

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

POSGRADO EN CIENCIAS EN BIOLOGIA MOLECULAR

**“El papel del Glutathión en la respuesta a estrés
oxidante del hongo patógeno oportunista
Candida glabrata”**

Tesis que presenta

Ma Guadalupe Gutiérrez Escobedo

Para obtener el grado de

Doctora en Ciencias en Biología Molecular

Director de la Tesis:

Dr. Alejandro De Las Peñas Nava

San Luis Potosí, S.L.P., Febrero 2013

Constancia de aprobación de la tesis

La tesis “**El papel del glutatión en la respuesta a estrés oxidante del hongo patógeno *Candida glabrata***” presentada para obtener el Grado de Doctora en Ciencias en Biología Molecular fue elaborada por **Ma Guadalupe Gutiérrez Escobedo** y aprobada el **26 de febrero del 2013** 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 Ruíz
(Miembro del Comité Tutorial)

Dra. María del Carmen González Castillo
(Miembro del Comité Tutorial)

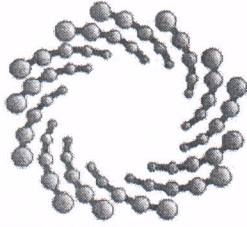
Dr. Carlos Barajas López
(Miembro del Comité Tutorial)

Dra. Irene Beatriz Castaño Navarro
(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, 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 con No. de registro 48580 y del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A. C.



IPICYT

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 052 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 26 días del mes de febrero del año 2013, se reunió a las 16:00 horas en las instalaciones del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C., el Jurado integrado por:

| | | |
|--|------------------------|---------------|
| Dr. Carlos Barajas López | Presidente | IPICYT |
| Dra. Lina Raquel Riego Ruiz | Secretaria | IPICYT |
| Dr. Alejandro De Las Peñas Nava | Sinodal | IPICYT |
| Dra. María del Carmen González Castillo | Sinodal externo | UASLP |

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

DOCTORA EN CIENCIAS EN BIOLOGÍA MOLECULAR

sustentó la C.

Ma. Guadalupe Gutiérrez Escobedo

sobre la Tesis intitulada:

El papel del glutatión en la respuesta a estrés oxidante del hongo patógeno Candida glabrata

que se desarrolló bajo la dirección de

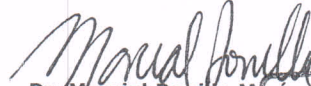
Dr. Alejandro De Las Peñas Nava

El Jurado, después de deliberar, determinó

APROBARLA

Dándose por terminado el acto a las 17:20 horas, procediendo a la firma del Acta los integrantes del Jurado. Dando fe el Secretario Académico del Instituto.

A petición de la interesada y para los fines que a la misma convengan, se extiende el presente documento en la ciudad de San Luis Potosí, S.L.P., México, a los 26 días del mes de febrero de 2013.


Dr. Marcial Borja Marín
Secretario Académico


Mtra. Ivonne Lizette Cuevas Vélez
Jefa del Departamento del Posgrado



Dedicatorias

Para:

Carmen, mi pequeña princesa. Eres la inspiración y el pilar de todo lo que hago.

Eduardo, por tu fuerza, comprensión y apoyo.

Mi mamá, Carmen, por su ejemplo, sus valores y su presencia en todas las etapas de mi vida.

Mi papá, Cruz y mis hermanos, Claudia, Octavio y Cruz, por su respaldo y cariño que me acompañan siempre.

Mi hermana Luz por su apoyo y ayuda incondicionales, esto fue posible gracias a ti.

Agradecimientos

A:

Dr. Alejandro De Las Peñas Nava y Dra. Irene Beatriz Castaño Navarro por su confianza, sus conocimientos, sus consejos, su infinita paciencia y su valioso apoyo.

Compañeros de laboratorio de Microbiología Molecular, especialmente Marce, Jacky y Emmanuel por su cariño y por compartir los buenos y malos momentos.

Gloria López por su apoyo en los momentos difíciles.

Dra. Lina Raquel Riego Ruiz, Dra. María del Carmen González Castillo y Dr. Carlos Barajas López por sus valiosas aportaciones a este trabajo.

Dra. Gloria Patricia Pérez Cornejo, Dr. Jorge Arreola Gómez y Q.F.B. Carmen Yudith Hernández Carballo por su ayuda en los ensayos de exposición a macrófagos.

Dra. Ana Paulina Barba De La Rosa, M. en C. Alberto Barrera Pacheco, M. en C. José Luis Martínez Salgado y Dr. José Ángel Huerta Ocampo por su ayuda en la cuantificación de prolina y extracción de proteínas de membrana.

IPICYT por las facilidades otorgadas para realizar este trabajo.

CONACYT por la beca que me otorgó y que hizo posible este trabajo.

Contenido

| | Página |
|--------------------------------------|--------|
| 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 |
| Resumen | xiv |
| Abstract | xv |

INTRODUCCIÓN

| | |
|--|----|
| 1. <i>Candida glabrata</i> | 1 |
| 2. Especies reactivas, estrés oxidante y homeostasis redox | 3 |
| 2.1. Sistema tiorredoxina | 5 |
| 2.2. Sistema GSH | 5 |
| 3. Control de la respuesta a estrés oxidante | 11 |
| 4. Glutación y estrés por metales pesados: cadmio | 13 |
| 5. Transporte de glutación en levaduras | 15 |
| 6. Metabolismo de la prolina | 16 |

MATERIALES Y MÉTODOS

| | |
|--|-----------|
| 1. Medios de cultivo y cepas | 18 |
| 1.1. Medios de cultivo para bacterias | 18 |
| 1.2. Cepas de bacterias | 18 |
| 1.3. Medios de cultivo para levaduras | 19 |
| 1.4. Cepas de levaduras | 20 |
| 2. Plásmidos | 25 |
| 3. Oligonucleótidos | 27 |
| 4. Transformación genética de <i>C. glabrata</i> | 31 |
| 5. Ensayos de sensibilidad | 32 |
| 6. Curvas de crecimiento | 32 |
| 7. Evaluación de la pérdida de plásmidos | 33 |
| 8. Cuantificación de GSH | 33 |
| 9. Análisis bioinformáticos | 33 |
| 10. Transformación de <i>E. coli</i> | 34 |
| 11. Extracción de ADN genómico de <i>C. glabrata</i> | 34 |
| 12. Precipitación de ADN con fenol:cloroformo:alcohol isoamílico y precipitación con etanol | 35 |
| 13. Construcción de mutantes de <i>C. glabrata</i> | 35 |
| 14. Cuantificación de ADN | 35 |
| 15. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) | 36 |
| 16. Cuantificación de prolina | 36 |
| 17. Generación de protoplastos de <i>C. glabrata</i> | 37 |

| | |
|--|-----|
| 18. Purificación de proteínas de membrana de <i>C. glabrata</i> por centrifugación en gradiente de sacarosa | 37 |
| 19. Determinación del tiempo de vida cronológica de <i>C. glabrata</i> | 38 |
| 20. Análisis estadísticos | 39 |
| RESULTADOS | |
| 1. The role of glutathione in the oxidative stress response in the fungal pathogen <i>Candida glabrata</i> . | 40 |
| RESULTADOS ADICIONALES | |
| 1. Esencialidad del gen <i>GSH1</i> | 69 |
| 2. Análisis fenotípico de las mutantes deficientes en la síntesis de GSH | 71 |
| 2.1. Crecimiento en medio YPD | 71 |
| 2.2. Crecimiento en YNB. Evaluación de los requerimientos de GSH y L-Pro | 72 |
| 2.3. Crecimiento en diferentes fuentes de carbono | 73 |
| 2.4. Funcionalidad del alelo <i>pro2-4</i> | 74 |
| 2.5. Competencia entre el transporte de GSH y L-Pro | 77 |
| 3. GSH y resistencia a fluconazol | 79 |
| DISCUSIÓN | |
| 1. La supresión de <i>pro2-4</i> en ausencia de GSH | 82 |
| 2. Resistencia a fluconazol | 82 |
| 3. Auxotrofía por prolina de la mutante <i>gsh1Δ pro2-4</i> | 84 |
| 4. Transporte de GSH en <i>C. glabrata</i> | 84 |
| 5. <i>C. glabrata</i> y su resistencia a cadmio | 86 |
| FIGURAS ADICIONALES | 88 |
| REFERENCIAS | 127 |

Lista de tablas

| | |
|---|----|
| Tabla 1. Comparación del sistema de homeostasis redox de <i>S. cerevisiae</i> versus <i>C. glabrata</i> . | 7 |
| Tabla 2. Comparación del metabolismo de la prolina de <i>S. cerevisiae</i> versus <i>C. glabrata</i> | 17 |
| Tabla 3. Cepas de <i>Escherichia coli</i> | 18 |
| Tabla 4. Cepas de <i>Candida glabrata</i> | 20 |
| Tabla 5. Plásmidos | 25 |
| Tabla 6. Oligonucleótidos usados en este trabajo | 27 |

Lista de figuras

| | |
|---|----|
| Figura 1. El sistema redox tiol citoplasmático consiste del sistema Trx (tioredoxina) y el sistema GSH (glutación)..... | 4 |
| Figura 2. Estructura del GSH. | 8 |
| Figura 3. Biosíntesis de GSH. | 9 |
| Figura 4. Inactivación de cadmio por medio de GSH en <i>S. cerevisiae</i> | 14 |
| Figura 5. Rutas biosintéticas de la prolina..... | 16 |
| Figura 6. El gen <i>GSH1</i> es un gen esencial. | 69 |
| Figura 7. La presencia de <i>ScOPT1</i> permite interrumpir el gen <i>GSH1</i> en <i>C. glabrata</i> | 70 |
| Figura 8. Análisis del crecimiento en medio YPD líquido. | 71 |
| Figura 9. Análisis del crecimiento en medio YNB líquido. | 72 |
| Figura 10. Análisis del crecimiento en diferentes fuentes de carbono. | 73 |
| Figura 11. Análisis de la funcionalidad del alelo <i>pro2-4</i> para la biosíntesis de prolina. | 74 |
| Figura 12. El requerimiento de prolina en la mutante <i>gsh1Δ pro2-4</i> se mantiene aún cuando se reconstituye el gen <i>GSH1</i> en su locus nativo y se elimina cuando se complementa con una copia del gen <i>PRO2</i> silvestre..... | 75 |
| Figura 13. En la mutante <i>pro2Δ</i> se elimina la auxotrofia a prolina expresando de manera episomal el alelo silvestre <i>PRO2</i> o el alelo <i>pro2-4</i> | 76 |
| Figura 14. La presencia de prolina afecta la toma de GSH. | 77 |
| Figura 15. Análisis del crecimiento de la mutante <i>pro2-4</i> durante varios días de crecimiento. | 78 |
| Figura 16. La mutante <i>GSH1 pro2-4</i> es más resistente a fluconazol que la cepa silvestre y la resistencia es independiente de los genes <i>PDRs</i> | 79 |
| Figura 17. Análisis del crecimiento en medio YNB y medios reducidos con o sin GSH. | 88 |
| Figura 18. Análisis del contenido de GSH intracelular durante el crecimiento en medio rico YPD. | 90 |

| | |
|--|-----|
| Figura 19. Análisis del contenido de GSH intracelular en medio YNB y YNB _r N con o sin GSH. | 91 |
| Figura 20. La mutante <i>GSH1 pro2-4</i> contiene la misma cantidad de GSH intracelular que la cepa silvestre BG14. | 93 |
| Figura 21. La mutante <i>GSH1 pro2-4</i> es auxótrofa de prolina. | 94 |
| Figura 22. Análisis del crecimiento de la mutante <i>pro2Δ</i> | 95 |
| Figura 23. Fenotipos de la mutante <i>gsh2Δ pro2Δ</i> | 96 |
| Figura 24. Fenotipos de la mutante <i>ttr1Δ</i> | 98 |
| Figura 25. Análisis del crecimiento de la mutante <i>gsh2Δ ttr1Δ</i> en diferentes medios. | 100 |
| Figura 26. Fenotipos de la mutante <i>cta1Δ ttr1Δ</i> | 101 |
| Figura 27. Fenotipos de la mutante <i>yor1Δ</i> | 103 |
| Figura 28. Análisis del crecimiento de la mutante <i>dug2Δ</i> | 105 |
| Figura 29. El producto del gen <i>PRC1</i> no participa en la resistencia a cadmio en <i>C. glabrata</i> | 106 |
| Figura 30. Cuantificación de prolina en cultivos crecidos en YPD. | 107 |
| Figura 31. Cuantificación de GSX intracelular y extracelular de cultivos de 8hs suplementados con GSH 0.1mM. | 109 |
| Figura 32. Cuantificación de GSX intracelular y extracelular de cultivos de 24hs suplementados con GSH 0.1mM. | 111 |
| Figura 33. Cuantificación de GSX intracelular y extracelular de cultivos de 8hs suplementados con GSH 0.5 mM. | 113 |
| Figura 34. Cuantificación de GSX intracelular y extracelular de cultivos de 24hs suplementados con GSH 0.5 mM. | 115 |
| Figura 35. Cuantificación de GSX intracelular y extracelular de cultivos de 24hs suplementados con GSH 0.05 mM. | 117 |
| Figura 36. Purificación de proteínas de membrana de <i>Candida glabrata</i> | 118 |
| Figura 37. Exposición a sulfato de cadmio de varias mutantes de <i>Candida glabrata</i> en diferentes fases de crecimiento. | 119 |
| Figura 38. Exposición a fluconazol de varias mutantes de <i>Candida glabrata</i> en fase | |

| | |
|---|------------|
| estacionaria. | 120 |
| Figura 39. Exposición a H₂O₂ de varias mutantes de <i>Candida glabrata</i> en diferentes fases de crecimiento. | 121 |
| Figura 40. Exposición a menadiona de varias mutantes de <i>Candida glabrata</i> en fase estacionaria. | 122 |
| Figura 41. Exposición a cloruro de zinc en fase estacionaria. | 123 |
| Figura 42. Análisis de la resistencia a fluconazol en medio CAA de diferentes cepas en fase estacionaria crecidas en medio sin GSH..... | 124 |
| Figura 43. Análisis de la resistencia a fluconazol en medio CAA de diferentes cepas en fase estacionaria crecidas en medio con GSH 0.5mM. | 125 |

Resumen

El papel del glutatión en la respuesta a estrés oxidante del hongo patógeno *Candida glabrata*

Candida glabrata es un hongo patógeno oportunista, en EUA se encuentra en el 18 a 26% de las candidiasis sistémicas. *C. glabrata* tiene una fuerte respuesta a estrés oxidante y en este trabajo caracterizamos el papel del glutatión (GSH), un tiol esencial que se requiere para mantener el equilibrio redox celular y en la eliminación de iones metálicos. El GSH se sintetiza a partir de ácido glutámico, cisteína y glicina mediante dos reacciones secuenciales donde intervienen las enzimas Gsh1 (gama glutamil cisteína sintetasa) y Gsh2 (glutatión sintetasa). En primer lugar hicimos un escrutinio para encontrar mutaciones supresoras que permitieran el crecimiento en ausencia del gen *GSH1* (*gsh1Δ*) y encontramos una única mutación en el gen *PRO2* (*pro2-4*), que codifica para la enzima γ -glutamil fosfato reductasa que cataliza la segunda reacción en la ruta de biosíntesis de la prolina. Encontramos que el GSH es importante en la respuesta a estrés oxidante ya que las mutantes *gsh1Δ pro2-4* and *gsh2Δ* son más sensibles a estrés generado por H₂O₂ y menadiona. También se requiere para la tolerancia a cadmio. En ausencia de las enzimas Gsh1 y Gsh2 las células mueren rápidamente en fase estacionaria. Además, a pesar de que *C. glabrata* no contiene el ortólogo al transportador de GSH ScOpt1/Hgt1 nuestros datos genéticos y bioquímicos muestran que las mutantes *gsh1Δ pro2-4* and *gsh2Δ* pueden incorporar GSH del medio. Finalmente, reportamos que los sistemas GSH y tiorredoxina, el segundo sistema redox celular, no son esenciales para la respuesta de adaptación a H₂O₂ independiente de la catalasa.

Palabras clave: *Candida glabrata*, glutatión, tolerancia a cadmio, supresora *PRO2*, estrés oxidante, catalasa, tiorredoxina.

Abstract

The role of glutathione in the oxidative stress response in the fungal pathogen *Candida glabrata*

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 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*Δ 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 oxidative stress response since the *gsh1*Δ *pro2-4* and *gsh2*Δ mutant strains are more sensitive to oxidative stress generated by H₂O₂ and menadione. GSH is also required for Cadmium (Cd) tolerance. In the absence of both Gsh1 and Gsh2, cells die rapidly in stationary phase. Furthermore, *C. glabrata* does not contain the *Saccharomyces cerevisiae* high affinity GSH transporter orthologue, ScOpt1/Hgt1, however our genetic and biochemical experiments show that the *gsh1*Δ *pro2-4* and *gsh2*Δ 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 H₂O₂.

Key words: *Candida glabrata*, glutathione, cadmium tolerance, *PRO2* suppressor, oxidative stress, catalase, thioredoxin.

INTRODUCCI3N

1. *Candida glabrata*

C. glabrata es una levadura haploide no dim3rfica que forma parte de la flora normal de individuos sanos. En las 3ltimas d3cadas ha emergido como la segunda levadura pat3gena m3s prevalente despu3s de *Candida albicans* debido al uso de fluconazol como agente profil3ctico (Li, *et al.*, 2007, Pfaller & Diekema, 2007, Presterl, *et al.*, 2007). Tanto *C. albicans* como *C. glabrata* cambian de comensales a pat3genos oportunistas cuando el hospedero presenta inmunosupresi3n, como sucede en pacientes con c3ncer, diabetes, trasplantados o en etapa senil (Malani, *et al.*, 2005).

Factores de virulencia en *C. glabrata*

Se han identificado varios factores de virulencia en *C. glabrata*:

1. Adherencia. *C. glabrata* se adhiere a las c3lulas epiteliales del hospedero mediante prote3nas de pared celular llamadas adhesinas. Las adhesinas se unen covalentemente a la pared celular por medio de un dominio GPI. Las adhesinas est3n codificadas en la familia de los genes *EPA* (Kaur, *et al.*, 2005) (De Las Penas, *et al.*, 2003).

2. Aspartil proteasas. *C. glabrata* remodela su pared celular mediante yapsinas (aspartil proteasas ancladas a la pared por su dominio GPI). Estas aspartil proteasas est3n involucradas en su sobrevivencia en macr3fago (Kaur, *et al.*, 2007).

3. Ace2. El gen *ACE2* codifica para el factor transcripcional Ace2 cuya ausencia genera defectos en la separaci3n de las c3lulas hijas y hace a la cepa mutante hipervirulenta (Kamran, *et al.*, 2004).

4. Rearreglos cromosomales. Los rearreglos cromosomales se relacionan directamente con la respuesta a las condiciones ambientales a las que se halla expuesta. Los rearreglos m3s comunes son fusiones cromos3micas, circularizaciones, translocaciones no rec3procas y la formaci3n de mini cromosomas. Los cromosomas que presentan estos arreglos son aquellos que contienen genes implicados en la interacci3n de *C. glabrata* con su hospedero: transportadores tipo ABC, aspartil proteasas, proteasas y fosfolipasa B, entre otros. Este fen3meno proporciona a la levadura un gran potencial para adaptarse dentro de su hospedero (Polakova, *et al.*, 2009).

5. Resistencia al ataque por c3lulas fagoc3ticas. La primera l3nea de defensa contra pat3genos son las c3lulas fagoc3ticas del hospedero y *C. glabrata* puede sobrevivir e incluso replicarse dentro de los macr3fagos. Cuando *C. glabrata* es fagocitada reprograma sus v3as metab3licas: Induce genes que codifican para enzimas involucradas en β -oxidaci3n, el ciclo del glioxilato y gluconeog3nesis (Kaur, *et al.*, 2007); induce la catalasa que se concentra en los peroxisomas, los cuales se incrementan tempranamente durante la fagocitosis y, posteriormente, hay pexofagia para reciclar los componentes internos (Roetzer, *et al.*, 2010). *C. glabrata* evita la maduraci3n del fagosoma de tal manera que puede mantenerse y replicarse en este organelo hasta que el macr3fago se lisa y libera a la levadura (Seider, *et al.*, 2011).

6. Resistencia a compuestos az3licos. *C. glabrata* es intr3nicamente resistente a compuestos az3licos usados como antif3ngicos. En presencia de estos f3rmacos, *C. glabrata* induce genes que codifican para transportadores tipo ABC (*CDR1*, *CDR2* y *SNQ2*) los cuales expulsan hacia el exterior el xenobi3tico presente en el interior de la c3lula y al gen *ERG11* (que codifica para la enzima lanosterol desmetilasa, el blanco de los compuestos az3licos) (Tsai, *et al.*, 2006). Otro mecanismo de resistencia son las mutaciones que generan ganancia de funci3n en el gen *PDR1*, el factor de transcripci3n que induce la expresi3n de los genes *CDR1* y *CDR2* (Caudle, *et al.*, 2011). Cuando hay defectos en la funci3n mitocondrial, se crea una alta resistencia a azoles debido a que se incrementa la expresi3n *CDR1*, *CDR2* y *SNQ2* (Sanglard, *et al.*, 2001). Esto sucede como un mecanismo de protecci3n a la mitocondria cuando la levadura se expone a xenobi3ticos.

7. Alta resistencia al estr3s oxidante. La cepa BG14 de *C. glabrata* es altamente resistente a estr3s oxidante. Puede resistir concentraciones m3s altas de H_2O_2 y de varios agentes generadores de estr3s oxidante que otras levaduras con las que se relaciona filogen3ticamente, como *S. cerevisiae* y *C. albicans* (Cuellar-Cruz, *et al.*, 2008, Cuellar-Cruz, *et al.*, 2009, Abegg, *et al.*, 2010, Roetzer, *et al.*, 2011). Las enzimas que pueden desintoxicar estos compuestos son la catalasa (Cuellar-Cruz, *et al.*, 2008), las super3xido dismutasas (Roetzer, *et al.*, 2011). Los factores de transcripci3n Yap1, Skn7, Msn2, Msn4 y Hog1 regulan la expresi3n de 3stas y otras enzimas para responder a estr3s (Gregori, *et al.*, 2007, Cuellar-Cruz, *et al.*, 2008, Saijo, *et al.*, 2010, Roetzer, *et al.*, 2011).

2. Especies reactivas, estr3s oxidante y homeostasis redox

Los compuestos oxidantes que se generan en la c3lula incluyen a las **Especies Reactivas** de **Ox3geno** y de **Nitr3geno** (ERO y ERN, respectivamente). Las ERO son formas reducidas del ox3geno que se producen y acumulan dentro de las c3lulas como el resultado de la transferencia de uno, dos, o tres electrones para formar super3xido ($O_2^{\cdot-}$), per3xido de hidr3geno (H_2O_2) y radicales hidroxilo ($\cdot OH$), respectivamente. Estos compuestos son productos secundarios de reacciones esenciales y pueden oxidar a todas las biomol3culas (Halliwell & Gutteridge, 1999).

En condiciones fisiol3gicas existe un balance entre la generaci3n de compuestos oxidantes y su eliminaci3n. En el momento que la generaci3n de oxidantes supera a la capacidad de eliminaci3n de los mismos, se genera estr3s oxidante en la c3lula (Sies, 1991). En respuesta al estr3s oxidante, las c3lulas pueden inducir sistemas de defensa antioxidante para restaurar el equilibrio pro-oxidante/antioxidante (**adaptaci3n**), pueden sufrir da3o celular y/o morir por necrosis o apoptosis (Halliwell & Gutteridge, 1999).

En presencia de estr3s oxidante, las c3lulas requieren mantener el equilibrio redox por medio de mecanismos de defensa enzim3ticos y no enzim3ticos y de estrategias de reparaci3n de las mol3culas da3adas. Para una eliminaci3n r3pida de las especies reactivas, las c3lulas utilizan enzimas con alta capacidad catal3tica, como la super3xido dismutasa (SOD), la catalasa (CTA), la glutati3n peroxidasa (Gpx), y las peroxiredoxinas, entre otras (Rhee, *et al.*, 2005).

El equilibrio redox se mantiene y se restaura por la acci3n de dos sistemas de amortiguamiento, el sistema tiorredoxina (Trx) y el sistema glutati3n (GSH) (Toledano, *et al.*, 2007). Ambos sistemas efectúan reacciones redox en residuos de ciste3na activos, alternando entre el estado tiol reducido (-SH) y el enlace disulfuro oxidado (-S-S-). Al final, la fuente donadora de electrones de ambos sistemas es el NADPH que proviene de la oxidaci3n de la pentosa fosfato, el cual actúa como el donador primario de protones (Toledano, *et al.*, 2007) (Figura 1). *C. glabrata* posee la mayor3a de los genes ort3logos que codifican para las prote3nas de ambos sistemas (Tabla 1).

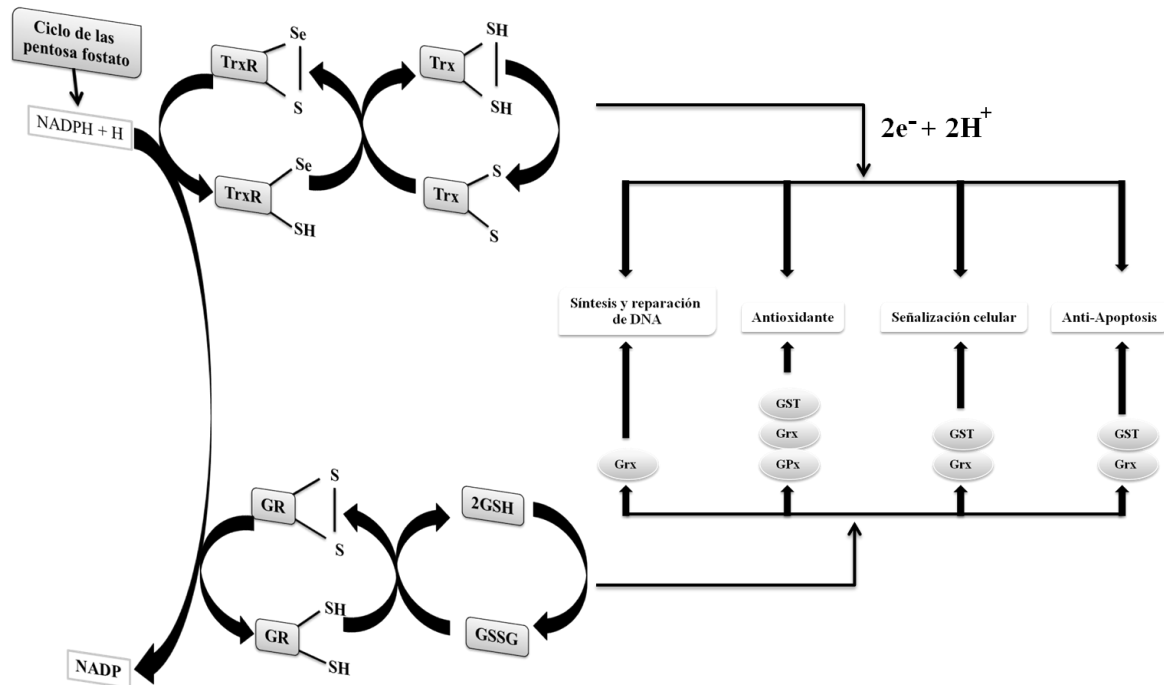


Figura 1. El sistema redox tiol citoplasmático consiste del sistema Trx (tioredoxina) y el sistema GSH (glutatión). El sistema tioredoxina involucra a NADPH, TrxR (tioredoxina reductasa), y Trx que se acoplan con peroxiredoxinas. El sistema GSH se compone por NADPH, GR (glutatión reductasa) y GSH que se acopla con Grxs (Glutaredoxinas), GPxs (glutatión peroxidadasas) y GST (glutatión S transferasas). Ambos sistemas regulan actividades celulares como síntesis de ADN, protección contra estrés oxidante y controlan la proliferación celular y la apoptosis. La última fuente de electrones para ambos sistemas proviene de la oxidación de las pentosas fostato que produce NADPH a partir de NADP⁺. (Tomado y modificado de (Lu, *et al.*, 2007)).

2.1. Sistema tioredoxina. El sistema tioredoxina incluye a las tioredoxinas y a las tioredoxina reductasas. *S. cerevisiae* cuenta con un sistema citoplasm3tico constituido por dos tioredoxinas (Muller, 1991) y una tioredoxina reductasa (Chae, *et al.*, 1994) y con un sistema mitocondrial constituido por una tioredoxina y una tioredoxina reductasa (Pedrajas, *et al.*, 1999).

Las tioredoxinas son oxidoreductasas de bajo peso molecular y poseen un sitio activo conservado CGPC (Holmgren, 1985). Estas mol3culas catalizan reacciones de intercambio de grupos ditioldisulfuro presentes en su sustrato (Figura 1). Las tioredoxinas citoplasm3ticas son codificadas por los genes *TRX1* y *TRX2*. Las mutantes sencillas en estos genes no tienen un fenotipo obvio, pero la mutante doble *trx1Δ trx2Δ* es incapaz de asimilar sulfato porque ambas tioredoxinas actúan como donadores de hidr3geno para la enzima fosfoadenosina fosfosulfato (PAPS) reductasa (Muller, 1991). Adem3s, en la mutante *trx1Δ trx2Δ* est3 afectada la funci3n de la enzima ribonucle3tido reductasa (RNR), lo cual ocasiona una fase S m3s larga (Muller, 1991). La mutante *trx2Δ* es sensible a H₂O₂, debido a que todas la peroxirredoxinas dependen del sistema Trx en *S. cerevisiae* (Draculic, *et al.*, 2000) (Kuge & Jones, 1994).

La enzima tioredoxina reductasa est3 codificada por el gen *TRR1*. Su funci3n es reducir las tioredoxinas oxidadas. Las mutantes *trr1Δ* son sensibles a H₂O₂ y son aux3trofas de metionina (Machado, *et al.*, 1997, Pearson & Merrill, 1998); sin embargo son capaces de asimilar sulfato y tienen una fase S normal.

2.2. Sistema GSH. Este sistema consiste de glutaredoxinas (Grx), GSH y una glutati3n reductasa (Glr1) (Figura 1).

Las glutaredoxinas son oxidoreductasas que requieren de GSH como donador de electrones para reducir su enlace disulfuro una vez que llevan a cabo su reacci3n enzim3tica (Holmgren & Aslund, 1995). De acuerdo a la estructura de su sitio activo, se clasifican como ditiol (motivo CPY/FC) y monotioliol (motivo CGFS) (Lundberg, *et al.*, 2004) (Rodríguez-Manzaneque, *et al.*, 1999). El genoma de *S. cerevisiae* codifica para 7 Grxs. Grx1 y Grx2 son glutaredoxinas tipo ditiol, ambas est3n involucradas en defensa antioxidante. Grx1 es importante para contrarrestar los efectos del an3n super3xido y de



hidroper3xidos mientras que Grx2 es espec3fica para hidroper3xidos (Luikenhuis, *et al.*, 1998). Grx1 y Grx2 pueden reducir a la enzima RNR pero con menos eficiencia que las Trxs (Draculic, *et al.*, 2000).

Existen cinco Grxs del tipo monotiol y desarrollan diferentes funciones que las de tipo ditiol. Grx3 and Grx4 tienen un dominio parecido al dominio tiorredoxina, CGFS. Se encuentran predominantemente en el n3cleo (Lopreiato, *et al.*, 2004) (Ojeda, *et al.*, 2006) (Pujol-Carrion, *et al.*, 2006). Grx5 se encuentra en la matriz mitocondrial donde participa en la maduraci3n y ensamble de las prote3nas ferrosulfuradas (Rodr3guez-Manzaneque, *et al.*, 2002) (Ojeda, *et al.*, 2006). Grx6 y Grx7 tienen en su sitio activo los motivos CSYS y CPYS, respectivamente. Aunque pertenecen al grupo monotiol difieren considerablemente de las prote3nas de este grupo. Ambas prote3nas se encuentran en el *cis*-Golgi. Grx6 y Grx7 son importantes para responder al estr3s oxidante (Mesecke, *et al.*, 2008).

Ninguna Grxs es esencial de manera individual. La doble mutante *grx2Δ grx4Δ* crece lentamente. En la mutante *grx5Δ*, que crece lentamente, se acumula Fe libre y esto incrementa el estr3s oxidante (Rodr3guez-Manzaneque, *et al.*, 2002, Vilella, *et al.*, 2004).

Tabla 1. Comparación del sistema de homeostasis redox de *S. cerevisiae* versus *C. glabrata*.

| | Proteína | Gen <i>S. cerevisiae</i> | Gen <i>C. glabrata</i> | % Identidad* | Sintenia ⁺ |
|--------------------------------|----------------------|-----------------------------|---------------------------|-----------------|-----------------------|
| SISTEMA TIOREDOXINA | Trx1 Citoplásmica | YLR043C | No ortólogo | NA | NA |
| | Trx2 Citoplásmica | YGR209C | CAGL0K00803g | 76 | Sí |
| | Trr1 Citoplásmica | YDR353W | CAGL0A02530g | 86 | Sí |
| | Trx3 Mitocondrial | YCR083W | CAGL0E00583g | 46 | Sí |
| | Trr2 Mitocondrial | YHR106W | CAGL0I01166g | 75 | Sí |
| | Grx1 | YCL035C | No ortólogo | NA | NA |
| | Grx2 | YDR513W | CAGL0K05818g | 55 | Sí |
| | Grx3 | YDR098C | CAGL0G08151g | 58 | Sí |
| SISTEMA GLUTATIÓN | Grx4 | YER174C | CAGL0L11990g | 46 | Sí |
| | Grx5 | YPL059W | CAGL0M07271g | 72 | Sí |
| | Grx6 | YDL010W | No ortólogo | NA | NA |
| | Grx7 | YBR014C | CAGL0I04554g | 25 | Sí |
| | Glr1 | YPL091W | CAGL0H05665g | 79 | Sí |
| | Gsh1 | YJL101C | CAGL0L03630g | 68 | Sí |
| | Gsh2 | YOL049w | CAGL0F00825g | 50 | Sí |
| | Ecm38 | YLR299W | CAGL0I00506g | 60 | Sí |
| | Glr1 | YPL091W | CAGL0H05665g | 78 | Sí |
| | Gpx1 | YKL215C | CAGL0K00231g | 64 | Sí |
| | Gpx2 | YBR244W | CAGL0C01705g | 74 | Sí |
| | Gpx3 | YIR037W | No ortólogo | NA | NA |
| | Gto1 | YGR154C | No ortólogo | NA | NA |
| | Gto2 | YKR076W | CAGL0G02101g | 68 | Sí |
| | Gto3 | YMR251W | No ortólogo | NA | NA |
| | Gtt1 | YIR038C | No ortólogo | NA | NA |
| | Gtt2 | YLL060C | No ortólogo | NA | NA |
| | Gtt3 | YEL017W | CAGL0M03311g | 32 | Sí |

* % de identidad a nivel de la proteína completa

+ Ventana de ± 8 genes. .Versión 7 (Scannell, *et al.*, 2011).

NA No aplica

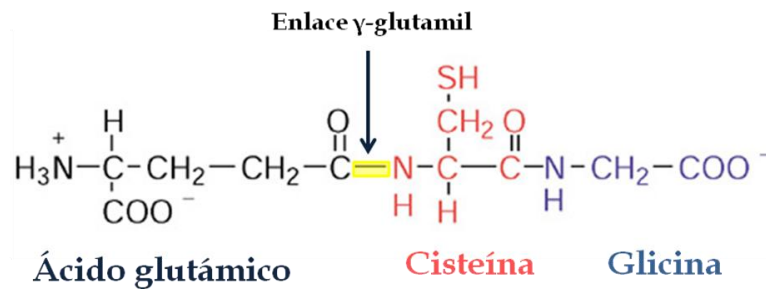


Figura 2. Estructura del GSH. El GSH es un tripéptido con un enlace γ -Glutamil.

El GSH es un tripéptido formado por ácido glutámico, cisteína y glicina (Figura 2) y se sintetiza de manera no ribosomal mediante un mecanismo donde intervienen dos enzimas: γ -glutamilcisteína sintetasa (Gsh1) codificada por el gen *GSH1* (Ohtake & Yabuuchi, 1991), y glutati3n sintasa (Gsh2) codificada por el gen *GSH2* (Mooz & Meister, 1967) (Figura 3). El residuo de cisteína es el responsable de las propiedades redox del GSH.

En *S. cerevisiae*, la mutante *gsh1 Δ es inviable y su crecimiento se rescata con la adici3n de GSH. Gsh2 es dispensable para el crecimiento bajo condiciones normales, en presencia de estr3s oxidante el dipéptido γ -GC sustituye parcialmente la ausencia de GSH (Grant, *et al.*, 1997).*

El gen *GSH1* se expresa en condiciones fisiol3gicas (Inoue, *et al.*, 1998, Sugiyama, *et al.*, 2000), y en presencia de estr3s oxidante se induce por Yap1 (Lee, *et al.*, 1999) (Carmel-Harel & Storz, 2000). *GSH1* tambi3n se regula por GSH a trav3s del factor transcripcional Met4 (Thomas, *et al.*, 1992, Wheeler, *et al.*, 2002). Los niveles de GSH responden a la disponibilidad y naturaleza de las fuentes de nitr3geno y de carbono (Nagy, *et al.*, 2003) (Mehdi & Penninckx, 1997).

Existen dos actividades enzim3ticas que pueden degradar el GSH. La enzima γ -Glutamil transpeptidasa, (γ -GT), codificada por el gen *ECM38* (Penninckx & Elskens, 1993), cataliza la transferencia del residuo γ -Glutamil del GSH a otros amino3cidos. La enzima se encuentra unida a la membrana vacuolar (Jaspers & Penninckx, 1984, Mehdi, *et al.*, 2001). Una vez que el γ -GT retira el 3cido glut3mico del GSH, la enzima L-Cisteinil-glicina dipeptidasa, CG, hidroliza al dip3ptido L-cisteinil-glicina (Jaspers & Penninckx, 1984).

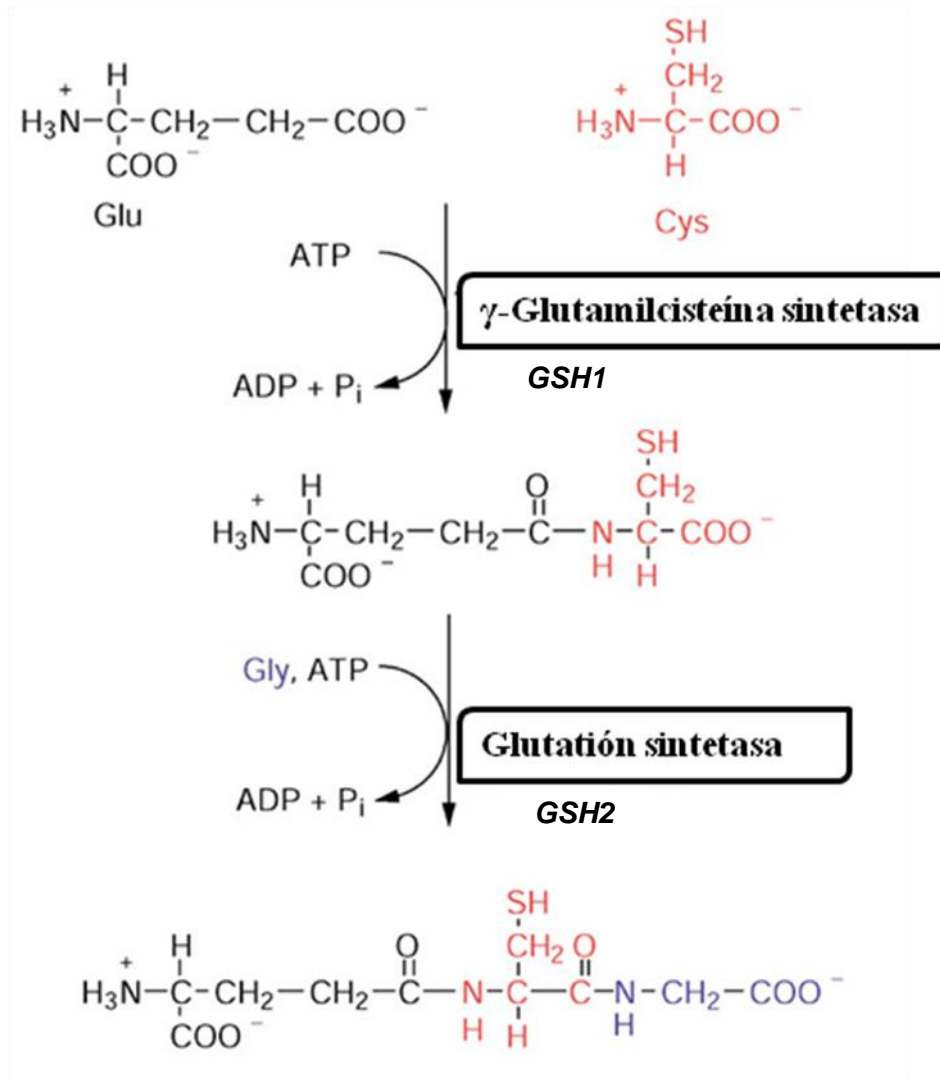


Figura 3. Bios3ntesis de GSH. La enzima Gsh1 (γ -glutamilciste3na sintetasa) condensa la ciste3na con 3cido glut3mico y Gsh2 (glutati3n sintetasa) forma el GSH adicionando un residuo de glicina. Tomado y modificado de (Copley & Dhillon, 2002).

Recientemente, se ha descrito el complejo DUG en el catabolismo de GSH. La degradaci3n del GSH por este complejo ocurre en el citosol y requiere de la participaci3n de tres genes denominados *DUG1*, *DUG2* y *DUG3* los cuales codifican para peptidasas (Kumar, *et al.*, 2003, Ganguli, *et al.*, 2007).

La enzima glutati3n reductasa (GR) es esencial para mantener y restaurar el balance GSH/GSSG en una reacci3n que depende del NADPH (Grant, 2001).

El GSH es esencial porque participa en la maduraci3n de grupos de hierro-azufre (Sipos, *et al.*, 2002, Kumar, *et al.*, 2011) en conjunto con el transportador ABC de membrana mitocondrial Atm1 y la tioloxidasa del espacio intermembranal Erv1 (Lill, *et al.*, 1999) (Lange, *et al.*, 1999) (Sipos, *et al.*, 2002). Este proceso es vital para la maduraci3n de prote3nas esenciales del citoplasma (Lill, 2009). Adem3s de esta funci3n esencial, el GSH tambi3n lleva a cabo otras funciones, protege al ADN mitocondrial, estabiliza membranas y prote3nas, participa en la diferenciaci3n celular y desarrollo, en el ensamble adecuado de microt3bulos y en la desintoxicaci3n de xenobi3ticos (metales pesados y drogas). Debido a su abundancia celular, brinda protecci3n contra estr3s oxidante.

El GSH reacciona de manera directa con ERO y ERN o radicales que contienen carbono. Tambi3n protege a las prote3nas de oxidaciones irreversibles, proceso conocido como glutationilaci3n (Grant, *et al.*, 1999, Shenton, *et al.*, 2002). Puede reaccionar con el 4-hidroxi-2-nonenal y malondialde3do que se producen durante la peroxidaci3n lip3dica (Gupta, *et al.*, 1996, Turton, *et al.*, 1997, Wonisch, *et al.*, 1997). Participa en la eliminaci3n de per3xidos al reducir a las Glutati3n peroxidasas (GPx) (Inoue, *et al.*, 1995, Avery & Avery, 2001) y desintoxica algunos compuestos junto con las glutati3n transferasas.

3. Control de la respuesta a estr3s oxidante

Los principales reguladores de la respuesta a estr3s oxidante en *S. cerevisiae* son Yap1, Skn7, Msn2, Msn4, Sko1 y Hsf1.

Yap1. Yap1 pertenece a la familia bZip (basic-leucine zipper) (Moye-Rowley, *et al.*, 1989). Yap1 regula la respuesta a estr3s oxidante, a estr3s por cadmio y a estr3s por drogas y activa la transcripci3n de transportadores asociados a la membrana como *YCF1*, *ATR1*, y *FLR1*. Una mutante *yap1* Δ es hipersensible a H₂O₂, ter-butil hidroper3xido e hidroper3xido de cumeno (Schnell, *et al.*, 1992). Yap1 regula la inducci3n de antioxidantes celulares y la v3a de las pentosas fosfato (Lee, *et al.*, 1999).

Yap1 se activa por diferentes compuestos como: per3xidos (H₂O₂, t-BOOH) y por diamida (Kuge & Jones, 1994), menadiona (Stephen, *et al.*, 1995, Stephen & Jamieson, 1997), dietilmaleato (Kuge & Jones, 1994), benomil y MMS (Nguyen, *et al.*, 2001), y cadmio (Hirata, *et al.*, 1994, Stephen & Jamieson, 1997). La activaci3n de Yap1 involucra diferentes modificaciones estructurales de la prote3na las cuales controlan su distribuci3n dentro de la c3lula (Kuge, *et al.*, 1997, Kuge, *et al.*, 1998) (Yan, *et al.*, 1998) (Delaunay, *et al.*, 2000). La exportaci3n nuclear de Yap1 est3 regulada por la presencia de diamida, dietilmaleato y per3xidos donde cada compuesto involucra una modificaci3n estructural diferente (Wemmie, *et al.*, 1997) (Delaunay, *et al.*, 2000).

En condiciones no estresantes Yap1 est3 en citoplasma (Kuge, *et al.*, 1997). Crm1 transporta a Yap1 fuera del n3cleo ya que reconoce la NES (secuencia de exportaci3n nuclear) de Yap1 ubicada en el extremo carboxilo terminal. Cuando Yap1 se expone a oxidantes se acumula en el n3cleo porque deja de interactuar con Crm1 debido a la formaci3n de un puente disulfuro catalizado por Gpx3 que enmascara la NES (Kuge, *et al.*, 1998, Yan, *et al.*, 1998).

Skn7. Este factor de transcripci3n tambi3n es cr3tico para la respuesta a estr3s por per3xido. Skn7 se requiere para la activaci3n de *TRX2* y *TRR1* en respuesta a H_2O_2 (Morgan, *et al.*, 1997, Lee, *et al.*, 1999, Raitt, *et al.*, 2000). Induce varios genes de choque t3rmico (*HSP12*, *HSP26* y *HSP104*) en respuesta a H_2O_2 (Raitt, *et al.*, 2000), y la mitad del regul3n de Yap1 que incluye antioxidantes y actividades de la v3a tiorredoxina (Lee, *et al.*, 1999). Skn7 es parte de una v3a de se3alizacion de dos componentes (Brown, *et al.*, 1994). La activaci3n de la transcripci3n de *TRX2* por Skn7 no est3 mediada por H_2O_2 , sino por un incremento en la osmolaridad interna.

Msn2 y Msn4. Son factores de transcripci3n que contienen un dedo de zinc y que median respuestas a muchas condiciones que activan los elementos respuesta a estr3s (Martinez-Pastor & Estruch, 1996, Schmitt & McEntee, 1996). La mutante doble *msn2Δ msn4Δ* es *hipersensible* a H_2O_2 (Martinez-Pastor & Estruch, 1996), y por microarreglos se determin3 que estos factores transcripcionales regulan genes como *CTT1*, varias *HSP*, y enzimas de la v3a del metabolismo de carbohidratos (Gasch, *et al.*, 2000).

Sko1. Es un factor transcripcional bZip que se une y reprime genes del grupo de elementos de respuesta a cAMP (CRE). Es el primer sustrato directo de Hog1 (Proft, *et al.*, 2001). Sko1 reprime la expresi3n basal de genes que dependen del sistema CRE reclutando al complejo represor Tup1/Ssn6/Cyc8. Cuando hay estr3s osm3tico la represi3n por este complejo se libera de manera dependiente de Hog1 (Marquez, *et al.*, 1998) (Proft & Serrano, 1999) (Rep, *et al.*, 2001) que libera a un activador espec3fico CRE hipot3tico (Garcia-Gimeno & Struhl, 2000). Adem3s, en respuesta a estr3s osm3tico, Sko1 se convierte de un represor a un activador (Rep, *et al.*, 2001) de los genes *GRE2*, *AHP1*, *GLR1*, *SFA1* y *YML131W*, los cuales tambi3n se inducen por H_2O_2 a trav3s de Yap1 (Rep, *et al.*, 2001). Sko1 interfiere con el acceso de Yap1 a sus promotores y/o su actividad pero el mecanismo no se conoce.

4. Glutati3n y estr3s por metales pesados: cadmio

El cadmio es un elemento traza altamente t3xico que ingresa a las c3lulas mediante transportadores de cationes como calcio, hierro, o zinc (Clemens, 2006). Dentro de las c3lulas el cadmio:

- Se une a las bases del ADN y produce cortes de cadena sencilla e inhibe el sistema de reparaci3n de errores (Jin, *et al.*, 2003).
- Genera disfunci3n mitocondrial (Gomes, *et al.*, 2008)
- Ocasiona estr3s oxidante debido a su afinidad por los grupos tiol, especialmente GSH (Azevedo, *et al.*, 2007)

Para contrarrestar los efectos t3xicos del cadmio los organismos cuentan con varias estrategias. El mecanismo general es desintoxicar al cadmio conjug3ndolo con GSH, otra manera es sintetizar fitoquelatinas (p3ptidos tiol sintetizados enzim3ticamente) (Grill, *et al.*, 1989). Las fitoquelatinas se producen en respuesta a la exposici3n a cadmio por la enzima fitoquelatina sintasa. El complejo fitoquelatina-cadmio se transporta a la vacuola. Esta estrategia ha sido descrita en plantas (Grill, *et al.*, 1985), en hongos como *Schizosaccharomyces pombe* (Ha, *et al.*, 1999) y en nem3todos (Vatamaniuk, *et al.*, 2005). En mam3feros, el cadmio se desintoxica con metalotione3nas (Henkel & Krebs, 2004).

S. cerevisiae acompleja el cadmio citoplasm3tico como Bis (glutinationato)-Cd y lo transporta a la vacuola a trav3s del transportador Ycf1 (Li, *et al.*, 1997). La enzima Gtt2 (Glutati3n transferasa 2) participa en la formaci3n del complejo GSH-Cd cuya acumulaci3n citoplasm3tica inhibe la toma de cadmio (Adamis, *et al.*, 2004) (Gomes, *et al.*, 2002). Dentro de la vacuola el GSH se degrada por las enzimas γ GT (γ Glutamil transferasa) y Lap4 (cisteinilglicina dipeptidasa) liberando el 3cido glut3mico, la ciste3na y la glicina al citoplasma para que se reutilicen en la bios3ntesis de GSH (Adamis, *et al.*, 2007) (Figura 4).

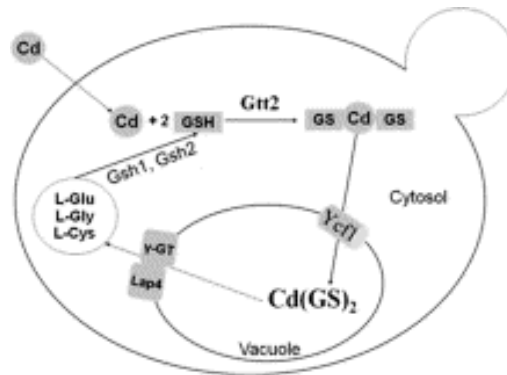


Figura 4. Inactivación de cadmio por medio de GSH en *S. cerevisiae*. La enzima Gtt2 conjuga el cadmio con dos moléculas de GSH y el conjugado se transporta a vacuola a través de Ycf1. Dentro de la vacuola, las enzimas γ -GT y Lap4 liberan el GSH y así se reciclan los aminoácidos constituyentes. (Tomado de (Adamis, *et al.*, 2009)).

S. cerevisiae no tiene homólogos de fitoquelatina sintasa, pero previamente se describió la presencia de pequeñas fitoquelatinas en respuesta a la exposición de iones metálicos (Kneer, *et al.*, 1992). En el 2007, se reportó que las serín carboxipeptidasas vacuolares CPY (codificada por YMR297W) y CPC (codificada por YBR139W) pueden llevar a cabo la síntesis de fitoquelatinas en *S. cerevisiae* (Wunschmann, *et al.*, 2007).

C. glabrata contiene genes que codifican para metalotioneínas (MT) y la presencia de fitoquelatinas en respuesta a estrés por cadmio se ha reportado (Mehra, *et al.*, 1988, Mehra, *et al.*, 1989, Mehra, *et al.*, 1992). Sin embargo, no se ha identificado el gen que codifique para una fitoquelatina sintasa.

5. Transporte de glutati3n en levaduras

S. cerevisiae tiene dos sistemas de transporte de p3ptidos: PTR (Peptide Transporte) y OPT (Oligopeptide Transporter) (Hauser, *et al.*, 2001).

S. cerevisiae tiene genes que codifican para dos miembros de la familia OPT, Opt1 y Opt2, y existe adem3s otro miembro hipot3tico, YGL114w (Wiles, *et al.*, 2006). Opt1 es una prote3na con 12-14 dominios transmembranales. Puede transportar tetra y pentap3ptidos (Lubkowitz, *et al.*, 1998) y tambi3n GSH (Bourbouloux, *et al.*, 2000). OPT1 se induce en ausencia de azufre y presencia de amino3cidos sulfurados (Wiles, *et al.*, 2006).

El sistema PTR esta codificado por 3 genes (Island, *et al.*, 1991): dos reguladores transcripcionales y una prote3na integral de membrana, Ptr2 (Perry, *et al.*, 1994). Ptr2 permite el transporte de di y trip3ptidos a trav3s de la membrana.

Los sustratos de Ptr2 son similares a los de Opt1 porque ambas permeasas transportan peque3os p3ptidos, pero el papel fisiol3gico de cada transportador es diferente. Ptr2, transporta dip3ptidos y trip3ptidos para metabolizar sus amino3cidos constituyentes como fuente de nitr3geno. Opt1 transporta GSH y tetra/pentap3ptidos probablemente para obtener azufre (Wiles, *et al.*, 2006).

6. Metabolismo de la prolina

La prolina es un aminoácido que se sintetiza a partir del ácido glutámico. El glutamato se activa por la enzima γ -glutamil cinasa, Pro1, para formar glutamil fosfato. El glutamil fosfato es muy inestable y se convierte a glutamato semialdeído por la enzima γ -glutamil fosfato reductasa, Pro2. El glutamato semialdeído se cicla espontáneamente para formar el ácido Δ -pirrolina-5-carboxílico (P5C). Finalmente, la enzima P5C reductasa convierte al P5C en prolina (Figura 5). La síntesis de prolina ocurre en el citoplasma (Tomenchok & Brandriss, 1987).

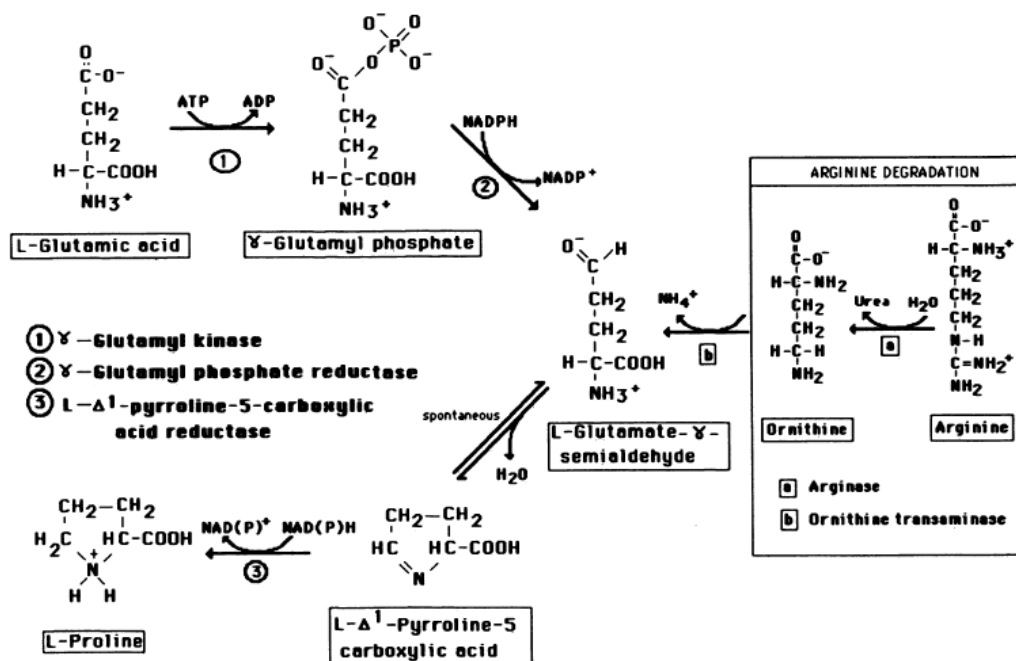


Figura 5. Rutas biosintéticas de la prolina (Tomenchok & Brandriss, 1987).

La prolina entra a la célula a través de la permeasa de prolina, Put4, y de la permeasa general de aminoácidos, Gap1. Se transporta a la mitocondria y se convierte en glutamato mediante la participación secuencial de dos enzimas: prolina oxidasa, Put1, y la P5C deshidrogenasa, Put2. Ambas proteínas son reguladas transcripcionalmente por Put3. (Brandriss & Magasanik, 1979, Siddiqui & Brandriss, 1989).

En *S. cerevisiae*, las mutantes *pro1* Δ y *pro2* Δ no son auxótrofas de prolina porque el requerimiento de prolina lo cubre la vía de degradación de la arginina o la ornitina (Figura 5). Las mutantes *pro3* Δ son auxótrofas de prolina (Brandriss & Magasanik, 1981).

Tabla 2. Comparaci3n del metabolismo de la prolina de *S. cerevisiae* versus *C. glabrata*

| Prote3na | Gen <i>S. cerevisiae</i> | Gen <i>C. glabrata</i> | % Identidad [*] | Sintenia ⁺ |
|--------------------------------|-----------------------------|---------------------------|--------------------------|-----------------------|
| Pro1 Citopl3smica | YDR300C | CAGL0H01441g | 71 | S3 |
| Pro2 Citopl3smica | YOR323C | CAGL0F00693g | 77 | S3 |
| Pro3 Citopl3smica | YER023W | CAGL0I08283g | 75 | S3 |
| Car1 Citopl3smica | YPL111W | CAGL0J07062g | 72 | S3 |
| Arg8 Mitocondrial | YOL140W | CAGL0B01507g | 71 | S3 |
| Put1 Mitocondrial | YLR142W | CAGL0M04499g | 62 | S3 |
| Put2 Mitocondrial | YHR037W | CAGL0D03982g | 75 | S3 |
| Put3 Nuclear | YKL015W | CAGL0L09691g | 60 | S3 |
| Put4 Membrana plasm3tica | YOR348C | CAGL0E05632g | 69 | S3 |
| Gap1 Membrana plasm3tica | YKR039W | CAGL0L03267g | 70 | S3 |

* % de identidad a nivel de la prote3na completa

+ Ventana de ± 8 genes. Versi3n 7 (Scannell, *et al.*, 2011).

NA No aplica

MATERIALES Y M3TODOS

1. Medios de cultivo y cepas

1.1. Medios de cultivo para bacterias.

Para el cultivo de bacterias se utiliz3 el medio Luria-Bertani (LB): extracto de levadura (5 g/L), triptona (10 g/L) y NaCl (10 g/L). Cuando fue necesario al medio LB se le a3adi3 carbenicilina (Invitrogene™) (50 µg/mL), cloranfenicol (IBI Scientific) (20 µg/mL), kanamicina (A. G. Scientific, Inc.) (30 µg/mL). Para el medio LB s3lido se a3adi3 agar (15 g/L). Para recuperar cepas bacterianas competentes se utiliz3 el medio SOC: extracto de levadura (5 g/L), triptona (20 g/L), NaCl (10 mM), KCl (2.3 mM), MgSO₄ (10 mM) MgCl₂ (10 mM) y glucosa (0.4% w/v).

1.2. Cepas de bacterias. Las cepas bacterianas utilizadas en este trabajo se describen en la tabla 3.

Tabla 3. Cepas de *Escherichia coli*

| Cepa | Genotipo | Referencia |
|------------------|--|---------------------------|
| DH10 | F ⁻ <i>mcrA</i> Δ(<i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i>) φ80d <i>lacZ</i> Δ <i>lacX74</i> <i>deoR</i> <i>recA1</i> <i>endA1</i> <i>araD139</i> Δ(<i>ara,leu</i>)7697 <i>galU</i> <i>galk</i> λ ⁻ <i>rpsL</i> <i>nupG</i> | (Calvin & Hanawalt, 1988) |
| DH10 <i>pcnB</i> | DH10 <i>pcnB</i> | (Lopilato, et al., 1986) |
| <i>Stbl2</i> | F ⁻ <i>mcrA</i> Δ(<i>mrrBC-hsdRMS</i>) <i>recA1</i> <i>endA1</i> <i>lon</i> <i>gyrA96</i> <i>thi1</i> <i>supE44</i> <i>relA1</i> λ ⁻ Δ(<i>lac-proAB</i>) | Invitrogen™ |

1.3. Medios de cultivo para levaduras.

Medio YPD: extracto de levadura (10 g/L), peptona (20 g/L), glucosa (20 g/L) y uracilo (25 mg/L). Cuando fue requerido se suplemento con higromicina (480 µg/mL) (A. G. Scientific), con nourseotricina (100 µg/mL) (Werner BioAgents) .

Para los ensayos de sensibilidad a agentes generadores de estr3s oxidante el medio YPD se suplement3 de la siguiente manera:

- H₂O₂ (Sigma-Aldrich[®]): 5, 10, 15, 20 y 25 mM
- Menadiona (Sigma-Aldrich[®]): 0.01, 0.03, 0.05, 0.06, 0.08 y 0.11 mM.
- Hidroper3xido de cumeno (Sigma-Aldrich[®]): 0.6, 0.8, 1.0 y 1.2 mM.
- CdSO₄ (Sigma-Aldrich[®]): 0.01, 0.03, 0.05, 0.08, 0.1, 0.15 y 2 mM.
- Fluconazol (Diflucan de Pfizer[®]): 1, 2, 4, 8, 16, 32, 64 y 128 µg/mL.

Medio YPG: extracto de levadura (10 g/L), peptona (20 g/L), glicerol (20 g/L) y uracilo (25 mg/L).

Medio CAA: base nitrogenada de levadura sin amonio (1.7 g/L), sulfato de amonio (5 g/L), casamino3cidos (6 g/L) y glucosa (20 g/L). Cuando fue necesario se suplemento con uracilo (25 mg/L).

Medio 5-FOA: base nitrogenada de levadura sin amonio (1.7 g/L), sulfato de amonio (5 g/L), casamino3cidos (6 g/L), glucosa (20 g/L), uracilo (25 mg/L) y 3cido 5-fluor3tico (0.9 g/L) (Toronto Research Chemicals[®]).

Medio YNB (Wickerham, *et al.*, 1946): base nitrogenada de levadura sin amonio (1.7 g/L), sulfato de amonio (5 g/L), glucosa (20 g/L) y uracilo (25 mg/L). Cuando fue necesario se suplement3 con L-prolina (10 µg/mL) o con GSH (0.01, 0.1, 0.25, 0.5, 1, 5 o 10 mM).

Medio YNB reducido en nitr3geno (YNBrN): base nitrogenada de levadura sin amonio (1.7 g/L), sulfato de amonio (0.5 g/L), sulfato de sodio (4.83 g/L), glucosa (20 g/L) y uracilo (25 mg/L). Cuando fue necesario se suplement3 con L-prolina (10 µg/mL) o con GSH (0.01, 0.1, 0.25, 0.5, 1, 5 3 10 mM).

Medio YNB reducido en azufre (YNBrS): base nitrogenada de levadura sin amonio (1.7 g/L), cloruro de amonio (4.046 g/L), glucosa (20 g/L) y uracilo (25 mg/L). Cuando fue necesario se suplement3 con L-prolina (10 µg/mL) o con GSH (0.01, 0.1, 0.25, 0.5, 1, 5 3 10mM).

Los medios reducidos se prepararon de acuerdo a (Wiles, *et al.*, 2006).

Para los medios s3lidos se a3adi3 agar bacteriol3gico (20 g/L).

1.4. Cepas de levaduras. Las cepas de levaduras utilizadas en este estudio se describen en la tabla 4.

Tabla 4. Cepas de *Candida glabrata*

| Cepa | Parental | Genotipo | Comentario | Referencia |
|---------------------------------------|----------|---|--|-------------------------------|
| BG2 | — | Aislado Cl3nico | — | (Fidel, <i>et al.</i> , 1996) |
| BG14 | BG2 | <i>ura3Δ::Tn903 Neo^R</i> (G418) | Silvestre | (Cormack & Falkow, 1999) |
| CGM295 <i>cta1Δ</i> | BG14 | <i>ura3Δ::Tn903 Neo^R</i> (G418) <i>cta1Δ::hph</i> | <i>cta1Δ</i> Ura ⁻ Hyg ^f | Colecci3n del laboratorio |
| CGM392 <i>cta1Δ</i> | CGM295 | <i>ura3Δ::Tn903 Neo^R</i> (G418) pMZ18(pEPA1p:: <i>FLP1</i>) <i>cta1Δ</i> | <i>cta1Δ</i> Ura ⁻ Hyg ^s | Colecci3n del laboratorio |
| CGM814 <i>gsh1Δ pro2-4</i> | BG14 | <i>ura3Δ::Tn903 Neo^R</i> (G418) <i>gsh1Δ::hph, pro2-4</i> | <i>gsh1Δ pro2-4</i> Ura ⁻ Hyg ^f | Este trabajo |
| CGM865 pGSH1 | BG14 | <i>ura3Δ::Tn903 Neo^R</i> (G418) pGE59(<i>CgCEN/ARS URA3 GSH1</i>) | Silvestre pGSH1 Ura ⁺ | Este trabajo |
| CGM873 <i>gsh2Δ</i> | BG14 | <i>ura3Δ::Tn903 Neo^R</i> (G418) <i>gsh2Δ::hph</i> | <i>gsh2Δ</i> Ura ⁻ Hyg ^f | Este trabajo |
| CGM876 <i>gsh1Δ pGSH1</i> | CGM865 | <i>ura3Δ::Tn903 Neo^R</i> (G418) pGE59 (<i>CgCEN/ARS URA3 GSH1</i>) <i>gsh1Δ::hph</i> | <i>gsh1Δ pGSH1</i> Ura ⁺ Hyg ^f | Este trabajo |
| CGM883 <i>gsh1Δ pro2-4</i> | CGM814 | <i>ura3Δ::Tn903 Neo^R</i> (G418) <i>gsh1Δ, pro2-4</i> pMZ18(pEPA1p:: <i>FLP1</i>) | <i>gsh1Δ pro2-4</i> Ura ⁻ Hyg ^s | Este trabajo |
| CGM976 <i>gsh2Δ</i> | CGM873 | <i>ura3Δ::Tn903 Neo^R</i> (G418) <i>gsh2Δ</i> pMZ18(pEPA1p:: <i>FLP1</i>) | <i>gsh2Δ</i> Ura ⁻ Hyg ^s | Este trabajo |
| CGM989 <i>gsh2Δ pGSH1</i> | CGM976 | <i>ura3Δ::Tn903 Neo^R</i> (G418) <i>gsh2Δ</i> pGE60 (<i>CgCEN/ARS URA3 GSH1</i>) | <i>gsh2Δ pGSH1</i> Ura ⁺ Hyg ^s | Este trabajo |
| CGM1035 pScOPT1 | BG14 | <i>ura3Δ::Tn903 Neo^R</i> (G418) pGE67 (<i>CgCEN/ARS URA3</i> | Silvestre pScOPT1 | Este trabajo |

| | | <i>ScOPT1</i>) | Ura ⁺ | |
|--|---------|---|---|--------------|
| CGM1037 pScOPT2 | BG14 | <i>ura3Δ::Tn903 Neo^R (G418)</i> <i>pGE69 (CgCEN/ARS URA3 ScOPT2)</i> | Silvestre <i>pScOPT2</i> Ura ⁺ | Este trabajo |
| CGM1061 ure2Δ | BG14 | <i>ura3Δ::Tn903 Neo^R (G418)</i> <i>ure2Δ::hph</i> | <i>ure2Δ</i> Ura ⁻ Hyg ^f | Este trabajo |
| CGM1071 gsh1Δ pScOPT1 | CGM1035 | <i>ura3Δ::Tn903 Neo^R (G418)</i> <i>pGE67 (CgCEN/ARS URA3 ScOPT1)</i> <i>gsh1Δ::hph</i> | <i>pScOPT1</i> <i>gsh1Δ</i> Ura ⁺ Hyg ^f | Este trabajo |
| CGM1073 pGRB2.2 | BG14 | <i>ura3Δ::Tn903 Neo^R (G418)</i> <i>pGRB2.2 (CgCEN/ARS URA3)</i> | Silvestre <i>pGRB2.2</i> Ura ⁺ | Este trabajo |
| CGM1075 ure2Δ | CGM1061 | <i>ura3Δ::Tn903 Neo^R (G418)</i> <i>ure2Δ</i> <i>pMZ18(pEPA1p::FLP1)</i> | <i>ure2Δ</i> Ura ⁻ Hyg ^s | Este trabajo |
| CGM1092 gsh2Δ pScOPT1 | CGM873 | <i>ura3Δ::Tn903 Neo^R (G418)</i> <i>gsh2Δ</i> <i>pGE67 (CgCEN/ARS URA3 ScOPT1)</i> | <i>gsh2Δ</i> <i>pScOPT1</i> Ura ⁺ Hyg ^f | Este trabajo |
| CGM1099 cta1Δ gsh2Δ | CGM392 | <i>ura3Δ::Tn903 Neo^R (G418)</i> <i>cta1Δ gsh2Δ::hph</i> | <i>cta1Δ gsh2Δ</i> Ura ⁻ Hyg ^f | Este trabajo |
| CGM1101 gsh2Δ pScOPT1 | CGM976 | <i>ura3Δ::Tn903 Neo^R (G418)</i> <i>gsh2Δ</i> <i>pGE67 (CgCEN/ARS URA3 ScOPT1)</i> | <i>gsh2Δ</i> <i>pScOPT1</i> Ura ⁻ Hyg ^s | Este trabajo |
| CGM1115 gsh2Δ gsh1Δ pScOPT1 | CGM1101 | <i>ura3Δ::Tn903 Neo^R (G418)</i> <i>gsh2Δ</i> <i>pGE67 (CgCEN/ARS URA3 ScOPT1)</i> <i>gsh1Δ::hph</i> | <i>gsh2Δ gsh1Δ</i> <i>pScOPT1</i> Ura ⁻ Hyg ^f | Este trabajo |
| CGM1121 cta1Δ pGRB2.2 | CGM392 | <i>ura3Δ::Tn903 Neo^R (G418)</i> <i>cta1Δ</i> <i>pGRB2.2(CgCEN/ARS URA3)</i> | <i>cta1Δ</i> Ura ⁺ Hyg ^s | Este trabajo |
| CGM1123 gsh2Δ pGRB2.2 | CGM976 | <i>ura3Δ::Tn903 Neo^R (G418)</i> <i>gsh2Δ</i> <i>pGRB2.2(CgCEN/ARS URA3)</i> | <i>gsh2Δ</i> Ura ⁺ Hyg ^s | Este trabajo |
| CGM1125 cta1Δ gsh2Δ | CGM1099 | <i>ura3Δ::Tn903 Neo^R (G418)</i> <i>cta1Δ gsh2Δ</i> <i>pMZ18(pEPA1p::FLP1)</i> | <i>cta1Δ gsh2Δ</i> Ura ⁻ Hyg ^s | Este trabajo |
| CGM1127 cta1Δ gsh2Δ pScOPT1 | CGM1125 | <i>ura3Δ::Tn903 Neo^R (G418)</i> <i>cta1Δ gsh2Δ</i> <i>pGE67(CgCEN/ARS URA3 ScOPT1)</i> | <i>cta1Δ gsh2Δ</i> <i>pScOPT1</i> Ura ⁺ Hyg ^s | Este trabajo |
| CGM1129 pCAGL0F07293g | BG14 | <i>ura3Δ::Tn903 Neo^R (G418)</i> <i>pGE72(CgCEN/ARS URA3 CAGL0F07293g)</i> | Silvestre <i>pCAGL0F07293g</i> Ura ⁺ Hyg ^s | Este trabajo |
| CGM1139 gsh1Δ | CGM814 | <i>ura3Δ::URA3 pBC34.1/PstI</i> <i>gsh1Δ::hph, pro2C376A</i> | <i>gsh1Δ</i> Ura ⁺ , Hyg ^f <i>pro2-4 G418^s</i> | Este trabajo |

| | | | | |
|--|---------|---|--|--------------|
| CGM1140 <i>gsh2Δ</i> | CGM873 | <i>ura3Δ::URA3</i> pBC34.1/PstI <i>gsh2Δ::hph</i> | <i>gsh2Δ</i> Ura ⁺ , Hyg ^r G418 ^s | Este trabajo |
| CGM1142 <i>cta1Δ gsh2Δ</i> | CGM1099 | <i>ura3Δ::URA3</i> pBC34.1/PstI <i>cta1Δ gsh2Δ::hph</i> | <i>cta1Δ gsh2Δ</i> Ura ⁺ Hyg ^r G418 ^s | Este trabajo |
| CGM1205 pCAGL0F07293g | BG14 | <i>ura3Δ::Tn903 Neo^R</i> (G418) pGE75(CgCEN/ARS URA3 CAGL0F07293g) | Silvestre pCAGL0F07293g Ura ⁺ Hyg ^s | Este trabajo |
| CGM1216 <i>gsh1Δ pro2-4</i> <i>pdr1Δ</i> | CGM883 | <i>ura3Δ::Tn903 Neo^R</i> (G418) <i>gsh1Δ pro2-4</i> <i>pdr1Δ::hph</i> | <i>gsh1Δ pro2-4</i> <i>pdr1Δ</i> Ura ⁻ Hyg ^r | Este trabajo |
| CGM1217 <i>gsh1Δ pro2-4</i> <i>cdr2Δ</i> | CGM883 | <i>ura3Δ::Tn903 Neo^R</i> (G418) <i>gsh1Δ, pro2-4</i> <i>cdr2Δ::hph</i> | <i>gsh1Δ pro2-4</i> <i>cdr2Δ</i> Ura ⁻ Hyg ^r | Este trabajo |
| CGM1219 <i>prc1Δ</i> | BG14 | <i>ura3Δ::Tn903 Neo^R</i> (G418) <i>prc1Δ::hph</i> | <i>prc1Δ</i> Ura ⁻ Hyg ^r | Este trabajo |
| CGM1240 <i>gsh1Δ pro2-4</i> <i>cdr1Δ</i> | CGM883 | <i>ura3Δ::Tn903 Neo^R</i> (G418) <i>gsh1Δ, pro2-4</i> <i>cdr1Δ::hph</i> | <i>gsh1Δ pro2-4</i> <i>cdr1Δ</i> Ura ⁻ Hyg ^r | Este trabajo |
| CGM1247 <i>gsh1Δ pro2-4</i> <i>GSH1</i> | CGM814 | <i>ura3Δ::Tn903 Neo^R</i> (G418) <i>gsh1Δ::hph, pro2-4</i> Cointegrante pGE77(URA3 <i>GSH1</i>)/PmL I | <i>gsh1Δ pro2-4</i> <i>GSH1</i> Ura ⁺ Hyg ^r | Este trabajo |
| CGM1290 <i>GSH1pro2-4</i> | CGM1247 | <i>ura3Δ::Tn903 Neo^R</i> (G418) <i>gsh1Δ::hph, pro2-4</i> Segregante pGE77(URA3 <i>GSH1</i>)/PmL I | <i>GSH1pro2-4</i> Ura ⁻ Hyg ^s | Este trabajo |
| CGM1323 <i>pro2-4</i> | BG14 | <i>ura3Δ::Tn903 Neo^R</i> (G418) Cointegrante pGE78(URA3 <i>PRO2*</i>)/Age I | <i>PRO2 pro2-4</i> Ura ⁺ Hyg ^s | Este trabajo |
| CGM1327 <i>pro2-4</i> | CGM1323 | <i>ura3Δ::Tn903 Neo^R</i> (G418) Segregante pGE78(URA3 <i>PRO2*</i>)/Age I | <i>pro2-4</i> Ura ⁻ Hyg ^s | Este trabajo |
| CGM1328 pScOPT1 | CGM883 | <i>ura3Δ::Tn903 Neo^R</i> (G418) <i>gsh1Δ pro2C376A</i> pGE67(CgCEN/ARS URA3 ScOPT1) | <i>gsh1Δ pro2-4</i> pScOPT1 Ura ⁺ Hyg ^s | Este trabajo |
| CGM1330 <i>gsh1Δ pro2-4</i> pCAGL0F07293g | CGM883 | <i>ura3Δ::Tn903 Neo^R</i> (G418) <i>gsh1Δ pro2C376A</i> pGE75(CgCEN/ARS URA3 CAGL0F07293g) | <i>gsh1Δ pro2-4</i> pCAGL0F07293g Ura ⁺ Hyg ^s | Este trabajo |
| CGM1332 <i>gsh2Δ</i> pScOPT1 | CGM976 | <i>ura3Δ::Tn903 Neo^R</i> (G418) <i>gsh2Δ</i> pGE67(CgCEN/ARS URA3 ScOPT1) | <i>gsh2Δ</i> pScOPT1 Ura ⁺ Hyg ^s | Este trabajo |
| CGM1334 <i>gsh2Δ</i> pCAGL0F07293g | CGM976 | <i>ura3Δ::Tn903 Neo^R</i> (G418) <i>gsh2Δ</i> pGE75(CgCEN/ARS URA3 CAGL0F07293g) | <i>gsh2Δ</i> pCAGL0F07293g Ura ⁺ Hyg ^s | Este trabajo |
| CGM1368 | CGM1094 | <i>ura3Δ::Tn903 Neo^R</i> (G418) <i>pdr1Δ</i> Cointegrante pGE78(URA3 | <i>pdr1Δ</i> <i>PRO2 pro2-4</i> Ura ⁺ Hyg ^r | Este trabajo |

| | | <i>PRO2</i> *)/Age I | | |
|---|---------|---|---|--------------|
| CGM1370 | CGM1096 | <i>ura3Δ::</i> Tn903 Neo ^R (G418) <i>cdr1Δ</i> Cointegrante pGE78(<i>URA3</i> <i>PRO2</i> *)/Age I | <i>cdr1Δ</i> <i>PRO2 pro2-4</i> Ura ⁺ Hyg ^r | Este trabajo |
| CGM1372 | CGM1098 | <i>ura3Δ::</i> Tn903 Neo ^R (G418) <i>cdr2Δ</i> Cointegrante pGE78(<i>URA3</i> <i>PRO2</i> *)/Age I | <i>cdr2Δ</i> <i>PRO2 pro2-4</i> Ura ⁺ Hyg ^r | Este trabajo |
| CGM1374 | CGM976 | <i>ura3Δ::</i> Tn903 Neo ^R (G418) <i>gsh2Δ</i> Cointegrante pGE78(<i>URA3</i> <i>PRO2</i> *)/Age I | <i>gsh2Δ</i> <i>PRO2 pro2-4</i> Ura ⁺ Hyg ^s | Este trabajo |
| CGM1376 | CGM24 | <i>ura3Δ::</i> Tn903 Neo ^R (G418) <i>sir3Δ</i> Cointegrante pGE32(<i>URA3</i> 5' <i>GSH1::hph::3'GSH1</i>)/ <i>Hind</i> III | <i>sir3Δ</i> Ura ⁺ Hyg ^r | Este trabajo |
| CGM1382 <i>cdr1Δ</i> | CGM1096 | <i>ura3Δ::</i> Tn903 Neo ^R (G418) <i>cdr1Δ</i> <i>pMZ18(pEPA1p::FLP1)</i> | <i>cdr1Δ</i> Ura ⁻ Hyg ^s | Este trabajo |
| CGM1384 <i>cdr2Δ</i> | CGM1098 | <i>ura3Δ::</i> Tn903 Neo ^R (G418) <i>cdr2Δ</i> <i>pMZ18(pEPA1p::FLP1)</i> | <i>cdr2Δ</i> Ura ⁻ Hyg ^s | Este trabajo |
| CGM1386 <i>pdr1Δ</i> <i>pro2-4</i> | CGM1368 | <i>ura3Δ::</i> Tn903 Neo ^R (G418) <i>pdr1Δ</i> Segregante pGE78(<i>URA3</i> <i>PRO2</i> *)/Age I | <i>pdr1Δ</i> <i>pro2-4</i> Ura ⁻ Hyg ^r | Este trabajo |
| CGM1388 <i>cdr2Δ</i> <i>pro2-4</i> | CGM1372 | <i>ura3Δ::</i> Tn903 Neo ^R (G418) <i>cdr2Δ</i> Segregante pGE78(<i>URA3</i> <i>PRO2</i> *)/Age I | <i>cdr2Δ</i> <i>pro2-4</i> Ura ⁻ Hyg ^r | Este trabajo |
| CGM1389 | CGM1382 | <i>ura3Δ::</i> Tn903 Neo ^R (G418) <i>pdr1Δ</i> Cointegrante pGE32(<i>URA3</i> <i>GSH1</i>)/ <i>Hind</i> III | <i>pdr1Δ</i> Ura ⁺ Hyg ^r | Este trabajo |
| CGM1391 | CGM1384 | <i>ura3Δ::</i> Tn903 Neo ^R (G418) <i>cdr1Δ</i> Cointegrante pGE32(<i>URA3</i> <i>GSH1</i>)/ <i>Hind</i> III | <i>cdr1Δ</i> Ura ⁺ Hyg ^r | Este trabajo |
| CGM1393 <i>pdr1Δ</i> <i>pro2-4</i> | CGM1386 | <i>ura3Δ::</i> Tn903 Neo ^R (G418) <i>pdr1Δ pro2-4</i> <i>pMZ18(pEPA1p::FLP1)</i> | <i>pdr1Δ</i> <i>pro2-4</i> Ura ⁻ Hyg ^s | Este trabajo |
| CGM1395 <i>cdr2Δ</i> <i>pro2-4</i> | CGM1388 | <i>ura3Δ::</i> Tn903 Neo ^R (G418) <i>cdr2Δpro2-4</i> <i>pMZ18(pEPA1p::FLP1)</i> | <i>cdr2Δ</i> <i>pro2-4</i> Ura ⁻ Hyg ^s | Este trabajo |
| CGM1446 <i>pro2Δ</i> | BG14 | <i>ura3Δ::</i> Tn903 Neo ^R (G418) <i>pro2::URA3</i> | <i>pro2Δ</i> Ura ⁺ | Este trabajo |
| CGM1448 <i>dug2Δ</i> | BG14 | <i>ura3Δ::</i> Tn903 Neo ^R (G418) <i>dug2::URA3</i> | <i>dug2Δ</i> Ura ⁺ | Este trabajo |
| CGM1450 <i>gsh2Δ pro2Δ</i> | CGM976 | <i>ura3Δ::</i> Tn903 Neo ^R (G418) <i>gsh2Δ</i> | <i>gsh2Δ pro2Δ</i> Ura ⁺ | Este trabajo |

| | | <i>pro2::URA3</i> | | |
|---|---------|---|--|--------------|
| CGM1474 <i>yor1Δ</i> | BG14 | <i>ura3Δ::</i> Tn903 Neo ^R (G418) <i>yor1::URA3</i> | <i>yor1Δ</i> Ura ⁺ | Este trabajo |
| CGM1475 <i>trr1Δ</i> | BG14 | <i>ura3Δ::</i> Tn903 Neo ^R (G418) <i>trr1::URA3</i> | <i>trr1Δ</i> Ura ⁺ | Este trabajo |
| CGM1477 <i>cta1Δ trr1Δ</i> | CGM392 | <i>ura3Δ::</i> Tn903 Neo ^R (G418) <i>cta1Δ</i> <i>trr1::URA3</i> | <i>cta1Δ trr1Δ</i> Ura ⁺ , Hyg ^r | Este trabajo |
| CGM1501 <i>gsh1Δ pro2-4 trr1Δ</i> | CGM883 | <i>ura3Δ::</i> Tn903 Neo ^R (G418) <i>gsh1Δ, pro2-4</i> <i>trr1::URA3</i> | <i>gsh1Δ pro2-4</i> <i>trr1Δ</i> Ura ⁺ Hyg ^s | Este trabajo |
| CGM1519 <i>gsh2Δ dug2Δ</i> | CGM976 | <i>ura3Δ::</i> Tn903 Neo ^R (G418) <i>gsh2Δ</i> <i>dug2Δ::hph</i> | <i>gsh2Δ dug2Δ</i> Ura ⁺ Hyg ^s | Este trabajo |
| CGM1521 <i>gsh2Δ trr1Δ</i> | CGM976 | <i>ura3Δ::</i> Tn903 Neo ^R (G418) <i>gsh2Δ</i> <i>trr1::URA3</i> | <i>gsh2Δ trr1Δ</i> Ura ⁺ Hyg ^s | Este trabajo |
| CGM1587 | BG14 | <i>ura3Δ::</i> Tn903 Neo ^R (G418) Cointegrante pGE84(<i>URA3</i> <i>PRO2*</i>)/Age I | <i>PRO2 pro2-4</i> Ura ⁺ | Este trabajo |
| CGM1592 <i>pro2-4</i> | CGM1587 | <i>ura3Δ::</i> Tn903 Neo ^R (G418) Segregante pGE84(<i>URA3</i> <i>PRO2*</i>)/Age I | <i>pro2-4</i> Ura ⁺ | Este trabajo |
| CGM1595 | CGM1592 | <i>ura3Δ::</i> Tn903 Neo ^R (G418) <i>pro2-4</i> Cointegrante pGE32(<i>URA3</i> <i>GSH1</i>)/Hind III | <i>pro2-4</i> Ura ⁻ Hyg ^r | Este trabajo |
| CGM1601 <i>ppro2-4</i> | BG14 | <i>ura3Δ::</i> Tn903 Neo ^R (G418) pGE92(NAT <i>pro2C376A</i>) | Nat ^r | Este trabajo |
| CGM1603 <i>gsh1Δ pro2-4 pPRO2</i> | CGM814 | <i>ura3Δ::</i> Tn903 Neo ^R (G418) <i>gsh1Δ pro2-4</i> pGE90(NAT <i>PRO2</i>) | <i>gsh1Δ pro2-4</i> Hyg ^r Nat ^r | Este trabajo |
| CGM1613 <i>pro2Δ pPRO2</i> | CGM1446 | <i>ura3Δ::</i> Tn903 Neo ^R (G418) <i>pro2Δ</i> pGE90(NAT <i>PRO2</i>) | <i>pro2Δ pPRO2</i> Hyg ^r Nat ^r | Este trabajo |
| CGM1615 <i>pro2Δ ppro2-4</i> | CGM1446 | <i>ura3Δ::</i> Tn903 Neo ^R (G418) <i>pro2Δ</i> pGE92(NAT <i>pro2C376A</i>) | <i>pro2Δ ppro2-4</i> Hyg ^r Nat ^r | Este trabajo |
| CGM1619 <i>pro2-4 pGSH1</i> | CGM1592 | <i>ura3Δ::</i> Tn903 Neo ^R (G418) <i>pro2-4</i> pGE59(<i>URA GSH1+</i>) | <i>pro2-4 pGSH1</i> Ura ⁺ Hyg ^r | Este trabajo |
| CGM1625 CGM1626 | CGM1619 | <i>ura3Δ::</i> Tn903 Neo ^R (G418) <i>pro2-4</i> pGE59(<i>URA GSH1+</i>) <i>gsh1Δ</i> | <i>pro2-4 pGSH1</i> Ura ⁺ Hyg ^r | Este trabajo |
| CGM1627 <i>gsh1Δ pro2-4 R</i> | CGM1625 | <i>ura3Δ::</i> Tn903 Neo ^R (G418) <i>pro2-4</i> <i>gsh1Δ</i> | <i>gsh1Δ pro2-4 Ura⁻</i> Hyg ^r | Este trabajo |
| CGM1629 <i>gsh1Δ pro2-4 R</i> | CGM1626 | <i>ura3Δ::</i> Tn903 Neo ^R (G418) <i>pro2-4</i> <i>gsh1Δ</i> | <i>gsh1Δ pro2-4 Ura⁻</i> Hyg ^r | Este trabajo |

2. Plásmidos.

Los plásmidos utilizados en este trabajo se describen en la tabla 5.

Tabla 5. Plásmidos

| Plásmido | Descripción o genotipo relevante | Referencia |
|----------------|---|----------------------------------|
| pGEM-T | Vector de clonación. Amp ^r | Promega |
| pYIp/lac211 | Vector de clonación integrativo. <i>URA3</i> Amp ^r | (Gietz & Sugino, 1988) |
| pGRB2.0 | Vector de clonación replicativo. <i>CgCEN/ARS URA3</i> Amp ^r | (Domergue, <i>et al.</i> , 2005) |
| pGRB2.2 | Vector de clonación replicativo. | (Domergue, <i>et al.</i> , 2005) |
| pAR1 | Vector de clonación replicativo. <i>CgCEN/ARS NAT</i> Amp ^r | Colección del laboratorio |
| pLS9 | Vector replicativo que expresa el gen <i>ScFLP1</i> para escindir marcadores de selección. <i>P_{EPA1}::FLP1::(3'UTR_{HIS3}) CgCEN/ARS NAT</i> Amp ^r | Colección del laboratorio |
| pMZ21 | Vector replicativo que expresa el gen <i>ScFLP1</i> para escindir marcadores de selección. <i>P_{EPA1}::FLP1::(3'UTR_{HIS3}) CgCEN/ARS URA3</i> Amp ^r | Colección del laboratorio |
| pGE25 | Producto de PCR (#157/#158) de 1036pb correspondiente al 3'UTR del ORF de <i>GSH1</i> digerido con <i>Hind</i> III/ <i>Kpn</i> I y clonado en pGEM-T. Amp ^r | Este trabajo |
| pGE27 | Producto de PCR (#154/#155) de 747pb correspondiente a la región promotora 5'del ORF de <i>GSH1</i> digerido con <i>Sac</i> I/ <i>Bam</i> H I y clonado en pMB11. Cm ^r | Este trabajo |
| pGE29 | Fragmento <i>Hind</i> III/ <i>Kpn</i> I de 1036pb cortado de pGE25 y clonado en pAP599 digerido con <i>Hind</i> III/ <i>Kpn</i> I. Amp ^r | Este trabajo |
| pGE31 | Fragmento <i>Sac</i> I/ <i>Bam</i> H I de 747pb cortado de pGE27 y clonado en pGE29 digerido con <i>Sac</i> I/ <i>Bam</i> H I. Amp ^r [5' <i>GSH1</i> :: <i>hph</i> ::3'UTR <i>GSH1</i>] <i>URA3</i> Amp ^r Construcción para interrumpir el gen <i>GSH1</i> por pop in pop out | Este trabajo |
| pGE56 | Producto de PCR (#155/#158) de 3.9kb correspondiente al gen <i>GSH1</i> con sus regiones intergénicas clonado en pGEM-T. Amp ^r | Este trabajo |
| pGE59 | Fragmento <i>Sac</i> I/ <i>Kpn</i> I de 3.9kb obtenido de pGE56 digerido con <i>Sac</i> I/ <i>Kpn</i> I y clonado en pGRB2.0 digerido con <i>Sac</i> I/ <i>Kp</i> nI | Este trabajo |
| pGE62 | Producto de PCR (#711/#716) de 1.4kb correspondiente al gen <i>PRO2</i> de la cepa BG14 clonado en pMB11 digerido con <i>Stu</i> I. Cm ^r | Este trabajo |
| pGE64 | Producto de PCR (#711/#716) de 1.4kb correspondiente al gen <i>PRO2</i> de la cepa CGM814 clonado en pMB11 digerido con <i>Stu</i> I. Cm ^r | Este trabajo |
| pGE66 pGE67 | Producto de PCR (#728/#729) de 3kb correspondiente al gen <i>OPT1</i> de la cepa L-105 (<i>S. cerevisiae</i>) clonado en pGR2.2 digerido con <i>Xba</i> I/ <i>Sal</i> I. Amp ^r | Este trabajo |
| pGE68 pGE69 | Producto de PCR (#733/#732) de 3kb correspondiente al gen <i>OPT1</i> de la cepa L-105 (<i>S. cerevisiae</i>) clonado en pGR2.2 digerido con <i>Xba</i> I/ <i>Xho</i> I. Amp ^r | Este trabajo |
| pGE70 pGE71 | Producto de PCR (#791/#793) de 3.436kb correspondiente al gen CAGLOF07293g de la cepa BG14 clonado en pGEM-T. Amp ^r | Este trabajo |

| | | |
|----------------|--|--------------|
| pGE72 pGE73 | Fragmento <i>EcoR</i> I/ <i>Sal</i> I de 3.230kb obtenido de pGE70 clonado en pGRB2.0 digerido con <i>EcoR</i> I/ <i>Sal</i> I | Este trabajo |
| pGE74 pGE75 | Fusi6n obtenida por PCR para interrumpir el gen CAGLOF07293g par6logo de <i>ScOPT1</i> y <i>ScOPT2</i> de 3.9kb (#790/#794) clonado en pGEM-T. Amp ^r | Este trabajo |
| pGE76 | Producto de PCR (#791/#793) de 2.5kb correspondiente a CAGLOF07293g par6logo de <i>ScOPT1</i> y <i>ScOPT2</i> clonado en pGRB2.2 digerido con <i>Spe</i> I/ <i>Sal</i> I. Amp ^r | Este trabajo |
| pGE77 | Producto de PCR (#155/#158) de 3.845kb correspondiente al gen <i>GSH1</i> de la cepa BG14 clonado en pYlp <i>lac211</i> digerido con <i>Sac</i> I/ <i>Kpn</i> I. Amp ^r | Este trabajo |
| pGE78 pGE79 | Producto de PCR (#716/#711) de 1.4kb correspondiente al gen <i>PRO2</i> de la cepa CGM814 clonado en pYlp <i>lac211</i> digerido con <i>Sac</i> I/ <i>Kpn</i> I. Amp ^r | Este trabajo |
| pGE80 | Producto de PCR (#762/#763) de 1.353kb correspondiente al gen <i>URA3</i> de la cepa L-105 clonado en pMB11 digerido con <i>Stu</i> I. Cm ^r | Este trabajo |
| pGE81 pGE82 | Producto de PCR (#604/#605) de 1.4kb correspondiente al gen <i>URA3</i> clonado en pAP379 digerido con <i>Sac</i> I/ <i>Sal</i> I. Amp ^r | Este trabajo |
| pGE83 pGE84 | Producto de PCR (#716/#1005) de 1.75kb correspondiente al gen <i>PRO2</i> de la cepa CGM814 clonado en pYlp <i>lac211</i> digerido con <i>Sac</i> I/ <i>Kpn</i> I. Amp ^r | Este trabajo |
| pGE85 | Producto de PCR (#1091/#1093) de 1.7kb correspondiente al gen <i>PRO1(B)</i> de la cepa CGM814 clonado en pMB11 digerido con <i>Stu</i> I. Cm ^r | Este trabajo |
| pGE86 pGE87 | Producto de PCR (#1091/#1093) de 1.7kb correspondiente al gen <i>PRO1(B)</i> de la cepa BG14 clonado en pMB11 digerido con <i>Stu</i> I. Cm ^r | Este trabajo |
| pGE88 pGE89 | Producto de PCR (#1090/#1088) de 1.7kb correspondiente al gen <i>PRO1(A)</i> de la cepa CGM814 clonado en pMB11 digerido con <i>Stu</i> I. Cm ^r | Este trabajo |
| pGE90 pGE91 | Fragmento de 2.6kb correspondiente al gen <i>PRO2</i> m6s sus regiones interg6nicas de la cepa BG14 clonado en pAR1 digerido con <i>Pst</i> I/ <i>Kpn</i> I. Amp ^r | Este trabajo |
| pGE92 pGE93 | Fragmento de 2.6kb correspondiente al gen <i>PRO2</i> m6s sus regiones interg6nicas de la cepa CGM814 clonado en pAR1 digerido con <i>Pst</i> I/ <i>Kpn</i> I. Amp ^r | Este trabajo |
| pGE94 pGE95 | Producto de PCR (#1090/#1088) de 1.7kb correspondiente al gen <i>PRO1(A)</i> de la cepa BG14 clonado en pMB11 digerido con <i>Stu</i> I. Cm ^r | Este trabajo |

3. Oligonucleotidos. Los oligonucleótidos fueron sintetizados por Elim Biopharmaceuticals, Inc. La tabla 6 describe los oligonucleótidos que se utilizaron para la construcción de plásmidos y productos de fusión por PCR y para el diagnóstico de mutaciones.

Tabla 6. Oligonucleótidos usados en este trabajo

| # | Nombre | Secuencia 5' → 3' | Sitio |
|-----|--|---|-----------------|
| 13 | pUC Fw | GGCGATTAAGTTGGGTAACGCCAGGG | — |
| 14 | pUC Rv | TATGTTGTGTGGAATTGTGAGCGGA | — |
| 15 | P-PGK Rv out | CGATAAGAGGCCACGTGCTTTATG | — |
| 16 | 3'UTR <i>HIS3</i> Fw out | AGAAATACGCACGAACACGATATAGAGG | — |
| 17 | pUC Rv2 | GGAAACAGCTATGACCATGA | — |
| 154 | <i>GSH1</i> @-14 <i>BamH</i> I Rv | GCTGGATCCAGTCTGCTCCAGTCC | <i>BamH</i> I |
| 155 | <i>GSH1</i> @-768 <i>Sac</i> I Fw | CCAGGAGCTCCCAGGTGCCATCAAACCTACC | <i>Sac</i> I |
| 157 | <i>GSH1</i> @+10 <i>Hind</i> III Fw | CCCAAGCTTTTTTAAAGACATCCCCG | <i>Hind</i> III |
| 158 | <i>GSH1</i> @+1052 <i>Kpn</i> I Rv | CCGGGTACCGTTACATTTAGAAATAGC | <i>Kpn</i> I |
| 165 | MCS <i>PGK</i> Fw | GACTCACTATAGGGCGAATTGG | — |
| 166 | MCS <i>HIS3</i> UTR Rv | CGGAATTAACCCTCACTAAAGG | — |
| 167 | <i>GSH1</i> @-17pb <i>PGK</i> out32pb Rv | GGTGGAGCTCCAATTCGCCCTATAGTGAGTCGCTCCCAGTCC TGCTCCAGTCC | — |
| 169 | <i>GSH1</i> @+10pb <i>HIS3</i> out32pb Fw | GCTTTTGTTCCCTTTAGTGAGGGTTAATTCCGACTTTTTTAAAG ACATCCCCG | — |
| 170 | <i>GSH1</i> @+1057pb Rv | GGTATGGGCCAGTTACATTTAG | — |
| 508 | <i>GSH1</i> @-956pb Fw | CCAGGTTCCGCAGCGTCAAG | — |
| 509 | <i>GSH1</i> @-1029pb Fw | TTCGATCGCGAGTTGGACC | — |
| 521 | <i>GSH1</i> @67pb Fw | GGAACGAGGGTGTGAGC | — |
| 522 | <i>GSH1</i> @301pb Rv | ATGAACCGCCCGTACTCC | — |
| 634 | <i>GSH2</i> @-74 <i>BamH</i> I Rv | GCTGGATCCGGTATCTTCGGTAAAGACAAGC | <i>BamH</i> I |
| 635 | <i>GSH2</i> @-74pb <i>PGK</i> out32pb Rv | GGAGCTCCAATTCGCCCTATAGTGAGTCGGTATCTTCGGTAA AGACAAGC | — |
| 636 | <i>GSH2</i> @-985 <i>Sac</i> I Fw | CAAGAGCTCGTATGGTATAGATCCAGCCGC | <i>Sac</i> I |
| 637 | <i>GSH2</i> @-985 Fw | CGTATGGTATAGATCCAGCCGC | — |
| 638 | <i>GSH2</i> @-1018pb Fw | GATGCAGAGTAAACTGGGGGTGAC | — |

| | | | |
|-----|--|---|-----------------|
| 639 | <i>GSH2@+42 Hind III Fw</i> | CCCAAGCTTAGATAAACGATAATGGTGGC | <i>Hind III</i> |
| 640 | <i>GSH2@+43pb HIS3out32pb Fw</i> | TTTGTCCCTTTAGTGAGGGTTAATTCCGAAGATAAACGATAA TGGTGGC | — |
| 641 | <i>GSH2@+925 Kpn I Rv</i> | CCGGGTACCATCTCTGAGAGTTCGCTGG | <i>Kpn I</i> |
| 642 | <i>GSH2@+925pb Rv</i> | CATCTCTGAGAGTTCGCTGG | — |
| 643 | <i>GSH2@+1137pb Rv</i> | CACTCCAGTATTAGATCACGC | — |
| 644 | <i>GSH2@544pb Fw</i> | CCAGTTCCAACCTCTGTTCAGG | — |
| 645 | <i>GSH2@718pb Rv</i> | CACGGATACCATAGTCCTTTGAAGG | — |
| 728 | <i>OPT1@+693pb Sal I Rv</i> | GAAGTCGACGATGTAGTTATAGTTG | <i>Sal I</i> |
| 729 | <i>OPT1@1pb Xba I Fw</i> | GCATCTAGAAAAATGAGTACCATTATAGGGAG | <i>Xba I</i> |
| 730 | <i>OPT1@214pb Fw</i> | GGTCTCGTTTGAAGGGCGAC | — |
| 731 | <i>OPT1@701pb Rv</i> | CTTCTGGTAAGACCTGCAGACC | — |
| 732 | <i>OPT2@+500pb Xho I Rv</i> | AGCTCGAGGCTTCAACCGGAGTAATC | <i>Xho I</i> |
| 733 | <i>OPT2@1pb Xba I Fw</i> | GCATCTAGAAAAATGAGTGAAACAGTCAAAG | <i>Xba I</i> |
| 734 | <i>OPT2@122pb Fw</i> | CTCAGTGGTATACGGATGAACAG | — |
| 735 | <i>OPT2@682pb Rv</i> | CATACTTTCTGCCCTGATGG | — |
| 762 | <i>ScURA3@+184bpFRT Rv</i> | CCTGAAGTTCCTATTCTCTAGAAAGTATAGGAACCTCGTTCTG GCGAGGTATTGG | <i>FRT</i> |
| 763 | <i>ScURA3@-296bpFRT Fw</i> | CCTGAAGTTCCTATACTTTCTAGAGAATAGGAACCTCGAGGCA TATTATGGTGAAGG | <i>FRT</i> |
| 790 | <i>CAGL0F07293g@-843pb Fw</i> | TGACGGCAATATTCCTAAAAAC | — |
| 791 | <i>CAGL0F07293g@-879pb Spe I Fw</i> | CAAAC TAGTGCTACCAGTACGCATATATCTGC | <i>Spe I</i> |
| 792 | <i>CAGL0F07293g@+72pb HIS3out32pb FW</i> | TTTGTCCCTTTAGTGAGGGTTAATTCCGACGTATAGACCAGC CGATATG | — |
| 793 | <i>CAGL0F07293g@+625pb Sal I Rv</i> | AAAGTCGACCTACGCGAGGATGC | <i>Sal I</i> |
| 794 | <i>CAGL0F07293g@+902pb Rv</i> | CCCATTCTGCTTTACTTGTCCC | — |
| 795 | <i>CAGL0F07293g@+958pb Rv</i> | ATAATCTTTCTGTCTTTGTTGAC | — |
| 796 | <i>CAGL0F07293g@294pb FW</i> | ACAGGCCCTTAGCTCTAGGT | — |
| 797 | <i>CAGL0F07293g@640pb Rv</i> | GGATCCATTCTGAGTACCTCC | — |
| 816 | <i>CAGL0F07293g@ Xho I Rv</i> | CGCCTCGAGCATCTTTCATGGTATTATTTATG | <i>Xho I</i> |
| 817 | <i>CAGL0F07293g@1pb Xba I Fw</i> | GCATCTAGAAAAATGACTTCTACCAAGACAG | <i>Xba I</i> |



| | | | |
|-----|---|---|---|
| 819 | <i>PRC1</i> @-64pb <i>PGKout32pb</i> Rv | GGTGGAGCTCCAATTCGCCCTATAGTGAGTCGTAAGACAGG CAGATATACCAA | — |
| 820 | <i>PRC1</i> @-792pb Fw | GACACCTTGACATCCGAGAGCCTG | — |
| 821 | <i>PRC1</i> @-831pb Fw | GAGGCAGTACGGATCTTCAGACG | — |
| 822 | <i>PRC1</i> @+39pb <i>HIS3out32pb</i> Fw | GCTTTTGTTCCCTTAGTGAGGGTTAATTCCGAGGCTTCTATG CTTTAATTTTTTACC | — |
| 823 | <i>PRC1</i> @+871pb Rv | GGCTCACCTTTGTCTTCGTGATTGGG | — |
| 824 | <i>PRC1</i> @+959pb Rv | CGCTTAGAAGTGAACACGGTGGTACC | — |
| 825 | <i>PRC1</i> @592pb Fw | CTGTCGCCGCCGGTAAGGATGTC | — |
| 826 | <i>PRC1</i> @819pb Rv | CTGTATTGGGTCAATGGGTCAGTC | — |
| 909 | <i>PRO2</i> @+60 <i>sacB19pb</i> FW | CACGGCTACCACATCGTCTTTGAGAAAAATAACAAAAGCAA ATG | — |
| 910 | <i>PRO2</i> @+905pb Rv | GCATAAAACTCCGGAAGGGC | — |
| 911 | <i>PRO2</i> @+963pb Rv | CAACTCCAAGTATGCCACTGT | — |
| 912 | <i>PRO2</i> @-28 <i>sacB24pb</i> Rv | CGAATTCAGGAACCTTGATATTTTTTACACACTGCTTGAGAAT CAATGT | — |
| 913 | <i>PRO2</i> @-875pb Fw | GGTCTCGATGTTAACCGATTAC | — |
| 914 | <i>PRO2</i> @-970pb Fw | CAAGTACGACAGCGAGGTCAG | — |
| 915 | <i>PRO2</i> @1215pb Fw | CAAAGGTGACAAGTTCGATG | — |
| 916 | <i>YOR1</i> @+30 <i>sacB19pb</i> Fw | CACGGCTACCACATCGTCTTTGATTTGACAATAGATAGAAATC GGA | — |
| 918 | <i>YOR1</i> @+863pb Rv | CTGTGCTATGAGAGCCTGGGG | — |
| 919 | <i>YOR1</i> @+951pb Rv | GTGAAACTGGCTGGCCAACC | — |
| 920 | <i>YOR1</i> @-45 <i>sacB24pb</i> Rv | CGAATTCAGGAACCTTGATATTTTTTAACACACAAGTAACCCTT CCC | — |
| 921 | <i>YOR1</i> @-831pb Fw | CACGTGACAAGATTGTTAACTAAG | — |
| 922 | <i>YOR1</i> @-920pb Fw | CCACATAGCAAACACGCAAC | — |
| 924 | <i>YOR1</i> @843pb Fw | CCACGCCTCTCAAGTTACTG | — |
| 925 | <i>YOR1</i> @1165pb Rv | CGATTCTTAGCCCCAAAATC | — |
| 926 | <i>DUG2</i> @+20 <i>sacB19pb</i> Fw | CACGGCTACCACATCGTCTTTGATTAGGCTAGTAACTCTCCAA TTG | — |
| 927 | <i>DUG2</i> @+770 Rv | CCACGTAGCCCATATTGTATTAATG | — |
| 928 | <i>DUG2</i> @+902 Rv | CTCGTTATTGCTCTTGCTATCC | — |
| 929 | <i>DUG2</i> @-38 <i>sacB24pb</i> Rv | CGAATTCAGGAACCTTGATATTTTTATAGTGGTTGCTGTCGTT GG | — |
| 930 | <i>DUG2</i> @-762 Fw | CCATATTATAATCCTTCGGCGTGAC | — |
| 931 | <i>DUG2</i> @408 Fw | CGCAAGCTTGCTATTCTTAGAG | — |
| 932 | <i>DUG2</i> @-904 Fw | CACTTGCCTCGCTTTGTATCCTACC | — |
| 933 | <i>DUG2</i> @740 Rv | CCACATTTGTGTCATCAGATCTCTG | — |
| 934 | <i>TRR1</i> @-25pb <i>sacB24bp</i> Rv | CGAATTCAGGAACCTTGATATTTTTGTGGACGACACGGTGGATA TG | — |
| 935 | <i>TRR1</i> @-930pb Fw | CCACTAGATCTCTCTGGCTAAC | — |



| | | | |
|------|---------------------------------------|--|---|
| 936 | <i>TRR1</i> @-974bp Fw | GGTAGTAGGCTCAGCAACTCT | — |
| 937 | <i>TRR1</i> @+9bp <i>sacB</i> 19bp Fw | CACGGCTACCACATCGTCTTTGCAGTATATAATGTTGCAGTTT ATC | — |
| 938 | <i>TRR1</i> @+860bp Rv | CTGTTCAAGTCGAGGATAAGG | — |
| 939 | <i>TRR1</i> @+997bp Rv | CTGGATATATGGACCATGAAG | — |
| 940 | <i>TRR1</i> @312bp Fw | CGAAGATGGCGAACCAATTAC | — |
| 941 | <i>TRR1</i> @511bp Rv | GAACCGTATTTAGTCAAGAACTC | — |
| 1088 | <i>PRO1A</i> @+122pb Rv | CAATAATTCAAGACAATGAACG | — |
| 1089 | <i>PRO1A</i> @592pb Fw | GTTCCAGACCTGTCCAAAG | — |
| 1090 | <i>PRO1A</i> @-49pb FW | CAGTTGTCATTTCTAGTTGCTG | — |
| 1091 | <i>PRO1B</i> @+292pb Rv | CAAGGACATCATGAATAGCTCT | — |
| 1092 | <i>PRO1B</i> @555pb Fw | GCCCATAGTCATCGTCCCAA | — |

4. Transformación genética de *C. glabrata*

Para la transformación genética de *C. glabrata* se utilizó una modificación de método de transformación con acetato de litio (LiAcO) (Gietz, *et al.*, 1992). Cada cepa a transformar se creció en medio YPD durante una noche. Se inocularon 500 μ L del cultivo a 50 mL de YPD y se incubó con agitación hasta alcanzar una OD de 1. Las células se colectaron por centrifugación y se lavaron con 50 mL de agua estéril. Se concentraron en LiAcO 0.1M y se hicieron alícuotas de 50 μ L. Para cada transformación, a una alícuota de células se añadieron 240 μ L de polietilenglicol al 50% (Fluka Biochemica (PM400)), 36 μ L de LiAcO 1M, 25 μ L de ADN de esperma de salmón de cadena sencilla 2 mg/mL (Invitrogen) desnaturalizado por calor y el ADN a transformar resuspendido en 50 μ L de Tris 10mM. La mezcla se incubó a 30°C durante 45 min y se añadieron 43 μ L de DMSO. Se aplicó un choque térmico de 45°C por 15 min. Las células se centrifugaron para retirar la mezcla de transformación y se resuspendieron en agua o YPD (de acuerdo al tipo de selección). Para la selección de transformantes que complementen la auxotrofia por uracilo, las células se resuspendieron en 1 mL de agua y se sembraron tres cajas de medio CAA. Para la selección con higromicina o nourseotricina, las células se resuspendieron en 1 mL de medio YPD y se incubaron durante 4 h a 30°C en agitación y se sembraron tres cajas con medio YPD Hyg o Nat correspondiente. Las cajas se incubaron a 30°C durante 48 h ó más.

Cuando aparecieron transformantes se tomaron 8-16 colonias y se purificaron dos veces en el medio de selección correspondiente. Se analizó su función mitocondrial estriando en cajas de YPG. Se hizo PCR de colonia para diagnosticar la modificación genética correspondiente. De las colonias positivas se extrajo ADN genómico para confirmar la modificación genética.

En el caso de recombinación en dos pasos, las clonas confirmadas para la integración del ADN en el cromosoma, se resolvieron en YPD haciendo 3 pases y sembrando en cajas de YPD. Cuando aparecieron colonias se hizo replica a las cajas correspondientes en cajas de 5FOA donde las células Ura⁺ no crecen en este medio. Las segregantes se diagnosticaron para la modificación genética correspondiente.

5. Ensayos de sensibilidad

Exposici3n cr3nica. Se pusieron prein3culos de las cepas de *C. glabrata* durante una noche en medio YPD a 30 3C. Se inocul3 medio fresco y el cultivo se incub3 a 30 3C durante 48 h. Las c3lulas se lavaron con agua est3ril y se ajust3 la densidad celular a 1×10^7 c3lulas/mL. Se hicieron diluciones logar3tmicas y 5 μ L de cada diluci3n se colocaron en cajas con medio YPD con diferentes concentraciones del compuesto a analizar (ver medios de cultivo para levadura). Las cajas se incubaron a 30 3C.

Ensayos de adaptaci3n a H₂O₂. Las diferentes cepas de *C. glabrata* se crecieron en medio YPD a 30 3C durante una noche. Se diluyeron en medio YPD fresco y se crecieron durante 9 duplicaciones hasta que alcanzaron una densidad celular de 1×10^7 c3lulas/mL. Las c3lulas se expusieron a la concentraci3n de H₂O₂ indicada por 3 h. Para los experimentos de adaptaci3n, las c3lulas se pretrataron con una dosis subletal de H₂O₂ durante 1 h, se a3adieron diferentes dosis letales y se incubaron por 2 h m3s. El H₂O₂ se removió por centrifugaci3n. Las c3lulas se resuspendieron en agua destilada est3ril y se ajustaron a una densidad celular de 1×10^7 c3lulas/mL cuando fue necesario. Se hicieron diluciones logar3tmicas y 5 μ L de cada diluci3n se colocaron en placas con medio YPD. Las placas se incubaron a 30 3C.

6. Curvas de crecimiento

En las cepas de inter3s se analiz3 el crecimiento en diferentes medios. Todas las cepas se crecieron a 30 3C hasta que llegaron a saturaci3n (48 h). Las c3lulas se lavaron con agua destilada est3ril y se ajust3 la densidad celular a 0.01 (1×10^5 c3lulas/mL). Se tomaron 300 μ L de cada suspensi3n celular y se colocaron en microplacas colmena de 100 pozos por duplicado para analizar el crecimiento a 30 3C en agitaci3n constante a 600nm en el equipo BIOSCREEN C (Growth Curves Ab Ld) durante 24 3 96 h seg3n el medio en el que se deseaba evaluar el crecimiento. Se tomaron lecturas cada 15 min. A cada valor se le resto la lectura del blanco respectivo (el medio de cultivo sin levaduras) y se determin3 el tiempo de duplicaci3n.

7. Evaluaci3n de la p3rdida de pl3smidos

Para medir la poblaci3n celular que pierde el pl3smido de inter3s, las cepas se crecieron durante una noche a 30 3C en los medios YPD, CAA o YNB (con o sin GSH a diferentes concentraciones) y se reinocularon hasta tres veces en el medio fresco correspondiente. Los cultivos se diluyeron apropiadamente y se sembraron en cajas de YPD, en cajas con medio de selecci3n para el pl3smido (CAA) y en cajas con medio de contraselecci3n para el pl3smido (5-FOA). Las cajas se incubaron a 30 3C por 48 h y se contaron el total de colonias en los tres tipos de cajas. La relaci3n del n3mero de colonias en el medio 5-FOA con respecto al medio YPD es la fracci3n de c3lulas que perdieron el pl3smido.

8. Cuantificaci3n de GSH.

Para determinar el contenido de GSH las diferentes cepas se crecieron durante una noche a 30 3C en los medios YPD, CAA, YNB, YNB_rN o YNB_rS sin o suplementados con prolina y/o GSH. Se inocul3 medio fresco correspondiente y los cultivos se incubaron durante 48 h a 30 3C. Se ajust3 la densidad celular a 3×10^8 c3lulas/mL y se lavaron dos veces con pH 7 y se resuspendieron en 300 μ L de 3cido sulfosalic3lico al 5% (w/v) y se mezclaron con un volumen similar de perlas de zirconio. Las c3lulas se homogenizaron mezclando en vortex a 4 3C durante 10 min con pausas intermitentes. Los lisados se centrifugaron a 15000 **g** por 1 h. Se tomaron 200 μ L del sobrenadante, se hicieron las diluciones correspondientes y 10 μ L se utilizaron para cuantificar glutati3n total (GSX). La cuantificaci3n se hizo con un m3todo enzim3tico que usa DTNB [5,5'-ditiobis-(2-3cido nitrobenzoico)] y la enzima glutati3n reductasa (Anderson, 1985). Para determinar el contenido de GSH en el sobrenadante de los cultivos celulares separamos 10 μ L del sobrenadante correspondiente y se analiz3 como se describe arriba.

9. An3lisis bioinform3ticos

Las secuencias g3nicas y proteicas de *C. glabrata* se extrajeron de la base de datos del proyecto Genolevures (<http://www.genolevures.org/cagl.html>); las de *S. cerevisiae* de SGD (<http://www.yeastgenome.org/>). Los alineamientos se hicieron por el m3todo ClustalW (Higgins, *et al.*, 1996) con el programa MacVector (Accelrys). La informaci3n sobre la sintenia se realiz3 utilizando el servidor de yeast order browser (<http://wolfe.gen.tcd.ie/ygob/>) (Scannell, *et al.*, 2011).

10. Transformaci3n de *E. coli*

La transformaci3n de bacterias se hizo por electroporaci3n. Las c3lulas electrocompetentes se describen en la tabla 2. Se mezclaron las c3lulas bacterianas con el ADN a transformar, la mezcla se coloc3 en una celda de electroporaci3n de 1 mm (BIORAD®) y se le aplic3 un pulso el3ctrico (1800 V, 200 mA, 50 F) con un electroporador GenePulser Xcell Electroporation System (BIORAD®). Las c3lulas se resuspendieron en 1 mL de SOC y se incubaron a 30 °C durante 1 h. Las c3lulas se sembraron en cajas de LB con el antibi3tico correspondiente y se incubaron una noche a 30 °C.

El diagn3stico de las construcciones se hizo por PCR de colonia. Una vez confirmadas se resguardaron dos colonias independientes en glicerol al 10% a -80°C. Los pl3smidos se extrajeron mediante los kits comerciales QIAprep o Promega, y se analiz3 el patr3n de restricci3n con endonucleasas para confirmar la presencia del inserto. Todas las enzimas de restricci3n utilizadas en este trabajo son de New England BioLaboratories®.

11. Extracci3n de ADN gen3mico de *C. glabrata*.

Las cepas se incubaron durante una noche en medio YPD. Las c3lulas se colectaron por centrifugaci3n y se resuspendieron en 500 µL de la soluci3n A (Tris 0.05 M, EDTA 0.01 M, NaCl 0.15 M, Triton 1% y SDS 1%). Se adicionaron 500 µL de fenol:cloroformo:alcohol isoam3lico (Fluka Biochemicals®) (24:24:1) y se incubaron a 44 °C por 30 min agitando ocasionalmente. Se centrifug3 y se colect3 la fase acuosa PCR, a la cual se le a±adieron 50 µL del amortiguador A sin detergente con RNasa (AMBION®), y se incub3 por 30 min a 44 °C. Para la precipitaci3n del ADN se a±adieron 15 µL de NaCl 5 M y un volumen de etanol fr3o al 100%. La pastilla de ADN se lav3 con etanol fr3o al 70%, se sec3 a temperatura ambiente y se resuspendi3 en Tris 10 mM con RNasa.

12. Precipitaci3n de ADN con fenol:cloroformo:alcohol isoam3lico y precipitaci3n con etanol

Para eliminar prote3nas y sales del ADN, la muestra se llev3 a un volumen de 110 μL con agua miliQ y se a3adieron 42 μL de acetato de amonio 8.3 M (concentraci3n final 2.5 M). Se agreg3 un volumen equivalente de fenol:cloroformo:alcohol isoam3lico (Fluka Biochemicals®) (24:24:1) y se agit3 vigorosamente. Por centrifugaci3n se separ3 la fase acuosa y se transfiri3 a un tubo con un 1 μL de gluc3geno (Roche®). Se agregaron 2.5 vol3menes de etanol fr3o al 100% y se incub3 a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 20 min. El ADN se concentr3 por centrifugaci3n y la pastilla de ADN se lav3 con etanol fr3o al 70%, se sec3 a temperatura ambiente y se resuspendi3 en Tris 10 mM.

13. Construcci3n de mutantes de *C. glabrata*. Las mutantes nulas que se generaron en este estudio (excepto en las que se interrumpi3 el gen GSH1 utilizando el pl3smido pGE31) se construyeron por un solo evento de doble recombinaci3n hom3loga utilizando productos de fusi3n por PCR de acuerdo a (Kuwayama, *et al.*, 2002). Se llevaron a cabo dos rondas de PCR: en la primera de ellas, las regiones 5' y 3' del gen a interrumpir y el cassette de selecci3n se amplificaron con una enzima de alta fidelidad y los productos de PCR se purificaron con el kit comercial de QIAGEN. En la segunda ronda de PCR los tres fragmentos se fusionan utilizando el oligo Fw que se utiliz3 para amplificar el fragmento de la regi3n 5' y el oligo Rv que se utiliz3 para amplificar el fragmento de la regi3n 3'. El producto obtenido en la fusi3n que se utiliza para la transformaci3n de *C. glabrata*.

14. Cuantificaci3n de ADN.

El ADN se cuantific3 por espectrometr3a utilizando el equipo NANODROP 2000 (ThermoScientific®).

15. Reacci3n en cadena de la polimerasa (PCR).

Para amplificar fragmentos de ADN destinados a fusi3n por PCR, clonaci3n o secuenciaci3n se utilizaron las enzimas Expand Long Template PCR System (Roche®), Phusion® Hot Start High-Fidelity ADN Polymerase (Finnymes) y iProof High-Fidelity ADN Polymerase (Bio-Rad) de acuerdo a las condiciones sugeridas por el fabricante.

Para generar las construcciones de fusi3n se utilizaron las enzimas Expand Long Template PCR System (Roche®) y iProof High-Fidelity ADN Polymerase (Bio-Rad) de acuerdo a las condiciones sugeridas por el fabricante.

Para las reacciones de diagn3stico de modificaciones gen3ticas, se utiliz3 la enzima Taq Amplificasa® de la UNAM de acuerdo a las condiciones sugeridas por el fabricante.

16. Cuantificaci3n de prolina.

La determinaci3n del contenido intracelular de L-prolina se realiz3 como se ha descrito previamente (Bates, *et al.*, 1972). Las c3lulas se crecieron durante 48 h en YPD y 2×10^8 c3lulas se lavaron dos veces con agua. Se adicion3 1 mL de 3cido sulfosalic3lico al 5%. La suspensi3n se incub3 a 100 °C durante 10 min y se centrifug3 a 4 °C durante 5 min a 15000 xg. Se tomaron 800 μ L del sobrenadante en tubos de vidrio y se adicionaron 800 μ L de ninhidrina y 800 μ L de 3cido ac3tico glacial. Se incub3 a 100 °C durante 1 h y la reacci3n se detuvo en un ba3o de hielo. Se adicionaron 1600 μ L de tolueno y los tubos se agitaron por 20 seg. Se centrifug3 1 min y se tomaron 1200 μ L para medir la absorbancia a 520 nm en una celda de vidrio. La cantidad de prolina se determin3 con base a una curva de calibraci3n realizada simult3neamente.

17. Generaci3n de protoplastos de *C. glabrata*.

La generaci3n de protoplastos se hizo de acuerdo al m3todo descrito previamente con algunas modificaciones (Duell, *et al.*, 1964). Brevemente, 5 mL de un cultivo de *C. glabrata* en YNB sin o suplementado con GSH 0.5 mM, se inocularon en 50 mL del medio correspondiente y se incub3 a 30 °C hasta alcanzar una OD_{600nm} de 2-4. Las c3lulas se centrifugaron y se lavaron con agua est3ril. La pastilla celular se resuspendi3 con 20 mL de soluci3n de pretratamiento (Tris-HCl 10 mM, EDTA 5 mM, 2-mecaptoetanol 1%) y se incub3 a 30 °C a 80 rpm durante 30 min. La suspensi3n celular se centrifug3 a 3000 rpm durante 5 min y se adicionaron 10 mL de sorbitol 1 M. La pastilla se resuspendi3 con agitaci3n y se adicionaron 20 mL de amortiguador para generar protoplastos (sorbitol 1.2 M, enzimas l3ticas de trichoderma 5mg/mL pH=7.2 ajustado con amortiguador de fostatos). La suspensi3n celular se incub3 a 30 °C a 80 rpm durante 90 min. Se centrifug3 a 500 rpm durante 5 min y a la pastilla de protoplastos se lav3 dos veces con 5 mL de sorbitol 1 M centrifugando a 500 rpm durante 5 min. Los protoplastos se resuspendieron con agitaci3n suave en 5 mL de sorbitol 1 M.

18. Purificaci3n de prote3nas de membrana de *C. glabrata* por centrifugaci3n en gradiente de sacarosa.

La purificaci3n de las prote3nas de membrana se realiz3 como se ha descrito previamente (Cabezon, *et al.*, 2009). Los esferoblastos de *C. glabrata* se resuspendieron en 1mL de amortiguador de lisis (Tris-HCl 50 mM pH 7.5, EDTA 1 mM, NaCl 150 mM, DTT 1mM, PMSF 0.5 mM y c3ctel inhibidor de proteasas) y se lisaron mec3nicamente con 7 ciclos de 60 seg de agitaci3n y enfriamiento a 4 °C. Los lisados se centrifugaron durante 1 h a 13000 rpm a 4 °C. Se retir3 el sobrenadante y se adicionaron 600 mL de Na₂CO₃ 100 mM y se incub3 a 4 °C durante 1 h. Las muestras se resuspendieron en 200 μL de amortiguador de lisis con 200 μL con sacarosa al 12% y la mezcla se coloc3 sobre un gradiente continuo de sacarosa del 12 al 60% (nueve fracciones de 1.2 mL que corresponden a 12, 18, 24, 30,36, 42, 48, 54 y 60% de sacarosa). Los tubos se centrifugaron a 29500 rpm a 4 °C durante 3 h y se separ3 la banda densa presente entre las fracciones que corresponden a 42-48% del gradiente de sacarosa. Se adicion3 1 mL de Na₂CO₃ 100 mM y se incub3 a 4 °C toda la noche. Se centrifug3 a 4 °C a 13000 rpm durante 1 h. Las prote3nas de membranas se solubilizaron con 200 μL de amortiguador de

solubilizaci3n (urea 7 M, tiourea 2 M y CHAPS 4%). La precipitaci3n de prote3nas se hizo con TCA al 10%. Las muestras se centrifugaron a 13000 rpm durante 10 min a 4 3C y la pastilla se lav3 5 veces con 500 3L de acetona fr3a. Las pastillas se secaron a temperatura ambiente y las muestras se corrieron en un gel de poliacrilamida al 12%. Las prote3nas se revelaron con tinci3n por Coomassie coloidal como previamente se ha descrito (Candiano, *et al.*, 2004).

19. Determinaci3n del tiempo de vida cronol3gica de *C. glabrata*.

Los experimentos de viabilidad se hicieron como se ha descrito previamente con algunas modificaciones (Murakami, *et al.*, 2008). Brevemente, los cultivos de las cepas BG14 pGSH1, *gsh1*Δ pScOPT1, *gsh2*Δ pScOPT1 y *gsh1*Δ *gsh2*Δ pScOPT1 se crecieron durante 1 noche a 303C en medio YNB con GSH 0.05mM. Despu3s se inocularon en YNB sin GSH. En los tiempos indicados las c3lulas se lavaron con agua destilada est3ril y se ajust3 la densidad celular a 0.01 (1x10⁵ c3lulas/mL) en medio YPD. A los 1, 2, 3, 4, 6, 8, y 10 d3as, se tomaron 300 3L de cada suspensi3n celular y se colocaron en microplacas colmena de 100 pozos por duplicado para analizar el crecimiento a 30 3C en agitaci3n constante a una OD_{600nm} en el equipo BIOSCREEN C (Growth Curves Ab Ld) durante 24 h. Se tomaron lecturas cada 15 min. A cada valor se le rest3 la lectura del blanco respectivo (el medio de cultivo sin levaduras) y se determin3 el tiempo de duplicaci3n usando la pendiente de la curva semilogar3tmica de la OD en funci3n del tiempo. El tiempo 0 correspondi3 al d3a 3 de crecimiento. La sobrevivencia para cada cepa se calcul3 con la f3rmula:

$$v_n = \frac{1}{2^{\left(\frac{\Delta t_n}{\bar{\delta}}\right)}}$$

Donde v_n es la viabilidad en un punto n , Δt_n es la diferencia en tiempo en las curvas de crecimiento al tiempo n con respecto al tiempo 0 (3 d3as) en una OD_{600nm} de 0.5, y $\bar{\delta}$ es el promedio del tiempo de duplicaci3n calculado para cada cepa en cada d3a del experimento. Los valores v_n se graficaron para cada cepa para cada d3a a lo largo del experimento. Para mayores detalles consultar (Murakami, *et al.*, 2008).



20. An3lisis estad3sticos.

Todos los an3lisis estad3sticos se realizaron utilizando la prueba t student o ANOVA con el programa GraphPad Prims v5.



RESULTADOS

DOI: 10.1007/s00294-013-0390-1

The role of glutathione in the oxidative stress response in the fungal pathogen *Candida glabrata*.

Guadalupe Gutiérrez-Escobedo, Emmanuel Orta-Zavalza, Irene Castaño, and Alejandro De Las Peñas*.

IPICYT

Camino a la Presa San José 2055

División de Biología Molecular

Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica

San Luis Potosí, San Luis Potosí, 78216, México.



Running Title:

GSH and the oxidative stress response in *C. glabrata*

Key words: *Candida glabrata*, glutathione, Cd tolerance, *PRO2* suppressor, oxidative stress, catalase, thioredoxin

*Corresponding Author:

Alejandro De Las Peñas

Camino a la Presa San Jos3 2055

Divisi3n de Biolog3a Molecular

Instituto Potosino de Investigaci3n Cient3fica y Tecnol3gica

San Luis Potos3, San Luis Potos3, 78216, M3xico.

Phone: (52) 444 8342039. FAX: (52) 444 8342010.

E-mail: cano@ipicyt.edu.mx

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 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 (γ -glutamyl-cysteine synthetase) and Gsh2 (glutathione synthetase) enzymes. We first screened for suppressor mutations that would allow growth in the absence of *GSH1* (*gsh1 Δ background) and found a single point mutation in *PRO2* (*pro2-4*), a gene that encodes a γ -glutamyl phosphate reductase and catalyzes the second step in the biosynthesis of proline. We demonstrate that GSH is important in the oxidative stress response since the *gsh1 Δ *pro2-4* and *gsh2 Δ mutant strains are more sensitive to oxidative stress generated by H₂O₂ and menadione. GSH is also required for Cadmium (Cd) 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 orthologue, ScOpt1/Hgt1, however our genetic and biochemical experiments show that the *gsh1 Δ *pro2-4* and *gsh2 Δ 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 H₂O₂.*****

Introduction

In the last three decades, *C. 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 & 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, Roetzer, *et al.*, 2011). The robust oxidative stress response 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 cellular functions (Lopez-Mirabal & Winther, 2008). Living organisms have enzymatic (catalases, superoxide dismutases, and peroxidases) and non-enzymatic (thioredoxin and glutathione [GSH]) mechanisms to keep ROS and cysteine oxidation at physiological levels (Muller, 1991, Luikenhuis, *et al.*, 1998, Fernandes & Holmgren, 2004) In particular, phagocytic cells generate ROS to eliminate internalized pathogens (Mansour & Levitz, 2002), however, pathogens have coopted these well-conserved antioxidant mechanisms (enzymatic and non-enzymatic) to eliminate ROS and evade phagocyte defenses (Avery & Avery, 2001, Thorpe, *et al.*, 2004, Temple, *et al.*, 2005). It has been proposed that the oxidative stress response (synthesis and regulation of the antioxidant mechanisms) is related to virulence (Wysong, *et al.*, 1998, Hwang, *et al.*, 2002).

GSH, a tripeptide-like thiol-containing molecule (γ -L-glutamyl-L-cysteinyl-glycine) (Meister & Anderson, 1983) is found in many organisms. GSH is the main low-molecular weight-reducing molecule required to keep the redox homeostasis (Meister & Anderson, 1983, Carmel-Harel & Storz, 2000). GSH also participates in the detoxification of metal ions and xenobiotics; the regulation of the activity of many proteins by glutathionylation and it can also be used as a source of sulphur and nitrogen (Meister & Anderson, 1983, Penninckx & Elskens, 1993). GSH is essential in all eukaryotes so far studied (Penninckx, 2002, Toledano, *et al.*, 2007). The essential function of GSH is not due to the protection from oxidative stress it provides (Penninckx, 2002) but rather to its involvement in iron metabolism where GSH partners with glutaredoxins to assemble Fe-S clusters (Sipos, *et al.*, 2002, Kumar, *et al.*, 2011).

In *S. cerevisiae*, GSH is synthesized by the sequential action of Gsh1 (*GSH1*), the γ -glutamyl-cysteine synthetase, which catalyzes the first and rate limiting step in the conjugation of glutamate and cysteine; and Gsh2 (*GSH2*), the glutathione synthetase, which catalyzes the ATP-dependent synthesis of GSH from γ -glutamyl-cysteine and glycine (Grant, *et al.*, 1997). *S. cerevisiae* also contains other proteins involved in the GSH pathway, a glutathione reductase (*GLR1*), two classes of glutaredoxins (*GRX*) (Toledano, *et al.*, 2007), a high-affinity plasma membrane GSH transporter (*OPT1/HGT1*) (Bourbouloux, *et al.*, 2000, Hauser, *et al.*, 2000) and two kinds of peptidases for GSH degradation (*ECM38* and *DUG1-3*) (Jaspers, *et al.*, 1980, Kumar, *et*

al., 2003). In *S. cerevisiae*, the *gsh1*Δ mutant is non-viable, while the *gsh2*Δ mutant accumulate the γ-Glu-Cys intermediate which can partially substitute for GSH (Grant, *et al.*, 1997). Interestingly, it was found that mutations in the *PRO2* gene restored biosynthesis of very low levels of GSH by the abduction of the proline biosynthetic pathway (Spector, *et al.*, 2001, Toledano, *et al.*, 2007). *C. glabrata*, which is closely related to the yeast *S. cerevisiae*, shares many of the *S. cerevisiae* orthologues of the GSH pathway, and particularly, *GSH1* and *GSH2*. As in other organisms, *C. glabrata* is no exception and GSH is essential in this fungal pathogen (Yadav, *et al.*, 2011). Surprisingly, *C. glabrata* does not contain the *S. cerevisiae* high-affinity plasma membrane GSH transporter, ScOpt1/Hgt1 (Yadav, *et al.*, 2011).

In this work, we evaluated the role of GSH in the oxidative stress response in *C. glabrata*. We constructed mutants in the *GSH1* and *GSH2* genes and confirmed that *GSH1* is essential. *C. glabrata* cells show reduced viability in stationary phase once GSH has been depleted. Interestingly, we found a suppressor mutation, *pro2-4*, in the *PRO2* gene that allows the growth of *C. glabrata* in the absence of *GSH1*. We found that *gsh1*Δ *pro2-4* and *gsh2*Δ mutant strains are more sensitive to oxidative stress and to heavy metals and these phenotypes correlated with their reduced GSH concentration. Furthermore, in spite of the fact that *C. glabrata* does not contain the ScOpt1/Hgt1 orthologue, the *gsh1*Δ *pro2-4* and *gsh2*Δ mutant strains are able to take up GSH from the medium indicating the presence of a putative low affinity transporter for GSH. Finally, GSH and thioredoxin, in the absence of Cta1 (*cta1*Δ), are not essential for the adaptation response to H₂O₂. We show that GSH plays an important role in the oxidative stress response in *C. glabrata*.



Materials and Methods

Strains. All strains used this study are summarized in Table 1.

Plasmids. All plasmid used in this study are summarized in Table 2.

Primers. All primers used in this study are summarized in Table 3.

Media and Growth Conditions.

All overnight cell cultures were grown for 48 hr at 30°C. Yeast media were prepared as described previously (Sherman, *et al.*, 1986), and 2% agar was added for plates. Yeast extract-peptone-dextrose (YPD) medium contained yeast extract at 10 g/liter and peptone at 20 g/liter and was supplemented with 2% glucose. Synthetic complete medium (SC) was a mixture of yeast nitrogen base without (NH₄)₂SO₄ at 1.7 g/liter and NH₂SO₄ at 5 g/liter and was supplemented with 0.6% Casamino Acids, 2% glucose, and when needed, uracil at 25 mg/liter and 5-fluoroorotic acid (5-FOA) at 1.1 g/liter for 5-FOA plates (5-FOA, Toronto Research Chemicals). YNB medium was a mixture of yeast nitrogen base without (NH₄)₂SO₄, at 1.7 g/liter and (NH₄)₂SO₄ at 5 g/liter and was supplemented with 2% glucose. YPD plates were supplemented with hygromycin B (A. G. Scientific) at 460 µg/ml. Bacterial medium was prepared as described previously (Ausubel, 1992), and 1.5% agar was used for plates. Luria-Bertani medium contained yeast extract at 5 g/liter, Bacto peptone at 10 g/liter, and NaCl at 10 g/liter and was supplemented where needed with 50 µg/ml of carbenicillin (Invitrogen). All plasmid constructs were introduced into *Escherichia coli* DH10 by electroporation (Ausubel, 1992) and plasmids were purified with the Qiagen mini prep kit.

Transformation.

Yeast transformations with linear or supercoiled plasmid DNA were done as described previously (Castano, *et al.*, 2003).

Sequence analysis.

The amino acid sequence homology analysis was done by ClustalW alignment (Higgins, *et al.*, 1996) with MacVector (Accelrys).

Construction of mutant strains.

To construct all knockout mutations, we used the fusion PCR procedure (Kuwayama, *et al.*, 2002) and recombination of the PCR fragments by the one-step gene replacement. Briefly, for *gsh1*Δ (always in the presence of pGE59, pGSH1) and *gsh2*Δ mutants, 3 PCR fragments for each gene were amplified: the hygromycin cassette (primers 165/166), the promoter and 3'UTR regions of *GSH1* (primers for the promoter region 508/167 and primers for the 3'UTR region 169/509) and the promoter and 3'UTR regions of *GSH2* (primers for the promoter region 637/635 and primers for the 3'UTR region 640/642) (Table 3). These three fragments were linked by fusion PCR. All PCR products were purified using the Qiagen gel extraction kit. *C. glabrata* was then transformed with the fused PCR fragment and transformants were selected on YPD hygromycin plates. PCR analysis was done to confirm the structure of the deletion. The absence of each deleted gene was also verified by the inability to PCR amplify an internal fragment of the gene. The *pro2*Δ (primers for the promoter region 909/910 and primers for the 3'UTR region 912/913) and *trr1*Δ (primers for the

promoter region 934/935 and primers for the 3'UTR region 937/938) mutants were made in the same way as described above, but a *URA3* cassette was used instead of the hygromycin cassette and transformants were selected on SC -Ura plates. To screen for spontaneous *gsh1Δ* suppressors, the *gsh1Δ* mutation was recombine by the two-step gene replacement as described bellow. pGE31 was digested partially with *Hind III* and transformed into BG14. Transformants were selected and purified on SC-Ura plates and then screened for Ura- on SC+5-FOA plates as described. Ura⁺ cells die on SC-5-FOA. A single *gsh1Δ* sup⁺ mutant was isolated (*pro2-4*). The *pro2-4* mutation was cloned and introduced back in the BG14 strain by the two-step gene replacement. Briefly, the *pro2-4* was PCR amplified from strain CGM814 with primers 716/1005, and cloned into the integrative *URA3* plasmid, pYIplac211 (pGE83). pGE83 was cut with *Age I* enzyme and transformed into BG14. Transformants were selected and then purified onto SC-Ura plates. Single colonies were then grown on nonselective medium (YPD plates) and screened for Ura- on SC+5-FOA for the loss of the Ura marker. The 5-FOA^R colonies were purified on YPD plates. The presence of the *pro2-4* mutation was confirmed by sequencing of a PCR fragment amplified from the *pro2-4* region.

Growth rates of *C. glabrata* strains BG14, *gsh1Δ pro2-4* and *gsh2Δ* in the presence of GSH.

Saturated cultures of *C. glabrata* strains BG14, *gsh1Δ pro2-4* (CGM1627) and *gsh2Δ* (CGM873) were grown in YPD, YNB and YNB+GSH (0.5mM of GSH) for 48 hr at 30°C. Cells were diluted to a cell density of 2x10⁶ cells/ml and growth was evaluated in a Bioscreen for 4 days at 30°C with constant shaking and growth rates were determined. See Table 4.

H₂O₂, menadione, cumene hydroperoxide, tert-butyl hydroperoxide, and cadmium sensitivity assays.

All cultures were grown for 48 h in YPD at 30°C. H₂O₂ (35% (wt/wt) solution), CdSO₄, crystalline menadione, tert-butyl hydroperoxide and cumene hydroperoxide were obtained from Sigma-Aldrich. For sensitivity assays of log phase cells (LP), saturated cultures were diluted in fresh media in such a way that all strains went through nine doublings to reach an OD_{600nm} of 0.5 and for stationary phase cells (SP), 48 h saturated cultures were diluted into sterile H₂O to an OD_{600nm} of 0.5. LP and SP cultures were then serially diluted in 96-well plates. Each dilution was spotted onto YPD plates and YPD with different concentrations of H₂O₂ (10 and 15 mM), menadione (80 and 110 μM), tert-butyl hydroperoxide (5.0 mM), cumene hydroperoxide (0.6 and 1.0 mM) and CdSO₄ (30 μM) and the plates were incubated at 30°C. Experiments were repeated at least four times.

H₂O₂ sensitivity and adaptation assays.

For the sensitivity and adaptation experiments, all cultures were grown for 48 h in YPD at 30°C. Overnight cultures of BG14, *trr1Δ*, *gsh2Δ*, *gsh2Δ trr1Δ*, *cta1Δ*, *cta1Δ gsh2Δ* and *cta1Δ trr1* were diluted in rich medium (YPD) in such a way that all strains went through nine doublings to reach an OD_{600nm} of 0.5. The strains were exposed to different H₂O₂ concentrations, and incubated with shaking for 3 h. For adaptation assay, the strains were pretreated for 1 h with a non-lethal H₂O₂ concentration and then challenged with a lethal concentration of H₂O₂ for 3 additional hours. After the treatment, H₂O₂ was removed by centrifugation and the cultures were resuspended in distilled H₂O. The OD_{600nm} of the cultures was adjusted when needed to 0.5, and the cultures were then serially diluted in 96-well plates. Each dilution was spotted onto YPD plates, and the plates were incubated at 30°C for 48 hrs. All dilutions had the same amount of cells. Experiments were

repeated at least four times.

Quantification of the intracellular content of glutathione in *C. glabrata*.

To determine the glutathione content of BG14, *gsh1Δ pro2-4* and *gsh2Δ* strains, cells were grown and harvested as described (Chaudhuri, *et al.*, 1997). Briefly, the strains were grown in YNB with uracil supplemented with 5% ammonium sulphate and 2% glucose without or with 5 mM GSH and incubated for 48 hr at 30°C. Cells were diluted into YNB to an OD_{600nm} of 0.03 and samples were taken after 6 hr at an OD_{600nm} of 1.0 for log phase cells (LP, 6 hr) and after 24 hr and 48 hr for stationary phase cells (SP, 24 hr and 48 hr). Cells were washed twice with PBS pH 7, resuspended in 0.3 ml of 5% (w/v) sulphosalicylic acid (SSA) and mixed with an equal volume of zirconia beads. 1.5×10^8 cells were homogenized by bead mixing at 4°C for 10 min. After centrifugation at 15,000 xg for 15 min, 0.2 ml of the supernatant was used to quantify GSH. Total intracellular glutathione GSX (GSH plus GSSG) content was determined enzymatically using the DTNB [5,5'-dithiobis-(2-nitrobenzoic acid)]-GSSG reductase recycling assay using the Sigma-Aldrich manual (Anderson, 1985). Briefly, nmoles of GSH were calculated as follows: nmoles GSH per ml of sample = $\Delta A_{412}/\text{min}(\text{sample}) \times \text{dil} / \Delta A_{412}/\text{min}(1 \text{ nmole}) \times \text{vol}$; where $\Delta A_{412}/\text{min}(\text{sample})$ is the slope generated by sample (after subtracting the values generated by the blank reaction, $\Delta A_{412}/\text{min}(1 \text{ nmole})$ is the slope calculated from standard curve for 1 nmole of GSH, dil is dilution factor of original sample and vol is volume of the sample in the reaction in ml.

Quantification of viability in late chronological life of *C. glabrata*.

To determine the viability in late chronological life of mutants lacking GSH, first all *gsh1Δ* mutants were generated, as described above, in strains harboring the *ScOPT1/HGT1* gene in the presence of 0.5mM of GSH. Saturated cultures of *C. glabrata* strains BG14, *gsh1Δ pro2-4* (CGM1627), *gsh2Δ* (CGM976), BG14 p*ScOPT1* (CGM1035), *gsh1Δ* p*ScOPT1* (CGM1071), *gsh2Δ* p*ScOPT1* (CGM1101), and *gsh1Δ gsh2Δ* p*ScOPT1* (CGM1115) were grown in YNB+GSH (0.5mM) for 48 hr at 30°C. Cells were washed and diluted into fresh YNB without GSH and in the presence of 0.5mM of GSH and incubated at 30°C with constant shaking during 16 days. Samples were taken at day 3, 4, 6, 8, 10, 12 and 16. Cell density was adjusted to 2×10^5 cells/ml in YPD and 300 μl were taken for growth during 23 hr at 30°C in a Bioscreen and viability was calculated from Bioscreen data as follows (Murakami, *et al.*, 2008): The doubling time for each well in a Bioscreen assay, dW, was determined by the maximal slope of the semi-log plot of OD as a function of time. The doubling time was calculated for each duplicate. For each age-point, a t value was calculated as the shift in the Bioscreen growth curve relative to the initial age-point for that strain at day 3. The t value was calculated by first determining the linear regression equation of the natural logarithm of OD_{600nm} as a function of time for each duplicate (OD_{600nm} 0.3). Based on the linear regression equation for each duplicate, the time, tOD, at which OD_{600nm} 0.3 was estimated. This OD_{600nm} value was chosen because it is near the middle of the linear range on a plot of ln (OD_{600nm}) versus time. The tOD value was calculated for each age-point and the time shift, tn, was calculated as the difference of the tOD for each age-point and the tOD for the first age-point at day 3 of culture. Relative survival for each strain at each age-point was calculated.

Results

A point mutation in the *PRO2* gene (*pro2-4*) allows the cell to grow in the absence of GSH.

In order to determine the role of GSH in the oxidative stress response, we decided to generate mutations in the *GSH1* and *GSH2* genes that encode the enzymes for GSH biosynthesis. We generated fusion PCR fragments for each gene (5'*GSH-1-2::hph::3'GSH-1-2*) and transformed our lab reference strain, BG14, with these fragments and selected the gene replacements with the hygromycin resistant marker. We obtained the *gsh2* Δ mutant and confirmed that *GSH1* is an essential gene (data not shown). Additionally, we screened for *gsh1* Δ suppressors in BG14 (see Materials and Methods). In *C. glabrata*, *GSH1* is an essential gene (Yadav, *et al.*, 2011) and given that suppressor mutations in the *ScPRO2* gene (which encodes for the γ -glutamyl phosphate reductase that catalyzes the second step in proline biosynthesis) have been isolated (Spector, *et al.*, 2001), we sequenced the *PRO1* (*CAGL0D03894g*), *PRO2* (*CAGL0F00693g*) and *PRO3* (*CAGL0I08283g*) genes from BG14 and the *gsh1* Δ mutant (CGM814). We identified a single point mutation (C376A/P126T) only in the *PRO2* gene (*pro2-4*) (Figures 1 and 6). We then determined if the *pro2-4* mutation is responsible of suppressing the absence of GSH in the *gsh1* Δ mutant. We cloned and recombined the *pro2-4* mutation into BG14 (CGM1592) and then transformed this strain with a *URA3* plasmid carrying *GSH1*. In this strain (CGM1619), *pro2-4* p*GSH1*, we deleted the chromosomal copy of *GSH1*. We used this mutant strain *gsh1* Δ *pro2-4* p*GSH1* (CGM1625) to screen for the loss of the plasmid in SC+5-FOA plates. If the strain *gsh1* Δ *pro2-4* p*GSH1* is able to lose the plasmid, this will indicate that *pro2-4* is suppressing the absence of GSH. Ura⁺ cells die on SC+5-FOA plates and only cells that have lost the *URA3* plasmid can grow. Consistent with the fact that both strains BG14 (*GSH1*) p*GSH1* (CGM865) and *pro2-4* (*GSH1*) p*GSH1* (CGM1619), have 2 copies of *GSH1*, these strains lost the Ura⁺ plasmid at about the same percentage (30%). Conversely, the *gsh1* Δ p*GSH1* strain did not lose the Ura⁺ plasmid because *GSH1* is essential for growth. Notably, the *gsh1* Δ *pro2-4* p*GSH1* strain lost the Ura⁺ plasmid at about 6%, indicating that the *pro2-4* mutation is responsible for suppressing the absence of GSH (Figure 2a). Furthermore, since *PRO2* is an essential gene in the biosynthesis of proline, we determine if the *pro2-4* mutation conferred auxotrophy to proline. Cultures of BG14, *pro2-4*, *pro2* Δ , *gsh1* Δ *pro2-4* and *gsh2* Δ were plated onto YPD, YNB and YNB+Pro plates. The *pro2-4* and the *gsh1* Δ *pro2-4* mutants are not auxotrophs of proline, indicating that the proline biosynthetic pathway remained functional and independent of GSH (compare growth of *pro2* Δ and *pro2-4* and the *pro2-4* *gsh1* Δ on YNB and YNB+PRO) (Figure 2b). These data confirm that *GSH1* is an essential gene and that a suppressor mutation in the *PRO2* gene (*pro2-4*) allows the *gsh1* Δ mutant to grow in the absence of GSH.

GSH content in the *gsh1* Δ *pro2-4* and *gsh2* Δ mutants.

GSH1 and *GSH2* are the structural genes responsible for GSH biosynthesis. Given that we have constructed mutations in *GSH1* (*gsh1* Δ in the presence of the suppressor mutation *pro2-4*) and *GSH2* (*gsh2* Δ), we decided to evaluate the intracellular content of GSH in these mutants and in BG14. Cells were grown for 48 hr and then diluted on YNB in the absence of GSH (and in the presence of GSH, see section below). Samples were taken in log phase (LP, 6 hr after dilution, OD_{600nm} of 1.0) and in stationary phase (SP, 24 hr and 48 hr after dilution). Cells were lysed and the GSX (total glutathione, reduced and oxidized [GSH + GSSG]) content was determined enzymatically with DTNB (See Materials and Methods). We found that BG14 has an intracellular content of GSX of 86.7 \pm 3.5 nmol/ml in LP (6 hr) (Figure 3). In SP, there is a reduction of GSX content but remained constant at 48.7 \pm 6.5 nmol/ml (24 hr) and 42.4 \pm 9.0 nmol/ml (48 hr). In the

gsh1Δ pro2-4 mutant, there is no detectable content of GSX. Notably, the *gsh2Δ* mutant showed a constant but very low content of GSX of 4.0 ± 0.18 nmol/ml (6 hr), 4.0 ± 0.05 nmol/ml (24 hr) and 2.27 ± 2.1 nmol/ml (48 hr). This GSX content was slightly higher than the *gsh1Δ pro2-4* mutant (Figure 3). These results indicate that these enzymes are essential for the synthesis of GSH, and suggest that the dipeptide could be responsible of the low content of GSH in the *gsh2Δ* mutant but enough for the cell to grow and that the *pro2-4* mutation is not suppressing the *gsh1Δ* mutant by highly increasing the content of GSH.

External GSH improves growth of the *gsh1Δ pro2-4* and *gsh2Δ* mutants.

It has been determined by a bioinformatic analysis that *C. glabrata* does not have the high affinity GSH transporter orthologue present in *S. cerevisiae* (*OPT1/HGT1*) (Byrne & Wolfe, 2005), however we had evidence that *C. glabrata* might be incorporating GSH from the medium. In order to determine whether external GSH is incorporated by *C. glabrata*, we performed two genetic experiments. First, cultures of BG14, *pro2-4*, *pro2-4 gsh1Δ* and *gsh2Δ* were grown and plated onto YNB and YNB+GSH (0.5mM) plates. The presence of GSH improved the growth of both strain *pro2-4 gsh1Δ* and *gsh2Δ* strains (Figure 2b, compare growth on YPD which has 50μM of GSH, YNB with YNB+GSH). Second, we determined the growth rate of BG14, *pro2-4 gsh1Δ* and *gsh2Δ* strains in the presence of GSH. Liquid cultures of these strains were grown in YPD, YNB and YNB+GSH and their growth rate was determined using a Bioscreen (see Materials and Methods). BG14 doubling time remained constant independent of the media used at around 96 min. Both mutant strains, *gsh1Δ pro2-4* and *gsh2Δ*, grew at almost at the same rate in YPD than BG14 (94 min and 101 min). In contrast, both strain increased their doubling times in YNB to 117.3 ± 6.6 min and 129.5 ± 4.4 min respectively. The addition of GSH to YNB improved the growth rate of *gsh2Δ* mutant (back to 98.5 ± 3.7 min) and marginally improved that of *gsh1Δ pro2-4* mutant (back to 101.9 ± 7.9 min); the same doubling times as in YPD (Table 4). These experiments show that the presence of external GSH improves the growth of the *gsh2Δ* mutant strain defective in GSH biosynthesis and suggest that GSH could be taken up from the medium. To determine if these mutant strains are indeed incorporating external GSH, we determined their internal GSH content when grown in the presence of GSH. The same cells used and described in Figure 3 were grown in the presence of GSH (5mM). We found that BG14 showed the same GSH content. In LP (6 hr, +GSH), the BG14 content of GSX was 96.3 ± 6.8 nmol/ml, compared to 86.7 ± 3.5 nmol/ml when grown in the absence of GSH (Figure 3). In SP, BG14 showed a slight reduction of GSX content at 69.2 ± 4.7 nmol/ml (24 hr) and 59.6 ± 12.6 nmol/ml (48 hr) (slightly higher than BG14 grown in the absence of GSH [48.7 ± 6.5 nmol/ml (24 hr) and 42.4 ± 9.0 nmol/ml (48 hr)] (Figure 3). In the *gsh1Δ pro2-4* and *gsh2Δ* mutants, there is a detectable increase in the content of GSH. In LP, the *gsh1Δ pro2-4* and *gsh2Δ* mutants showed a content of GSH of 6.5 and 8.6 nmol/ml at 6 hr (compared to 0 and 4 nmol/ml, a 6 and 2 fold increase), and an average for both strains of 15 nmol/ml at 24 hr and 48 hr (compared to 0 and 2.2 nmol/ml, a 15 and 12 fold increase) (Figure 3). Taken together these experiments, these data suggest that *C. glabrata* could be incorporating GSH from the media, possibly through a low affinity transporter.

The role of GSH in the oxidative stress response.

It has been shown that GSH is required in the detoxification of heavy metals and instrumental in the protection from oxidative stress (Grant, *et al.*, 1996, Stephen & Jamieson, 1996, Halliwell & Gutteridge, 2007). In order to characterize the role of GSH in the response to oxidative stress and to metal ions in *C. glabrata*, we investigated the resistance of *gsh1Δ pro2-4* and *gsh2Δ*

mutant strains to H₂O₂, menadione, cumene hydroperoxide (CHP), tert-butyl hydroperoxide (TBH) and CdSO₄. Log phase (LP) and stationary phase (SP) cells were exposed to the oxidants and to the metal ion as described in the legend to Figure 4. In SP, BG14 was able to survive exposure to H₂O₂ at concentrations up to 15 mM. At this same concentration, both mutant strains *gsh1Δ pro2-4* and *gsh2Δ* became sensitive. In LP, *gsh1Δ pro2-4* and *gsh2Δ* were more sensitive to up to 10mM and 15mM of H₂O₂ respectively. Notably, in both LP and SP cells, *gsh2Δ* was slightly more resistant to H₂O₂ than *gsh1Δ pro2-4* (compare growth at 10 mM and 15 mM) (Figure 4a). Same behavior was seen with menadione. In both, LP and SP, BG14 survived at 110 μM of menadione while the mutant strains, *gsh1Δ pro2-4* and *gsh2Δ*, were less resistant at this concentration. Again, *gsh2Δ* was less sensitive to menadione than *gsh1Δ pro2-4* (compare growth at 80 μM and 110μM) (Figure 4b). Interestingly, in the presence of CHP and TBH, in LP and SP, both mutant strains, *gsh1Δ pro2-4* and *gsh2Δ*, were less sensitive than BG14 (compare growth at 1.0 mM of CHP and 5.0 mM of TBH, Figures 4c and 4d). Conversely, *yap1Δ* in both LP and SP, was highly sensitive to CHP (Figure 4c). In the presence of CdSO₄ in both LP and SP, BG14 was able to survive exposure to 30 μM, however at this concentration both mutant strains *gsh1Δ pro2-4* and *gsh2Δ* were more sensitive. Interestingly, *gsh1Δ pro2-4* was slightly less sensitive than the *gsh2Δ* mutant in LP (compare growth at 30 μM) (Figure 4e). In summary, these data show that GSH participates in the oxidative stress response (OSR) in *C. glabrata* and plays an important role in the detoxification of Cd. Notably, these data suggest too that the presence of the dipeptide in the *gsh2Δ* could be providing some protection as well.

We have previously shown that *C. glabrata* lacking the single catalase, *Cta1*, became sensitive to H₂O₂ in both SP and LP (Cuellar-Cruz, *et al.*, 2008). Interestingly, *cta1Δ* cells still were able to adapt when exposed to low levels of H₂O₂ and then challenged to a lethal concentration (Cuellar-Cruz, *et al.*, 2008), indicating a catalase-independent pathway to respond to H₂O₂. We asked whether GSH or thioredoxin (which is a second redox system that maintains the reduced state of protein thiols and has been shown in *S. cerevisiae* that can compensate for the lack of GSH in the cell), could be responsible for the adaptation response in the absence of the catalase. Both systems use NADPH as a final electron donor, and Glutaredoxins (Grx) depend on GSH and thioredoxin depends on the activity of thioredoxin reductase (*TRR1*). In order to determine the role of GSH or thioredoxin reductase in the adaptation response in the absence of catalase, we tested the resistance and adaptation to H₂O₂ in BG14, the single mutants *gsh2Δ*, *trr1Δ* (which encodes for the thioredoxin reductase), and *cta1Δ* and the double mutants *cta1Δ gsh2Δ* and *cta1Δ trr1Δ*. Cells were grown and exposed to the oxidants as described in the legend to Figure 5. BG14 and *trr1Δ* showed the same behavior in the presence of H₂O₂. Both strains are resistant up to 10 mM of H₂O₂ and were able to adapt (10+100 mM and 5+50 mM of H₂O₂) (Figure 5). As expected, the *gsh2Δ* mutant was less resistant at 10mM of H₂O₂ than BG14 and *trr1Δ*, but still was able to adapt at 5+50 mM of H₂O₂ (Figure 5). The response to oxidative stress in the double mutant, *gsh2Δ trr1Δ*, showed the phenotype of the single *gsh2Δ* mutant, less resistant at 10mM of H₂O₂ (Figure 5), however, this mutant still was able to adapt at 2+25 mM of H₂O₂ (Figure 5). We then tested if the *cta1Δ* strain could still adapt in the absence of GSH or thioredoxin reductase. The *cta1Δ* is less resistant to H₂O₂, it grew at 1mM and was sensitive to 4 mM, but was able to adapt to the lethal concentration of 4 mM (1 mM + 4 mM, Figure 5). Both double mutants, *cta1Δ gsh2Δ* and *cta1Δ trr1Δ* showed the same behavior as the *cta1Δ*. These mutant strains grew up to 1mM, were sensitive to 4 mM and were able to adapt to the lethal concentration of 4 mM (1 mM + 4 mM, Figure 5). These data indicate that the thioredoxin reductase or high levels of GSH and are not responsible for the catalase-independent adaptation to H₂O₂ in *C. glabrata*.

GSH requirement in late chronological life.

Given that it has been shown that microorganisms are more resistant to oxidative stress in SP and that some virulence factors are induced in SP (Thompson, *et al.*, 2003), we decided to evaluate the role of GSH in cells in late chronological life where cells are under aerobic respiration and are not replicating. We analyzed the GSH mutant strains in the presence or absence of the *S. cerevisiae* high-affinity plasma membrane GSH transporter, ScOpt1/Hgt1 and in the presence or absence of GSH in the media (see Materials and Methods). Saturated cultures of *C. glabrata* strains BG14, *gsh1Δ pro2-4*, and *gsh2Δ*; and BG14 p*OPT1*, *gsh1Δ pOPT1*, *gsh2Δ pOPT1* and *gsh1Δ gsh2Δ pOPT1* were grown in YNB+GSH (0.5mM) for 48 hr at 30°C. Cells were washed and diluted into YNB in the presence (0.5mM) and in the absence of GSH. At day 3 all cells stopped growing (cells enter stationary phase) and samples were taken at day 3, 4, 6, 8, 10, 12 and 16 and diluted into fresh YPD media and viability was scored in a Bioscreen (see Materials and Methods). At day 3, strains BG14, *gsh1Δ pro2-4* and *gsh2Δ* showed 100% viability (Table 5). BG14 cells were viable throughout the course of the experiment. At day 16, BG14 in the absence of GSH (-GSH) showed 34±4% viability, while in the presence of GSH (+GSH) showed 50±15% viability. *gsh1Δ pro2-4* at day 6 (-GSH) showed 18±3% while (+GSH) showed 41±8% viability and lost viability at day 8 (±GSH, 5±3% / 3.6±2%). *gsh2Δ* from day 8 lost viability (±GSH) compare to BG14, however, *gsh2Δ* in the presence of GSH also showed an increase in viability starting at days 10 and 12 (day10, 25±5% / 41±7%; day 12, 19±3% / 34±5%). Interestingly, *gsh1Δ pro2-4* showed less viability than *gsh2Δ* (compare day 8 *gsh1Δ pro2-4* (±GSH, 5±3% / 3.6±2%) and *gsh2Δ* (±GSH, 46±13% / 51±10%). These data suggest that the GSH could be introduced from the media, and also indicates that the dipeptide in the *gsh2Δ* strain is providing protection against ROS. Strains BG14 p*ScOPT1*, *gsh1Δ pScOPT1*, *gsh2Δ pScOPT1* and *gsh1Δ gsh2Δ pScOPT1* showed 100% viability at day 3 (Table 5). All 4 strains in the presence of GSH (BG14 p*ScOPT1*, *gsh1Δ pScOPT1*, *gsh2Δ pScOPT1* and *gsh1Δ gsh2Δ pScOPT1*) showed the same rate of loss of viability; at day 8 the strains have an average of 88% viability (91±13%, 88±8%, 90±4% and 81±9%) and by day 16 the strains have an average of 16% viability (15±2%, 23±4%, 13±1% and 13±4%). This result indicate that the presence of GSH and the *ScOPT1* GSH transporter make the mutant strains behave like the parental strain BG14. Also in the presence of GSH, strains *gsh1Δ pScOPT1*, *gsh2Δ pScOPT1* and *gsh1Δ gsh2Δ pScOPT1* at day 8 showed an increase in viability (42±5% / 88±8%, 38±11% / 90±4%, 33±8% / 81±9%, respectively). Notably, compared to BG14 at day 8 in the absence of GSH, all mutant strains showed reduced viability (88±7%, 42±5%, 38±11%, 33±8%) and the mutants showed the same rate of loss of viability from day 10. In summary, these results indicate that GSH is needed in late chronological life and the presence of GSH allows the mutant strains to remain viable longer.

Discussion

Phagocytic cells generate ROS (O_2^- , H_2O_2 , $\cdot OH$) to eliminate fungal infections, however, fungal pathogens are very efficient to respond to oxidative stress (Mansour & Levitz, 2002). Transcriptional remodeling through well-conserved transcription factors (Yap1, Skn7, Msn2, and Msn4) (Lee, *et al.*, 1999, Gasch, 2007) and synthesis of enzymes and antioxidant molecules (Cta, SODs, and Gpx and GSH and Trx) (Grant, *et al.*, 1998, Thorpe, *et al.*, 2004) ensure elimination of ROS and survival of the pathogen. The importance of the presence of these anti-oxidant mechanisms for virulence in several fungal pathogens has been documented (Hwang, *et al.*, 2002, Paris, *et al.*, 2003). *C. glabrata* is no exception and has a defined OSR with transcriptional gene regulation, synthesis of antioxidant mechanisms, and survival inside phagocytic cells (Kaur, *et al.*, 2007, Cuellar-Cruz, *et al.*, 2008, Roetzer, *et al.*, 2010, Saijo, *et al.*, 2010).

GSH is a γ -glutamyl-cysteinyl-glycine tripeptide present in many organisms. It is important for protection against oxidative stress, detoxification of xenobiotics, and enzyme activity. It is essential for growth because it is required for assembling cytoplasmic Fe-S clusters (ISC) (Sipos, *et al.*, 2002, Kumar, *et al.*, 2011). In this study, in order to further our understanding of the OSR in *C. glabrata*, we characterized the role of glutathione in this fungal pathogen.

gsh1 Δ suppressor maps in *PRO2*.

We made mutations in the structural genes in the biosynthesis of GSH, *GSH1* and *GSH2*, and confirmed that *GSH1* is essential (Yadav, *et al.*, 2011). However, suppressor mutations in the absence of GSH had been obtained in *E. coli* (Veeravalli, *et al.*, 2011) and in *S. cerevisiae* (Spector, *et al.*, 2001), where the suppression requires the proline biosynthesis pathway (described in Figure 6). In our study, we screened for spontaneous *gsh1* Δ suppressors and found a single point mutation in *PRO2* (*pro2-4*, P126T) which is a new allele localized in a conserved region (Figure 1). Furthermore and consistent with what has been described previously, the *pro2-4* does not affect proline biosynthesis (Figure 2b). The biosynthetic pathway of proline is probably the only mechanism to suppress the absence of GSH. It has been proposed that this pathway can be used to synthesize small but enough amounts of GSH in *E. coli*, *S. cerevisiae* and now in *C. glabrata* (Figure 6). These data nicely show how enzymes can be co-opted to function in additional roles.

GSH and protection against oxidative and heavy metal stress.

GSH is fundamental in the protection against oxidative stress and tolerance to heavy metals. We showed here that GSH is important for the OSR generated by menadione and H_2O_2 (Figures 4a and 4b). Our data also shows that the dipeptide (γ -glutamyl cysteine) provides protection against oxidative stress (Figures 4a and 4b). In *S. cerevisiae*, the organic peroxides, cumene hydroperoxide (CHP) and tert-butyl hydroperoxide (TBH) are de-toxified by glutathione peroxidases however, GSH is only required to eliminate TBH, but not, CHP (Grant, *et al.*, 1996, Mutoh, *et al.*, 2005). Interestingly, we found that the mutants lacking GSH are resistant to both organic peroxides, CHP and TBH (Figures 4c and 4d). These results suggest first, the existence of an alternative GSH independent de-toxification mechanism for organic peroxides in *C. glabrata* and second, GSH is affecting negatively the removal of these peroxides. Additionally, this alternative de-toxification mechanism for organic peroxides depends on the transcription factor Yap1 (Figure 4c) indicating that the resistance to organic peroxides is regulated by the OSR. Currently, we are trying to understand this GSH-independent resistance to organic peroxides.

GSH can form chelation complexes with heavy metals and thereby assist in their detoxification. In *S. cerevisiae*, Cd²⁺ tolerance is achieved when Cd²⁺(GSH)₂ complexes are formed and then moved into the vacuole by Ycf1(Li, *et al.*, 1997). In this study, we showed that *GSH1* and *GSH2* are important in the detoxification of Cd²⁺ (Figure 4e). Surprisingly, the *gsh2Δ* mutant showed increased sensitivity to Cd²⁺ indicating that the dipeptide (γ-glutamyl-cysteine) is not participating in the detoxification of Cd²⁺ (Figure 4e). A likely explanation for this increased sensitivity to Cd²⁺ is the lack of synthesis of phytochelatins (PhCs) in the *gsh2Δ* mutant. It has been shown in *S. pombe* and in *C. glabrata* that exposure to Cd²⁺ induced the biosynthesis of PhCs; a (γ-Glu-Cys)_n-Gly polymer (Rausser, 1990, Rausser, 1995). PhCs chelate Cd²⁺, Cu²⁺, and Zn²⁺ ions in the cytosol and these complexes are then moved into the vacuole (Ortiz, *et al.*, 1992). It has been proposed that Gsh2 in addition to catalyze the synthesis of GSH, is also responsible of the synthesis of PhCs (Al-Lahham, *et al.*, 1999).

Are GSH and thioredoxin compensating for the absence of Cta1?

We have shown that *C. glabrata* strain BG14 is extremely resistant to oxidative stress generated by H₂O₂ (Cuellar-Cruz, *et al.*, 2008). As expected, deletion of the single catalase, Cta1, renders the cell sensitive to H₂O₂. However, *C. glabrata cta1Δ* is still virulent in a murine model of disseminated infection. Interestingly, we found that *cta1Δ* can still adapt if exposed first, to a non-lethal and then to a lethal concentration of H₂O₂ (1+4 mM H₂O₂) (Figure 5) (Cuellar-Cruz, *et al.*, 2008). This result suggests that with this residual resistance, first, the *cta1Δ* mutant can survive in vivo and second, that there is a catalase-independent pathway to respond to H₂O₂. Given that GSH compensates in *S. cerevisiae* for the lack of both catalases in growing cells (Izawa, *et al.*, 1996), and that thioredoxin is a second redox system which compensates for the lack of GSH in the cell, we asked if GSH or thioredoxin were involved in this catalase-independent pathway to respond to H₂O₂. Here we showed that the catalase-independent adaptation response to H₂O₂ is not mediated by GSH or thioredoxin (Figure 5). Currently, we are trying to identify these regulators/ effectors of the catalase-independent adaptation response to H₂O₂.

Is there a GSH transporter in *C. glabrata*?

Bioinformatic and experimental analysis have shown that *C. glabrata* does not have the *S. cerevisiae* high affinity transporter orthologue Opt1/Hgt1. However, our genetic data (Figure 2b, Table 4 and Table 5) and the quantification analysis of the internal content of GSH when cells were grown in the presence of GSH (Figure 3) suggest that the mutant strains are introducing GSH from the medium. We propose that *C. glabrata* could be incorporating external GSH by either an amino acid transporter with low affinity for GSH or from a GSH transporter that could be expressed only under specific conditions; and in vivo specific expression of genes is common in pathogens. (Cormack, *et al.*, 1999, De Las Penas, *et al.*, 2003).

GSH is important in late chronological life.

GSH is important for diverse processes in the cell, in the OSR and specially its activity during iron metabolism where GSH works with glutaredoxins to assemble cytoplasmic Fe-S clusters fundamental in the maturation of essential enzymes in the cell (Kumar, *et al.*, 2011). Given that microorganisms are more resistant to oxidative stress in SP, we analyzed the role of GSH in late stationary phase where ROS are being generated. GSH is required and consumed in late chronological life and the presence of GSH allows the strains to remain viable longer but not indefinitely (Table 5), in spite that only trace amounts of the tripeptide are required for the essential



role of GSH (Sipos, *et al.*, 2002, Kumar, *et al.*, 2011). This also indicates that viability in late chronological life is not only determined by the presence of GSH. The loss of viability, as estimated by delay in growth, is likely to be due to the absence of properly assembled Fe–S clusters in essential cytoplasmic proteins and to the inability to neutralize ROS generated during the aerobic respiration in stationary phase. Given that external GSH extended the viability of the *gsh1Δ pro2-4* and *gsh2Δ* mutants, these data provides additional support that GSH is being introduced from the media.

Given that GSH in *C. glabrata* is essential and is required for the OSR, detoxification of heavy metals, and for late chronological life, it is important to understand why *C. glabrata* does not have or does not express a transporter for such an essential molecule (GSH). We are currently determined to identity this putative transporter.



Acknowledgements

We thank Lina Riego, Marcela Briones and Jacqueline Juárez for helpful discussions. This work was funded by a Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) fellowship to G.G.E. (48580) and E.O.Z. (233455). This work was funded by a CONACYT grant No. CB-2010-01-153929 to A.D.L.P and grant No. CB-2010-01-151517 to I.C.N.

FIGURES



Fig 1 ScPro2, CgPro2 and CgPro2-4 alignment. ScPro2 and CgPro2 are 87% similar across the entire length of the proteins. Identical residues are boxed and shaded. The asterisk (*) show the three mutations described in ScPro2 (S124P, G149S, and A226V). The black star (♣) indicates the *C. glabrata pro2-4* mutation (P126T).

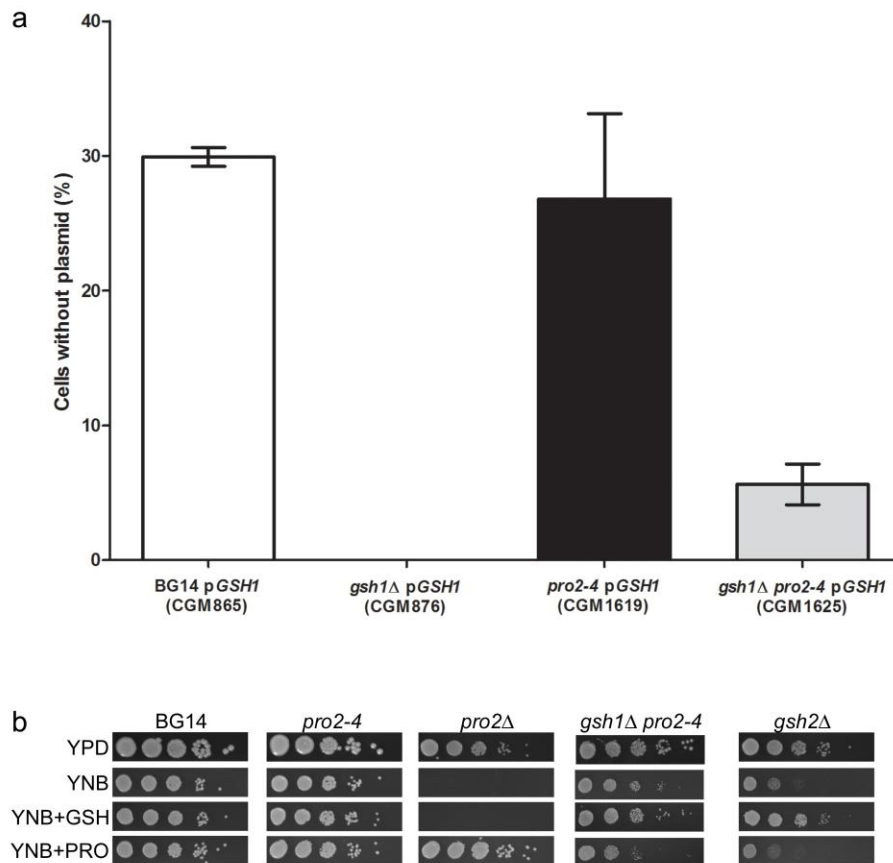


Fig 2 The *pro2-4* suppressor mutation. (a) Strains BG14 p*GSH1* (CGM865), *gsh1*Δ p*GSH1* (CGM876), *pro2-4* p*GSH1* (CGM1619), and *gsh1*Δ *pro2-4* p*GSH1* (CGM1625) were grown at 30°C for 48 hr in YPD and diluted back in to fresh media and grown for another 24 hr. This was repeated 3 times. 10-fold serial dilutions were plated on YPD plates for viable counts and on SC+5FOA plates to screen for the loss of the Ura⁺ plasmid. Ura⁺ cells die on SC+5-FOA plates. Only cells that have lost the Ura⁺ plasmid can grow on SC +5-FOA. % of cells without plasmid was calculated by the number of cells on SC+5-FOA divided by the number of cells on YPD (viable count). (b) Strains BG14, *pro2-4* (CGM1592), *pro2*Δ (CGM1446), *gsh1*Δ *pro2-4* (CGM1627) and *gsh2*Δ (CGM873) were grown for 48 hr at 30°C in YPD or YNB. Strains were diluted to OD_{600nm} 0.5 with distilled water and 10-fold serial dilutions were spotted onto YPD, YNB, YNB+GSH (500μM of GSH) and YNB+Pro (1% of proline) plates. Plates were incubated at 30°C. See Materials and Methods.

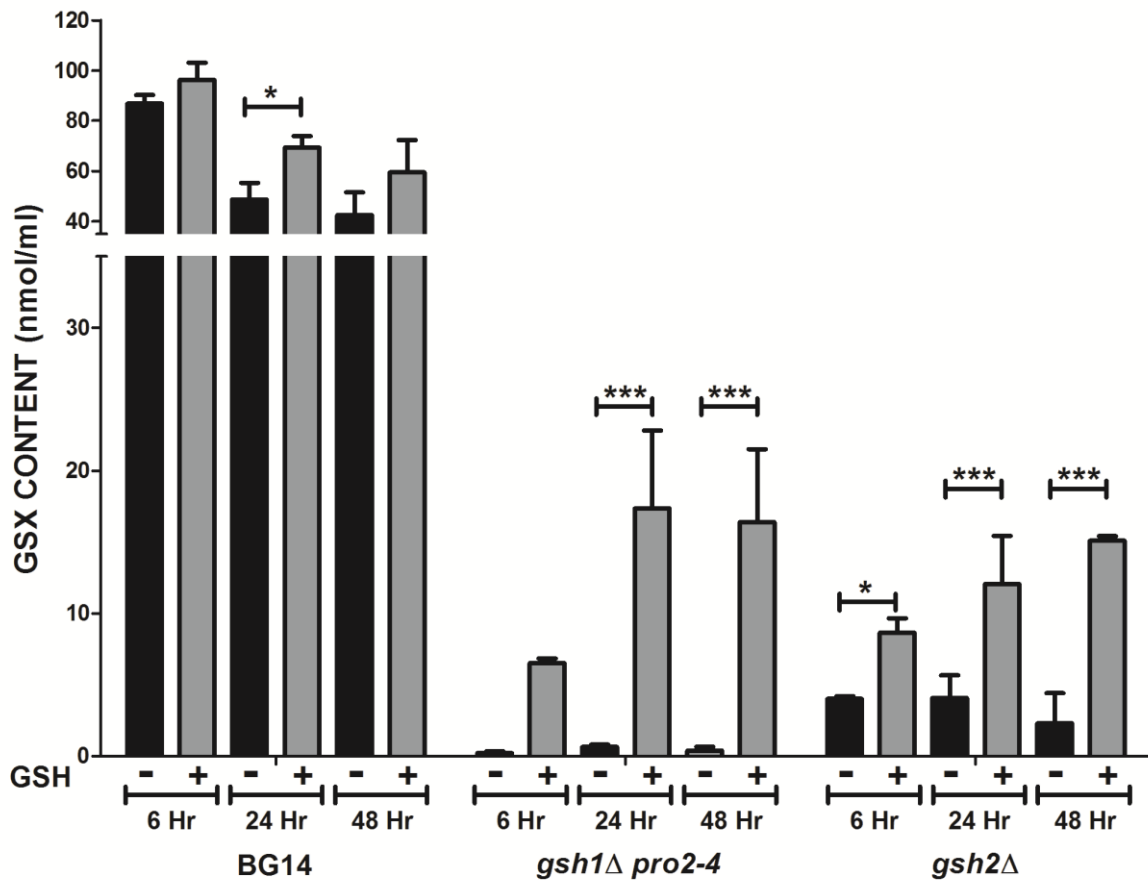


Fig 3 GSX content in *C. glabrata* strains BG14, *gsh1Δ pro2-4* and *gsh2Δ*. To quantify the intracellular GSX concentration from *C. glabrata* strains BG14, *gsh1Δ pro2-4* (CGM1627) and *gsh2Δ* (CGM873), cells were grown on YNB media at 30°C in the absence (black bars) or presence (gray bars) of GSH [5mM], and samples were taken at 6 hr (OD_{600nm} of 1.0), 24 hr and 48h hr. 1.5 x10⁸ cells were washed twice with PBS and then lysed with glass beads in 5% SSA buffer. The intracellular GSX content was determined enzymatically with DTNB. Statistical analysis where * p<0.05 and *** p<0.001. See Materials and Methods.

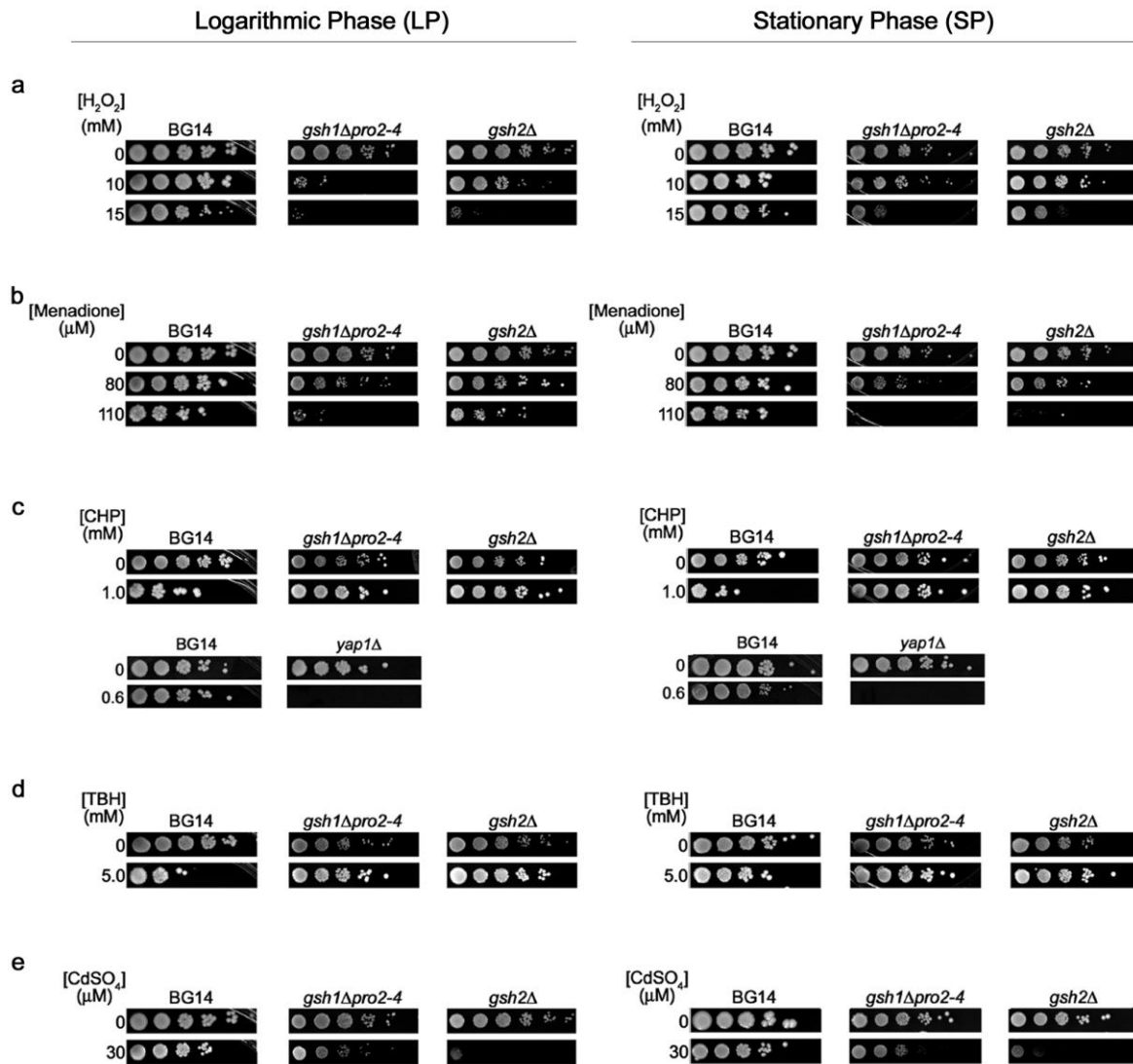


Fig 4 C. glabrata strains BG14, *gsh1Δ pro2-4* and *gsh2Δ* response to H₂O₂, menadione, tert-butyl hydroperoxide, cumene hydroperoxide and CdSO₄. Saturated cultures of *C. glabrata* strains BG14, *gsh1Δ pro2-4* (CGM1627), *gsh2Δ* (CGM873) and *yap1Δ* (CGM297) were grown in YPD media for 48 hr at 30°C. Logarithmic phase (LP) and stationary phase (SP) cells were washed and resuspended in water and the OD_{600nm} were adjusted when needed to 0.5. Cultures were serially diluted and each dilution was spotted onto YPD plates supplemented (as indicated) with different concentrations of (a) H₂O₂, (b) menadione, (c) cumene hydroperoxide (CHP), (d) tert-butyl hydroperoxide (TBH), and (e) CdSO₄. Plates were incubated at 30°C. See Materials and Methods.

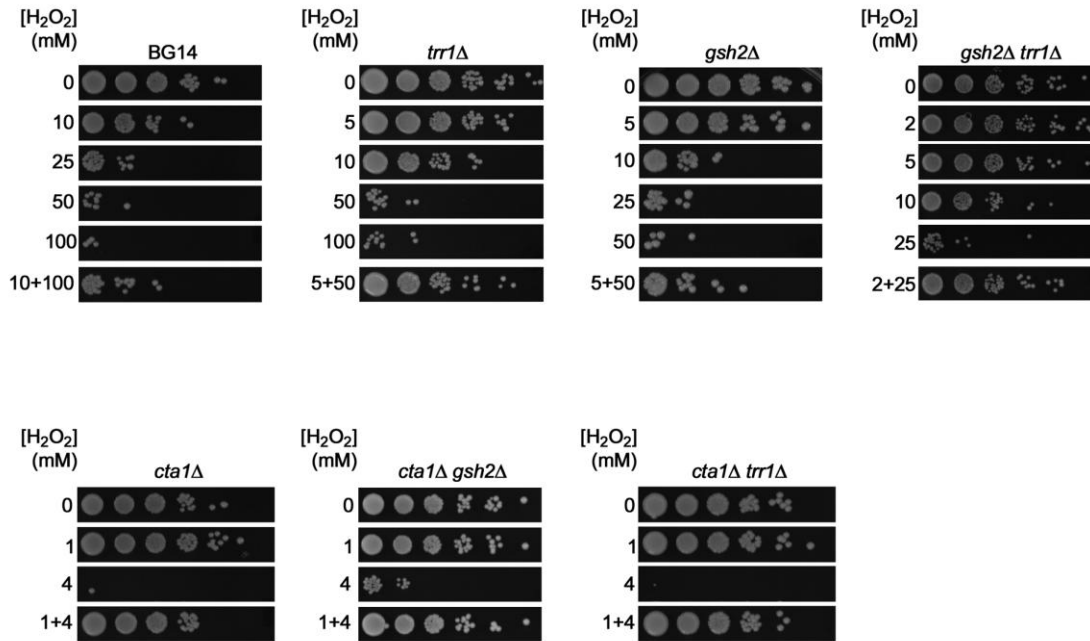


Fig 5 Adaptation response of *C. glabrata* strains BG14, *trr1* Δ , *gsh2* Δ , *gsh2* Δ *trr1* Δ , *cta1* Δ , *cta1* Δ *gsh2* Δ and *cta1* Δ *trr1* Δ to H₂O₂. Saturated cultures of *C. glabrata* strains BG14, *trr1* Δ (CGM1475), *gsh2* Δ (CGM976), *gsh2* Δ *trr1* Δ (CGM1521), *cta1* Δ (CGM392), *cta1* Δ *gsh2* Δ (CGM1099), and *cta1* Δ *trr1* Δ (CGM1477) were diluted in fresh medium (YPD) so that all strains reached an OD_{600nm} of 0.5 after nine doublings at 30°C. Strains BG14 and *trr1* Δ were exposed to 0, 10, 25, 50, and 100 mM of H₂O₂, *gsh2* Δ was exposed to 0, 5, 10, 25, and 50 of H₂O₂, *gsh2* Δ *trr1* Δ was exposed to 0, 2, 5, 10, and 25 of H₂O₂, and strains *cta1* Δ , *cta1* Δ *gsh2* Δ , and *cta1* Δ *trr1* Δ were exposed to 0, 1, and 4 mM of H₂O₂ for 3 hrs. For adaptation experiments, strain BG14 was pretreated for 1 hr with 10 mM H₂O₂ and then with 100 mM H₂O₂ for 3 additional hours; strains *trr1* Δ and *gsh2* Δ were pretreated for 1 hr with 5 mM H₂O₂ and then with 50 mM H₂O₂ for 3 additional hours, strain *gsh2* Δ *trr1* Δ was pretreated for 1 hr with 2 mM H₂O₂ and then with 25 mM H₂O₂ for 3 additional hours and strains *cta1* Δ , *cta1* Δ *gsh2* Δ , and *cta1* Δ *trr1* Δ were pretreated for 1 hr with 1 mM H₂O₂ and then with 4 mM H₂O₂ for 3 additional hours. After the treatments, H₂O₂ was removed by centrifugation. The cultures were resuspended in distilled water and the OD_{600nm} were adjusted when needed to 0.5. Cultures were serially diluted and each dilution was spotted onto YPD plates. Plates were incubated at 30°C. See Materials and Methods.

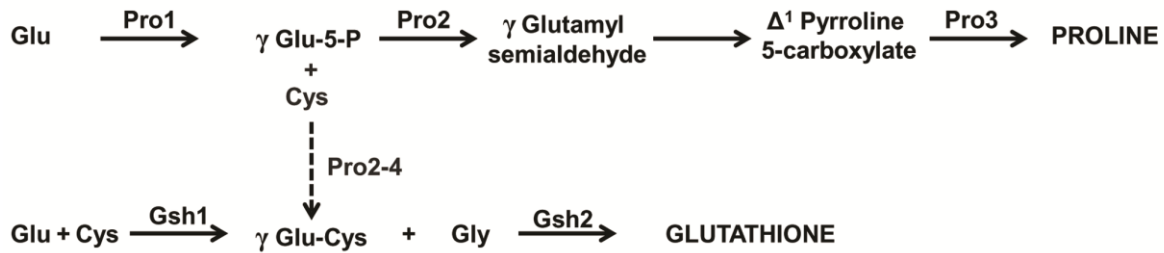


Fig 6. The GSH suppression pathway. In *S. cerevisiae*, the proline biosynthesis pathway is catalyzed by Pro1 (γ -glutamyl kinase) that converts glutamate to γ -glutamyl phosphate (Tomenchok & Brandriss, 1987) that then is converted by Pro2 (γ -glutamyl phosphate reductase) to glutamate- γ -semialdehyde, the precursor of L- Delta 1- pyrroline-5 carboxylic acid, which is converted to proline by Pro3 (Delta 1-pyrroline-5-carboxylate reductase). The suppression pathway requires γ -glutamyl phosphate. The suppressor alleles of Pro2 (In *S. cerevisiae*: S124P, G149S, and A226V; and in *C. glabrata*: P126T [Pro2-4]) could be allowing the condensation of cysteine to γ -glutamyl phosphate to produce γ -glutamyl-cysteine, and Gsh2 then converts γ -glutamyl-cysteine in GSH. Glu is glutamic acid, Cys is cysteine, and Gly is glycine.

| Table 1. Strains used in this study | | | |
|---------------------------------------|---------|---|----------------------------|
| Strain | Parent | Genotype | Reference |
| <i>Escherichia coli</i> | | | |
| DH10 | | <i>F mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC) φ80dlacZΔM15 ΔlacX74 deoR recA1 endA1 araD139 Δ(ara,leu)7697galU galK λ rpsL nupG</i> | Calvin and Hanawalt (1988) |
| <i>Candida glabrata</i> strains | | | |
| BG2 | | Clinical isolate (strain B) | Fidel et al. (1996) |
| BG14 | BG2 | <i>ura3Δ::Tn903 G418^R</i> | Cormack and Falkow (1999) |
| CGM297 | BG14 | <i>ura3Δ::Tn903 G418^R yap1Δ Hyg^r Ura⁻</i> | Cuellar, et al. (2008) |
| CGM392 (<i>cta1Δ</i>) | CGM295 | <i>ura3Δ::Tn903 G418^R cta1Δ Hyg^r Ura⁻</i> | Lab collection |
| CGM814 (<i>gsh1Δ pro2-4</i>) | BG14 | <i>ura3Δ::Tn903 G418^R gsh1Δ::hph pro2-4 Hyg^R Ura⁻</i> Original mutation | This work |
| CGM865 (pGSH1) | BG14 | <i>ura3Δ::Tn903 G418^R pGE59 Ura⁺</i> | This work |
| CGM873 (<i>gsh2Δ</i>) | BG14 | <i>ura3Δ::Tn903 G418^R gsh2Δ::hph Hyg^R Ura⁻</i> | This work |
| CGM876 (<i>gsh1Δ pGSH1</i>) | CGM865 | <i>ura3Δ::Tn903 G418^R gsh1Δ::hph pGE59 Hyg^R Ura⁺</i> | This work |
| CGM976 (<i>gsh2Δ</i>) | CGM873 | <i>ura3Δ::Tn903 G418^R gsh2Δ Hyg^S Ura⁻</i> | This work |
| CGM1035 (BG14 pScOPT1) | BG14 | <i>ura3Δ::Tn903 G418^R BG14 pGE67 Ura⁺</i> | This work |
| CGM1071 (<i>gsh1Δ pScOPT1</i>) | CGM1035 | <i>ura3Δ::Tn903 G418^R gsh1Δ::hph pGE67 Hyg^R Ura⁺</i> | This work |
| CGM1099 (<i>cta1Δ gsh2Δ</i>) | CGM392 | <i>ura3Δ::Tn903 G418^R cta1Δ gsh2Δ::hph Hyg^R Ura⁻</i> | This work |
| CGM1101 (<i>gsh2Δ ScOPT1</i>) | CGM976 | <i>ura3Δ::Tn903 G418^R gsh2Δ pGE67 Hyg^S Ura⁺</i> | This work |
| CGM1115 (<i>gsh2Δ gsh1Δ ScOPT1</i>) | CGM1101 | <i>ura3Δ::Tn903 G418^R gsh2Δ gsh1Δ::hph pGE67 Hyg^R Ura⁺</i> | This work |
| CGM1446 (<i>pro2Δ</i>) | BG14 | <i>ura3Δ::Tn903 G418^R pro2Δ::URA3 Ura⁺</i> | This work |
| CGM1475 (<i>trr1Δ</i>) | BG14 | <i>ura3Δ::Tn903 G418^R trr1Δ::URA3 Ura⁺</i> | This work |
| CGM1477 (<i>cta1Δ trr1Δ</i>) | CGM392 | <i>ura3Δ::Tn903 G418^R cta1Δ trr1Δ::URA3 Hyg^S Ura⁺</i> | This work |
| CGM1521 (<i>gsh2Δ trr1Δ</i>) | CGM976 | <i>ura3Δ::Tn903 G418^R gsh2Δ trr1Δ::URA3 Hyg^S Ura⁺</i> | This work |
| CGM1592 (<i>pro2-4</i>) | BG14 | <i>ura3Δ::Tn903 G418^R pro2-4 Ura⁻</i> | This work |
| CGM1619 (<i>pro2-4 pGSH1</i>) | CGM1592 | <i>ura3Δ::Tn903 G418^R pro2-4 pGE59 Ura⁺</i> | This work |
| CGM1625 (<i>gsh1Δ pro2-4 pGSH1</i>) | CGM1619 | <i>ura3Δ::Tn903 G418^R gsh1Δ::hph pro2-4 pGE59 Hyg^R Ura⁺</i> | This work |
| CGM1627 (<i>gsh1Δ pro2-4</i>) | CGM1625 | <i>ura3Δ::Tn903 G418^R gsh1Δ pro-4 Hyg^R Ura⁻</i> | This work |

| Table 2. Plasmid used in this study | | |
|-------------------------------------|--|----------------------------|
| Plasmid | Relevant Genotype | Reference |
| pYIplac211 | Cloning vector, integrative vector <i>URA3</i> Ap ^R | Gietz and Sugino (1988) |
| pAP599 | Cloning vector for construction of knockout mutants with two FRT direct repeats flanking the hygromycin cassette to remove the selection marker for construction of multiple mutants in <i>C. glabrata</i> . [FRT-P _{PGK} ::hph::3' UTR _{HIS3} -FRT] <i>URA3</i> Hyg ^R Ap ^R | Domergue et al. (2005) |
| pGRB2.0 | Cloning vector, pRS406 <i>URA3 C.g.CEN ARS</i> Ap ^R Single copy. | De Las Peñas et al. (2003) |
| pGRB2.2 | Cloning vector derived from pGRB2.0, for <i>PGK1</i> -promoter fusions <i>URA3 C.g.CEN ARS</i> Ap ^R <i>PGK1</i> strong promoter. | (Domergue, et al., 2005) |
| pGE31 | A 0.747kb <i>SacI/BamHI</i> PCR fragment (primers 154/155) carrying the promoter region of <i>GSH1</i> a 1.036 <i>HindIII/KpnI</i> PCR fragment (primers 157/158) carrying the 3'UTR region of <i>GSH1</i> were cloned into pAP599 digested with <i>HindIII/KpnI</i> and <i>SacI/BamHI</i> . [5' <i>GSH1</i> ::hph::3'UTR <i>GSH1</i>]. <i>URA3</i> Ap ^R . | This work |
| pGE59 | A 3.844kb <i>SacI/KpnI</i> PCR fragment (primers 155/158) carrying the intergenic regions and ORF of <i>GSH1</i> was cloned into pGRB2.0 digested with <i>SacI/KpnI</i> . <i>URA3</i> Ap ^R . | This work |
| pGE67 | A 3.094kb <i>XbaI/SalI</i> PCR fragment (primers 728/729) carrying the ORF of <i>OPT1</i> and its 3'UTR of BY4742 strain of <i>S. cerevisiae</i> was cloned into pGRB2.2 digested with <i>XbaI/SalI</i> . Amp ^R | This work |
| pGE83 | A 1.748kb <i>SacI/KpnI</i> PCR fragment (primers 716/1005) carrying <i>PRO2</i> gene of CGM814 strain was cloned into pYIplac211 digested with <i>SacI/KpnI</i> . <i>URA3</i> Ap ^R | This work |

Table 3. Oligonucleotides used in this study

| Primer | Sequence | Sites |
|--------|---|-----------------|
| 154 | GCTGGATCCAGTCCTGCTCCAGTCC | <i>Bam</i> H I |
| 155 | CCAGGAGCTCCAGGTGCCATCAAAC TACC | <i>Sac</i> I |
| 157 | CCCAAGCTTTTTAAAGACATCCCCG | <i>Hind</i> III |
| 158 | CCGGGTACCGTTACATTTAGAAATAGC | <i>Kpn</i> I |
| 165 | GACTCACTATAGGGCGAATTGG | |
| 166 | CGGAATTAACCCCTCACTAAAGG | |
| 167 | GGTGGAGCTCCAATTCGCCCTATAGTGAGTCGCTCCCAGTCCTGCTCCAGTCC | |
| 169 | GCTTTTGTCCCTTTAGTGAGGGTTAATTCGACTTTTTAAAGACATCCCCG | |
| 170 | GGTATGGGCCAGTTACATTTAG | |
| 508 | CCAGGTTCCGCAGCGTCAAG | |
| 604 | AAAAATATCAAGTTCCTGATTTCCG | |
| 605 | CAAAGACGATGTGGTAGCC | |
| 635 | GGAGCTCCAATTCGCCCTATAGTGAGTCGGTATCTTCGGTAAAGACAAGC | |
| 637 | CGTATGGTATAGATCCAGCCGC | |
| 640 | TTTGTTCCCTTTAGTGAGGGTTAATTCGAAGATAAACGATAATGGTGCC | |
| 642 | CATCTGAGAGTTCGCTGG | |
| 716 | GAAGGTACCGCTATATTAGTTACACC | <i>Kpn</i> I |
| 728 | GAAGTCGACGATGTAGTTATAGTTG | <i>Sal</i> I |
| 729 | GCATCTAGAAAAATGAGTACCATTTATAGGGAG | <i>Xba</i> I |
| 909 | CACGGCTACCACATCGTCTTTGAGAAAAATATAACAAAAGCAAATG | |
| 910 | GCATAAAAAC TCCGGAAAGGGC | |
| 912 | CGAATTCAGGAAC TTGATATTTTTTACACACTGCTTGAGAATCAATGT | |
| 913 | GGTCTCGATGTTAACCGATTTAC | |
| 934 | CGAATTCAGGAAC TTGATATTTTTGTGGACGACACGGTGGATATG | |
| 935 | CCACTAGATCTCTTCTGGCTAAC | |
| 937 | CACGGCTACCACATCGTCTTTGCAGTATATAATGTTGCAGTTTATC | |
| 938 | CTGTTCAAGTCGAGGATAAGG | |
| 1005 | GCGAGCTCAGCTGAATAGTATGTGTGAT | <i>Sac</i> I |
| 1088 | CAATAATTCAGACAATGAACG | |
| 1090 | CAGTTGTCATTTCTAGTTGCTG | |
| 1092 | GCCCATAGTCATCGTCCCAA | |



References

Al-Lahham A, Rohde V, Heim P, *et al.* (1999) Biosynthesis of phytochelatin in the fission yeast. Phytochelatin synthesis: a second role for the glutathione synthetase gene of *Schizosaccharomyces pombe*. *Yeast* 15: 385-396.

Anderson ME (1985) Determination of glutathione and glutathione disulfide in biological samples. *Methods Enzymol* 113: 548-555.

Ausubel FM (1992) *Short protocols in molecular biology : a compendium of methods from Current protocols in molecular biology*. Greene, New York, N.Y.

Avery AM & Avery SV (2001) *Saccharomyces cerevisiae* expresses three phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidases. *J Biol Chem* 276: 33730-33735.

Bourbouloux A, Shahi P, Chakladar A, Delrot S & Bachhawat AK (2000) Hgt1p, a high affinity glutathione transporter from the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* 275: 13259-13265.

Byrne KP & Wolfe KH (2005) The Yeast Gene Order Browser: combining curated homology and syntenic context reveals gene fate in polyploid species. *Genome Res* 15: 1456-1461.

Carmel-Harel O & Storz G (2000) 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.

Castano I, Pan SJ, Zupancic M, Hennequin C, Dujon B & Cormack BP (2005) Telomere length control and transcriptional regulation of subtelomeric adhesins in *Candida glabrata*. *Mol Microbiol* 55: 1246-1258.

Castano I, Kaur R, Pan S, *et al.* (2003) Tn7-based genome-wide random insertional mutagenesis of *Candida glabrata*. *Genome Res* 13: 905-915.

Cormack BP, Ghori N & Falkow S (1999) An adhesin of the yeast pathogen *Candida glabrata* mediating adherence to human epithelial cells. *Science* 285: 578-582.

Cuellar-Cruz M, Briones-Martin-del-Campo M, Canas-Villamar I, Montalvo-Arredondo J, Riego-Ruiz L, Castano I & De Las Penas A (2008) 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.

Chaudhuri B, Ingavale S & Bachhawat AK (1997) apd1+, a gene required for red pigment formation in ade6 mutants of *Schizosaccharomyces pombe*, encodes an enzyme required for glutathione biosynthesis: a role for glutathione and a glutathione-conjugate pump. *Genetics* 145: 75-83.

De Las Penas A, Pan SJ, Castano I, Alder J, Cregg R & Cormack BP (2003) 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.

Diekema DJ, Messer SA, Brueggemann AB, Coffman SL, Doern GV, Herwaldt LA & Pfaller MA (2002) Epidemiology of candidemia: 3-year results from the emerging infections and the epidemiology of Iowa organisms study. *J Clin Microbiol* 40: 1298-1302.

Fernandes AP & Holmgren A (2004) Glutaredoxins: glutathione-dependent redox enzymes with functions far beyond a simple thioredoxin backup system. *Antioxid Redox Signal* 6: 63-74.

Gasch AP (2007) Comparative genomics of the environmental stress response in ascomycete fungi. *Yeast* 24: 961-976.

Grant CM, MacIver FH & Dawes IW (1996) Glutathione is an essential metabolite required for resistance to oxidative stress in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Curr Genet* 29: 511-515.



Grant CM, Maclver FH & Dawes IW (1997) Glutathione synthetase is dispensable for growth under both normal and oxidative stress conditions in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* due to an accumulation of the dipeptide gamma-glutamylcysteine. *Mol Biol Cell* 8: 1699-1707.

Grant CM, Perrone G & Dawes IW (1998) Glutathione and catalase provide overlapping defenses for protection against hydrogen peroxide in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochem Biophys Res Commun* 253: 893-898.

Halliwell B & Gutteridge JMC (2007) *Free radicals in biology and medicine*. Oxford University Press, Oxford.

Hauser M, Donhardt AM, Barnes D, Naider F & Becker JM (2000) Enkephalins are transported by a novel eukaryotic peptide uptake system. *J Biol Chem* 275: 3037-3041.

Heeren G, Jarolim S, Laun P, *et al.* (2004) The role of respiration, reactive oxygen species and oxidative stress in mother cell-specific ageing of yeast strains defective in the RAS signalling pathway. *FEMS Yeast Res* 5: 157-167.

Higgins DG, Thompson JD & Gibson TJ (1996) Using CLUSTAL for multiple sequence alignments. *Methods Enzymol* 266: 383-402.

Hwang CS, Rhie GE, Oh JH, Huh WK, Yim HS & Kang SO (2002) Copper- and zinc-containing superoxide dismutase (Cu/ZnSOD) is required for the protection of *Candida albicans* against oxidative stresses and the expression of its full virulence. *Microbiology* 148: 3705-3713.

Izawa S, Inoue Y & Kimura A (1996) Importance of catalase in the adaptive response to hydrogen peroxide: analysis of acatalasaemic *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochem J* 320 (Pt 1): 61-67.

Jaspers C, Penninckx M & Wiame JM (1980) Glutathione metabolism and the transport of amino acids in *Saccharomyces cerevisiae*. The gamma-glutamyltranspeptidase [proceedings]. *Arch Int Physiol Biochim* 88: B34.

Kaur R, Ma B & Cormack BP (2007) A family of glycosylphosphatidylinositol-linked aspartyl proteases is required for virulence of *Candida glabrata*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104: 7628-7633.

Kumar C, Sharma R & Bachhawat AK (2003) Utilization of glutathione as an exogenous sulfur source is independent of gamma-glutamyl transpeptidase in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*: evidence for an alternative glutathione degradation pathway. *FEMS Microbiol Lett* 219: 187-194.

Kumar C, Igbaria A, D'Autreaux B, *et al.* (2011) Glutathione revisited: a vital function in iron metabolism and ancillary role in thiol-redox control. *EMBO J* 30: 2044-2056.

Kuwayama H, Obara S, Morio T, Katoh M, Urushihara H & Tanaka Y (2002) PCR-mediated generation of a gene disruption construct without the use of DNA ligase and plasmid vectors. *Nucleic Acids Res* 30: E2.

Lee J, Godon C, Lagniel G, Spector D, Garin J, Labarre J & Toledano MB (1999) Yap1 and Skn7 control two specialized oxidative stress response regulons in yeast. *J Biol Chem* 274: 16040-16046.

Li L, Redding S & Dongari-Bagtzoglou A (2007) *Candida glabrata*: an emerging oral opportunistic pathogen. *J Dent Res* 86: 204-215.

Li ZS, Lu YP, Zhen RG, Szczypka M, Thiele DJ & Rea PA (1997) A new pathway for vacuolar cadmium sequestration in *Saccharomyces cerevisiae*: YCF1-catalyzed transport of bis(glutathionato)cadmium. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94: 42-47.

Lopez-Mirabal HR & Winther JR (2008) Redox characteristics of the eukaryotic cytosol. *Biochim Biophys Acta* 1783: 629-640.

Luikenhuis S, Perrone G, Dawes IW & Grant CM (1998) The yeast *Saccharomyces cerevisiae* contains two glutaredoxin genes that are required for protection against reactive oxygen species. *Mol Biol Cell* 9: 1081-1091.



- Mansour MK & Levitz SM (2002) Interactions of fungi with phagocytes. *Curr Opin Microbiol* 5: 359-365.
- Meister A & Anderson ME (1983) Glutathione. *Annu Rev Biochem* 52: 711-760.
- Muller EG (1991) Thioredoxin deficiency in yeast prolongs S phase and shortens the G1 interval of the cell cycle. *J Biol Chem* 266: 9194-9202.
- Murakami CJ, Burtner CR, Kennedy BK & Kaerberlein M (2008) A method for high-throughput quantitative analysis of yeast chronological life span. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 63: 113-121.
- Mutoh N, Kawabata M & Kitajima S (2005) Effects of four oxidants, menadione, 1-chloro-2,4-dinitrobenzene, hydrogen peroxide and cumene hydroperoxide, on fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *J Biochem* 138: 797-804.
- Ortiz DF, Kreppel L, Speiser DM, Scheel G, McDonald G & Ow DW (1992) Heavy metal tolerance in the fission yeast requires an ATP-binding cassette-type vacuolar membrane transporter. *EMBO J* 11: 3491-3499.
- Paris S, Wysong D, Debeaupuis JP, Shibuya K, Philippe B, Diamond RD & Latge JP (2003) Catalases of *Aspergillus fumigatus*. *Infect Immun* 71: 3551-3562.
- Penninckx MJ (2002) An overview on glutathione in *Saccharomyces* versus non-conventional yeasts. *FEMS Yeast Res* 2: 295-305.
- Penninckx MJ & Elskens MT (1993) Metabolism and functions of glutathione in micro-organisms. *Adv Microb Physiol* 34: 239-301.
- Pfaller MA & Diekema DJ (2010) Epidemiology of invasive mycoses in North America. *Crit Rev Microbiol* 36: 1-53.
- Presterl E, Daxbock F, Graninger W & Willinger B (2007) Changing pattern of candidaemia 2001-2006 and use of antifungal therapy at the University Hospital of Vienna, Austria. *Clin Microbiol Infect* 13: 1072-1076.
- Rausser WE (1990) Phytochelatins. *Annu Rev Biochem* 59: 61-86.
- Rausser WE (1995) Phytochelatins and related peptides. Structure, biosynthesis, and function. *Plant Physiol* 109: 1141-1149.
- Roetzer A, Gratz N, Kovarik P & Schuller C (2010) Autophagy supports *Candida glabrata* survival during phagocytosis. *Cell Microbiol* 12: 199-216.
- Roetzer A, Gregori C, Jennings AM, *et al.* (2008) *Candida glabrata* environmental stress response involves *Saccharomyces cerevisiae* Msn2/4 orthologous transcription factors. *Mol Microbiol* 69: 603-620.
- Roetzer A, Klopff E, Gratz N, *et al.* (2011) Regulation of *Candida glabrata* oxidative stress resistance is adapted to host environment. *FEBS Lett* 585: 319-327.
- Saijo T, Miyazaki T, Izumikawa K, *et al.* (2010) Skn7p is involved in oxidative stress response and virulence of *Candida glabrata*. *Mycopathologia* 169: 81-90.
- Seider K, Brunke S, Schild L, *et al.* (2011) The facultative intracellular pathogen *Candida glabrata* subverts macrophage cytokine production and phagolysosome maturation. *J Immunol* 187: 3072-3086.
- Sherman F, Fink GR & Hicks JB (1986) *Laboratory course manual for methods in yeast genetics*. Cold Spring Harbor Laboratory.
- Sipos K, Lange H, Fekete Z, Ullmann P, Lill R & Kispal G (2002) Maturation of cytosolic iron-sulfur proteins requires glutathione. *J Biol Chem* 277: 26944-26949.
- Spector D, Labarre J & Toledano MB (2001) A genetic investigation of the essential role of glutathione: mutations in the proline biosynthesis pathway are the only suppressors of glutathione auxotrophy in yeast. *J Biol Chem* 276: 7011-7016.



Stephen DW & Jamieson DJ (1996) Glutathione is an important antioxidant molecule in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiol Lett* 141: 207-212.

Temple MD, Perrone GG & Dawes IW (2005) Complex cellular responses to reactive oxygen species. *Trends Cell Biol* 15: 319-326.

Thompson LJ, Merrell DS, Neilan BA, Mitchell H, Lee A & Falkow S (2003) Gene expression profiling of *Helicobacter pylori* reveals a growth-phase-dependent switch in virulence gene expression. *Infect Immun* 71: 2643-2655.

Thorpe GW, Fong CS, Alic N, Higgins VJ & Dawes IW (2004) Cells have distinct mechanisms to maintain protection against different reactive oxygen species: oxidative-stress-response genes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101: 6564-6569.

Toledano MB, Kumar C, Le Moan N, Spector D & Tacnet F (2007) 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.

Tomenchok DM & Brandriss MC (1987) Gene-enzyme relationships in the proline biosynthetic pathway of *Saccharomyces cerevisiae*. *J Bacteriol* 169: 5364-5372.

Veeravalli K, Boyd D, Iverson BL, Beckwith J & Georgiou G (2011) Laboratory evolution of glutathione biosynthesis reveals natural compensatory pathways. *Nat Chem Biol* 7: 101-105.

Wysong DR, Christin L, Sugar AM, Robbins PW & Diamond RD (1998) Cloning and sequencing of a *Candida albicans* catalase gene and effects of disruption of this gene. *Infect Immun* 66: 1953-1961.

Yadav AK, Desai PR, Rai MN, Kaur R, Ganesan K & Bachhawat AK (2011) 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.

RESULTADOS ADICIONALES

1. Esencialidad del gen *GSH1*

Para demostrar que *GSH1* es esencial en *C. glabrata*, evaluamos la p3rdida del pl3smido portador del gen *GSH1* (pGE59) utilizando medios de selecci3n (CAA) y contraselecci3n para el pl3smido (5-FOA) con diferentes concentraciones de GSH. Como se muestra en la figura el 100% de las c3lulas de la mutante *gsh1Δ* retiene el pl3smido que porta el gen *GSH1* a3n en presencia de GSH ex3geno. La cepa silvestre pierde en menor porcentaje el pl3smido portador del gen *GSH1* que el vector vac3o.

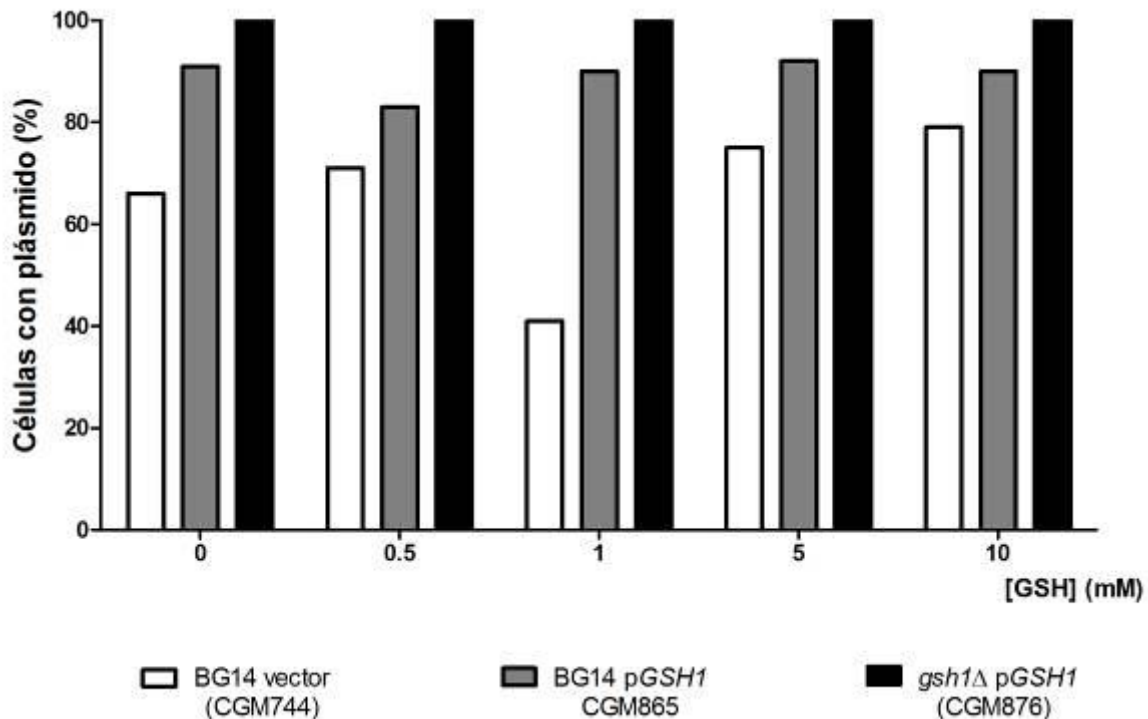


Figura 6. El gen *GSH1* es un gen esencial. Las cepas BG14 pGRB2.0 (CGM744), BG14 pGSH1 (CGM865) y *gsh1Δ* pGSH1 (CGM876) se crecieron a 30 °C por 24 h en YPD, se diluyeron en medio fresco y se crecieron por 48 h. Las c3lulas se lavaron, se hicieron diluciones seriadas y se sembraron en placas de YPD y en placas de 5-FOA para determinar la p3rdida del pl3smido *URA3*. Las c3lulas Ura⁺ mueren en las placas de 5-FOA. Las c3lulas que pierden el pl3smido crecen en 5-FOA. Ver materiales y m3todos.

Observamos que no era posible interrumpir el gen *GSH1* en presencia de GSH ex3geno, esto indicaba que en las condiciones que utilizamos no se efectuaba el transporte de GSH. Sobreexpresamos el gen *ScOPT1* en *C. glabrata* y logramos interrumpir el gen *GSH1*. Enseguida evaluamos la p3rdida del pl3smido que porta al gen *ScOPT1* en los medios YPD, CAA y YNB sin y con GSH 0.5 mM en la cepa silvestre y en la cepa *gsh1Δ*. La mutante *gsh1Δ* no pierde el pl3smido y que la cepa silvestre trata de conservarlo (Figura 7).

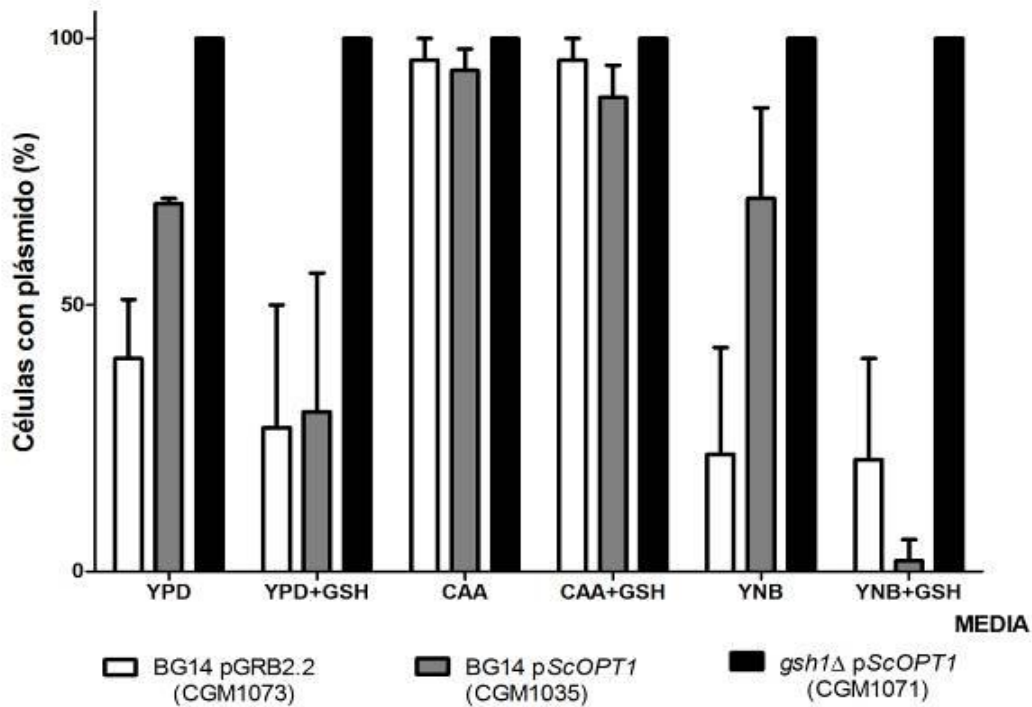


Figura 7. La presencia de *ScOPT1* permite interrumpir el gen *GSH1* en *C. glabrata*. Las cepas BG14 pBRG2.2 (CMG1073), BG14 pScOPT1 (CGM1035) y *gsh1Δ* pScOPT1 (CGM1071) se crecieron durante una noche a 30 °C en YPD, CAA 3 ó YNB sin 3 con GSH 0.5 mM y se inocularon tres veces en el medio fresco correspondiente. Las c3lulas se lavaron, se hicieron diluciones seriadas y se sembraron en placas de YPD y en placas de 5-FOA para determinar la p3rdida del pl3smido *URA3*. Las c3lulas Ura⁺ mueren en las placas de 5-FOA. Las c3lulas que pierden el pl3smido crecen en 5-FOA. Ver materiales y m3todos.

2. An3lisis fenot3pico de las mutantes deficientes en la s3ntesis de GSH

2.1. Crecimiento en medio YPD.

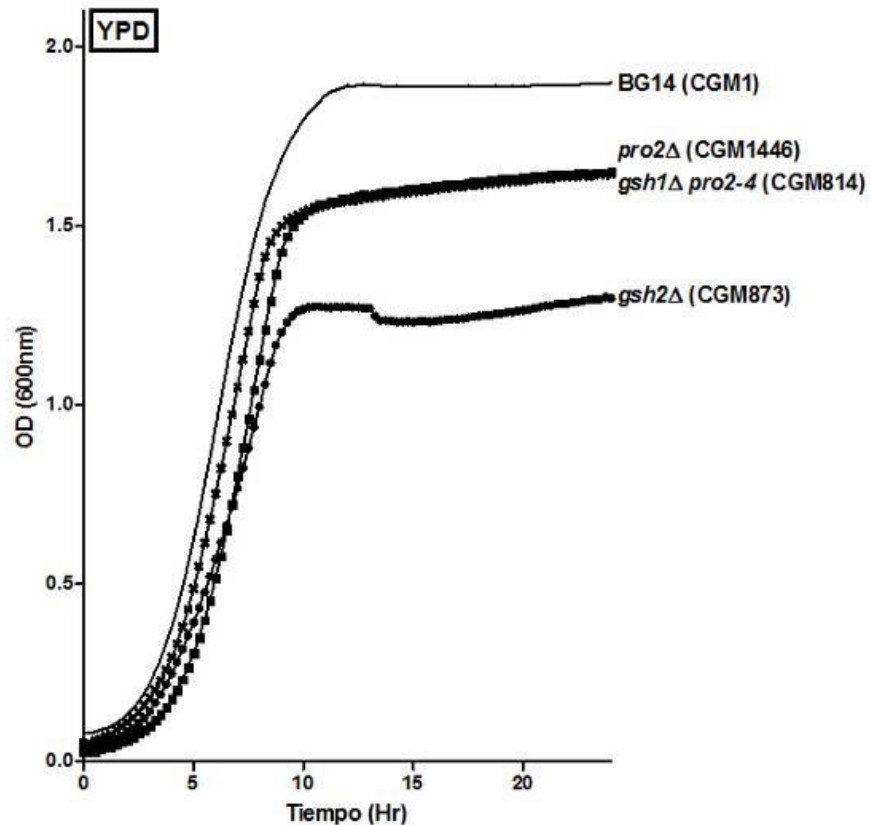


Figura 8. An3lisis del crecimiento en medio YPD l3quido. Las cepas BG14 (CGM1), *pro2*Δ (CGM1446), *gsh1*Δ *pro2-4* (CGM814) y *gsh2*Δ (CGM873) se crecieron durante 48 h a 30 °C en YPD y se inocularon en medio fresco a una densidad celular de 5×10^5 células/mL. Se tomaron 300 μ L de las suspensiones celulares y se colocaron por duplicado en una placa para monitorear su crecimiento en Bioscreen a 30 °C en agitaci3n constante. Ver materiales y m3todos.

2.2. Crecimiento en YNB. Evaluación de los requerimientos de GSH y L-Pro.

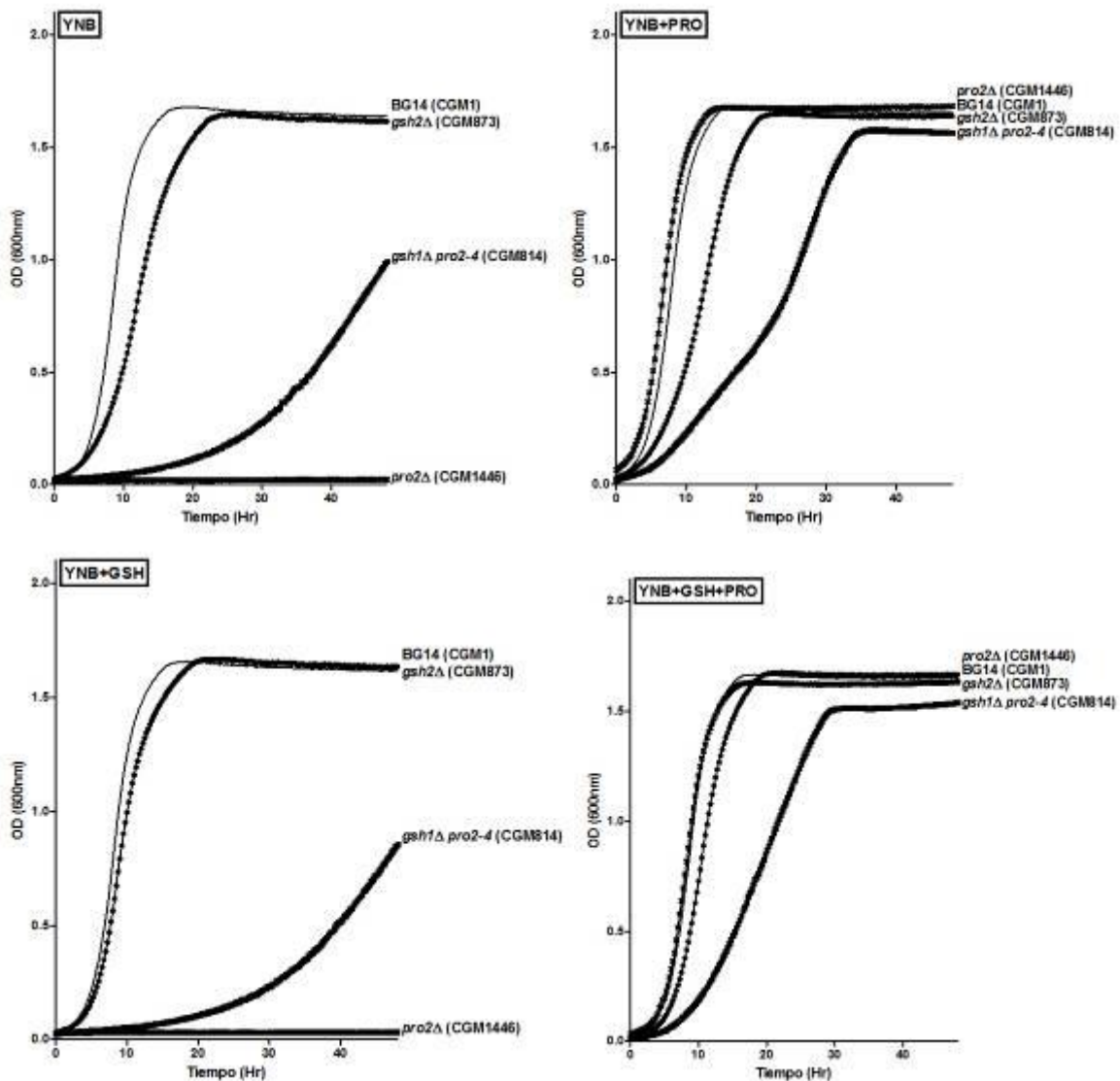


Figura 9. Análisis del crecimiento en medio YNB líquido. Las cepas BG14 (CGM1), *pro2*Δ (CGM1446), *gsh1*Δ *pro2-4* (CGM814) y *gsh2*Δ (CGM873) y se crecieron durante 48 h a 30 °C en YNB, YNB+PRO, YNB+GSH Y YNB+GSH+PRO y se inocularon en medio fresco a una densidad celular de 5×10^5 células/mL. Se tomaron 300 μ L de las suspensiones celulares y se colocaron por duplicado en una placa para monitorear su crecimiento en Bioscreen a 30 °C en agitación constante. Ver materiales y métodos.

La figura 9 muestra que la mutante *gsh1Δ pro2-4* requiere prolina y GSH para su crecimiento, mientras que la mutante *gsh2Δ* s3lo requiere GSH. El panel A muestra que la mutante *gsh1Δ pro2-4* presenta un lag muy largo con respecto a la cepa silvestre o a la mutante *gsh2Δ*, como control se incluye a la mutante *pro2Δ*, la cual es aux3trofa de prolina. En el panel B se muestra como la adici3n de GSH mejora considerablemente el crecimiento de la mutante *gsh2Δ*, sin afectar el crecimiento en la mutante *gsh1Δ pro2-4*. En el panel C podemos ver como la adici3n de prolina restaura el crecimiento de la mutante *pro2Δ* a los mismo niveles que la cepa silvestre BG14 y mejora notablemente el crecimiento de la mutante *gsh1Δ pro2-4*. en el panel D se muestra como la adici3n simult3nea de GSH y prolina mejora en mayor medida el crecimiento de la mutante *gsh1Δ pro2-4* que s3lo la adici3n de uno de los dos compuestos.

2.3. Crecimiento en diferentes fuentes de carbono.

Para determinar la utilizaci3n de carbono de las mutantes *gsh1Δ pro2-4* y *gsh2Δ*, evaluamos su crecimiento en diferentes fuentes de carbono: glucosa (YPD), glicerol (YPG) y etanol (YPE). En la figura 20 vemos que todas las cepas pueden utilizar estas fuentes de carbono de manera similar. Como controles evaluamos el crecimiento de cepas que contienen episomalmente el transportador de GSH de *S. cerevisiae*.

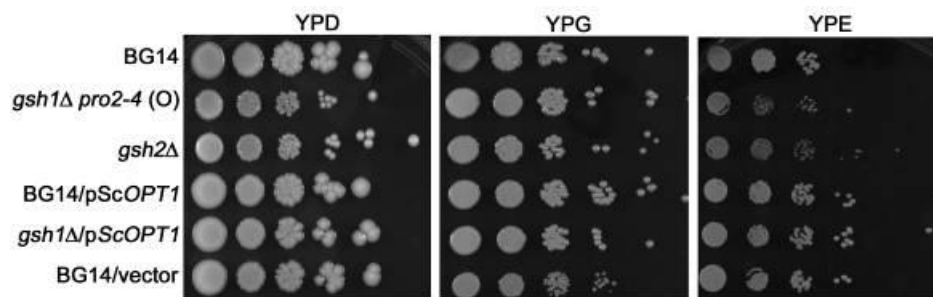


Figura 10. An3lisis del crecimiento en diferentes fuentes de carbono. Cultivos de la cepa BG14 (CGM1) y de las mutantes en la s3ntesis de GSH, *gsh1Δ pro2-4* (CGM814) y *gsh2Δ* (CGM873), y como controles las cepas BG14 pScOPT1 (CGM1035), *gsh1Δ pScOPT1* (CGM1071) y BG14 vector (CGM1073) se crecieron en medio YPD durante 48 h a 30 3C. Las c3lulas se lavaron y se diluyeron a una densidad celular de 1×10^7 c3lulas/mL. Se hicieron diluciones logar3micas y 5 μ L de cada diluci3n se colocaron en placas de YPD, YPG y YPE. Las placas se incubaron a 30 3C durante 48 h.

2.4. Funcionalidad del alelo *pro2-4*.

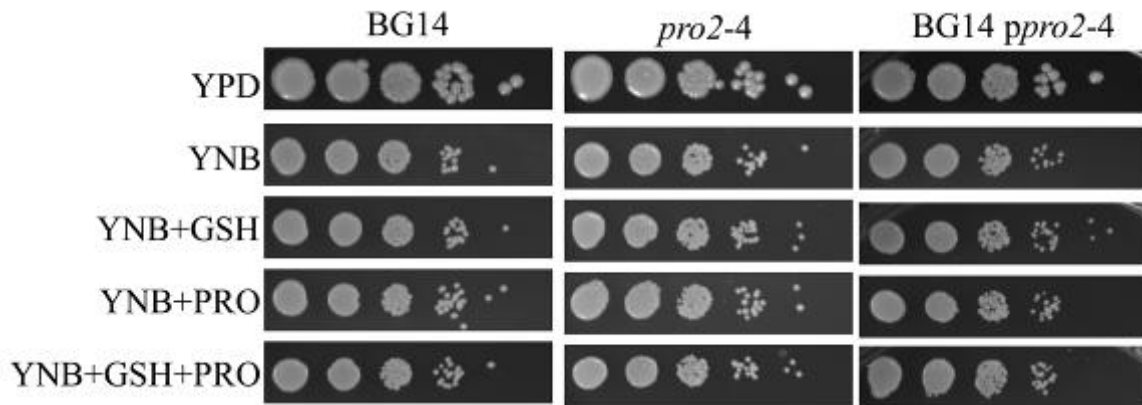


Figura 11. An3lisis de la funcionalidad del alelo *pro2-4* para la bios3ntesis de prolina.

Las cepas BG14 (CGM1), *pro2-4* (CGM1592) y BG14 *ppro2-4* (CGM1601) se crecieron durante 48 h a 30°C en YNB, se lavaron y se ajustaron a una densidad celular de 1×10^7 c3lulas/mL. Se tomaron 5 μ L de las suspensiones celulares y se colocaron en una placas de YPD, YNB, YNB+GSH, YNB+PRO y YNB+GSH+PRO y se incubaron a 30 °C durante 48 h. Ver materiales y m3todos.

La figura 11 nos muestra que el requerimiento de prolina en la mutante *gsh1 Δ pro2-4* no se debe a la mutaci3n *pro2-4*, ya que el alelo con esta mutaci3n es funcional para la bios3ntesis de L-prolina. La mutaci3n supresora *pro2-4* se introdujo en la cepa silvestre BG14 utilizando el pl3smido integrativo pGE84 digerido con *Age* I. Por otro lado, la mutaci3n supresora *pro2-4* se clon3 en un pl3smido replicativo (pGE92) para evaluar la dominancia o recesividad de este alelo. Como se observa en la figura 9, ninguna de estas mutantes es aux3trofa de prolina lo cual indica que la mutaci3n supresora en el gen *PRO2* no es responsable de la auxotrofia a prolina que observamos en la mutante *gsh1 Δ pro2-4* (CGM814).

El gen *GSH1* se regres3 a su lugar cromos3mico original en la mutante *gsh1Δ pro2-4* (CGM814) utilizando el pl3smido integrativo pGE77 digerido con *P1m* I. Adem3s, en la mutante *gsh1Δ pro2-4* (CGM814) se evalu3 si el alelo silvestre *PRO2* eliminaba su auxotrof3a a prolina utilizando el pl3smido replicativo pGE90. Como se observa en la figura 12, s3lo la presencia del alelo silvestre elimina la auxotrof3a a prolina en la mutante *gsh1Δ pro2-4* (CGM814).

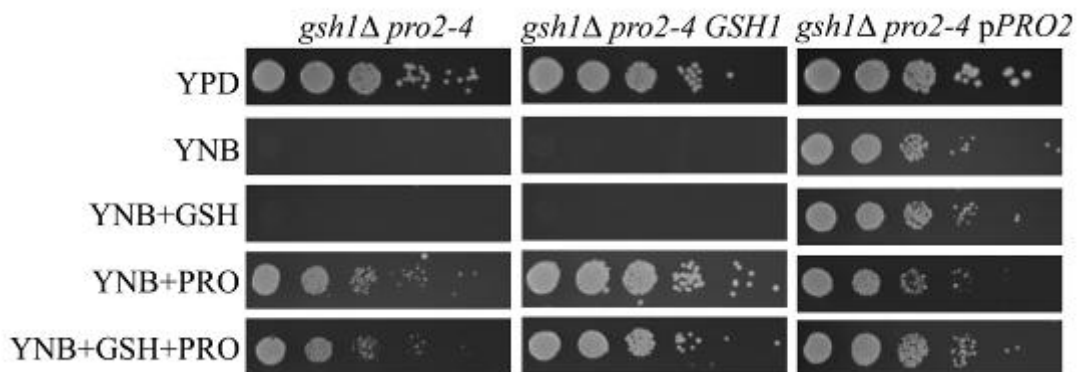


Figura 12. El requerimiento de prolina en la mutante *gsh1Δ pro2-4* se mantiene a3n cuando se reconstituye el gen *GSH1* en su locus nativo y se elimina cuando se complementa con una copia del gen *PRO2* silvestre. Las cepas *gsh1Δ pro2-4* (CGM814), *pro2-4 GSH1* (CGM1290) y *gsh1Δ pro2-4 pPRO2* (CGM1603) se crecieron durante 48 h a 30 °C en YNB, se lavaron y se ajustaron a una densidad celular de 1×10^7 c3lulas/mL. Se tomaron 5 μ L de las suspensiones celulares y se colocaron en una placas de YPD, YNB, YNB+GSH, YNB+PRO y YNB+GSH+PRO y se incubaron a 30 °C durante 48 h. Ver materiales y m3todos.

En la mutante *pro2Δ* se introdujeron los pl3smidos replicativos pGE90 y pGE92 para evaluar si estos alelos eliminaban la auxotrof3a por prolina. Como lo muestra la figura 13, ambos alelos son funcionales para la bios3ntesis de prolina.

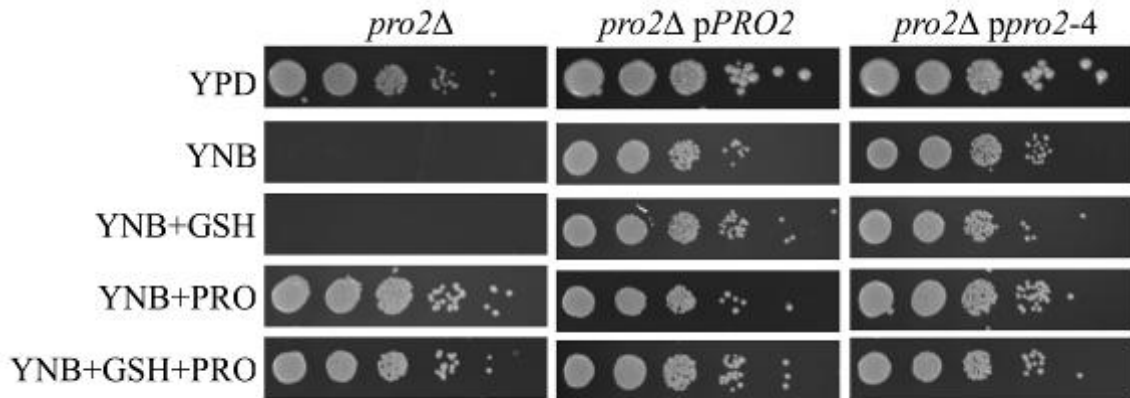


Figura 13. En la mutante *pro2Δ* se elimina la auxotrofía a prolina expresando de manera episomal el alelo silvestre *PRO2* o el alelo *pro2-4*. Las cepas *pro2Δ* (CGM1446), *pro2Δ pPRO2* (CGM1613), y *pro2Δ ppro2-4* (CGM1615) se crecieron durante 48 h a 30 °C en YNB, se lavaron y se ajustaron a una densidad celular de 1×10^7 células/mL. Se tomaron 5 μ L de las suspensiones celulares y se colocaron en una placas de YPD, YNB, YNB+GSH, YNB+PRO y YNB+GSH+PRO y se incubaron a 30 °C durante 48 h. Ver materiales y métodos.

2.5. Competencia entre el transporte de GSH y L-Pro.

Reconstruimos la mutante *gsh1Δ pro2-4* y evaluamos sus requerimientos por prolina y GSH. En la mutante *pro2Δ* se introdujeron los plásmidos replicativos pGE90 y pGE92 para evaluar si estos alelos eliminaban la auxotrofía por prolina. Como se observa en la figura 14, ambos alelos son funcionales para la biosíntesis de prolina.

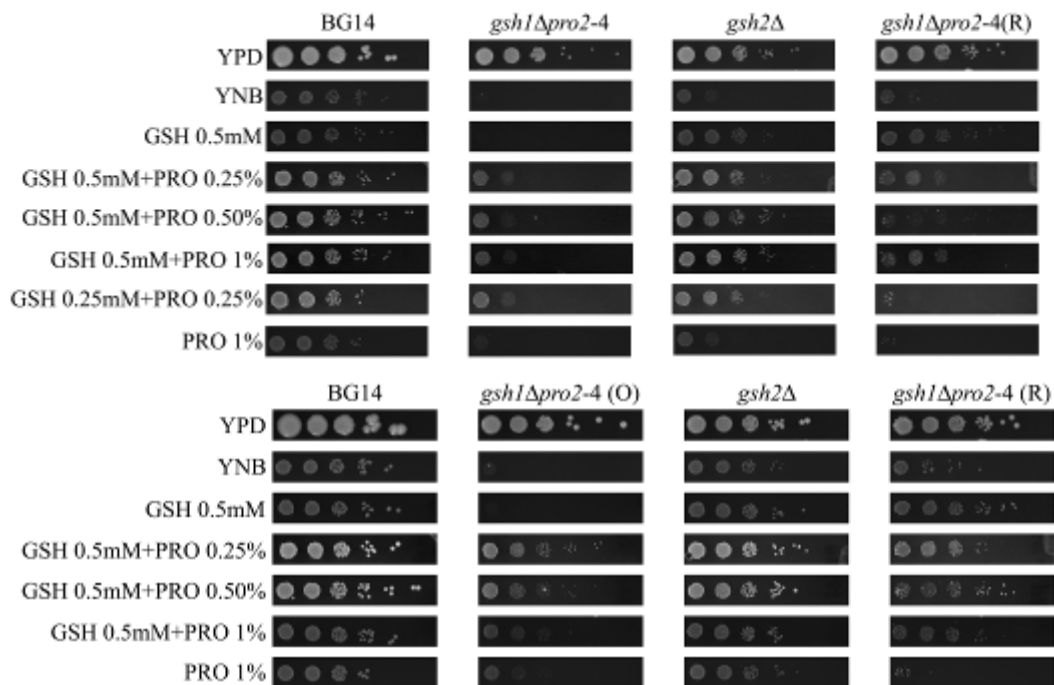


Figura 14. La presencia de prolina afecta la toma de GSH. Las cepas BG14 (CGM1) *pro2Δ* (CGM1446), *pro2Δ pPRO2* (CGM1613), y *pro2Δ ppro2-4* (CGM1615) se crecieron durante 48 h a 30 °C en YNB, se lavaron y se ajustaron a una densidad celular de 1×10^7 células/mL. Se tomaron 5 μ L de las suspensiones celulares y se colocaron en una placas de YPD, YNB, YNB+GSH, YNB+PRO y YNB+GSH+PRO y se incubaron a 30°C durante 48h. Ver materiales y métodos.

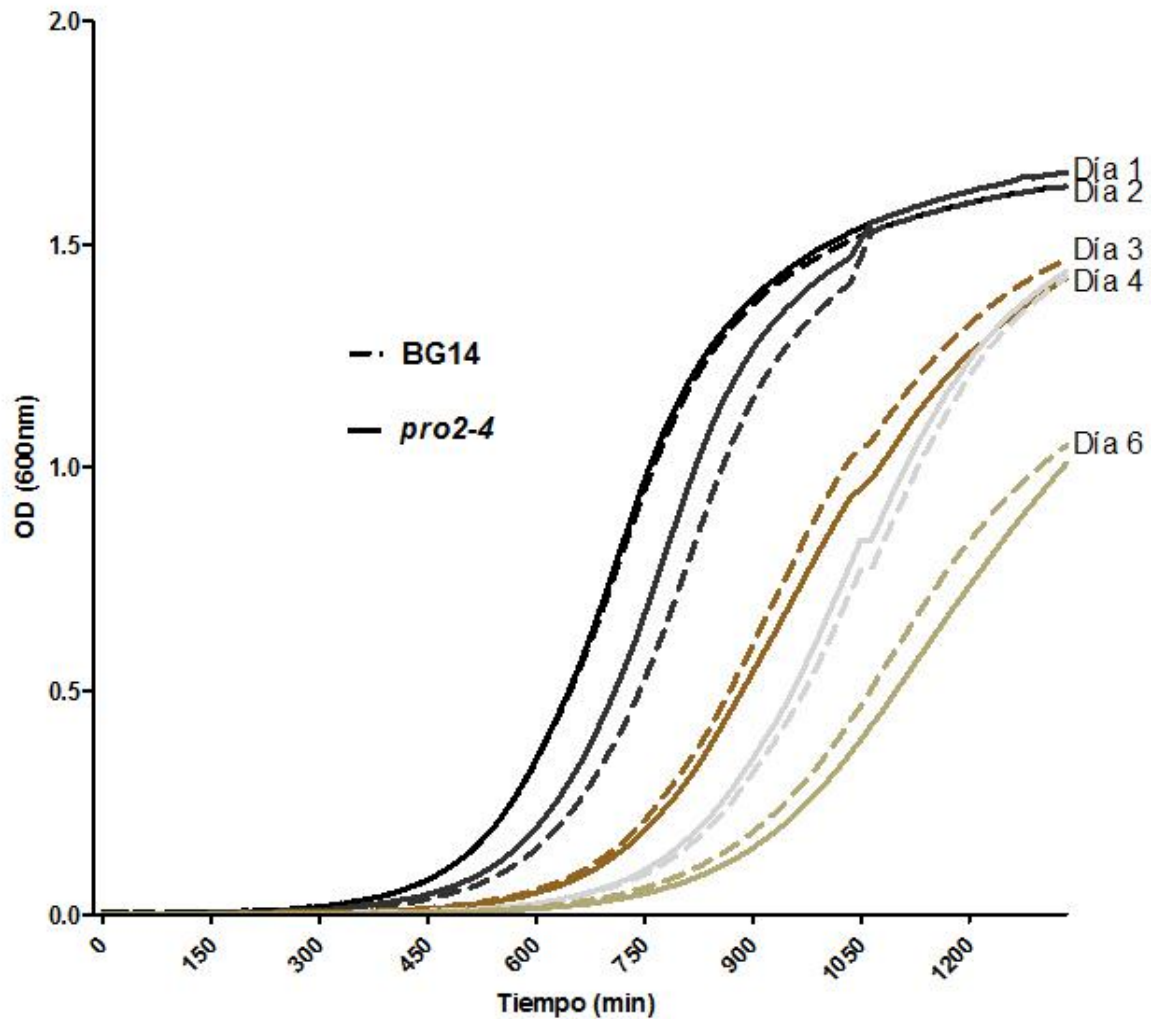
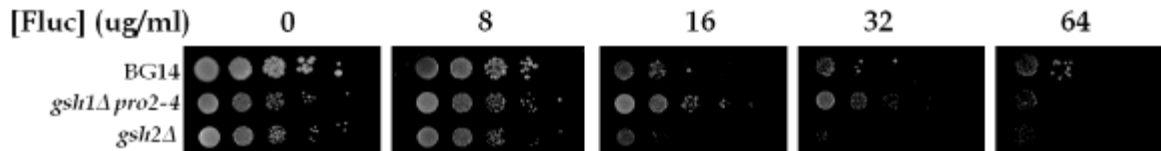


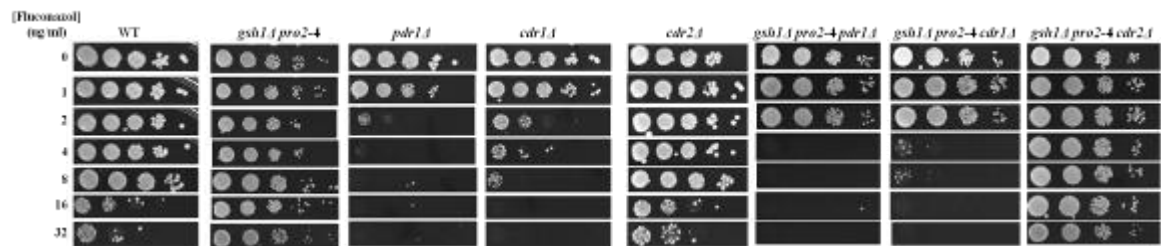
Figura 15. Análisis del crecimiento de la mutante *pro2-4* durante varios días de crecimiento. Cultivos de la cepa BG14 (CGM1) y de la mutante *pro2-4* (CGM1592) se crecieron en YNB durante 48 h a 30°C. Las células se lavaron y se diluyeron a una densidad celular a 2×10^6 células/mL. El crecimiento se evaluó en YNB en un BIOSCREEN durante 24 h a 30 °C en agitación constante. Las curvas de cada día corresponden al crecimiento de un medio reinoculado con el cultivo antecesor.

3. GSH y resistencia a fluconazol

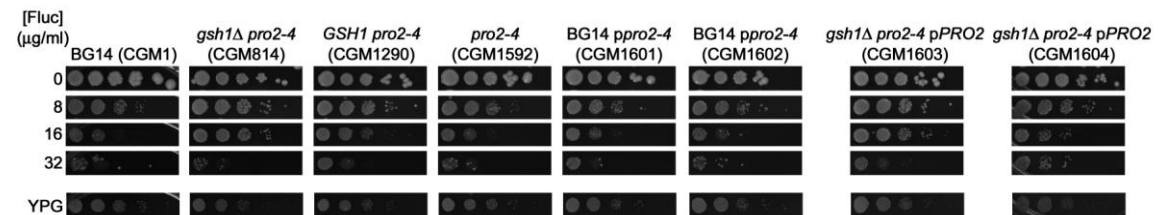
A



B



C



D

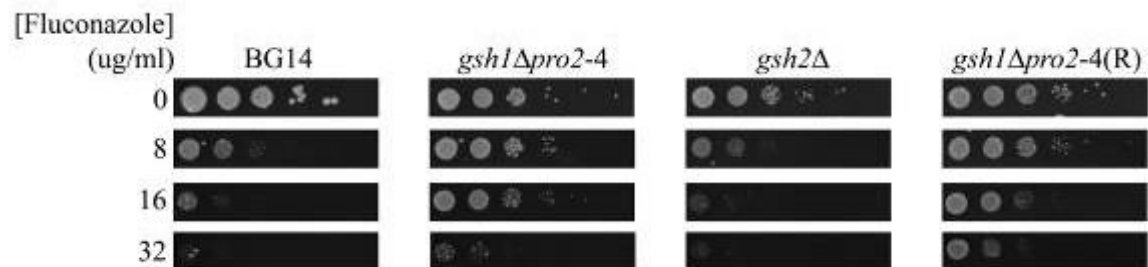


Figura 16. La mutante *GSH1 pro2-4* es más resistente a fluconazol que la cepa silvestre y la resistencia es independiente de los genes *PDRs*. Cultivos de la cepa BG14 (CGM1) y de las mutantes *gsh1Δ pro2-4* (CGM814), *gsh2Δ* (CGM873), *pdr1Δ* (CGM104), *cdr1Δ* (CGM1096), *cdr2Δ* (CGM1098), *gsh1Δ pro2-4 pdr1Δ* (CGM1216), *gsh1Δ pro2-4 cdr1Δ* (CGM1240), *gsh1Δ pro2-4 cdr2Δ* (CGM1217), *GSH1 pro2-4* (CGM1290), *pro2-4* (CGM1592), BG14 *ppro2-4* (CGM1601 y CGM1602), *gsh1Δ pro2-4 pPRO2* (CGM1603 y CGM1604) y *gsh1Δ pro2-4R* (CGM1627) se crecieron en medio YPD durante 48 h a 30 °C. Las células se lavaron y se diluyeron a una densidad celular de 1×10^7 células/mL. Se hicieron diluciones logarítmicas y 5 μ L de cada dilución se colocaron en placas de YPD sin o con diferentes concentraciones de fluconazol. Las placas se incubaron a 30 °C durante 48 h.

Debido a la participación del GSH en procesos de desintoxicación de drogas, evaluamos la resistencia de las mutantes *gsh1Δ pro2-4* y *gsh2Δ* a fluconazol. En el panel A podemos ver que la mutante *gsh1Δ pro2-4* soporta mejor la exposición a este agente azólico. Evaluamos si existía alguna relación entre la ausencia del gen *GSH1* y la desintoxicación de fluconazol por medio del sistema Pdr. En el fondo mutante *gsh1Δ pro2-4* hicimos las mutantes *pdr1Δ*, *cdr1Δ* y *cdr2Δ*. El panel B muestra que las mutantes dobles generadas son más resistentes a fluconazol que las mutantes sencillas correspondientes. En el panel C evaluamos la resistencia a fluconazol en una mutante en la que regresamos el gen *GSH1* a su lugar cromosómico nativo, en una cepa en la que se reemplazó el alelo *PRO2* por el alelo *pro2-4* y en mutantes donde se expresó episomalmente, bajo el control de un promotor fuerte constitutivo, el alelo *pro2-4* y el alelo *PRO2* en los fondos BG14 y de la mutante *gsh1Δ pro2-4*, respectivamente. Se observa que la mutante *GSH1 pro2-4* es similarmente resistente que su cepa parental, *gsh1Δ pro2-4*. La presencia del alelo *pro2-4*, así como la sobreexpresión de los alelos del gen *PRO2* no tienen efecto en la resistencia a fluconazol que presentan sus cepas parentales. En el panel D podemos observar que la mutante reconstruida *gsh1Δ pro2-4* presenta el mismo fenotipo de resistencia a fluconazol que la mutante supresora original. Estos datos indican, que la resistencia que observamos en la mutante *gsh1Δ pro2-4* se debe a la combinación de la ausencia del gen *GSH1* y a la presencia del alelo *pro2-4*.

DISCUSIÓN

Candida glabrata está repuntando como uno de los aislados más frecuentes en infecciones micóticas de pacientes inmunocomprometidos. El incremento en su prevalencia se atribuye a su resistencia innata a los azoles, los cuales son la primera línea de tratamiento. Dado el incremento en la prevalencia de esta levadura es fundamental su estudio a nivel molecular para poder detectar nuevos blancos para la generación de drogas. Asimismo, es de suma importancia elucidar los factores que afectan la colonización y sobrevivencia dentro de su hospedero.

El GSH (glutación) es un compuesto importante para la virulencia en varios microorganismos (Alkhuder, *et al.*, 2009, Yadav, *et al.*, 2011) y varias de las enzimas que requieren al GSH como cofactor también se han reportado como factores de virulencia indispensables para una infección exitosa (Bjur, *et al.*, 2006, Chaves, *et al.*, 2007, Abad, *et al.*, 2010, Huang, *et al.*, 2011). En este trabajo estudiamos la participación del GSH en la respuesta a estrés oxidante de *C. glabrata* y nos enfocamos en entender los mecanismos de transporte del GSH a la célula y su relación con el metabolismo de la prolina.

En este trabajo demostramos que el GSH es un factor importante para soportar el estrés oxidante en *C. glabrata* y que influye en su viabilidad en fase estacionaria. Aún cuando nuestros datos sugieren que el GSH puede influir en la patogénesis de *C. glabrata* se requieren experimentos para evaluar el papel que juega in vivo. Es necesario llevar a cabo ensayos de enfrentamiento de las mutantes deficientes en la síntesis de GSH de *C. glabrata* ante células fagocíticas. Lo que esperamos es que estas mutantes de *C. glabrata* sean más sensibles que la cepa de referencia al ataque por macrófagos o neutrófilos este tipo de células para eliminar microorganismos. Adicionalmente, se deben hacer experimentos de colonización en ratón donde predecimos que las mutantes *gsh1Δ pro2-4* y *gsh2Δ* presentarán una menor colonización.

1. La supresi3n de *pro2-4* en ausencia de GSH.

Existen dos reportes que implican a la ruta biosint3tica de prolina en la supresi3n de la ausencia de GSH. En *S. cerevisiae* la auxotrof3a por GSH se suprime 3nicamente con mutaciones espec3ficas en el gen *PRO2*, m3s a3n, se requiere γ -glutamil fosfato como un sustrato obligado de los alelos supresores. Cabe mencionar que ninguna de las mutantes supresoras present3 auxotrof3a por prolina (Spector, *et al.*, 2001). Recientemente, en *E. coli* se demostr3 que es posible compensar la ausencia de GSH modificando la ruta biosint3tica de la prolina: perdiendo la funci3n de la enzima ProA y modificando las propiedades cin3ticas de la enzima ProB. Las mutantes supresoras requieren de prolina para llevar a cabo la supresi3n (Spector, *et al.*, 2001, Veeravalli, *et al.*, 2011). Estos datos indican que la 3nica forma de compensar la bios3ntesis de GSH es mediante la modificaci3n de la ruta biosint3tica de la prolina.

En este estudio, nosotros encontramos una mutaci3n supresora en el gen *PRO2*, que nos permiti3 obtener la mutante *gsh1* Δ . Proponemos que el mecanismo mediante el cual el alelo *pro2-4* suprime la mutaci3n en el gen *GSH1* es, como se ha reportado para *S. cerevisiae* y *E. coli*, la ganancia de funci3n de Pro2 hacia la bios3ntesis de peque3as cantidades de GSH.

2. Resistencia a fluconazol.

El fenotipo m3s inesperado e interesante en la mutante *gsh1* Δ *pro2-4* es su resistencia a fluconazol (Figura 16, panel A), la cual parece no estar mediada por los genes PDRs (Figura 16 panel B). Esta resistencia puede deberse a la ausencia GSH, a la mutaci3n *pro2-4* o a la combinaci3n de ambos cambios gen3ticos. Cuando reconstituimos el gen *GSH1* en la mutante *gsh1* Δ *pro2-4* observamos la misma resistencia. En cambio la mutante *gsh2* Δ no presenta el fenotipo de resistencia. Esto indica que la resistencia no se relaciona 3nicamente con la ausencia del gen *GSH1*. Al introducir la mutaci3n supresora en el fondo silvestre, *pro2-4*, no se presenta el fenotipo de resistencia a fluconazol que presenta la mutante *gsh1* Δ *pro2-4* (Figura 16 panel C), m3s a3n la sobreexpresi3n de los alelos *pro2-4* o del alelo *PRO2* en los fondos BG14 o *gsh1* Δ *pro2-4*, respectivamente,

mantiene el fenotipo de resistencia a fluconazol que las cepas parentales. La mutante *gsh1Δ pro2-4* reconstruida, efectivamente presenta el fenotipo de resistencia que la cepa supresora original, lo cual indica que la resistencia a fluconazol se debe a la combinaci3n de ausencia del gen *GSH1* y la presencia del alelo *pro2-4*.

¿A qu3 se debe la resistencia a fluconazol que presenta la mutante *gsh1 pro2-4*? Creemos que la ausencia de GSH puede afectar a alg3n regulador del sistema Pdr o de otro sistema de transporte en *C. glabrata*. Un posible candidato es el represor del sistema PDR, Hst1. Hst1 es una desacetilasa de histonas que contiene un motivo CPYC, el cual es caracter3stico de las enzimas glutaredoxinas tipo ditiol, el cual se requiere para mantener su estado reducido mediante la presencia de GSH o del sistema Trx. La mutante nula *hst1Δ* es altamente resistente a fluconazol y la resistencia depende del sistema Pdr (datos del laboratorio). Si la hip3tesis es cierta, la ausencia de GSH evitar3a que la enzima se recicle en su estado reducido ocasionando la p3rdida de su actividad como represor del sistema Pdr o de otro sistema de transporte de xenobi3ticos, por ejemplo el sistema MRP (**Mu**Lidrug **R**esistance **P**rotein). El sistema MRP comprende un alto n3mero de prote3nas con funci3n de transportadores y algunos de ellos han sido caracterizados. En humanos, MRP1 media el exporte de conjugados de GSH. Los ort3logos de MRP1 en *S. cerevisiae* son las prote3nas Yor1 localizada en membrana plasm3tica y Ycf1 localizada en membrana vacuolar. *C. glabrata* contiene los genes que codifican para las prote3nas ort3logas de Yor1, CAGL0G00242g, y Ycf1, CAGL0L06402g, con un 70% y 74% de identidad a nivel de prote3na, respectivamente.

Algo menos probable es que la resistencia se deba a una desregulaci3n en el transporte hacia el interior de la c3lula del fluconazol, ya que en la mutante observamos alteraciones en el transporte tanto de GSH como de prolina (Figuras 9 y 14). Cabe mencionar que no se ha descrito el mecanismo de ingreso de fluconazol a la c3lula.

Proponemos analizar la actividad de Hst1 en ausencia de GSH as3 como evaluar su estado redox. Un an3lisis por RT-PCR nos indicari3 cu3les transportadores se inducen en condiciones de ausencia de GSH. Otro experimento que vale la pena realizar es evaluar la expresi3n de los genes *GSH1* y *GSH2* en presencia de fluconazol, ya que si el GSH es importante para desintoxicar el fluconazol probablemente la presencia de este xenobi3tico

induzca la síntesis de GSH.

Profundizar en este aspecto es muy importante debido a las implicaciones que la resistencia a fluconazol tiene en el tratamiento de infecciones por *C. glabrata*.

3. Auxotrofia por prolina de la mutante *gsh1Δ pro2-4*.

Fue sorprendente que la mutante original *gsh1Δ pro2-4* requiera prolina para su crecimiento. Descartamos la existencia de alguna otra mutación en los genes de la biosíntesis de prolina, *PRO1* o *PRO3*. Es posible que este fenotipo se deba a que el alelo supresor pierde parcialmente su función y que a largo plazo se presente el consumo de las pozas de prolina en esta mutante. Esto se apoya por el hecho de que la sobreexpresión del alelo silvestre *PRO2* restaura el crecimiento de la mutante *gsh1Δ pro2-4* en ausencia de prolina (Figura 12) y porque la sobreexpresión del alelo *pro2-4* elimina de manera similar la auxotrofia por prolina en la mutante *pro2Δ* que el alelo *PRO2* (Figura 13). Evaluamos el crecimiento de la mutante *pro2-4* en medio YNB suponiendo que se agotarían las pozas de prolina y no pudimos determinar ninguna diferencia en el crecimiento entre la cepa BG14 y la mutante (Figura 15).

La mutante *gsh1Δ pro2-4* reconstruida no presenta auxotrofia por prolina, más bien sólo requiere de la presencia de GSH para crecer en medio YNB (Figura 14). En conclusión, se necesitan estudios adicionales para determinar a qué se debe el requerimiento de prolina de la mutante supresora original.

4. Transporte de GSH en *C. glabrata*.

Probablemente relacionado a la resistencia a fluconazol, se encuentra el transporte del GSH. Es interesante que el ingreso del GSH a la célula se presente en medios limitantes de nutrientes, particularmente en un medio limitante en nitrógeno; sin embargo esto no es sorprendente ya que el GSH puede ser utilizado como fuente de nitrógeno o azufre en condiciones de limitación de nutrientes (Mehdi & Penninckx, 1997, Springael & Penninckx, 2003). Más aún, el gen *GSH1* está regulado por factores que controlan el metabolismo de aminoácidos azufrados tales como Met4 (Wheeler, *et al.*, 2002) y enzimas importantes del ciclo metabólico del GSH están reguladas por los factores de transcripción tipo GATA,

Gln3 y Gat1 (Springael & Penninckx, 2003). Varios transportadores se regulan por v3as que detectan las se3ales nutricionales: incluso *ScOPT1* se regula por un sistema detector de limitaci3n de azufre (Miyake, *et al.*, 2003).

En la figura 14 podemos ver que la mutante *gsh1Δ pro2-4* reconstruida recupera su crecimiento cuando se a3ade GSH al medio de crecimiento, de manera similar que la mutante *gsh2Δ*. Sorprendentemente la adici3n de prolina inhibe su crecimiento; creemos que el GSH se transporta al interior de la c3lula a trav3s de un transportador de prolina. El transporte de prolina se efectúa por la permeasa de prolina Put4 y por la permeasa general de amino3cidos, Gap1. La expresi3n de PUT4 se regula por el sistema de represi3n catab3lica por nitr3geno (Xu, *et al.*, 1995, ter Schure, *et al.*, 2000) y postraduccionalmente por enzimas que regulan su localizaci3n, activaci3n y degradaci3n (Stanbrough & Magasanik, 1995, Roberg, *et al.*, 1997, Popova lu, *et al.*, 2000). GAP1 tambi3n se regula su expresi3n por la fuente de nitr3geno disponible en el medio de crecimiento (Stanbrough & Magasanik, 1995) y postraduccionalmente a trav3s de su localizaci3n y degradaci3n (Roberg, *et al.*, 1997, Springael & Andre, 1998, De Craene, *et al.*, 2001, Soetens, *et al.*, 2001). Estas caracter3sticas hacen de los transportadores de prolina posibles candidatos para llevar a cabo el transporte de GSH en *C. glabrata*. Para identificar este transportador seguimos por dos estrategias:

1. Hicimos una b3squeda inform3tica de posibles ort3logos de los genes de la familia *OPT* de *S. cerevisiae* en *C. glabrata*. *C. glabrata* no tiene los genes ort3logos a *ScOPT1* y *ScOPT2*, pero si para el tercer miembro de esta familia, YGL114W, el cual no tiene funci3n conocida. Tratamos de generar una mutante nula en **CAGL0F07293g** pero no tuvimos 3xito. M3s a3n, en una mutante que sobreexpresa este gen no logramos observar ning3n fenotipo claro (figuras 37, 38,39, 40, 42,y 43).

2. Purificamos prote3nas de membrana tanto de la cepa de referencia BG14 y de la mutante *gsh2Δ* la cual mejora su crecimiento cuando crece en un medio que contiene GSH (figuras 9, 14 y 17). La obtenci3n de las prote3nas se llev3 a cabo bajo dos condiciones de crecimiento: medio YNB y medio YNB_rN sin o suplementados con GSH 0.5mM. Lo que esperamos encontrar es una prote3na diferencial entre las dos cepas y a su vez entre los dos medios para despu3s secuenciarla. Realizamos la purificaci3n y visualizamos las prote3nas en un gel de una sola dimensi3n (figura 36), sin embargo no

logramos obtener suficiente cantidad de prote3nas para correr el gel en segunda dimensi3n.

Es probable que el transportador de GSH se induzca en condiciones de limitaci3n de nutrientes, situaci3n a la que *C. glabrata* se enfrenta constantemente cuando est3 dentro de su hospedero. Se requiere evaluar el ingreso de GSH a *C. glabrata* en medios limitantes o con diferentes fuentes de nitr3geno, esperamos que en presencia de malas fuentes nitr3geno se induzca el transporte de GSH. Actualmente, nuestro grupo sigue trabajando en la identificaci3n de este posible transportador de GSH.

5. *C. glabrata* y su resistencia a cadmio.

C. glabrata es resistente a cadmio (Mehra, *et al.*, 1988, Mehra, *et al.*, 1989, Barbas, *et al.*, 1992, Mehra, *et al.*, 1994) y el mecanismo que determina tal resistencia implica la bios3ntesis de fitoquelatinas, aunque nunca se ha reportado el gen que codifique para la fitoquelatina sintasa en *C. glabrata*. Observamos que las mutantes deficientes en la s3ntesis de GSH son m3s sensibles a CdSO₄ que la cepa de referencia BG14. En *S. pombe*, la s3ntesis de fitoquelinas la realiza la enzima Gsh2 (Al-Lahham, *et al.*, 1999) y en *S. cerevisiae* se han descrito dos carboxipeptidasas con esta actividad (Kneer, *et al.*, 1992). Hicimos una b3squeda bioinform3tica de los posibles ort3logos a los genes de fitoquelatina sintasas que se conocen y no encontramos nada similar en *C. glabrata*. Entonces generamos una mutante en el gen CAGL0M13651g que es el posible ort3logo de las carboxipeptidasas CPY y CPC para evaluar si esta prote3na estaba involucrada en la resistencia a cadmio. La sensibilidad de la mutante *prc1Δ* a CdSO₄ es similar a la sensibilidad de la cepa silvestre BG14 (Figura 29). Esto indica que en *C. glabrata* esta carboxipeptidasa no participa en la resistencia a cadmio. Es posible tambi3n que Gsh2 tenga esta actividad ya que la mutante *gsh2Δ* es m3s sensible a CdSO₄ que la mutante *gsh1 pro2-4Δ* (figura 37).

Existen diferencias entre los fenotipos de las mutantes deficientes en la s3ntesis de GSH. Claramente hay diferencias entre los fenotipos de las mutantes *gsh1Δ pro2-4* y *gsh2Δ* (Figuras 8, 9, 14, 16, 17, 18, 19 y 20). Aunque ambas presentan un contenido m3nimo de GSH creemos que su estados redox es diferente, esto porque se sabe que el dip3ptido, γ -



GluCys puede compensar parcialmente la ausencia de GSH (Grant, *et al.*, 1997) y m3s 3un, el dip3ptido puede desintoxicar ROS en conjunto con la enzima glutati3n peroxidasa (Quintana-Cabrera, *et al.*, 2012).

Finalmente, debido a la alta resistencia que *C. glabrata* presenta a cadmio, es interesante averiguar c3mo puede utilizarse en la biorremediaci3n de zonas contaminadas por metales pesados. La literatura sobre la resistencia a cadmio que presenta *C. glabrata* se basa fundamentalmente en la detecci3n de fitoquelatinas, pero no se han hecho estudios ni a nivel de genes o prote3nas para detectar a la fitoquelatina sintasa de *C. glabrata*. Es necesaria investigaci3n adicional para profundizar en este tema.

FIGURAS ADICIONALES

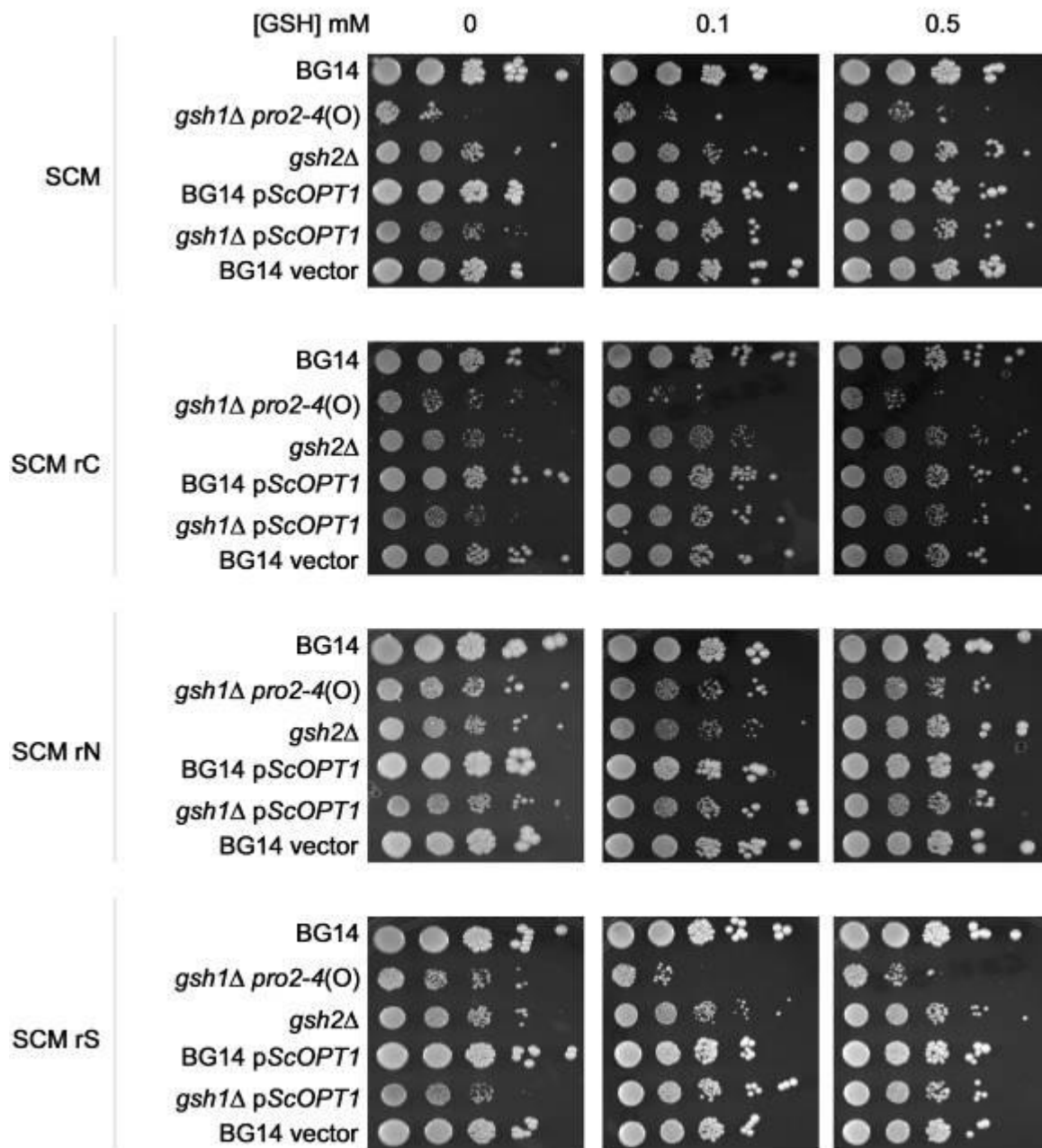


Figura 17. An3lisis del crecimiento en medio YNB y medios reducidos con o sin GSH. Cultivos de la cepa BG14 (CGM1) y de las mutantes en la s3ntesis de GSH, *gsh1Δ pro2-4* (CGM814) y *gsh2Δ* (CGM873), y como controles las cepas BG14 pScOPT1 (CGM1035), *gsh1Δ pScOPT1* (CGM1071) y BG14 vector (CGM1073) se crecieron en medio YNB durante 48 h a 30 °C. Las c3lulas se lavaron y se diluyeron a una densidad celular de 1×10^7 c3lulas/mL. Se hicieron diluciones logar3tmicas y 5 μ L de cada diluci3n se colocaron en placas de YNB, YNBrc, YNBn y YNBs suplementadas con 0.1 y 0.5 mM de GSH. Las placas se incubaron a 30 °C durante 48 h.

Para determinar los requerimientos de GSH de las mutantes *gsh1Δ pro2-4* y *gsh2Δ*, evaluamos su crecimiento en diferentes medios con diferentes concentraciones de GSH. En la figura 17 vemos que las cepas BG14 y la mutante *gsh1Δ pro2-4* crecieron de manera similar en presencia o ausencia de GSH. En cambio, encontramos que la mutante *gsh2Δ* en YNB sin GSH tiene un crecimiento muy reducido que se rescata en presencia de concentraciones de GSH superiores a 0.1mM. En los medios reducidos el efecto del GSH ex3geno es m3s notorio. Como controles evaluamos el crecimiento de cepas que contienen episomalmente el transportador de GSH de *S. cerevisiae* y encontramos que una gran mejor3a en el crecimiento en la mutante *gsh1Δ* cuando se crece en medios que contienen GSH.

Cuantificación del contenido de GSH en las mutantes deficientes en la síntesis de GSH.

Determinamos la concentración de GSX intracelular en la cepa BG14, en las mutantes deficientes en la síntesis de GSH, *gsh1Δ pro2-4* (CGM814) y *gsh2Δ* (CGM873) y en la mutante *gsh1Δ pGSH1* (CGM976), y si esta concentración cambiaba en las diferentes etapas de crecimiento. La figura 18 muestra que la cepa BG14 mantiene constante su contenido de GSX intracelular. Las mutantes *gsh1Δ pro2-4* y *gsh2Δ* tienen una menor concentración de GSX intracelular a las 6 h de crecimiento. Esa concentración disminuye conforme las células entran a fase estacionaria. Las células de la mutante *gsh1Δ pro2-4* tienen mayor concentración de GSX que las células de la mutante *gsh2Δ*. Se debe notar que el plásmido *pGSH1* complementa parcialmente la ausencia del gen *GSH1* cromosómico.

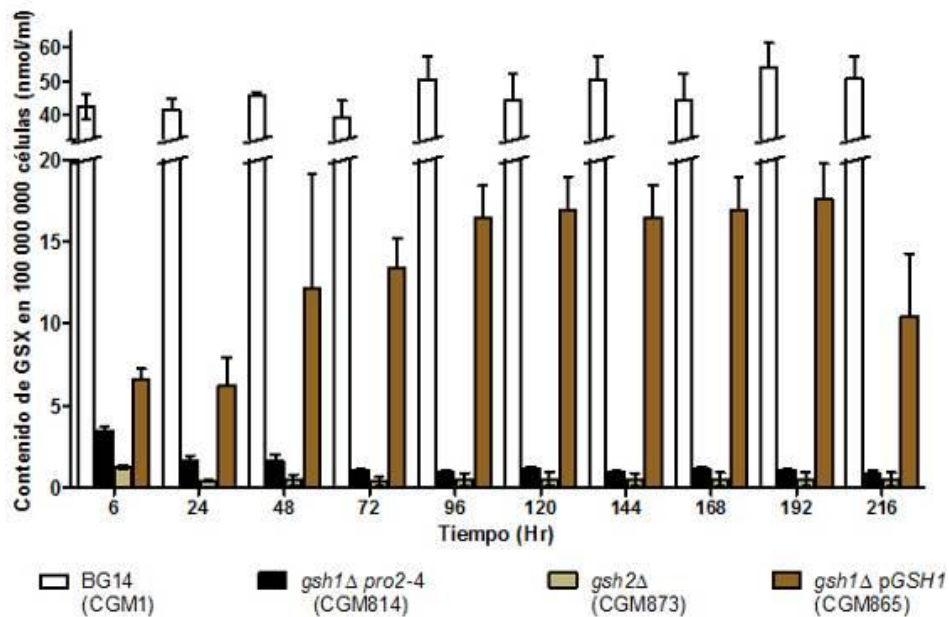
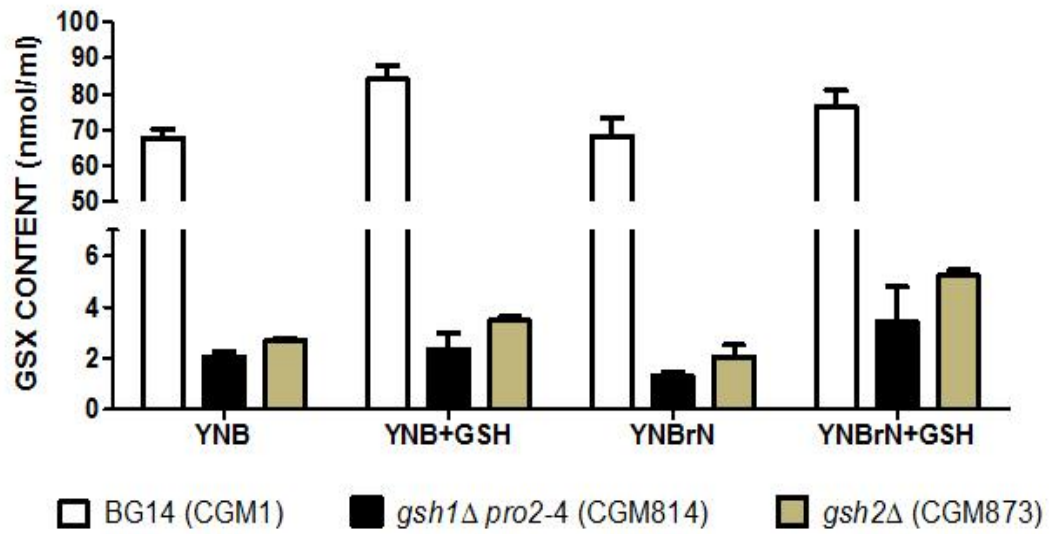


Figura 18. Análisis del contenido de GSH intracelular durante el crecimiento en medio rico YPD. Para cuantificar la concentración de GSX intracelular, las células se crecieron en medio YPD y se tomaron muestras a lo largo de la fase de crecimiento. Las células se lavaron dos veces con PBS y se lisaron con perlas de vidrio en SSA al 5%. El contenido intracelular de GSX se determinó enzimáticamente con DTNB como se describe en materiales y métodos.

A



B

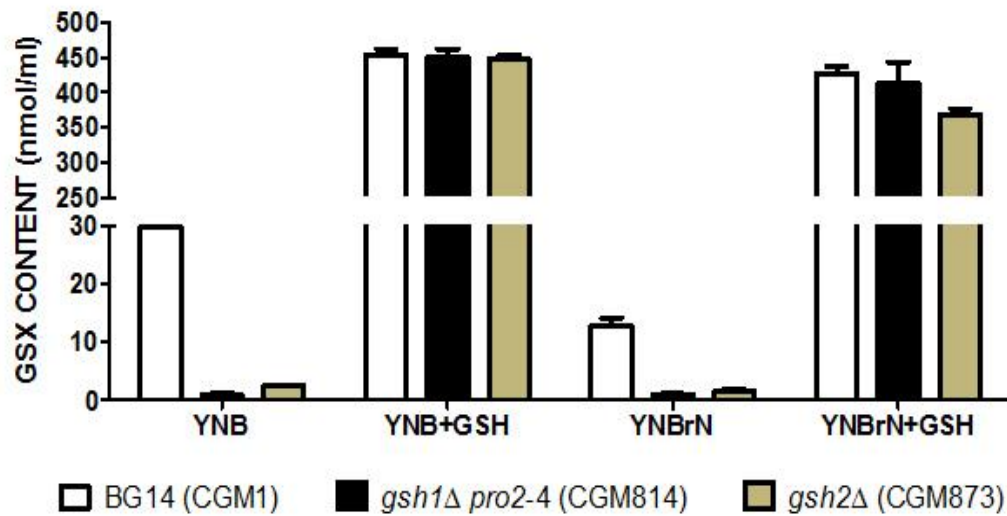


Figura 19. An3lisis del contenido de GSH intracelular en medio YNB y YNB_rN con o sin GSH. Para cuantificar la concentraci3n de GSX intracelular, las c3lulas se crecieron en medio YNB o YNB_rN con o sin GSH 0.5 mM durante 48 h. Se ajustaron a una densidad celular de 3×10^8 c3lulas/mL y se lavaron dos veces con PBS. Las c3lulas se lisaron con perlas de vidrio en SSA al 5%. El contenido intracelular de GSX se determin3 enzim3ticamente con DTNB como se describe en materiales y m3todos.

Debido a que el GSH ex3geno mejora el crecimiento de la mutante *gsh2Δ* determinamos si la concentraci3n de GSH intracelular incrementaba en presencia de GSH ex3geno. Podemos ver en el panel A que existe un ligero incremento en el contenido de GSH intracelular en las mutantes deficientes en la s3ntesis de GSH cuando se a3adi3 GSH al medio de crecimiento, esto sugiere que existe un transportador de GSH en *C. glabrata* y que s3lo se induce en condiciones de bajo nitr3geno (YNB_rN). En el panel B se muestra la cuantificaci3n de GSH en el sobrenadante y es importante notar como la concentraci3n es menor en el medio YNB_rN de la mutante *gsh2Δ*.

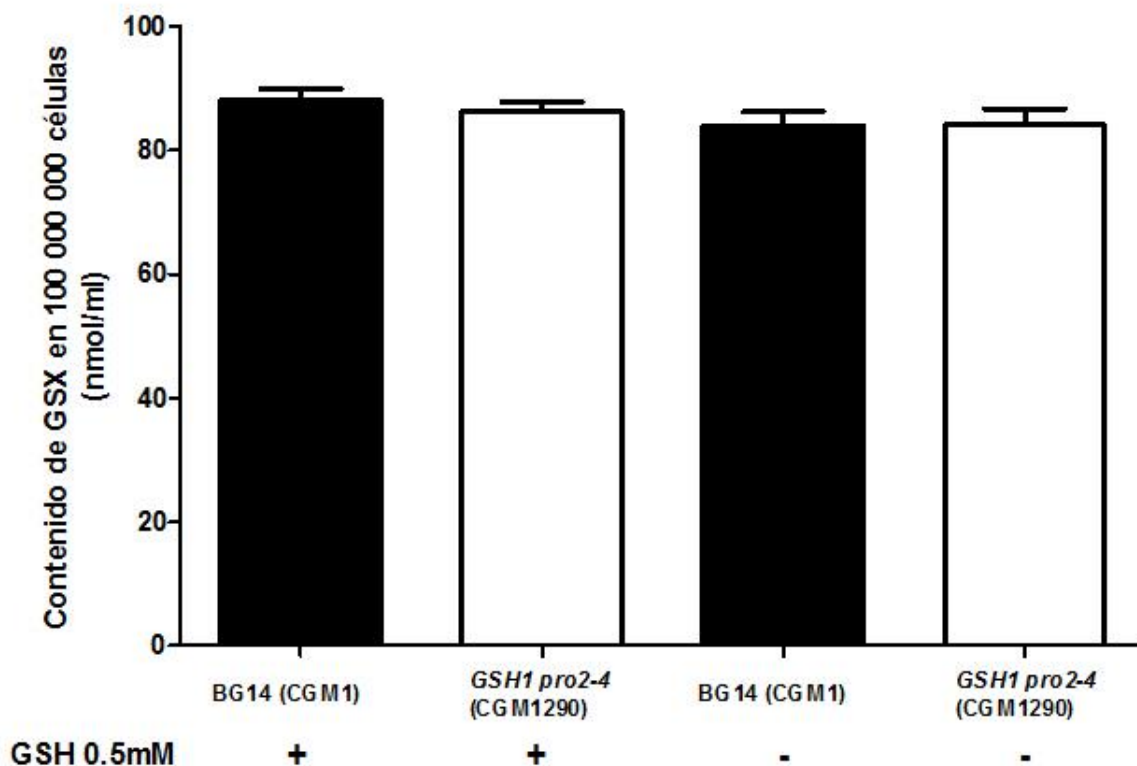


Figura 20. La mutante *GSH1 pro2-4* contiene la misma cantidad de GSH intracelular que la cepa silvestre BG14. Para cuantificar GSX, las cepas se crecieron en medio YNB sin o con GSH 0.5mM durante 48 h a 30 3C. Las c3lulas se ajustaron a una densidad celular de 3×10^8 y se lavaron con PBS. Las c3lulas se lisaron con perlas de vidrio en SSA al 5%. El contenido intracelular de GSX se determin3 enzim3ticamente con DTNB como se describe en materiales y m3todos.

La figura 20 nos muestra que la restauraci3n del gen *GSH1* complementa el contenido de GSX a niveles similares que los encontrados en la cepa silvestre, en medio sin o con GSH a3adido.

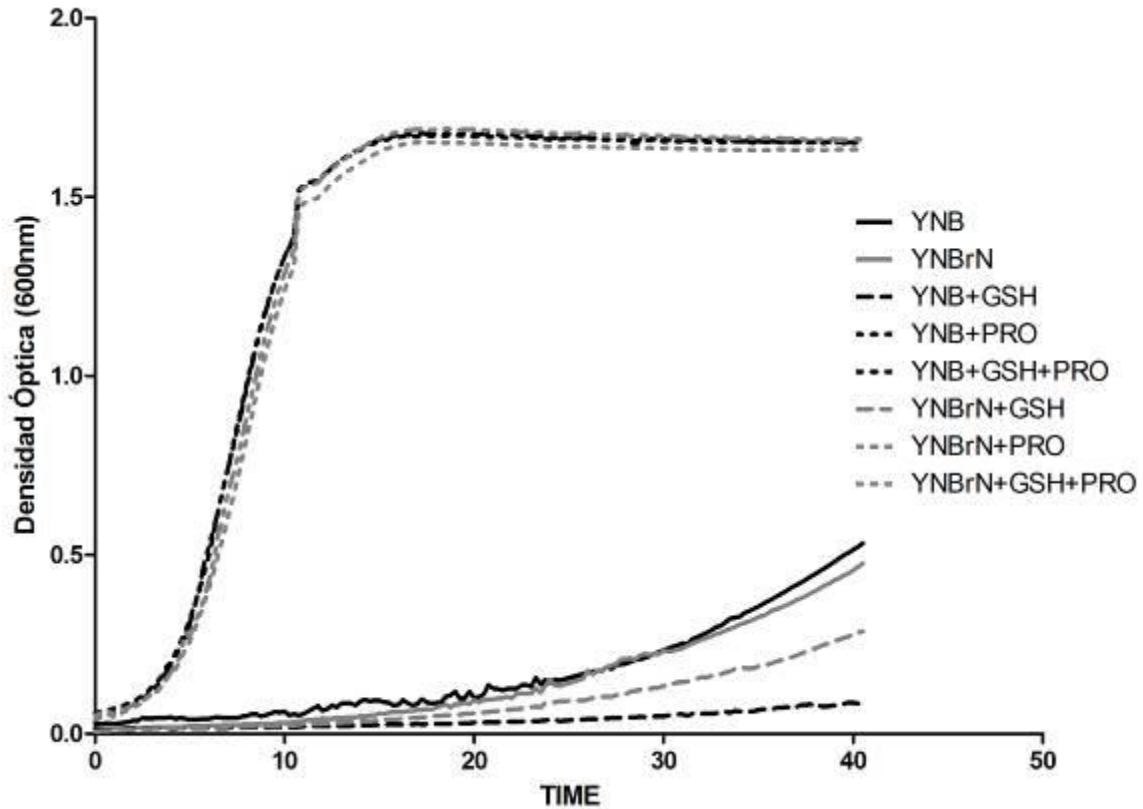


Figura 21. La mutante *GSH1 pro2-4* es aux3trofa de prolina. Evaluamos el crecimiento de la mutante *GSH1 pro2-4* en diferentes medios y como muestra la figura la mutante *GSH1 pro2-4* mantiene la auxotrofa a prolina que presenta su parental (*gsh1Δ pro2-4*). Cultivos de la mutante *GSH1 pro2-4* (CGM1290) se crecieron en YNB y YNB rN suplementados con GSH 0.5mM (+GSH), L-Prolina 1μg/mL (+PRO) o simult3neamente con GSH y L-Prolina (+GSH+PRO) durante 48h a 30°C. Las c3lulas se lavaron y se diluyeron a una densidad celular a 2×10^6 c3lulas/mL. Se evalu3 el crecimiento de estas cepas en el medio correspondiente en un BIOSCREEN durante 4 d3as a 30°C en agitaci3n constante.

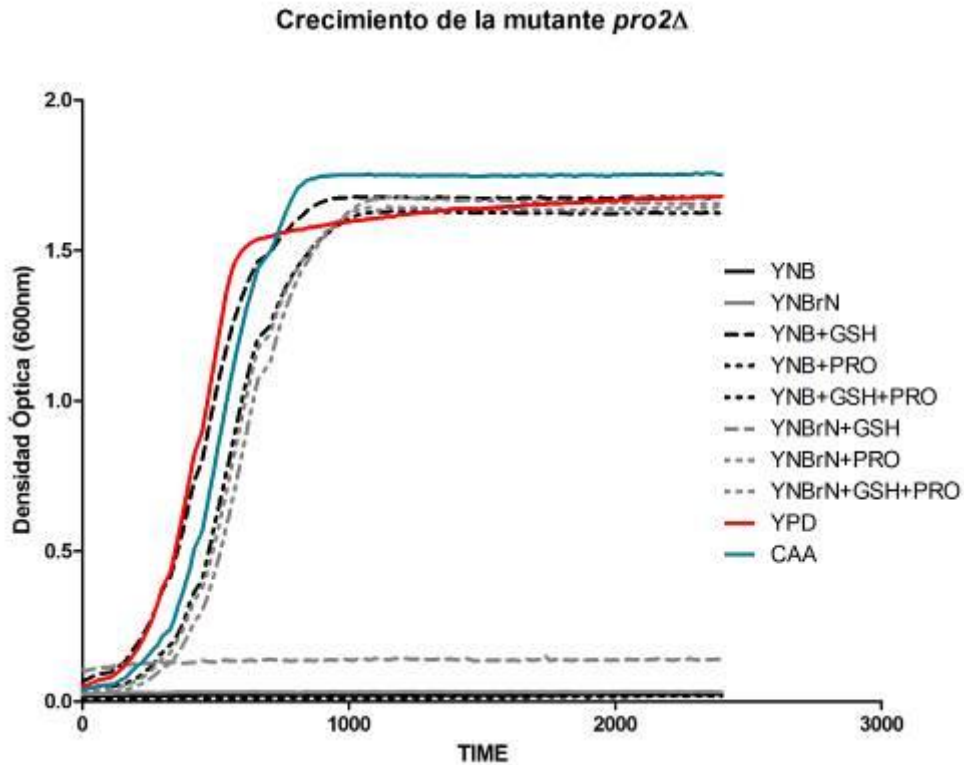
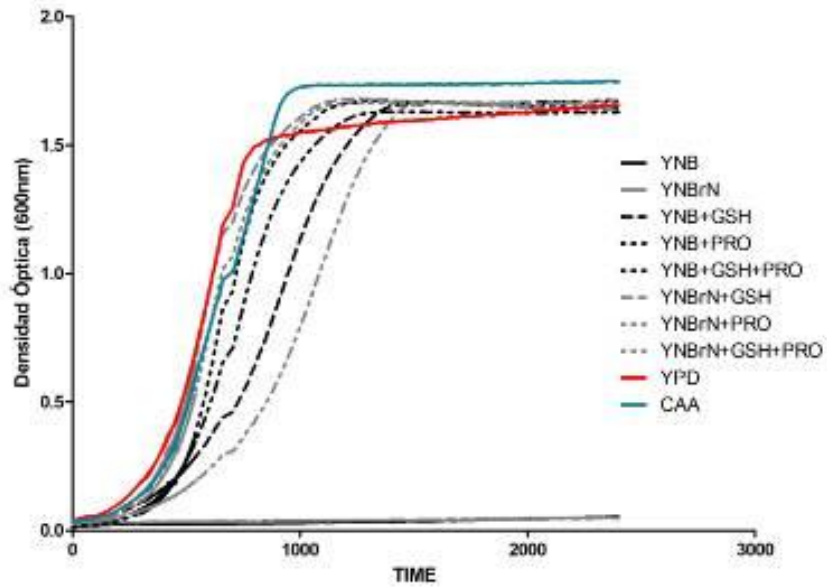


Figura 22. An3lisis del crecimiento de la mutante *pro2Δ*. Cultivos de la mutante *pro2Δ* se crecieron en YPD, CAA y YNB y YNBrN suplementados con GSH 0.5mM (+GSH), L-Prolina 1μg/mL (+PRO) o simult3neamente con GSH y L-Prolina (+GSH+PRO) durante 48 h a 30 °C. Las c3lulas de la mutante *pro2Δ* (CGM1446) se lavaron y se diluyeron a una densidad celular a 2×10^6 c3lulas/mL. Se evalu3 el crecimiento de estas cepas en el medio correspondiente en un BIOSCREEN durante 4 d3as a 30 °C en agitaci3n constante.

A



B

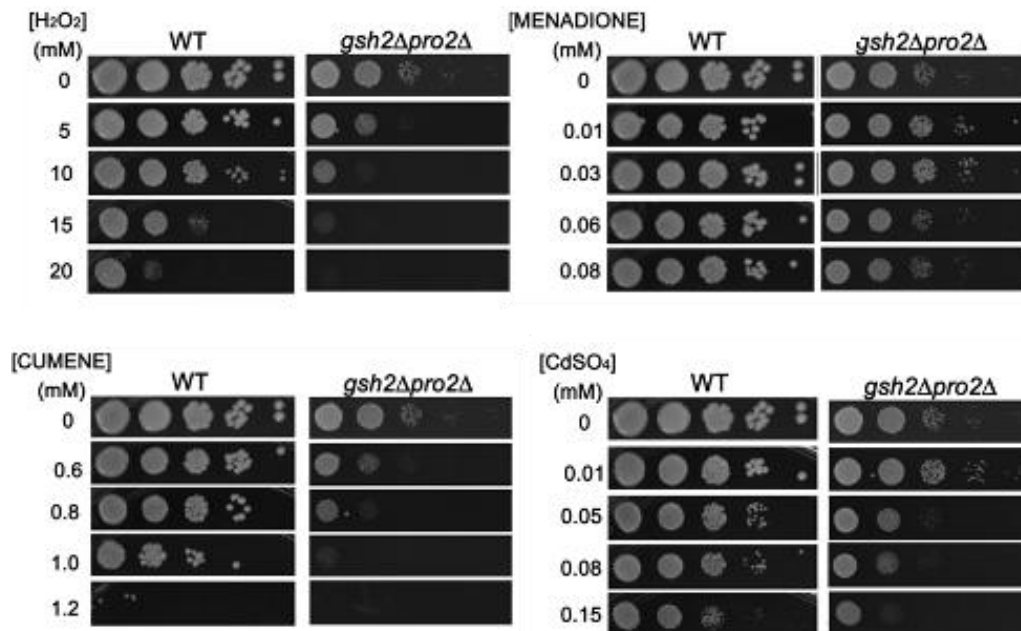
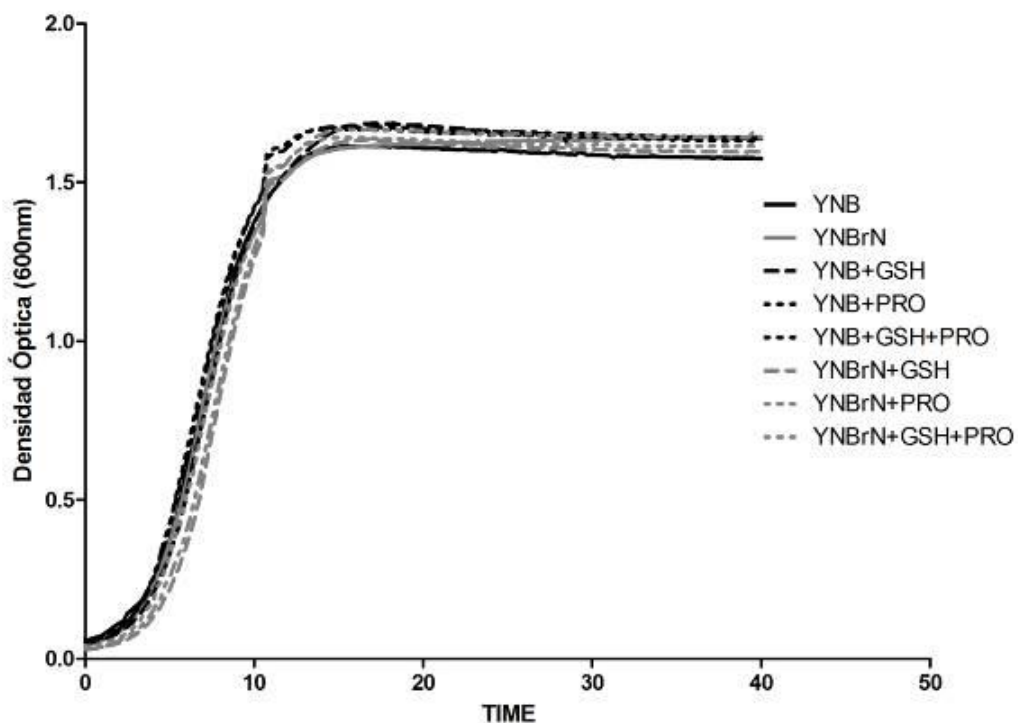


Figura 23. Fenotipos de la mutante *gsh2Δ pro2Δ*. Cultivos de la mutante *gsh2Δ pro2Δ* (CGM1450) se crecieron en YNB y YNB_rN suplementados con GSH 0.5mM (+GSH), L-Prolina 1μg/mL (+PRO) o simult3neamente con GSH y L-Prolina (+GSH+PRO) durante 48 h a 30 °C. Las c3lulas se lavaron y se diluyeron a una densidad celular a 2x10⁶ c3lulas/mL. Se evalu3 el crecimiento de estas cepas en el medio correspondiente en un BIOSCREEN durante 4 d3as a 30 °C en agitaci3n constante. Cultivos de la cepa silvestre BG14 (CGM1) y de la mutante *gsh2Δ pro2Δ* (CGM1450) se crecieron en YPD durante 48h a 30°C. Las c3lulas se lavaron y se diluyeron a una densidad celular de 1x10⁷ c3lulas/mL. Se hicieron diluciones logar3tmicas y 5 μL de cada diluci3n se colocaron en placas con YPD con diferentes concentraciones de agentes generadores de estr3s oxidante. Las placas se incubaron a 30 °C durante 48 h.

Interrumpimos el gen *PRO2* en el fondo *gsh2Δ* para generar una mutante doble *gsh2Δ pro2Δ*. El panel A muestra que el crecimiento en esta mutante se rescata tanto con prolina como con GSH. En el panel B observamos que la ausencia del gen *PRO2* en la mutante *gsh2Δ* acentúa su sensibilidad a H₂O₂ cadmio y cumeno, pero no afecta su sensibilidad a menadiona.

A



B

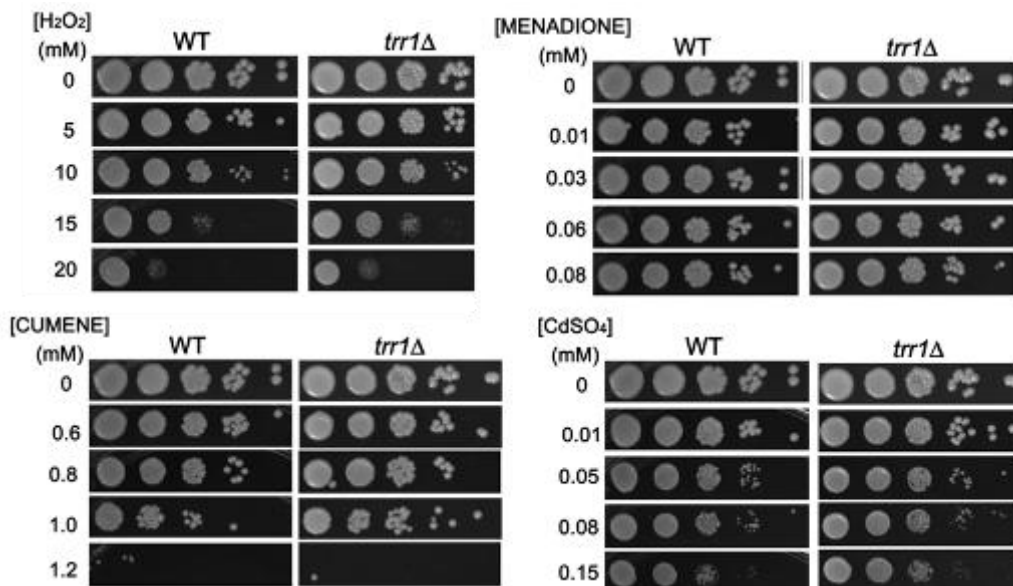


Figura 24. Fenotipos de la mutante *ttr1Δ*. Cultivos de la mutante *ttr1Δ* (CGM1475) se crecieron en YNB y YNB_rN suplementados con GSH 0.5mM (+GSH), L-Prolina 1 μg/mL (+PRO) o simult3neamente con GSH y L-Prolina (+GSH+PRO) durante 48h a 30°C. Las c3lulas se lavaron y se diluyeron a una densidad celular a 2x10⁶ c3lulas/mL. Se evalu3 el crecimiento de estas cepas en el medio correspondiente en un BIOSCREEN durante 4 d3as a 30 °C en agitaci3n constante. Cultivos de la cepa silvestre BG14 (CGM1) y de la mutante *ttr1Δ* (CGM1475) se crecieron en YPD durante 48h a 30°C. Las c3lulas se lavaron y se diluyeron a una densidad celular de 1x10⁷ c3lulas/mL. Se hicieron diluciones logar3tmicas y 5 μL de cada diluci3n se colocaron en placas con YPD con diferentes concentraciones de agentes generadores de estr3s oxidante. Las placas se incubaron a 30 °C durante 48 h.

Para poder evaluar si existe una funci3n sobrelapante entre la rama de amortiguaci3n redox del GSH y de la rama tiorredoxina generamos una mutante en el gen *TRR1*. En la figura 24 panel A observamos que la mutante *ttr1Δ* crece de manera similar a la cepa silvestre en los medios. El panel B muestra que la mutante *ttr1Δ* es similarmente resistente que la cepa silvestre a agentes generadores de estr3s oxidante. analizados.

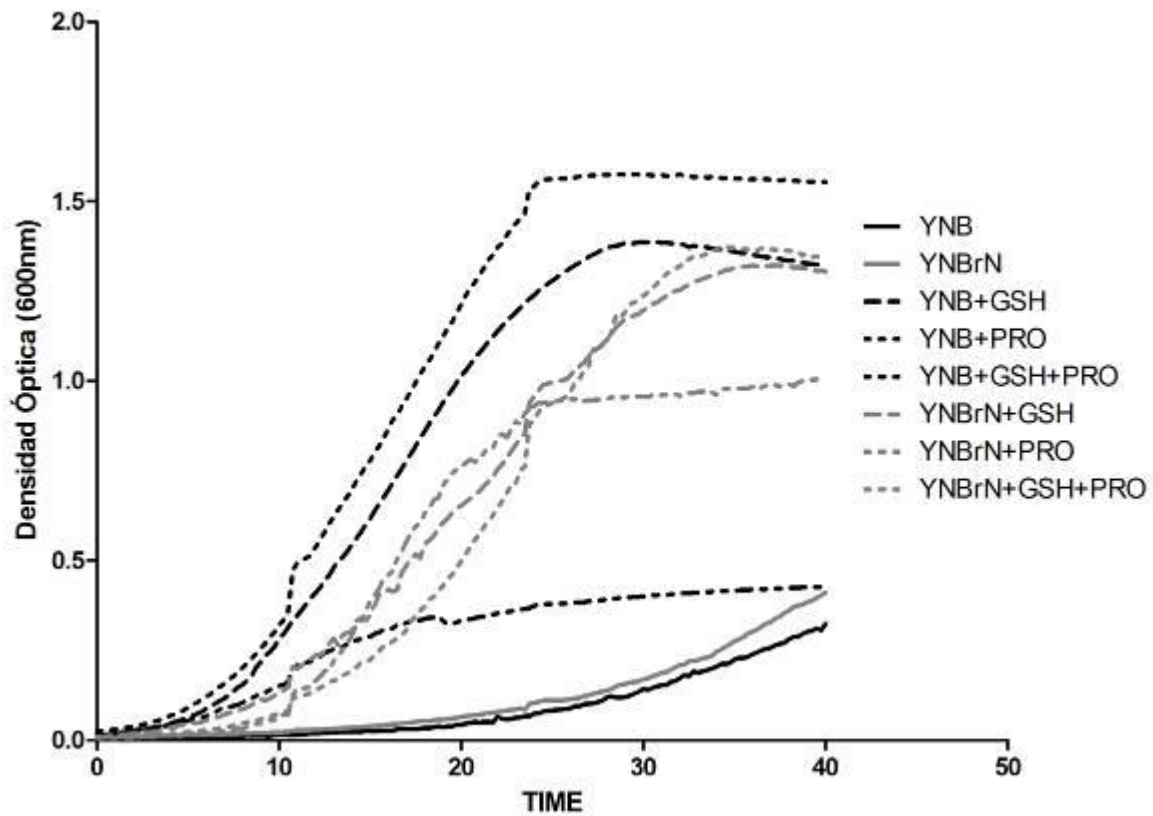
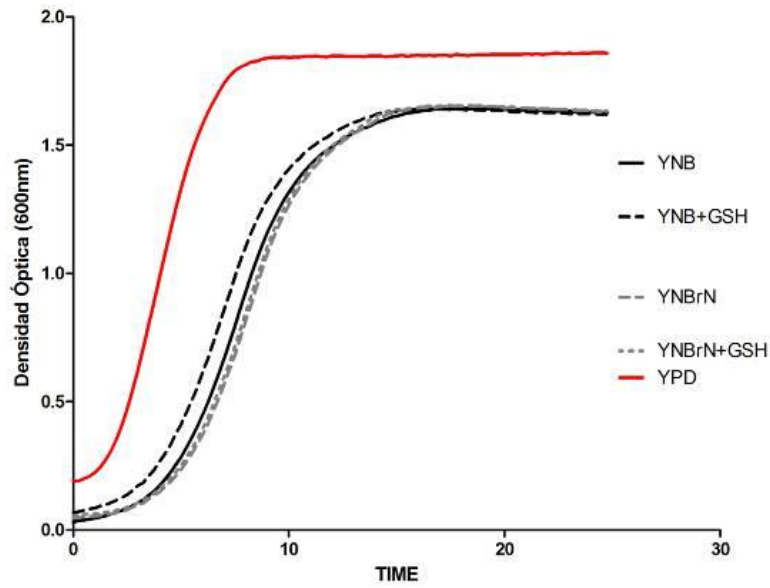


Figura 25. An3lisis del crecimiento de la mutante *gsh2Δ ttr1Δ* en diferentes medios.

Cultivos de la mutante *gsh2Δ ttr1Δ* (CGM1521) se crecieron en YNB y YNBrN suplementados con GSH 0.5mM (+GSH), L-Prolina 1μg/mL (+PRO) o simult3neamente con GSH y L-Prolina (+GSH+PRO) durante 48 h a 30 °C. Las c3lulas se lavaron y se diluyeron a una densidad celular a 2×10^6 c3lulas/mL. Se evalu3 el crecimiento de estas cepas en el medio correspondiente en un BIOSCREEN durante 4 d3as a 30 °C en agitaci3n constante.

A



B

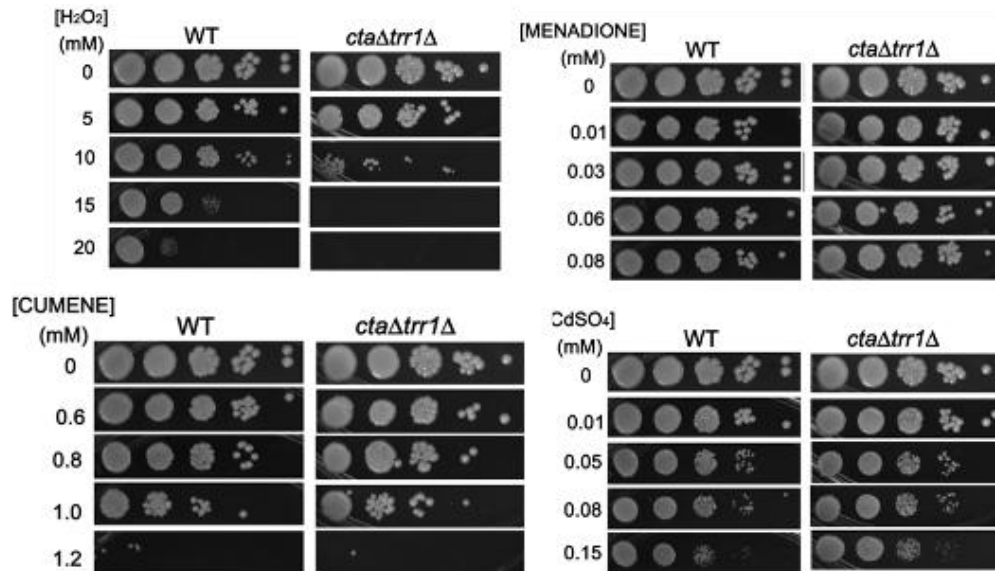
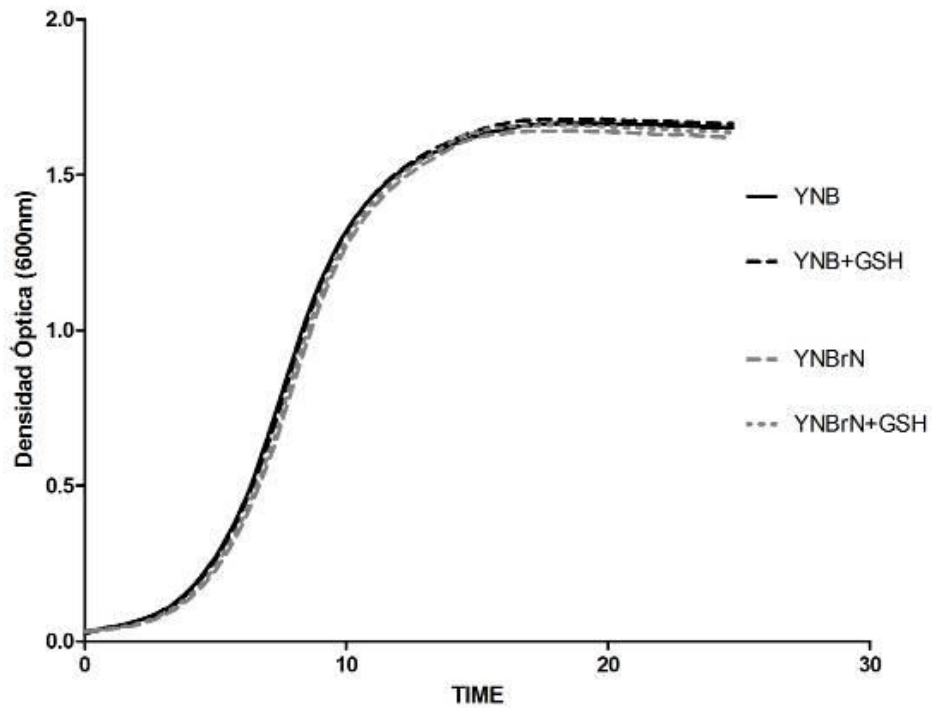


Figura 26. Fenotipos de la mutante *cta1Δ trr1Δ*. Cultivos de la mutante *cta1Δ trr1Δ* (CGM1477) se crecieron en YPD, YNB y YNB_rN suplementados con GSH 0.5 mM (+GSH) durante 48 h a 30 °C. Las c3lulas se lavaron y se diluyeron a una densidad celular a 2×10^6 c3lulas/mL. Se evalu3 el crecimiento de estas cepas en el medio correspondiente en un BIOSCREEN durante 4 d3as a 30 °C en agitaci3n constante. En el panel B observamos que esta mutante es muy sensible a H₂O₂ pero resiste un poco m3s que la mutante sencilla *cta1Δ* (ver Figura 38). Cultivos de la cepa silvestre BG14 (CMG11) y de la mutante *cta1Δ trr1Δ* (CGM1477) se crecieron en YPD durante 48 h a 30 °C. Las c3lulas se lavaron y se diluyeron a una densidad celular de 1×10^7 c3lulas/mL. Se hicieron diluciones logar3tmicas y 5 μL de cada diluci3n se colocaron en placas con YPD con diferentes concentraciones de agentes generadores de estr3s oxidante. Las placas se incubaron a 30 °C durante 48 h.

A



B

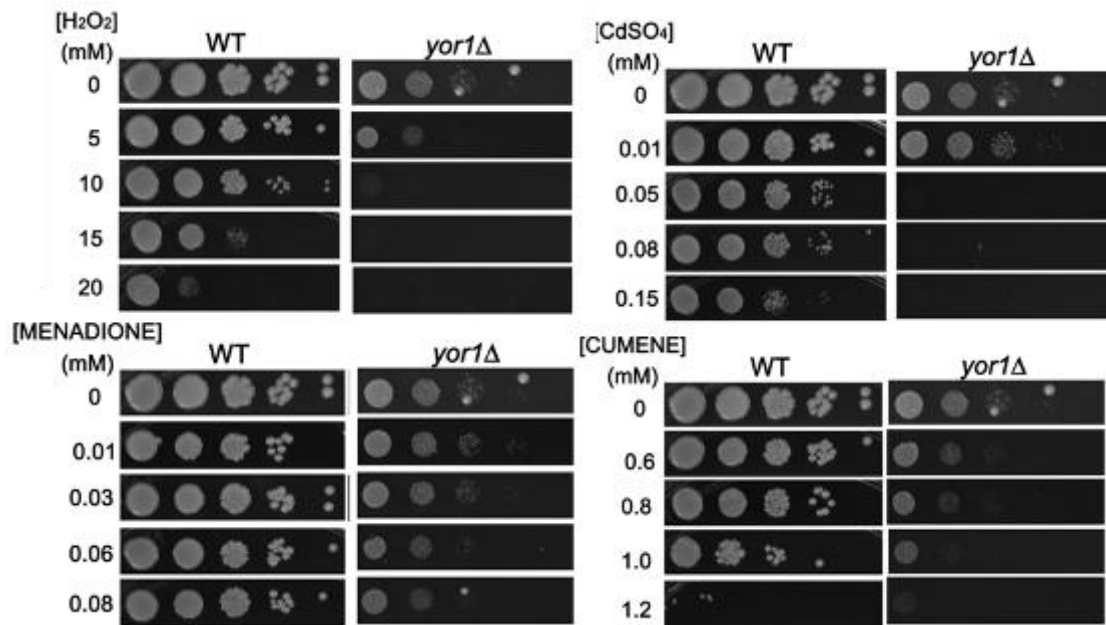


Figura 27. Fenotipos de la mutante *yor1Δ*. Cultivos de la mutante *yor1Δ* (CGM1474) se crecieron en YNB y YNBrN suplementados con GSH 0.5mM (+GSH) durante 48 h a 30 °C. Las c3lulas se lavaron y se diluyeron a una densidad celular a 2×10^6 c3lulas/mL. Se evalu3 el crecimiento de estas cepas en el medio correspondiente en un BIOSCREEN durante 4 d3as a 30 °C en agitaci3n constante. En el panel B observamos que el crecimiento de *yor1Δ* est3 muy afectado y debido a eso es altamente sensible a todos los agentes generadores de estr3s oxidante que probamos. Cultivos de la cepa silvestre BG14 (CGM1) y de la mutante *yor1Δ* (CGM1474) se crecieron en YPD durante 48 h a 30 °C. Las c3lulas se lavaron y se diluyeron a una densidad celular de 1×10^7 c3lulas/mL. Se hicieron diluciones logar3tmicas y 5 μ L de cada diluci3n se colocaron en placas con YPD con diferentes concentraciones de agentes generadores de estr3s oxidante. Las placas se incubaron a 30 °C durante 48 h.

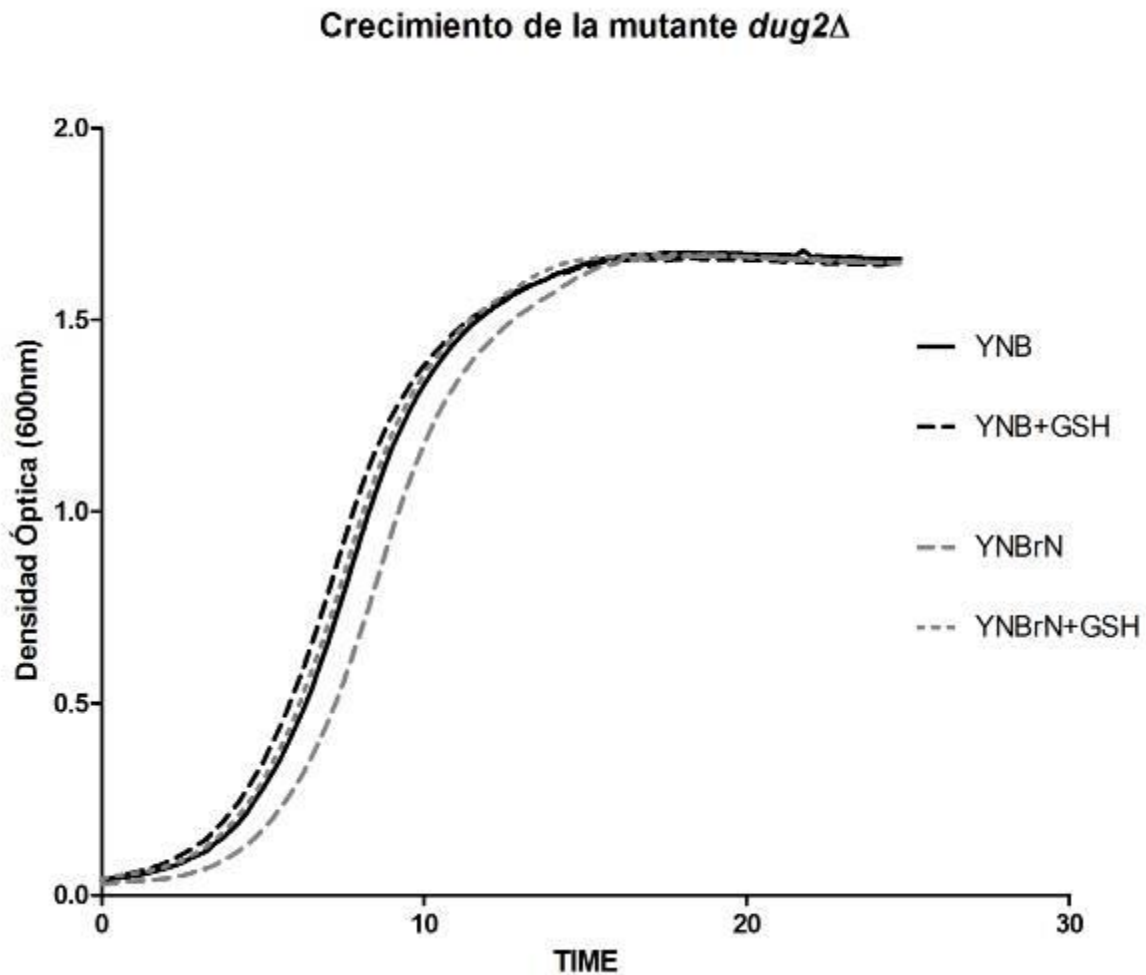


Figura 28. An3lisis del crecimiento de la mutante *dug2Δ*. Cultivos de la mutante *dug2Δ* (CGM1448) se crecieron en YNB y YNB rN suplementados con GSH 0.5 mM (+GSH) durante 48 h a 30 °C. Las c3lulas se lavaron y se diluyeron a una densidad celular a 2×10^6 c3lulas/mL. Se evalu3 el crecimiento de estas cepas en el medio correspondiente en un BIOSCREEN durante 4 d3as a 30 °C en agitaci3n constante.

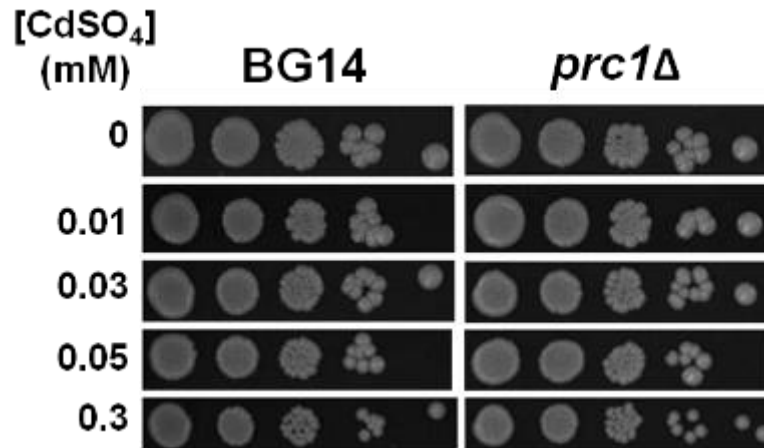


Figura 29. El producto del gen *PRC1* no participa en la resistencia a cadmio en *C. glabrata*. Cultivos de la cepa silvestre BG14 (CGM1) y de la mutante *prc1*Δ (CGM1219) se crecieron en YPD durante 48 h a 30 °C. Las c3lulas se lavaron y se diluyeron a una densidad celular de 1×10^7 c3lulas/mL. Se hicieron diluciones logar3tmicas y 5 μ L de cada diluci3n se colocaron en placas con YPD con diferentes concentraciones de sulfato de cadmio. Las placas se incubaron a 30 °C durante 48 h.

Para saber si, al igual a lo reportado en *S. cerevisiae*, en *C. glabrata* las carboxipeptidasas pueden llevar a cabo la s3ntesis de fitoquelatinas, hicimos una b3squeda bioinform3tica para identificar a los genes ort3logos que pudieran codificar para las carboxipeptidasas CPY y CPC. Encontramos el ORF CAGL0M13651g que es sint3tico al gen YMR297W (*PRC1/CPY*) y que tiene un 71% de identidad. No identificamos el ort3logo al gen YBR139W, pero CAGL0M13651g tiene un 55% de identidad con este gen. Hicimos una mutante nula en el gen CAGL0M13651g (*PRC1*) y evaluamos la resistencia a sulfato de cadmio. Encontramos que la sensibilidad de esta mutante a sulfato de cadmio es similar a la sensibilidad de la cepa silvestre BG14. Esto sugiere que en *C. glabrata*, esta carboxipeptidasa no participa en la resistencia a cadmio.

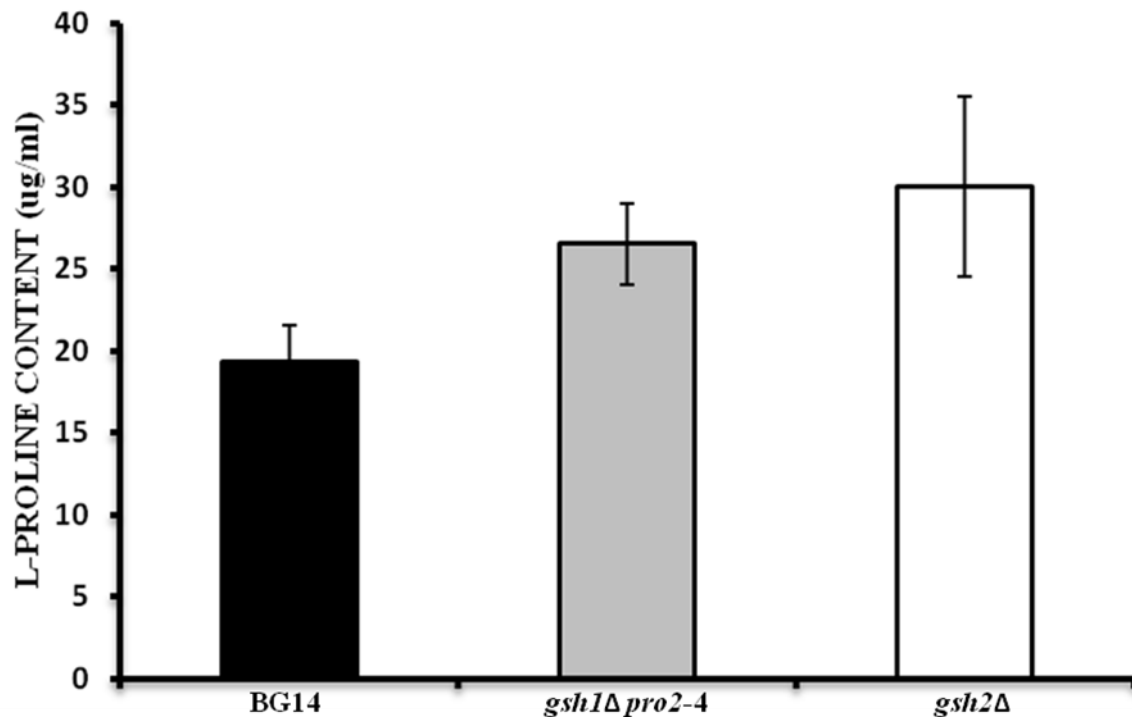
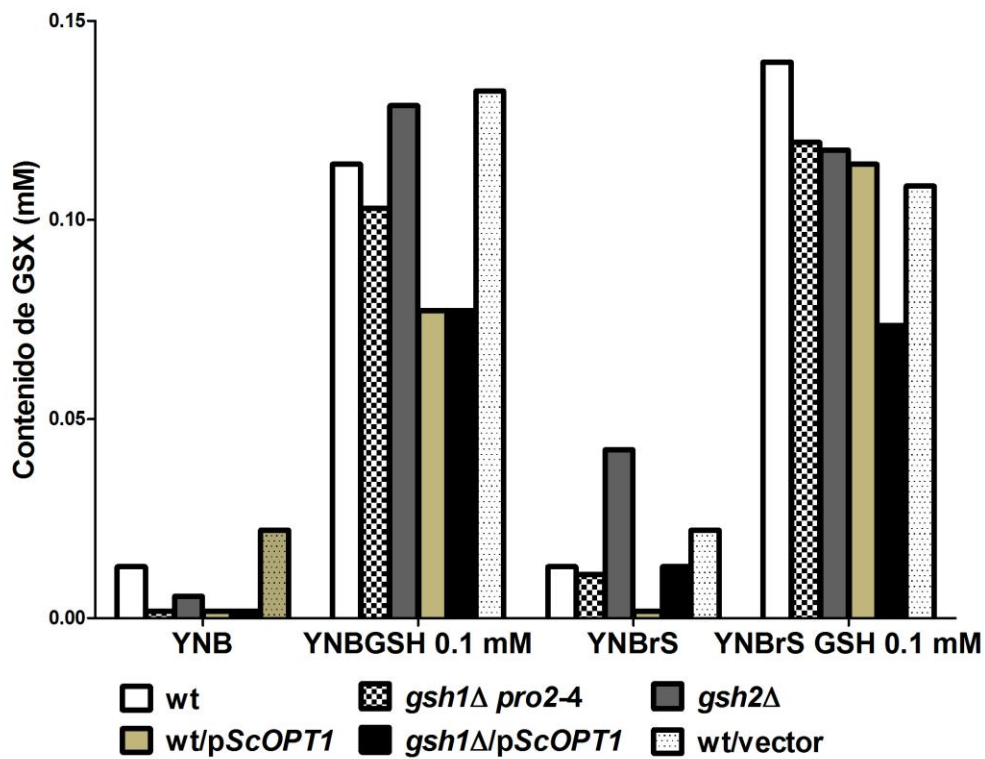
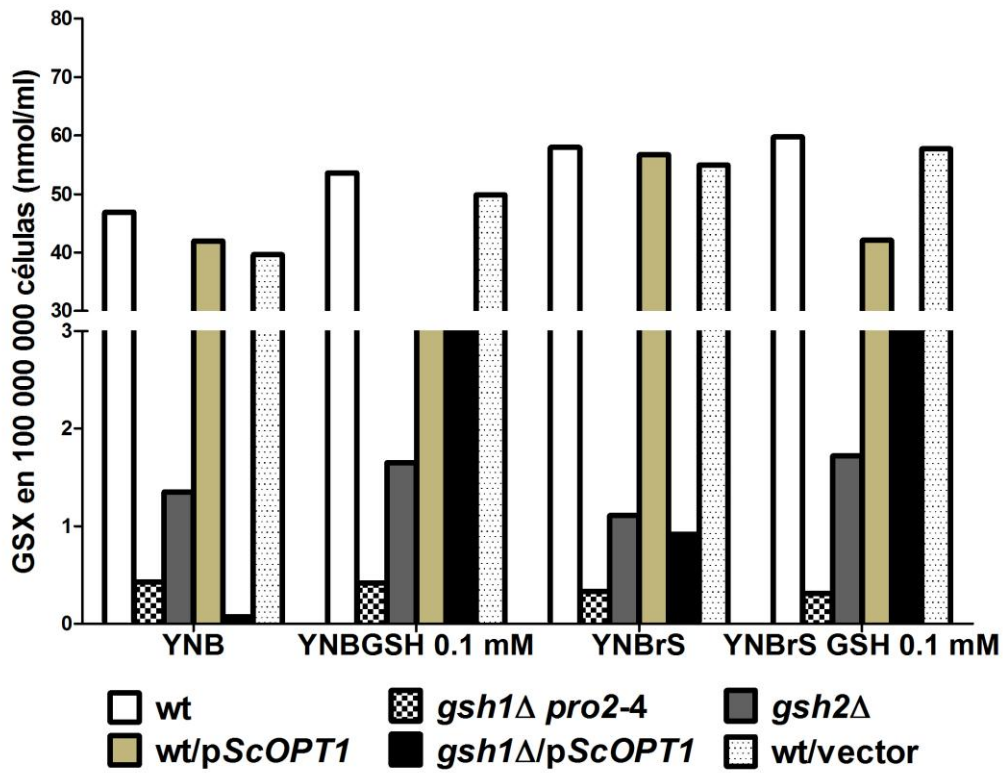
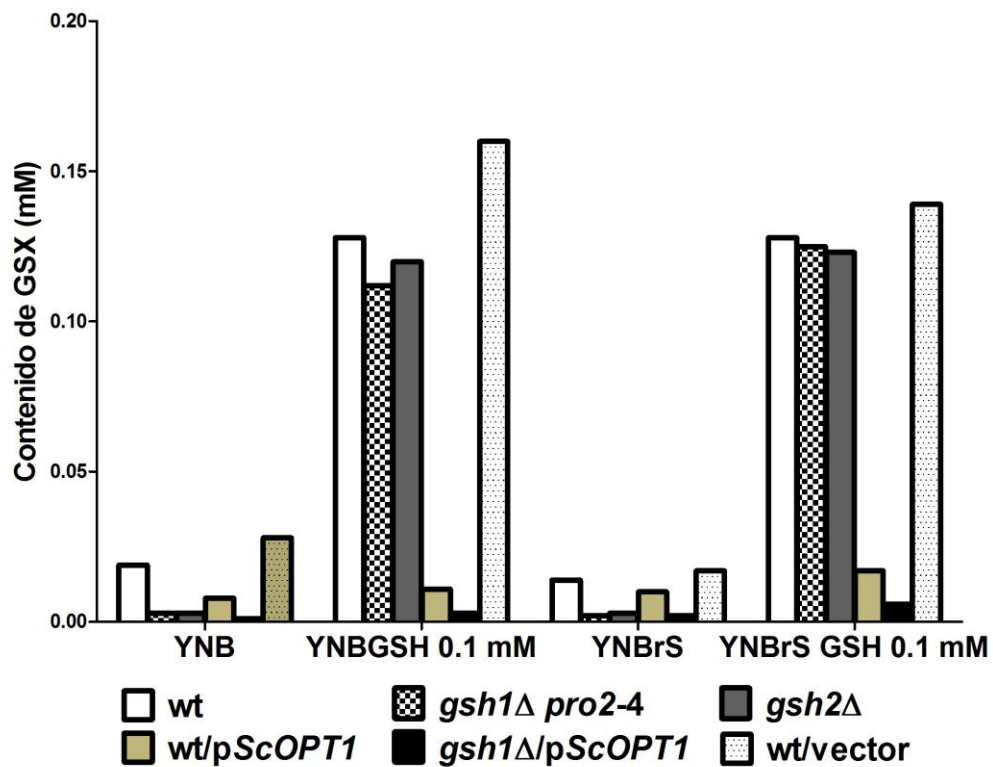
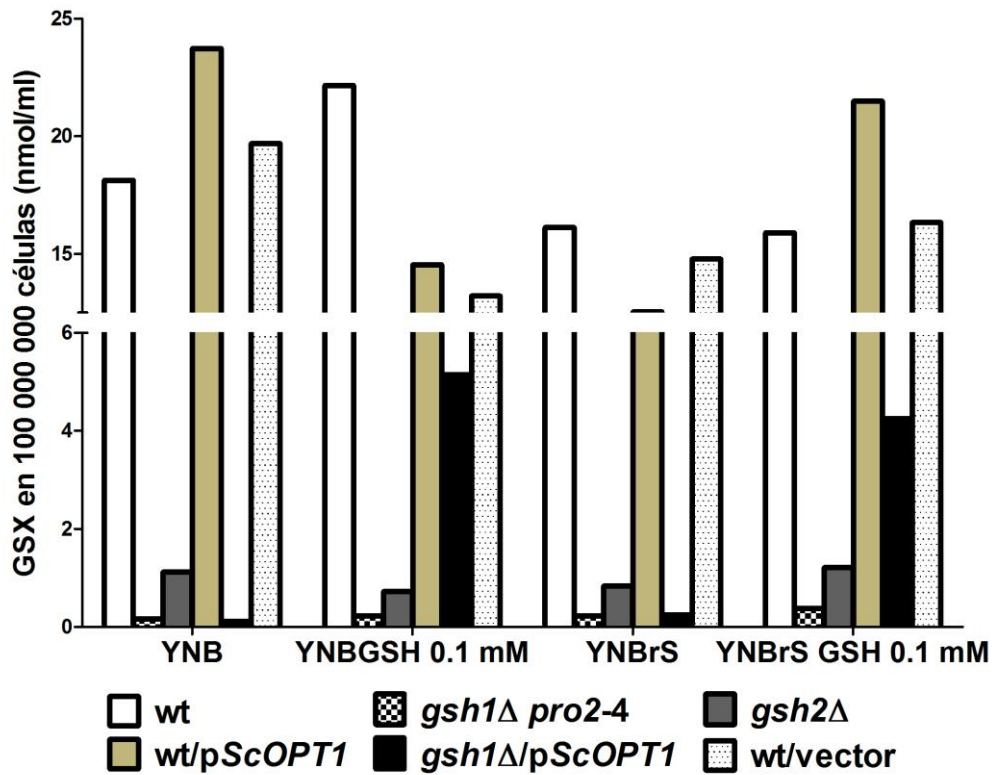


Figura 30. Cuantificación de prolina en cultivos crecidos en YPD. Cultivos de la cepa silvestre BG14 (CGM1) y de las mutantes *gsh1Δ pro2-4* (CGM814) y *gsh2Δ* (CGM873) se crecieron en YPD durante 48 h a 30 °C. Las células se lavaron y el contenido de L-Prolina se determinó como se describe en materiales y métodos.



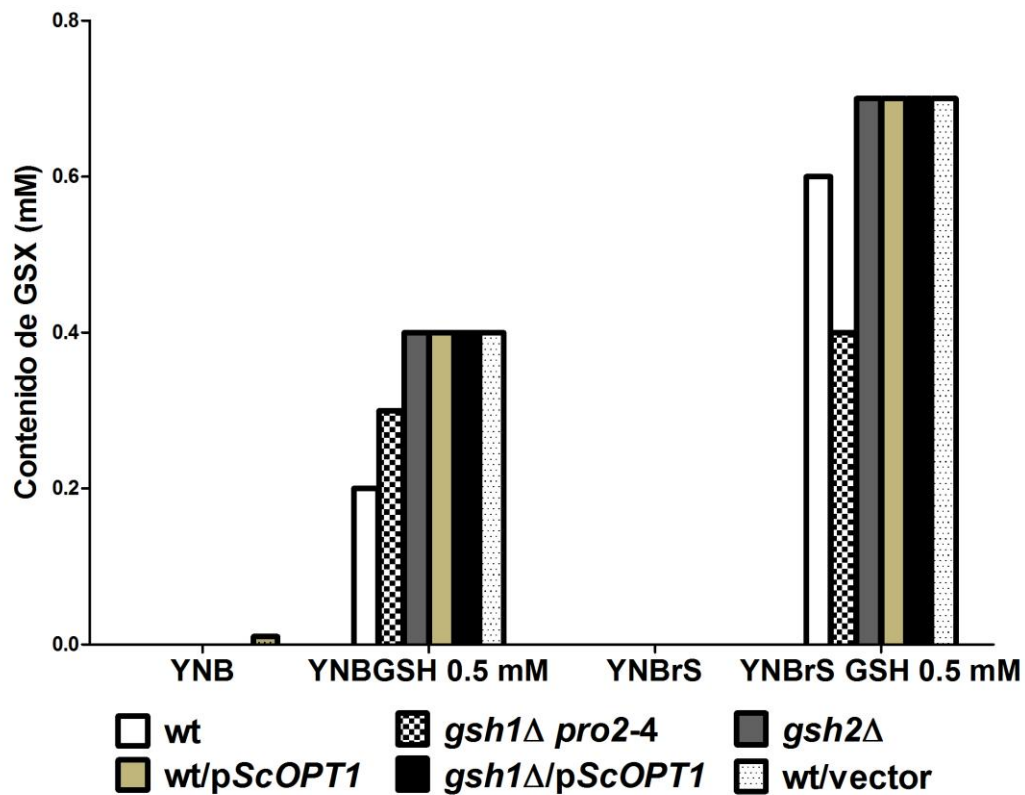
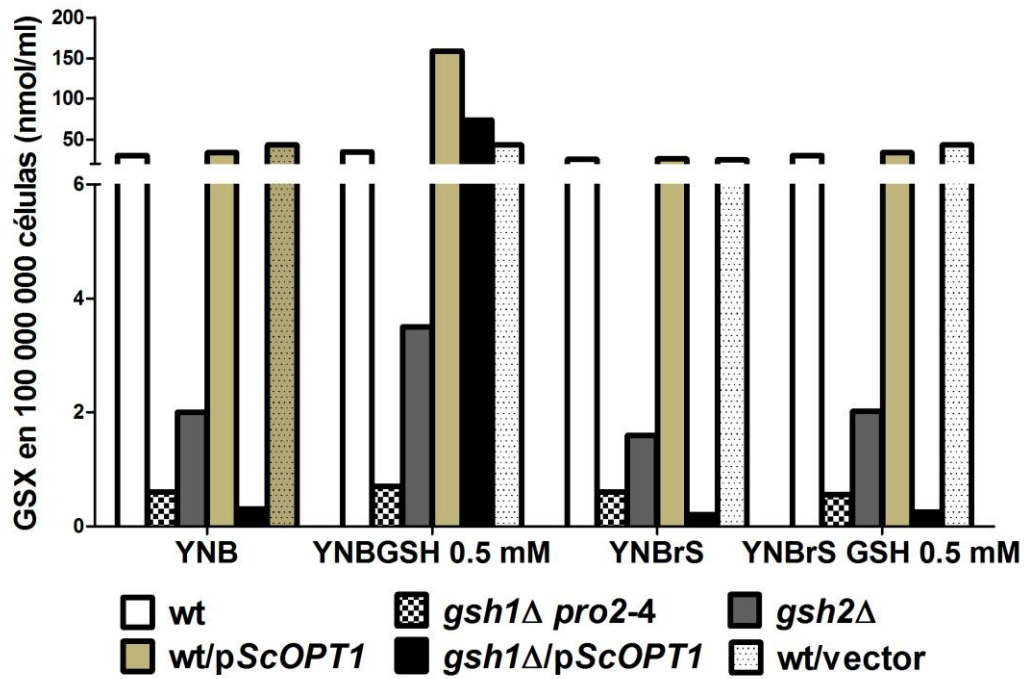
| | [GSX] en extractos celulares (nm/ml) | | | | [GSX] en sobrenadante (mM) | | | |
|----------------------|--------------------------------------|-------------------|-------|---------------------|----------------------------|-------------------|--------|---------------------|
| | YNB | YNB+GSH 0.1 mM | YNBrS | YNBrS+GSH 0.1 mM | YNB | YNB+GSH 0.1 mM | YNBrS | YNBrS+GSH 0.1 mM |
| wt | 46.88 | 53.64 | 57.95 | 59.73 | 0.0129 | 0.1140 | 0.0129 | 0.1397 |
| <i>gsh1Δ pro2-4</i> | 0.43 | 0.42 | 0.33 | 0.31 | 0.0018 | 0.1029 | 0.0110 | 0.1195 |
| <i>gsh2Δ</i> | 1.35 | 1.65 | 1.11 | 1.72 | 0.0055 | 0.1287 | 0.0423 | 0.1176 |
| wt/pScOPT1 | 41.98 | 21.47 | 56.76 | 42.12 | 0.0018 | 0.0772 | 0.0018 | 0.1140 |
| <i>gsh1Δ/pScOPT1</i> | 0.07 | 18.50 | 0.92 | 23.18 | 0.0018 | 0.0772 | 0.0129 | 0.0735 |
| wt/vector | 39.67 | 49.85 | 54.98 | 57.73 | 0.0221 | 0.1324 | 0.0221 | 0.1085 |

Figura 31. Cuantificaci6n de GSX intracelular y extracelular de cultivos de 8hs suplementados con GSH 0.1mM. Para cuantificar la concentraci6n de GSX intracelular, las c6lulas de las cepas BG14 (CGM1) y de las mutantes *gsh1Δ pro2-4* (CGM814), *gsh2Δ* (CGM873), wt/pScOPT1 (CGM1035), *gsh1Δ/pScOPT1* (CGM1071) y wt/vector (CGM1073) se crecieron en medio YNB o YNBrS con o sin GSH 0.1 mM durante 8 h de crecimiento del cultivo. Se tomaron 3×10^8 c6lulas/mL y se lavaron dos veces con PBS. Las c6lulas se lisaron con perlas de vidrio en SSA al 5%. El contenido intracelular de GSX se determin6 enzim6ticamente con DTNB como se describe en materiales y m6todos.



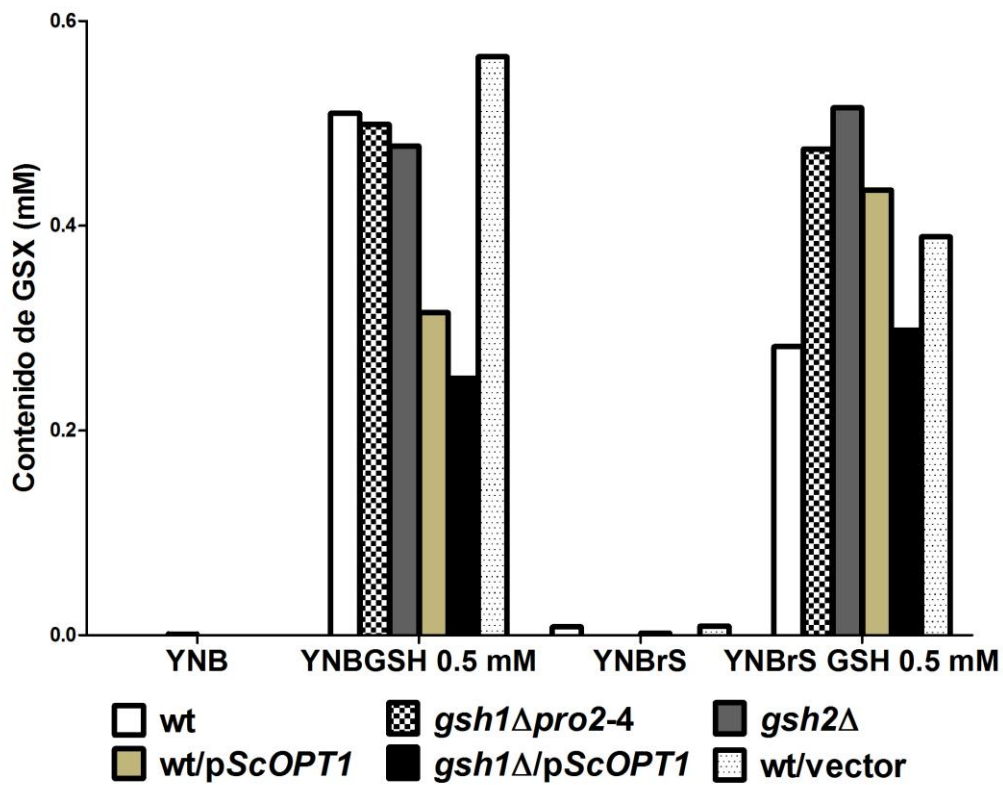
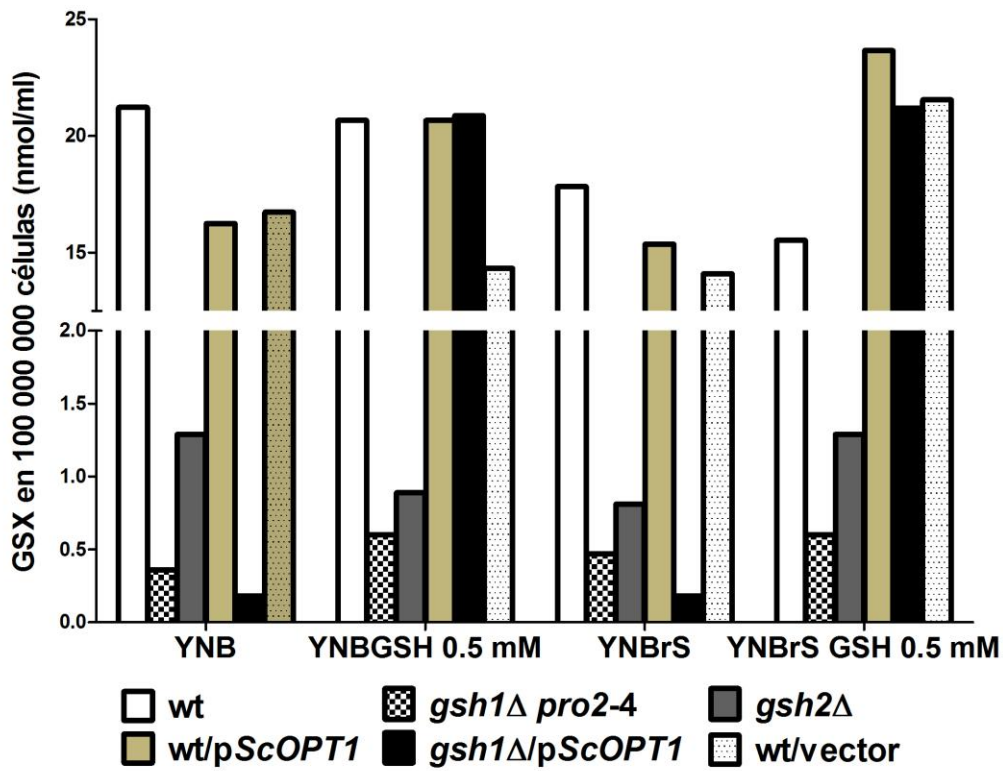
| | [GSX] en extractos celulares (nm/ml) | | | | [GSX] en sobrenadante (mM) | | | |
|----------------------|--------------------------------------|-------------------|-------|---------------------|----------------------------|-------------------|-------|---------------------|
| | YNB | YNB+GSH 0.1 mM | YNBrS | YNBrS+GSH 0.1 mM | YNB | YNB+GSH 0.1 mM | YNBrS | YNBrS+GSH 0.1 mM |
| wt | 18.13 | 22.16 | 16.12 | 15.90 | 0.019 | 0.128 | 0.014 | 0.128 |
| <i>gsh1Δ pro2-4</i> | 0.16 | 0.22 | 0.22 | 0.38 | 0.003 | 0.112 | 0.002 | 0.125 |
| <i>gsh2Δ</i> | 1.12 | 0.72 | 0.83 | 1.21 | 0.003 | 0.120 | 0.003 | 0.123 |
| wt/pScOPT1 | 23.73 | 14.55 | 12.54 | 21.49 | 0.008 | 0.011 | 0.010 | 0.017 |
| <i>gsh1Δ/pScOPT1</i> | 0.11 | 5.15 | 0.25 | 4.25 | 0.001 | 0.003 | 0.002 | 0.006 |
| wt/vector | 19.70 | 13.21 | 14.78 | 16.34 | 0.028 | 0.160 | 0.017 | 0.139 |

Figura 32. Cuantificaci3n de GSX intracelular y extracelular de cultivos de 24hs suplementados con GSH 0.1mM Para cuantificar la concentraci3n de GSX intracelular, las c3lulas de las cepas BG14 (CGM1) y de las mutantes *gsh1Δ pro2-4* (CGM814), *gsh2Δ* (CGM873), wt/pScOPT1 (CGM1035), *gsh1Δ/pScOPT1* (CGM1071) y wt/vector (CGM1073) se crecieron en medio YNB o YNBrS con o sin GSH 0.1 mM durante 24 h de crecimiento del cultivo. Se tomaron 3×10^8 c3lulas/mL y se lavaron dos veces con PBS. Las c3lulas se lisaron con perlas de vidrio en SSA al 5%. El contenido intracelular de GSX se determin3 enzim3ticamente con DTNB como se describe en materiales y m3todos.



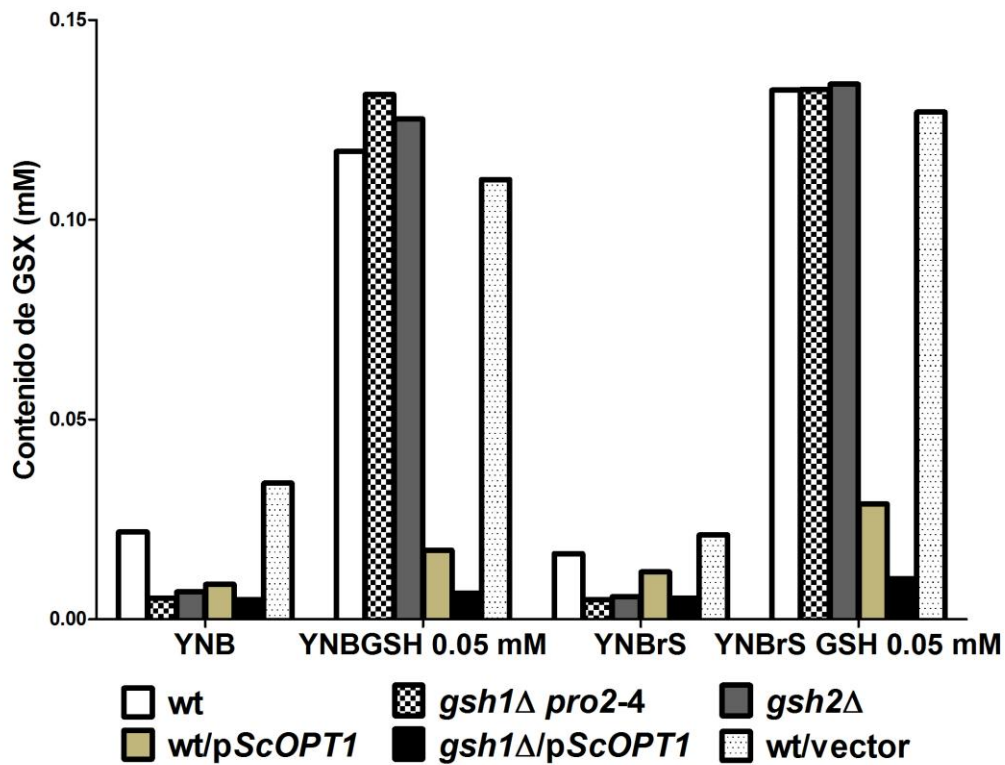
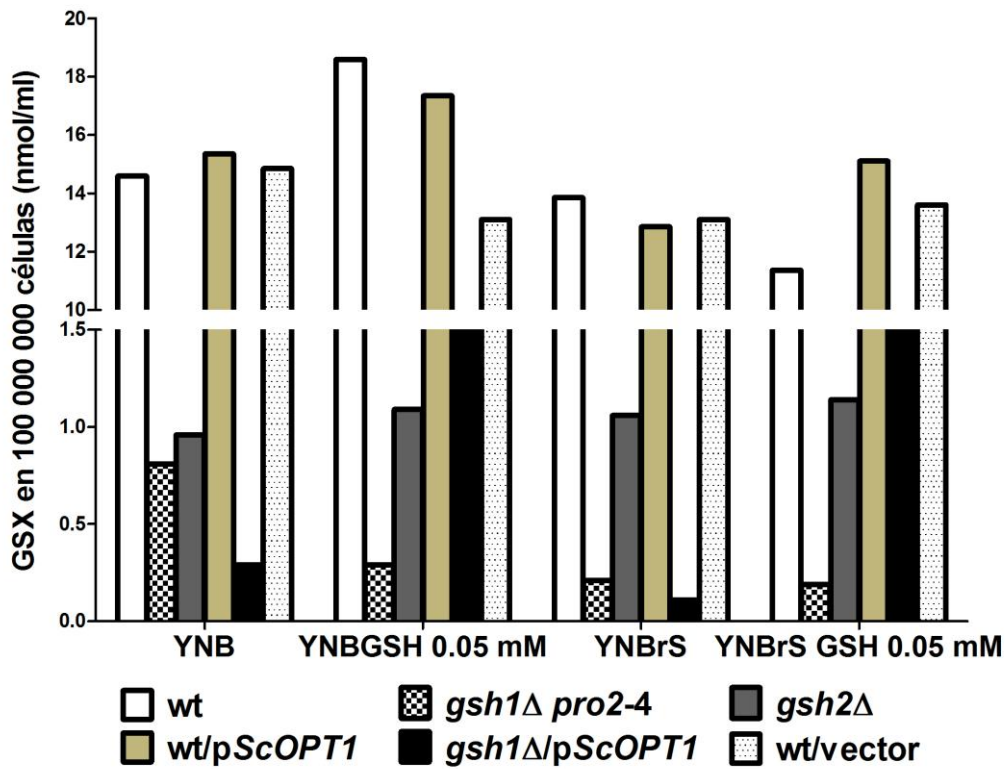
| | [GSX] en extractos celulares (nm/ml) | | | | [GSX] en sobrenadante (mM) | | | |
|----------------------|--------------------------------------|-------------------|-------|---------------------|----------------------------|-------------------|-------|---------------------|
| | YNB | YNB+GSH 0.5 mM | YNBrS | YNBrS+GSH 0.5 mM | YNB | YNB+GSH 0.5 mM | YNBrS | YNBrS+GSH 0.5 mM |
| wt | 30.6 | 34.7 | 25.8 | 30.61 | 0.003 | 0.215 | 0.004 | 0.630 |
| <i>gsh1Δ pro2-4</i> | 0.6 | 0.7 | 0.6 | 0.56 | 0.002 | 0.350 | 0.002 | 0.361 |
| <i>gsh2Δ</i> | 2.0 | 3.5 | 1.6 | 2.02 | 0.002 | 0.364 | 0.001 | 0.691 |
| wt/pScOPT1 | 33.9 | 158.6 | 26.3 | 33.90 | 0.002 | 0.373 | 0.003 | 0.724 |
| <i>gsh1Δ/pScOPT1</i> | 0.3 | 74.1 | 0.2 | 0.25 | 0.003 | 0.381 | 0.002 | 0.740 |
| wt/vector | 43.5 | 43.3 | 25.0 | 43.51 | 0.006 | 0.353 | 0.007 | 0.666 |

Figura 33. Cuantificaci3n de GSX intracelular y extracelular de cultivos de 8hs suplementados con GSH 0.5 mM Para cuantificar la concentraci3n de GSX intracelular, las c3lulas de las cepas BG14 (CGM1) y de las mutantes *gsh1Δ pro2-4* (CGM814), *gsh2Δ* (CGM873), wt/pScOPT1 (CGM1035), *gsh1Δ/pScOPT1* (CGM1071) y wt/vector (CGM1073) se crecieron en medio YNB o YNBrS con o sin GSH 0.5 mM durante 8 h de crecimiento del cultivo. Se tomaron 3×10^8 c3lulas/mL y se lavaron dos veces con PBS. Las c3lulas se lisaron con perlas de vidrio en SSA al 5%. El contenido intracelular de GSX se determin3 enzim3ticamente con DTNB como se describe en materiales y m3todos.



| | [GSX] en extractos celulares (nm/ml) | | | | [GSX] en sobrenadante (mM) | | | |
|----------------------|--------------------------------------|-------------------|--------|---------------------|----------------------------|-------------------|--------|---------------------|
| | YNB | YNB+GSH 0.5 mM | YNBrS | YNBrS+GSH 0.5 mM | YNB | YNB+GSH 0.5 mM | YNBrS | YNBrS+GSH 0.5 mM |
| wt | 21.230 | 20.670 | 17.830 | 15.520 | 0.000 | 0.510 | 0.008 | 0.282 |
| <i>gsh1Δ pro2-4</i> | 0.360 | 0.600 | 0.470 | 0.600 | 0.000 | 0.499 | -0.001 | 0.475 |
| <i>gsh2Δ</i> | 1.290 | 0.890 | 0.810 | 1.290 | 0.001 | 0.478 | 0.000 | 0.515 |
| wt/pScOPT1 | 16.240 | 20.670 | 15.360 | 23.670 | 0.000 | 0.315 | 0.002 | 0.435 |
| <i>gsh1Δ/pScOPT1</i> | 0.180 | 20.880 | 0.180 | 21.175 | 0.000 | 0.251 | 0.000 | 0.298 |
| wt/vector | 16.740 | 14.330 | 14.090 | 21.546 | 0.000 | 0.565 | 0.009 | 0.389 |

Figura 34. Cuantificación de GSX intracelular y extracelular de cultivos de 24hs suplementados con GSH 0.5 mM Para cuantificar la concentración de GSX intracelular, las células de las cepas BG14 (CGM1) y de las mutantes *gsh1Δ pro2-4* (CGM814), *gsh2Δ* (CGM873), *wt/pScOPT1* (CGM1035), *gsh1Δ/pScOPT1* (CGM1071) y *wt/vector* (CGM1073) se crecieron en medio YNB o YNBrS con o sin GSH 0.5 mM durante 24 h de crecimiento del cultivo. Se tomaron 3×10^8 células/mL y se lavaron dos veces con PBS. Las células se lisaron con perlas de vidrio en SSA al 5%. El contenido intracelular de GSX se determinó enzimáticamente con DTNB como se describe en materiales y métodos.



| | [GSX] en extractos celulares (nm/ml) | | | | [GSX] en sobrenadante (mM) | | | |
|----------------------|--------------------------------------|--------------------|-------|----------------------|----------------------------|--------------------|-------|----------------------|
| | YNB | YNB+GSH 0.05 mM | YNBrS | YNBrS+GSH 0.05 mM | YNB | YNB+GSH 0.05 mM | YNBrS | YNBrS+GSH 0.05 mM |
| wt | 14.60 | 18.59 | 13.85 | 11.36 | 0.022 | 0.117 | 0.017 | 0.133 |
| <i>gsh1Δ pro2-4</i> | 0.81 | 0.29 | 0.21 | 0.19 | 0.005 | 0.131 | 0.005 | 0.133 |
| <i>gsh2Δ</i> | 0.96 | 1.09 | 1.06 | 1.14 | 0.007 | 0.125 | 0.006 | 0.134 |
| wt/pScOPT1 | 15.35 | 17.35 | 12.85 | 15.10 | 0.009 | 0.017 | 0.012 | 0.029 |
| <i>gsh1Δ/pScOPT1</i> | 0.29 | 6.86 | 0.11 | 6.36 | 0.005 | 0.007 | 0.005 | 0.010 |
| wt/vector | 14.85 | 13.10 | 13.10 | 13.60 | 0.034 | 0.110 | 0.021 | 0.127 |

Figura 35. Cuantificaci3n de GSX intracelular y extracelular de cultivos de 24hs suplementados con GSH 0.05 mM Para cuantificar la concentraci3n de GSX intracelular, las c3lulas de las cepas BG14 (CGM1) y de las mutantes *gsh1Δ pro2-4* (CGM814), *gsh2Δ* (CGM873), wt/pScOPT1 (CGM1035), *gsh1Δ/pScOPT1* (CGM1071) y wt/vector (CGM1073) se crecieron en medio YNB o YNBrS con o sin GSH 0.05 mM durante 24 h de crecimiento del cultivo. Se tomaron 3×10^8 c3lulas/mL y se lavaron dos veces con PBS. Las c3lulas se lisaron con perlas de vidrio en SSA al 5%. El contenido intracelular de GSX se determin3 enzim3ticamente con DTNB como se describe en materiales y m3todos.

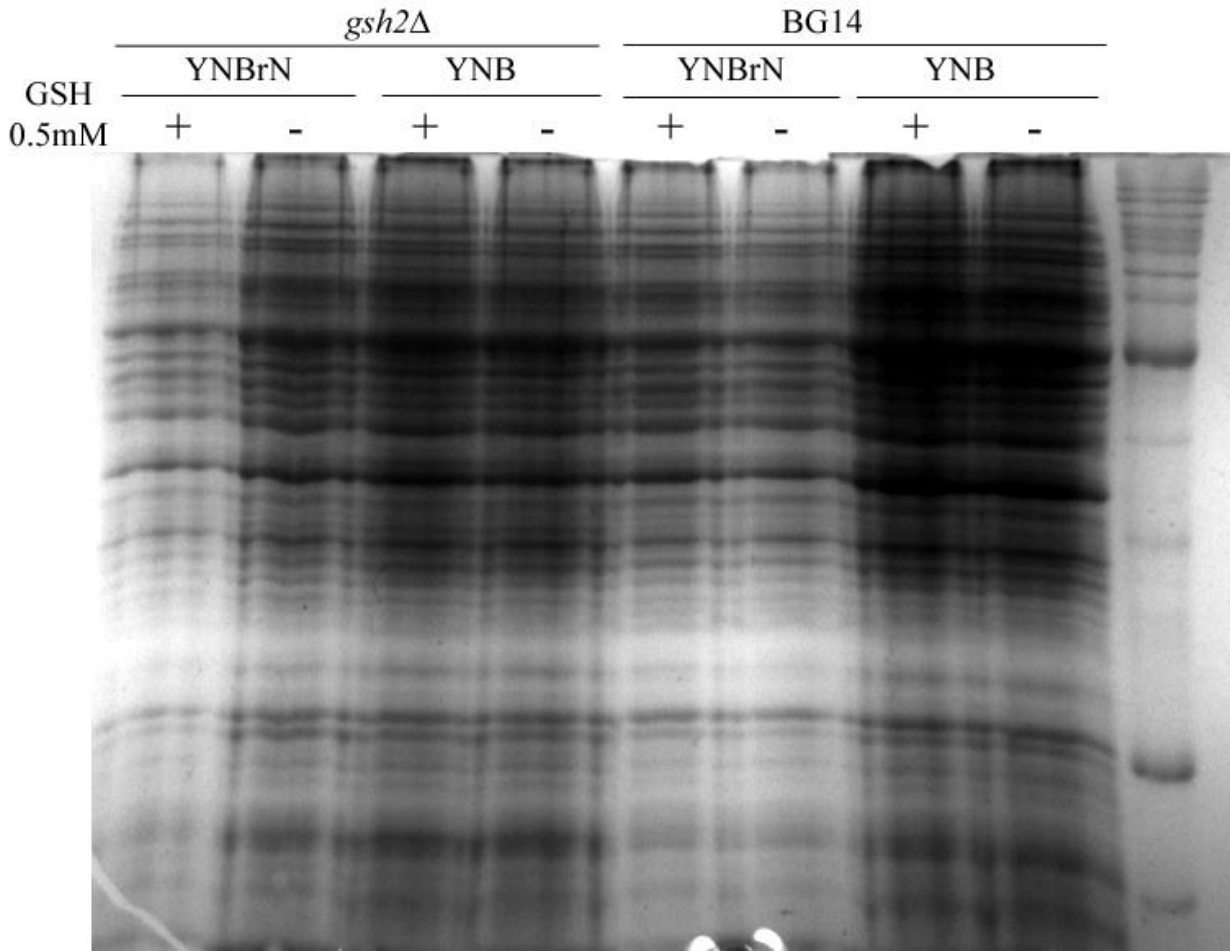


Figura 36. Purificaci3n de prote3nas de membrana de *Candida glabrata*. Cultivos de las cepas BG14 (CGM1) y *gsh2* (CGM873) se crecieron en medio YNB y YNBrN sin o suplementados con GSH 0.5 mM durante 6 hs y se obtuvieron protoplastos como se describe en materiales y m3todos. Los protoplastos se lisaron para extraer las prote3nas, y las prote3nas de membrana se purificaron mediante un gradiente continuo de sacarosa. Las prote3nas se corrieron en un gel de acrilamida al 12% y se tiñeron con coomassie coloidal. Ver materiales y m3todos.

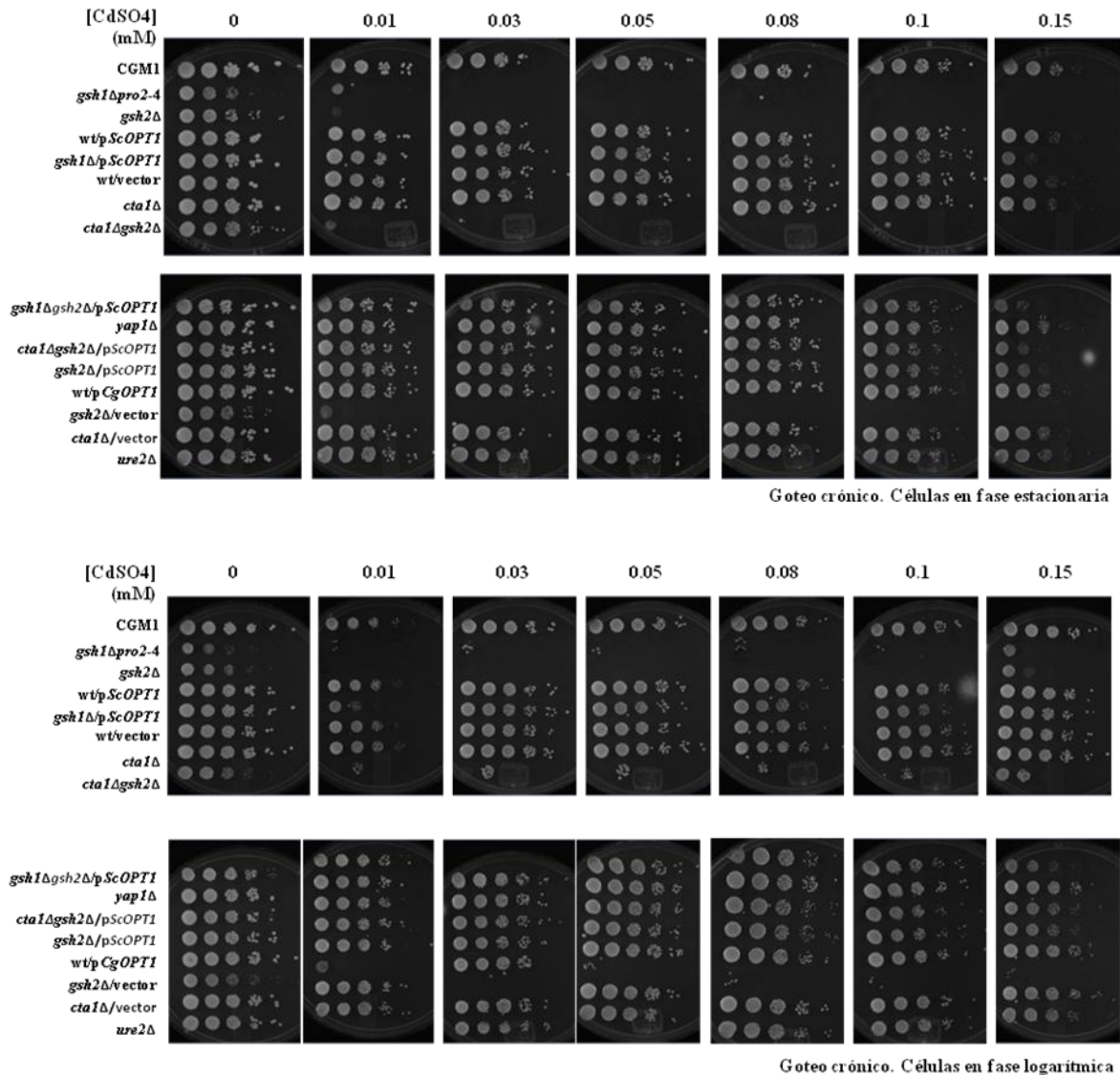
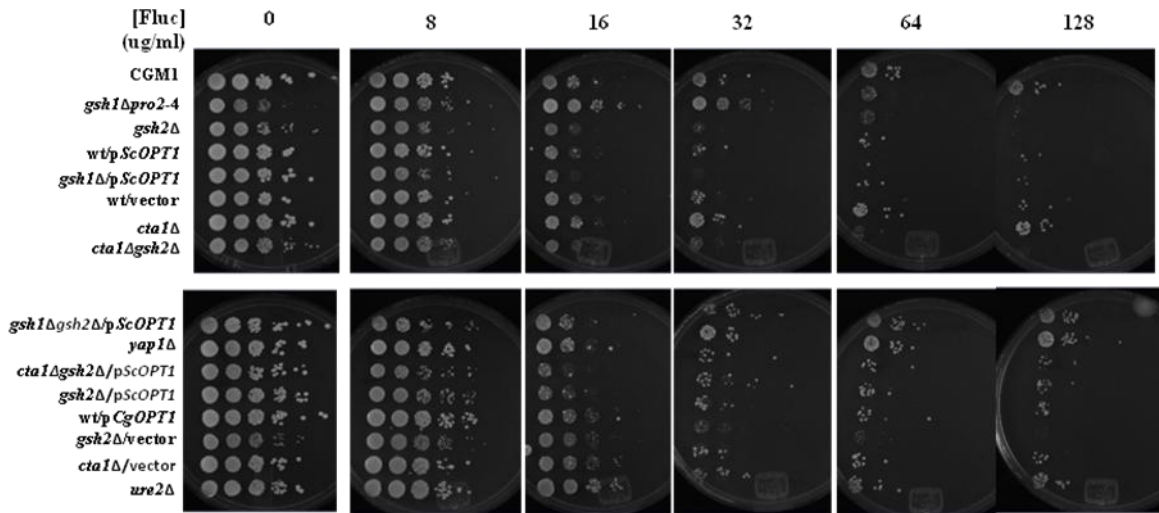


Figura 37. Exposición a sulfato de cadmio de varias mutantes de *Candida glabrata* en diferentes fases de crecimiento. Cultivos de la cepa silvestre BG14 y de diferentes mutantes se crecieron en YPD a 30 °C durante 48hs (fase estacionaria) o el tiempo suficiente para realizar 9 duplicaciones (fase logarítmica). Las células se lavaron y se diluyeron a una densidad celular de 1×10^7 células/mL. Se hicieron diluciones logarítmicas y 5 μ L de cada dilución se colocaron en placas con YPD con diferentes concentraciones de CdSO_4 . Las placas se incubaron a 30 °C durante 48 h.



Goteo crónico. Células en fase estacionaria

Figura 38. Exposición a fluconazol de varias mutantes de *Candida glabrata* en fase estacionaria. Cultivos de la cepa silvestre BG14 y de diferentes mutantes se crecieron en YPD a 30 °C durante 48hs (fase estacionaria). Las células se lavaron y se diluyeron a una densidad celular de 1×10^7 células/mL. Se hicieron diluciones logarítmicas y 5 μ L de cada dilución se colocaron en placas con YPD con diferentes concentraciones de fluconazol. Las placas se incubaron a 30 °C durante 48 h.

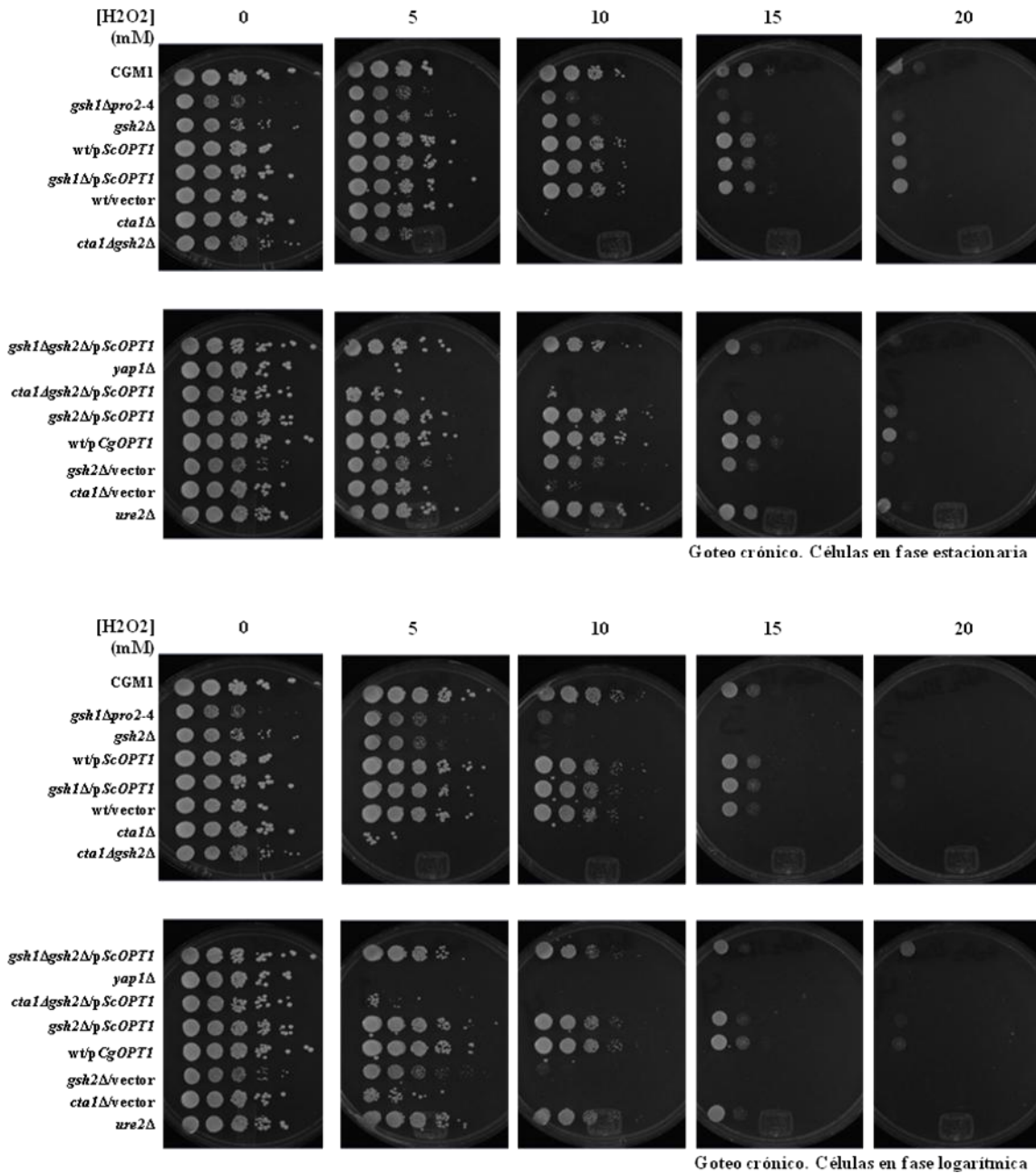


Figura 39. Exposición a H₂O₂ de varias mutantes de *Candida glabrata* en diferentes fases de crecimiento. Cultivos de la cepa silvestre BG14 y de diferentes mutantes se crecieron en YPD a 30 °C durante 48hs (fase estacionaria) o el tiempo suficiente para realizar 9 duplicaciones (fase logarítmica). Las células se lavaron y se diluyeron a una densidad celular de 1×10^7 células/mL. Se hicieron diluciones logarítmicas y 5 μ L de cada dilución se colocaron en placas con YPD con diferentes concentraciones de H₂O₂. Las placas se incubaron a 30 °C durante 48 h.

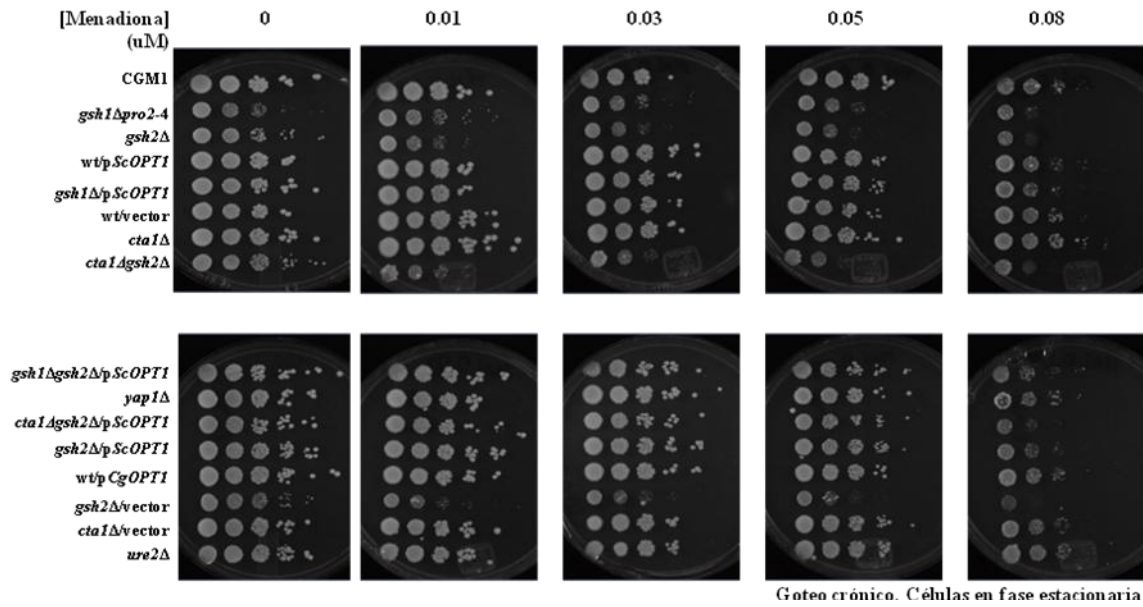


Figura 40. Exposici3n a menadiona de varias mutantes de *Candida glabrata* en fase estacionaria. Cultivos de la cepa silvestre BG14 y de diferentes mutantes se crecieron en YPD a 30 °C durante 48hs (fase estacionaria). Las c3lulas se lavaron y se diluyeron a una densidad celular de 1×10^7 c3lulas/mL. Se hicieron diluciones logar3micas y 5 μ L de cada diluci3n se colocaron en placas con YPD con diferentes concentraciones de menadiona. Las placas se incubaron a 30 °C durante 48 h.

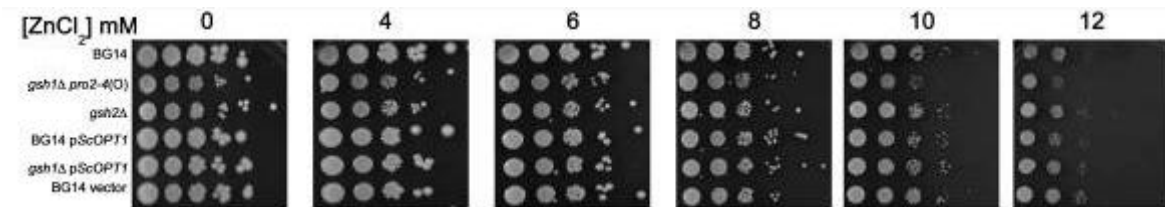


Figura 41. Exposición a cloruro de zinc en fase estacionaria. Cultivos de la cepa silvestre BG14 y de diferentes mutantes se crecieron en YPD a 30 °C durante 48hs (fase estacionaria). Las células se lavaron y se diluyeron a una densidad celular de 1×10^7 células/mL. Se hicieron diluciones logarítmicas y 5 μ L de cada dilución se colocaron en placas con YPD con diferentes concentraciones de ZnCl₂. Las placas se incubaron a 30 °C durante 48 h.

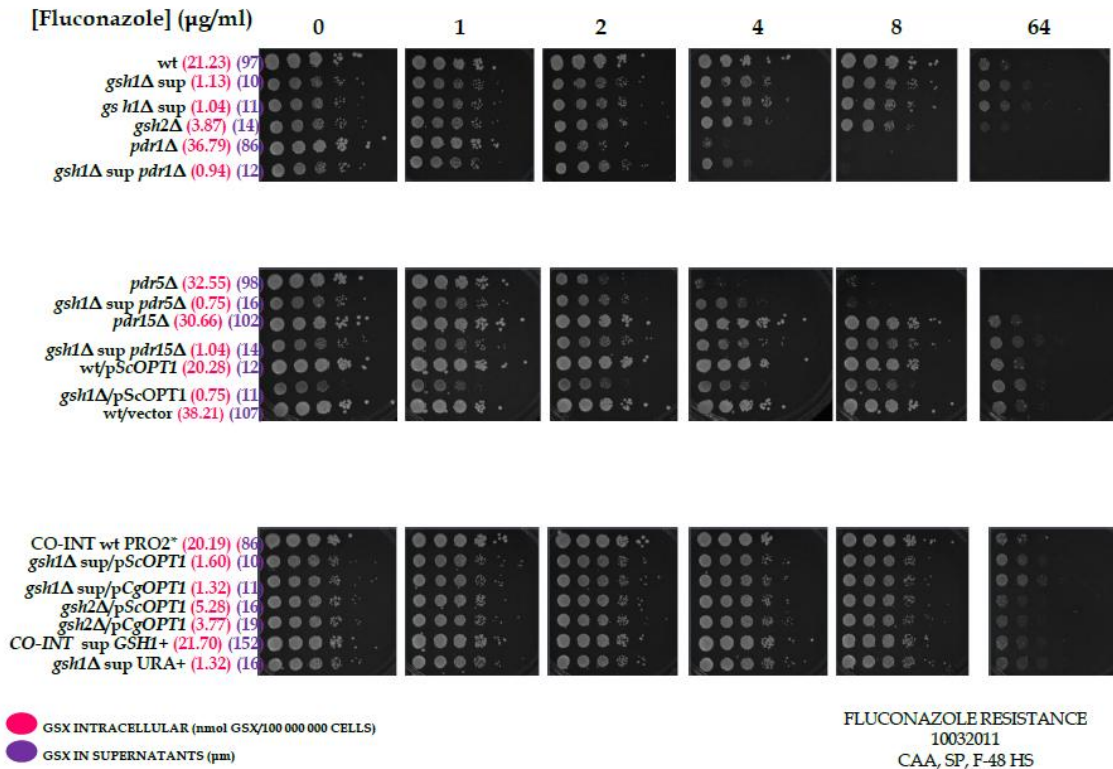


Figura 42. An6lisis de la resistencia a fluconazol en medio CAA de diferentes cepas en fase estacionaria crecidas en medio sin GSH. Cultivos de la cepa silvestre BG14 y de diferentes mutantes se crecieron en CAA a 30 °C durante 48hs (fase estacionaria). Las c6lulas se lavaron y se diluyeron a una densidad celular de 1×10^7 c6lulas/mL. Se hicieron diluciones logar6micas y 5 µL de cada diluci6n se colocaron en placas con CAA con diferentes concentraciones de fluconazol. Las placas se incubaron a 30 °C durante 48 h. Ver materiales y m6todos.

Los n6meros dentro del par6ntesis rosa indican el contenido de GSH intracelular y los n6meros dentro del par6ntesis azul indican el contenido de GSH extracelular.

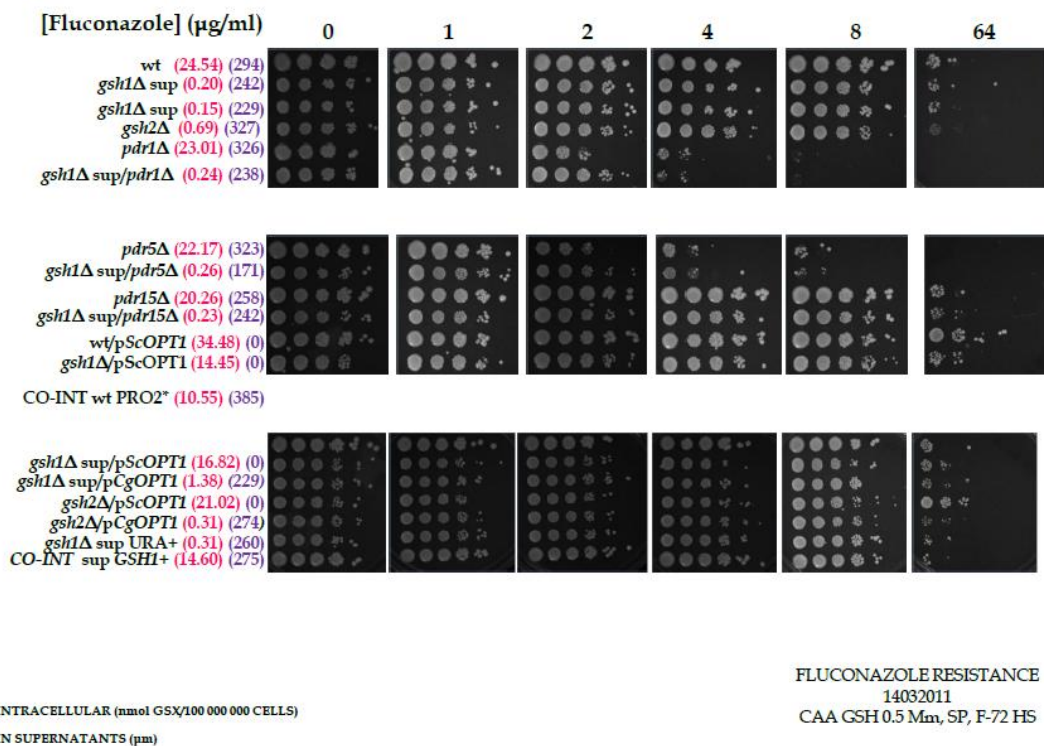


Figura 43. An6lisis de la resistencia a fluconazol en medio CAA de diferentes cepas en fase estacionaria crecidas en medio con GSH 0.5mM. Cultivos de la cepa silvestre BG14 y de diferentes mutantes se crecieron en CAA suplementado con GSH 0.5 mM a 30 °C durante 48hs (fase estacionaria). Las c6lulas se lavaron y se diluyeron a una densidad celular de 1×10^7 c6lulas/mL. Se hicieron diluciones logar6tmicas y 5 μL de cada diluci6n se colocaron en placas con CAA con diferentes concentraciones de fluconazol. Las placas se incubaron a 30 °C durante 48 h. Ver materiales y m6todos.

Los n6meros dentro del par6ntesis rosa indican el contenido de GSH intracelular y los n6meros dentro del par6ntesis azul indican el contenido de GSH extracelular.

REFERENCIAS

- Abad A, Fernandez-Molina JV, Bikandi J, *et al.* (2010) What makes *Aspergillus fumigatus* a successful pathogen? Genes and molecules involved in invasive aspergillosis. *Rev Iberoam Micol* **27**: 155-182.
- Abegg MA, Alabarse PV, Casanova A, *et al.* (2010) Response to oxidative stress in eight pathogenic yeast species of the genus *Candida*. *Mycopathologia* **170**: 11-20.
- Adamis PD, Panek AD & Eleutherio EC (2007) Vacuolar compartmentation of the cadmium-glutathione complex protects *Saccharomyces cerevisiae* from mutagenesis. *Toxicol Lett* **173**: 1-7.
- Adamis PD, Gomes DS, Pinto ML, Panek AD & Eleutherio EC (2004) The role of glutathione transferases in cadmium stress. *Toxicol Lett* **154**: 81-88.
- Adamis PD, Mannarino SC, Riger CJ, Duarte G, Cruz A, Pereira MD & Eleutherio EC (2009) Lap4, a vacuolar aminopeptidase I, is involved in cadmium-glutathione metabolism. *Biometals* **22**: 243-249.
- Al-Lahham A, Rohde V, Heim P, *et al.* (1999) Biosynthesis of phytochelatins in the fission yeast. Phytochelatin synthesis: a second role for the glutathione synthetase gene of *Schizosaccharomyces pombe*. *Yeast* **15**: 385-396.
- Alkhuder K, Meibom KL, Dubail I, Dupuis M & Charbit A (2009) Glutathione Provides a Source of Cysteine Essential for Intracellular Multiplication of *Francisella tularensis*. *Plos Pathogens* **5**.
- Anderson ME (1985) Determination of glutathione and glutathione disulfide in biological samples. *Methods Enzymol* **113**: 548-555.
- Avery AM & Avery SV (2001) *Saccharomyces cerevisiae* expresses three phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidases. *J Biol Chem* **276**: 33730-33735.
- Azevedo D, Nascimento L, Labarre J, Toledano MB & Rodrigues-Pousada C (2007) The *S. cerevisiae* Yap1 and Yap2 transcription factors share a common cadmium-sensing domain. *FEBS Lett* **581**: 187-195.
- Barbas J, Santhanagopalan V, Blaszczynski M, Ellis WR, Jr. & Winge DR (1992) Conversion in the peptides coating cadmium:sulfide crystallites in *Candida glabrata*. *J Inorg Biochem* **48**: 95-105.
- Bates CJ, Prynne CJ & Levene CI (1972) Ascorbate-dependent differences in the hydroxylation of proline and lysine in collagen synthesized by 3T6 fibroblasts in culture. *Biochim Biophys Acta* **278**: 610-616.
- Bjur E, Eriksson-Ygberg S, Aslund F & Rhen M (2006) Thioredoxin 1 promotes intracellular replication and virulence of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Infect Immun* **74**: 5140-5151.



Bourbouloux A, Shahi P, Chakladar A, Delrot S & Bachhawat AK (2000) Hgt1p, a high affinity glutathione transporter from the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* **275**: 13259-13265.

Brandriss MC & Magasanik B (1979) Genetics and physiology of proline utilization in *Saccharomyces cerevisiae*: enzyme induction by proline. *J Bacteriol* **140**: 498-503.

Brandriss MC & Magasanik B (1981) Subcellular compartmentation in control of converging pathways for proline and arginine metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Bacteriol* **145**: 1359-1364.

Brown JL, Bussey H & Stewart RC (1994) Yeast Skn7p functions in a eukaryotic two-component regulatory pathway. *EMBO J* **13**: 5186-5194.

Cabezon V, Llama-Palacios A, Nombela C, Monteoliva L & Gil C (2009) Analysis of *Candida albicans* plasma membrane proteome. *Proteomics* **9**: 4770-4786.

Calvin NM & Hanawalt PC (1988) High-efficiency transformation of bacterial cells by electroporation. *J Bacteriol* **170**: 2796-2801.

Candiano G, Bruschi M, Musante L, *et al.* (2004) Blue silver: a very sensitive colloidal Coomassie G-250 staining for proteome analysis. *Electrophoresis* **25**: 1327-1333.

Carmel-Harel O & Storz G (2000) 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.

Caudle KE, Barker KS, Wiederhold NP, Xu L, Homayouni R & Rogers PD (2011) Genomewide expression profile analysis of the *Candida glabrata* Pdr1 regulon. *Eukaryot Cell* **10**: 373-383.

Clemens S (2006) Toxic metal accumulation, responses to exposure and mechanisms of tolerance in plants. *Biochimie* **88**: 1707-1719.

Copley SD & Dhillon JK (2002) Lateral gene transfer and parallel evolution in the history of glutathione biosynthesis genes. *Genome Biol* **3**: research0025.

Cormack BP & Falkow S (1999) Efficient homologous and illegitimate recombination in the opportunistic yeast pathogen *Candida glabrata*. *Genetics* **151**: 979-987.

Cuellar-Cruz M, Castano I, Arroyo-Helguera O & De Las Penas A (2009) Oxidative stress response to menadione and cumene hydroperoxide in the opportunistic fungal pathogen *Candida glabrata*. *Mem Inst Oswaldo Cruz* **104**: 649-654.

Cuellar-Cruz M, Briones-Martin-del-Campo M, Canas-Villamar I, Montalvo-Arredondo J, Riego-Ruiz L, Castano I & De Las Penas A (2008) 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.



Chae HZ, Chung SJ & Rhee SG (1994) Thioredoxin-dependent peroxide reductase from yeast. *J Biol Chem* **269**: 27670-27678.

Chaves GM, Bates S, Maccallum DM & Odds FC (2007) *Candida albicans* GRX2, encoding a putative glutaredoxin, is required for virulence in a murine model. *Genet Mol Res* **6**: 1051-1063.

De Craene JO, Soetens O & Andre B (2001) The Npr1 kinase controls biosynthetic and endocytic sorting of the yeast Gap1 permease. *J Biol Chem* **276**: 43939-43948.

De Las Penas A, Pan SJ, Castano I, Alder J, Cregg R & Cormack BP (2003) 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.

Delaunay A, Isnard AD & Toledano MB (2000) H₂O₂ sensing through oxidation of the Yap1 transcription factor. *EMBO J* **19**: 5157-5166.

Domergue R, Castano I, De Las Penas A, *et al.* (2005) Nicotinic acid limitation regulates silencing of *Candida* adhesins during UTI. *Science* **308**: 866-870.

Draculic T, Dawes IW & Grant CM (2000) A single glutaredoxin or thioredoxin gene is essential for viability in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Microbiol* **36**: 1167-1174.

Duell EA, Inoue S & Utter MF (1964) Isolation and Properties of Intact Mitochondria from Spheroplasts of Yeast. *J Bacteriol* **88**: 1762-1773.

Fidel PL, Jr., Cutright JL, Tait L & Sobel JD (1996) A murine model of *Candida glabrata* vaginitis. *J Infect Dis* **173**: 425-431.

Ganguli D, Kumar C & Bachhawat AK (2007) The alternative pathway of glutathione degradation is mediated by a novel protein complex involving three new genes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* **175**: 1137-1151.

Garcia-Gimeno MA & Struhl K (2000) Aca1 and Aca2, ATF/CREB activators in *Saccharomyces cerevisiae*, are important for carbon source utilization but not the response to stress. *Mol Cell Biol* **20**: 4340-4349.

Gasch AP, Spellman PT, Kao CM, *et al.* (2000) Genomic expression programs in the response of yeast cells to environmental changes. *Mol Biol Cell* **11**: 4241-4257.

Gietz D, St Jean A, Woods RA & Schiestl RH (1992) Improved method for high efficiency transformation of intact yeast cells. *Nucleic Acids Res* **20**: 1425.

Gietz RD & Sugino A (1988) New yeast-*Escherichia coli* shuttle vectors constructed with in vitro mutagenized yeast genes lacking six-base pair restriction sites. *Gene* **74**: 527-534.

Gomes DS, Fragoso LC, Riger CJ, Panek AD & Eleutherio EC (2002) Regulation of cadmium



uptake by *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochim Biophys Acta* **1573**: 21-25.

Gomes DS, Pereira MD, Panek AD, Andrade LR & Eleutherio EC (2008) Apoptosis as a mechanism for removal of mutated cells of *Saccharomyces cerevisiae*: the role of Grx2 under cadmium exposure. *Biochim Biophys Acta* **1780**: 160-166.

Grant CM (2001) Role of the glutathione/glutaredoxin and thioredoxin systems in yeast growth and response to stress conditions. *Mol Microbiol* **39**: 533-541.

Grant CM, MacIver FH & Dawes IW (1997) Glutathione synthetase is dispensable for growth under both normal and oxidative stress conditions in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* due to an accumulation of the dipeptide gamma-glutamylcysteine. *Mol Biol Cell* **8**: 1699-1707.

Grant CM, Quinn KA & Dawes IW (1999) Differential protein S-thiolation of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase isoenzymes influences sensitivity to oxidative stress. *Mol Cell Biol* **19**: 2650-2656.

Gregori C, Schuller C, Roetzer A, Schwarzmuller T, Ammerer G & Kuchler K (2007) 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.

Grill E, Winnacker EL & Zenk MH (1985) Phytochelatins: the principal heavy-metal complexing peptides of higher plants. *Science* **230**: 674-676.

Grill E, Loffler S, Winnacker EL & Zenk MH (1989) Phytochelatins, the heavy-metal-binding peptides of plants, are synthesized from glutathione by a specific gamma-glutamylcysteine dipeptidyl transpeptidase (phytochelatase). *Proc Natl Acad Sci U S A* **86**: 6838-6842.

Gupta S, Singh B & Sharma SC (1996) Glutathione-glutathione reductase system and lipid peroxidation in *Saccharomyces cerevisiae* under alcohol stress. *Acta Microbiol Immunol Hung* **43**: 33-38.

Ha SB, Smith AP, Howden R, *et al.* (1999) Phytochelatase synthase genes from *Arabidopsis* and the yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Plant Cell* **11**: 1153-1164.

Halliwell B & Gutteridge JMC (1999) *Free radicals in biology and medicine*. Oxford University Press, Oxford.

Hauser M, Narita V, Donhardt AM, Naider F & Becker JM (2001) Multiplicity and regulation of genes encoding peptide transporters in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Membr Biol* **18**: 105-112.

Henkel G & Krebs B (2004) Metallothioneins: zinc, cadmium, mercury, and copper thiolates and selenolates mimicking protein active site features--structural aspects and biological implications. *Chem Rev* **104**: 801-824.

Higgins DG, Thompson JD & Gibson TJ (1996) Using CLUSTAL for multiple sequence alignments. *Methods Enzymol* **266**: 383-402.



Hirata D, Yano K & Miyakawa T (1994) Stress-induced transcriptional activation mediated by YAP1 and YAP2 genes that encode the Jun family of transcriptional activators in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Gen Genet* **242**: 250-256.

Holmgren A (1985) Thioredoxin. *Annu Rev Biochem* **54**: 237-271.

Holmgren A & Aslund F (1995) Glutaredoxin. *Methods Enzymol* **252**: 283-292.

Huang K, Czymbek KJ, Caplan JL, Sweigard JA & Donofrio NM (2011) HYR1-mediated detoxification of reactive oxygen species is required for full virulence in the rice blast fungus. *PLoS Pathog* **7**: e1001335.

Inoue Y, Sugiyama K, Izawa S & Kimura A (1998) Molecular identification of glutathione synthetase (GSH2) gene from *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochim Biophys Acta* **1395**: 315-320.

Inoue Y, Tran LT, Kamakura M, Izawa S, Miki T, Tsujimoto Y & Kimura A (1995) Oxidative stress response in yeast: glutathione peroxidase of *Hansenula mrakii* is bound to the membrane of both mitochondria and cytoplasm. *Biochim Biophys Acta* **1245**: 325-330.

Island MD, Perry JR, Naider F & Becker JM (1991) Isolation and characterization of *S. cerevisiae* mutants deficient in amino acid-inducible peptide transport. *Curr Genet* **20**: 457-463.

Jaspers CJ & Penninckx MJ (1984) Glutathione metabolism in yeast *Saccharomyces cerevisiae*. Evidence that gamma-glutamyltranspeptidase is a vacuolar enzyme. *Biochimie* **66**: 71-74.

Jin YH, Clark AB, Slebos RJ, *et al.* (2003) Cadmium is a mutagen that acts by inhibiting mismatch repair. *Nat Genet* **34**: 326-329.

Kamran M, Calcagno AM, Findon H, *et al.* (2004) Inactivation of transcription factor gene ACE2 in the fungal pathogen *Candida glabrata* results in hypervirulence. *Eukaryot Cell* **3**: 546-552.

Kaur R, Ma B & Cormack BP (2007) A family of glycosylphosphatidylinositol-linked aspartyl proteases is required for virulence of *Candida glabrata*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**: 7628-7633.

Kaur R, Domergue R, Zupancic ML & Cormack BP (2005) A yeast by any other name: *Candida glabrata* and its interaction with the host. *Curr Opin Microbiol* **8**: 378-384.

Kneer R, Kutchan TM, Hochberger A & Zenk MH (1992) *Saccharomyces cerevisiae* and *Neurospora crassa* contain heavy metal sequestering phytochelatin. *Arch Microbiol* **157**: 305-310.

Kuge S & Jones N (1994) YAP1 dependent activation of TRX2 is essential for the response of *Saccharomyces cerevisiae* to oxidative stress by hydroperoxides. *EMBO J* **13**: 655-664.

Kuge S, Jones N & Nomoto A (1997) Regulation of yAP-1 nuclear localization in response to oxidative stress. *EMBO J* **16**: 1710-1720.



Kuge S, Toda T, Iizuka N & Nomoto A (1998) Crm1 (Xpo1) dependent nuclear export of the budding yeast transcription factor yAP-1 is sensitive to oxidative stress. *Genes Cells* **3**: 521-532.

Kumar C, Sharma R & Bachhawat AK (2003) Utilization of glutathione as an exogenous sulfur source is independent of gamma-glutamyl transpeptidase in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*: evidence for an alternative glutathione degradation pathway. *FEMS Microbiol Lett* **219**: 187-194.

Kumar C, Igbaria A, D'Autreaux B, *et al.* (2011) Glutathione revisited: a vital function in iron metabolism and ancillary role in thiol-redox control. *EMBO J* **30**: 2044-2056.

Kuwayama H, Obara S, Morio T, Katoh M, Urushihara H & Tanaka Y (2002) PCR-mediated generation of a gene disruption construct without the use of DNA ligase and plasmid vectors. *Nucleic Acids Res* **30**: E2.

Lange H, Kispal G & Lill R (1999) Mechanism of iron transport to the site of heme synthesis inside yeast mitochondria. *J Biol Chem* **274**: 18989-18996.

Lee J, Godon C, Lagniel G, Spector D, Garin J, Labarre J & Toledano MB (1999) Yap1 and Skn7 control two specialized oxidative stress response regulons in yeast. *J Biol Chem* **274**: 16040-16046.

Li L, Redding S & Dongari-Bagtzoglou A (2007) *Candida glabrata*: an emerging oral opportunistic pathogen. *J Dent Res* **86**: 204-215.

Li ZS, Lu YP, Zhen RG, Szczypka M, Thiele DJ & Rea PA (1997) A new pathway for vacuolar cadmium sequestration in *Saccharomyces cerevisiae*: YCF1-catalyzed transport of bis(glutathionato)cadmium. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**: 42-47.

Lill R (2009) Function and biogenesis of iron-sulphur proteins. *Nature* **460**: 831-838.

Lill R, Diekert K, Kaut A, Lange H, Pelzer W, Prohl C & Kispal G (1999) The essential role of mitochondria in the biogenesis of cellular iron-sulfur proteins. *Biol Chem* **380**: 1157-1166.

Lopilato J, Bortner S & Beckwith J (1986) Mutations in a new chromosomal gene of *Escherichia coli* K-12, *pcnB*, reduce plasmid copy number of pBR322 and its derivatives. *Mol Gen Genet* **205**: 285-290.

Lopreiato R, Facchin S, Sartori G, *et al.* (2004) Analysis of the interaction between p1D261/Bud32, an evolutionarily conserved protein kinase of *Saccharomyces cerevisiae*, and the Grx4 glutaredoxin. *Biochem J* **377**: 395-405.

Lu J, Chew EH & Holmgren A (2007) Targeting thioredoxin reductase is a basis for cancer therapy by arsenic trioxide. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**: 12288-12293.

Lubkowitz MA, Barnes D, Breslav M, Burchfield A, Naider F & Becker JM (1998) *Schizosaccharomyces pombe* *isp4* encodes a transporter representing a novel family of oligopeptide transporters. *Mol Microbiol* **28**: 729-741.



Luikenhuis S, Perrone G, Dawes IW & Grant CM (1998) The yeast *Saccharomyces cerevisiae* contains two glutaredoxin genes that are required for protection against reactive oxygen species. *Mol Biol Cell* **9**: 1081-1091.

Lundberg M, Fernandes AP, Kumar S & Holmgren A (2004) Cellular and plasma levels of human glutaredoxin 1 and 2 detected by sensitive ELISA systems. *Biochem Biophys Res Commun* **319**: 801-809.

Machado AK, Morgan BA & Merrill GF (1997) Thioredoxin reductase-dependent inhibition of MCB cell cycle box activity in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* **272**: 17045-17054.

Malani A, Hmoud J, Chiu L, Carver PL, Bielaczyc A & Kauffman CA (2005) *Candida glabrata* fungemia: experience in a tertiary care center. *Clin Infect Dis* **41**: 975-981.

Marquez JA, Pascual-Ahuir A, Proft M & Serrano R (1998) The Ssn6-Tup1 repressor complex of *Saccharomyces cerevisiae* is involved in the osmotic induction of HOG-dependent and -independent genes. *EMBO J* **17**: 2543-2553.

Martinez-Pastor MT & Estruch F (1996) Sudden depletion of carbon source blocks translation, but not transcription, in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett* **390**: 319-322.

Mehdi K & Penninckx MJ (1997) An important role for glutathione and gamma-glutamyltranspeptidase in the supply of growth requirements during nitrogen starvation of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiology* **143 (Pt 6)**: 1885-1889.

Mehdi K, Thierie J & Penninckx MJ (2001) gamma-Glutamyl transpeptidase in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* and its role in the vacuolar transport and metabolism of glutathione. *Biochem J* **359**: 631-637.

Mehra RK, Mulchandani P & Hunter TC (1994) Role of CdS quantum crystallites in cadmium resistance in *Candida glabrata*. *Biochem Biophys Res Commun* **200**: 1193-1200.

Mehra RK, Tarbet EB, Gray WR & Winge DR (1988) Metal-specific synthesis of two metallothioneins and gamma-glutamyl peptides in *Candida glabrata*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **85**: 8815-8819.

Mehra RK, Thorvaldsen JL, Macreadie IG & Winge DR (1992) Disruption analysis of metallothionein-encoding genes in *Candida glabrata*. *Gene* **114**: 75-80.

Mehra RK, Garey JR, Butt TR, Gray WR & Winge DR (1989) *Candida glabrata* metallothioneins. Cloning and sequence of the genes and characterization of proteins. *J Biol Chem* **264**: 19747-19753.

Mesecke N, Spang A, Deponte M & Herrmann JM (2008) A novel group of glutaredoxins in the cis-Golgi critical for oxidative stress resistance. *Mol Biol Cell* **19**: 2673-2680.

Miyake T, Hiraishi H, Sammoto H & Ono B (2003) Involvement of the VDE homing endonuclease



and rapamycin in regulation of the *Saccharomyces cerevisiae* GSH11 gene encoding the high affinity glutathione transporter. *J Biol Chem* **278**: 39632-39636.

Mooz ED & Meister A (1967) Tripeptide (glutathione) synthetase. Purification, properties, and mechanism of action. *Biochemistry* **6**: 1722-1734.

Morgan BA, Banks GR, Toone WM, Raitt D, Kuge S & Johnston LH (1997) The Skn7 response regulator controls gene expression in the oxidative stress response of the budding yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO J* **16**: 1035-1044.

Moye-Rowley WS, Harshman KD & Parker CS (1989) Yeast YAP1 encodes a novel form of the jun family of transcriptional activator proteins. *Genes Dev* **3**: 283-292.

Muller EG (1991) Thioredoxin deficiency in yeast prolongs S phase and shortens the G1 interval of the cell cycle. *J Biol Chem* **266**: 9194-9202.

Murakami CJ, Burtner CR, Kennedy BK & Kaerberlein M (2008) A method for high-throughput quantitative analysis of yeast chronological life span. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* **63**: 113-121.

Nagy MA, Emri T, Fekete E, Sandor E, Springael JY, Penninckx MJ & Pocsy I (2003) Glutathione metabolism of *Acremonium chrysogenum* in relation to cephalosporin C production: is gamma-glutamyltransferase in the center? *Folia Microbiol (Praha)* **48**: 149-155.

Nguyen DT, Alarco AM & Raymond M (2001) Multiple Yap1p-binding sites mediate induction of the yeast major facilitator FLR1 gene in response to drugs, oxidants, and alkylating agents. *J Biol Chem* **276**: 1138-1145.

Ohtake Y & Yabuuchi S (1991) Molecular cloning of the gamma-glutamylcysteine synthetase gene of *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* **7**: 953-961.

Ojeda L, Keller G, Muhlenhoff U, Rutherford JC, Lill R & Winge DR (2006) Role of glutaredoxin-3 and glutaredoxin-4 in the iron regulation of the Aft1 transcriptional activator in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* **281**: 17661-17669.

Pearson GD & Merrill GF (1998) Deletion of the *Saccharomyces cerevisiae* TRR1 gene encoding thioredoxin reductase inhibits p53-dependent reporter gene expression. *J Biol Chem* **273**: 5431-5434.

Pedrajas JR, Kosmidou E, Miranda-Vizuetes A, Gustafsson JA, Wright AP & Spyrou G (1999) Identification and functional characterization of a novel mitochondrial thioredoxin system in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* **274**: 6366-6373.

Penninckx MJ & Elskens MT (1993) Metabolism and functions of glutathione in micro-organisms. *Adv Microb Physiol* **34**: 239-301.

Perry JR, Basrai MA, Steiner HY, Naider F & Becker JM (1994) Isolation and characterization of a *Saccharomyces cerevisiae* peptide transport gene. *Mol Cell Biol* **14**: 104-115.



Pfaller MA & Diekema DJ (2007) Epidemiology of invasive candidiasis: a persistent public health problem. *Clin Microbiol Rev* **20**: 133-163.

Polakova S, Blume C, Zarate JA, Mentel M, Jorck-Ramberg D, Stenderup J & Piskur J (2009) Formation of new chromosomes as a virulence mechanism in yeast *Candida glabrata*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**: 2688-2693.

Popova Iu G, Padkina MV & Sambuk EV (2000) [Effect of mutations in PHO85 and PHO4 genes on utilization of proline in *Saccharomyces cerevisiae* yeasts]. *Genetika* **36**: 1622-1628.

Presterl E, Daxbock F, Graninger W & Willinger B (2007) Changing pattern of candidaemia 2001-2006 and use of antifungal therapy at the University Hospital of Vienna, Austria. *Clin Microbiol Infect* **13**: 1072-1076.

Proft M & Serrano R (1999) Repressors and upstream repressing sequences of the stress-regulated ENA1 gene in *Saccharomyces cerevisiae*: bZIP protein Sko1p confers HOG-dependent osmotic regulation. *Mol Cell Biol* **19**: 537-546.

Proft M, Pascual-Ahuir A, de Nadal E, Arino J, Serrano R & Posas F (2001) Regulation of the Sko1 transcriptional repressor by the Hog1 MAP kinase in response to osmotic stress. *EMBO J* **20**: 1123-1133.

Pujol-Carrion N, Belli G, Herrero E, Nogues A & de la Torre-Ruiz MA (2006) Glutaredoxins Grx3 and Grx4 regulate nuclear localisation of Aft1 and the oxidative stress response in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Cell Sci* **119**: 4554-4564.

Quintana-Cabrera R, Fernandez-Fernandez S, Bobo-Jimenez V, Escobar J, Sastre J, Almeida A & Bolanos JP (2012) gamma-Glutamylcysteine detoxifies reactive oxygen species by acting as glutathione peroxidase-1 cofactor. *Nat Commun* **3**: 718.

Raitt DC, Johnson AL, Erkin AM, Makino K, Morgan B, Gross DS & Johnston LH (2000) The Skn7 response regulator of *Saccharomyces cerevisiae* interacts with Hsf1 in vivo and is required for the induction of heat shock genes by oxidative stress. *Mol Biol Cell* **11**: 2335-2347.

Rep M, Proft M, Remize F, Tamas M, Serrano R, Thevelein JM & Hohmann S (2001) The *Saccharomyces cerevisiae* Sko1p transcription factor mediates HOG pathway-dependent osmotic regulation of a set of genes encoding enzymes implicated in protection from oxidative damage. *Mol Microbiol* **40**: 1067-1083.

Rhee SG, Chae HZ & Kim K (2005) Peroxiredoxins: a historical overview and speculative preview of novel mechanisms and emerging concepts in cell signaling. *Free Radic Biol Med* **38**: 1543-1552.

Roberg KJ, Bickel S, Rowley N & Kaiser CA (1997) Control of amino acid permease sorting in the late secretory pathway of *Saccharomyces cerevisiae* by SEC13, LST4, LST7 and LST8. *Genetics* **147**: 1569-1584.

Rodriguez-Manzaneque MT, Ros J, Cabisco E, Sorribas A & Herrero E (1999) Grx5 glutaredoxin



plays a central role in protection against protein oxidative damage in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* **19**: 8180-8190.

Rodriguez-Manzanaque MT, Tamarit J, Belli G, Ros J & Herrero E (2002) Grx5 is a mitochondrial glutaredoxin required for the activity of iron/sulfur enzymes. *Mol Biol Cell* **13**: 1109-1121.

Roetzer A, Gratz N, Kovarik P & Schuller C (2010) Autophagy supports *Candida glabrata* survival during phagocytosis. *Cell Microbiol* **12**: 199-216.

Roetzer A, Klopff E, Gratz N, *et al.* (2011) Regulation of *Candida glabrata* oxidative stress resistance is adapted to host environment. *FEBS Lett* **585**: 319-327.

Saijo T, Miyazaki T, Izumikawa K, *et al.* (2010) Skn7p is involved in oxidative stress response and virulence of *Candida glabrata*. *Mycopathologia* **169**: 81-90.

Sanglard D, Ischer F & Bille J (2001) 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.

Scannell DR, Zill OA, Rokas A, *et al.* (2011) The Awesome Power of Yeast Evolutionary Genetics: New Genome Sequences and Strain Resources for the *Saccharomyces sensu stricto* Genus. *G3 (Bethesda)* **1**: 11-25.

Schmitt AP & McEntee K (1996) Msn2p, a zinc finger DNA-binding protein, is the transcriptional activator of the multistress response in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**: 5777-5782.

Schnell N, Krems B & Entian KD (1992) The PAR1 (YAP1/SNQ3) gene of *Saccharomyces cerevisiae*, a c-jun homologue, is involved in oxygen metabolism. *Curr Genet* **21**: 269-273.

Seider K, Brunke S, Schild L, *et al.* (2011) The facultative intracellular pathogen *Candida glabrata* subverts macrophage cytokine production and phagolysosome maturation. *J Immunol* **187**: 3072-3086.

Shenton D, Perrone G, Quinn KA, Dawes IW & Grant CM (2002) Regulation of protein S-thiolation by glutaredoxin 5 in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* **277**: 16853-16859.

Siddiqui AH & Brandriss MC (1989) The *Saccharomyces cerevisiae* PUT3 activator protein associates with proline-specific upstream activation sequences. *Mol Cell Biol* **9**: 4706-4712.

Sies H (1991) Oxidative stress: from basic research to clinical application. *Am J Med* **91**: 31S-38S.

Sipos K, Lange H, Fekete Z, Ullmann P, Lill R & Kispal G (2002) Maturation of cytosolic iron-sulfur proteins requires glutathione. *J Biol Chem* **277**: 26944-26949.

Soetens O, De Craene JO & Andre B (2001) Ubiquitin is required for sorting to the vacuole of the



yeast general amino acid permease, Gap1. *J Biol Chem* **276**: 43949-43957.

Spector D, Labarre J & Toledano MB (2001) A genetic investigation of the essential role of glutathione: mutations in the proline biosynthesis pathway are the only suppressors of glutathione auxotrophy in yeast. *J Biol Chem* **276**: 7011-7016.

Springael JY & Andre B (1998) Nitrogen-regulated ubiquitination of the Gap1 permease of *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Biol Cell* **9**: 1253-1263.

Springael JY & Penninckx MJ (2003) Nitrogen-source regulation of yeast gamma-glutamyl transpeptidase synthesis involves the regulatory network including the GATA zinc-finger factors Gln3, Nil1/Gat1 and Gzf3. *Biochem J* **371**: 589-595.

Stanbrough M & Magasanik B (1995) Transcriptional and posttranslational regulation of the general amino acid permease of *Saccharomyces cerevisiae*. *J Bacteriol* **177**: 94-102.

Stephen DW & Jamieson DJ (1997) Amino acid-dependent regulation of the *Saccharomyces cerevisiae* GSH1 gene by hydrogen peroxide. *Mol Microbiol* **23**: 203-210.

Stephen DW, Rivers SL & Jamieson DJ (1995) The role of the YAP1 and YAP2 genes in the regulation of the adaptive oxidative stress responses of *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Microbiol* **16**: 415-423.

Sugiyama K, Izawa S & Inoue Y (2000) The Yap1p-dependent induction of glutathione synthesis in heat shock response of *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* **275**: 15535-15540.

ter Schure EG, van Riel NA & Verrips CT (2000) The role of ammonia metabolism in nitrogen catabolite repression in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiol Rev* **24**: 67-83.

Thomas D, Jacquemin I & Surdin-Kerjan Y (1992) MET4, a leucine zipper protein, and centromere-binding factor 1 are both required for transcriptional activation of sulfur metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* **12**: 1719-1727.

Toledano MB, Kumar C, Le Moan N, Spector D & Tacnet F (2007) 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.

Tomenchok DM & Brandriss MC (1987) Gene-enzyme relationships in the proline biosynthetic pathway of *Saccharomyces cerevisiae*. *J Bacteriol* **169**: 5364-5372.

Tsai HF, Krol AA, Sarti KE & Bennett JE (2006) *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.

Turton HE, Dawes IW & Grant CM (1997) *Saccharomyces cerevisiae* exhibits a yAP-1-mediated adaptive response to malondialdehyde. *J Bacteriol* **179**: 1096-1101.



Vatamaniuk OK, Bucher EA, Sundaram MV & Rea PA (2005) CeHMT-1, a putative phytochelatin transporter, is required for cadmium tolerance in *Caenorhabditis elegans*. *J Biol Chem* **280**: 23684-23690.

Veeravalli K, Boyd D, Iverson BL, Beckwith J & Georgiou G (2011) Laboratory evolution of glutathione biosynthesis reveals natural compensatory pathways. *Nat Chem Biol* **7**: 101-105.

Vilella F, Alves R, Rodriguez-Manzaneque MT, Belli G, Swaminathan S, Sunnerhagen P & Herrero E (2004) Evolution and cellular function of monothiol glutaredoxins: involvement in iron-sulphur cluster assembly. *Comp Funct Genomics* **5**: 328-341.

Wemmie JA, Steggerda SM & Moye-Rowley WS (1997) The *Saccharomyces cerevisiae* AP-1 protein discriminates between oxidative stress elicited by the oxidants H₂O₂ and diamide. *J Biol Chem* **272**: 7908-7914.

Wheeler GL, Quinn KA, Perrone G, Dawes IW & Grant CM (2002) Glutathione regulates the expression of gamma-glutamylcysteine synthetase via the Met4 transcription factor. *Mol Microbiol* **46**: 545-556.

Wickerham LJ, Flickinger MH & Burton KA (1946) A Modification of Henrici's Vegetable-Juice Sporulation Medium for Yeasts. *J Bacteriol* **52**: 611-612.

Wiles AM, Naider F & Becker JM (2006) Transmembrane domain prediction and consensus sequence identification of the oligopeptide transport family. *Res Microbiol* **157**: 395-406.

Wiles AM, Cai H, Naider F & Becker JM (2006) Nutrient regulation of oligopeptide transport in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiology* **152**: 3133-3145.

Wonisch W, Hayn M, Schaur RJ, *et al.* (1997) Increased stress parameter synthesis in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* after treatment with 4-hydroxy-2-nonenal. *FEBS Lett* **405**: 11-15.

Wunschmann J, Beck A, Meyer L, Letzel T, Grill E & Lenzian KJ (2007) Phytochelatin synthetases are synthesized by two vacuolar serine carboxypeptidases in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett* **581**: 1681-1687.

Xu S, Falvey DA & Brandriss MC (1995) Roles of URE2 and GLN3 in the proline utilization pathway in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* **15**: 2321-2330.

Yadav AK, Desai PR, Rai MN, Kaur R, Ganesan K & Bachhawat AK (2011) 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.

Yan C, Lee LH & Davis LI (1998) Crm1p mediates regulated nuclear export of a yeast AP-1-like transcription factor. *EMBO J* **17**: 7416-7429.

