmacológica de <i>C. glabrata</i> .....	26
1.11. Las sirtuinas de <i>C. glabrata</i> en la respuesta a los estímulos ambientales .....	31
2. ANTECEDENTES DIRECTOS .....	34
3. OBJETIVO GENERAL.....	35
3.1. Objetivos específicos.....	35
4. MATERIALES Y MÉTODOS.....	36
4.1. Cepas.....	36
4.2. Plásmidos .....	38

4.3.	Oligonucleótidos .....	40
4.4.	Medios de cultivo .....	42
4.5.	Transformación genética de <i>C. glabrata</i> .....	43
4.6.	Ensayos de sensibilidad a los oxidantes .....	44
4.7.	Ensayos de susceptibilidad al fluconazol .....	44
4.8.	Ensayo de longevidad cronológica .....	46
4.9.	Construcción de las cepas .....	47
4.10.	PCR cuantitativa (qPCR) y transcripción reversa de la PCR por punto final (RT-PCR) ...	49
4.11.	Inmunoprecipitación e inmunodetección .....	50
4.12.	Análisis bioinformáticos .....	51
5.	RESULTADOS .....	53
5.1.	Local silencing controls the oxidative stress response and the multidrug resistance in <i>Candida glabrata</i> .....	54
5.2.	Role of glutathione in the oxidative stress response in the fungal pathogen <i>Candida glabrata</i> .....	74
5.3.	Sir3 Polymorphisms in <i>Candida glabrata</i> clinical isolates .....	90
5.4.	The oxidative stress response of the opportunistic fungal pathogen <i>Candida glabrata</i>	103
5.5.	Adherence, virulence and cell wall proteins of <i>Candida glabrata</i> .....	109
5.6.	Catalase Activity Assay in <i>Candida glabrata</i> .....	124
6.	RESULTADOS ADICIONALES .....	129
6.1.	Análisis fenotípico de las mutantes deficientes en sirtuinas .....	129
6.1.1.	La delección de <i>SIR2</i> o de <i>HST2</i> no modifica la susceptibilidad de <i>Candida glabrata</i> al fluconazol o al H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> .....	129
6.1.2.	La delección de <i>HST1</i> o <i>RFM1</i> disminuye la susceptibilidad de <i>C. glabrata</i> a la menadiona .....	130
6.1.3.	La complementación de <i>HST1</i> y <i>SUM1</i> revierte la resistencia al fluconazol .....	131
6.1.4.	La ausencia de <i>SIR2</i> o <i>HST1</i> no afecta la viabilidad cronológica de <i>C. glabrata</i> .....	132
6.2.	Susceptibilidad al fluconazol en función del medio de cultivo .....	134
6.2.1.	La delección de <i>HST1</i> disminuye la susceptibilidad al fluconazol en medio rico YPD pero no en el medio definido RPMI-1640 .....	134
6.2.2.	El medio de cultivo influye en la expresión basal de <i>CDR1</i> .....	136
6.2.3.	La exclusión de la peptona o el extracto de levadura del YPD no modifica la resistencia al fluconazol de la mutante <i>hst1Δ</i> .....	137

6.2.4.	La adición de medio condicionado de la mutante <i>hst1Δ</i> no modifica la susceptibilidad al fluconazol de la cepa parental y viceversa .....	139
6.2.5.	La adición de YPD al medio RPMI-1640 incrementa la resistencia de <i>C. glabrata</i> al fluconazol .....	141
6.3.	La divergencia de Sum1.....	142
6.3.1.	Sum1 de <i>L. kluyveri</i> no complementa a la mutante <i>sum1Δ</i> de <i>C. glabrata</i> .....	142
6.4.	Análisis de la interacción de Skn7 y Yap1.....	145
6.4.1.	Yap1 y Skn7 no co-inmunoprecipitan en condiciones basales ni oxidantes .....	145
7.	DISCUSIÓN.....	150
7.1.	¿La inactivación del complejo HRS es ventajosa para <i>C. glabrata</i> ? .....	151
7.2.	Sum1 es el componente filogenéticamente diferente del complejo HRS .....	154
8.	CONCLUSIONES .....	157
9.	PERSPECTIVAS .....	158
10.	REFERENCIAS .....	159

## Lista de tablas

Tabla 1   Cepas de <i>Candida glabrata</i> .....	36
Tabla 2   Cepas de otras levaduras.....	38
Tabla 3   Plásmidos .....	38
Tabla 4   Oligonucleótidos .....	41
Tabla 5   Porcentaje de viabilidad de <i>C. glabrata</i> en ausencia de sirtuinas.....	133
Tabla 6   Susceptibilidad al fluconazol de las mutantes de <i>C. glabrata</i> .....	135
Tabla 7   Susceptibilidad de las mutantes de <i>C. glabrata</i> en las diferentes mezclas de medios YPD-RPMI .....	141

## Lista de figuras

Ilustración 1   <i>Distribución de especies de Candida causantes de candidemias en Norteamérica.</i> .....	2
Ilustración 2   <i>Incidencia de las infecciones sistémicas hospitalarias causadas por Candida spp.</i> .....	3
Ilustración 3   <i>Filogenia de las especies secuenciadas de los clados Candida y Saccharomyces.</i> .....	4
Ilustración 4   <i>El marco daño-respuesta.</i> .....	6
Ilustración 5   <i>La pared fúngica de los ascomicetos.</i> .....	8
Ilustración 6   <i>La estructura típica de las adhesinas fúngicas.</i> .....	9
Ilustración 7   <i>Filogenia de los dominios Epa.</i> .....	10
Ilustración 8   <i>Activación de las defensas del hospedero.</i> .....	13
Ilustración 9   <i>Vías de señalización asociadas al reconocimiento de PAMP fúngicos por células del sistema inmune.</i> .....	15
Ilustración 10   <i>Maduración del fagosoma.</i> .....	17
Ilustración 11   <i>La respuesta a estrés oxidante de C. glabrata.</i> .....	25
Ilustración 12   <i>Mecanismos de acción de los actuales fármacos antifúngicos.</i> ....	27
Ilustración 13   <i>Función y regulación de Pdr1.</i> .....	29
Ilustración 14   <i>Susceptibilidad de C. glabrata al fluconazol en ausencia de sirtuinas.</i> .....	129
Ilustración 15   <i>Susceptibilidad de C. glabrata al H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en ausencia de sirtuinas.</i>	130
Ilustración 16   <i>Susceptibilidad de C. glabrata a la menadiona en ausencia de sirtuinas.</i> .....	131
Ilustración 17   <i>Susceptibilidad al fluconazol de las mutantes hst1Δ y sum1Δ reconstituidas.</i> .....	131
Ilustración 18   <i>Viabilidad cronológica de C. glabrata en ausencia de sirtuinas.</i> .	133
Ilustración 19   <i>Susceptibilidad al fluconazol de las cepas BG14, hst1Δ y sum1Δ en medio CAA.</i> .....	136
Ilustración 20   <i>Influjo del medio en los niveles de transcrito de CDR1 en BG14 y hst1Δ.</i> .....	137

Ilustración 21  <i>Curva de crecimiento de las cepas BG14 y mutante hst1Δ en YPDu, YDu y PDu.</i> .....	138
Ilustración 22  <i>Susceptibilidad de C. glabrata al fluconazol en medio rico completo (YPDu), sin peptona (YDu) o sin extracto de levadura (PDu).</i> .....	139
Ilustración 23   <i>Influjo del medio condicionado por distintas cepas de C. glabrata en la susceptibilidad al fluconazol.</i> .....	140
Ilustración 24   <i>Árbol filogenético de secuencias Sum1 de hemiascomicetos.</i> ....	143
Ilustración 25   <i>Diagrama de los bloques proteicos conservados entre las proteínas de la familia Sum1.</i> .....	144
Ilustración 26   <i>Ensayo de complementación de la mutante sum1Δ de C. glabrata.</i> .....	145
Ilustración 27   <i>Alineamiento de las secuencias de Yap1 de S. cerevisiae y de C. glabrata.</i> .....	146
Ilustración 28  <i>Alineamiento de las secuencias de Skn7 de S. cerevisiae y de C. glabrata.</i> .....	147
Ilustración 29   <i>Análisis de la interacción de Yap1-Flag y Skn7-cMyc por co-inmunoprecipitación.</i> .....	148

## Acrónimos y abreviaturas

<b>5-FOA</b>	Ácido 5-fluorótico, del inglés 5- <u>f</u> luo <u>r</u> otic <u>a</u> cid.
<b>ABC</b>	Casete de unión a ATP, del inglés <u>A</u> TP <u>b</u> inding <u>c</u> assette.
<b>ADN</b>	<u>Á</u> cido <u>d</u> esoxirribo <u>n</u> ucleico.
<b>AN</b>	<u>Á</u> cido <u>n</u> icotínico.
<b>ARE</b>	Elemento de respuesta a AP-1, del inglés <u>A</u> P-1 <u>r</u> esponse <u>e</u> lement.
<b>ATP</b>	Trifosfato de adenosina, del inglés <u>a</u> denosine <u>t</u> riphosphate.
<b>BMDM</b>	Macrófagos derivados de la médula ósea, del inglés <u>b</u> one <u>m</u> arrow <u>d</u> erived <u>m</u> acrophage.
<b>BM-DC</b>	Células dendríticas de ratón derivadas de médula ósea, del inglés <u>b</u> one <u>m</u> arrow <u>d</u> erived <u>d</u> endritic <u>c</u> ells.
<b>CAA</b>	Medio cas <u>a</u> mino <u>á</u> cidos.
<b>Cg</b>	Referente a <u>C</u> andida <u>g</u> labrata.
<b>ChIP</b>	Ensayo de inmunoprecipitación de la cromatina, del inglés <u>c</u> hromatin <u>i</u> mmunoprecipitation.
<b>DC</b>	Células dendríticas, del inglés <u>d</u> endritic <u>c</u> ells.
<b>ERC</b>	Círculo extracromosómico del ADN ribosomal, del inglés <u>e</u> xtrachromosomic <u>r</u> DNA <u>c</u> ircle.
<b>ERO</b>	<u>E</u> species <u>r</u> eactivas de <u>o</u> xígeno.
<b>FLC</b>	<u>F</u> lu <u>c</u> onazol.
<b>FRT</b>	Secuencias de reconocimiento de recombinasa Flp1p, del inglés <u>f</u> lippase <u>r</u> ecognition <u>t</u> arget.
<b>GOF</b>	Ganancia de función, del inglés <u>g</u> ain <u>o</u> f <u>f</u> unction.
<b>GPI</b>	Glicosil-fosfatidilinositol, del inglés glycosyl phosphatidylinositol.
<b>GSH</b>	Glutación, tripéptido formado por glicina, cisteína y ácido glutámico.
<b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></b>	Peróxido de hidrógeno.
<b>IS</b>	<u>I</u> nfección <u>s</u> istémica.
<b>IFN</b>	<u>I</u> nter <u>f</u> erón.
<b>MDM</b>	Macrófagos derivados de monocitos, del inglés <u>m</u> onocyte- <u>d</u> erived

macrophages.

<b>MFS</b>	Superfamilia facilitadora principal, del inglés <u>m</u> ajor <u>f</u> acilitator <u>s</u> uperfamily
<b>MSE</b>	Elemento de la esporulación intermedia, del inglés <u>m</u> iddle <u>s</u> porulation <u>e</u> lement.
<b>NAD<sup>+</sup></b>	<u>N</u> icotinamida <u>a</u> denina <u>d</u> inucleótido. NADH corresponde a la forma reducida. El NADP <sup>+</sup> es la forma fosforilada y también puede reducirse (NADPH)
<b>NAM</b>	<u>N</u> icotin <u>a</u> mida
<b>NR</b>	Ribósido de nicotinamida del inglés <u>n</u> icotinamide <u>r</u> iboside.
<b>O<sub>2</sub><sup>•-</sup></b>	Radical superóxido.
<b>DO<sub>600</sub></b>	Densidad óptica registrada a la longitud de onda de 600nm. Del inglés <u>O</u> ptical <u>D</u> ensity, y equivale a la absorbencia en este punto del espectro visible (A600nm).
<b>OH<sup>•</sup></b>	Radical hidroxilo.
<b>ORF</b>	Marco abierto de lectura, del inglés <u>o</u> pen <u>r</u> eading <u>f</u> rame.
<b>OSRE</b>	Elemento de respuesta a estrés oxidante, del inglés, <u>o</u> xidative <u>s</u> tress <u>r</u> esponse <u>e</u> lement.
<b>PAMP</b>	Patrones moleculares asociados a patógenos, del inglés <u>p</u> athogen- <u>a</u> ssociated <u>m</u> olecular <u>p</u> atterns.
<b>PBMC</b>	Monocitos humanos de sangre periférica, del inglés <u>p</u> eripheral <u>b</u> lood <u>m</u> ononuclear <u>c</u> ells.
<b>PCR</b>	Reacción en cadena de la polimerasa, del inglés <u>p</u> olymerase <u>c</u> hain <u>r</u> eaction.
<b>PDE</b>	Elemento de cambio posdiáuxico, del inglés <u>p</u> ost <u>d</u> iauxic <u>s</u> hift <u>e</u> lement.
<b>PDRE</b>	Elemento de respuesta pleiotrópica farmacológica, del inglés pleiotropic drug resistance.
<b>PMN</b>	Leucocitos <u>p</u> ol <u>i</u> mor <u>f</u> on <u>u</u> cleares
<b>PRR</b>	Receptores reconocedores de patrones, del inglés <u>p</u> attern

- recognition receptor.
- REO** Respuesta al estrés oxidante.
- RT-PCR** Reacción de la cadena de polimerasa en transcripción reversa, del inglés reverse transcription polymerase chain reaction.
- Sc** Referente a Saccharomyces cerevisiae.
- SOD** Superóxido dismutasa.
- STRE** Elemento de respuesta a estrés, del inglés stress response element.
- TLR** Receptores tipo Toll, del inglés Toll-like receptor.
- YPD** Medio de extracto de levadura, peptona y dextrosa. yeast extract-peptone-dextrose.
- YRE** Elemento de respuesta a Yap1p, del inglés Yap1p response element.

## Glosario

**Árbol génico:** Diagrama ramificado que representa las relaciones conocidas o inferidas de un grupo de genes o secuencias de aminoácidos históricamente relacionados.

**Comensalismo:** Relación interespecífica entre dos organismos vivos, donde uno de los individuos se beneficia y el otro no se es perjudicado ni favorecido.

**Epistasis:** Interacción entre los productos de dos genes en el cual un gen interfiere la expresión fenotípica del otro.

**Especiación:** Proceso mediante el cual una población de una determinada especie da lugar a otra u otras poblaciones, aisladas reproductivamente de la población anterior y entre sí, que con el tiempo irán acumulando otras diferencias genéticas.

**Fungemia:** Infección sistémica causada por hongos.

**Filogenia:** La secuencia de eventos involucrados en el desarrollo evolutivo de una especie o un grupo taxonómico de organismos.

**Homólogo:** Un gen relacionado a otro gen por descender de una secuencia ancestral de ADN.

**Oportunista:** Denota a un microorganismo que no causa ordinariamente enfermedad, pero que bajo ciertas circunstancias se vuelve patógeno.

**Ortólogo:** Genes en diferentes especies que evolucionaron a partir de un gen ancestral común por especiación. Normalmente, los genes ortólogos retienen la misma función a lo largo de la evolución.

**Parálogo:** Genes relacionados por la duplicación dentro de un genoma. Por lo general genes parálogos evolucionan nuevas funciones, incluso si están

relacionadas a la original.

**Patogenicidad:** La capacidad potencial de producir enfermedad o cambios patológicos en un hospedero.

**Sintenia:** Es la localización conservada de genes en posiciones equivalentes en especies relacionadas con el mismo ancestro. También puede expresarse como la conservación o coherencia del contenido de genes y su orden en los cromosomas de diferentes genomas.

**Virulencia:** El grado de patogenicidad dentro de una especie. Es una medida cuantitativa de la patogenicidad y representa la severidad de la infección.

.

## Resumen

### **En *Candida glabrata* el silenciamiento local controla la respuesta al estrés oxidante y la resistencia múltiple a los fármacos**

En *Candida glabrata* las sirtuinas Sir2 y Hst1 regulan parcialmente la expresión de una gran cantidad de genes. Dentro de los genes regulados por estas sirtuinas destacan los que codifican para las adhesinas epiteliales y para los transportadores de niacina, que son requeridos para la colonización del hospedero y el crecimiento, respectivamente. Sin embargo, dado que las sirtuinas son susceptibles a inactivarse *in vivo*, nos preguntamos si la inhibición de las sirtuinas podría modificar la respuesta de *C. glabrata* a las condiciones de estrés. En este trabajo encontramos que la delección de *HST1* disminuye la susceptibilidad de *C. glabrata* al fluconazol y al peróxido de hidrógeno. Nuestros experimentos indican que el factor Pdr1 y el transportador Cdr1 median el fenotipo resistente al fluconazol de la cepa *hst1*Δ. Por otra parte, el activador Msn4 y la catalasa (Cta1) son necesarios para proveer de resistencia al estrés oxidante. Además, demostramos que el factor de transcripción Sum1 interacciona físicamente con Hst1 y que participa en la regulación de los genes que confieren la resistencia. Finalmente, *C. glabrata* está relacionada filogenéticamente con la levadura *Saccharomyces cerevisiae*. Sin embargo, encontramos que la delección de *HST1* sólo modifica la susceptibilidad al fluconazol y al peróxido de hidrógeno en *C. glabrata* pero no en *Saccharomyces cerevisiae*, lo que sugiere un control distinto con sirtuinas similares. En conjunto, nuestros resultados sugieren que Hst1 funciona como un regulador de los genes asociados con la resistencia en el patógeno oportunista *C. glabrata*.

**PALABRAS CLAVE:** Sirtuinas, nicotinamida, Hst1, fluconazol, peróxido de hidrógeno, Sum1

## Abstract

### **Local silencing controls the oxidative stress response and the multidrug resistance in *Candida glabrata***

In *Candida glabrata*, the sirtuins Sir2 and Hst1 control the expression of a wide number of genes including adhesins required for host colonization and niacin transporters needed for growth. Given that these sirtuins can be inactivated during infection, we asked if their inhibition could modify the response of *C. glabrata* to other stressful conditions. Here, we found that deletion of *HST1* decreases susceptibility of *C. glabrata* to fluconazole and hydrogen peroxide. The transcription factor Pdr1 and the ABC transporter Cdr1 mediated the fluconazole resistance phenotype of the *hst1* $\Delta$  cells, whereas the transcriptional activator Msn4 and the catalase Cta1 are necessary to provide oxidative stress resistance. We show that the transcription factor Sum1 interacts with Hst1 and participate in the regulation of these genes. Interestingly, even though *C. glabrata* and *Saccharomyces cerevisiae* are closely related phylogenetically, deletion of *HST1* decreased susceptibility to fluconazole and hydrogen peroxide only in *C. glabrata* but not in *S. cerevisiae*, indicating a different transcriptional control by two similar sirtuins. Our findings suggest that Hst1 acts as a regulator of stress resistance associated-genes.

KEY WORDS: Sirtuins, nicotinamide, Hst1, fluconazole, hydrogen peroxide, Sum1.

# 1. INTRODUCCIÓN

## 1.1. Las micosis

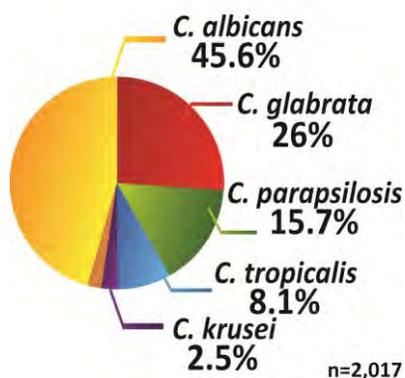
Los hongos son organismos muy diversos que pueden habitar en una extensa variedad de nichos, desde animales y plantas hasta los ambientes más extremos de la Tierra. Por fortuna, y a pesar de esta diversidad, relativamente pocas especies pueden causar enfermedades a los humanos<sup>1-2</sup>. Los agentes más importantes de las micosis sistémicas son los géneros *Candida*, *Cryptococcus*, *Aspergillus* y algunos mucorales<sup>1</sup>.

Las micosis son un importante problema de salud pública porque su incidencia se ha incrementado dramáticamente desde finales del siglo pasado<sup>1</sup>. Varios autores concuerdan en que la principal causa de este fenómeno es el incremento de la población susceptible<sup>2-4</sup>. Esta población se comprende por personas inmunodeficientes, principalmente pacientes infectados con el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), pacientes trasplantados y cancerosos. Desafortunadamente las micosis son de difícil diagnóstico por que la manifestación clínica de estas enfermedades es muy variable. Aunado a esto y no obstante los avances de la medicina, el tratamiento farmacológico de las micosis es problemático. Dado que los hongos son eucariontes y, comparten muchos de sus procesos celulares con los humanos, esto dificulta desarrollar fármacos eficientes y con baja toxicidad<sup>5</sup>. Además, a la fecha no existen vacunas estandarizadas contra ningún hongo causante de micosis y su desarrollo todavía debe superar obstáculos experimentales y logísticos importantes<sup>6-7</sup>. En conjunto, estas características explican por qué las micosis causan una mortalidad que oscila entre un 50-95%<sup>1,8</sup>. Es por ello que el estudio de los hongos causantes de micosis es una prioridad en la investigación médica.

## 1.2. Las candidiasis

Sí bien los agentes etiológicos de las fungemias son diversos, es indudable que la mayoría de estas infecciones son causadas por levaduras del género *Candida*. La principal causa que explica esta prevalencia es que estas levaduras son

comensales de las mucosas de la mayoría de los individuos sanos<sup>9</sup>. Es por ello que las candidiasis suelen ser de origen endógeno, en donde el paciente es su propia fuente infectiva, tanto en enfermedades de las mucosas como sistémicas. Sin embargo, las candidiasis exógenas también son frecuentes debido a la presencia de vehículos contaminados. Además existen estudios que han documentado la transmisión del personal del hospital al paciente<sup>10</sup> así como entre pacientes, especialmente en la unidad de cuidados intensivos<sup>11</sup>. Entonces, no es sorprendente que las especies de *Candida* sean la cuarta causa de infecciones sistémicas (IS) hospitalarias en Estados Unidos, con porcentajes entre el 8-10% del total<sup>1</sup>. Cabe resaltar que entre más de las 100 especies de *Candida*, sólo cinco son las responsables de >95% de las candidemias a nivel mundial: *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis* y *C. krusei*<sup>12</sup>. En la Ilustración 1 se muestra la distribución de estas especies en Norteamérica (EUA y Canadá).



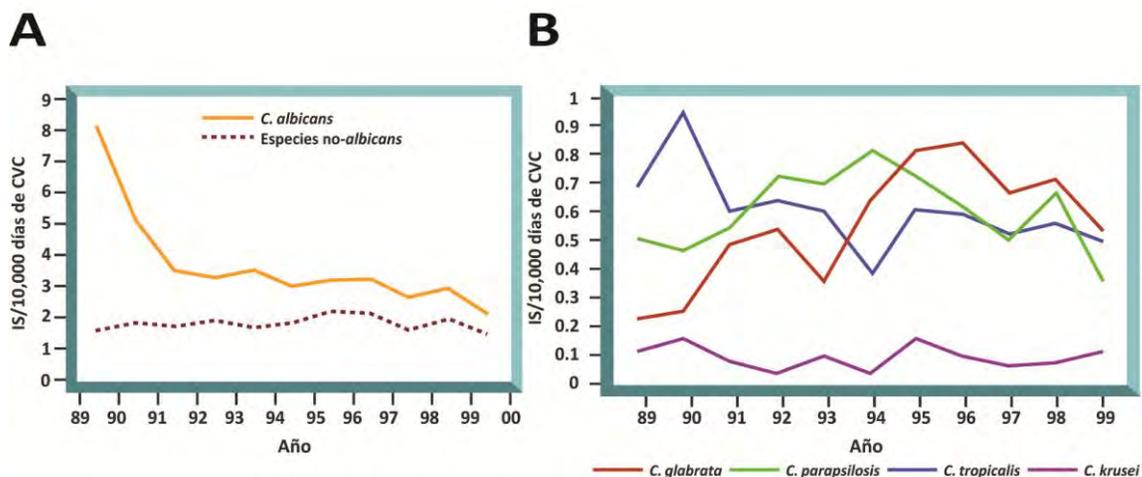
**Ilustración 1 | Distribución de especies de *Candida* causantes de candidemias en Norteamérica.**

Los datos corresponden a la suma de los casos registrados en los pacientes de medicina general, pacientes con enfermedades hematológicas, trasplantados con células troncales y/u órganos, pacientes con el síndrome de inmunodeficiencia adquirida, neonatos de la unidad de cuidados intensivos y pacientes con tumores. En total suman 2,017 personas infectadas en el periodo 2004-2008. Figura generada a partir de los datos recopilados por Pfaller *et al.* (2010)<sup>12</sup>.

Desafortunadamente, en México se carece de estudios epidemiológicos tan detallados sobre las candidiasis. Los esfuerzos de González y colaboradores han contribuido de forma importante al determinar la distribución de las especies causantes de candidiasis en pacientes de Monterrey<sup>13</sup> y en pacientes pediátricos a nivel nacional<sup>14</sup>. En base a los resultados de sus trabajos, los autores sugieren la formación de un programa nacional permanente de vigilancia epidemiológica de candidemias, una propuesta sensata frente al problema de salud pública que representan estas micosis a nivel mundial.

### 1.3. *Candida glabrata*: un patógeno emergente

Varios estudios internacionales indican que la mayoría de las candidemias son ocasionadas por *C. albicans*<sup>15</sup> (Ilustración 1 y 2A). No obstante, en las últimas décadas, ha existido una tendencia en la disminución significativa de las infecciones causadas por este hongo dimórfico, tanto en EUA como en 40 países más<sup>15</sup>. Destaca que esta reducción se ha acompañado de la emergencia de otras levaduras, en particular de *C. glabrata*<sup>16-17</sup>. Al respecto, Trick *et al.* utilizaron la prueba de  $\chi^2$  para demostrar que hubo un descenso significativo de la incidencia de infecciones por *C. albicans* ( $P < 0.001$ ) durante el periodo 1989-1999 en hospitales estadounidenses (Ilustración 2A). Aunque los autores no encontraron variaciones significativas en las infecciones causadas por el conjunto de especies no-*albicans* (Ilustración 2A,  $P = 0.53$ ), el análisis individual indicó un incremento significativo en las infecciones causadas por *C. glabrata* a partir de 1993<sup>17</sup> (Ilustración 2B,  $P = 0.05$ , línea roja).

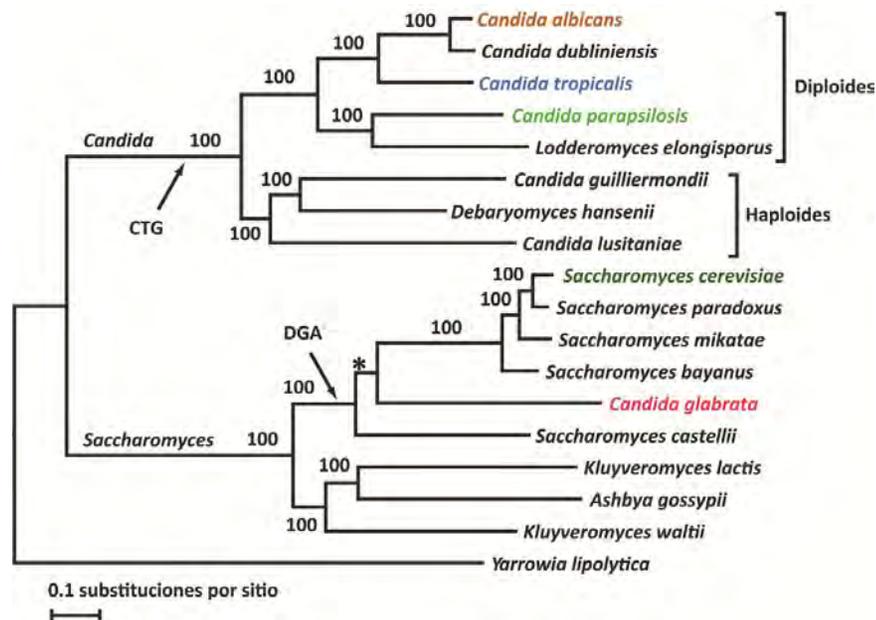


**Ilustración 2 | Incidencia de las infecciones sistémicas hospitalarias causadas por *Candida* spp.**

**A** Número de infecciones sistémicas ocasionadas por *C. albicans* y especies no-*albicans* por cada 10,000 días de catéter venoso central en el periodo 1989-1999. **B** Distribución de las infecciones causadas por cada especie diferente a *albicans*. Los datos provienen del programa de vigilancia de infecciones de la unidad de cuidados intensivos de los hospitales estadounidenses afiliados al sistema nacional de vigilancia de infecciones hospitalarias en el periodo 1989-1999. Modificada de Trick *et al.* (2002)<sup>17</sup>. IS, infecciones sistémicas; CVC, catéter venoso central.

Este cambio epidemiológico es relevante porque *C. glabrata* causa infecciones con índices de mortalidad tan elevados como *C. albicans*<sup>18</sup> (~40 %) y porque *C. glabrata* es intrínsecamente resistente a los fármacos azólicos<sup>19-20</sup>. Sin

embargo, tal vez una de las características más interesantes de *C. glabrata* es su posición filogenética. A pesar de su nombre, *C. glabrata* es una levadura filogenéticamente más relacionada a la levadura *Saccharomyces cerevisiae* que al resto de las especies de *Candida*<sup>21-22</sup> (Ilustración 3). Se ha sugerido que esta cercanía filogenética podría resultar útil en la comprensión del comportamiento patogénico de *C. glabrata*. Es probable que como consecuencia de su adaptación al hospedero, *C. glabrata* haya desarrollado mecanismos que le permiten adaptarse a condiciones ambientales hostiles y asegurar su supervivencia. Es por ello que en el presente documento se revisarán los factores que proveen a *C. glabrata* de esta capacidad adaptativa.



**Ilustración 3 | Filogenia de las especies secuenciadas de los clados *Candida* y *Saccharomyces*.** Butler *et al.* construyeron el árbol filogenético a partir de varias secuencias peptídicas. Los 706 ortólogos fueron alineados en las 18 especies con el programa MUSCLE (alineamiento múltiple de secuencias con alta precisión y rendimiento). Posteriormente, la filogenia se infirió a partir del programa MrBayes 3.1.2. Las probabilidades están indicadas con números encima de las ramas. El asterisco (\*) marca la rama que se construyó con base en la conservación sinténica. La leyenda CTG indica que las levaduras del clado *Candida* utilizan el codón CUG para traducir serina en vez de leucina. La leyenda DGA marca el evento de la duplicación genómica ancestral. Figura modificada de Butler *et al.* (2009)<sup>21</sup>.

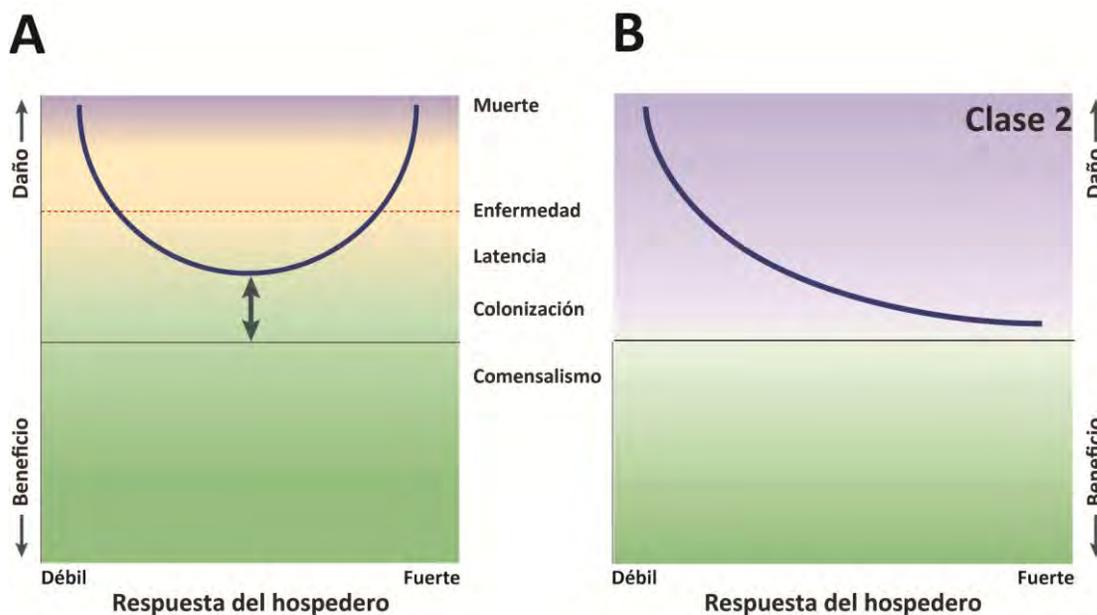
#### **1.4. Características de *C. glabrata***

*C. glabrata* es una levadura haploide, no dimórfica y asexual, presente en forma de blastoconidio, tanto en su fase comensal como patógena. El genoma de la cepa CBS138 de *C. glabrata* fue secuenciado en el año 2004 por parte del proyecto Génolevures<sup>23</sup>. Este genoma consta de 12.3 Mb distribuidos en 13 cromosomas (A-M), con alrededor de 5,000 regiones codificantes y 207 genes de tRNA. El contenido de guanina y citosina es de 38.8%, el cual es parecido al de *S. cerevisiae* (38.3%). Aunado a ello, de acuerdo con el buscador de orden genético de levaduras (YGOB), *C. glabrata* y *S. cerevisiae* presentan un alto grado de sintenia<sup>24</sup>. Cabe resaltar que a diferencia de *S. cerevisiae*, *C. glabrata* conserva un menor número de bloques génicos duplicados por lo que se ha sugerido que este patógeno oportunista experimentó una evolución reductiva como resultado de su interacción con su hospedero<sup>23</sup>. Gracias a estas características, gran parte de las herramientas moleculares desarrolladas para *S. cerevisiae* pueden ser utilizadas en *C. glabrata*.

#### **1.5. La interacción de *C. glabrata* con el hospedero**

En las micosis, los mecanismos de defensa del hospedero influyen notablemente en la manifestación y severidad de la enfermedad. Casadevall y Pirofski, han propuesto el marco “daño-respuesta” para entender la patogénesis microbiana<sup>25</sup>. Este concepto propone que la enfermedad es el resultado de la interacción del microorganismo con la respuesta inmunológica del hospedero y que el daño a este puede ser causado tanto por factores microbianos como por la magnitud de la respuesta inmunológica (Ilustración 4A). A partir de la curva presentada en la Ilustración 4A, los autores clasifican a los microorganismos en seis clases. De acuerdo con las características de *Candida* spp., proponen que estas levaduras pertenecen a la clase 2, donde se encuentran los patógenos que dañan al hospedero cuya respuesta inmune es débil o normal (Ilustración 4)<sup>25</sup>. Los patógenos clase 2 se encuentran en fase comensal cuando su población es controlada y restringida a su nicho ecológico por competencia con otros microbios y por la respuesta inmune del hospedero. Un cambio en el equilibrio del sistema

que lleve a una alteración de la microbiota con un marcado incremento de la población patogénica puede causar la invasión de otros tejidos. El daño se presenta cuando la respuesta del hospedero es insuficiente para erradicar al microorganismo y cuando el daño alcanza un nivel umbral se manifiesta la enfermedad. La propuesta de Casadevall y Pirofski es altamente enriquecedora para analizar las infecciones microbianas desde ambos aspectos: el microbiológico y el inmunológico y de esta forma avanzar en el entendimiento de estos padecimientos.



**Ilustración 4 | El marco daño-respuesta.**

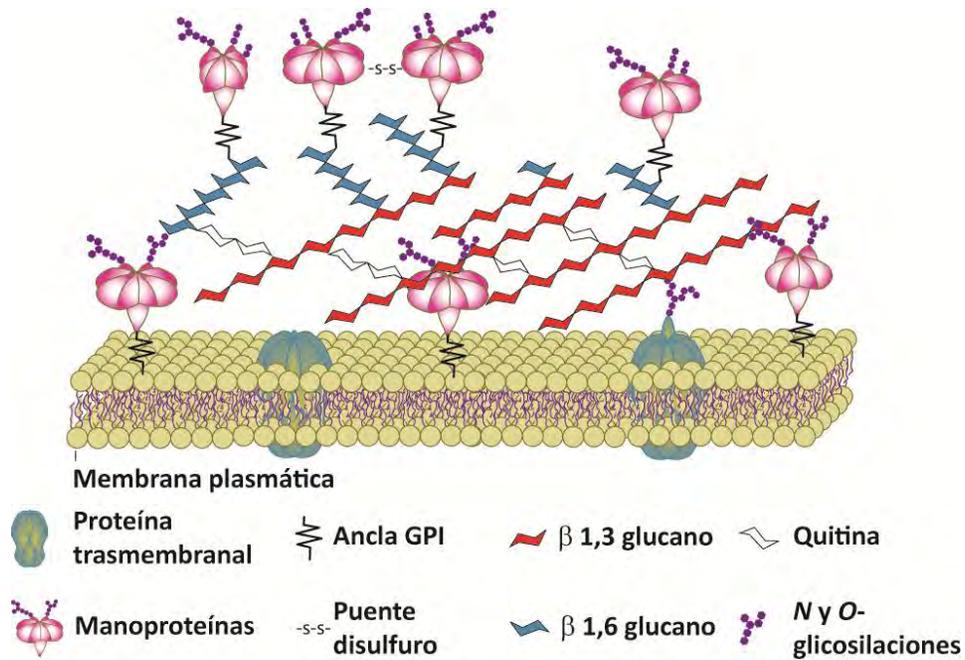
**A** Curva básica del marco daño-respuesta. Pirofski y Casadevall proponen que el resto de las curvas de interacción se pueden derivar de esta curva básica. La flecha central indica que la posición de la curva es variable y depende de la interacción específica del microorganismo con el hospedero. El eje de las abscisas indica el daño al hospedero en función de su respuesta inmunológica. Esta respuesta está representada en el eje de las ordenadas como un continuo que va desde “débil” a “fuerte”. Las respuestas débiles son insuficientes o inapropiadas para erradicar al microorganismo. Las respuestas fuertes son excesivas y pueden dañar al hospedero. **B** Curva de los microorganismos clase 2 de acuerdo al marco daño-respuesta. Cuando el daño alcanza un nivel umbral, el hospedero se vuelve sintomático, adquiere la enfermedad y en los casos más graves, muere. La escala de colores del fondo, verde, amarillo y morado representan salud, enfermedad y enfermedad severa, respectivamente. Figura modificada de Casadevall y Pirofski (2003)<sup>25</sup>.

Como hongo patógeno oportunista, *C. glabrata* tiene una interacción compleja con el sistema inmune del hospedero. Al tratarse de una levadura comensal, *C. glabrata* ha adquirido un par de características importantes: 1) la evolución de estrategias eficientes de evasión de la respuesta inmune y 2) una prolongada

estimulación antigénica del hospedero que puede tener marcadas consecuencias inmunomoduladoras<sup>26</sup>. En este apartado se discutirá la colonización de los tejidos por *C. glabrata* y posteriormente el reconocimiento de esta levadura por el sistema inmunológico. Finalmente, se describirán las estrategias que este microorganismo ha desarrollado para evadir esta respuesta inmune. Se realizará la comparación con otros hongos, en particular *C. albicans* para demostrar que aún cuando causan infecciones sistémicas y de mucosas con manifestaciones clínicas muy semejantes<sup>27</sup>, sus factores de virulencia y estrategias de evasión son diferentes<sup>28</sup>.

### **1.6. Adherencia y colonización del hospedero**

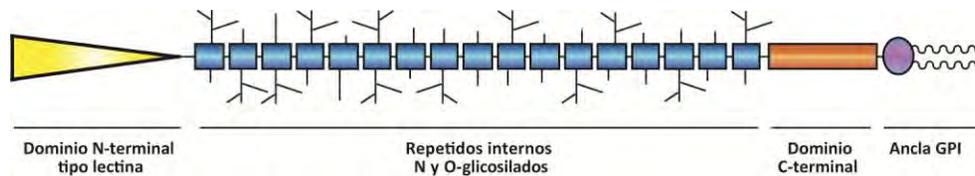
Para cualquier microorganismo, comensal o patógeno, un paso esencial en su interacción con el hospedero es la adherencia. Es por ello que las proteínas fúngicas responsables de esta adhesión son consideradas determinantes de virulencia<sup>29-32</sup>. Dichas proteínas están contenidas en la pared celular, la estructura que brinda forma y protección a los hongos<sup>29,33</sup>. En la Ilustración 5 se muestra un esquema con los componentes generales de la pared de los ascomicetos. Aproximadamente un 60-70% del total de la masa de la pared está formada por carbohidratos como los  $\beta$ -D-glucanos y la quitina, un polímero de *N*-acetilglucosamina. Varios estudios señalan que la parte más externa de la pared fúngica es rica en manoproteínas *N*- y *O*-glicosiladas, las cuales se unen a través de anclas de glicosilfosfatidilinositol (GPI) al esqueleto interno de la pared, donde residen la quitina y los  $\beta$ -D-glucanos.



**Ilustración 5 / La pared fúngica de los ascomycetos.**

La pared fúngica forma una bicapa compuesta en su parte más interna por una red fibrosa de carbohidratos complejos (quitina,  $\beta$ 1,6 y  $\beta$ 1,3-glucano) y una capa externa constituida por proteínas glicosiladas covalentemente unidas al manto de glucano. La estructura está relativamente conservada entre la mayoría de los hongos del filo *Ascomycetes*.

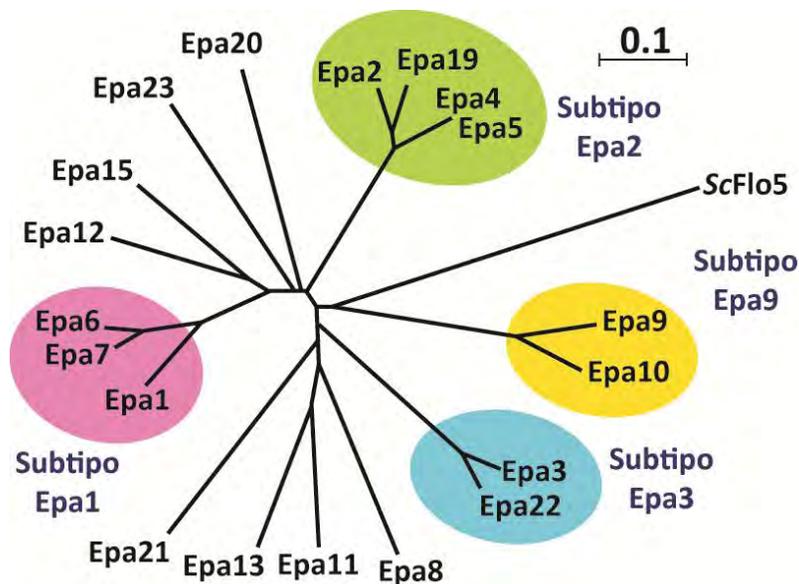
Precisamente, la mayoría de las adhesinas fúngicas son glicoproteínas con ancla GPI. La estructura primaria de las adhesinas contiene varias características conservadas que se muestran en la Ilustración 6. En la porción amino terminal contienen un péptido señal que las dirige al retículo endoplásmico, mientras que el carboxilo terminal las ancla al lípido de GPI preformado en este compartimento. La elevada complejidad de la secuencia del N-terminal parece ser la responsable de las interacciones de las adhesinas con sus ligandos, ya sean carbohidratos u otras proteínas (Ilustración 6)<sup>32,34</sup>. Sin embargo, el dominio interno rico en secuencias repetidas en tándem se encuentra muy glicosilado y se cree que también es capaz de mediar la adherencia. Es importante resaltar que esta secuencia está sujeta a variación en su longitud que se genera mediante eventos de recombinación del ADN durante la replicación<sup>32,35</sup>. Se ha propuesto que el número de repeticiones ocasiona un cambio antigénico y al mismo tiempo la creación de adhesinas diferentes que reconocen otros sustratos<sup>35</sup>.



**Ilustración 6 | La estructura típica de las adhesinas fúngicas.**

El dominio N-terminal se une específicamente a los azúcares de algunas proteínas. La larga porción intermedia contiene secuencias repetidas, generalmente serinas y treoninas. Esta porción se encuentra muy *N*- y *O*-glicosilada y se piensa que están implicadas en la adherencia al ligando. El dominio C-terminal contiene el ancla GPI que las une transitoriamente a la membrana celular. Eventualmente el ancla GPI es escindida y la adhesina se une subsecuentemente al exterior de la pared. Figura tomada de Vestrepen y Fink (2009)<sup>35</sup>.

Al momento, se han identificado diferentes adhesinas en algunos hongos patógenos como *C. albicans*, *Aspergillus fumigatus*, *Cryptococcus neoformans*, *Coccidioides immitis*, *Blastomyces dermatitidis* y *C. glabrata*<sup>29</sup>. Con respecto a *C. glabrata*, el análisis del genoma de la cepa CBS138 reveló que contiene un número excepcionalmente grande de secuencias que pueden codificar para proteínas de pared con ancla GPI (aprox. 66)<sup>36-37</sup>. de Groot *et al.* han propuesto una clasificación que divide estas proteínas en siete subgrupos, en función de la variación de la secuencia N-terminal. Es de destacar que cerca de 44 de los genes que codifican para las adhesinas se localizan en regiones subteloméricas<sup>40-41</sup>, lo cual posiblemente contribuya en la generación de las variantes<sup>35</sup>. El grupo más grande y estudiado corresponde a las adhesinas epiteliales (*EPA*). Algunos de los miembros de este grupo participan en la adherencia a células epiteliales y en la formación de biopelículas<sup>38-40</sup>. En la Ilustración 7 se muestra la filogenia de las adhesinas *Epa* de la cepa secuenciada de *C. glabrata* (CBS138). Sin embargo, se ha visto que el número de genes que codifican para las adhesinas *EPA* es variable en cada cepa aislada. Por ejemplo, la cepa CBS138 contiene 19 genes mientras que BG2 cuenta con 23<sup>41-42</sup>. Es interesante destacar que los genes *EPA* ortólogos en estas dos cepas no son idénticos y frecuentemente presentan una longitud variable. Con base en estas observaciones se ha sugerido que esta variación intraespecie debe dotar de una plasticidad a las adhesinas de *C. glabrata* y la unión con diferentes ligandos<sup>35,43</sup>.



**Ilustración 7 | Filogenia de los dominios Epa.**

El árbol filogenético está basado en el alineamiento de las secuencias de aminoácidos de los dominios tipo PA14 de *C. glabrata* y Flo5 de *S. cerevisiae*. La familia Epa muestra cuatro principales subtipos: Epa1 (rosa), Epa2 (verde), Epa9 (amarillo) y Epa3 (azul). La barra indica las distancias filogenéticas en número de sustituciones de aminoácidos por posición. Figura tomada de Maestre-Reyna *et al.* (2012)<sup>43</sup>

Una característica de todas las proteínas Epa estudiadas es que despliegan propiedades tipo lectina; es decir, que son capaces de unir azúcares en presencia de calcio. El dominio efector que media el reconocimiento de los carbohidratos se denomina PA14 y se localiza dentro de los 300 aminoácidos del N-terminal de estas adhesinas<sup>34</sup>. Zupancic *et al.* encontraron por medio de glicoarreglos que Epa1, Epa6 y Epa7 se unen a oligosacáridos que contienen residuos de galactosa. Además determinaron que Epa6 se une a una mayor variedad de ligandos, desde galactosas unidas mediante enlaces  $\beta$ -1,3 o  $\beta$ -1,4 a glucosa, galactosa o sus derivados *N*-acetilados<sup>34</sup>. En contraste, Epa1 tiene una preferencia por glucanos unidos en enlace  $\beta$ -1,3 y menor afinidad por carbohidratos unidos por enlaces glucosídicos tipo  $\alpha$ <sup>34,43-44</sup>. Finalmente, dedujeron que Epa7 es la adhesina más específica porque se une casi exclusivamente a ligandos con disacáridos de galactosas unidos en enlace  $\beta$ -1,3 o bien, galactosa y glucosa con enlace  $\beta$ -1,4<sup>34</sup>. Estos análisis son consistentes con los hallazgos de que estas adhesinas se unen a la superficie de las células del hospedero, generalmente O-glicosiladas<sup>43</sup>. Finalmente, se demostró que la especificidad de sustrato de Epa1, 2, 3, 6 y 7 es

conferida por los dominios estructurales de unión al calcio (CBL1 y CBL2), así como por las asas externas (L1, L2 y L3) de la estructura de las Epa<sup>43</sup>.

Las evidencias antes mencionadas indican que el genoma de *C. glabrata* cuenta con un número grande y variable de adhesinas con diferentes especificidades y afinidades por sus sustratos. Las adhesinas mejor estudiadas de *C. glabrata* son Epa1, Epa6 y Epa7 porque las tres confieren adherencia a las células epiteliales y endoteliales humanas<sup>34,38,43,45</sup>. Se ha visto que la delección de *EPA1* es suficiente para reducir considerablemente la adherencia de *C. glabrata* a células de mamífero *in vitro* porque el resto de los genes *EPA* se transcriben a bajos niveles en estas condiciones experimentales<sup>46-47</sup>. Con respecto a la regulación de los genes *EPA*, se ha reportado que la mayoría de ellos son reprimidos por el silenciamiento subtelomérico<sup>39,46-47</sup>. Con excepción de *EPA8*, *EPA9* y *EPA10*, el resto de los 20 genes *EPA* de la cepa BG2 son subteloméricos<sup>42</sup>. Este proceso represivo es dependiente de las proteínas del silenciamiento Sir2, Sir3, Sir4, Ku70/80 y Rif1<sup>46-47</sup>. La importancia de esta regulación reside en que la desacetilasa de histonas Sir2 mantiene la cromatina en un estado de represión de la transcripción mediante el uso del dinucleótido de nicotinamida y adenina (NAD<sup>+</sup>). Dado que *C. glabrata* es incapaz de sintetizar NAD<sup>+</sup> *de novo*<sup>48</sup>, esta levadura depende de la disponibilidad ambiental de los precursores de NAD<sup>+</sup> (niacina) para mantener el silenciamiento<sup>45</sup>. Debido a esto, la limitación de niacina causa la inactivación de Sir2 y en consecuencia la desrepresión de las adhesinas que normalmente silenciadas (*EPA6* y *EPA7*) las cuales incrementan la adherencia a las células epiteliales<sup>45</sup>.

Aún cuando el silenciamiento subtelomérico es completamente dependiente del complejo Sir, se ha publicado que hay telómeros cuya represión es diferente, ya que puede prescindir de las proteínas Ku y Rif1<sup>49</sup>. Una de estas regiones subteloméricas se encuentra en el brazo derecho del cromosoma E y contiene a los genes *EPA1*, *EPA2* y *EPA3*. En contraste con otras regiones subteloméricas, el silenciamiento de esta zona es a través de un elemento en *cis* que se localiza entre *EPA3* y el telómero. Este protosilenciador es el responsable de la represión regional aparentemente independiente de las proteínas Ku<sup>50</sup>. Además, dentro de

este grupo de genes *EPA* existe otro elemento en *cis* denominado elemento negativo y que se ubica entre *EPA1* y *EPA2*. La presencia del elemento negativo es necesaria para la represión de la transcripción de *EPA1* en un mecanismo dependiente de las proteínas Ku y que opera tras la entrada de la levadura a fase de crecimiento estacionario<sup>51</sup>. Entonces existen al menos dos mecanismos que reprimen la expresión de *EPA1*: uno que depende del silenciamiento subtelomérico y otro dependiente del elemento negativo. Esta regulación podría explicar lo observado por Halliwell *et al.* quienes han reportado que la expresión de *Epa1* en la superficie de *C. glabrata* es muy heterogénea aunque la población de levaduras sea genéticamente idéntica. Los autores proponen que esta diferencia en el grado de silenciamiento de *EPA1* se debe al ruido en la transcripción que es inherente al mecanismo epigenético del silenciamiento. Esta observación es respaldada por el hecho de que la delección de *SIR3* homogeniza los niveles de expresión de *Epa1* en la población mutante<sup>52</sup>. Marcadamente, existe una elevada variación en la expresión de los genes *EPA* en aislados clínicos de *C. glabrata*. Aún más, algunas de estas cepas cuentan con polimorfismos en la secuencia de *SIR3* que podrían afectar el silenciamiento y, por ende, la regulación de la transcripción de los genes *EPA*<sup>53</sup>.

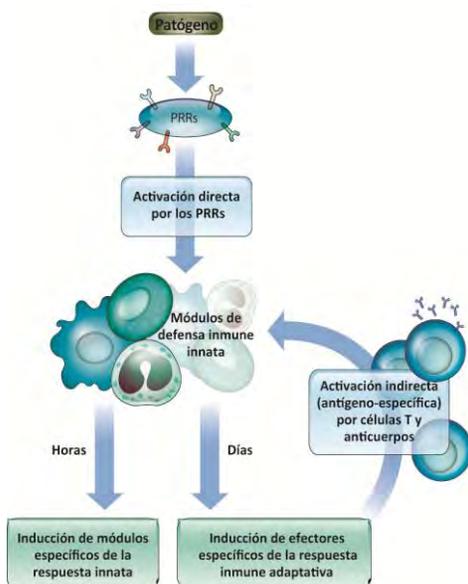
Existen otras condiciones que influyen en la transcripción de los *EPA*. Por ejemplo, Kraneveld encontró que *EPA3* se induce durante la formación de las biopelículas, tanto en medio rico (YPD) como en medio semi-definido. En contraste, este mismo estudio reporta una inducción de *EPA1* y *EPA22*, pero sólo en el medio semi-definido que contiene concentraciones limitantes de glucosa<sup>40</sup>. En otro trabajo se documenta que la exposición de *C. glabrata* a parabenos ocasiona la inducción de *EPA6* y en menor grado de *EPA1*, pero no de *EPA7*. Los parabenos son ésteres del ácido *p*-hidroxibenzoico que se encuentran regularmente en preparaciones farmacéuticas y se utilizan como conservadores. Los autores encontraron que este efecto requiere de condiciones hipóxicas y de los factores de transcripción Flo8 y Mss11. Aún más, esta inducción incrementó la adherencia de la levadura a las células epiteliales de cultivos primarios y la

presencia de parabenos mejoró la adherencia de algunos aislados clínicos de *C. glabrata*<sup>54</sup>.

En conclusión, *C. glabrata* cuenta con un amplio repertorio de adhesinas, de expresión dinámica y con una elevada propensión a la recombinación. Estas características hacen que *C. glabrata* pueda generar adhesinas distintas que le permitan colonizar otros nichos y alterar su reconocimiento por parte del hospedero. Estudiar los mecanismos inherentes a su regulación es de vital importancia para comprender el proceso de invasión al hospedero y la evasión del sistema inmunológico.

### 1.7.El reconocimiento de *C. glabrata* por las células de la inmunidad innata

La defensa del hospedero contra los hongos necesita de la inmunidad innata y adaptativa<sup>26</sup>. En la defensa innata participan células fagocíticas profesionales (especializadas en fagocitosis), receptores celulares y varios factores humorales. Todos estos componentes orquestan en conjunto para destruir al patógeno a través de la fagocitosis e instruir a las células del sistema inmune adaptativo<sup>26,55</sup> (Ilustración 8). Es importante destacar que la mayoría de los mecanismos de defensa del hospedero son inducibles y para ello se requiere del reconocimiento del agente infeccioso. La defensa antifúngica inicia cuando los patrones moleculares asociados a patógenos (PAMP) son reconocidos por las células del sistema inmune a través de receptores reconocedores de patrones (PRR), tales como los receptores tipo Toll (TLR)<sup>55</sup>.

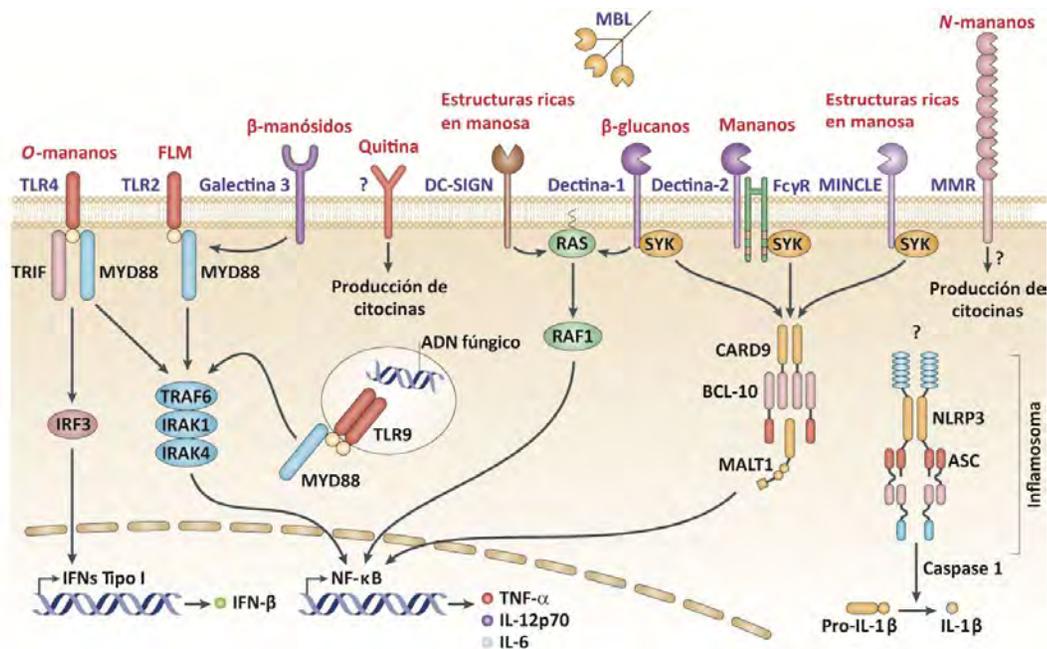


**Ilustración 8 | Activación de las defensas del hospedero.**

Las defensas del hospedero pueden ser inducidas directamente, a través del reconocimiento de los PAMP por los PRR o bien indirectamente por las células T y los anticuerpos. Cada componente de la inmunidad se caracteriza por diferentes mecanismos de defensa y estas células pueden instruir al sistema inmunológico adaptativo para desencadenar una respuesta específica. La activación específica de antígeno de los componentes de la inmunidad innata es generalmente más eficiente que la activación directa y es necesaria para la eliminación del patógeno. Figura modificada de Medzhitov (2007)<sup>55</sup>.

Varios componentes de la pared fúngica pueden actuar como PAMP y ser reconocidos por los receptores de las membranas de los fagocitos y las células dendríticas (DC). Hasta el momento se han identificado proteínas que pueden reconocer residuos de manosa, glucanos y posiblemente de quitina y combinaciones de estos carbohidratos de las paredes fúngicas<sup>56</sup>. Por este mecanismo, cada PAMP se une a su PRR y activa un juego definido de factores de transcripción para ejercer la respuesta inmunológica (Ilustración 9)<sup>26,57</sup>. Se conoce que los  $\beta$ -D-glucanos son detectados por los fagocitos a través del receptor dectina-1, TLR2<sup>58-59</sup> y los receptores "carroñeros" (SCARF y CD63)<sup>60</sup>, al menos para el caso de *C. albicans*. La unión de dectina-1 a los  $\beta$ -D-glucanos causa diversas respuestas protectoras como la fagocitosis, el estallido oxidante y la producción de citocinas pro- y anti-inflamatorias<sup>57</sup>. Sin embargo, *C. albicans* ha desarrollado estrategias para enmascarar sus  $\beta$ -D-glucanos y evitar la activación de la respuesta inmune. Recientemente se demostró que este mecanismo depende de la activación de la vía de las MAP cinasas a través de la cinasa extracelular *CEK1*, ya que su delección causa una mayor exposición de  $\beta$ -D-glucanos<sup>61</sup>.

Las células fagocíticas detectan las proteínas *N*- y *O*-manosiladas de los hongos a través del receptor de manosa (MMR o CD206), TLR4, MINCLE y DC-SIGN, mientras que con TLR2 y TLR6 reconocen a los fosfolipomananos<sup>57,62-64</sup> (Ilustración 9). La Dectina-2 colabora con Fc $\gamma$ R para reconocer los mananos y la asociación del receptor galectina-3 con TLR2 permite el reconocimiento de los residuos de manosa- $\beta$ -1,2 (Ilustración 9). Por último, hay reportes que señalan una participación parcial de los receptores TLR2, dectina-1 y MMR en la activación de los macrófagos al ser expuestos a la quitina purificada<sup>65</sup>. Sin embargo, un trabajo reciente demostró que los receptores TLR2, TLR4 y MINCLE de macrófagos de ratón no participan en la detección de la quitina de *C. albicans*. Sin embargo, en este mismo estudio, los autores proponen que dectina-1 y otro PRR aún por descubrir, podrían colaborar en la detección de quitina<sup>66</sup>.



**Ilustración 9 | Vías de señalización asociadas al reconocimiento de PAMP fúngicos por células del sistema inmune.**

Los receptores de superficie tipo Toll (TLR), familia de lectinas del tipo-C (dectina-1,2 y Mincle) y los TLR endosómicos participan en el reconocimiento de los PAMP fúngicos. La lectina soluble de unión a manosa (MBL) puede unirse a estructuras ricas en manosa. Estas estructuras también pueden ser reconocidas por el receptor macrófago de manosa 1 (MMR), la molécula de adhesión intercelular captadora de no-integrina y específica de células dendríticas (DC-SIGN) y la lectina inducible tipo-C de macrófagos (Mincle). Por su parte, dectina 1 reconoce los β-glucanos mientras que dectina-2 y FcγR reconocen mananos (polímeros de manosa). El TLR4 se une a O-mananos, el TLR2 a fosfolipomananos (FLM) y cuando coopera con el receptor galectina-3 pueden reconocer β-manósidos. El receptor TLR9 se encuentra en el citoplasma y reconoce al ADN fúngico. Además, el receptor NLRP3 forma un complejo de inflamosoma con la proteína tipo-moteada asociada a la apoptosis (ASC) y la enzima caspasa-1 pero se desconoce aún el ligando. Figura modificada de Gow *et al.* (2012)<sup>64</sup>.

Con respecto a *C. glabrata*, realmente se conoce poco de los PAMP y PRR que median su reconocimiento por parte de las células de la inmunidad innata. Al respecto, una publicación demuestra que la fagocitosis de *C. glabrata* por macrófagos de ratón prescinde del receptor dectina-1, dado que no hubo diferencia en el grado de unión de *C. glabrata* a macrófagos provenientes de ratones con (*Dectina-1*<sup>+/+</sup>) o sin el receptor dectina-1 (*dectina-1*<sup>-/-</sup>)<sup>67</sup>. Por otra parte, este mismo trabajo demuestra que Epa1 media la adherencia a las células mieloides y promueve la fagocitosis en monocitos humanos de sangre periférica (PBMC), aunque aún falta por identificar al receptor de esta adhesina<sup>67</sup>. El trabajo de Vale-Silva *et al.* también respalda este resultado. Estos autores demuestran que la adición de galactosa inhibe la unión de *C. glabrata* a macrófagos derivados de la médula ósea (BMDM)<sup>68</sup>. Previamente se ha demostrado que la galactosa es

un ligando de Epa1 y que puede inhibir competitivamente la adherencia de la levadura a las células epiteliales Iec2<sup>34</sup>. Por su parte, los experimentos de competencia de Keppler-Ross *et al.* demostraron que los macrófagos prefieren fagocitar *C. glabrata* sobre *C. albicans*. Los autores proponen que esto podría deberse al mayor contenido de mananos en la pared de *C. glabrata*<sup>36</sup>, aunque aún falta realizar experimentos para comprobar esta hipótesis<sup>69</sup>. Ifrim *et al* recientemente demostraron que el reconocimiento de los mananos por parte de Dectina-2 es importante para la defensa contra *C. glabrata* en modelos murinos de infección sistémica<sup>70</sup>.

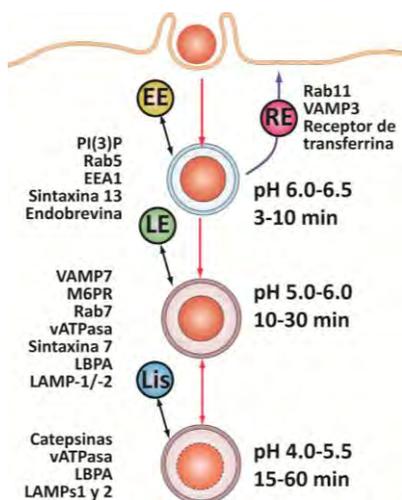
Finalmente, en otro par de investigaciones se reporta la detección de *C. glabrata* por parte del sistema inmunológico. Chen *et al.* encontraron que el receptor TLR4 (cuyos ligandos contienen O-manosa) no es necesario para proteger en contra de las infecciones del tracto urinario en el ratón, lo que sugiere que el reconocimiento de *C. glabrata* por parte de este receptor no ayuda en la eliminación de la levadura<sup>71</sup>. Por otra parte, Bourgeois *et al.* demostraron que la fagocitosis de *C. glabrata* es dependiente de dinamina en células dendríticas de ratón derivadas de médula ósea (BM-DC) y que requiere la vía de señalización de las cinasas Syk/Src. Además, observan que la fagocitosis de *C. glabrata* ocasiona la liberación de IFN- $\beta$  por parte de las BM-DCs en un mecanismo independiente de Dectina-1, TLR4 y TLR2, pero que necesita del factor transcripcional MyD88. Se conoce que la liberación de IFN- $\beta$  causa la estimulación autócrina/parácrina de las BM-DCs para producir más IFN tipo I y permitir la maduración de las DC a células presentadoras de antígeno. Sin embargo, tal vez los hallazgos más importantes de este artículo son que: 1) esta liberación del IFN- $\beta$  necesita de TLR7, un PRR que reconoce RNA de cadena sencilla<sup>72</sup> y 2) que esta señalización de IFN-I promueve la persistencia de *C. glabrata* en los tejidos de ratones infectados<sup>73</sup>.

Entonces, aunque ha habido un progreso sustancial en la identificación de los receptores que disparan diferentes cascadas de señalización durante la fagocitosis, la identidad de las moléculas que median el reconocimiento entre el fagocito y *C. glabrata* (o de los hongos en general) es aún incompleta. Será

necesario incrementar la investigación acerca de estas moléculas para poder comprender a mayor profundidad la patología de las micosis y poder desarrollar estrategias más eficientes para su tratamiento y prevención.

### 1.8. Los mecanismos de *C. glabrata* para evadir la respuesta inmune

Las células fagocíticas profesionales, como los neutrófilos, leucocitos mononucleares y las DC reconocen diversos componentes de la pared celular fúngica (PAMP) a través de sus receptores para eliminar al agente infeccioso de los tejidos y el torrente sanguíneo. En la vía fagocítica, el fagosoma madura a través de su fusión con vesículas endosómicas a fagolisosoma, el cual contiene un ambiente hostil y destructivo para los microorganismos<sup>74-76</sup> (Ilustración 10). Dentro de esta vesícula existe una severa restricción nutricional, que se acompaña de una acidez que crece a medida que el endosoma madura. Además, durante la biogénesis del fagosoma, se ensambla la oxidasa fagocítica dependiente del NADH (Nox2). Esta enzima reduce el oxígeno molecular y genera radical superóxido ( $O_2^{\bullet-}$ ) en ocasiones  $H_2O_2$ , que son especies reactivas del oxígeno (ERO), que causan daño oxidante al agente infeccioso<sup>77-78</sup>. La acción combinada de estos factores normalmente es suficiente para eliminar y degradar la mayoría de los microorganismos fagocitados. Cuando esto ocurre, las células fagocíticas actúan como moduladores de la inmunidad adaptativa al presentar los antígenos y secretar citocinas pro- y anti-inflamatorias (Ilustración 9).



**Ilustración 10 | Maduración del fagosoma.**

La maduración a lo largo de la vía degradante se indica con las flechas rojas y la de reciclaje con la flecha azul. Los endosomas maduran a medida que se fusionan con vesículas de la siguiente fase de maduración. En la parte izquierda del esquema se presenta las moléculas que identifican cada endosoma. En la derecha se muestra el pH de las vesículas y el tiempo que toma la partícula en alcanzar dicho compartimento. La mayoría de la destrucción del patógeno ocurre en el fagosoma tardío (LE) y el fagolisosoma (Lis). PI(3)P, fosfatidilinositol-3-fosfato; Rab, proteínas de unión a GTP relacionadas con RAS, EEA1, antígeno del endosoma temprano 1; VAMP, proteína de membrana asociada a vesículas; M6PR, receptor de manosa-6-fosfato; vATPasa, ATPasa vacuolar; LBPA, ácido lisobisfosfatídico; LAMP, proteína de membrana asociada a lisosomas. Figura modificada de Haas (2007)<sup>74</sup>.

Sin embargo, a pesar de todos estos mecanismos microbicidas, los hongos han desarrollado diferentes estrategias para contrarrestar el ataque de los fagocitos y sobrevivir<sup>79</sup>. Por ejemplo, *Histoplasma capsulatum* impide la acidificación del fagolisosoma y sobrevive en su interior como microorganismo facultativo<sup>80</sup>. En cambio, *C. albicans* inhibe la producción de especies reactivas del oxígeno y del nitrógeno<sup>81</sup>, lo que le permite sobrevivir en el interior del fagosoma y posteriormente destruir al fagocito a través de su cambio morfológico de levadura a hifa<sup>82</sup>. Por último, se ha visto que la levadura dimórfica y capsulada *C. neoformans* puede escapar mediante dos vías diferentes. *C. neoformans* puede inducir la apoptosis del fagocito<sup>83</sup> o bien escapar de él mediante un mecanismo denominado extrusión fagosómica, en el que el hongo forma vacuolas masivas que afectan la permeabilidad de fagocito y conduce a la liberación del agente infeccioso sin afectar a la célula hospedera<sup>84</sup>.

En la literatura existen diferentes estudios que han comenzado a descifrar los mecanismos que utiliza *C. glabrata* para evadir la respuesta inmunológica. Gracias a estos trabajos, se ha demostrado que *C. glabrata* no sólo sobrevive al ataque de los fagocitos, sino que también puede duplicarse en su interior<sup>68,85-87</sup>. Hasta el momento se han identificado varios factores que son necesarios para esta supervivencia<sup>85-86,88-90</sup>. Al respecto, Kaur *et al.* encontraron que una familia de aspartil proteasas con ancla GPI; principalmente *YPS1* y *YPS7*, son necesarias para que *C. glabrata* sobreviva en el interior de macrófagos<sup>86</sup>. Sin embargo, aún se desconoce la función precisa que realizan estas proteínas para la subsistencia de *C. glabrata*. Se ha propuesto que podrían participar en la remodelación de la pared celular y por lo tanto en enmascarar algunos antígenos superficiales, uno de los cuales podría ser *Epa1*<sup>86</sup>. Por otra parte, Nevitt *et al.* encontraron que el transportador de sideróforos *Sit1* permite la supervivencia de *C. glabrata* cuando es fagocitada en presencia de ferricromo, un sideróforo de origen fúngico<sup>89</sup>. Estos autores sugieren que el sideróforo podría proveer del hierro requerido para el funcionamiento de los mecanismos de duplicación del ADN y las enzimas antioxidantes de la levadura<sup>89</sup>. La respuesta al estrés oxidante de la levadura

también parece jugar un papel importante en esta supervivencia. Por ejemplo, el factor de transcripción de respuesta a estrés oxidante Yap1 y la superóxido dismutasa Sod1 son imprescindibles para sobrevivir en el interior de los BMDM<sup>88</sup>. Además, la producción de un pigmento derivado de la degradación del triptófano, protege a *C. glabrata* del ataque de los neutrófilos, presumiblemente debido a su actividad antioxidante<sup>91</sup>. Además, la autofagia de los peroxisomas (pexofagia) también beneficia a *C. glabrata*<sup>85,92</sup>. Se ha visto que las cepas mutantes deficientes de este proceso sobreviven en menor proporción que la cepa parental<sup>85</sup>. Por otra parte, se ha demostrado que la mutación de los genes que participan en el remodelado de la cromatina (*RSC3*, *RTT109*) también afectan la proliferación de *C. glabrata* en los macrófagos<sup>90</sup>. Por último, Seider, *et al.* identificaron recientemente otros genes que son necesarios para la supervivencia de *C. glabrata*. Los autores analizaron la supervivencia de 433 mutantes en co-incubación con macrófagos derivados de monocitos (MDMs) y encontraron 23 genes que son esenciales para la supervivencia de la levadura<sup>93</sup>. Las mutaciones identificadas se encontraron en los procesos de: biosíntesis de pared, la homeostasis del calcio y del hierro, la respuesta nutricional, la respuesta al estrés y la glicosilación de proteínas<sup>93</sup>.

Por otra parte, para comprender la respuesta de *C. glabrata* ante la fagocitosis, Fukuda, Kaur y Rai *et al.* han analizado el perfil de transcripción de las levaduras fagocitadas por neutrófilos o macrófagos, respectivamente. El principal hallazgo de estos experimentos es que la levadura reprograma su metabolismo del carbono. Este cambio se refleja en un incremento de la gluconeogénesis, la  $\beta$ -oxidación de los ácidos grasos y el ciclo del glioxilato<sup>86,90,92</sup>. Se ha propuesto que este cambio ocurre en respuesta al estrés oxidante y a la limitación nutricional del fagosoma, lo que concuerda con el hecho de que *C. glabrata* recurre a mecanismos autofágicos como la pexofagia para la obtención de nutrientes<sup>85,90</sup>.

Finalmente, es importante destacar que, a diferencia de las infecciones causadas por otras especies de *Candida*, *C. glabrata* no ocasiona la producción de citocinas, tanto pro- como anti-inflamatorias<sup>87,94</sup>. La única excepción es el factor estimulante de colonias de granulocitos-macrófagos (GM-CSF). En modelos

múridos de infección sistémica y epitelial se ha encontrado que esta citocina se encuentra elevada y se cree que contribuye al reclutamiento de los macrófagos al sitio de la infección<sup>87,95-96</sup>. Sin embargo, quizá los hallazgos más interesantes en la interacción de *C. glabrata* con el fagocito son que la levadura suprime activamente la producción de ERO<sup>81,87</sup> e impide la maduración del fagolisosoma<sup>87</sup>. Específicamente *C. glabrata* previene evita la acidificación del fagosoma y retiene su maduración en el estado del fagosoma tardío<sup>87</sup> (Ilustración 10) Hasta ahora se desconocen los mecanismos detrás de estas respuestas, pero será de suma importancia identificar los factores que interfieren en la progresión de la fagocitosis. En su análisis más reciente, Seider *et al.* no encontraron mutaciones que afectaran la maduración del fagosoma, todas sus mutantes analizadas se comportaron igual que la cepa parental<sup>93</sup>. Sin embargo, un hallazgo interesante es que 15 de las 23 mutantes analizadas fueron incapaces de suprimir la producción de ERO. Estos hallazgos, aunados al hecho de que *C. glabrata* no altera la producción de citocinas proinflamatorias, ha llevado a algunos autores a sugerir que *C. glabrata* utiliza los fagocitos para duplicarse en su interior y diseminarse a otros tejidos<sup>28,87</sup>. Destaca que aún cuando *C. glabrata* no ocasiona la apoptosis del fagocito, sí causa su lisis cuando la cantidad de levaduras es excesiva<sup>87</sup>.

### **1.9. La respuesta a estrés oxidante de *C. glabrata***

Como organismo anaerobio facultativo, *C. glabrata* está expuesta a las ERO que se generan en la fase aeróbica de su metabolismo. Especies como el radical superóxido ( $O_2^{\bullet-}$ ), el peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ), el radical hidroxilo ( $OH^{\bullet}$ ) y el oxígeno singulete ( $O_2^1$ ) pueden dañar a los lípidos, las proteínas y el ADN y causar la muerte celular<sup>97-98</sup>. Además, la interacción de *C. glabrata* con el hospedero incrementa la cantidad de estrés oxidante a la que está expuesta la levadura. Por un lado, se encuentran las ERO que genera el fagocito durante el estallido oxidante<sup>78</sup> y por otra parte las que se deben generar en la levadura debido al estrés nutricional al que está sujeta en el fagosoma<sup>86,92</sup>. Para contrarrestar los efectos deletéreos de estas moléculas, *C. glabrata* ha desarrollado mecanismos que detectan, señalizan y contrarrestan el estrés oxidante<sup>99</sup>.

*C. glabrata* es fagocitada por células como los macrófagos, las células dendríticas y los neutrófilos. Con la fagocitosis, se acoplan las subunidades que conforman al complejo multimérico de la Nox2 (gp91<sup>phox</sup>, p22<sup>phox</sup>, p40<sup>phox</sup>, p47<sup>phox</sup>, p67<sup>phox</sup> y Rac) para activar la enzima<sup>100</sup>. Cualquiera de los componentes de la Nox2 es vital para la inmunocompetencia. Esto se refleja en los pacientes con enfermedad granulomatosa crónica, ya que son propensos a sufrir infecciones fúngicas y bacterianas recurrentes porque poseen alelos mutantes de los genes de las subunidades de la Nox2 (gp91<sup>phox</sup>, p22<sup>phox</sup>, p47<sup>phox</sup> o p67<sup>phox</sup>)<sup>101</sup>. Es por ello que se considera que los mecanismos que intervienen en la respuesta antioxidante de los patógenos fúngicos son factores potenciales de virulencia.

Debido a la cercanía filogenética de *C. glabrata* y *S. cerevisiae* en un principio se propuso que estas levaduras podrían responder de forma parecida al estrés oxidante. Sin embargo, se han identificado diferencias importantes que se contraponen a esta suposición<sup>88,99,102-104</sup>. Por ejemplo, la resistencia de *C. glabrata* al peróxido de hidrógeno *in vitro* es mucho mayor que la de *S. cerevisiae* e incluso *C. albicans*<sup>102</sup>. En *C. glabrata* los mecanismos implicados en la detección del estrés oxidante todavía no se han caracterizado por completo. Por ejemplo, en contraste con otros hongos como *S. cerevisiae* y *C. albicans*<sup>105-106</sup>, la vía de Hog de *C. glabrata* no parece participar en este proceso. Hasta el momento no se ha detectado la fosforilación de la MAP-cinasa Hog1 cuando *C. glabrata* es expuesta a estrés oxidante<sup>107</sup>. No obstante, existen otros factores que son necesarios para responder a este estímulo y uno de ellos es el factor de transcripción tipo cremallera de leucinas Yap1 o Cgap1<sup>85,102,108</sup>. Yap1 contiene dominios ricos en cisteína en sus porciones C- y N-terminal que son susceptibles a la oxidación por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub><sup>109</sup>. Cuando *S. cerevisiae* se encuentra en presencia de estrés oxidante, Yap1 es oxidado por la tiol-peroxidasa Gpx3 (Orp1 o Hyr1) para formar una serie de enlaces disulfuro que promueven la acumulación de Yap1 en el núcleo y la inducción de genes antioxidantes<sup>110</sup>. *C. glabrata* tiene un gen ortólogo a GPX3 que no conserva la sintenia, por lo que se desconoce si participa en el relevo y formación de los enlaces disulfuro de Yap1 (De acuerdo con la herramienta en línea YGOB,<sup>111</sup>). A pesar de ello, el ortólogo de Yap1 en *C. glabrata* controla la

mayoría de los genes que tienen respuesta al estrés oxidante (REO) como: *CTA1*, *TRR1/2*, *TSA1/2*, *TRX2*, *GPX2* y *CCP1*<sup>88</sup>. Resulta interesante que Yap1 se localiza en el núcleo de *C. glabrata* tras la fagocitosis, probablemente para activar la transcripción de este u otro juego de genes<sup>85</sup>.

Por otra parte, el factor de transcripción Skn7 también tiene una participación destacada en la REO de *C. glabrata*. Skn7 es un regulador de la transcripción conservado en todos los hongos que responde al estrés oxidante y al estrés de la pared celular<sup>112</sup>. La secuencia de Skn7 de *C. glabrata* es muy parecida a la de *S. cerevisiae* (60.7%), contiene un dominio de unión al ADN en el N-terminal, que es parecido al de los factores de choque térmico, y un dominio receptor en el C-terminal<sup>112-113</sup>. En *C. glabrata*, Skn7 parece cooperar con Yap1 para la inducción de los genes como *TRX2*, *CTA1*, *TRR1* y *TSA1*, lo que ha llevado a sugerir que controlan el núcleo de la REO<sup>88,114</sup>. Además, se ha demostrado que Skn7 es necesario para la resistencia y adaptación al H<sub>2</sub>O<sub>2</sub><sup>102</sup>. Sin embargo, su participación como factor de virulencia aún es controvertida. En un estudio se demostró que las cepas mutantes en *SKN7* exhiben una menor colonización de los tejidos en modelos murinos de infección sistémica<sup>114</sup>, mientras que en otro estudio se encontró que su ausencia no afecta la supervivencia en el interior de los macrófagos<sup>88</sup>. Por último, los factores de transcripción Msn2 y Msn4 trabajan en paralelo con Yap1 y Skn7 para conferir resistencia al estrés oxidante durante la fase de crecimiento estacionario de *C. glabrata*<sup>102</sup>. Estos factores contienen dominios dedos de zinc y activan los genes de respuesta al estrés general de esta levadura<sup>103</sup>. Tal como se verá más adelante, en nuestro trabajo hemos demostrado que Msn4 tiene una participación discreta en la inducción del gen *CTA1* en ausencia de la represión de la transcripción mediada por la desacetilasa de histonas Hst1<sup>115</sup>. Sin embargo, a pesar de que Msn2 y Msn4 regulan una gran cantidad de genes de la respuesta al estrés, no tienen impacto en la virulencia de *C. glabrata*. La cepa doble mutante *msn2Δ msn4Δ* no exhibe deficiencias en la colonización en un modelo infectivo de *Drosophila melanogaster*<sup>103</sup>.

Al igual que en otros hongos, en *C. glabrata* la detección del estrés oxidante activa vías de señalización que instruyen a los factores de transcripción para

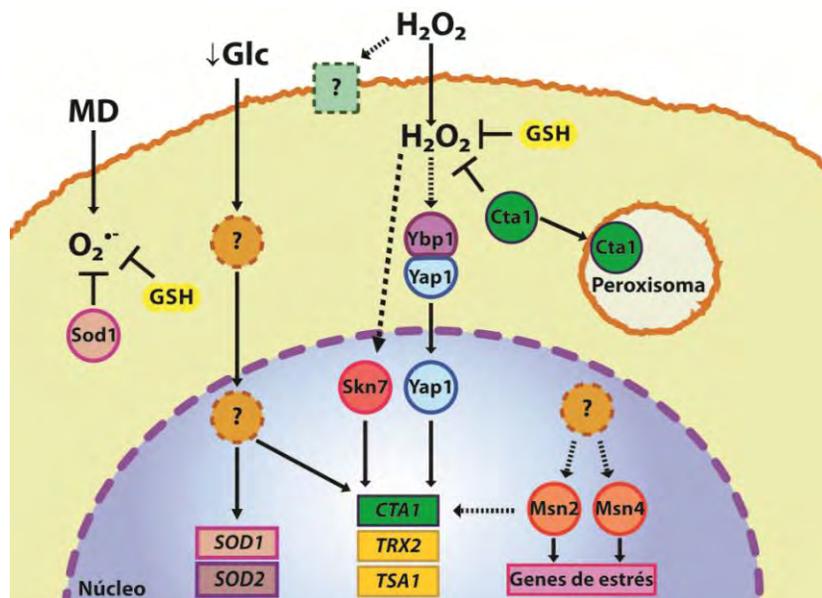
inducir genes que contrarresten las ERO. Dentro de estos genes se encuentran aquellos que codifican para las enzimas con actividad antioxidante, como la catalasa, las superóxido dismutasas, las glutaredoxinas y las tioredoxinas<sup>116-117</sup>. A diferencia de *S. cerevisiae* que contiene dos catalasas, *C. glabrata* cuenta con una sola que le confiere su elevada resistencia al H<sub>2</sub>O<sub>2</sub><sup>102</sup>. En respuesta a la fagocitosis, se ha descrito que *C. glabrata* incrementa la producción de esta enzima antioxidante y posteriormente la direcciona a los peroxisomas<sup>85</sup>. Se cree que esta respuesta también se debe a la limitación nutricional que impone el fagocito sobre la levadura porque la asimilación de fuentes de carbono no-fermentables también causa esta localización<sup>85</sup>. Otro par de enzimas antioxidantes que se inducen frente a la limitación nutricional son las superóxido dismutasas (SOD)<sup>88</sup>. *C. glabrata* posee dos SOD, una tiene cobre-zinc (Sod1) y la otra manganeso (Sod2). A pesar de que la Sod1 es necesaria para contender contra el anión superóxido generado por la menadiona, esta enzima no es requerida para que *C. glabrata* sobreviva en el interior del fagocito<sup>88</sup>. Sin embargo, *C. glabrata* cuenta también con la Sod2, por lo que probablemente esta supervivencia se deba a la redundancia funcional de las SOD.

El equilibrio del estado oxidoreductor es importante para mantener funcionales gran parte de los procesos celulares. La preservación del estado oxidoreductor de los grupos tioles de las cisteínas corre a cuenta de los sistemas glutatión (GSH) y tioredoxina<sup>118-120</sup> y la ruta de las pentosas provee los equivalentes reductores para ambos sistemas<sup>120</sup>. *C. glabrata* cuenta con la mayoría de los genes ortólogos de *S. cerevisiae* que componen uno y otro sistema<sup>121</sup>. Con respecto al sistema tioredoxina, *C. glabrata* posee un par de tioredoxinas y dos tioredoxina-reductasas, pero hasta el momento se desconoce cuál es la contribución precisa de este sistema en la REO<sup>122</sup>. En cambio, el sistema GSH ha sido mejor estudiado<sup>121-123</sup>. El GSH es un tripéptido compuesto por glicina, cisteína y ácido glutámico, en cuya síntesis intervienen las enzimas Gsh1 y Gsh2<sup>124</sup>. El grupo tiol del GSH es fundamental para las enzimas glutatión peroxidasas, glutaredoxinas y glutatión transferasas y combatir el estrés oxidante. Se ha documentado que en *C. glabrata* el gen *GSH1* es esencial por su participación en la formación de los

centros hierro azufre de las proteínas y en la formación de enlaces difulfuro en el retículo endoplasmico<sup>122-123</sup>. Sin embargo, existe al menos una mutación supresora en el gen *PRO2* que compensa la ausencia de la  $\gamma$ -glutamil-cisteína sintetasa (*GSH1*). Nuestro grupo de trabajo ha demostrado que en presencia de la mutación supresora *pro2-4* se sintetizan cantidades residuales de GSH que son aptas para sobrevivir pero insuficientes para contender contra el estrés oxidante generado por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y menadiona<sup>122</sup>. Hemos propuesto que el alelo supresor de *PRO2* podría permitir la condensación de la cisteína al  $\gamma$ -glutamil-5-fosfato de la ruta biosintética de la prolina y dar origen a la  $\gamma$ -glutamil-cisteína<sup>122</sup>. Estos resultados indican que el GSH contribuye de forma importante en la REO de *C. glabrata*. Finalmente, esta levadura carece de un gen ortólogo al transportador canónico del GSH; sin embargo, los datos de Gutiérrez-Escobedo *et al.* sugieren que el GSH es transportado en condiciones de limitación nutricional. La identificación de este posible transportador y su regulación, así como la participación del GSH en la virulencia de *C. glabrata* son objeto de actual investigación en nuestro grupo de trabajo.

Los datos acerca de la contribución de los sistemas antioxidantes en la virulencia de *C. glabrata* son hasta cierto punto paradójicos. El esquema de la Ilustración 11 sintetiza los factores identificados que participan en la REO de *C. glabrata*. Algunos factores son requeridos para la supervivencia de la levadura en los macrófagos o para la colonización de los tejidos, como Yap1, Sod1 y Skn7<sup>88,114</sup>, mientras que otros son dispensables, como la catalasa<sup>102</sup>. Sin embargo, es importante destacar que para el caso de Yap1 y Sod1, la disminución de la supervivencia de *C. glabrata* en macrófagos sólo se observa mediante la mutación simultánea de ambos genes<sup>88</sup>, lo que indica que tanto el inductor como el efector son necesarios para contender contra el estrés impuesto por el fagocito. Además, recordemos que Sod1 no parece ser regulado ni por Yap1 ni por Skn7<sup>88</sup>, lo que sugiere que no participan dos vías importantes en la respuesta al estrés con efectos pleiotrópicos. Con respecto a Skn7, hemos también analizado la colonización de tejidos en modelos murinos de infección sistémica y no sólo de la cepa mutante *skn7* $\Delta$  sino también de la doble mutante *skn7* $\Delta$  *yap1* $\Delta$ . Hasta el

momento, no hemos observado diferencias en la colonización con respecto a la cepa parental (Juárez-Cepeda *et al.*, manuscrito en preparación). Es probable que esta impactante diferencia se deba al distinto fondo genético de las levaduras utilizadas entre Saijo *et al.* y nosotros<sup>114</sup>. Sin embargo, nuestros datos respaldan mejor lo observado por Roetzer *et al.* quienes no advirtieron una diferencia en la supervivencia de una doble mutante *skn7Δ yap1Δ* dentro de los macrófagos<sup>88</sup>. Por último, el hecho de que una cepa tan susceptible al estrés oxidante, como la mutante nula en el gen que codifica para la catalasa (*cta1Δ*), colonice igual que la cepa parental<sup>102</sup> sugiere al menos dos escenarios: 1) Que deben existir sistemas compensatorios de participación discreta que contrarresten el estrés oxidante o 2) que la REO es aparentemente innecesaria para sobrevivir al ataque del hospedero. Considero que ahora la investigación debe ser dirigida a los factores que posee *C. glabrata* para suprimir la producción de las ERO por parte del fagocito<sup>81,87</sup>. De esta forma, la identificación de estos mecanismos nos ayudaría a comprender por qué la aparente abstención de sistemas antioxidantes por parte de este patógeno oportunista en su supervivencia durante la infección del hospedero.



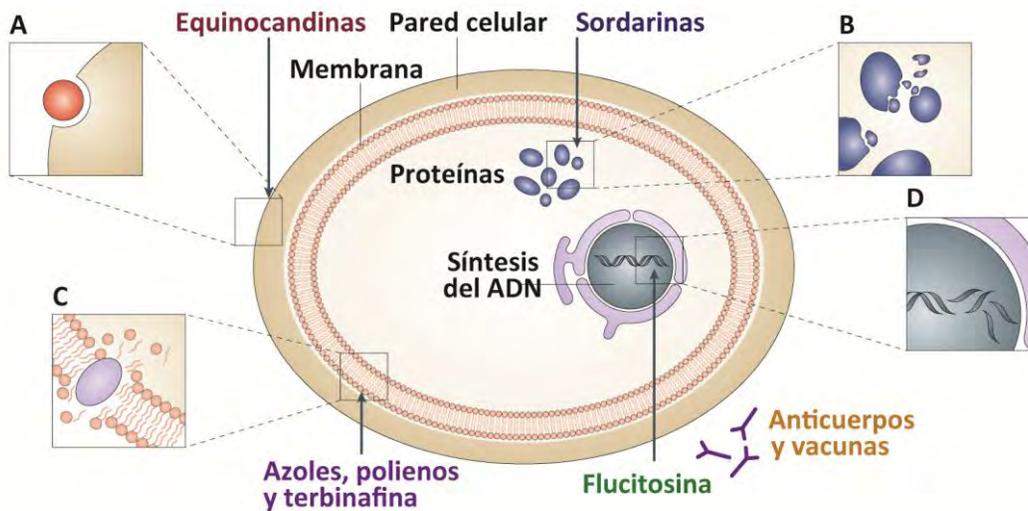
**Ilustración 11 / La respuesta a estrés oxidante de *C. glabrata*.**

*C. glabrata* responde con diferentes sistemas antioxidantes ante fuentes externas de estrés oxidante como el  $H_2O_2$  y la menadiona (MD). La vía de transducción de señales inducida con el peróxido aún se desconoce, pero los datos indican que el  $H_2O_2$  activa los factores de transcripción Yap1, Skn7 y Msn4. La respuesta de Yap1 al  $H_2O_2$  necesita de la proteína de unión a Yap1, denominada Ybp1. Los factores Yap1 y Skn7 inducen los genes que pertenecen al núcleo de la respuesta al estrés oxidante como la catalasa (*CTA1*), la tioredoxina

(*TRX2*) y la tioredoxín-peroxidasa (*TSA1*). La catalasa elimina el  $H_2O_2$  del citoplasma y de los peroxisomas. El glutatión (GSH) también contribuye a eliminar el  $H_2O_2$  a través de la glutatión peroxidasa. Para neutralizar el superóxido ( $O_2^{\bullet-}$ ), *C. glabrata* utiliza la superóxido dismutasa (Sod1). La limitación nutricional ( $\downarrow$ Glc) induce la transcripción de los genes *SOD* y los factores de transcripción *Msn2/4* inducen genes de respuesta a estrés general. Las flechas y círculos con línea punteada corresponden a procesos aún no establecidos. Figura modificada de Briones-Martín-del-Campo (2013)<sup>99</sup>.

### **1.10. La resistencia farmacológica de *C. glabrata***

Hasta ahora hemos descrito la respuesta de *C. glabrata* ante los mecanismos de defensa del hospedero; sin embargo, es probable que durante la infección, *C. glabrata* se enfrente a diferentes agentes antifúngicos. En la Ilustración 12 se muestra un esquema con los diferentes tipos de antifúngicos actuales, así como su mecanismo de acción<sup>5,125-126</sup>. De acuerdo con los datos epidemiológicos aportados por los estudios de vigilancia, ha habido cambios sustanciales en el manejo terapéutico de las candidiasis<sup>127</sup>. En 2009, la sociedad de enfermedades infecciosas de Estados Unidos (IDSA por sus siglas en inglés) recomendó el tratamiento con equinocandinas en vez de azoles para pacientes con infección severa a moderada o para aquellos que habían recibido un tratamiento previo con azoles<sup>127</sup>. La recomendación está basada en la experiencia clínica o descripción de casos por médicos expertos y cuenta con buena evidencia para recomendar su uso<sup>128</sup>. Sin embargo, en la actualidad, el fluconazol es el agente más utilizado para el tratamiento profiláctico o empírico de las candidiasis. A pesar de que ambos fármacos poseen una actividad de amplio espectro, el fluconazol cuenta con varias ventajas farmacocinéticas sobre las equinocandinas: como poseer excelente biodisponibilidad oral, penetrar el sistema nervioso central, atravesar el cuerpo vítreo y alcanzar altas concentraciones en la orina<sup>127</sup>.



**Ilustración 12 | Mecanismos de acción de los actuales fármacos antifúngicos.**

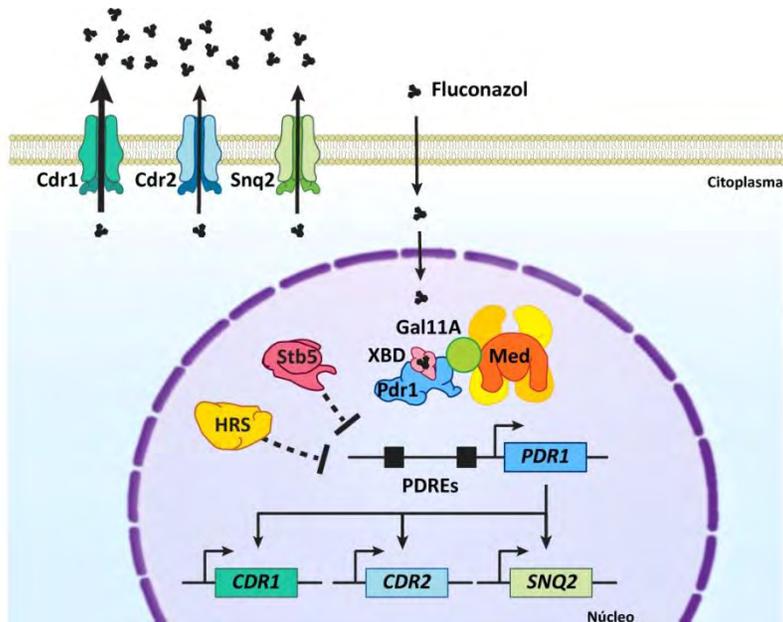
**A.** Las equinocandinas inhiben la formación de la pared celular a través de la inhibición de las enzimas que sintetizan los  $\beta$ -1,3-glucanos. **B.** Las sordarinas estabilizan la unión de los ribosomas al factor de elongación 2 (EF2) y detienen la síntesis de proteínas. **C.** Los azoles, los polienos y la terbinafina actúan al nivel de la membrana celular. Los azoles inhiben la síntesis de ergosterol al unirse a la lanosterol 14- $\alpha$ -desmetilasa mientras que la terbinafina se une a la escualeno epoxidasa. Los polienos incrementan la permeabilidad de la membrana plasmática y causan daño oxidante. **D.** Los análogos fluorinados de pirimidinas como la 5-flucitosina interfieren con la síntesis del ADN al incorporar 5-fluoridina. Los anticuerpos y vacunas podrían prevenir la infección al bloquear o destruir a las células fúngicas. Figura modificada Ostrozky-Zeichner (2010)<sup>125</sup>.

El fluconazol se introdujo en la década de los noventa y resultó altamente efectivo para el tratamiento de diversas micosis, entre ellas las candidiasis<sup>125</sup>. El mecanismo de acción de los azoles es a través de la inhibición de la síntesis del ergosterol, componente lipídico de las células fúngicas que, por estar ausente en células animales, brinda especificidad a estos fármacos fungistáticos<sup>129</sup>. Los azoles inactivan la enzima P-450 lanosterol 14- $\alpha$  desmetilasa codificada por el gen *ERG11* y conllevan a la inhibición del crecimiento fúngico por la acumulación de esteroides metilados<sup>130</sup>. En general, la introducción del fluconazol contribuyó positivamente en el tratamiento de estas IS por que la mayoría de los aislados clínicos de *Candida* spp. son susceptibles al fluconazol. Sin embargo, de acuerdo con lo revisado por Pfaller *et al.* en 2009, más del 10% de los aislados clínicos de *C. glabrata* son resistentes al fluconazol (CMI  $\geq 64 \mu\text{g mL}^{-1}$ )<sup>131</sup>. Además, se ha demostrado que *C. glabrata* puede desarrollar o incrementar su resistencia al fluconazol durante la terapia<sup>132</sup>. Varios estudios señalan que el tratamiento profiláctico con concentraciones subóptimas de fluconazol es un factor de riesgo

para adquirir una IS por esta levadura pero también influyen la edad de los pacientes y sus características geográficas<sup>19-20,133</sup>. Es por ello que a continuación revisaremos los mecanismos implicados en la adquisición de resistencia a los azoles en *C. glabrata*.

Hasta el momento se han descrito cuatro mecanismos diferentes implicados en la resistencia a fármacos azólicos en *Candida* spp.: 1) sobreproducción de bombas que expulsan el fármaco, 2) mutaciones en *ERG11* que disminuyen su inhibición por fluconazol, 3) sobreexpresión de *ERG11*, 4) generación de vías alternas que compensen la ausencia de *ERG11*<sup>134</sup> y 5) la sustitución del ergosterol por el colesterol del hospedero. Cabe resaltar que más de un mecanismo puede operar en una cepa dada y que los cambios que generan la resistencia pueden ocurrir de forma secuencial y proveer de resistencia cruzada a otros fármacos.

En *C. glabrata* el mecanismo principal y más observado en la clínica es la inducción de transportadores que expulsan al fluconazol de la célula<sup>134-135</sup>. La sobreexpresión de genes que codifican para los transportadores que tienen un sitio de unión a ATP (ABC), como *CDR1*, *CDR2 (PDH1)* y *SNQ2*. Los transportadores ABC se han asociado con la resistencia de *C. glabrata* al fluconazol, tanto en cepas de laboratorio como en aislados clínicos<sup>132,136-139</sup>. Esta sobreexpresión se acompaña generalmente de alteraciones en el principal regulador de estos genes, denominado Pdr1, un factor de transcripción con dedos de zinc<sup>140-142</sup>. Pdr1 de *C. glabrata* combina los atributos funcionales de sus ortólogos en *S. cerevisiae* llamados Pdr1 y Pdr3<sup>143-144</sup>. El mecanismo de acción de Pdr1 ha sido ampliamente estudiado tanto en *S. cerevisiae* como en *C. glabrata*. Comienza con la unión del fluconazol al dominio de unión a los xenobióticos (XBD) de Pdr1. Posteriormente, Pdr1 reconoce las secuencias del elemento de resistencia pleiotrópica farmacológica (PDRE) de los promotores de sus genes blanco e interacciona con el complejo mediador a través de la subunidad Gal11A<sup>143-144</sup>. Esta asociación facilita el reclutamiento de la ARN polimerasa II y la transcripción de genes de los transportadores ABC, los cuales expulsan el fármaco mediante la hidrólisis del ATP (Ilustración 13)<sup>143</sup>.



**Ilustración 13 / Función y regulación de Pdr1.**

El fluconazol entra a la célula por un mecanismo aún desconocido. En el interior de la levadura, el fluconazol inhibe la síntesis del ergosterol y causa la acumulación de esteroides metilados, que son tóxicos. En *C. glabrata* el fluconazol se une al dominio XBD de Pdr1 y esto ocasiona su interacción con el complejo mediador (Med) a través de la subunidad Gal11A. La formación del complejo entre el mediador y Pdr1 recluta la RNA polimerasa II a los promotores de los principales genes tipo ABC: *CDR1*, *CDR2* y *SNQ2*. La expresión de estos transportadores causan la expulsión del fármaco. Pdr1 es capaz de inducir su propia expresión mediante un par de secuencias PDRE localizadas en su secuencia promotora. El factor de transcripción Stb5 compite con Pdr1 e impide la inducción de los genes de la resistencia farmacológica. El complejo Hst1-Rfm1-Sum1 (HRS) también reprime la transcripción de estos genes.

Con respecto a la regulación de *PDR1*, Paul *et al.* demostraron que en *C. glabrata* este gen se autoregula a través de dos PDRE en su secuencia promotora (Ilustración 13)<sup>144</sup>. Los autores mencionan que este mecanismo semeja a lo observado para *PDR3* de *S. cerevisiae*<sup>145</sup>. Además, recientemente se demostró que en *C. glabrata* existe un factor de transcripción denominado Stb5 con funciones aparentemente opuestas a Pdr1<sup>146</sup>. La delección de *STB5* en *C. glabrata* ocasiona un incremento en la transcripción de *CDR1*, *CDR2*, *YOR1* y *PDR1* que se traducen en un incremento sutil la susceptibilidad al voriconazol y al fluconazol con una dependencia parcial de *PDR1*<sup>146</sup>. Los autores proponen que el posible mecanismo implica una competencia entre Stb5 y Pdr1 por los sitios de unión al ADN, posiblemente los PDRE<sup>146</sup>. Tal como se verá más adelante, nosotros hemos contribuido a desentrañar los mecanismos que regulan la resistencia farmacológica de *C. glabrata* al demostrar que la sirtuina Hst1 participa en la represión de estos genes (Ilustración 12)<sup>115</sup>. Finalmente, en *S. cerevisiae* se ha

encontrado que las chaperonas moleculares Zuo1 y Ssz1 interaccionan con Pdr1 y pueden activar su transcripción<sup>147</sup>. *C. glabrata* tiene los genes ortólogos (YGOB<sup>111</sup>) y los resultados de BLASTP señalan que las proteínas son similares a Zuo1 y Ssz1 de *S. cerevisiae* (91 y 88%, respectivamente) pero no se ha estudiado su participación en la regulación de *PDR1* en *C. glabrata*.

Se han documentado diferentes mutaciones de ganancia de función (GOF) en *PDR1* que conllevan a la sobreexpresión de transportadores tipo ABC<sup>148-149</sup>. Estas mutaciones GOF en Pdr1 cambian sustancialmente en el perfil de transcripción de *C. glabrata* y además varía en función de la mutación adquirida<sup>149-150</sup>. Una característica interesante de estas mutaciones de *PDR1* es que no sólo conllevan a la generación de resistencia farmacológica *in vitro* e *in vivo* sino a un incremento en la virulencia de *C. glabrata*<sup>148-149</sup>, es decir, hay una ganancia de una función. Este fenómeno resulta interesante porque generalmente la adquisición de resistencia farmacológica se suele acompañar de una disminución en la competencia de los microorganismos<sup>151</sup>. El trabajo de Ferrari *et al.* ha demostrado que el transportador Cdr1 y una proteína mitocondrial, llamada Pup1, contribuyen parcialmente a este incremento en la virulencia y cabe resaltar que los dos genes que las codifican son regulados por *PDR1* con GOF<sup>149</sup>. Además, otro trabajo reciente del mismo grupo ha demostrado que los aislados resistentes al fluconazol con GOF en Pdr1 son menos fagocitados que la cepa control en experimentos de fagocitosis competitiva, lo que sugiere que el factor puede jugar un papel en la evasión de la respuesta inmunológica<sup>68</sup>. Los autores proponen que Pdr1 con GOF controla la expresión de las adhesinas epiteliales, entre ellas las de la familia *EPA*. Los datos de Ferrari *et al.* demuestran que la expresión de *EPA1* se encuentra disminuida en la mayoría de las cepas con mutaciones GOF en *PDR1*, como D1082G, T588A, E1083Q, Y584C, L280F y P822L<sup>149</sup>. Es posible que la disminución en la expresión de la *EPA1* reduzca el reconocimiento de *C. glabrata* por los BMDM, ya que esta adhesina epitelial funciona como un PAMP<sup>67</sup>.

Cabe resaltar que se han descrito otros mecanismos que incrementan la expresión de los transportadores ABC y la resistencia farmacológica, pero que no implican mutaciones GOF en *PDR1*. Por ejemplo, existen alteraciones

cromosómicas que aumentan el número de copias de los genes que codifican para los transportadores ABC<sup>152-154</sup>. Poláková *et al.* demostraron que un aislado de *C. glabrata* contiene un mini-cromosoma F estable, en donde se encuentra el gen *CDR2*, y que se selecciona en condiciones de exposición al fluconazol<sup>153</sup>. Por otra parte, se conoce que la pérdida de la función mitocondrial se asocia con la generación de la resistencia al fluconazol en *C. glabrata*<sup>136,155-156</sup>. Sin embargo, el mecanismo de cómo éstas mutantes petit ( $\rho^0$ ) incrementan la resistencia a los azoles todavía se desconoce. Un estudio reciente demostró que, si bien Gal11A es esencial para la activación de los genes de resistencia al fluconazol en las cepas normales, es prescindible en las mutantes petit<sup>144</sup>. En concordancia con la hipótesis de que la adquisición de la resistencia se asocia con una disminución de la competencia<sup>151</sup>, un estudio ha demostrado que la pérdida de la función mitocondrial incrementa la resistencia al fluconazol pero también disminuye la virulencia de *C. glabrata*<sup>157</sup>. Los autores adjudican este fenómeno a la incapacidad de las mutantes  $\rho^0$  de asimilar fuentes de carbono no fermentables y a su menor velocidad de crecimiento. Sin embargo, Ferrari *et al.* encontraron un aislado clínico que perdió la función mitocondrial durante el tratamiento farmacológico del paciente y no sólo se tornó resistente al fármaco sino que también exhibió un mayor grado de competencia *in vivo*<sup>158</sup>. Los autores de este trabajo mencionan que la razón por la que probablemente no se encuentren aislados petit resistentes a los azoles en los pacientes se puede deber a los métodos de crecimiento en el laboratorio. Dado que las mutantes petit exhiben una disminución en la velocidad de crecimiento *in vitro* es probable que en la clínica se subestime su número y su impacto epidemiológico. Será necesario efectuar un mayor número de estudios para esclarecer su frecuencia real.

### **1.11. Las sirtuinas de *C. glabrata* en la respuesta a los estímulos ambientales**

La capacidad de *C. glabrata* de modificar su perfil de transcripción es una de las principales estrategias que le permiten adaptarse a condiciones ambientales adversas. Sin embargo, esta respuesta a los estímulos ambientales no sólo es esencial para la supervivencia de *C. glabrata* dentro del hospedero sino también

para detectar las condiciones favorables para la infección. Un ejemplo de esta respuesta es la transcripción de las adhesinas asociadas con la virulencia cuando hay una limitación ambiental de los precursores del NAD<sup>+</sup>. Tal como hemos mencionado anteriormente, esta desrepresión se debe a la pérdida del silenciamiento por inactivación de la sirtuina Sir2 en las regiones subteloméricas<sup>45</sup>. Las sirtuinas son una familia de desacetilasas de proteínas dependientes del NAD<sup>+</sup> que se encuentran presentes en todos los organismos, de bacterias a humanos<sup>159</sup>. *C. glabrata* tiene cinco genes de sirtuinas que incluyen *SIR2* y sus cuatro homólogos, denominados *HST1-HST4*<sup>160</sup>. De estos genes, el parálogo más cercano a *SIR2* es *HST1* y, aunque ambas proteínas participan en la represión de la transcripción, también controlan otros procesos distintos<sup>45,161</sup>

En *S. cerevisiae*, se ha propuesto que Sir2 y Hst1 han adquirido durante la evolución una función distinta<sup>162-163</sup> de tal forma que Sir2 opera como un silenciador regional<sup>164-165</sup> mientras que Hst1 como un represor local de un juego de genes específico<sup>166-167</sup>. En *S. cerevisiae* Sir2 y Hst1 comparten dos regiones conservadas: la porción N-terminal, que posee una conservación moderada y participa en la interacción con otras proteínas, y el dominio catalítico del C-terminal, que está muy conservado y contiene el sitio activo y el módulo de unión a zinc; este último es esencial para la estructura de las sirtuinas. A pesar de su similitud, Sir2 y Hst1 forman complejos proteicos diferentes. Específicamente, Sir2 interacciona con Sir4 para el silenciamiento de las regiones subteloméricas y los loci del apareamiento<sup>164,168-169</sup>. Además, Sir2 interacciona con Net1, una proteína esencial en el silenciamiento nucleolar de las regiones repetidas del RNA ribosomal<sup>170</sup>. En cambio, Hst1 funciona como un represor específico del promotor de los genes  $\alpha$ -específicos de la fase intermedia de la esporulación, de la biosíntesis de la tiamina y de la biosíntesis y el transporte del NAD<sup>+</sup><sup>171-174</sup>. La especificidad de Hst1 por estos genes es debida a su interacción con el factor de transcripción Sum1 y la proteína Rfm1<sup>166-167</sup>. Recientemente, se ha propuesto que los aminoácidos glutamina e isoleucina de la posición 296 y 297 son los residuos que median la interacción de Hst1 con Rfm1. En cambio, la especificidad de Sir2

por el complejo Sir está dada por un dominio en el N-terminal del núcleo catalítico<sup>162</sup>.

Hasta este momento, los datos apuntan a que la divergencia funcional entre estas sirtuinas también se ha conservado en *C. glabrata*, posiblemente debido a la cercanía filogenética de esta levadura con *S. cerevisiae*<sup>45,49,161,175</sup>. Resulta interesante que Hst1 es la principal sirtuina que media la transcripción de *C. glabrata* a la limitación de niacina<sup>161</sup>. Entre los genes controlados por Hst1 se destacan los que codifican para los transportadores de alta afinidad por niacina (*TNA1*, *TNR1* y *TNR2*). Estos genes son requeridos para mantener la homeostasis del NAD<sup>+</sup> en *C. glabrata*<sup>161</sup>. Ma *et al.* demostraron que, en condiciones limitantes de niacina, Hst1 pierde su actividad y permite la desrepresión de los transportadores de niacina para restaurar los niveles del NAD<sup>+</sup> intracelular y reanudar el crecimiento de *C. glabrata*<sup>48</sup>. Esta respuesta es similar a lo que sucede en *S. cerevisiae*, en donde Hst1 funciona como un detector que regula los niveles del NAD<sup>+</sup> al controlar tanto los transportadores de sus precursores como los genes implicados en su biosíntesis<sup>172</sup>. Sin embargo, vale la pena destacar que aún cuando Hst1 es similar entre *S. cerevisiae* y *C. glabrata*, los perfiles de transcripción obtenidos en las cepas mutantes *hst1Δ* sugieren que esta sirtuina controla genes distintos en las dos levaduras<sup>161,176</sup>.

## 2. ANTECEDENTES DIRECTOS

El trabajo de Ma *et al.* demostró que las sirtuinas son represores transcripcionales y que, a pesar de su elevado grado de similitud, cada una controla un juego de genes distinto en *C. glabrata*<sup>161</sup>. Además, la auxotrofia de *C. glabrata* por el NAD<sup>+</sup> hace que las sirtuinas sean susceptibles a la limitación ambiental de niacina, una condición que se puede encontrar en el hospedero<sup>45,161</sup>. Es por ello que decidimos evaluar si la inactivación de las sirtuinas puede modificar la capacidad adaptativa de *C. glabrata* en diferentes condiciones de estrés. En este trabajo decidimos explorar la participación de las sirtuinas en la respuesta al estrés oxidante y en la resistencia multifarmacológica de *C. glabrata*. Elegimos estos estímulos porque la generación de altos niveles de especies reactivas del oxígeno constituye uno de los principales mecanismos que utilizan las células fagocíticas para eliminar los microorganismos, y, por otro lado, el fluconazol continúa siendo el medicamento de elección para el tratamiento profiláctico de las candidiasis. La participación de las sirtuinas en el control de ambos procesos no ha sido estudiada.

### 3. OBJETIVO GENERAL

Evaluar la participación de las sirtuinas en la respuesta al estrés de *C. glabrata*, en particular del estrés oxidante y de la exposición al fluconazol, así como profundizar en el mecanismo de regulación.

#### 3.1. Objetivos específicos

- Analizar la susceptibilidad de *C. glabrata* al fluconazol y al peróxido de hidrógeno en ausencia de las sirtuinas.
- Identificar a los genes implicados en la susceptibilidad a los agentes evaluados.
- Determinar si los fenotipos observados se deben a la represión de la transcripción de los genes controlados por las sirtuinas.
- Ahondar en el mecanismo de represión de la transcripción ejercido con las sirtuinas.
- Analizar si la respuesta estudiada se encuentra conservada en *S. cerevisiae*.

## 4. MATERIALES Y MÉTODOS

### 4.1. Cepas

Las cepas de *C. glabrata* empleadas en este trabajo se detallan en las tablas contenidas en el artículo. Las cepas usadas en los resultados anexos se describen en la tabla 1, mientras que la tabla 2 enlista las cepas usadas de *S. cerevisiae*. La cepa parental de *C. glabrata* (BG14), posee una mutación nula por inserción con el transposón Tn903 [Tn903 *npt* (Neo<sup>R</sup> G418<sup>R</sup>)] en el gen *URA3*, por lo que todas las cepas derivadas de ella son auxótrofas de uracilo<sup>177</sup>. La cepa parental de *S. cerevisiae* es BY4742, por lo que son auxótrofas de uracilo, lisina, leucina e histidina.

**Tabla 1 | Cepas de *Candida glabrata***

Cepa	Parental	Genotipo	Comentario	Referencia
BG2	—	Aislado clínico (Cepa B)	—	<sup>178</sup>
BG14	BG2	<i>ura3Δ::Tn903 G418<sup>R</sup></i>	Parental Ura <sup>-</sup> , Hyg <sup>S</sup>	<sup>177</sup>
CGM71 <i>sir2Δ</i>	BG14	<i>ura3Δ::Tn903 G418<sup>R</sup></i> <i>sir2Δ::hph</i>	Ura <sup>-</sup> , Hyg <sup>R</sup>	Colección del laboratorio.
CGM84 <i>hst1Δ</i>	CGM76	<i>ura3Δ::Tn903 G418<sup>R</sup></i> <i>hst1Δ</i>	Ura <sup>-</sup> , Hyg <sup>S</sup>	Colección del laboratorio.
CGM86 <i>hst2Δ</i>	BG14	<i>ura3Δ::Tn903 G418<sup>R</sup></i> <i>hst2Δ::hph</i>	Ura <sup>-</sup> , Hyg <sup>R</sup>	Colección del laboratorio.
CGM673 <i>sum1Δ</i>	BG14	<i>ura3Δ::Tn903 G418<sup>R</sup></i> <i>sum1Δ::hph</i> - PCR de fusión	Ura <sup>-</sup> , Hyg <sup>R</sup>	Colección del laboratorio.
CGM712 <i>hst1Δ/sir2Δ</i>	CGM84	<i>ura3Δ::Tn903 G418<sup>R</sup></i> <i>hst1Δ/sir2Δ::hph</i> - pAP596/ <i>SacI</i> - <i>KpnI</i>	Ura <sup>-</sup> , Hyg <sup>R</sup>	Este trabajo.
CGM943 <i>rfm1Δ</i>	BG14	<i>ura3Δ::Tn903 G418<sup>R</sup></i> <i>rfm1Δ::NAT</i> - PCR de fusión	Ura <sup>-</sup> , Nat <sup>R</sup>	Este trabajo.
CGM1094 <i>pdr1Δ</i>	BG14	<i>ura3Δ::Tn903 G418<sup>R</sup></i> <i>pdr1Δ::hph</i> - PCR de fusión	Ura <sup>-</sup> , Hyg <sup>R</sup>	Colección del laboratorio.
CGM1096 <i>cdr1Δ</i>	BG14	<i>ura3Δ::Tn903 G418<sup>R</sup></i> <i>cdr1Δ::hph</i> por PCR de fusión	Ura <sup>-</sup> , Hyg <sup>R</sup>	Colección del laboratorio.

CGM1117 <i>hst1Δ/pdr1Δ</i>	CGM84	<i>ura3Δ::Tn903 G418<sup>R</sup></i> <i>hst1Δ/pdr1Δ::hph</i> por PCR de fusión	Ura <sup>-</sup> , Hyg <sup>R</sup>	Colección del laboratorio.
CGM1118 <i>hst1Δ/cdr1Δ</i>	CGM84	<i>ura3Δ::Tn903 G418<sup>R</sup></i> <i>hst1Δ/cdr1Δ::hph</i> por PCR de fusión	Ura <sup>-</sup> , Hyg <sup>R</sup>	Colección del laboratorio.
CGM1232 <i>sum1Δ</i>	CGM673	<i>ura3Δ::Tn903 G418<sup>R</sup></i> <i>sum1Δ</i>	Ura <sup>-</sup> , Hyg <sup>S</sup>	Este trabajo
CGM1232 <i>rfm1Δ</i>	CGM943	<i>ura3Δ::Tn903 G418<sup>R</sup></i> <i>rfm1Δ</i>	Ura <sup>-</sup> , Hyg <sup>S</sup>	Este trabajo
CGM1236 Hst1-cMyc Sum1-Flag	CGM983	<i>ura3Δ::Tn903 G418<sup>R</sup></i> <i>HST1::c-Myc13 - pOZ32/Xmnl-BIpl</i> <i>SUM1:: FLAG - pOZ72/PvuII-BgII</i>	Ura <sup>-</sup> , Hyg <sup>S</sup>	Colección del laboratorio
CGM1444 <i>hst1</i> C344A,C347A	CGM1336	<i>ura3Δ::Tn903 G418<sup>R</sup></i> <i>hst1 C344A,C347A - pOZ86/MscI</i>	Ura <sup>-</sup> , Hyg <sup>S</sup>	Este trabajo
CGM1505 Skn7-cMyc	CGM1482	<i>ura3Δ::Tn903 G418<sup>R</sup></i> <i>SKN7::c-Myc13 - pJC52/BamHI-BgII</i>	Ura <sup>-</sup> , Hyg <sup>S</sup>	Juárez-Cepeda
CGM1548 Skn7-cMyc Yap1-Flag	CGM1528	<i>ura3Δ::Tn903 G418<sup>R</sup></i> <i>SKN7::c-Myc13 - pJC52/BamHI-BgII</i> <i>YAP1:: FLAG - pJC50/MfeI-BsgI</i>	Ura <sup>-</sup> , Hyg <sup>S</sup>	Juárez-Cepeda
CGM1605 <i>hst1Δ::HST1</i>	CGM1590	<i>ura3Δ::Tn903 G418<sup>R</sup></i> <i>hst1Δ::HST1 - pOZ102/BIpl</i>	Ura <sup>-</sup> , Hyg <sup>S</sup>	Este trabajo
CGM1611 <i>sum1Δ::SUM1</i>	CGM1590	<i>ura3Δ::Tn903 G418<sup>R</sup></i> <i>sum1Δ::SUM1 - pOZ100/BgII</i>	Ura <sup>-</sup> , Hyg <sup>S</sup>	Este trabajo
CGM1762 Yap1-Flag	CGM1747	<i>ura3Δ::Tn903 G418<sup>R</sup></i> <i>YAP1:: FLAG - pJC50/BsgI-BsgI</i>	Ura <sup>-</sup> , Hyg <sup>S</sup>	Juárez-Cepeda
CGM1819 <i>sum1Δ::LkSUM1</i>	CGM1232	<i>ura3Δ::Tn903 G418<sup>R</sup></i> <i>sum1Δ::LkSUM1 - pOZ110/PacI</i>	Ura <sup>+</sup> , Hyg <sup>S</sup>	Este trabajo
CGM1820 <i>sum1Δ::LkSUM1</i>	CGM1232	<i>ura3Δ::Tn903 G418<sup>R</sup></i> <i>sum1Δ::LkSUM1 - pOZ110/PacI</i>	Ura <sup>+</sup> , Hyg <sup>S</sup>	Este trabajo

**Tabla 2 | Cepas de otras levaduras**

Especie	Cepa	Genotipo	Comentario	Referencia
<i>S. cerevisiae</i>	BY4742	<i>MAT<math>\alpha</math></i> <i>his3<math>\Delta</math>1</i> , <i>leu2<math>\Delta</math>0</i> , <i>lys2<math>\Delta</math>0</i> , <i>ura3<math>\Delta</math>0</i>	Parental His <sup>-</sup> , Leu <sup>-</sup> , Lys <sup>-</sup> , Ura <sup>-</sup>	<sup>179</sup>
<i>L. kluyveri</i>	NRRL Y-12651	—	—	Riego-Ruiz
<i>C. parapsilosis</i>	ATCC 22019	—	FLC [S] 0.5 - 4 $\mu$ g/mL a 24 h 1 - 4 $\mu$ g/mL a 48 h	UASLP
<i>C. krusei</i>	ATCC 6258	—	FLC [S-DD a R] 8 - 64 $\mu$ g/mL a 24 h 16 -128 $\mu$ g/mL a 48 h	UASLP

#### 4.2. Plásmidos

Los plásmidos utilizados en este estudio se describen en la Tabla 3. Todos ellos se introdujeron por electroporación o por choque térmico en alguna de las cepas de *Escherichia coli* utilizadas en este trabajo (DH10B, DH10 *pcnB*<sup>-</sup> o *Stb12*). Para aislar el ADN plasmídico de cultivos bacterianos, se usó el kit *QIAprep* de la marca comercial QIAGEN<sup>®</sup>.

**Tabla 3 | Plásmidos**

Plásmido	Descripción y/o genotipo relevante	Referencia
pGEM <sup>®</sup> -T	Vector de clonación. Amp <sup>R</sup> .	Promega <sup>®</sup> No. Cat.: A3600
pMB11	Vector de clonación. Cm <sup>R</sup> , Sac <sup>S</sup>	<sup>180</sup>
pOZ18	Vector para crear fusiones traduccionales con <i>c-myc13</i> . Fragmento BamHI/BglII de 0,563Kb ( <i>c-myc13</i> ) derivado de pAP760, clonado en pOZ14 digerido con BamHI. Se seleccionó la orientación con el <i>c-myc13</i> en dirección 5'→3'. [ <i>c-myc13</i> ::( <i>FRT</i> -3'UTR <sub>CTA1</sub> )P <sub>PGK1</sub> :: <i>hph</i> ::(3'UTR <sub>HIS3</sub> )- <i>FRT</i> ] ; <i>URA3</i> Hyg <sup>R</sup> Amp <sup>R</sup> .	Este trabajo.
pGE40	Vector para crear fusiones traduccionales con <i>FLAG</i> .	Colección

	[ <i>FLAG::(FRT-3'UTR<sub>CTA1</sub>)P<sub>PGK1</sub>::hph::(3'UTR<sub>HIS3</sub>)-FRT</i> ] ; <i>URA3 Hyg<sup>R</sup> Amp<sup>R</sup></i> .	del laboratorio.
pYIp <i>lac211</i>	Vector de clonación. <i>URA3 Amp<sup>R</sup></i>	Colección del laboratorio.
pRS306	Vector de clonación. <i>URA3 Amp<sup>R</sup></i>	Colección del laboratorio.
VECTORES PARA MODIFICACIONES GÉNICAS		
Plásmido	Descripción y/o genotipo relevante	Referencia
pAP596 <i>sir2Δ</i>	Vector para construcción de mutante nula en <i>SIR2</i> . Un casete de resistencia a higromicina, flanqueado en el extremo 5' por 0.583Kb de la región promotora de <i>SIR2</i> y en el 3' por 0.828Kb del terminador de <i>SIR2</i> . [5' <i>SIR2</i> -P <sub>PGK1</sub> :: <i>hph::(3'UTR<sub>HIS3</sub>)-(3'UTR<sub>SIR2</sub>)</i> ]; <i>URA3 Hyg<sup>R</sup> Amp<sup>R</sup></i> .	Colección del laboratorio.
pOZ32 <i>HST1::c-Myc13</i>	Fragmento <i>SacI-BglII</i> de 0.654Kb (3' <i>ORFHST1</i> ) derivado de pAP754, clonado en pOZ22 digerido con <i>SacI-BamHI</i> . [3' <i>ORFHST1::c-myc13::(FRT-3'UTR<sub>CTA1</sub>)P<sub>PGK1</sub>::hph::(3'UTR<sub>HIS3</sub>)-FRT-(3'UTR<sub>HST1</sub>)</i> ]; <i>URA3 Hyg<sup>R</sup> Amp<sup>R</sup></i> . Para fusión traduccional de <i>HST1</i> con <i>c-myc13</i> .	Este trabajo.
pOZ72 <i>SUM1::FLAG G</i>	Fragmento <i>SpeI-BglII</i> de 1.552Kb (3' <i>ORFSUM1</i> ) derivado de pOZ56, clonado en pOZ64 digerido con <i>SpeI-BamHI</i> . [3' <i>ORFSUM1::FLAG::(FRT-3'UTR<sub>CTA1</sub>)P<sub>PGK1</sub>::hph::(3'UTR<sub>HIS3</sub>)-FRT-(3'UTR<sub>SUM1</sub>)</i> ]; <i>URA3 Hyg<sup>R</sup> Amp<sup>R</sup></i> . Para fusión traduccional de <i>SUM1</i> con <i>FLAG</i> .	Este trabajo.
pOZ86 <i>hst1 C344A, C347A</i>	Fragmento <i>SacI-HindIII</i> de 2.429Kb que contiene el ORF mutante de <i>HST1</i> y las regiones 5'y 3'flanquantes. La parte N-terminal fue amplificada con los oligonucleótidos #311 y #583 y la pareja #503 y #385 para la parte C-terminal. Los cambios en la secuencia de nucleótidos sustituyen a las Cys 344 y 347 por Ala e introducen un sitio <i>NheI</i> . Clonado en pYIp <i>lac211</i> .	Este trabajo.
pOZ100 <i>SUM1</i>	Fragmento <i>BamHI-SalI</i> de 3.785Kb (5'- <i>SUM1</i> -3') amplificado con los oligonucleótidos #859 y #860, clonado en pYIp <i>lac211</i> digerido con <i>BamHI-SalI</i> . <i>URA3 Amp<sup>R</sup></i> Para complementación de la mutante <i>sum1Δ</i>	Este trabajo.
pOZ102 <i>HST1</i>	Fragmento <i>SalI-XhoI</i> de 4.367Kb (5'- <i>HST1</i> -3') amplificado con los oligonucleótidos #861 y #789, clonado en pRS306 digerido con <i>SalI</i> -	Este trabajo.

	<i>Xho</i> I. <i>URA3</i> Amp <sup>R</sup> Para complementación de la mutante <i>hst1Δ</i>	
pOZ110 <i>LkSUM1</i>	Fragmento <i>Bam</i> HI- <i>Sa</i> II de 4.8Kb (5'-Lk <i>SUM1</i> -3') de PCR de fusión, amplificado con los oligonucleótidos #859 y #860, clonado en pRS306 digerido con <i>Bam</i> HI- <i>Sa</i> II. Los módulos del 5'y 3' de <i>C. glabrata</i> fueron amplificados con los oligonucleótidos #859 con #1012, y #1015 y #860. El ORF de <i>SUM1</i> de <i>L. kluyveri</i> fue amplificado con los oligonucleótidos #1013 y #1014. <i>URA3</i> Amp <sup>R</sup> Para complementación de la mutante <i>sum1Δ</i>	Este trabajo.
pJC50 <i>YAP1::FLAG</i>	[3'ORF <i>YAP1::FLAG::(FRT-3'UTR<sub>CTA1</sub>)P<sub>PGK1</sub>::hph::(3'UTR<sub>HIS3</sub>)-FRT-(3'UTR<sub>YAP1</sub>)]; <i>URA3</i> Hyg<sup>R</sup> Amp<sup>R</sup>. Para fusión traduccional de <i>YAP1</i> con <i>FLAG</i></i>	Juárez-Cepeda
pJC52 <i>SKN7::c-Myc13</i>	[3'ORF <i>SKN7::cMyc13::(FRT-3'UTR<sub>CTA1</sub>)P<sub>PGK1</sub>::hph::(3'UTR<sub>HIS3</sub>)-FRT-(3'UTR<sub>SKN7</sub>)]; <i>URA3</i> Hyg<sup>R</sup> Amp<sup>R</sup>. Para fusión traduccional de <i>SKN7</i> con <i>cMyc13</i></i>	Juárez-Cepeda
VECTORES REPLICATIVOS		
Plásmido	<b>Descripción y/o genotipo relevante</b>	<b>Referencia</b>
pMZ21	Vector replicativo que expresa la recombinasa ( <i>ScFlp1p</i> ) para la remoción de casetes de resistencia a antibióticos flanqueados por sitios <i>FRT</i> ; [ <i>P<sub>EPA1</sub>::FLP1::(3' UTR<sub>HIS3</sub>)</i> ; <i>URA3</i> Amp <sup>R</sup> .	Colección del laboratorio

### 4.3. Oligonucleótidos

Los oligonucleótidos (Elim Biopharmaceuticals, Inc.) utilizados para la construcción de los plásmidos y los análisis de la transcripción se describen en la Tabla 4. El nombre indica el gen en donde hibrida y los sitios de restricción. Los números sin signo son coordenadas dentro del ORF, mientras que negativos y positivos indican una hibridación con el extremo 5' o el 3' UTR del gen, respectivamente. Fw denota orientación en sentido y Rv la antisentido.

**Tabla 4 | Oligonucleótidos**

#	Nombre	Secuencia 5'→3'	Sitios
13	1505 Univ	GGCGATTAAGTTGGGTAACGCCAGGG	—
17	418 Univ. pGEM Rv	GGAAACAGCTATGACCATGA	—
88	HST1@+1306Rv	AAGAGCTAAGAGAACTTTGTCCTCCGTC	—
114	ScURA3@730bp Fw	GCTAAGGTAGAGGGTGAACGTTACAG	—
219	219 ACT1@70 Fw	CGCCGGTGACGATGCTCC	—
221	HST1@-1080bp Fw	GTCAAATCTTGACACAGGCAGTGG	—
225	NAT 5' FW	CCGCTGCTAGGCGCGCCGTG	—
227	NAT 3' RV	GCAGGGATGCGGCCGCTGAC	—
273	CTA1@92bp Fw	TCAAAGAGTTGGTCAACACG	—
274	CTA1@275bp Rv	CGGAGAACATGGCAGAACC	—
284	MSN4@158bp Fw	ATCGGGAACCAACTCAACC	—
285	MSN4@345bp Rv	GCAGCTTAGGCAGCGTAGC	—
313	HST1@+1PstIFw	CG <u>ACTGCAG</u> ACCGCTCATTGTTTTATAAT AG	<i>PstI</i>
486	RFM1@-56bpNAT RV	CCACGGCGCGCCTAGCAGCGGTATTCAAAT GAATACGTTAATGTAGAAG	—
487	RFM1@-947bp FW	GGCGAATTGGATACAGTAGTC	—
489	RFM1@+1bpNAT FW	CGTCAGCGGCCGCATCCCTGCCATTACCTC GCATTAATAGTAGG	—
490	RFM1@+914bp RV	ATGTCCCTCAGAACATAATATCG	—
496	SUM1@-929bp Fw	AATAAAATTATGAACTACCACTATCGG	—
498	SUM1@+951bp Rv	GCTGGGATCATGAAATTTATGTG	—
499	SUM1@+991bp Rv	CGTAAGACCAAAGCTAATACTCTC	—
502	HST1@540bpEcoRI Fw	AGCAACA <u>GAATTC</u> GATTATCC	<i>EcoRI</i>
503	HST1@1008bpClal Fw	CAG <u>ATCGAT</u> GGAATTGCC <u>GCTAGCT</u> CCTTAT <u>GCTTATCAA</u>	<i>Clal</i> <i>NheI</i>
504	HST1@449bp Fw	CGAATATGAAGATTTCACTGATCC	—
582	SUM1@306bpSpeIFw	AA <u>ACTAGT</u> ACGTACACAAATTCAAATAGCTC TG	<i>SpeI</i>
583	HST1@1047bp NheI Rv	TTGATAAGCATAAGG <u>GCTAGC</u> GGCAATTC	<i>NheI</i>
586	SUM1@-89bpFw	GTATTACACCCTTGATAATCGAATTAC	—
588	SUM1@+1059bp KpnIRv	GCG <u>GGTACC</u> CAAATACTACTTAGTTTTCAC AATTCTG	<i>KpnI</i>
742	PDR1@729bp Fw	CGCCATTGAGTTACAACCTTAG	—

743	<b>PDR1@952bp Rv</b>	CAAGACTAAATCCACACTCTCC	—
750	<b>CDR1@2294bp Fw</b>	GTATTGGTCTGGCCTATGTG	—
751	<b>CDR1@2565bp Rv</b>	GGCTTCAGATTGAGATAAACC	—
789	<b>HST1@+1000bpXhoI Rv</b>	CG <b>ACTCGAG</b> TACGGTGCCGCTGTTC	<b>XhoI</b>
859	<b>SUM1@-835bp BamHI Fw</b>	GAG <b>GGATCC</b> GGTACGTTAGCTGTGTGCG	<b>BamHI</b>
860	<b>SUM1@+807bp Sall Rv</b>	ACG <b>GTCGAC</b> AAACGTTGCGCAGC	<b>Sall</b>
861	<b>HST1@-791bp Sall Fw</b>	GCAG <b>GTCGAC</b> GGAGACGAAACGCAGG	<b>Sall</b>
977	<b>ACT1@258 Rv</b>	CGTTGTAGAAAGTGTGATGC	—
1012	<b>CgSUM1@-1bp LkSUM1@23bp Rv</b>	ACAACATGGCTATCAACACTCATAGCTGGTT TATATAATTGTTTCTAAGC	—
1013	<b>LkSUM1@1bp Fw</b>	ATGAGTGTTGATAGCCATGTTG	—
1014	<b>LkSUM1@2700bp CgSUM1+10bp Rv</b>	ACGAGTTGTTCTAAACCTCTGGTTG	—
1015	<b>LkSUM1@2683bp CgSUM1+1bp Fw</b>	CCTCAACCAGAGGTTTAGAACAACTCGTATA TATAAGAGTCTCAATAC	—

#### 4.4. Medios de cultivo

Para el aislamiento de los plásmidos a partir de cultivos de las cepas de *E. coli*, se utilizó medio Luria-Bertani (LB)<sup>181</sup>. El medio contiene extracto de levadura 5 g/L, triptona 10 g/L y NaCl 5 g/L. Cuando fue necesario, se suplementó con carbenicilina (A. G. Scientific<sup>®</sup>) a una concentración final de 50 µg/mL (LB-Cb50) o bien con cloranfenicol (IBI Scientific<sup>®</sup>) a 20 µg/mL. Para los medios sólidos de LB con carbenicilina y para LB con cloramfenicol y sacarosa (Fermont<sup>®</sup>), se añadió agar bacteriológico (Fisher Scientific<sup>®</sup>) a una concentración final de 1.5 % (w/v), mientras que el azúcar se añadió a concentración final de 5 % (w/v). Se usó La solución de almacenamiento y transformación hacer *in situ* cepas bacterianas competentes. La solución se constituye por LB con 10% (w/v) de polietilenglicol (Fluka Biochemica<sup>®</sup>) (3350), MgCl<sub>2</sub> 100 mM y dimetilsulfóxido (DMSO Sigma-Aldrich<sup>®</sup>) 5% (v/v) a pH de 6.5. Finalmente, para la recuperación de las cepas bacterianas competentes, se utilizó medio SOC. Este medio rico contiene extracto de levadura 5 g/L, triptona 20 g/L, NaCl 10 mM, KCl 2.5 mM, MgSO<sub>4</sub> 10 mM, MgCl<sub>2</sub> 10 mM y glucosa a una concentración final de 0.4% (w/v).

Las cepas de *C. glabrata* se cultivaron en medio YPD. El medio contiene extracto de levadura 10 g/L, peptona 20 g/L, glucosa 2 % (w/v) y es complementado con 25 mg/L de uracilo (Sigma Aldrich®)<sup>182</sup>. Para la selección de las cepas transformadas, se suplementó con higromicina (A. G. Scientific®) a una concentración final de 440 µg/mL o con 100 µg/mL de nourseotricina (WERNER BioAgents®). El medio casaminoácidos (CAA), se compone de base nitrogenada de levadura sin amonio 1.7g/L, sulfato de amonio [(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>] 5 g/L, casaminoácidos 6 g/L y de glucosa 2 % (w/v). Cuando fue necesario, se suplementó con uracilo 50 mg/L y de ácido-5-fluorótico 0.9 g/L (Toronto Research Chemicals®), para dar lugar al medio 5-FOA. Para el ensayo de longevidad cronológica se utilizó medio mínimo que sólo contiene base nitrogenada de levadura sin amonio 1.7 g/L, sulfato de amonio 5 g/L, glucosa 2 % y uracilo 25 mg/mL. Para las versiones sólidas de los medios descritos, se añadió agar bacteriológico a concentración final de 2 % (w/v). Para ensayos de sensibilidad al fluconazol (Diflucan® de Pfizer®, solución salina) se prepararon cajas de YPD suplementado con diferentes concentraciones del fármaco y cuando se indica, también se añadió nicotinamida (Sigma Aldrich®) a concentración final de 10mM. Para los ensayos de susceptibilidad cuantitativa al fluconazol se utilizó el medio sintético RPMI-1640 (Sigma Aldrich®), con MOPS 0.164 M (Sigma Aldrich®) a pH 7.0±0.1, complementado con glutamina 0.3 g/L (Sigma Aldrich®) y sin bicarbonato sódico. Los cultivos líquidos se incubaron con agitación rotatoria y tanto sólidos como líquidos se incubaron a 30 °C.

#### **4.5. Transformación genética de *C. glabrata***

Para transformar genéticamente a *C. glabrata* con ADN lineal o superenrollado se utilizó una modificación del método de transformación con acetato de litio (LiAcO)<sup>183</sup>. Todas las cajas con colonias transformadas se incubaron a 30 °C, al menos durante 48 horas. Se eligieron en promedio 8 colonias de cada cepa transformada y se purificaron dos veces en medio de selección adecuado (CAA, YPD-Hyg o YPD-NAT). Se estriaron en medio YPG para analizar su capacidad de utilizar glicerol como fuente de carbono no fermentable y de este modo descartar que hayan presentado mutaciones que alteraran su función mitocondrial (*petit*).

Posteriormente se extrajo ADN genómico y se diagnosticó por PCR la modificación genética correspondiente.

#### **4.6. Ensayos de sensibilidad a los oxidantes**

Todos los precultivos de las cepas de *C. glabrata* usadas en estos ensayos se hicieron crecer por 36 h en medio YPD a 30 °C, hasta alcanzar una  $DO_{600} \approx 30$ . Como agente oxidante se utilizó  $H_2O_2$  35 % (wt) o menadiona de Sigma-Aldrich®. Para evaluar la sensibilidad en la fase de crecimiento exponencial, los cultivos saturados fueron diluidos en medio YPD fresco, de tal forma que al término de siete duplicaciones alcanzaran una  $DO_{600}$  de 0.5. Inmediatamente después se dividieron los cultivos en alícuotas para someterlos a diferentes concentraciones de  $H_2O_2$  o de menadiona por 3 h a 30 °C y con agitación constante. Al finalizar el tratamiento, se colectó la cantidad de cultivo equivalente a una  $DO_{600}$  de 0.5 y, tras la remoción del agente oxidante, las células se resuspendieron en 1mL de agua destilada estéril. Posteriormente se realizaron diluciones logarítmicas en placas Costar® de 96 pozos y se sembraron en cajas petri con medio YPD mediante el uso de un replicador metálico de 48 dientes (VP 407AH, V&P Scientific Inc.).

Se registró el crecimiento de las cepas durante 2-3 días de incubación a 30 °C. Sin embargo, debido al fenotipo de lento crecimiento de las cepas *hst1Δ*, *sum1Δ* y *rfm1Δ*, los registros fotográficos se realizaron a las 48 h y se comparan con las fotografías obtenidas a las 36 h del resto de las cepas evaluadas en YPD. Los experimentos se realizaron al menos por duplicado.

#### **4.7. Ensayos de susceptibilidad al fluconazol**

Se utilizó una solución salina de fluconazol (Diflucan Pfizer® 2 mg/mL) para la realización de medios sólidos de YPD con Fluconazol (YPD-FLC) a diferentes concentraciones. Todas las cepas de *C. glabrata* usadas en este ensayo se hicieron crecer por 36 h en medio YPD a 30 °C, hasta alcanzar una  $DO_{600} \approx 30$ . De cada cepa en fase de crecimiento estacionario, se tomó la cantidad necesaria para obtener una  $DO_{600}$  de 0.5. Las células se colectaron por centrifugación, se

descartó el sobrenadante y se resuspendieron en 1 mL de agua estéril. Después se realizaron cinco diluciones logarítmicas seriadas en placas Costar® de 96 pozos y se gotearon  $\approx 5$   $\mu\text{L}$  en YPD y en cajas YPD-FLC de diferentes concentraciones. Cuando fue necesario, se añadió NAM a concentración final de 10 mM, tanto a las placas de YPD como a las de YPD-FLC. Se registró el crecimiento de las cepas durante 2-3 días de incubación a 30 °C. Para los registros fotográficos también se consideraron los fenotipos de las cepas mutantes previamente mencionadas.

Para los ensayos cuantitativos de susceptibilidad al fluconazol se utilizó el método M27-A2 del Instituto de Estándares Clínicos y de Laboratorio (CLSI)<sup>184</sup>. Brevemente, las cepas se hicieron crecer en medio YPD por 36 h hasta alcanzar la fase de crecimiento estacionario. A partir de este cultivo se realiza una serie de diluciones intermedias en solución salina 0.9% y se prepara una suspensión que contenga 500 células/mL en medio sintético RPMI-1640. Posteriormente, en una placa Costar de 96 pozos se vertieron 100  $\mu\text{L}$  del medio RPMI-1640 con las diferentes concentraciones de fluconazol y después se añadieron 100  $\mu\text{L}$  de la suspensión celular. Cuando se indique, tanto las suspensiones celulares como las soluciones con el antifúngico fueron preparadas en diferentes combinaciones de YPD con RPMI-1640. En todos los casos, las placas fueron incubadas a 35 °C por 48 horas. Al término de la incubación se realizó la lectura de la densidad óptica a 540 nm de longitud de onda en el lector de placas Benchmark Plus (BIO-RAD®). El punto de corte fue determinado como la concentración de fluconazol a la cual la levadura despliega un crecimiento menor al 50 % con respecto al crecimiento del microorganismo en el pocillo sin antifúngico. Se usaron las cepas *C. krusei* (ATCC 6258) y *C. parapsilosis* (ATCC 22019) como controles resistentes y susceptibles, respectivamente.

También desarrollamos un ensayo cuantitativo de la susceptibilidad al fluconazol, diferente al del M27-A2. Para ello, se diluyeron los cultivos de la fase de crecimiento estacionario para obtener suspensiones celulares en YPD con  $10^4$  células/mL. Posteriormente se transfirieron 150  $\mu\text{L}$  de esta suspensión a cada uno de los pozos de una placa colmenar de 100 pozos (Oy Growth Curves Ab Ltd) que

contenían 150  $\mu\text{L}$  de medio con diferentes concentraciones de fluconazol. El crecimiento fue monitorizado continuamente por 24 h en el lector espectrofotométrico Bioscreen C (Oy Growth Curves Ab Ltd) a 600 nm de longitud de onda con lecturas cada 15 min y a una temperatura de incubación de 35 °C. La concentración mínima inhibitoria del 50 % del crecimiento ( $\text{MIC}_{50}$ ) fue calculada a partir del área bajo la curva y la gráfica dosis-respuesta generada en el programa GraphPad Prism GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA).

#### 4.8. Ensayo de longevidad cronológica

Para determinar la participación de las sirtuinas en el envejecimiento cronológico de *C. glabrata*, se realizó el experimento descrito por Murakami con algunas modificaciones<sup>185</sup>. Los cultivos de las cepas a evaluar se hicieron crecer en medio YPD por una noche. Posteriormente se transfirió la misma cantidad de células en medio mínimo y se cultivaron a 30 °C por 26 días en agitador rotatorio. En los días indicados (4, 6, 8, 12, 15, 22 y 26) se tomó una alícuota de cada uno de los cultivos, se determinó su densidad óptica y se preparó una suspensión celular de  $10^5$  céls/mL en medio YPD. Se transfirieron 150  $\mu\text{L}$  de cada suspensión en una placa colmenar de 100 pozos que contenían 150  $\mu\text{L}$  de medio YPD. Las placas fueron incubadas a 30 °C en el aparato Bioscreen y se monitorizó su crecimiento por 24 h mediante lecturas espectrofotométricas de su densidad óptica a 600 nm de longitud de onda e intervalos de 15 min, con agitación constante. A los valores de DO obtenidos para cada cepa se les restó manualmente la DO promedio de los pozos control (sin inóculo). A partir de los valores obtenidos se determinó el tiempo de duplicación mediante el cálculo de la pendiente obtenido de la curva de crecimiento logarítmico en función del tiempo (min). El tiempo de duplicación que corresponde a la máxima viabilidad (100 %) se tomó al cuarto día y se consideró como tiempo cero. La supervivencia se calculó a partir de la fórmula:  $v_n = \frac{1}{2^{(\Delta t_n/\delta)}}$  donde  $v_n$  corresponde a la viabilidad al punto  $n$ ,  $\Delta t_n$  es la cantidad de tiempo que le toma al cultivo evaluado al punto  $n$  en alcanzar una  $\text{DO}_{600}$  de 0.5 con respecto a la curva obtenida al tiempo 0 (máxima viabilidad) y  $\delta$  es el promedio del tiempo de

duplicación calculado para cada cepa en cada día del experimento. Los valores de  $v_n$  se graficaron para cada cepa en función de los días de cultivo. Este experimento sólo se realizó una vez.

#### 4.9. Construcción de las cepas

Se describen solamente las cepas que no fueron incluidas en el artículo. Para colocar el ORF de *SUM1* proveniente de *Lachancea kluyveri* bajo el control de las regiones intergénicas de *SUM1* de *C. glabrata*, se amplificaron tres fragmentos con el sistema Expand Long Template PCR System (Roche®). Los oligonucleótidos #859 y #1012 fueron usados para generar un fragmento que contiene la región intergénica 5' de *C. glabrata* fusionada al inicio de *LkSUM1*. Con los oligonucleótidos #1013 y #1014 se amplificó el ORF de *LkSUM1* que incluye una pequeña porción de la región intergénica 3' de *SUM1* de *C. glabrata*. Por último, la pareja #1015 y #860 fueron utilizadas para obtener la región intergénica 3' de *CgSUM1* que incluye el último fragmento del ORF de *LkSUM1*. Los amplicones fueron purificados por el kit *QIAquick* de *QIAGEN*® y se utilizaron en cantidades equimolares para la reacción de PCR de fusión<sup>186</sup>. Para la fusión de los fragmentos se utilizó la enzima Expand Long Template PCR System® (ROCHE®) y los oligonucleótidos que hibridan en los extremos 5' y 3' de *SUM1* (#859 y #860). El producto de la fusión fue purificado del gel de agarosa (*QIAquick*) y se clonó en pGEM. Para la generación del plásmido pOZ110, se cortó el fragmento de fusión *Cg5'-LkSUM1-Cg3'* con las enzimas *BamHI-SalI* y se clonó en el vector pRS306 cortado con las mismas enzimas. Se cortó el plásmido pOZ110 fue cortado con la enzima *PacI* y tras su purificación con el kit *QIAquick* de *QIAGEN*® se usó para transformar a *C. glabrata*. Las cepas transformadas fueron seleccionadas fueron seleccionadas en cajas medio CAA sin uracilo y se diagnosticó su correcta inserción en el locus de *SUM1* con los oligonucleótidos #496 y #1017 para el 5' y la pareja #13 y #499 para el 3'.

Para construir los plásmidos que se usaron para complementar a las mutantes *sum1Δ* y *hst1Δ*, se amplificaron los ORF de cada gen con sus regiones 5'y 3'. Para amplificar a *HST1*, se usó la pareja de oligonucleótidos #861 y 789,

mientras que los oligonucleótidos #859 y #860 fueron usados para amplificar a *SUM1*. Los amplicones fueron purificados por el kit *QIAquick* y se clonaron en pGEM-T (Promega®) o en pMB11<sup>180</sup>. El fragmento de *HST1* fue cortado con las enzimas *Sall-XhoI*, purificado y clonado en pRS306 para dar lugar al plásmido pOZ102. El fragmento de *SUM1* fue cortado con las enzimas *BamHI-Sall*, purificado y clonado en pYIp/*lac211* para generar el plásmido pOZ100. Los plásmidos pOZ100 y pOZ102 fueron cortados con las enzimas *BglII* y *BlnI*, respectivamente. Con pOZ100-*BglII* se transformó a la mutante CGM1232 (*sum1Δ*) y con pOZ102-*BlnI* a la mutante CGM84 (*hst1Δ*) y Las cepas transformadas fueron seleccionadas fueron seleccionadas en medio CAA. El diagnóstico de la cepa reconstituida de *HST1* se realizó con los oligonucleótidos #313 y #114 para el 5' y para el 3' se usaron los oligonucleótidos #503 y #88. Para diagnosticar la reconstitución de *SUM1* se usaron los oligonucleótidos #586 y #17 para el 5' y para el 3' la pareja de #582 con #498. La resolución de las cepas que segregan por recombinación se realizó mediante el cultivo de las colonias transformadas, en YPD líquido, y su siembra en medio YPD, CAA, YPG y 5-FOA. Tras el escrutinio, se seleccionaron las colonias que crecieron en YPG y que son 5-FOA<sup>R</sup>, que es indicativo que han perdido el gen *URA3* y que indican eventos de recombinación. Estas colonias fueron seleccionadas a partir de las cajas de YPD y se realizó la extracción del ADN. La identificación de las colonias que contienen el evento de recombinación que reconstituye los genes *SUM1* y *HST1* se realizó mediante PCR. Los oligonucleótidos #221 y #88 fueron usados para la identificación de *HST1*, mientras que los oligonucleótidos #496 y #588 para *SUM1*.

La generación de la mutante *rfm1Δ* se realizó mediante PCR de fusión<sup>186</sup>. Los oligonucleótidos (Tabla 4) se diseñaron para la remoción precisa del marco de lectura abierto y con la precaución de alterar lo menos posible la región promotora y terminadora del gen, y de esta forma minimizar cualquier repercusión en genes aledaños. Tanto el oligonucleótido reverso que amplifica la región 5'<sub>RFM1</sub> (#486) como el sentido que amplifica la región 3'<sub>RFM1</sub> (#489), contienen regiones homólogas que hibridan en los extremos del marcador de selección (NAT). Los fragmentos 5' y 3' no traducibles fueron amplificados por PCR con los

oligonucleótidos #486 y #487, y #489 y #490 a partir de ADN genómico de *C. glabrata* y el marcador de selección (NAT) se amplificó a partir del plásmido pCR-TOPO-NAT con los oligonucleótidos #225 y #227. Para la síntesis de estos productos se utilizó la ADN polimerasa Phusion<sup>®</sup> (FINNZYMES<sup>®</sup>). Los amplicones fueron purificados por el kit *QIAquick* de *QIAGEN*<sup>®</sup> y se utilizaron en cantidades equimolares para la reacción de PCR de fusión. Para la fusión de los fragmentos se utilizó la enzima Expand Long Template PCR System<sup>®</sup>(ROCHE<sup>®</sup>) y los oligonucleótidos que hibridan en los extremos 5' y 3' de *RFM1* (#487 y #490). El producto de la fusión fue purificado de gel de agarosa (*QIAquick*) y usado para transformar a *C. glabrata*. La transformación se efectuó tal y como se ha descrito previamente, con la excepción de que las colonias se seleccionaron y estriaron en cajas de YPD con nourseotricina (100µg/mL).

#### **4.10. PCR cuantitativa (qPCR) y transcripción reversa de la PCR por punto final (RT-PCR)**

Las cepas analizadas se hicieron crecer hasta la fase de crecimiento exponencial o estacionario en el medio indicado. Los medios usados fueron YPD, YPD con NAM 10 mM o RPMI-1640. El ARN se extrajo con el reactivo TRIzol (Invitrogen<sup>®</sup>) de acuerdo con las especificaciones del fabricante y fue tratado con DNasa (Invitrogen<sup>®</sup>) para asegurar la remoción completa de cualquier posible ADN contaminante. La síntesis del ADN complementario (cDNA) se llevó a cabo a 42 °C por 50 min y mediante el uso de la transcriptasa reversa SuperScript II<sup>®</sup> (Invitrogen<sup>®</sup>) con los oligonucleótidos reversos para cada gen (tabla 5). Para la PCR cuantitativa (qPCR) se utilizó el reactivo intercalante Fast SYBR Green Master Mix (Invitrogen<sup>®</sup>) y la reacción se llevó a cabo en el equipo ABI 7500 Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems). Los oligonucleótidos usados para la qPCR fueron diseñados con el programa primer express 3.0. Los niveles de transcrito de *ACT1* fueron usados como el control interno para la normalización. El método del ciclo umbral ( $2^{-\Delta\Delta Ct}$ ) fue utilizado para calcular las diferencias en la expresión génica. Los experimentos de qPCR fueron realizados en triplicados técnicos y a partir de tres extracciones de RNA independientes.

Para la RT-PCR, la síntesis del cDNA y la transcripción reversa fue realizada simultáneamente con el reactivo AccessQuick reverse transcription PCR (Promega®). Los oligonucleótidos usados se encuentran en la tabla 5. Para *ACT1* se usaron los oligonucleótidos #219 y #977 con una temperatura de alineamiento (Ta) de 55 °C y 18 ciclos, para *CDR1* los oligonucleótidos #750 y #751 con Ta de 58 °C y 20 ciclos, para *PDR1* los oligonucleótidos #742 y #743 con Ta de 58 °C y 22 ciclos, para *CTA1* los oligonucleótidos #273 y #274 con Ta de 55 °C y 22 ciclos y para *MSN4* los oligonucleótidos #284 y #285 con Ta de 57 °C y 24 ciclos. Se incluyó una reacción sin transcriptasa reversa como control negativo en todas las muestras de RNA y con cada par de oligonucleótidos. En ningún caso se detectó contaminación por ADN.

#### **4.11. Inmunoprecipitación e inmunodetección**

El procedimiento seguido para la extracción de proteínas es una versión modificada del protocolo reportado por McCord et al.<sup>166</sup> Se utilizaron cultivos de cada cepa en 50 mL de YPD, en una fase intermedia del crecimiento logarítmico ( $DO_{600} \approx 0,5$ ). Para el caso del análisis de la interacción entre Skn7 y Yap1, se partió de un cultivo de 10 mL de células en la fase de crecimiento estacionario, del cultivo se expuso a 200 mM de  $H_2O_2$  por 30 min a 30°C. Las células se colectaron por centrifugación y se resuspendieron en 300  $\mu$ L de una solución de lisis la fase de crecimiento estacionario (Tris 50 mM a pH 7,5, NaCl 250 mM, EDTA 5mM, 0.1% Nonidet P-40 substitute [Fluka Biochemica®], DTT [Sigma®] 1.5mM, 1x de inhibidor general de proteasas SigmaFAST® [Sigma®] y 1x del coctel de inhibidor de proteasas Complete [ROCHE®]). Posteriormente se añadió un volumen equivalente (150  $\mu$ L) de perlas de zirconio (BioSpec®) y cada muestra fue agitada veinte veces en el agitador vortex por intervalos de 1 minuto, alternados con incubaciones en hielo de la misma duración. Tras la lisis, el volumen del extracto se ajustó a 500  $\mu$ L mediante la adición de la solución de lisis. Después, cada muestra fue aclarada por centrifugación a 15,000rpm por 30 min a 4 °C y el sobrenadante se transfirió a un tubo limpio. Previo a las reacciones inmunoprecipitación, cada lisado se aclaró con perlas de sefarosa acopladas a la

proteína G (Sigma® P3296). El lisado total se combinó con 30 µL de la resina de perlas al 50 % y se incubaron a 4 °C por 30 min con agitación constante. Al término de la incubación se centrifugó a 15,000rpm por 5 min a 4 °C y el sobrenadante se transfirió a un tubo limpio. Para la inmunoprecipitación, se combinaron 100 µL del extracto aclarado con 100 µL de las suspensiones de perlas de agarosa acopladas al anticuerpo (anti-c-Myc Sigma® A4770 o anti-FLAG Sigma®A2220) y se incubaron por hora y media a 4 °C con agitación constante. Los inmunocomplejos se colectaron por centrifugación, se lavaron con amortiguador salino de forfatos (pH 7.5), se resuspendieron en 25 µL de una solución de dodecilsulfato sódico y se calentaron a 95 °C por 5 min. Las muestras fueron cargadas en un gel al 12 % de poliacrilamida, con el desnaturizante SDS y tras la electroforesis, se transfirieron las proteínas a una membrana sequi-blot de PVDF (BIO-RAD®). Para la inmunodetección de las proteínas marcadas con epítomos, las membranas se incubaron con suspensiones de anticuerpos de ratón anti-c-Myc (Millipore® 05-419) o anti-FLAG (Sigma® F3165) por hora y media, a temperatura ambiente. Después de la incubación, se lavaron las membranas con amortiguador salino de Tris [Tris 100 mM, 0.2 % Tween® 20 (USB Corporation®) y 0.1 % leche descremada (Svelty Nestlé®)]. Posteriormente, las membranas fueron incubadas por hora y media con la suspensión de anticuerpo secundario de cabra que reconoce a las inmunoglobulinas de ratón (Amersham®). Al terminar la incubación las membranas fueron lavadas para eliminar el exceso de anticuerpo. El anticuerpo secundario se encuentra acoplado a la peroxidasa de rábano picante, por lo que tras la adición del luminol y del peróxido de hidrógeno (reactivos de luminiscencia electroquímica Amersham®) la señal quimioluminiscente se registró en películas fotosensibles (X-OMAT Kodak®).

#### **4.12. Análisis bioinformáticos**

Para los análisis comparativos entre *C. glabrata* y *S. cerevisiae*, las secuencias génicas se extrajeron de la base de datos del proyecto *Genólevures* (<http://www.genolevures.org/index.html#>) y de la base de datos de *S. cerevisiae*, *SGD* (<http://www.yeastgenome.org/>). Los alineamientos fueron realizados con el

programa MacVector y las filogenias fueron con el programa gratuito MEGA (<http://www.megasoftware.net/>).

Los datos de los microarreglos de Biao-Ma *et al* (2009, NCBI; GEO, número de acceso: GSE6626) y Maki-Hirao *et al* (2003, <http://labs.fhcrc.org/bedalov/jbc.html>), se encuentran disponibles en línea.

Se usó la base de datos <http://blocks.fhcrc.org/> para la identificación de bloques conservados en secuencias proteicas. La base de datos <http://pfam.janelia.org/> se empleó para la identificación de motivos proteicos.

## 5. RESULTADOS

Los principales hallazgos del presente trabajo de investigación se publicaron en el siguiente artículo:

### **5.1. Local silencing controls the oxidative stress response and the multidrug resistance in *Candida glabrata***

**Orta-Zavalza E**, Guerrero-Serrano G, Gutierrez-Escobedo G, Canas-Villamar I, Juarez-Cepeda J, Castano I, De Las Penas A. 2013. *Mol Microbiol* 88: 1135-48

También participé en los siguientes artículos de investigación:

### **5.2. Role of glutathione in the oxidative stress response in the fungal pathogen *Candida glabrata***

Gutierrez-Escobedo G, **Orta-Zavalza E**, Castano I, De Las Penas A. 2013. *Curr Genet* 59: 91-106

### **5.3. Sir3 Polymorphisms in *Candida glabrata* clinical isolates**

Martinez-Jimenez V, Ramirez-Zavaleta CY, **Orta-Zavalza E**, de Leon GD, Gutierrez-Escobedo G, de Leon AP, Sifuentes-Osornio J, del Valle MB, De Las Penas A, Castano I. 2013. *Mycopathologia* 175: 207-19

Así como en la siguiente revisión y capítulo de libro:

### **5.4. The oxidative stress response of the opportunistic fungal pathogen *Candida glabrata***

Briones-Martin-Del-Campo M, **Orta-Zavalza E**, Juarez-Cepeda J, Gutierrez-Escobedo G, Canas-Villamar I, Castano I, De Las Penas A. 2013. *Rev Iberoam Micol*, **En prensa**

### **5.5. Adherence, virulence and cell wall proteins of *Candida glabrata***

De Las Penas, A. **Orta-Zavalza, E**. Martinez Jimenez, V. Castano, I., The Fungal Cell Wall. Ed. H. M. Mora-Montes. Guanajuato, Mexico, Nova Science Publishers. **1**: 134-158.

Y en la redacción del siguiente método en línea:

### **Catalase activity assay in *Candida glabrata*.**

**Orta-Zavalza E**, Briones-Martin-del-Campo M, Castano I, De Las Penas A. 2013. **Submitted** <http://www.bio-protocol.org/>

El protocolo se encuentra en fase de revisión.

# Local silencing controls the oxidative stress response and the multidrug resistance in *Candida glabrata*

Emmanuel Orta-Zavalza, Gehenna Guerrero-Serrano, Guadalupe Gutiérrez-Escobedo, Israel Cañas-Villamar, Jacqueline Juárez-Cepeda, Irene Castaño and Alejandro De Las Peñas\*

IPICYT, División de Biología Molecular, Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, Camino a la Presa San José 2055, Lomas 4ª sección, San Luis Potosí 78216, México.

## Summary

In *Candida glabrata*, the sirtuins Sir2 and Hst1 control the expression of a wide number of genes including adhesins required for host colonization and niacin transporters needed for growth. Given that these sirtuins can be inactivated during infection, we asked if their inhibition could modify the response of *C. glabrata* to other stressful conditions. Here, we found that deletion of *HST1* decreases susceptibility of *C. glabrata* to fluconazole and hydrogen peroxide. The transcription factor Pdr1 and the ABC transporter Cdr1 mediated the fluconazole resistance phenotype of the *hst1*Δ cells, whereas the transcriptional activator Msn4 and the catalase Cta1 are necessary to provide oxidative stress resistance. We show that the transcription factor Sum1 interacts with Hst1 and participate in the regulation of these genes. Interestingly, even though *C. glabrata* and *Saccharomyces cerevisiae* are closely related phylogenetically, deletion of *HST1* decreased susceptibility to fluconazole and hydrogen peroxide only in *C. glabrata* but not in *S. cerevisiae*, indicating a different transcriptional control by two similar sirtuins. Our findings suggest that Hst1 acts as a regulator of stress resistance associated-genes.

## Introduction

*Candida glabrata* is a commensal yeast that acts as an opportunistic pathogen in immunocompromised patients. In the last three decades, *C. glabrata* has emerged as the second most frequent causative agent of mucosal and bloodstream fungal infections (Richardson and Lass-Flörl,

2008; Pfaller and Diekema, 2010). Changes in the transcription program are a major strategy of *C. glabrata* to adapt to hostile environments. For example, induction of extracellular proteases, siderophore transporters, elements of the oxidative stress response (OSR), autophagy, shift in metabolism and chromatin remodelling are required for the survival of *C. glabrata* inside phagocytes (Kaur *et al.*, 2007; Cuellar-Cruz *et al.*, 2008; Roetzer *et al.*, 2010; 2011; Nevitt and Thiele, 2011; Seider *et al.*, 2011; Rai *et al.*, 2012; Fukuda *et al.*, 2013). In addition, *C. glabrata* induces membrane-spanning efflux pumps in the presence of fluconazole (Sanglard *et al.*, 1999; Vermitsky and Edlind, 2004; Sanguinetti *et al.*, 2005), which are associated with multidrug resistance (MDR) (Pfaller *et al.*, 2010).

The response to environmental stimuli is essential not only to ensure the survival of *C. glabrata* within the host but also to detect conditions that favour infection. *C. glabrata* induces the transcription of virulence-related adhesins when availability of nicotinamide adenine dinucleotide (NAD<sup>+</sup>) precursors in the environment is limited (Domergue *et al.*, 2005; Ma *et al.*, 2009). This response is due to the derepression of epithelial adhesin genes encoded in subtelomeric regions that are subject to chromatin silencing (De Las Penas *et al.*, 2003; Castano *et al.*, 2005; Domergue *et al.*, 2005). In *C. glabrata*, the Sir complex (Sir2, Sir3 and Sir4) is essential for subtelomeric silencing (De Las Penas *et al.*, 2003; Castano *et al.*, 2005; Rosas-Hernandez *et al.*, 2008). The enzymatic component of the Sir complex is Sir2, a histone deacetylase that uses NAD<sup>+</sup> as cofactor to keep the chromatin in a transcriptionally repressive state. Interestingly, since *C. glabrata* is unable to *de novo* synthesize NAD<sup>+</sup> (Ma *et al.*, 2007), Sir2 relies on the environmental supply of NAD<sup>+</sup> precursors (niacin) to maintain silencing. Thus, environmental limitation of niacin causes inactivation of Sir2 and derepression of normally silent adhesins that result in increased adherence to epithelial cells (Domergue *et al.*, 2005).

Sirtuins are a family of NAD<sup>+</sup>-dependent protein deacetylases present in all organisms, from bacteria to humans (Sauve *et al.*, 2006). *C. glabrata* contains five sirtuin genes that include *SIR2* and four homologues of *SIR2* called *HST1* – *HST4*. *HST1* is the closest paralogue of *SIR2* and both are involved in transcriptional repression, however these proteins display non-overlapping functions (Ma *et al.*, 2009). In *S. cerevisiae*, the paral-

Accepted 26 April, 2013. \*For correspondence. E-mail cano@ipicyt.edu.mx; Tel. (+52) 444 8342000; Fax (+52) 444 8342010. The authors declare no conflict of interest.

# Role of glutathione in the oxidative stress response in the fungal pathogen *Candida glabrata*

Guadalupe Gutiérrez-Escobedo · Emmanuel Orta-Zavalza · Irene Castaño · Alejandro De Las Peñas

Received: 9 January 2013 / Revised: 7 February 2013 / Accepted: 12 February 2013  
© Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2013

**Abstract** *Candida glabrata*, an opportunistic fungal pathogen, accounts for 18–26 % of all *Candida* systemic infections in the US. *C. glabrata* has a robust oxidative stress response (OSR) and in this work we characterized the role of glutathione (GSH), an essential tripeptide-like thiol-containing molecule required to keep the redox homeostasis and in the detoxification of metal ions. GSH is synthesized from glutamate, cysteine, and glycine by the sequential action of Gsh1 ( $\gamma$ -glutamyl-cysteine synthetase) and Gsh2 (glutathione synthetase) enzymes. We first screened for suppressor mutations that would allow growth in the absence of *GSH1* (*gsh1* $\Delta$  background) and found a single point mutation in *PRO2* (*pro2-4*), a gene that encodes a  $\gamma$ -glutamyl phosphate reductase and catalyzes the second step in the biosynthesis of proline. We demonstrate that GSH is important in the OSR since the *gsh1* $\Delta$  *pro2-4* and *gsh2* $\Delta$  mutant strains are more sensitive to oxidative stress generated by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and menadione. GSH is also required for Cadmium tolerance. In the absence of Gsh1 and Gsh2, cells show decreased viability in stationary phase. Furthermore, *C. glabrata* does not contain *Saccharomyces cerevisiae* high affinity GSH transporter ortholog, ScOpt1/Hgt1, however, our genetic and biochemical experiments show that the *gsh1* $\Delta$  *pro2-4* and *gsh2* $\Delta$  mutant strains are able to incorporate GSH from the medium. Finally, GSH and thioredoxin, which is a second redox

system in the cell, are not essential for the catalase-independent adaptation response to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

**Keywords** *Candida glabrata* · Glutathione · Cd tolerance · *PRO2* suppressor · Oxidative stress · Catalase · Thioredoxin

## Introduction

In the last three decades, *Candida glabrata*, an opportunistic fungal pathogen, has emerged as the second cause of mucosal and bloodstream fungal infections, accounting for 18–26 % of all *Candida* systemic infections in the US (Li et al. 2007; Presterl et al. 2007; Pfaller and Diekema 2010). Several *C. glabrata* virulence factors have been described. These include intrinsic resistance to fluconazole (Diekema et al. 2002), adherence to epithelial cells (Cormack et al. 1999; Castano et al. 2005) and high resistance to oxidative stress (Cuellar-Cruz et al. 2008; Roetzer et al. 2010, 2011). The robust oxidative stress response (OSR) in *C. glabrata* include the single catalase Cta1, the transcription factors Yap1, Skn7, Msn2, and Msn4 (Cuellar-Cruz et al. 2008; Roetzer et al. 2008; Saijo et al. 2010) and its capacity to survive within phagocytes (Kaur et al. 2007; Seider et al. 2011).

Under steady state conditions, the eukaryotic cytoplasm is highly reducing. As a consequence, the reactive oxygen species (ROS, superoxide anion, hydrogen peroxide, and hydroxyl radicals) and glutathionylated proteins are present at very low levels (Heeren et al. 2004). ROS are endogenous by-products of aerobic metabolism arising from mitochondria and the oxidative metabolism in peroxisome and the endoplasmic reticulum. At high levels, ROS can damage proteins, lipids and DNA, thereby affecting many

Communicated by B. Cormack.

G. Gutiérrez-Escobedo · E. Orta-Zavalza · I. Castaño · A. De Las Peñas (✉)  
IPICYT, Camino a la Presa San José 2055, División de Biología Molecular, Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, 78216 San Luis Potosí, San Luis Potosí, México  
e-mail: cano@ipicyt.edu.mx

## Sir3 Polymorphisms in *Candida glabrata* Clinical Isolates

Verónica Martínez-Jiménez · Candy Y. Ramírez-Zavaleta · Emmanuel Orta-Zavalza · Gabriel Díaz de León · Guadalupe Gutiérrez-Escobedo · Alfredo Ponce de León · José Sifuentes-Osornio · Miriam Bobadilla del Valle · Alejandro De Las Peñas · Irene Castaño

Received: 19 November 2012 / Accepted: 27 January 2013 / Published online: 8 February 2013  
© Springer Science+Business Media Dordrecht 2013

**Abstract** The opportunistic fungal pathogen *Candida glabrata* adheres tightly to epithelial cells in culture, mainly through the adhesin Epa1. *EPA1* is the founding member of a family of up to 23 putative adhesin-encoding genes present in the *C. glabrata* genome. The majority of the *EPA* genes are localized close to the telomeres, where they are repressed by subtelomeric silencing that depends on the Sir, Ku, Rif1, and Rap1 proteins. *EPA6* and *EPA7* also encode functional adhesins that are repressed in vitro. *EPA1* expression in vitro is tightly controlled both positively and negatively, and in addition, presents high cell-to-cell

heterogeneity, which depends on Sir-mediated silencing. In this work, we characterized the ability to adhere to HeLa epithelial cells and the expression of several *EPA* genes in a collection of 79 *C. glabrata* clinical isolates from several hospitals in Mexico. We found 11 isolates that showed increased adherence to mammalian cells compared with our reference strain under conditions where *EPA1* is not expressed. The majority of these isolates displayed over-expression of *EPA1* and *EPA6* or *EPA7*, but did not show increased biofilm formation. Sequencing of the *SIR3* gene of several hyper-adherent isolates revealed that all of them contain several polymorphisms with respect to the reference strain. Interestingly, two isolates have polymorphisms in positions flanked by clusters of amino acids required for silencing in the *Saccharomyces cerevisiae* Sir3 protein. Our data show that there is a large variability in adhesin expression and adherence to epithelial cells among different *C. glabrata* clinical isolates.

**Electronic supplementary material** The online version of this article (doi:10.1007/s11046-013-9627-2) contains supplementary material, which is available to authorized users.

V. Martínez-Jiménez · C. Y. Ramírez-Zavaleta · E. Orta-Zavalza · G. Díaz de León · G. Gutiérrez-Escobedo · A. De Las Peñas · I. Castaño (✉)

División de Biología Molecular, IPICYT. Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, Camino a la Presa San José, #2055, Col. Lomas 4<sup>a</sup>, San Luis Potosí, San Luis Potosí 78216, Mexico  
e-mail: icastano@ipicyt.edu.mx

A. Ponce de León · J. Sifuentes-Osornio · M. Bobadilla del Valle  
Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición “Salvador Zubirán” (INNSZ), Vasco de Quiroga 15, Belisario Domínguez Sección 16, México, DF, Mexico

**Keywords** *Candida glabrata* · Clinical isolate · *EPA* genes · Adherence · Sir3 polymorphism · Biofilm

### Introduction

*Candida glabrata* has emerged recently as the second most frequent species of *Candida* isolated from blood stream infections in the United States, second only to *Candida albicans* [1]. One of the characteristics thought to be important to establish successful

**AUTHOR QUERY FORM**

 <b>ELSEVIER</b>	<b>Journal:</b> RIAM	<b>Please e-mail or fax your responses and any corrections to:</b>
	<b>Article Number:</b> 278	<b>E-mail:</b> <a href="mailto:corrections.eses@elsevier.thomsondigital.com">corrections.eses@elsevier.thomsondigital.com</a>
		<b>Fax:</b> +34 932 091 136

Dear Author,

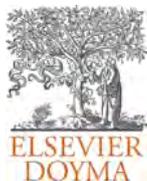
Please check your proof carefully and mark all corrections at the appropriate place in the proof (e.g., by using on-screen annotation in the PDF file) or compile them in a separate list. Note: if you opt to annotate the file with software other than Adobe Reader then please also highlight the appropriate place in the PDF file. To ensure fast publication of your paper please return your corrections within 48 hours.

For correction or revision of any artwork, please consult <http://www.elsevier.com/artworkinstructions>.

Any queries or remarks that have arisen during the processing of your manuscript are listed below and highlighted by flags in the proof. Click on the 'Q' link to go to the location in the proof.

<b>Location in article</b>	<b>Query / Remark: <a href="#">click on the Q link to go</a> Please insert your reply or correction at the corresponding line in the proof</b>
<a href="#">Q1</a> <a href="#">Q2</a>	<p>Please confirm that given names and surnames have been identified correctly. As per the journal style, acronyms are not allowed in keywords. Hence it has been changed accordingly both in English and in Spanish keywords. Please check, and correct if necessary.</p> <div style="border: 1px solid black; padding: 10px; margin-top: 20px;"> <p>Please check this box or indicate your approval if you have no corrections to make to the PDF file <input type="checkbox"/></p> </div>

Thank you for your assistance.



## Revista Iberoamericana de Micología

[www.elsevier.es/reviberoammicol](http://www.elsevier.es/reviberoammicol)



Mycologic Forum

# The oxidative stress response of the opportunistic fungal pathogen *Candida glabrata*

Q1 **Marcela Briones-Martin-Del-Campo**, **Emmanuel Orta-Zavalza**, **Jacqueline Juarez-Cepeda**,  
Q2 **Guadalupe Gutierrez-Escobedo**, **Israel Cañas-Villamar**, **Irene Castaño**, **Alejandro De Las Peñas**\*

División de Biología Molecular, IPICYT, Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, San Luis Potosí, San Luis Potosí, Mexico

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 26 August 2013

Accepted 27 September 2013

Available online xxx

#### Keywords:

*Candida glabrata*

Yap1

Cta1

Skn7

Glutathione

Q2 Reactive oxygen species

### ABSTRACT

Organisms have evolved different strategies to respond to oxidative stress generated as a by-product of aerobic respiration and thus maintain the redox homeostasis within the cell. In particular, fungal pathogens are exposed to reactive oxygen species (ROS) when they interact with the phagocytic cells of the host which are the first line of defense against fungal infections. These pathogens have co-opted the enzymatic (catalases, superoxide dismutases (SODs), and peroxidases) and non-enzymatic (glutathione) mechanisms used to maintain the redox homeostasis within the cell, to resist oxidative stress and ensure survival within the host. Several virulence factors have been related to the response to oxidative stress in pathogenic fungi. The opportunistic fungal pathogen *Candida glabrata* (*C. glabrata*) is the second most common cause of candidiasis after *Candida albicans* (*C. albicans*). *C. glabrata* has a well defined oxidative stress response (OSR), which include both enzymatic and non-enzymatic mechanisms. *C. glabrata* OSR is controlled by the well-conserved transcription factors Yap1, Skn7, Msn2 and Msn4. In this review, we describe the OSR of *C. glabrata*, what is known about its core elements, its regulation and how *C. glabrata* interacts with the host.

This manuscript is part of the series of works presented at the "V International Workshop: Molecular genetic approaches to the study of human pathogenic fungi" (Oaxaca, Mexico, 2012).

© 2013 Revista Iberoamericana de Micología. Published by Elsevier España, S.L. All rights reserved.

## Respuesta al estrés oxidativo en el hongo patógeno oportunista *Candida glabrata*

### RESUMEN

Los microorganismos han establecido diferentes estrategias para controlar el estrés oxidativo generado durante la respiración aeróbica y, por consiguiente, mantener la homeostasia redox en la célula. En particular, los hongos patógenos se exponen a especies reactivas del oxígeno cuando interactúan con las células fagocíticas del huésped que son la primera línea de defensa contra estos agentes infecciosos. Estos patógenos han reclutado sistemas enzimáticos (catalasas, superóxido dismutasas y peroxidasas) y no enzimáticos (glutación) que normalmente utilizan para mantener la homeostasia redox en la célula, para resistir frente al estrés oxidativo y garantizar la supervivencia dentro del huésped. Varios factores de virulencia se han relacionado con la respuesta al estrés oxidativo de los hongos patógenos. El hongo patógeno oportunista *Candida glabrata* (*C. glabrata*) es la segunda causa más frecuente de candidiasis después de *Candida albicans* (*C. albicans*). *C. glabrata* produce una respuesta bien definida al a estrés oxidativo, que incluye sistemas enzimáticos y no enzimáticos y está regulada por los factores de transcripción Yap1, Skn7, Msn2 y Msn4. En esta revisión, describimos los elementos de la respuesta de *C. glabrata* a dicho estrés, cómo se regula y cómo *C. glabrata* interacciona con el huésped.

Este artículo forma parte de una serie de estudios presentados en el «V International Workshop: Molecular genetic approaches to the study of human pathogenic fungi» (Oaxaca, México, 2012).

© 2013 Revista Iberoamericana de Micología. Publicado por Elsevier España, S.L. Todos los derechos reservados.

\* Corresponding author.

E-mail address: [cano@ipicyt.edu.mx](mailto:cano@ipicyt.edu.mx) (A. De Las Peñas).

## **ADHERENCE, VIRULENCE AND CELL WALL PROTEINS OF CANDIDA GLABRATA**

***Alejandro De Las Peñas, Emmanuel Orta-Zavalza,  
Verónica Martínez-Jiménez and Irene Castaño\****

IPICYT, Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica,  
División de Biología Molecular, San Luis Potosí, SLP, México CP

### **ABSTRACT**

The cell wall of human pathogenic fungi is a dynamic organelle that forms the interface between the fungus and its host environment. It gives shape, provides protection against the environmental conditions within the host, and mediates host-fungus interactions that allow the establishment of the infections.

The fungal cell wall is a bi-layered structure composed of an inner network of complex carbohydrates and an outer layer of glycosylated mannoproteins (cell wall glycoproteins or CWPs) covalently linked to the wall glucans. There are two major types of cell surface glycoproteins: glycosylphosphatidylinositol-dependent glycoproteins (GPI-CWPs) and the Pir proteins: proteins with internal repeats (Pir-CWPs).

The outer layer is essential for cell wall recognition processes such as adhesion to other fungal or mammalian cells. Proteins present at the cell surface display variations among different species and also within a single species depending on the environment or the growth phase, allowing fungi to adapt to changing environmental conditions. One group of highly diverse GPI-CWPs is the adhesins, which mediate interactions between the fungus and the mammalian host cells and to abiotic surfaces to form biofilms.

*Candida glabrata*, an opportunistic pathogenic yeast that adheres to epithelial and endothelial cells, is responsible for 18-26% of all *Candida* systemic infections in the US. The cell wall of *C. glabrata* contains 67 adhesin-like GPI-CWPs classified into 7 groups, and the majority of these proteins are encoded at subtelomeric regions of the genome. Adherence to epithelial cells is mediated primarily by members of the largest group of GPI-CWPs, the Epa family of adhesins, encoded by the paralogous *EPA* genes.

---

\* icastano@ipicyt.edu.mx, IPICYT, Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica. División de Biología Molecular, Camino a la Presa San José # 2055, Col. Lomas 4a, San Luis Potosí, SLP, México CP 78216

## 5.6. Catalase Activity Assay in *Candida glabrata*

Category by field: Biochemistry > Protein analysis > Protein/enzyme activity assay

Category by organism: Fungi > *Candida glabrata* > Protein analysis

Emmanuel Orta-Zavalza, Marcela Briones-Martin-del-Campo, Irene Castano and  
Alejandro De Las Penas

Corresponding author: Alejandro De Las Penas, [cano@ipicyt.edu.mx](mailto:cano@ipicyt.edu.mx)

IPICYT, Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, División  
de Biología Molecular, San Luis Potosí, SLP, México.

[Abstract] Commensal and pathogenic fungi are exposed to hydrogen peroxide ( $H_2O_2$ ) produced by macrophages of the host. Pathogenic fungi counteract the harmful effects of  $H_2O_2$  with the enzyme catalase (EC 1.11.1.6), which decomposes  $H_2O_2$  to water and oxygen. Contribution of antioxidant systems on fungal virulence is actively studied. Measurement of catalase activity can contribute to the elucidation of the factors that influence the regulation of this pivotal enzyme. Here we described a simple spectrophotometric method in which the activity of catalase is measured in total yeast extracts. Decomposition of  $H_2O_2$  by the yeast extract is followed by the decrease in absorbance at 240 nm. The difference in absorbance through time ( $\Delta A_{240}$ ) is the measure of catalase activity.

### **Materials and Reagents**

1. Yeast strains
2. Bradford reagent (Sigma-Aldrich, catalog number: B6916)
3. Bovine serum albumin - fraction V (Sigma-Aldrich, catalog number: 85040C)
4. Catalase from bovine liver (Sigma-Aldrich, catalog number: C9322)
5. Zirconia/silica beads 0.5 mm diameter (Bio Spec Products, catalog number: 11079105z)
6. Sterile water
7. Ice

8. Protease inhibitors (Roche Diagnostics, catalog number: 04693116001)
9. Hydrogen peroxide (Sigma-Aldrich, catalog number: 349887)
10. Catalase lyophilized powder (Sigma-Aldrich, catalog number: C9322)
11. YPD broth (see Recipes)
12. 50 mM Phosphate buffer, pH 7.0 (PB, see Recipes)
13. 30 mM Hydrogen peroxide (see Recipes)
14. Catalase solution (see Recipes)

## **Equipment**

1. Orbital incubator shaker
2. Microfuge tubes
3. 50 ml conical tubes
4. Corning 96 well clear flat bottom (Corning, catalog number: 3595)
5. Standard 10 mm light path quartz cuvette with PTFE cover.
6. UV/Vis Spectrophotometer (Shimadzu, model: UV-1700, catalog number: 206-55401-92)
7. Microplate spectrophotometer system (Bio-Rad Laboratories, Benchmark Plus Microplate reader, catalog number: 170-6931)
8. Centrifuge (Beckman Coulter, model: Allegra<sup>®</sup> 25R, catalog number: 369464)
9. Microfuge
10. Stopwatch
11. Parafilm

## **Procedure**

- A. Preparation of total soluble extracts
  1. Yeast strains are grown overnight in 5 ml YPD or selective media at 30°C.
  2. Dilute overnight cultures in 50 ml of fresh medium in order that after seven duplications, the cultures reach an OD<sub>600</sub> = 0.5 at 30°C.

3. Centrifuge the cells for 5 min at 2,600  $\times$  g. Discard supernatant.
4. Wash the cells with 25 ml of sterile water and discard supernatant.
5. Resuspend the cells in 0.5 ml PB with protease inhibitors and transfer to a microfuge tube. Keep the samples on ice.
6. Add 50  $\mu$ l of zirconia/silica beads and disrupt by vortexing for 1 min and placed on ice for another minute (repeat 20 times).
7. Centrifuge the lysate at 25,000  $\times$  g for 30 min at 4°C to remove cell debris and zirconia/silica beads
8. Transfer supernatant to a clean microfuge tube. Lysates are ready for quantification of total protein and measurement of catalase activity. Alternatively, samples can be stored at -20°C.

#### B. Bradford assay for protein quantitation

1. Fill the wells of a microplate with 250  $\mu$ l of Bradford reagent.
2. Prepare a standard curve of absorbance versus nanograms of protein using fresh BSA standards (100, 200, 400, 600, 800 ng/ $\mu$ l). Use PB as solvent.
3. Dilute the lysates 1:20 or 1:50 with sterile water.
4. Load 5  $\mu$ l of the standards and diluted lysates to the Bradford reagent. Incubate room temperature for 5 min.
5. Measure the absorbance at OD<sub>595</sub> in a microplate spectrophotometer.
6. Determine the amount of protein of the samples from the standard curve. Consider the dilution factor.

#### C. Catalase activity assay.

1. Set up the spectrophotometer by first turning on the instrument and then the UV light. Set up a kinetics program to record every 30 s at a wavelength of 240 nm for 2 min.
2. Calibrate the spectrophotometer using 3 ml of PB in a 3-ml quartz cuvette as a blank.
3. Dilute the lysate samples 1:50 with PB.

4. In a quartz cuvette, mix 1 ml PB with 1 ml of the diluted sample. To begin the assay, add 1 ml of the H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> solution (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> to a final concentration of 10 mM). The initial absorbance must be between 0.550 and 0.520.
5. Mix the content by inversion and Immediately place the cuvettes into the spectrophotometer. Follow the decrease in absorbance at OD<sub>240</sub> with a stopwatch for 2 min.
6. A catalase solution must be used as a control (see recipe). Pippete 2.9 ml of PB in the cuvette, add 1 ml 30 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and 100 µl of the catalase solution (~10 units). Record the inical and final absorbance in a one-minute period. Use 2 ml of PB and 1 ml of 30 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> as blank.
7. Calculate the catalase activity using the following formula:

$$U/mg = \frac{(A_0 - A_{60}) \times V_t}{\epsilon_{240} \times d \times V_s \times C_t \times 0.001}$$

Where

$(A_0 - A_{60})$  Is the difference between the initial and final absorbance.

$V_t$  Is the total volume of the reaction (3 ml).

$\epsilon_{240}$  Is the molar extinction coefficient for H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> at OD<sub>240</sub> (34.9 mol<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup>).

$d$  Is the optical length path of cuvette (1 cm).

$V_s$  Is the volume of the sample in ml.

$C_t$  Is the protein concentration of the sample in mg/ml

### **Notes**

1. For catalase, the dependence of the H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> decomposition on temperature is small, so measurements can be carried out between 0 and 37 °C, however 20 °C is recommended.
2. For the catalase assay, each test cuvette will need to be run one at a time, so do not prepare the next test cuvette until the run with the preceding cuvette is complete.
3. Low concentrations of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> are used to avoid bubbling.

- Mixing of the samples can be facilitated by the use of parafilm.

## **Recipes**

1. YPD broth (1 L)

Dissolve 10 g yeast extract and 20 g peptone in 950 ml of distilled water

Autoclave (121°C, 15 lb/in<sup>2</sup> for 15 min)

Add 50 ml 40% (w/v) dextrose (2% final; sterilized separately by autoclaving or filtering).

2. Phosphate Buffer 50 mM, pH 7.0 (1 L) PB

Dissolve 2.724 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> in 400 ml of distilled water

Dissolve 5.34 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> in 600 ml of distilled water

Mix solutions [proportion (1:1.5)]

pH to 7.0 with 1 M KOH

To obtain cell lysates, prepare 50 ml of PB and add two tablets of cOmpete protease inhibitors.

3. Hydrogen peroxide 30 mM (100 ml)

Dilute 0.26 ml of 35% hydrogen peroxide with PB to 100 ml.

4. Catalase solution

Dissolve 10 mg of catalase lyophilized powder in 1 ml of cold PB.

Immediately before use, dilute 5 µl of catalase solution to 1 ml cold PB to obtain a

solution with ~100 U/ml.

## **References**

1. \*Aebi, H. (1984). [Catalase in vitro](#). *Methods Enzymol* 105: 121-126.
2. Weydert, C. J. and Cullen, J. J. (2010). [Measurement of superoxide dismutase, catalase and glutathione peroxidase in cultured cells and tissue](#). *Nat Protoc* 5(1): 51-66.

## 6. RESULTADOS ADICIONALES

### 6.1. Análisis fenotípico de las mutantes deficientes en sirtuinas

6.1.1. La delección de *SIR2* o de *HST2* no modifica la susceptibilidad de *Candida glabrata* al fluconazol o al H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

Previamente hemos demostrado que *C. glabrata* se torna resistente al fluconazol en presencia de NAM 10mM, porque este metabolito inhibe a Hst1<sup>187</sup>. Sin embargo, NAM inhibe también al resto de las desacetilasas de histonas que son dependientes del NAD<sup>+</sup>, es decir a Sir2 y sus parálogos: Hst2, Hst3 y Hst4. Para determinar cuál sirtuina era la responsable de este fenotipo, realizamos ensayos de susceptibilidad al fluconazol en cepas mutantes que carecen de *SIR2*, *HST1* o *HST2*. Aunque en *S. cerevisiae* se ha reportado que la delección de *HST3* y *HST4* es viable ([SGD](#)), en *C. glabrata* no hemos podido recuperar mutar estos genes, por lo que no pudimos incluir a estas mutantes en los ensayos. A pesar de ello, encontramos que la delección de *HST1* incrementó la resistencia de *C. glabrata* al fluconazol (Ilustración 14). Además, encontramos que las mutantes *sir2*Δ y *hst2*Δ tampoco son resistentes al H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Ilustración 15). Lo que sugiere que los fenotipos observados se adjudican a la mutación de *HST1*, *HST3* o *HST4*. Sin embargo, el hecho de que la delección de los genes *RFM1* o *SUM1* causen los mismos fenotipos que *hst1*Δ, sugieren que la resistencia se debe a la ausencia de *HST1* y no de otra sirtuina.

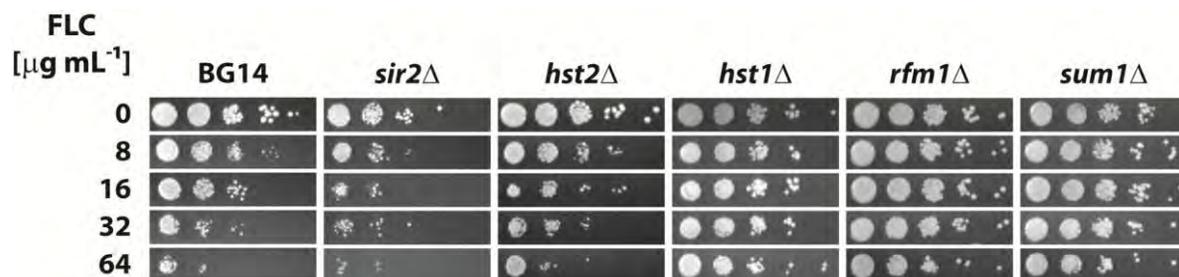
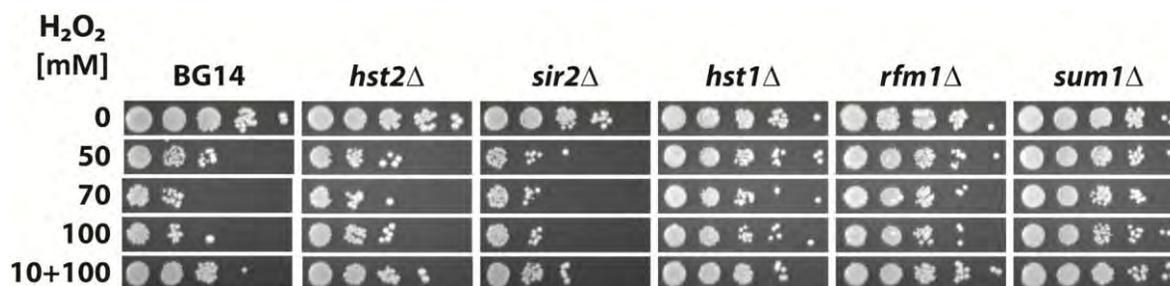


Ilustración 14 | Susceptibilidad de *C. glabrata* al fluconazol en ausencia de sirtuinas.

La cepa parental (BG14), la mutante *sir2*Δ (CGM71), la mutante *hst1*Δ (CGM84), la mutante *hst2*Δ (CGM86), la mutante *rfm1*Δ (CGM943) y la mutante *sum1*Δ (CGM673) se hicieron crecer hasta la fase de crecimiento estacionario en medio YPD líquido. De cada cultivo se tomó la cantidad de volumen necesaria para obtener 1 mL con DO = 0.5. A partir de esta suspensión se realizaron diluciones seriadas y se sembraron en cajas de YPD agar con diferentes concentraciones de fluconazol. [0, 8, 16, 32 y 64 μg/mL].

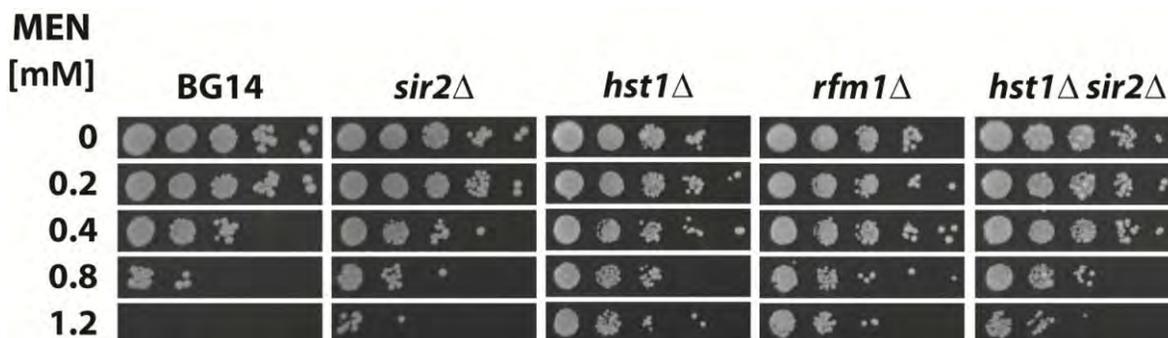


**Ilustración 15 / Susceptibilidad de *C. glabrata* al H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en ausencia de sirtuinas.**

Los cultivos de las cepa parental (BG14), la mutante *sir2*Δ (CGM71), la mutante *hst1*Δ (CGM84), la mutante *hst2*Δ (CGM86), la mutante *rfm1*Δ (CGM943) y la mutante *sum1*Δ (CGM673) fueron diluidas en medio fresco YPD de tal forma que después de siete duplicaciones a 30 °C alcanzaran una densidad óptica de 0.5. Los cultivos fueron divididos en 5 alícuotas y cada una fue expuesta a diferentes concentraciones de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> [0, 50, 70, 100 y 10+100 mM]. Después del tratamiento, el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> fue removido por centrifugación, los cultivos fueron suspendidos en 1 mL de agua destilada y fueron ajustados a una DO = 0.5, cuando fue necesario. De cada suspensión se realizaron diluciones seriadas y se sembraron en cajas de YPD agar.

### 6.1.2. La delección de *HST1* o *RFM1* disminuye la susceptibilidad de *C. glabrata* a la menadiona

La delección de *HST1*, *SUM1* o *RFM1* incrementa la resistencia de *C. glabrata* al fluconazol y al peróxido de hidrógeno. En cambio la eliminación de *SIR2* no altera la susceptibilidad de la levadura a ninguno a de estos agentes (Ilustración 14 y 15). Decidimos evaluar la sensibilidad de las cepas mutantes nulas en estos genes frente a menadiona, un generador de superóxido. En la Ilustración 16 se muestra que la delección de *HST1* o de *RFM1* también causa un incremento en la resistencia de *C. glabrata* ante este pro-oxidante. También encontramos que la delección de *SIR2* parece tener un efecto; aunque más discreto que las mutantes *hst1*Δ o *rfm1*Δ. Sin embargo, la delección concomitante de *SIR2* y *HST1* no incrementa esta resistencia, lo que sugiere que ambas sirtuinas podrían actuar a través de la misma vía, o bien, que el efecto de mutar *SIR2* es tan sutil que la adición fenotípica no puede ser detectada por este ensayo. Será necesario realizar más experimentos para determinar si este fenotipo requiere de alguna de las SOD.



**Ilustración 16 | Susceptibilidad de *C. glabrata* a la menadiona en ausencia de sirtuinas.**

Los cultivos de las cepa parental (BG14), la mutante *sir2*Δ (CGM71), la mutante *hst1*Δ (CGM84), la mutante *rfm1*Δ (CGM943) y la doble mutante *hst1*Δ *sir2*Δ (CGM712) fueron diluidas en medio fresco YPD de tal forma que después de siete duplicaciones a 30 °C alcanzaran una densidad óptica de 0.5. Cada cultivo fue dividido en alícuotas y cada una fue expuesta a diferentes concentraciones de menadiona [0, 0.2, 0.4, 0.8 y 1.2 mM]. Después del tratamiento la menadiona fue removida por centrifugación, los cultivos fueron suspendidos en 1 mL de agua destilada y fueron ajustados a una DO = 0.5, cuando fue necesario. De cada suspensión se realizaron diluciones seriadas y se sembraron en cajas de YPD agar.

### 6.1.3. La complementación de *HST1* y *SUM1* revierte la resistencia al fluconazol

Para comprobar que el fenotipo de resistencia al fluconazol se debe a la mutación de *HST1* y *SUM1*, decidimos realizar la reconstitución de las mutantes *hst1*Δ y *sum1*Δ con los alelos nativos en sus *loci* correspondientes. Encontramos que las mutantes reconstituidas revierten su fenotipo y se comportan como la cepa parental (Ilustración 17).



**Ilustración 17 | Susceptibilidad al fluconazol de las mutantes *hst1*Δ y *sum1*Δ reconstituidas.**

Se hizo crecer la cepa parental (BG14), la mutante *hst1*Δ (CGM84), la mutante *hst2*Δ (CGM86), y las mutantes reconstituidas *HST1* (CGM1605) y *SUM1* (CGM1611) en medio YPD líquido hasta la fase de crecimiento estacionario. De cada cultivo se tomó la cantidad de volumen necesaria para obtener 1 mL con DO = 0.5. A partir de esta suspensión se realizaron diluciones seriadas y se sembraron en cajas de YPD agar con diferentes concentraciones de fluconazol. [0, 8, 16, 32 y 64 μg/mL].

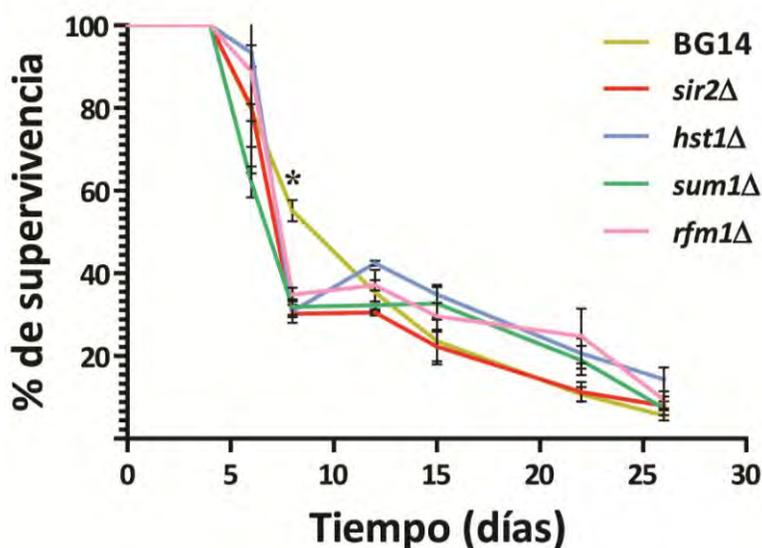
#### 6.1.4. La ausencia de *SIR2* o *HST1* no afecta la viabilidad cronológica de *C. glabrata*

El tiempo que una célula postmitótica permanece viable ha sido determinado y se ha utilizado para estudiar el envejecimiento cronológico<sup>188</sup>. En *S. cerevisiae* la participación de las sirtuinas en el envejecimiento es controvertida<sup>189</sup>. Por una parte, Sir2 es importante para preservar el potencial reproductivo de las células mitóticas, pero en la célula posmitótica, la pérdida de la sirtuina parece favorecer la transición hacia un estado protector que la defiende del envejecimiento durante la falta de nutrientes. Esta dualidad funcional de Sir2, aparentemente contradictoria con respecto al envejecimiento, es actualmente objeto de debate. Varios trabajos recientes indican que las sirtuinas no influyen en la viabilidad cronológica, incluso ni siquiera en condiciones de restricción calórica<sup>185,190</sup>. En *C. glabrata* las sirtuinas son susceptibles a ser inactivadas *in vivo* por limitación de niacina pero se desconoce si la ausencia de sirtuinas afecta la viabilidad de esta levadura. Para evaluar la participación de las sirtuinas en la viabilidad cronológica, analizamos el tiempo que *C. glabrata* permanece viable cuando carece de *SIR2*, *HST1*, *SUM1* o *RFM1*. Para ello monitorizamos la viabilidad de cultivos de la fase de crecimiento estacionario mantenidos en medio mínimo a los 4, 6, 8, 12, 15, 22 y 26 días (Ver materiales y métodos). El crecimiento de las cepas al cuarto día fue considerado como el 100 % de viabilidad. En la Ilustración 18 se muestra como la viabilidad de la cepa parental disminuyó a lo largo del experimento hasta llegar a un sólo  $5.61 \pm 2.19$  % en el vigésimo sexto día. Las cepas mutantes exhibieron un comportamiento similar a lo largo del experimento, pero cabe destacar que la viabilidad de todas ellas fue menor a la de la cepa parental en el octavo día (Ilustración 18). A este día, la cepa parental conservó una viabilidad del  $55.2 \pm 4.4$  %, mientras que este valor fue de alrededor del 30 % para las mutantes (Tabla 5). Aunque la diferencia fue estadísticamente significativa ( $P < 0.05$ ), no encontramos diferencias en el resto de los días evaluados (12, 15, 22 y 26), por lo que no podemos afirmar que la ausencia de *SIR2* o el complejo HRS afecte la viabilidad de *C. glabrata*. Será necesario efectuar un mayor número de análisis para estas cepas mutantes y en un intervalo de tiempo más estrecho, para esclarecer la

participación de las sirtuinas en la viabilidad cronológica de *C. glabrata*. Otra alternativa es efectuar experimentos de competencia entre las cepas mutantes.

**Tabla 5 | Porcentaje de viabilidad de *C. glabrata* en ausencia de sirtuinas**

Día	BG14	<i>sir2</i> Δ	<i>hst1</i> Δ	<i>sum1</i> Δ	<i>rfm1</i> Δ
4	100	100	100	100	100
6	79.7 ± 26.8	80.3 ± 16.8	93.4 ± 21.6	62.1 ± 6.5	88.9 ± 20.7
8	55.2 ± 4.4	30.2 ± 3.8	30.9 ± 2.6	31.8 ± 3.3	34.9 ± 2.9
12	35.3 ± 9.6	30.6 ± 0.3	42.4 ± 1.0	32.3 ± 1.6	37.1 ± 2.2
15	23.6 ± 9.7	22.3 ± 6.2	34.9 ± 4.0	32.7 ± 6.9	29.6 ± 5.6
22	10.7 ± 2.9	11.3 ± 4.1	20.6 ± 6.4	18.9 ± 6.1	24.8 ± 11.5
26	5.6 ± 2.2	7.9 ± 3.9	14.4 ± 5.0	7.4 ± 2.9	9.4 ± 3.6



**Ilustración 18 | Viabilidad cronológica de *C. glabrata* en ausencia de sirtuinas.**

El gráfico muestra el porcentaje de células viables en función de los días de cultivo en medio mínimo para cada cepa. Se monitorizó la viabilidad de las cepas: parental (BG14), la mutante *sir2*Δ (CGM71), la mutante *hst1*Δ (CGM84), la mutante *sum1*Δ (CGM673) y la mutante *rfm1*Δ (CGM943). Las muestras de cada cepa fueron extraídas a los 4, 6, 8, 12, 15, 22 y 26 días. El porcentaje de supervivencia se calculó en función del desplazamiento que presenta la curva de crecimiento de cada cepa a medida que el cultivo envejece. Se tomó el cuarto día como punto de partida.

## 6.2. Susceptibilidad al fluconazol en función del medio de cultivo

6.2.1. La delección de *HST1* disminuye la susceptibilidad al fluconazol en medio rico YPD pero no en el medio definido RPMI-1640

Actualmente existen dos estándares independientes de microdilución para la determinación de la susceptibilidad antifúngica al fluconazol en especies de *Candida*: El método M27-A2 del Instituto de Estándares Clínicos y de Laboratorio (CLSI)<sup>184</sup> y el método del Comité Europeo de la Evaluación de la Susceptibilidad Antimicrobiana (EUCAST)<sup>191</sup>. Estos métodos recomiendan el uso del medio de cultivo definido RPMI-1640, con MOPS 0.164 M a pH  $7.0 \pm 0.1$ , complementado con glutamina 0.3 g/L y sin bicarbonato sódico. A pesar de las diferencias entre ambos métodos, se ha demostrado que son equivalentes para la determinación de las concentraciones mínimas inhibitorias del fluconazol en varias especies de *Candida*<sup>192</sup>. En nuestro trabajo modificamos el método M27-A2 para utilizar YPD en vez de RPMI-1640 y obtuvimos valores de concentraciones mínimas inhibitorias (CMI) similares a las reportadas previamente para la cepa parental BG14 así como para las mutantes susceptibles *pdr1* $\Delta$  y *cdr1* $\Delta$ <sup>115</sup>. Sin embargo, cuando utilizamos el método M27-A2 encontramos que la mutante *hst1* $\Delta$  mostró un fenotipo similar al de la cepa parental (Tabla 6). Es decir, la cepa *hst1* $\Delta$  incrementó su susceptibilidad y se comportó como un aislado susceptible dependiente de la dosis (S-DD).

**Tabla 6 | Susceptibilidad al fluconazol de las mutantes de *C. glabrata***

Cepa	YPD		RPMI-640	
	CMI50 ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) <sup>a</sup>	Categoría	CMI50 ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) <sup>b</sup>	Categoría
BG14	14.93 $\pm$ 2.951	S-DD	16-32	S-DD
<i>hst1</i> $\Delta$	93.68 $\pm$ 21.8	R	16	S-DD
<i>sum1</i> $\Delta$	100.2 $\pm$ 21.07	R	16	S-DD
<i>rfm1</i> $\Delta$	101.3 $\pm$ 23.88	R	16	S-DD
<i>pdr1</i> $\Delta$	2.427 $\pm$ 0.6116	S	1-2	S
<i>cdr1</i> $\Delta$	2.803 $\pm$ 0.6957	S	8	S
<i>hst1</i> $\Delta$ <i>pdr1</i> $\Delta$	3.933 $\pm$ 0.8991	S	2	S
<i>hst1</i> $\Delta$ <i>cdr1</i> $\Delta$	3.94 $\pm$ 0.6811	S	8	S
<i>hst1</i> C344A C347A	82.19 $\pm$ 11.26	R	16	S-DD

<sup>a</sup>Las CMI fueron determinadas en medio YPD por un método cuantitativo de susceptibilidad.

<sup>b</sup>Las CMI fueron determinadas por el método M27-A2 en medio RPMI-1640. Ambos métodos se encuentran descritos en el apartado 4.7 de materiales y métodos. S = Susceptible ( $\leq 8 \mu\text{g/mL}$ ), S-DD = susceptible dependiente de la dosis (16 - 32  $\mu\text{g/mL}$ ) y R = resistente ( $\geq 64 \mu\text{g/mL}$ ).

Esta disminución de resistencia se presentó también en las mutantes que conforman el complejo HRS (*sum1* $\Delta$ , *rfm1* $\Delta$ ) y en la mutante *hst1* C344A C347A de pérdida de función (Tabla 6). En cambio, las cepas BG14, *pdr1* $\Delta$  y *cdr1* $\Delta$  exhibieron un comportamiento similar en ambos medios (S-DD y susceptibles, respectivamente). Además, encontramos que el fenotipo de resistencia de *hst1* $\Delta$  también se elimina cuando la cepa es expuesta al fluconazol en medio CAA (ver *materiales y métodos*, sección 4.4.). La Ilustración 19 demuestra que las cepas *hst1* $\Delta$  y *sum1* $\Delta$  se comportan igual que la cepa parental en este medio, lo que sugiere que el medio YPD posee un componente que permite la inducción de resistencia. Es decir, al parecer no basta con que haya una desrepresión de los genes controlados por el complejo HRS sino que un componente del medio es indispensable para la disminución de la susceptibilidad al fluconazol.

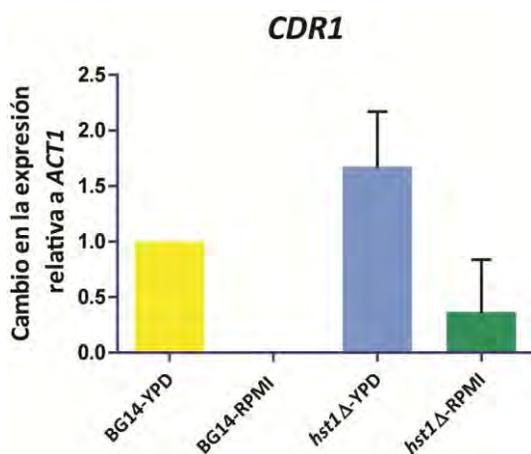


**Ilustración 19 / Susceptibilidad al fluconazol de las cepas BG14, *hst1*Δ y *sum1*Δ en medio CAA.**

La cepa parental (BG14), la mutante *hst1*Δ (CGM84) y la mutante *sum1*Δ (CGM673) hicieron crecer en medio CAA líquido hasta la fase de crecimiento estacionario. De cada cultivo se tomó la cantidad de volumen necesaria para obtener 1 mL con DO = 0.5. A partir de esta suspensión se realizaron diluciones seriadas y se sembraron en cajas de CAA agar con diferentes concentraciones de fluconazol. [0, 8, 16, 32 y 64 μg/mL].

### 6.2.2. El medio de cultivo influye en la expresión basal de *CDR1*

Previamente demostramos que en ausencia de *HST1* se induce la transcripción de *CDR1* en medio YPD y esto incrementa la resistencia de *C. glabrata* al fluconazol<sup>115</sup>. Sin embargo, esta resistencia se anula cuando la cepa mutante es crecida en medio RPMI-1640 (Tabla 6), lo que sugiere que estas condiciones afectan la transcripción de *CDR1*. Para evaluar esta posibilidad, decidimos realizar un ensayo de RT-PCR punto final y comparar los niveles del transcrito de *CDR1* en la mutante *hst1*Δ crecida en medio YPD y RPMI-1640. Como control utilizamos a la cepa parental crecida en medio YPD (Ilustración 20). Encontramos que en medio RPMI-1640 existe una expresión significativamente menor de *CDR1* que en medio YPD, pero no sólo en la mutante *hst1*Δ sino también en BG14 ( $P < 0.001$ , ANOVA de una vía, prueba de Tukey). Sin embargo, a pesar de que este resultado podría ayudar a explicar porqué la mutante *hst1*Δ tiene una mayor susceptibilidad al fluconazol cuando es cultivada en RPMI-1640 que en YPD, no puede explicar el hecho de ambas cepas exhiban la misma susceptibilidad al antifúngico en RPMI-1640. En este medio, incluso los niveles de expresión basal de *CDR1* son mayores en la cepa *hst1*Δ que en la cepa parental. Sin embargo, es posible que, a pesar de ello, esta expresión sea insuficiente para rebasar un nivel umbral y conferir el fenotipo resistente en la mutante *hst1*Δ. Será necesario evaluar por qPCR la expresión de *CDR1* en ambos medios y cepas así como en presencia de fluconazol.

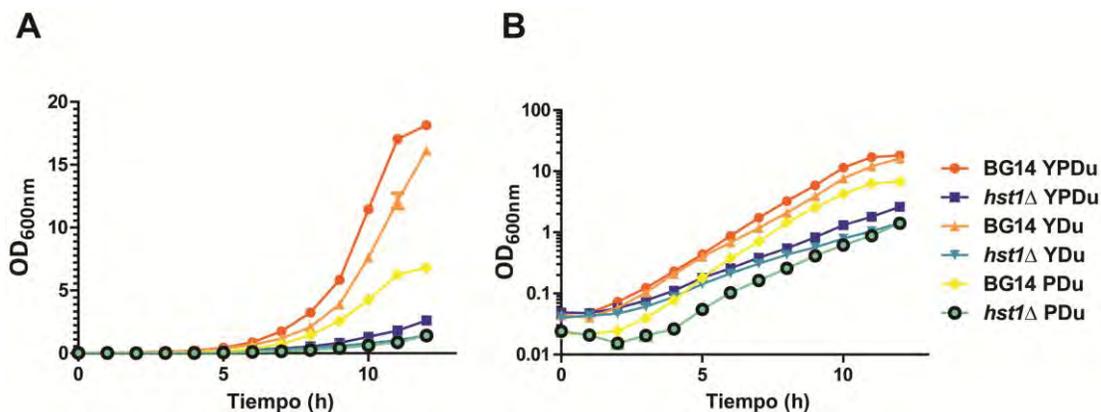


**Ilustración 20 | Influjo del medio en los niveles de transcrito de *CDR1* en BG14 y *hst1Δ*.**

Se determinó el nivel de expresión del gen *CDR1* por RT-PCR punto final, a partir de cultivos de fase exponencial crecidos en YPD y en RPMI-1640. Los niveles del transcrito de *CDR1* fueron normalizados con respecto a *ACT1* y expresados en relación a los niveles que exhibe la cepa silvestre en medio YPD. Se muestran los resultados de tres experimentos con triplicados.

### 6.2.3. La exclusión de la peptona o el extracto de levadura del YPD no modifica la resistencia al fluconazol de la mutante *hst1Δ*

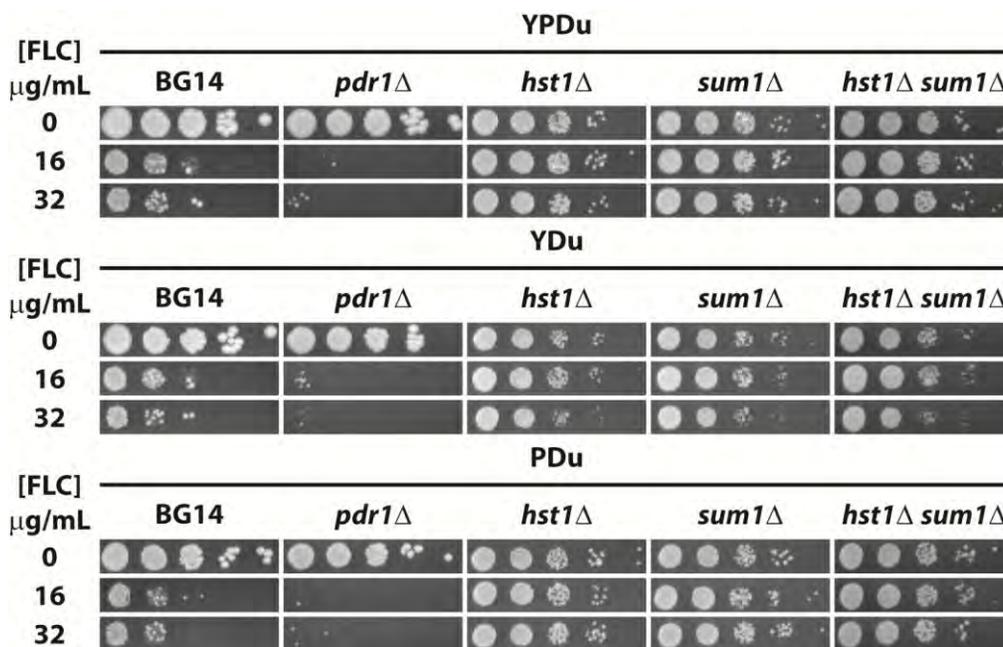
La cepa *hst1Δ* es resistente al fluconazol en medio YPD pero pierde este fenotipo al crecer en RPMI-1640. El medio sintético RPMI tiene una composición conocida, en cambio el YPD es un medio complejo que contiene un hidrolizado soluble de levadura, peptona cárnica y dextrosa. Es posible que la resistencia observada para la cepa *hst1Δ* en YPD se deba a dos posibilidades: 1) que el YPD contenga una sustancia que contribuye a la inducción de la resistencia farmacológica y que está ausente en RPMI; o bien 2) que el medio RPMI contiene un inhibidor de la resistencia que no está en el YPD. Debido a la composición rica y compleja del YPD, es probable que este medio contenga casi todos los metabolitos del RPMI, por lo que decidimos evaluar la primer hipótesis. Para averiguar si el presunto inductor está contenido en alguno de los componentes del YPD, analizamos la susceptibilidad de *C. glabrata* al fluconazol en medios YPD que carecen de extracto de levadura (PDu) o de peptona (YDu). Previamente hemos demostrado que la delección de *HST1* disminuye la velocidad de crecimiento de *C. glabrata*<sup>193</sup> por lo que primero, evaluamos el crecimiento de la cepa parental y de la mutante *hst1Δ* en los diferentes medios (YPDu, YDu y PDu). Encontramos que la remoción de peptona o extracto de levadura retarda el crecimiento de todas las cepas (Ilustración 21).



**Ilustración 21/ Curva de crecimiento de las cepas BG14 y mutante *hst1Δ* en YPDu, YDu y PDu.**

**A.** Se graficó la densidad óptica de los cultivos a 600 nm de longitud de onda en función del tiempo. **A.** Curva de crecimiento en escala lineal. **B.** Curva de crecimiento den escala logarítmica base 10. Se muestra el promedio de las lecturas de tres cultivos diferentes.

Sin embargo, a pesar de estas diferencias en el crecimiento, la mutante en *hst1Δ* exhibió el mismo fenotipo resistente en cualquiera de los tres medios (Ilustración 22). La mutante *sum1Δ* y la doble mutante *sum1Δ hst1Δ* también conservaron la resistencia, al tiempo que los fenotipos de la mutante sensible *pdr1Δ* o la cepa parental permanecieron inalterados. Entonces, la remoción de la peptona o del extracto de levadura del YPD no afecta la susceptibilidad al fluconazol, lo que sugiere que la resistencia de la mutante *hst1Δ* depende de algún componente en común entre el extracto de levadura y la peptona. Consideramos que es poco probable que sea la dextrosa, sin embargo no hemos realizado ensayos de susceptibilidad al fluconazol en el que la fuente de carbono sea sustituida por otra, por ejemplo, una no fermentable como glicerol o etanol.



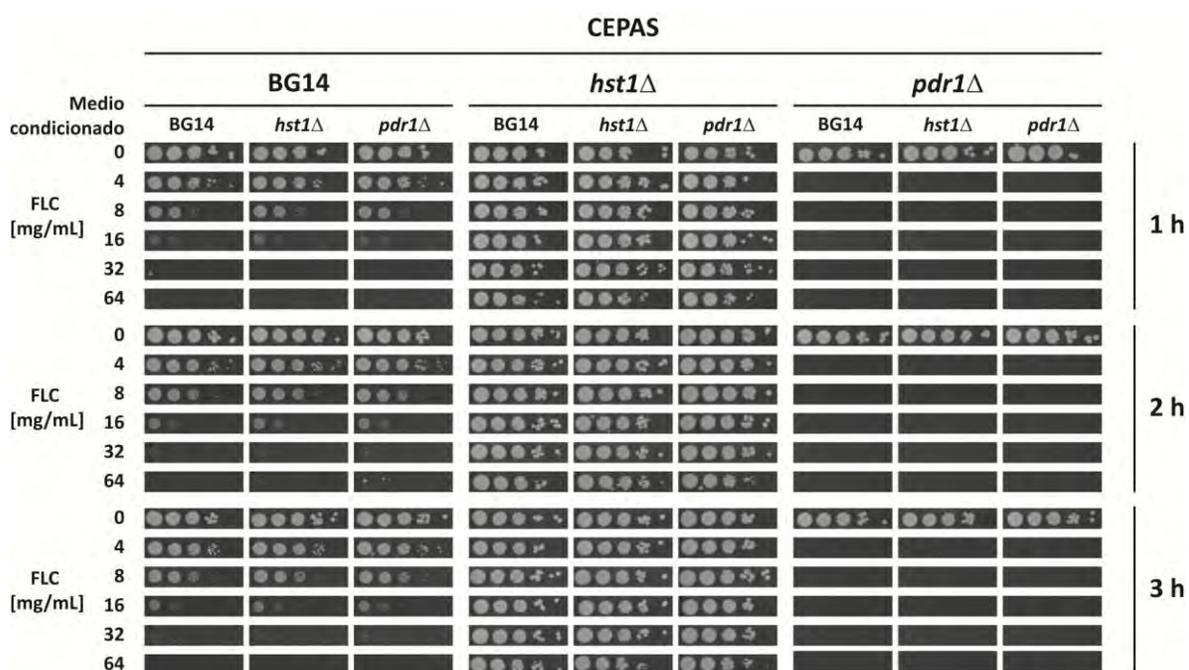
**Ilustración 22/ Susceptibilidad de *C. glabrata* al fluconazol en medio rico completo (YPDu), sin peptona (YDu) o sin extracto de levadura (PDu).**

Se hizo crecer la La cepa parental (BG14), la mutante *hst1Δ* (CGM84), la mutante *sum1Δ* (CGM673), la mutante *pdr1Δ* (CGM1094) y la mutante doble *hst1Δ sum1Δ* (CGM1607) hasta la fase de crecimiento estacionario en los distintos medios: YPDu, YDu o PDu líquido. De cada cultivo se tomó la cantidad de volumen necesaria para obtener 1 mL con DO = 0.5. A partir de esta suspensión se realizaron diluciones seriadas y se sembraron en cajas de YPDu, YDu o PDu agar con diferentes concentraciones de fluconazol. [0, 16 y 32  $\mu\text{g/mL}$ ].

6.2.4. La adición de medio condicionado de la mutante *hst1Δ* no modifica la susceptibilidad al fluconazol de la cepa parental y viceversa

Los transportadores de la familia ABC son diversos y utilizan diversos sustratos<sup>194</sup>. En *S. cerevisiae* estos transportadores participan en la expulsión de toxinas y metabolitos así como en el transporte de iones y esteroides<sup>194</sup>. En la mutante *hst1Δ* ocurre la desrepresión de *PDR1* y en consecuencia se inducen transportadores de la familia ABC que podrían expulsar pequeñas moléculas además del fluconazol. Es por ello que decidimos evaluar la idea de que el medio de la cepa *hst1Δ* contiene moléculas que inducen la resistencia al fluconazol, similar a la detección de *quórum*. Para ello crecimos a las cepas (parental, *hst1Δ* y *pdr1Δ*) en medio líquido YPD hasta la fase estacionaria de crecimiento estacionario. Posteriormente, separamos las células por centrifugación y filtramos los medios usados. Las células de cada cepa fueron incubadas con cada uno de los medios

condicionados durante 1, 2 y 3 h. Al terminar la incubación, las células fueron lavadas y se evaluó la su susceptibilidad al fluconazol en YPD agar. Sin embargo, la Ilustración 23 muestra que la adición del medio condicionado no modifica la susceptibilidad al fluconazol en ninguno de los casos durante este intervalo de tiempo. Es decir que la cepa parental sigue comportándose como un aislado S-DD, mientras que la mutante *hst1Δ* es resistente y la *pdr1Δ* es hipersensible. Estos datos sugieren que el medio condicionado de la mutante *hst1Δ* no puede modificar el perfil de transcripción del resto de las cepas ni conferirles resistencia. Al mismo tiempo, la resistencia de las células *hst1Δ* no puede ser revertida por la exposición a un medio usado por cepas de mayor susceptibilidad al fluconazol.



**Ilustración 23 | Influjo del medio condicionado por distintas cepas de *C. glabrata* en la susceptibilidad al fluconazol.**

La cepa parental (BG14), la mutante *hst1Δ* (CGM84) y la mutante *pdr1Δ* (CGM1094) se hicieron crecer en medio YPD líquido hasta la fase de crecimiento estacionario. Para obtener el medio usado, los cultivos fueron centrifugados y filtrados (0.22 μm). Posteriormente las células de cada cepa fueron suspendidas en 5 mL del medio usado e incubadas por diferentes tiempos. Al finalizar la incubación, se tomó la cantidad de volumen necesaria para obtener 1 mL con DO = 0.5. A partir de esta suspensión se realizaron diluciones seriadas y se sembraron en cajas de con diferentes concentraciones de fluconazol [0, 4, 8, 16, 32 y 64 μg/mL].

6.2.5. La adición de YPD al medio RPMI-1640 incrementa la resistencia de *C. glabrata* al fluconazol

Los resultados preliminares indican que la adición de una pequeña fracción de YPD al medio RPMI-1640, propicia el incremento en la resistencia al fluconazol. En este experimento combinamos los medios YPD y RPMI en diferentes proporciones: YPD puro (100Y), 80 % YPD con 20 % RPMI-1640 (80Y20R), 60 % YPD con 40 % RPMI-1640 (60Y40R), 50 % YPD con 50 % RPMI-1640 (50Y50R), 40 % YPD con 60 % RPMI-1640 (40Y60R), 20 % YPD con 80 % RPMI-1640 (20Y80R) y RPMI-1640 puro (100R). Posteriormente a cada una de estas mezclas le añadimos la cantidad de fluconazol necesaria para obtener medios con 0, 0.5, 1, 2, 4, 8, 16, 32, 64, 128, 264 µg/mL de fluconazol. La preparación de las suspensiones para los inóculos se realizó en estos mismos medios y se utilizó el método de microdilución M27-A2 para la determinación de la susceptibilidad. Encontramos que la mutante *hst1Δ* se comporta como un aislado resistente en la mayoría de las mezclas, incluso en la que sólo contiene un 20 % de YPD. Sin embargo, aún cuando validamos el experimento con el uso de las cepas ATCC de *C. parapsilosis* (aislado sensible) y *C. krusei* (aislado S-DD), obtuvimos una gran variabilidad en la cepa BG14 de *C. glabrata* (Tabla 7). Tendremos que repetir este experimento para asegurarnos de que la mínima presencia de YPD en el medio confiere resistencia al fluconazol en *C. glabrata*.

**Tabla 7 | Susceptibilidad de las mutantes de *C. glabrata* en las diferentes mezclas de medios YPD-RPMI<sup>a</sup>**

Mezcla	BG14		<i>hst1Δ</i>		<i>C. krusei</i>		<i>C. parapsilosis</i>	
100Y	64 [R]	128 [R]	64 [R]	128 [R]	16 [S-DD]	16 [S-DD]	1 [S]	2 [S]
80Y20R	16 [S-DD]	32 [S-DD]	64 [R]	128 [R]	16 [S-DD]	16 [S-DD]	0.5 [S]	0.5 [S]
60Y40R	32 [S-DD]	32 [S-DD]	128 [R]	64 [R]	16 [S-DD]	16 [S-DD]	0.5 [S]	0.5 [S]
50Y50R	64 [R]	128 [R]	128 [R]	128 [R]	16 [S-DD]	16 [S-DD]	0.5 [S]	0.5 [S]
40Y60R	64 [R]	64 [R]	64 [R]	64 [R]	16 [S-DD]	16 [S-DD]	0.5 [S]	0.5 [S]
20Y80R	64 [R]	128 [R]	64 [R]	64 [R]	32 [S-DD]	32 [S-DD]	0.5 [S]	0.5 [S]
100R	16 [S-DD]	8 [S]	8 [S]	16 [S-DD]	16 [S-DD]	16 [S-DD]	1 [S]	1 [S]

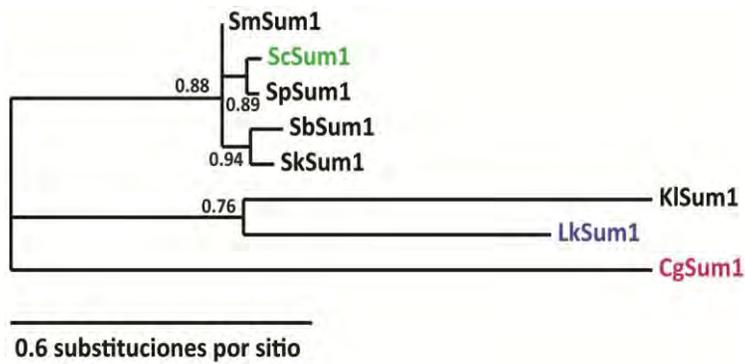
<sup>a</sup>Las CMI fueron determinadas por el método M27-A2 en medio YPD, RPMI-1640 y combinaciones de ambos medios. S = Susceptible ( $\leq 8$  µg/mL), S-DD = susceptible dependiente de la dosis (16 - 32 µg/mL) y R = resistente ( $\geq 64$  µg/mL).

### 6.3. La divergencia de Sum1

#### 6.3.1. Sum1 de *L. kluyveri* no complementa a la mutante *sum1* $\Delta$ de *C. glabrata*

*C. glabrata* y *S. cerevisiae* comparten el 62% de identidad nucleotídica en la secuencia de *HST1*. A nivel de proteínas, CgHst1 es 74 % similar a ScHst1. Sin embargo, a pesar de esta conservación, las sirtuinas regulan negativamente un grupo muy distinto de genes. En *S. cerevisiae*, Hst1 forma un complejo con Rfm1 y Sum1 (HRS) para el silenciamiento puntual de genes que contienen el elemento de la esporulación intermedia (MSRE). En este trabajo hemos demostrado que Sum1 también se asocia con Rfm1 y Hst1 en *C. glabrata*, pero en esta levadura el complejo regula genes de resistencia a estrés oxidante y fluconazol, a diferencia de *S. cerevisiae*<sup>115</sup>. Hemos propuesto que el diferente control de la transcripción en las mutantes de *S. cerevisiae* y de *C. glabrata* que carecen de *HST1*, es consecuencia de un represor Sum1 distinto que cambió en la secuencia de reconocimiento del ADN.

Por sintenia se ha determinado que el gen ortólogo a *SUM1* en *C. glabrata* es CAGL0J10956. Sin embargo, el análisis de las secuencias de aminoácidos del factor Sum1 de varias especies de hemiascomicetos revelan que esta proteína es solamente un 30.4 % similar a su ortólogo de *S. cerevisiae* y que el mayor grado de similitud (35.2 %) se encuentra con el ortólogo de *L. kluyveri*. El árbol filogenético de la Ilustración 24, muestra que Sum1 de *C. glabrata* es muy distinto al de *S. cerevisiae*, aún cuando estas levaduras son filogenéticamente cercanas (Ilustración 3).



**Ilustración 24 | Árbol filogenético de secuencias Sum1 de hemiascomicetos.**

El diagrama fue trazado a partir del alineamiento de las secuencias proteicas por el método MUSCLE. Se removieron las regiones ambiguas con el programa Gblocks. Finalmente el árbol fue construido por el método de máxima similitud. El porcentaje de árboles replicados en los que las especies se agruparon juntas en la prueba de “bootstrap” se muestran arriba de cada rama. Árbol obtenido a partir de [phylogeny.fr](http://phylogeny.fr).

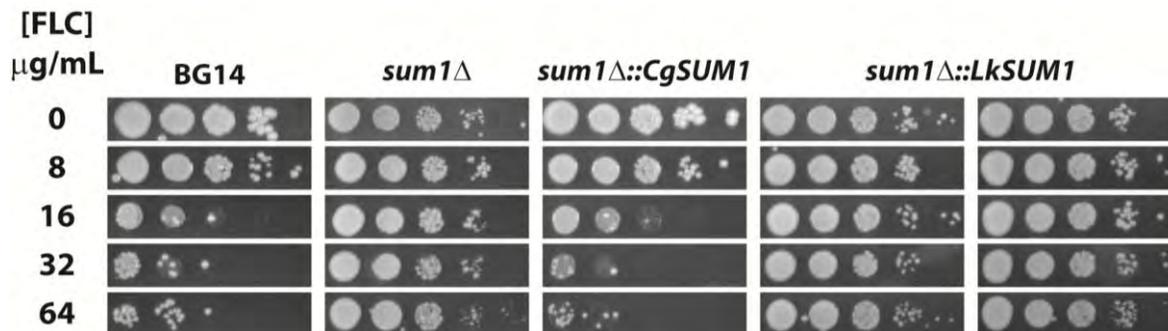
El alineamiento global de secuencias de Sum1 indica que la región más conservada entre estas proteínas se encuentra en el extremo N-terminal. Además, la mayoría de los bloques proteicos que comparte CgSum1 con el resto de las proteínas Sum1 se localizan en esta región (Ilustración 25). Esto sugiere que probablemente el N-terminal medie la interacción con Rfm1 para el reclutamiento de Hst1 y ejercer así el silenciamiento. Sin embargo, cabe mencionar que aún cuando se conoce la secuencia de ADN que reconoce Sum1 de *S. cerevisiae*, hasta el momento se desconoce cuáles son los dominios funcionales de Sum1, ni siquiera el sitio de unión al ADN. La base de datos [Pfam](http://Pfam) para la búsqueda de dominios proteicos<sup>195</sup> no identifica ningún motivo dentro de las secuencias de ninguna de proteínas de la familia Sum1.



**Ilustración 25 | Diagrama de los bloques proteicos conservados entre las proteínas de la familia Sum1.** Se muestran las siete secuencias de las proteínas Sum1 de las levaduras *C. glabrata*, *K. lactis*, *L. kluyveri*, *S. bayanus*, *S. cerevisiae*, *S. kudriavzevii*, *S. mikatae* y *S. paradoxus*. La escala de la parte superior muestra representa 100 aminoácidos. El programa BLOCKS, a través del algoritmo MOTIF, identificó cinco bloques proteicos conservados entre las siete secuencias: El bloque rosa de 55 aa, el bloque azul de 13 aa, el amarillo de 55 aa, el bloque verde de 54 aa y el bloque morado de 43 aa. Cabe mencionar que los bloques de *C. glabrata* fueron los más distintos entre el resto de las proteínas.

Los análisis anteriores sugieren que Sum1 de *C. glabrata* es el componente del complejo HRS que más cambios ha experimentado. Para averiguar si estos cambios en Sum1 de *C. glabrata* han sido suficientes para ocasionar una reprogramación de la transcripción, decidimos analizar si la secuencia del ortólogo más cercano a Sum1 era capaz de complementar a una cepa mutante nula *sum1Δ* de *C. glabrata*. Para ello introdujimos la secuencia codificante de *SUM1* de *L. kluyveri* en el locus de *SUM1* de *C. glabrata*. La idea es que si LkSum1 puede sustituir a CgSum1 entonces, la mutante *sum1Δ* de *C. glabrata* revertirá su fenotipo de resistencia al fluconazol. Sin embargo, encontramos que la mutante *sum1Δ* que porta el gen de *SUM1* de *L. kluyveri* se comporta igual que la mutante nula, a diferencia de la cepa complementada con *CgSUM1* que revierte su fenotipo a S-DD (Ilustración 26). Dado que Sum1 de *L. kluyveri* es incapaz de complementar a *C. glabrata* estos resultados sugieren al menos dos posibilidades: 1) que LkSum1 y CgSum1 reconocen secuencias diferentes en los promotores de los genes que regulan o 2) que LkSum1 ni siquiera puede asociarse con CgRfm1 para formar el complejo represor HRS. Será necesario realizar otros experimentos

para determinar cuál de estas posibilidades es la responsable del fenotipo observado.



**Ilustración 26 / Ensayo de complementación de la mutante *sum1Δ* de *C. glabrata*.**

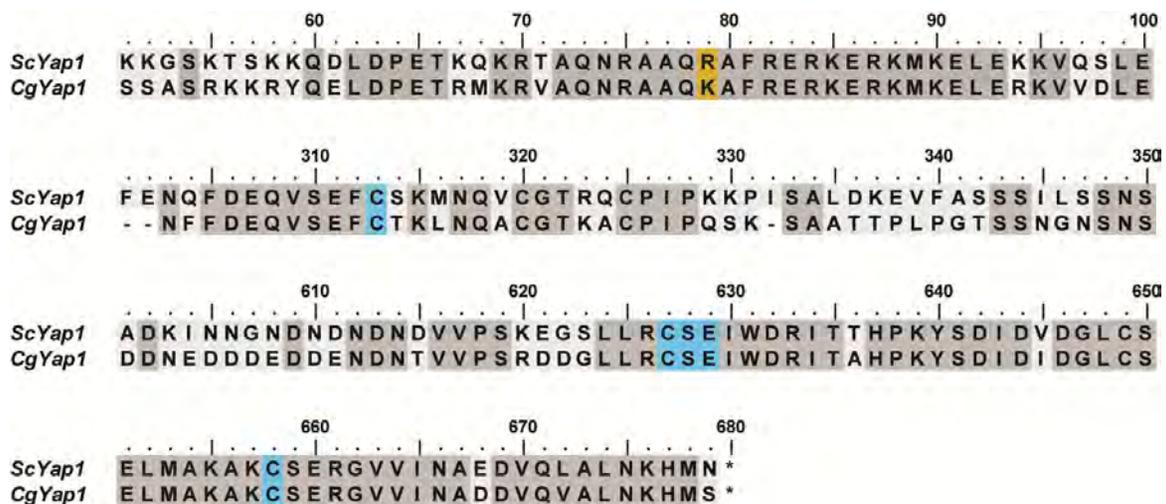
La cepa parental (BG14), la mutante *sum1Δ* (CGM673), la mutante *sum1Δ* complementada (CGM1611) y dos aislados independientes de la mutante *sum1Δ* transformada con el gen *SUM1* de *L. kluyveri* (CGM1819 y CGM1820) fueron crecidas hasta la fase de crecimiento estacionario en medio YPD líquido. Posteriormente se tomó la cantidad de volumen necesaria para obtener 1 mL con DO = 0.5. A partir de esta suspensión se realizaron diluciones seriadas y se sembraron en cajas de con diferentes concentraciones de fluconazol. [0, 8, 16, 32 y 64 μg/mL].

## 6.4. Análisis de la interacción de Skn7 y Yap1

### 6.4.1. Yap1 y Skn7 no co-inmunoprecipitan en condiciones basales ni oxidantes

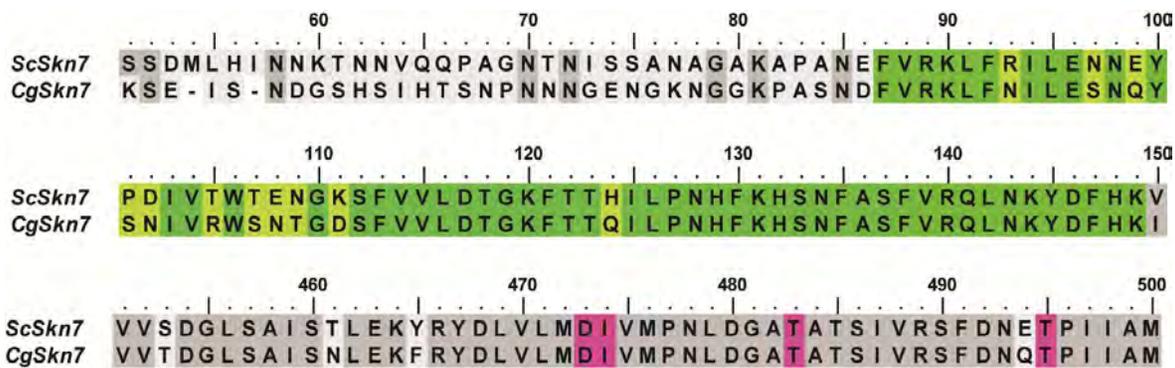
Los factores de transcripción Skn7 y Yap1 controlan la respuesta a estrés oxidante tanto en *C. glabrata* como en *S. cerevisiae*<sup>88,102,196</sup>. Además, se ha demostrado que ambos factores son importantes para la regulación de los genes centrales de respuesta a peróxido, como el sistema tioredoxina, las glutatión peroxidasas y la catalasa<sup>88</sup>. En *S. cerevisiae* se ha demostrado que la interacción proteica entre Skn7 y Yap1 es necesaria para una respuesta eficiente al estrés oxidante<sup>196</sup>. Mulford *et al.* identificaron mediante experimentos de co-inmunoprecipitación algunos de los residuos de aminoácidos que son importantes para que se lleve a cabo esta interacción (ilustraciones Ilustración 27 Ilustración 28)<sup>196</sup>. En *C. glabrata*, Roetzer *et al.* han demostrado que Yap1 y Skn7 cooperan para la inducción de genes como *TRR2* y *GPX2*. Sin embargo, aunque la presencia de ambos factores es necesaria para la activación total de estos genes, sus datos no necesariamente demuestran que estas proteínas interactúen<sup>88</sup>. Es por ello que decidimos analizar por ensayos de co-inmunoprecipitación si Yap1 interactúa físicamente con Skn7 en *C. glabrata*.

En las ilustraciones Ilustración 27 y Ilustración 28 se muestran los alineamientos entre las proteínas Skn7 y Yap1 de *C. glabrata* y *S. cerevisiae*. Estos análisis revelan que las proteínas Yap1 comparten un 50.3 % de similitud entre las dos especies, en cambio las Skn7 son 60.7 % similares. CgYap1 conserva los residuos que han demostrado favorecer la interacción con Skn7 en *S. cerevisiae* (residuos en azul, Ilustración 27). Por otra parte, el dominio de factor de choque térmico, que es necesario para la interacción entre estas proteínas, está muy conservado en Skn7 de *C. glabrata* y *S. cerevisiae* (89 % de similitud, matriz BLOSUM62). Además, CgSkn7 conserva los aminoácidos que también han sido identificados como importantes para la interacción con Yap1 en *S. cerevisiae* (Ilustración 28).



**Ilustración 27 | Alineamiento de las secuencias de Yap1 de *S. cerevisiae* y de *C. glabrata*.**

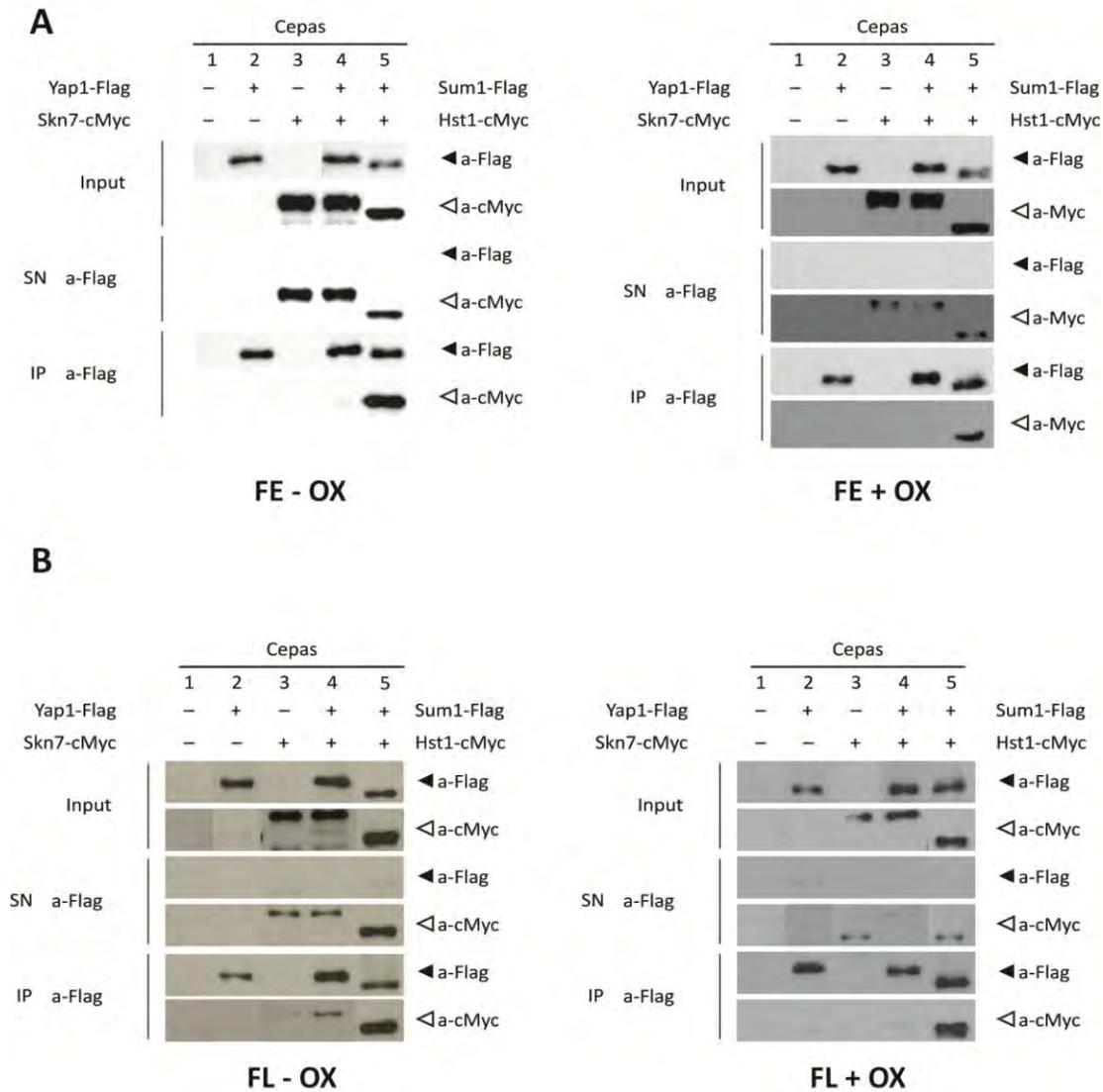
Se muestran sólo cuatro secciones del alineamiento pareado de las secuencias de Yap1. En amarillo se indica el residuo que determina la unión a elementos de respuesta a Yap (YRE). Mientras ScYap1 prefiere YRE-O, CgYap1 se une en mayor grado a YRE-A. En azul se muestran los residuos que son necesarios para la interacción entre Yap1 y Skn7 de *S. cerevisiae*.



**Ilustración 28/ Alineamiento de las secuencias de Skn7 de *S. cerevisiae* y de *C. glabrata*.**

Se muestran sólo tres secciones del alineamiento pareado de las secuencias de Skn7. En verde se delimita el dominio tipo-factor de choque térmico que es altamente parecido entre las dos especies. En la parte inferior, se resaltan los aminoácidos que han demostrado favorecer la interacción entre Yap1 y Skn7 de *S. cerevisiae*.

Los análisis de las secuencias anteriores, junto a los datos de Roetzer *et al.* sugieren que es altamente probable que Yap1 y Skn7 interactúen. Entonces decidimos realizar un ensayo de co-inmunoprecipitación, tanto en condiciones basales, como oxidantes para analizar la interacción entre estas proteínas. Para ello, J. Juárez-Cepeda construyó las versiones marcadas de los genes *YAP1* y *SKN7* con los epítomos FLAG y cMyc en sus porciones C-terminal y las introdujo en los locus nativos de la cepa parental BG14. Se generaron cepas que contienen a Yap1-Flag y Skn7-cMyc, así como los controles que poseen una sola proteína marcada. Tras comprobar mediante ensayos de susceptibilidad al H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> que las proteínas permanecieron funcionales (datos no mostrados), realizamos los experimentos de co-inmunoprecipitación en extractos celulares provenientes de cultivos en la fase estacionaria de crecimiento estacionario, con y sin tratamiento oxidante. Se realizó la inmunoprecipitación de Yap1 con perlas cubiertas del anticuerpo contra Flag y posteriormente se inmunodetectaron las proteínas en el extracto crudo, el sobrenadante y la fracción inmunoprecipitada con anticuerpos contra cMyc y contra Flag. En caso de que Yap1-Flag interactúe con Skn7-cMyc, se deberá detectar la presencia de Skn7 en el inmunoprecipitado. Sin embargo, nuestros ensayos indican que Skn7-cMyc y Yap1-Flag no co-inmunoprecipitan en células de la fase estacionaria de crecimiento estacionario, tanto en condiciones basales como oxidantes (líneas 4 de la Ilustración 29 A).



**Ilustración 29 | Análisis de la interacción de Yap1-Flag y Skn7-cMyc por co-inmunoprecipitación.**

**A** Se realizó la inmunoprecipitación de Yap1-Flag a partir de extractos celulares totales de cultivos en la fase de crecimiento estacionario, tanto en condiciones basales (FE-OX) como tratados con 200 mM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (FE+OX). Después de la inmunoprecipitación se realizó la detección de las proteínas con los anticuerpos contra c-Myc y Flag en todas las fracciones: el extracto crudo (input), el sobrenadante que contiene las proteínas no precipitadas (SN) y el inmunoprecipitado (IP). La cepa parental BG14 que no contiene proteínas marcadas fue utilizada como control negativo (línea 1) mientras que la cepa CGM1236 que contiene a Sum1-Flag y Hst1-cMyc se utilizó como control positivo (línea 5). La cepa CGM1792 contiene sólo la proteína Yap1 marcada con Flag (línea 2), la cepa CGM1505 posee la versión marcada de Skn7 con cMyc (línea 3) y la cepa CGM1548 contiene ambas proteínas marcadas (línea 4). **B** Se realizó el mismo análisis que en A, pero los extractos fueron obtenidos a partir de cultivos crecidos en fase logarítmica. Tras siete duplicaciones en medio YPD hasta alcanzar la OD = 1.0, el cultivo fue dividido en dos, una parte fue tratada con 25mM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y la otra no recibió tratamiento oxidante.

Previamente se ha demostrado que *YAP1* y *SKN7* juegan un papel más relevante en la respuesta a estrés oxidante de *C. glabrata* en fase logarítmica<sup>102</sup>. Para evaluar si la fase influye en la interacción de Yap1 con Skn7 decidimos realizar el ensayo de co-inmunoprecipitación en células de fase logarítmica y con o sin tratamiento oxidante (25 mM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). A pesar de que en la Ilustración 29 B se observa una banda en la línea 4, que presumiblemente podría indicar la interacción de Yap1-Flag con Skn7-cMyc, la línea 3 despliega la misma señal aún cuando carece de la proteína Yap1 marcada. Estos resultados podrían ser el resultado de un aclaramiento ineficiente de los extractos crudos con las perlas de sefarosa. Además, esta banda no se observa en el experimento realizado en condiciones oxidantes, lo que sugiere nuevamente que estos factores de transcripción no interactúan en *C. glabrata*.

Nuestros resultados indican que no existe interacción proteica entre Yap1 y Skn7 de *C. glabrata* incluso cuando conservan todos los residuos que han sido identificados como importantes en la interacción de estos factores en los ortólogos de *S. cerevisiae*. Esto sugiere que en *C. glabrata* estos residuos no son determinantes en la interacción o que no hemos identificado las condiciones ambientales que la propicien. De cualquier forma será interesante analizar si Yap1 de *C. glabrata* es lo suficientemente parecido a su ortólogo como para interactuar con Skn7 de *S. cerevisiae* y viceversa. Estos análisis nos permitirán evaluar si las diferencias contenidas en los factores de transcripción de las dos especies son determinantes en su interacción.

## 7. DISCUSIÓN

Las infecciones sistémicas causadas por *C. glabrata* son epidemiológicamente relevantes debido al incremento en su incidencia<sup>1</sup>, a su elevada mortalidad en pacientes inmunocomprometidos<sup>197</sup>, y a que frecuentemente desarrollan resistencia a los fármacos azólicos<sup>198-199</sup>. En particular, la resistencia multifarmacológica, tanto innata como inducible, representa un reto importante para el tratamiento de las candidiasis causadas por esta levadura<sup>200</sup>. Por otra parte, se ha demostrado que *C. glabrata* posee mecanismos de evasión de la respuesta inmune que le permiten sobrevivir y replicarse en el interior del fagosoma sin afectar aparentemente la célula fagocítica<sup>86</sup>. Se ha propuesto que la respuesta al estrés oxidante y nutricional es importante para la supervivencia dentro del macrófago y que posiblemente contribuya en la diseminación de *C. glabrata* durante la infección<sup>81,85,102,114</sup>. Como muchos otros procesos celulares, la resistencia farmacológica y la respuesta al estrés oxidante se encuentran finamente regulados. Sin embargo, hasta la fecha no se había profundizado en el papel de los remodeladores de cromatina en ninguno de estas respuestas. El mecanismo regulador del silenciamiento ha demostrado ser importante en la generación de variabilidad de la superficie celular de algunos hongos y protozoarios patógenos. Esta variación confiere a estos organismos una adherencia diferencial, una rápida adaptación a los cambios ambientales súbitos y les permite evadir el sistema inmune [revisado en Vestrepen K., y Fink G.(2009)<sup>35</sup>]. Por estas razones, consideramos que es importante explorar la posible actividad reguladora que el silenciamiento regional o local pueda tener en la resistencia multifarmacológica y oxidante de *C. glabrata*.

En este trabajo demostramos que la abolición del silenciamiento local mediado por el complejo HRS incrementa la resistencia de *C. glabrata* al fluconazol y al H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Nuestros análisis indican que el incremento en la resistencia al fluconazol se debe a la desrepresión de los transportadores del tipo ABC, pero posiblemente también existe un mecanismo independiente que contribuye, en menor grado, a la adquisición de esta resistencia. En cambio, el incremento en

resistencia al H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> parece deberse solamente a la inducción de la catalasa y no a otro sistema antioxidante. Además, encontramos que esta respuesta es específica de *C. glabrata*, ya que la mutación de los genes ortólogos de los componentes del complejo HRS no modifica la susceptibilidad a ninguno de estos agentes en *S. cerevisiae*. Sin embargo, aún cuando nuestros datos sugieren que la inactivación del complejo HRS puede favorecer la adquisición de resistencia de *C. glabrata*, desconocemos si este fenómeno se presenta *in vivo*.

### 7.1. ¿La inactivación del complejo HRS es ventajosa para *C. glabrata*?

La respuesta al estrés oxidante y la resistencia multifarmacológica de *C. glabrata* han sido extensamente estudiadas<sup>85,102,135,201</sup>. Nuestro trabajo y el de Noble *et al.* revelan que también existen mecanismos represivos en el control de estas respuestas<sup>115,146</sup>. En particular, nosotros demostramos que Hst1 participa como un corepresor de los genes implicados en la resistencia al fluconazol y al peróxido de hidrógeno. Además, los datos de microarreglos de Ma *et al.*<sup>161</sup>, sugieren que, en ausencia de *HST1* se induce *PUP1* (CAGL0M12947g), un gen que codifica para una proteína mitocondrial que se encuentra sobreexpresada en algunos aislados clínicos de *C. glabrata*<sup>149</sup>. Estos aislados clínicos contienen diferentes alelos con mutaciones de ganancia de función en *PDR1* que hacen a las cepas más virulentas y resistentes al fluconazol<sup>149</sup>. Aunado a esto, la delección de *HST1* también incrementa la adherencia de *C. glabrata* a las células epiteliales del ovario del hámster chino Lec2 (Cormack y Castaño, comunicación personal). Además, Domergue *et al.*<sup>45</sup> encontraron un incremento en la expresión de *EPA6* en la mutante *hst1Δ*. Estos datos sugieren que Hst1 también puede tener una participación en el control de adhesinas epiteliales, aunque de menor relevancia que su parálogo Sir2.

Nuestros datos sugieren que la inactivación de las sirtuinas no causa un detrimento para la supervivencia de *C. glabrata* (Ilustración 18). Por el contrario, la inactivación de Hst1 puede ser ventajosa para esta levadura, aunque no sabemos si esto pueda ocurrir *in vivo*. Se ha demostrado que la actividad de las sirtuinas de *C. glabrata* depende de los niveles ambientales de niacina. Se ha propuesto que la

limitación de niacina que presentan algunos nichos del hospedero, como el tracto urinario, incrementa la adherencia de la levadura al epitelio<sup>45</sup>. Pensamos que es posible que, en esas condiciones, Hst1 pierda su actividad de desacetilasa y permita la desrepresión de los genes que controla. Sin embargo, aún falta por demostrar si la limitación ambiental de niacina o la exposición a la orina humana sean estímulos suficientes para modificar la resistencia de *C. glabrata* al fluconazol o al H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Los datos de los microarreglos de Ma *et al.*<sup>161</sup> no reportan la inducción en los genes *PDR1* y *CDR1* con la limitación de niacina o la exposición a la orina humana, aunque existe una inducción de *MSN4* y de *CTA1*<sup>161</sup>. Será necesario analizar la susceptibilidad de *C. glabrata* al fluconazol y al estrés oxidante en esas condiciones y evaluar si la inactivación de Hst1 realmente contribuye en la adquisición de resistencia. Nuestros datos indican que no basta inhibir a Hst1, sino que el medio de cultivo influye, al menos, en la resistencia al fluconazol.

Por otra parte, se han identificado varios aminoácidos que son importantes para la estructura y la actividad enzimática de las sirtuinas. Al igual que otros miembros de esta familia de desacetilasas, CgHst1 contiene un dominio Cys-X-X-Cys-(X)<sub>15-20</sub>-Cys-X-X-que coordina un catión de Zn<sup>2+</sup><sup>202-203</sup>. Nosotros demostramos que el reemplazo de las cisteínas 344 y 347 por alaninas es suficiente para inactivar a Hst1. Lo interesante es que la secuencia Cys-Pro-Tyr-Cys contenida en este motivo de CgHst1 también se encuentra en el sitio activo conservado de las glutaredoxinas<sup>204</sup>. A la fecha no existe evidencia de que las cisteínas de este motivo de las sirtuinas sean susceptibles a la oxidación, pero este dominio podría representar un blanco potencial. No obstante, nuestros datos de co-inmunoprecipitación demuestran que la formación del complejo HRS se presenta tanto en el crecimiento logarítmico como estacionario y también en condiciones oxidantes. Será necesario efectuar experimentos con sirtuinas purificadas para evaluar si los niveles fisiológicos de estrés oxidante pueden oxidar a Hst1.

Sin embargo, aún cuando Hst1 parece ser el componente más propenso a la inactivación, no podemos descartar que existan otras señales que inactiven al resto de los elementos del complejo HRS. Por ejemplo, en *S. cerevisiae*, la cinasa

Ime2 fosforila a Sum1 para promover su disociación del complejo HRS y remover a este represor de los promotores de los genes de la esporulación en un mecanismo que depende de la proteína Ndt80<sup>205-206</sup>. Se conoce que en *S. cerevisiae* la limitación nutricional y el inicio de la meiosis inducen a *IME2*<sup>205</sup>. *C. glabrata* posee los genes ortólogos *IME2* (CAGL0G04455g), *CDK1* (CAGL0H07535), *CDC7* (CAGL0K01815g) y *NDT80* (CAGL0L13090g). Sin embargo, aún cuando [Pfam](#) predice que los primeros tres parecen conservar la actividad de cinasa y Ndt80 la de factor de unión al ADN, no se ha investigado su función en *C. glabrata*. Además, debido a la ausencia de ciclo sexual y meiótico en esta levadura, se desconocen cuáles pueden ser las condiciones de operación de Ime2 y de su relevancia fisiológica. Será interesante analizar si Ime2, Cdk1 y Cdc7 pueden fosforilar a Sum1 de *C. glabrata*, al menos *in vitro*.

Finalmente, nuestros análisis de susceptibilidad al fluconazol en diferentes medios de cultivo, sugieren que la inactivación del complejo HRS no es suficiente para que *C. glabrata* adquiera la resistencia al fluconazol, sino que es necesaria la presencia de un algún componente del medio de cultivo para el desarrollo del fenotipo (Ilustración 19-21 y Tabla 6). Consideramos que este fenómeno es importante porque el uso exclusivo de un medio de cultivo; como el RPMI-1640 de los estándares, puede impedir la identificación de las cepas o los aislados clínicos que tengan un comportamiento similar, es decir, cuya resistencia sea modificada por las condiciones nutricionales. El determinar la frecuencia con la que aparecen aislados clínicos con estas características nos permitirá averiguar si vale la pena analizar la susceptibilidad al fluconazol en diferentes medios de cultivo. Por nuestros experimentos sabemos que el extracto de levadura y el hidrolizado proteico de peptona comparten algún componente que causa la resistencia al fluconazol en ausencia de *hst1Δ* (Ilustración 22). Los tres medios que utilizamos contienen glucosa al 2%, por lo que consideramos poco probable que la fuente de carbono influya en la susceptibilidad al fluconazol, pero tendremos que descartar esta posibilidad. Además, nuestros ensayos sugieren que la mutación de *hst1Δ* no propicia la generación de señales en el medio de cultivo que modifiquen la susceptibilidad de otras cepas (Ilustración 23). En conjunto, estas evidencias

señalan que la represión de los genes *PDR* por Hst1 comprende sólo una capa de toda una red de regulación compleja que gobierna los componentes de la resistencia multifarmacológica. Sí la inactivación del complejo HRS es importante para la adquisición de la resistencia al estrés, o antecede a ésta, durante la infección del hospedero, es algo que aún falta por determinar y que valdrá la pena analizar.

## **7.2. Sum1 es el componente filogenéticamente diferente del complejo HRS**

*C. glabrata* se encuentra filogenéticamente relacionado con la levadura no patógena *S. cerevisiae*<sup>21</sup>. Se ha sugerido que la comparación genómica y su regulación génica entre estos organismos ayudará a comprender cuáles son los factores de virulencia que determinan el comportamiento patogénico de *C. glabrata*<sup>41</sup>. Existe evidencia de que *C. glabrata* ha perdido genes durante su evolución genómica y se ha propuesto que esto guarda relación con su adaptación al hospedero como patógeno oportunista<sup>23</sup>. Al parecer, *C. glabrata* ha tenido que ajustarse a condiciones ambientales relativamente hostiles, que la han llevado a generar mecanismos que aseguran su supervivencia tanto en su fase comensal como en la patogénica.

Nuestros análisis indican que Hst1, Sum1 y Rfm1 se asocian físicamente para formar un complejo represor. Resulta interesante que Hst1 de *C. glabrata* es 74 % similar al ortólogo de *S. cerevisiae*. Sin embargo, cuando comparamos los perfiles de transcripción de las cepas mutantes en el gen que codifica para esta sirtuina en ambas levaduras, encontramos que sólo 19 genes se regulan en común<sup>161,176</sup>. Pero ¿qué es lo que determina que la misma desacetilasa regule genes diferentes en las dos levaduras? La razón podría radicar en el represor Sum1. En *S. cerevisiae*, Sum1 reconoce en el ADN, la secuencia de del elemento de la etapa intermedia de la esporulación (MSRE) y, a través de Hst1, silencia un juego selecto de genes de manera específica<sup>166-167</sup>. Consideramos que el perfil de transcripción distinto entre *C. glabrata* y *S. cerevisiae* se puede explicar por las diferencias sustanciales que hay entre los represores Sum1, que reclutan la desacetilasa (30.4 % similares). Por experimentos de coinmunoprecipitación, hemos demostrado que el factor de transcripción se une físicamente a Hst1, tal y

como se ha descrito en *S. cerevisiae*<sup>166</sup>. Es probable que Sum1 de *C. glabrata* haya experimentado cambios en su secuencia que la hayan conducido al reconocimiento de una secuencia distinta al MSRE pero que al mismo tiempo le permitan reconocer al ADN y a la sirtuina para el silenciamiento génico. La ausencia de complementación de la mutante *sum1*Δ de *C. glabrata* con Sum1 de *L. kluyveri* sugiere que estas proteínas no comparten los dominios que son necesarios para reconocer el mismo sitio de unión al ADN (Ilustración 26). Además, cuando analizamos algunas regiones intergénicas de los genes de *C. glabrata* regulados negativamente por Hst1 (*TNR1*, *TNR2*, *TNA1*, *CDR1*, *YBT1*, *HSP12*, *HXT2*) en la base de datos para las secuencias consenso de los reguladores de transcripción ([YEASTRACT](#)), encontramos que carecen de secuencias MSRE(datos no mostrados). Sin embargo, tampoco se debe descartar que los genes seleccionados pueden ser indirectamente regulados por Sum1 y que, por lo tanto, la inducción de su transcripción se pueda deber a la desrepresión de un activador. Será necesario un análisis bioinformático más exhaustivo y experimentos de inmunoprecipitación de la cromatina con nuestra versión marcada de Sum1 para averiguar el sitio de reconocimiento de Sum1 en *C. glabrata*.

Por otra parte, a pesar del bajo grado de similitud de Sum1, la región más conservada se encuentra en el extremo N-terminal. Esta observación resulta interesante porque, en *S. cerevisiae*, dicha región alberga los residuos importantes para la interacción con Rfm1 y, por ende con Hst1<sup>166</sup>. Sin embargo, cabe resaltar que dichos residuos no se encuentran en la secuencia de Sum1 de *C. glabrata*, por lo que posiblemente su interacción dependa de diferentes aminoácidos aún no descritos. Consideramos que el grado de conservación de Rfm1 tal vez sea suficiente (55.1 %) para permitir la interacción con Sum1 y al mismo tiempo con Hst1, por lo que resultaría interesante identificar los residuos implicados en la estabilización del complejo. Considero que valdría la pena construir versiones truncas o mutagénicas de Sum1 y analizar la susceptibilidad de las cepas transformadas al fluconazol para evaluar su funcionalidad. De igual manera, podrían realizarse versiones quiméricas de Sum1 de *C. glabrata* y *L. kluyveri* para

determinar cuáles de los cambios son determinantes en la interacción de sus componentes.

## 8. CONCLUSIONES

- En *C. glabrata* la desacetilasa de histonas Hst1 interacciona con Sum1 en un mecanismo que depende de Rfm1 para formar el complejo HRS.
- *SUM1* de *L. kluyveri* es incapaz de reemplazar a *SUM1* de *C. glabrata*.
- La delección de cualquiera de los genes del complejo HRS (*HST1*, *SUM1* o *RFM1*) incrementa la resistencia de *C. glabrata* al fluconazol y al estrés oxidante (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> o menadiona).
- El tratamiento de la cepa parental con exceso de nicotinamida causa la inactivación de Hst1 y una disminución en la susceptibilidad al fluconazol que semeja a la delección del gen *HST1*.
- El reemplazo de las cisteínas 344 y 347, que se encuentran en el dominio de unión a zinc de Hst1, equivale a una mutación con pérdida de función.
- La ausencia o inhibición de Hst1 incrementa los niveles del transcrito de *PDR1*, *CDR1*, *MSN4* y *CTA1*. La sobreexpresión de los dos primeros genes puede explicar el fenotipo del incremento en la resistencia al fluconazol mientras que los últimos participan en la respuesta a estrés oxidante.
- La delección de las sirtuinas *SIR2* o *HST1* posiblemente no afecte la viabilidad cronológica de *C. glabrata*.
- El medio de cultivo influye en la susceptibilidad al fluconazol cuando *C. glabrata* carece de algún componente del complejo HRS.
- Skn7 y Yap1 no interaccionan en condiciones fase de crecimiento logarítmico ni estacionario, ni en presencia de oxidantes en *C. glabrata*.

## 9. PERSPECTIVAS

- Identificar los dominios funcionales de CgSum1.

Mediante la construcción de versiones truncas y mutaciones aleatorias de la secuencia de *SUM1* se podrán delimitar las regiones de la proteína que son indispensables para su función. Se analizará la funcionalidad de las construcciones mediante el ensayo de complementación de la mutante *sum1Δ* y la reversión del fenotipo de resistencia al fluconazol en YPD.

- Identificar la secuencia de unión al ADN de Sum1.

Primero, evaluaremos la presencia de Sum1-Flag en distintas regiones intergénicas por ChIP. Para ello, hemos diseñado oligonucleótidos a lo largo de las regiones intergénicas de *TNA1*, *CDR1*, *MSN4* y *PDR1*. Esta aproximación nos permitirá delimitar las regiones de la cromatina que se enriquecen con Sum1. Con los resultados obtenidos, diseñaremos sondas de ADN para analizar su unión a Sum1 mediante ensayos de cambios de movilidad electroforética.

- Analizar la frecuencia de aislados clínicos que desplieguen un comportamiento de susceptibilidad al fluconazol parecido al de la mutante *hst1Δ*.

Para ello primero determinaremos la susceptibilidad al fluconazol de una colección de aislados clínicos de *C. glabrata*, tanto en YPD como en RPMI-1640. Los aislados clínicos provienen de una colección de cepas gentilmente donadas al laboratorio por el Instituto Nacional de Cancerología (INCAN), el Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán y del Hospital de Tepic. Hasta el momento, de 47 aislados clínicos previamente identificados por otros métodos como *C. glabrata*, hemos confirmado la identidad de 40 de ellos por un método estandarizado y patentado de PCR. Resta por evaluar la susceptibilidad de los aislados al antifúngico.

## 10. REFERENCIAS

- 1 Pfaller, M. A. & Diekema, D. J. Epidemiology of invasive candidiasis: a persistent public health problem. *Clin Microbiol Rev* **20**, 133-163, (2007).
- 2 Clark, T. A. & Hajjeh, R. A. Recent trends in the epidemiology of invasive mycoses. *Curr Opin Infect Dis* **15**, 569-574, (2002).
- 3 Richardson, M. & Lass-Flörl, C. Changing epidemiology of systemic fungal infections. *Clin Microbiol Infect* **14 Suppl 4**, 5-24, (2008).
- 4 Warnock, D. W. Trends in the epidemiology of invasive fungal infections. *Nihon Ishinkin Gakkai Zasshi* **48**, 1-12, (2007).
- 5 Odds, F. C., Brown, A. J. & Gow, N. A. Antifungal agents: mechanisms of action. *Trends Microbiol* **11**, 272-279, (2003).
- 6 Edwards, J. E., Jr. Fungal cell wall vaccines: an update. *J Med Microbiol* **61**, 895-903, (2012).
- 7 Cassone, A. & Casadevall, A. Recent progress in vaccines against fungal diseases. *Curr Opin Microbiol* **15**, 427-433, (2012).
- 8 Gudlaugsson, O. *et al.* Attributable mortality of nosocomial candidemia, revisited. *Clin Infect Dis* **37**, 1172-1177, (2003).
- 9 Stenderup, A. & Pedersen, G. T. Yeasts of human origin. *Acta Pathol Microbiol Scand* **54**, 462-472, (1962).
- 10 Strausbaugh, L. J. *et al.* High frequency of yeast carriage on hands of hospital personnel. *J Clin Microbiol* **32**, 2299-2300, (1994).
- 11 Bliss, J. M., Basavegowda, K. P., Watson, W. J., Sheikh, A. U. & Ryan, R. M. Vertical and horizontal transmission of *Candida albicans* in very low birth weight infants using DNA fingerprinting techniques. *Pediatr Infect Dis J* **27**, 231-235, (2008).
- 12 Pfaller, M. A. & Diekema, D. J. Epidemiology of invasive mycoses in North America. *Crit Rev Microbiol* **36**, 1-53, (2010).
- 13 Gonzalez, G. M., Elizondo, M. & Ayala, J. Trends in species distribution and susceptibility of bloodstream isolates of *Candida* collected in Monterrey, México, to seven antifungal agents: results of a 3-year (2004 to 2007) surveillance study. *J Clin Microbiol* **46**, 2902-2905, (2008).
- 14 Gonzalez, G. M. *et al.* Species distribution and antifungal susceptibility of bloodstream fungal isolates in paediatric patients in Mexico: a nationwide surveillance study. *J Antimicrob Chemother* **68**, 2847-2851, (2013).
- 15 Pfaller, M. A. *et al.* Results from the ARTEMIS DISK Global Antifungal Surveillance study, 1997 to 2005: an 8.5-year analysis of susceptibilities of *Candida* species and other yeast species to fluconazole and voriconazole determined by CLSI standardized disk diffusion testing. *J Clin Microbiol* **45**, 1735-1745, (2007).
- 16 Hachem, R., Hanna, H., Kontoyiannis, D., Jiang, Y. & Raad, I. The changing epidemiology of invasive candidiasis: *Candida glabrata* and *Candida krusei* as the leading causes of candidemia in hematologic malignancy. *Cancer* **112**, 2493-2499, (2008).
- 17 Trick, W. E., Fridkin, S. K., Edwards, J. R., Hajjeh, R. A. & Gaynes, R. P. Secular trend of hospital-acquired candidemia among intensive care unit

- patients in the United States during 1989-1999. *Clin Infect Dis* **35**, 627-630, (2002).
- 18 Moran, C., Grussemeier, C. A., Spalding, J. R., Benjamin, D. K., Jr. & Reed, S. D. Comparison of costs, length of stay, and mortality associated with *Candida glabrata* and *Candida albicans* bloodstream infections. *Am J Infect Control* **38**, 78-80, (2010).
- 19 Pfaller, M. A. & Diekema, D. J. Twelve years of fluconazole in clinical practice: global trends in species distribution and fluconazole susceptibility of bloodstream isolates of *Candida*. *Clin Microbiol Infect* **10 Suppl 1**, 11-23, (2004).
- 20 Pfaller, M. A. *et al.* Geographic variation in the frequency of isolation and fluconazole and voriconazole susceptibilities of *Candida glabrata*: an assessment from the ARTEMIS DISK Global Antifungal Surveillance Program. *Diagn Microbiol Infect Dis* **67**, 162-171, (2010).
- 21 Butler, G. *et al.* Evolution of pathogenicity and sexual reproduction in eight *Candida* genomes. *Nature* **459**, 657-662, (2009).
- 22 Marcet-Houben, M. & Gabaldon, T. The tree versus the forest: the fungal tree of life and the topological diversity within the yeast phylome. *PLoS ONE* **4**, e4357, (2009).
- 23 Dujon, B. *et al.* Genome evolution in yeasts. *Nature* **430**, 35-44, (2004).
- 24 Wolfe, K. H. & Shields, D. C. Molecular evidence for an ancient duplication of the entire yeast genome. *Nature* **387**, 708-713, (1997).
- 25 Casadevall, A. & Pirofski, L. A. The damage-response framework of microbial pathogenesis. *Nat Rev Microbiol* **1**, 17-24, (2003).
- 26 Romani, L. Immunity to fungal infections. *Nat Rev Immunol* **11**, 275-288, (2011).
- 27 Fidel, P. L., Jr., Vazquez, J. A. & Sobel, J. D. *Candida glabrata*: review of epidemiology, pathogenesis, and clinical disease with comparison to *C. albicans*. *Clin Microbiol Rev* **12**, 80-96, (1999).
- 28 Brunke, S. & Hube, B. Two unlike cousins: *Candida albicans* and *C. glabrata* infection strategies. *Cell Microbiol* **15**, 701-708, (2013).
- 29 de Groot, P. W., Bader, O., de Boer, A. D., Weig, M. & Chauhan, N. Adhesins in human fungal pathogens: glue with plenty of stick. *Eukaryot Cell* **12**, 470-481, (2013).
- 30 Sundstrom, P. Adhesion in *Candida* spp. *Cell Microbiol* **4**, 461-469, (2002).
- 31 Bernhardt, J., Herman, D., Sheridan, M. & Calderone, R. Adherence and invasion studies of *Candida albicans* strains, using in vitro models of esophageal candidiasis. *J Infect Dis* **184**, 1170-1175, (2001).
- 32 Verstrepen, K. J. & Klis, F. M. Flocculation, adhesion and biofilm formation in yeasts. *Mol Microbiol* **60**, 5-15, (2006).
- 33 Latge, J. P. Tasting the fungal cell wall. *Cell Microbiol* **12**, 863-872, (2010).
- 34 Zupancic, M. L. *et al.* Glycan microarray analysis of *Candida glabrata* adhesin ligand specificity. *Mol Microbiol* **68**, 547-559, (2008).
- 35 Verstrepen, K. J. & Fink, G. R. Genetic and epigenetic mechanisms underlying cell-surface variability in protozoa and fungi. *Annu Rev Genet* **43**, 1-24, (2009).

- 36 de Groot, P. W. *et al.* The cell wall of the human pathogen *Candida glabrata*: differential incorporation of novel adhesin-like wall proteins. *Eukaryot Cell* **7**, 1951-1964, (2008).
- 37 Weig, M. *et al.* Systematic identification in silico of covalently bound cell wall proteins and analysis of protein-polysaccharide linkages of the human pathogen *Candida glabrata*. *Microbiology* **150**, 3129-3144, (2004).
- 38 Cormack, B. P., Ghorri, N. & Falkow, S. An adhesin of the yeast pathogen *Candida glabrata* mediating adherence to human epithelial cells. *Science* **285**, 578-582, (1999).
- 39 Iraqui, I. *et al.* The Yak1p kinase controls expression of adhesins and biofilm formation in *Candida glabrata* in a Sir4p-dependent pathway. *Mol Microbiol* **55**, 1259-1271, (2005).
- 40 Kraneveld, E. A. *et al.* Identification and differential gene expression of adhesin-like wall proteins in *Candida glabrata* biofilms. *Mycopathologia* **172**, 415-427, (2011).
- 41 Kaur, R., Domergue, R., Zupancic, M. L. & Cormack, B. P. A yeast by any other name: *Candida glabrata* and its interaction with the host. *Curr Opin Microbiol* **8**, 378-384, (2005).
- 42 De Las Penas, A., Orta-Zavalza, E., Martinez Jimenez, V. & Castano, I. in *The Fungal Cell Wall Vol. 1 Cell Biology Research Progress* (ed H. M. Mora-Montes) Ch. 6, 134-158 (Nova Science Publishers, 2013).
- 43 Maestre-Reyna, M. *et al.* Structural basis for promiscuity and specificity during *Candida glabrata* invasion of host epithelia. *Proc Natl Acad Sci U S A* **109**, 16864-16869, (2012).
- 44 Ielasi, F. S., Decanniere, K. & Willaert, R. G. The epithelial adhesin 1 (Epa1p) from the human-pathogenic yeast *Candida glabrata*: structural and functional study of the carbohydrate-binding domain. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **68**, 210-217, (2012).
- 45 Domergue, R. *et al.* Nicotinic acid limitation regulates silencing of *Candida* adhesins during UTI. *Science* **308**, 866-870, (2005).
- 46 Castano, I. *et al.* Telomere length control and transcriptional regulation of subtelomeric adhesins in *Candida glabrata*. *Mol Microbiol* **55**, 1246-1258, (2005).
- 47 De Las Penas, A. *et al.* Virulence-related surface glycoproteins in the yeast pathogen *Candida glabrata* are encoded in subtelomeric clusters and subject to *RAP1*- and *SIR*-dependent transcriptional silencing. *Genes Dev* **17**, 2245-2258, (2003).
- 48 Ma, B., Pan, S. J., Zupancic, M. L. & Cormack, B. P. Assimilation of NAD<sup>+</sup> precursors in *Candida glabrata*. *Mol Microbiol* **66**, 14-25, (2007).
- 49 Rosas-Hernandez, L. L. *et al.* yKu70/yKu80 and Rif1 regulate silencing differentially at telomeres in *Candida glabrata*. *Eukaryot Cell* **7**, 2168-2178, (2008).
- 50 Juarez-Reyes, A., Ramirez-Zavaleta, C. Y., Medina-Sanchez, L., De Las Penas, A. & Castano, I. A protosilencer of subtelomeric gene expression in *Candida glabrata* with unique properties. *Genetics* **190**, 101-111, (2012).

- 51 Gallegos-Garcia, V. *et al.* A Novel Downstream Regulatory Element Cooperates With the Silencing Machinery to Repress *EPA1* Expression in *Candida glabrata*. *Genetics*, (2012).
- 52 Halliwell, S. C., Smith, M. C., Muston, P., Holland, S. L. & Avery, S. V. Heterogeneous expression of the virulence-related adhesin Epa1 between individual cells and strains of the pathogen *Candida glabrata*. *Eukaryot Cell* **11**, 141-150, (2012).
- 53 Martinez-Jimenez, V. *et al.* Sir3 Polymorphisms in *Candida glabrata* clinical isolates. *Mycopathologia* **175**, 207-219, (2013).
- 54 Mundy, R. D. & Cormack, B. Expression of *Candida glabrata* adhesins after exposure to chemical preservatives. *J Infect Dis* **199**, 1891-1898, (2009).
- 55 Medzhitov, R. Recognition of microorganisms and activation of the immune response. *Nature* **449**, 819-826, (2007).
- 56 Levitz, S. M. Innate recognition of fungal cell walls. *PLoS Pathog* **6**, e1000758, (2010).
- 57 Bourgeois, C., Majer, O., Frohner, I. E., Tierney, L. & Kuchler, K. Fungal attacks on mammalian hosts: pathogen elimination requires sensing and tasting. *Curr Opin Microbiol* **13**, 401-408, (2010).
- 58 Brown, G. D. & Gordon, S. Immune recognition. A new receptor for beta-glucans. *Nature* **413**, 36-37, (2001).
- 59 Gantner, B. N., Simmons, R. M. & Underhill, D. M. Dectin-1 mediates macrophage recognition of *Candida albicans* yeast but not filaments. *Embo J* **24**, 1277-1286, (2005).
- 60 Means, T. K. *et al.* Evolutionarily conserved recognition and innate immunity to fungal pathogens by the scavenger receptors SCARF1 and CD36. *J Exp Med* **206**, 637-653, (2009).
- 61 Galan-Diez, M. *et al.* *Candida albicans* beta-glucan exposure is controlled by the fungal CEK1-mediated mitogen-activated protein kinase pathway that modulates immune responses triggered through dectin-1. *Infect Immun* **78**, 1426-1436, (2010).
- 62 Netea, M. G., Brown, G. D., Kullberg, B. J. & Gow, N. A. An integrated model of the recognition of *Candida albicans* by the innate immune system. *Nat Rev Microbiol* **6**, 67-78, (2008).
- 63 Saijo, S. *et al.* Dectin-2 recognition of alpha-mannans and induction of Th17 cell differentiation is essential for host defense against *Candida albicans*. *Immunity* **32**, 681-691, (2010).
- 64 Gow, N. A., van de Veerdonk, F. L., Brown, A. J. & Netea, M. G. *Candida albicans* morphogenesis and host defence: discriminating invasion from colonization. *Nat Rev Microbiol* **10**, 112-122, (2012).
- 65 Lee, C. G., Da Silva, C. A., Lee, J. Y., Hartl, D. & Elias, J. A. Chitin regulation of immune responses: an old molecule with new roles. *Curr Opin Immunol* **20**, 684-689, (2008).
- 66 Mora-Montes, H. M. *et al.* Recognition and blocking of innate immunity cells by *Candida albicans* chitin. *Infect Immun* **79**, 1961-1970, (2011).
- 67 Kuhn, D. M. & Vyas, V. K. The *Candida glabrata* adhesin Epa1p causes adhesion, phagocytosis, and cytokine secretion by innate immune cells. *FEMS Yeast Res* **12**, 398-414, (2012).

- 68 Vale-Silva, L., Ischer, F., Leibundgut-Landmann, S. & Sanglard, D. Gain-of-function mutations in *PDR1*, a regulator of antifungal drug resistance in *Candida glabrata*, control adherence to host cells. *Infect Immun* **81**, 1709-1720, (2013).
- 69 Keppler-Ross, S., Douglas, L., Konopka, J. B. & Dean, N. Recognition of yeast by murine macrophages requires mannan but not glucan. *Eukaryot Cell* **9**, 1776-1787, (2010).
- 70 Ifrim, D. C. *et al.* The role of Dectin-2 for host defense against systemic infection with *Candida glabrata*. *Infect Immun*, (2013).
- 71 Chen, C., Pande, K., French, S. D., Tuch, B. B. & Noble, S. M. An iron homeostasis regulatory circuit with reciprocal roles in *Candida albicans* commensalism and pathogenesis. *Cell Host Microbe* **10**, 118-135, (2011).
- 72 Mancuso, G. *et al.* Bacterial recognition by TLR7 in the lysosomes of conventional dendritic cells. *Nat Immunol* **10**, 587-594, (2009).
- 73 Bourgeois, C. *et al.* Conventional dendritic cells mount a type I IFN response against *Candida* spp. requiring novel phagosomal TLR7-mediated IFN-beta signaling. *J Immunol* **186**, 3104-3112, (2011).
- 74 Haas, A. The phagosome: compartment with a license to kill. *Traffic* **8**, 311-330, (2007).
- 75 Underhill, D. M. & Goodridge, H. S. Information processing during phagocytosis. *Nat Rev Immunol* **12**, 492-502, (2012).
- 76 Vieira, O. V., Botelho, R. J. & Grinstein, S. Phagosome maturation: aging gracefully. *Biochem J* **366**, 689-704, (2002).
- 77 Korshunov, S. S. & Imlay, J. A. A potential role for periplasmic superoxide dismutase in blocking the penetration of external superoxide into the cytosol of Gram-negative bacteria. *Mol Microbiol* **43**, 95-106, (2002).
- 78 Babior, B. M. The respiratory burst oxidase. *Curr Opin Hematol* **2**, 55-60, (1995).
- 79 Collette, J. R. & Lorenz, M. C. Mechanisms of immune evasion in fungal pathogens. *Curr Opin Microbiol* **14**, 668-675, (2011).
- 80 Strasser, J. E. *et al.* Regulation of the macrophage vacuolar ATPase and phagosome-lysosome fusion by *Histoplasma capsulatum*. *J Immunol* **162**, 6148-6154, (1999).
- 81 Wellington, M., Dolan, K. & Krysan, D. J. Live *Candida albicans* suppresses production of reactive oxygen species in phagocytes. *Infect Immun* **77**, 405-413, (2009).
- 82 Lorenz, M. C., Bender, J. A. & Fink, G. R. Transcriptional response of *Candida albicans* upon internalization by macrophages. *Eukaryot Cell* **3**, 1076-1087, (2004).
- 83 Villena, S. N. *et al.* Capsular polysaccharides galactoxylomannan and glucuronoxylomannan from *Cryptococcus neoformans* induce macrophage apoptosis mediated by Fas ligand. *Cell Microbiol* **10**, 1274-1285, (2008).
- 84 Alvarez, M. & Casadevall, A. Phagosome extrusion and host-cell survival after *Cryptococcus neoformans* phagocytosis by macrophages. *Curr Biol* **16**, 2161-2165, (2006).

- 85 Roetzer, A., Gratz, N., Kovarik, P. & Schuller, C. Autophagy supports *Candida glabrata* survival during phagocytosis. *Cell Microbiol* **12**, 199-216, (2010).
- 86 Kaur, R., Ma, B. & Cormack, B. P. A family of glycosylphosphatidylinositol-linked aspartyl proteases is required for virulence of *Candida glabrata*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**, 7628-7633, (2007).
- 87 Seider, K. *et al.* The Facultative Intracellular Pathogen *Candida glabrata* Subverts Macrophage Cytokine Production and Phagolysosome Maturation. *J Immunol* **187**, 3072-3086, (2011).
- 88 Roetzer, A. *et al.* Regulation of *Candida glabrata* oxidative stress resistance is adapted to host environment. *FEBS Lett* **585**, 319-327, (2011).
- 89 Nevitt, T. & Thiele, D. J. Host iron withholding demands siderophore utilization for *Candida glabrata* to survive macrophage killing. *PLoS Pathog* **7**, e1001322, (2011).
- 90 Rai, M. N., Balusu, S., Gorityala, N., Dandu, L. & Kaur, R. Functional Genomic Analysis of *Candida glabrata*-Macrophage Interaction: Role of Chromatin Remodeling in Virulence. *PLoS Pathog* **8**, e1002863, (2012).
- 91 Brunke, S. *et al.* *Candida glabrata* tryptophan-based pigment production via the Ehrlich pathway. *Mol Microbiol* **76**, 25-47, (2010).
- 92 Fukuda, Y., Tsai, H. F., Myers, T. G. & Bennett, J. E. Transcriptional Profiling of *Candida glabrata* during Phagocytosis by Neutrophils and in the Infected Mouse Spleen. *Infect Immun*, (2013).
- 93 Seider, K. *et al.* Immune Evasion, Stress Resistance, and Efficient Nutrient Acquisition Are Crucial for Intracellular Survival of *Candida glabrata* within Macrophages. *Eukaryot Cell* **13**, 170-183, (2014).
- 94 Jacobsen, I. D. *et al.* *Candida glabrata* persistence in mice does not depend on host immunosuppression and is unaffected by fungal amino acid auxotrophy. *Infect Immun* **78**, 1066-1077, (2010).
- 95 Li, L. & Dongari-Bagtzoglou, A. Epithelial GM-CSF induction by *Candida glabrata*. *J Dent Res* **88**, 746-751, (2009).
- 96 Schaller, M. *et al.* Infection of human oral epithelia with *Candida* species induces cytokine expression correlated to the degree of virulence. *J Invest Dermatol* **118**, 652-657, (2002).
- 97 Fang, F. C. Antimicrobial actions of reactive oxygen species. *MBio* **2**, (2011).
- 98 Temple, M. D., Perrone, G. G. & Dawes, I. W. Complex cellular responses to reactive oxygen species. *Trends Cell Biol* **15**, 319-326, (2005).
- 99 Briones-Martin-Del-Campo, M. *et al.* The oxidative stress response of the opportunistic fungal pathogen *Candida glabrata*. *Rev Iberoam Micol*, (2013).
- 100 Quinn, M. T. & Gauss, K. A. Structure and regulation of the neutrophil respiratory burst oxidase: comparison with nonphagocyte oxidases. *J Leukoc Biol* **76**, 760-781, (2004).
- 101 Fang, F. C. Antimicrobial reactive oxygen and nitrogen species: concepts and controversies. *Nat Rev Microbiol* **2**, 820-832, (2004).
- 102 Cuellar-Cruz, M. *et al.* High resistance to oxidative stress in the fungal pathogen *Candida glabrata* is mediated by a single catalase, Cta1p, and is

- controlled by the transcription factors Yap1p, Skn7p, Msn2p, and Msn4p. *Eukaryot Cell* **7**, 814-825, (2008).
- 103 Roetzer, A. *et al.* *Candida glabrata* environmental stress response involves *Saccharomyces cerevisiae* MSN2/4 orthologous transcription factors. *Mol Microbiol* **69**, 603-620, (2008).
- 104 Roetzer, A., Gabaldon, T. & Schuller, C. From *Saccharomyces cerevisiae* to *Candida glabrata* in a few easy steps: important adaptations for an opportunistic pathogen. *FEMS Microbiol Lett* **314**, 1-9, (2011).
- 105 Singh, K. K. The *Saccharomyces cerevisiae* Sln1p-Ssk1p two-component system mediates response to oxidative stress and in an oxidant-specific fashion. *Free Radic Biol Med* **29**, 1043-1050, (2000).
- 106 Chauhan, N. *et al.* *Candida albicans* response regulator gene *SSK1* regulates a subset of genes whose functions are associated with cell wall biosynthesis and adaptation to oxidative stress. *Eukaryot Cell* **2**, 1018-1024, (2003).
- 107 Gregori, C. *et al.* The high-osmolarity glycerol response pathway in the human fungal pathogen *Candida glabrata* strain ATCC 2001 lacks a signaling branch that operates in baker's yeast. *Eukaryot Cell* **6**, 1635-1645, (2007).
- 108 Chen, K. H., Miyazaki, T., Tsai, H. F. & Bennett, J. E. The bZip transcription factor Cgap1p is involved in multidrug resistance and required for activation of multidrug transporter gene *CgFLR1* in *Candida glabrata*. *Gene* **386**, 63-72, (2007).
- 109 Okazaki, S., Tachibana, T., Naganuma, A., Mano, N. & Kuge, S. Multistep disulfide bond formation in Yap1p is required for sensing and transduction of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> stress signal. *Mol Cell* **27**, 675-688, (2007).
- 110 Delaunay, A., Pflieger, D., Barrault, M. B., Vinh, J. & Toledano, M. B. A thiol peroxidase is an H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> receptor and redox-transducer in gene activation. *Cell* **111**, 471-481, (2002).
- 111 Byrne, K. P. & Wolfe, K. H. The Yeast Gene Order Browser: combining curated homology and syntenic context reveals gene fate in polyploid species. *Genome Res* **15**, 1456-1461, (2005).
- 112 Fassler, J. S. & West, A. H. Fungal Skn7 stress responses and their relationship to virulence. *Eukaryot Cell* **10**, 156-167, (2011).
- 113 Brown, J. L., Bussey, H. & Stewart, R. C. Yeast Skn7p functions in a eukaryotic two-component regulatory pathway. *Embo J* **13**, 5186-5194, (1994).
- 114 Saijo, T. *et al.* Skn7 is involved in oxidative stress response and virulence of *Candida glabrata*. *Mycopathologia* **169**, 81-90, (2010).
- 115 Orta-Zavalza, E. *et al.* Local silencing controls the oxidative stress response and the multidrug resistance in *Candida glabrata*. *Mol Microbiol* **88**, 1135-1148, (2013).
- 116 Herrero, E., Ros, J., Belli, G. & Cabiscol, E. Redox control and oxidative stress in yeast cells. *Biochim Biophys Acta* **1780**, 1217-1235, (2008).
- 117 Ikner, A. & Shiozaki, K. Yeast signaling pathways in the oxidative stress response. *Mutat Res* **569**, 13-27, (2005).

- 118 Carmel-Harel, O. & Storz, G. Roles of the glutathione- and thioredoxin-dependent reduction systems in the *Escherichia coli* and *Saccharomyces cerevisiae* responses to oxidative stress. *Annu Rev Microbiol* **54**, 439-461, (2000).
- 119 Toledano, M. B., Delaunay-Moisan, A., Outten, C. E. & Igarria, A. Functions and Cellular Compartmentation of the Thioredoxin and Glutathione Pathways in Yeast. *Antioxid Redox Signal*, (2013).
- 120 Toledano, M. B., Kumar, C., Le Moan, N., Spector, D. & Tacnet, F. The system biology of thiol redox system in *Escherichia coli* and yeast: differential functions in oxidative stress, iron metabolism and DNA synthesis. *FEBS Lett* **581**, 3598-3607, (2007).
- 121 Gutierrez-Escobedo, G. [*El papel del glutatión en la respuesta a estrés oxidante del hongo patógeno oportunista Candida glabrata*] PhD thesis, IPICYT, (2013).
- 122 Gutierrez-Escobedo, G., Orta-Zavalza, E., Castano, I. & De Las Penas, A. Role of glutathione in the oxidative stress response in the fungal pathogen *Candida glabrata*. *Curr Genet* **59**, 91-106, (2013).
- 123 Yadav, A. K. *et al.* Glutathione biosynthesis in the yeast pathogens *Candida glabrata* and *Candida albicans*: essential in *C. glabrata*, and essential for virulence in *C. albicans*. *Microbiology* **157**, 484-495, (2011).
- 124 Meister, A. Glutathione, metabolism and function via the gamma-glutamyl cycle. *Life Sci* **15**, 177-190, (1974).
- 125 Ostrosky-Zeichner, L., Casadevall, A., Galgiani, J. N., Odds, F. C. & Rex, J. H. An insight into the antifungal pipeline: selected new molecules and beyond. *Nat Rev Drug Discov* **9**, 719-727, (2010).
- 126 Monk, B. C. & Goffeau, A. Outwitting multidrug resistance to antifungals. *Science* **321**, 367-369, (2008).
- 127 Pappas, P. G. *et al.* Clinical practice guidelines for the management of candidiasis: 2009 update by the Infectious Diseases Society of America. *Clin Infect Dis* **48**, 503-535, (2009).
- 128 Aguado, J. M. *et al.* [Guidelines for the treatment of Invasive Candidiasis and other yeasts. Spanish Society of Infectious Diseases and Clinical Microbiology (SEIMC). 2010 Update]. *Enferm Infecc Microbiol Clin* **29**, 345-361, (2011).
- 129 Odds, F. C., Cheesman, S. L. & Abbott, A. B. Antifungal effects of fluconazole (UK 49858), a new triazole antifungal, in vitro. *J Antimicrob Chemother* **18**, 473-478, (1986).
- 130 Hitchcock, C. A., Pye, G. W., Troke, P. F., Johnson, E. M. & Warnock, D. W. Fluconazole resistance in *Candida glabrata*. *Antimicrob Agents Chemother* **37**, 1962-1965, (1993).
- 131 Pfaller, M. A. *et al.* Variation in susceptibility of bloodstream isolates of *Candida glabrata* to fluconazole according to patient age and geographic location in the United States in 2001 to 2007. *J Clin Microbiol* **47**, 3185-3190, (2009).
- 132 Bennett, J. E., Izumikawa, K. & Marr, K. A. Mechanism of increased fluconazole resistance in *Candida glabrata* during prophylaxis. *Antimicrob Agents Chemother* **48**, 1773-1777, (2004).

- 133 Pfaller, M. A. *et al.* Variation in susceptibility of bloodstream isolates of *Candida glabrata* to fluconazole according to patient age and geographic location. *J Clin Microbiol* **41**, 2176-2179, (2003).
- 134 Pfaller, M. A. Antifungal drug resistance: mechanisms, epidemiology, and consequences for treatment. *Am J Med* **125**, S3-13, (2012).
- 135 Cannon, R. D. *et al.* Efflux-mediated antifungal drug resistance. *Clin Microbiol Rev* **22**, 291-321, Table of Contents, (2009).
- 136 Sanglard, D., Ischer, F. & Bille, J. Role of ATP-binding-cassette transporter genes in high-frequency acquisition of resistance to azole antifungals in *Candida glabrata*. *Antimicrob Agents Chemother* **45**, 1174-1183, (2001).
- 137 Sanglard, D., Ischer, F., Calabrese, D., Majcherczyk, P. A. & Bille, J. The ATP binding cassette transporter gene *CgCDR1* from *Candida glabrata* is involved in the resistance of clinical isolates to azole antifungal agents. *Antimicrob Agents Chemother* **43**, 2753-2765, (1999).
- 138 Izumikawa, K., Kakeya, H., Tsai, H. F., Grimberg, B. & Bennett, J. E. Function of *Candida glabrata* ABC transporter gene, *PDH1*. *Yeast* **20**, 249-261, (2003).
- 139 Torelli, R. *et al.* The ATP-binding cassette transporter-encoding gene *CgSNQ2* is contributing to the *CgPDR1*-dependent azole resistance of *Candida glabrata*. *Mol Microbiol* **68**, 186-201, (2008).
- 140 Vermitsky, J. P. & Edlind, T. D. Azole resistance in *Candida glabrata*: coordinate upregulation of multidrug transporters and evidence for a Pdr1-like transcription factor. *Antimicrob Agents Chemother* **48**, 3773-3781, (2004).
- 141 Tsai, H. F., Krol, A. A., Sarti, K. E. & Bennett, J. E. *Candida glabrata* *PDR1*, a transcriptional regulator of a pleiotropic drug resistance network, mediates azole resistance in clinical isolates and petite mutants. *Antimicrob Agents Chemother* **50**, 1384-1392, (2006).
- 142 Vermitsky, J. P. *et al.* Pdr1 regulates multidrug resistance in *Candida glabrata*: gene disruption and genome-wide expression studies. *Mol Microbiol* **61**, 704-722, (2006).
- 143 Thakur, J. K. *et al.* A nuclear receptor-like pathway regulating multidrug resistance in fungi. *Nature* **452**, 604-609, (2008).
- 144 Paul, S., Schmidt, J. A. & Moye-Rowley, W. S. Regulation of the CgPdr1 transcription factor from the pathogen *Candida glabrata*. *Eukaryot Cell*, (2010).
- 145 Delahodde, A., Delaveau, T. & Jacq, C. Positive autoregulation of the yeast transcription factor Pdr3p, which is involved in control of drug resistance. *Mol Cell Biol* **15**, 4043-4051, (1995).
- 146 Noble, J. A. *et al.* *STB5* Is a Negative Regulator of Azole Resistance in *Candida glabrata*. *Antimicrob Agents Chemother* **57**, 959-967, (2013).
- 147 Prunuske, A. J., Waltner, J. K., Kuhn, P., Gu, B. & Craig, E. A. Role for the molecular chaperones Zuo1 and Ssz1 in quorum sensing via activation of the transcription factor Pdr1. *Proc Natl Acad Sci U S A* **109**, 472-477, (2012).

- 148 Ferrari, S. *et al.* Gain of function mutations in *CgPDR1* of *Candida glabrata*  
not only mediate antifungal resistance but also enhance virulence. *PLoS*  
*Pathog* **5**, e1000268, (2009).
- 149 Ferrari, S., Sanguinetti, M., Torelli, R., Posteraro, B. & Sanglard, D.  
Contribution of *CgPDR1*-regulated genes in enhanced virulence of azole-  
resistant *Candida glabrata*. *PLoS ONE* **6**, e17589, (2011).
- 150 Caudle, K. E. *et al.* Genomewide Expression Profile Analysis of the *Candida*  
*glabrata* Pdr1 Regulon. *Eukaryot Cell* **10**, 373-383, (2011).
- 151 Anderson, J. B. Evolution of antifungal-drug resistance: mechanisms and  
pathogen fitness. *Nat Rev Microbiol* **3**, 547-556, (2005).
- 152 Abbes, S. *et al.* Interactions between copy number and expression level of  
genes involved in fluconazole resistance in *Candida glabrata*. *Front Cell*  
*Infect Microbiol* **3**, 74, (2013).
- 153 Polakova, S. *et al.* Formation of new chromosomes as a virulence  
mechanism in yeast *Candida glabrata*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**, 2688-  
2693, (2009).
- 154 Shin, J. H. *et al.* Changes in karyotype and azole susceptibility of sequential  
bloodstream isolates from patients with *Candida glabrata* candidemia. *J Clin*  
*Microbiol* **45**, 2385-2391, (2007).
- 155 Kaur, R., Castano, I. & Cormack, B. P. Functional genomic analysis of  
fluconazole susceptibility in the pathogenic yeast *Candida glabrata*: roles of  
calcium signaling and mitochondria. *Antimicrob Agents Chemother* **48**,  
1600-1613, (2004).
- 156 Brun, S. *et al.* Relationships between respiration and susceptibility to azole  
antifungals in *Candida glabrata*. *Antimicrob Agents Chemother* **47**, 847-853,  
(2003).
- 157 Brun, S. *et al.* Biological consequences of petite mutations in *Candida*  
*glabrata*. *J Antimicrob Chemother* **56**, 307-314, (2005).
- 158 Ferrari, S. *et al.* Loss of mitochondrial functions associated with azole  
resistance in *Candida glabrata* also results in enhanced virulence in mice.  
*Antimicrob Agents Chemother*, (2011).
- 159 Sauve, A. A., Wolberger, C., Schramm, V. L. & Boeke, J. D. The  
biochemistry of sirtuins. *Annu Rev Biochem* **75**, 435-465, (2006).
- 160 Derbyshire, M. K., Weinstock, K. G. & Strathern, J. N. *HST1*, a new member  
of the *SIR2* family of genes. *Yeast* **12**, 631-640, (1996).
- 161 Ma, B. *et al.* High-affinity transporters for NAD<sup>+</sup> precursors in *Candida*  
*glabrata* are regulated by Hst1 and induced in response to niacin limitation.  
*Mol Cell Biol* **29**, 4067-4079, (2009).
- 162 Froyd, C. A. & Rusche, L. N. The duplicated deacetylases Sir2 and Hst1  
subfunctionalized by acquiring complementary inactivating mutations. *Mol*  
*Cell Biol*, (2011).
- 163 Mead, J. *et al.* Swapping the gene-specific and regional silencing  
specificities of the Hst1 and Sir2 histone deacetylases. *Mol Cell Biol* **27**,  
2466-2475, (2007).
- 164 Moazed, D., Kistler, A., Axelrod, A., Rine, J. & Johnson, A. D. Silent  
information regulator protein complexes in *Saccharomyces cerevisiae*: a  
SIR2/SIR4 complex and evidence for a regulatory domain in SIR4 that

- inhibits its interaction with SIR3. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**, 2186-2191, (1997).
- 165 Tanny, J. C., Dowd, G. J., Huang, J., Hilz, H. & Moazed, D. An enzymatic activity in the yeast Sir2 protein that is essential for gene silencing. *Cell* **99**, 735-745, (1999).
- 166 McCord, R. *et al.* Rfm1, a novel tethering factor required to recruit the Hst1 histone deacetylase for repression of middle sporulation genes. *Mol Cell Biol* **23**, 2009-2016, (2003).
- 167 Xie, J. *et al.* Sum1 and Hst1 repress middle sporulation-specific gene expression during mitosis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Embo J* **18**, 6448-6454, (1999).
- 168 Strahl-Bolsinger, S., Hecht, A., Luo, K. & Grunstein, M. SIR2 and SIR4 interactions differ in core and extended telomeric heterochromatin in yeast. *Genes Dev* **11**, 83-93, (1997).
- 169 Murphy, G. A. *et al.* The Sir4 C-terminal coiled coil is required for telomeric and mating type silencing in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Mol Biol* **334**, 769-780, (2003).
- 170 Straight, A. F. *et al.* Net1, a Sir2-associated nucleolar protein required for rDNA silencing and nucleolar integrity. *Cell* **97**, 245-256, (1999).
- 171 Sutton, A. *et al.* A novel form of transcriptional silencing by Sum1-1 requires Hst1 and the origin recognition complex. *Mol Cell Biol* **21**, 3514-3522, (2001).
- 172 Bedalov, A., Hirao, M., Posakony, J., Nelson, M. & Simon, J. A. NAD<sup>+</sup>-dependent deacetylase Hst1p controls biosynthesis and cellular NAD<sup>+</sup> levels in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* **23**, 7044-7054, (2003).
- 173 Li, M. *et al.* Thiamine biosynthesis in *Saccharomyces cerevisiae* is regulated by the NAD<sup>+</sup>-dependent histone deacetylase Hst1. *Mol Cell Biol* **30**, 3329-3341, (2010).
- 174 Zill, O. A. & Rine, J. Interspecies variation reveals a conserved repressor of alpha-specific genes in *Saccharomyces* yeasts. *Genes Dev* **22**, 1704-1716, (2008).
- 175 Ramirez-Zavaleta, C. Y., Salas-Delgado, G. E., De Las Penas, A. & Castano, I. Subtelomeric silencing of the MTL3 locus of *Candida glabrata* requires yKu70, yKu80, and Rif1 proteins. *Eukaryot Cell* **9**, 1602-1611, (2010).
- 176 Hirao, M. *et al.* Identification of selective inhibitors of NAD<sup>+</sup>-dependent deacetylases using phenotypic screens in yeast. *J Biol Chem* **278**, 52773-52782, (2003).
- 177 Cormack, B. P. & Falkow, S. Efficient homologous and illegitimate recombination in the opportunistic yeast pathogen *Candida glabrata*. *Genetics* **151**, 979-987, (1999).
- 178 Fidel, P. L., Jr., Cutright, J. L., Tait, L. & Sobel, J. D. A murine model of *Candida glabrata* vaginitis. *J Infect Dis* **173**, 425-431, (1996).
- 179 Brachmann, C. B. *et al.* Designer deletion strains derived from *Saccharomyces cerevisiae* S288C: a useful set of strains and plasmids for PCR-mediated gene disruption and other applications. *Yeast* **14**, 115-132, (1998).

- 180 Martin-del-Campo, M. B. [*Construcción de un vector para clonar productos de PCR*] MSc thesis, IPICYT, (2008).
- 181 Ausubel, F. M., Brent, R., Kingston, R.E., Moore, D.D., Seidman, J.G., Smith, J.A., and Struhl, K. in *Current Protocols* (John Wiley Current Protocols, New York, 1987).
- 182 Sherman, F., G. R. Fink, and J. B. Hicks. in *A Cold Spring Harbor Laboratory Course Manual* (ed Cold Sping Harbor Laboratory Press) 231 (John Inglis, New York, 1986).
- 183 Castano, I. *et al.* Tn7-based genome-wide random insertional mutagenesis of *Candida glabrata*. *Genome Res* **13**, 905-915, (2003).
- 184 CLSI. in *NCCLS document M27-A2* 31 (NCCLS, 940 West Valley Road, Wayne, PA, USA, 2002).
- 185 Murakami, C. J., Burtner, C. R., Kennedy, B. K. & Kaeberlein, M. A method for high-throughput quantitative analysis of yeast chronological life span. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* **63**, 113-121, (2008).
- 186 Noble, S. M. & Johnson, A. D. Strains and strategies for large-scale gene deletion studies of the diploid human fungal pathogen *Candida albicans*. *Eukaryot Cell* **4**, 298-309, (2005).
- 187 Orta-Zavalza, E., Briones-Martin-del-Campo, M., Castano, I. & De Las Penas, A. Catalase activity assay in *Candida glabrata*. (2013).
- 188 MacLean, M., Harris, N. & Piper, P. W. Chronological lifespan of stationary phase yeast cells; a model for investigating the factors that might influence the ageing of postmitotic tissues in higher organisms. *Yeast* **18**, 499-509, (2001).
- 189 Kaeberlein, M. & Powers, R. W., 3rd. Sir2 and calorie restriction in yeast: a skeptical perspective. *Ageing Res Rev* **6**, 128-140, (2007).
- 190 Kaeberlein, M., Kirkland, K. T., Fields, S. & Kennedy, B. K. Sir2-independent life span extension by calorie restriction in yeast. *PLoS Biol* **2**, E296, (2004).
- 191 EUCAST. EUCAST definitive document EDef 7.1: method for the determination of broth dilution MICs of antifungal agents for fermentative yeasts. *Clin Microbiol Infect* **14**, 398-405, (2008).
- 192 Pfaller, M. A. *et al.* Comparison of the broth microdilution (BMD) method of the European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing with the 24-hour CLSI BMD method for testing susceptibility of *Candida* species to fluconazole, posaconazole, and voriconazole by use of epidemiological cutoff values. *J Clin Microbiol* **49**, 845-850, (2011).
- 193 Canas-Villamar, I. [*Caracterización de la respuesta al estrés oxidante por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en la levadura patógen oportunistá Candida glabrata*] MSc thesis, IPICYT, (2007).
- 194 Prasad, R. & Goffeau, A. Yeast ATP-binding cassette transporters conferring multidrug resistance. *Annu Rev Microbiol* **66**, 39-63, (2012).
- 195 Bateman, A. *et al.* The Pfam protein families database. *Nucleic Acids Res* **32**, D138-141, (2004).
- 196 Mulford, K. E. & Fassler, J. S. Association of the Skn7 and Yap1 transcription factors in the *Saccharomyces cerevisiae* oxidative stress response. *Eukaryot Cell* **10**, 761-769, (2011).

- 197 Li, L., Redding, S. & Dongari-Bagtzoglou, A. *Candida glabrata*: an emerging oral opportunistic pathogen. *J Dent Res* **86**, 204-215, (2007).
- 198 Bennett, J. E., Izumikawa, K. & Marr, K. A. Mechanism of increased fluconazole resistance in *Candida glabrata* during prophylaxis. *Antimicrob Agents Chemother* **48**, 1773-1777, (2004).
- 199 Berrouane, Y. F., Herwaldt, L. A. & Pfaller, M. A. Trends in antifungal use and epidemiology of nosocomial yeast infections in a university hospital. *J Clin Microbiol* **37**, 531-537, (1999).
- 200 Klepser, M. E. *Candida* resistance and its clinical relevance. *Pharmacotherapy* **26**, 68S-75S, (2006).
- 201 Morschhauser, J. Regulation of multidrug resistance in pathogenic fungi. *Fungal Genet Biol* **47**, 94-106, (2010).
- 202 Min, J., Landry, J., Sternglanz, R. & Xu, R. M. Crystal structure of a SIR2 homolog-NAD complex. *Cell* **105**, 269-279, (2001).
- 203 Zhao, K., Chai, X., Clements, A. & Marmorstein, R. Structure and autoregulation of the yeast Hst2 homolog of Sir2. *Nat Struct Biol* **10**, 864-871, (2003).
- 204 Foloppe, N. & Nilsson, L. The glutaredoxin -C-P-Y-C- motif: influence of peripheral residues. *Structure* **12**, 289-300, (2004).
- 205 Winter, E. The Sum1/Ndt80 transcriptional switch and commitment to meiosis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol Mol Biol Rev* **76**, 1-15, (2012).
- 206 Ahmed, N. T., Bungard, D., Shin, M. E., Moore, M. & Winter, E. The Ime2 protein kinase enhances the disassociation of the Sum1 repressor from middle meiotic promoters. *Mol Cell Biol* **29**, 4352-4362, (2009).