

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

POSGRADO EN CIENCIAS EN BIOLOGIA MOLECULAR

PARTICIPACIÓN DEL SILENCIAMIENTO EN LA RESPUESTA
PLEIOTRÓPICA FARMACOLÓGICA Y EN LA RESPUESTA A
ESTRÉS OXIDANTE DE *Candida glabrata*

Tesis que presenta

Gehenna Lobo Guerrero Serrano

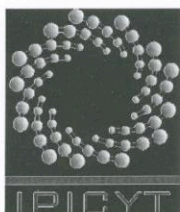
Para obtener el grado de

Maestra en Ciencias en Biología Molecular

Director de la Tesis:

Dr. Alejandro De Las Peñas Nava

San Luis Potosí, S.L.P., Julio de 2011



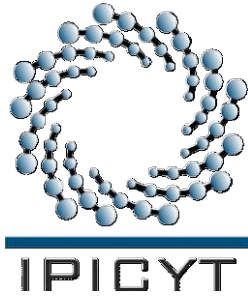
Constancia de aprobación de la tesis

La tesis "La Resistencia a Fluconazol en *Candida glabrata* mediada por *PDR1* y *CDR1* esta sujeta a silenciamiento local por la desacetilasa de histonas *Hst1*" y "Participación de dos glutatión peroxidadas subteloméricas en la respuesta a estrés oxidante de *Candida glabrata*" presentada para obtener el Grado de de Maestra en Ciencias en Biología Molecular fue elaborada por **Gehenna Lobo Guerrero Serrano** y aprobada el **04 de 07 de 2011** 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)

Dr. Margarita Rodríguez y Domínguez-Kessler
(Miembro del Comité Tutorial)

Dr. Luis Antonio Salazar Olivo
(Miembro del Comité Tutorial)



Créditos Institucionales

Esta tesis fue elaborada en el Laboratorio 6 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

Durante la realización del trabajo el autor recibió una beca académica del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología No. 230938 y del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A. C.



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

Acta de Examen de Grado

El Secretario Académico del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C., certifica que en el Acta 084 del Libro Primero de Actas de Exámenes de Grado del Programa de Maestría en Ciencias en Biología Molecular está asentado lo siguiente:

En la ciudad de San Luis Potosí a los 14 días del mes de julio del año 2011, se reunió a las 12:00 horas en las instalaciones del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C., el Jurado integrado por:

Dr. Alejandro De Las Peñas Nava	Presidente	IPICYT
Dr. Luis Antonio Salazar Olivo	Secretario	IPICYT
Dra. Margarita Rodríguez y Domínguez Kessler	Sinodal externo	Externa

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

MAESTRA EN CIENCIAS EN BIOLOGÍA MOLECULAR

sustentó la C.

Gehenna Lobo Guerrero Serrano

sobre la Tesis intitulada:

Participación del Silenciamiento en la Respuesta Pleiotrópica Farmacológica y en la Respuesta a Estrés Oxidante de 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 14:00 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 días del mes de de .

Mtra. Ivonne Lizette Cuevas Vélez
Jefa del Departamento del Posgrado


Dr. Marcial Bonilla Marín
Secretario Académico



Dedicado a mis Padres y a mí hermana Adelina

Agradecimientos

Quiero agradecer al doctor Alejandro de las Peñas por darme la oportunidad de trabajar bajo su dirección, ha sido una de las experiencias más enriquecedoras de mi vida.

A Irene Castaño por sus atinadas sugerencias y comentarios así como su entusiasmo.

A mis Sinodales La Dra. Margarita Rodríguez y Domínguez- Kessler y al Dr. Luis Antonio Salazar Olivo por sus atinados cometarios y sugerencias.

A mis profesores que con gran dedicación y sabiduría inculcaron en mí una vez más el amor por la ciencia.

A mis compañeros del laboratorio 6, por darse el tiempo para escuchar, para ofrecer soluciones y hacerlo con una sonrisa, en especial quiero agradecer a Jacqueline Juárez, Emmanuel Orta, Marcela Briones, Guadalupe Gutiérrez, Luis Medina, Alba Saucedo Y Berenice Vázquez.

A mis padres Gloria Serrano y Carlos Guerrero por todo su amor y sabiduría.

A Adelina Lobo por su apoyo incondicional e infinito amor.
A mi hermano Azdrubal por sus sabios consejos.

A mis amigos que son mi motor y felicidad.
Alejandro Nieto, Perla Nieto, Paola Almendarez, Eduardo Roa, Salvador Fernández, Mónica Saavedra y Fernando Rangel.

Contenido

Constancia de aprobación de la tesis	ii
Créditos institucionales	iii
Acta de examen	iv
Dedicatorias	v
Agradecimientos	vi
Resumen	vii
Abstract	viii
Título del Capítulo 1	1
Introducción	2
Resultados	3
Materiales y Métodos	7
Discusión	12
Referencias	13
Material suplementario	16
Título del Capítulo 2	17
Introducción	18
Resultados	19
Materiales y Métodos	22
Discusión	28
Referencias	29

Resumen

LA RESISTENCIA A FLUCONAZOL DE *Candida glabrata* MEDIADA POR Pdr1 Y Cdr1 ESTÁ SUJETA A SILENCIAMIENTO LOCAL POR LA DESACETILASA DE HISTONAS Hst1

Resumen

Candida glabrata ha emergido como un agente importante de infecciones fúngicas. Esta levadura puede adquirir resistencia a fluconazol, un fármaco usado para el tratamiento de las candidemias. La resistencia a este fármaco puede generarse a través de mutaciones tipo ganancia de función en el factor transcripcional Pdr1. Pdr1 induce la expresión de los genes que codifican transportadores con casete de unión a ATP (ABC), *CDR1* y *CDR2*, que median el transporte activo del azol al exterior de la célula. El incremento en la expresión de *CDR1* y *CDR2* puede también obtenerse por mutaciones en el DNA mitocondrial o por amplificación de estos genes. En este estudio demostramos que la expresión de los genes *PDR1* y *CDR1*, que regulan la respuesta pleiotrópica farmacológica de *C. glabrata*, se encuentra bajo control epigenético por Hst1, una desacetilasa de histonas dependiente de nicotinamida adenina dinucleótido (NAD⁺). Mostramos que la inhibición de Hst1 por NAM un precursor de NAD⁺, incrementa la resistencia de *C. glabrata* a fluconazol. Dado que Hst1 se puede inactivar *in vivo*, la pérdida del silenciamiento mediado por Hst1 puede ser importante para la adquisición de resistencia a fluconazol durante la infección.

PALABRAS CLAVE. Fluconazol, Silenciamiento, *Candida glabrata*

PARTICIPACIÓN DE DOS GLUTATIÓN PEROXIDASAS SUBTELOMÉRICAS EN LA RESPUESTA A ESTRÉS OXIDANTE DE *Candida glabrata*

Resumen

Encontramos tres fases abiertas de lectura homólogas a glutatión peroxidasas en el genoma de *C. glabrata* (*CAGLOC01705g*, *CAGLO100264g* y *CAGLO100242g*). Por sintenia y análisis de secuencia los nombramos *GPX2*, *GPX3A* y *GPX3B*, respectivamente. *GPX3A* y *GPX3B* son dos genes que codifican para 2 proteínas muy similares y que se transcriben de forma divergente. Estos dos genes se encuentran a 17.5Kb y 20 Kb del telomero izquiereado del cromosoma I, sin embargo, estos genes no están sujetos a silenciamiento subtelomérico. Investigamos el papel de estos genes en la respuesta a estrés oxidante en *C. glabrata*. La doble mutante *gpx3AΔ gpx3BΔ* fue sensible a hidroperóxido de cumeno. Estos datos sugieren que *GPX3A* y *GPX3B* pudieran codificar para glutatión peroxidasas de fosfolípidos involucradas en la depuración de hidroperóxidos orgánicos

PALABRAS CLAVE. Glutatión peroxidasas, estrés oxidante, *Candida glabrata*

Abstract

THE FLUCONAZOLE RESISTANCE OF *Candida glabrata* MEDIATED BY Pdr1 AND Cdr1 IS UNDER CONTROL OF LOCAL SILENCING BY THE HISTONE DEACETYLASE Hst1

Summary

Candida glabrata has emerged as a common cause of fungal infections. This yeast can acquire resistance to fluconazole, a drug used for the treatment of candidemias. Resistance to this drug can develop through gain-of-function mutations in the transcriptional regulator Pdr1. Pdr1 induces the expression of ATP-binding cassette (ABC) transporter-encoding genes, *CDR1* and *CDR2*, that mediate azole efflux from the cell. The increased expression of *CDR1* and *CDR2* can also be caused by mutations in mitochondrial DNA or genetic amplification of these genes. In this study, we show that expression of *PDR1* and *CDR1* genes, which regulate the pleiotropic drug resistance of *C. glabrata*, is under epigenetic control by Hst1, a nicotinic adenine dinucleotide (NAD⁺) dependent histone deacetylase. We show that the inhibition of Hst1 by NAM, a NAD⁺ precursor, results in increased resistance to fluconazole in *C. glabrata*. Since Hst1 can be inactivated *in vivo*, the loss of silencing mediated by Hst1, could be important for the acquisition of fluconazole resistance during infection.

KEY WORDS. Fluconazole, Silencing, *Candida glabrata*

TWO SUBTELOMERIC GLUTATHIONE PEROXIDASES ARE INVOLVED IN OXIDATIVE STRESS RESPONSE IN *Candida glabrata*

Summary

Three glutathione peroxidase homologs (*CAGLOC01705g*, *CAGLO100264g* and *CAGLO100242g*) were found in *Candida glabrata* genome. By synteny and sequence analysis we named them *GPX2*, *GPX3A* and *GPX3B*, respectively. *GPX3A* and *GPX3B* are two genes which encode 2 highly similar proteins. These two genes are divergently transcribed. *GPX3A* and *GPX3B* are localized 17.5Kb and 20Kb from the left telomere in chromosome I, however we showed that the *GPX3A/GPX3B* loci are not silenced. We investigated the involvement of these genes in the oxidative stress response of *C. glabrata*. The *gpx3AΔ gpx3BΔ* double mutant was sensitive to cumene hydroperoxide. These data suggest that *GPX3A* and *GPX3B* could encode phospholipid glutathione peroxidases involved in scavenging organic hydroperoxides.

KEY WORDS. Glutathione peroxidase, Cumene, *Candida glabrata*

CAPITULO I

LA RESISTENCIA A FLUCONAZOL DE *Candida glabrata* MEDIADA
POR PDR1 Y CDR1 ESTÁ SUJETA A SILENCIAMIENTO LOCAL POR
LA DESACETILASA DE HISTONAS HST1

Introducción.

Candida glabrata es un hongo patógeno oportunista que en las dos últimas décadas ha emergido como la segunda causa más común de infecciones fúngicas. *C. glabrata* se aísla de entre el 20% y el 24% del total de las candidemias (Trick *et al.*, 2002, Pfaller & Diekema, 2007, Pfaller & Diekema, 2010). Esta característica se debe en gran medida a la resistencia innata de *C. glabrata* a las drogas antifúngicas, especialmente a los azoles, y al desarrollo de esta resistencia en respuesta a la exposición al fármaco durante el tratamiento (Perea & Patterson, 2002, Sanglard & Odds, 2002, Sanglard, 2002).

Los azoles son los antifúngicos más comúnmente usados para el tratamiento de infecciones de mucosas y sistémicas. El incremento en la incidencia de infecciones ocasionadas por *C. glabrata* se dio en forma paralela a la introducción de los triazoles en 1990 (Trick *et al.*, 2002). Los azoles inactivan a la enzima P-450 lanosterol 14- α desmetilasa codificada por el gen *ERG11* e inhibe el crecimiento fúngico por la acumulación de esteroides metilados potencialmente tóxicos (Parkinson *et al.*, 1995, Richardson *et al.*, 1990). Se ha documentado que el incremento en la transcripción del gen *ERG11* (CAGL0E04334g) debido a la duplicación del cromosoma E, genera resistencia a fluconazol en *C. glabrata* (Marichal *et al.*, 1997). Sin embargo, el principal mecanismo que confiere resistencia a fluconazol en esta levadura es la sobreexpresión de genes que codifican para bombas transmembranales de las superfamilias ABC (de ATP Binding Cassette) y MFS (Major Facilitator Superfamily), que expulsan activamente el fármaco de la célula (Parkinson *et al.*, 1995, Miyazaki *et al.*, 1998, Sanglard *et al.*, 2001).

La baja susceptibilidad de *C. glabrata* al fluconazol se debe a diferentes factores y uno de ellos es la sobreexpresión de los transportadores tipo ABC Cdr1 y Cdr2 (Sanglard *et al.*, 1999, Miyazaki *et al.*, 1998, Morschhauser, 2010) que dependen del factor transcripcional Pdr1 para su expresión (Vermitsky & Edlind, 2004, Tsai *et al.*, 2006). La sobreexpresión de estos transportadores en *C. glabrata* puede deberse a diferentes alteraciones genéticas, que incluyen: [1] Mutaciones de ganancia de función en el factor transcripcional Pdr1 (Ferrari *et al.*, 2009) [2] Incremento en la dosis génica de los transportadores por amplificación (Polakova *et al.*, 2009) o [3] Mutaciones en el DNA mitocondrial (Ferrari *et al.*, 2011). Sin embargo, hasta el momento no existen reportes que relacionen cambios epigenéticos con adquisición de resistencia al fluconazol, aun cuando estos mecanismos controlan procesos de virulencia en *C. glabrata* como la adherencia (Domergue *et al.*, 2005), la respuesta a estrés oxidativo (datos no publicados del laboratorio) y la adaptación a nichos específicos del hospedero limitantes en niacina (Ma *et al.*, 2009).

En *C. glabrata*, Sir2 es una desacetilasa de histonas dependiente de NAD⁺ que participa en el silenciamiento de genes subteloméricos, algunos de los cuales están implicados en virulencia (De Las Penas *et al.*, 2003, Domergue *et al.*, 2005). *C. glabrata*, al igual que en *Saccharomyces cerevisiae* [levaduras cercanas filogenéticamente] cuenta con cuatro genes parálogos a *SIR2*, denominados *HST1-4* (Homologue of Sir2 por sus siglas en inglés). En ambas levaduras, Hst1 funciona como un corepresor que silencia genes mediante la modificación de la cromatina de manera local impidiendo la activación del promotor. Además, Hst1 controla la homeostasis de NAD⁺ (su propio cofactor) (Bedalov *et al.*, 2003, Robert *et al.*, 2004, Ma *et al.*, 2009), es decir, Hst1 controla su propia actividad. De manera interesante, tenemos evidencia que indica que una cepa mutante *hst1* Δ es altamente resistente a fluconazol (E. Zavalza, datos no publicados), y consistente con esta observación, existe un reporte donde analizaron la expresión de todos los genes del genoma

de *C. glabrata* en ausencia de *HST1* y dentro de la lista de genes que se sobreexpresan, se encuentran los transportadores *CDR1* y *CDR2*, así como el factor transcripcional *PDR1* (Ma et al., 2009). Estos datos sugieren que Hst1 pudiera estar regulando la respuesta pleiotrópica farmacológica de *C. glabrata* a través de la represión de *PDR1*, *CDR1* y/o *CDR2*. Para determinar la participación de Hst1 en la regulación de estos genes en la resistencia a fluconazol, construimos cepas mutantes sencillas *pdr1Δ*, *cdr1Δ* y *cdr2Δ*, y mutantes dobles *hst1Δ pdr1Δ*, *hst1Δ cdr1Δ* y *hst1Δ cdr2Δ*, y evaluamos genéticamente la participación de Hst1 en respuesta al antifúngico. También evaluamos la resistencia a fluconazol al inhibir la actividad de Hst1 en estas cepas en presencia de altas concentraciones de nicotinamida (NAM), un inhibidor específico de la actividad de las sirtuinas. Encontramos que *PDR1* y *CDR1* son los principales efectores involucrados en la resistencia a fluconazol de la cepa CGM1 de *C. glabrata*. En cambio, *CDR2* no participa en esta respuesta. Sin embargo, aún cuando Pdr1 y Cdr1 son esenciales para la resistencia, la pérdida del silenciamiento mediado por Hst1 protege a las cepas hipersensibles *cdr1* y *pdr1*. Esto indica que Hst1 actúa como represor de *PDR1* y *CDR1* pero también sugiere la existencia de otro transportador regulado por Hst1. Además por ensayos de expresión génica semicuantitativa (RT-PCR), se confirmó que la expresión de *CDR1* y *PDR1* se incrementa en ausencia de *HST1* o inhibiendo su actividad con NAM. Nuestros resultados indican que la respuesta pleiotrópica de *C. glabrata* está sujeta a una capa de regulación epigenética local por Hst1.

Resultados.

Generación de cepas mutantes.

Por datos de laboratorio sabemos que una cepa *hst1Δ* de *Candida glabrata* es altamente resistente a fluconazol. En *C. glabrata* la resistencia a azoles es mediada principalmente por los transportadores tipo ABC Cdr1 y Cdr2, así como del factor transcripcional que los regula Pdr1 (Sanglard et al., 1999, Miyazaki et al., 1998, Vermitsky & Edlind, 2004). Para determinar si estos genes están implicados en la resistencia a fluconazol en nuestra cepa de referencia CGM1, construimos mutantes sencillas *pdr1Δ*, *cdr1Δ* y *cdr2Δ* y evaluamos su susceptibilidad a fluconazol. Además, para determinar si la resistencia a fluconazol mediada por Pdr1, Cdr1 y Cdr2 está sujeta a regulación negativa por la desacetilasa de histonas Hst1, construimos también las tres mutantes dobles *pdr1Δ hst1Δ*, *cdr1Δ hst1Δ* y *cdr2Δ hst1Δ*. Las mutantes nulas en estos genes las construimos mediante el reemplazo, por doble recombinación homóloga, del gen silvestre por un producto de fusión de PCR, que consiste de un casete de resistencia a higromicina ($P_{PGK1}::hph::3'_{HIS3}$) flanqueado por dos secuencias homólogas, una de la región 5' y la otra de la región 3' del gen a interrumpir (Ver Materiales y Métodos). De esta forma se construyeron mutantes tanto en el fondo génico de la cepa silvestre como en la mutante *hst1Δ*. Las mutantes se seleccionaron por su resistencia a higromicina y la sustitución se verificó mediante PCR. En total se obtuvieron 6 cepas mutantes: *pdr1Δ*, *cdr1Δ*, *cdr2Δ* y *hst1Δ pdr1Δ*, *hst1Δ cdr1Δ* y *hst1Δ cdr2Δ*, cada una con su duplicado (Figura 1).

PDR1 y CDR1 están involucrados en la resistencia a fluconazol en C. glabrata

Se ha demostrado que la ausencia del factor transcripcional Pdr1, y de los transportadores Cdr1 y Cdr2 hace a *C. glabrata* hipersensible a fluconazol (Sanglard et al., 1999, Miyazaki et al., 1998, Vermitsky & Edlind, 2004). Para determinar si estos genes son responsables también de la resistencia a fluconazol en nuestra cepa de laboratorio CGM1, realizamos

ensayos de resistencia al antifúngico con la cepa silvestre (CGM1), las mutantes *pdr1* Δ (CGM1094), *cdr1* Δ (CGM1096), *cdr2* Δ (CGM1098) y *hst1* Δ (CGM84) La cepa silvestre (wt) fue sensible a partir de 16 μ g/mL de fluconazol, mientras que la mutante *hst1* Δ fue capaz de crecer hasta 64 μ g/mL (Figura 2A). La mutante en el factor transcripcional *PDR1* y la mutante en el transportador *CDR1* fueron sensibles a 2 μ g/mL. Este resultado es consistente con lo que se ha reportado para cepas de *C. glabrata* (Figura 2B) (Sanglard et al., 1999, Vermitsky & Edlind, 2004). La mutante en el gen que codifica para el transportador *CDR2* se comportó igual que la cepa silvestre (Figura 2B). Estos datos indican que *PDR1* y *CDR1* son los principales efectores involucrados en la resistencia a fluconazol en la cepa CGM1 de *C. glabrata* y que Hst1 es un regulador negativo de esta respuesta. Además, Cdr2 no participa en la resistencia a fluconazol o su participación está enmascarada por la actividad de los otros transportadores.

Hst1 regula negativamente la respuesta pleiotrópica farmacológica de C. glabrata

La cepa *hst1* Δ es altamente resistente a fluconazol (Figura 2A) esto sugiere que Hst1 podría ser un represor de la expresión de los genes involucrados en la resistencia multifarmacológica. Dado que *PDR1* y *CDR1* son los principales mediadores de esta respuesta (Figura 2B), nos preguntamos si Hst1 podría regular negativamente a *PDR1* y/o *CDR1*. Decidimos determinar genéticamente el efecto de Hst1 sobre los genes de la respuesta pleiotrópica farmacológica (*PDR1* y *CDR1*). Para esto realizamos ensayos de resistencia a fluconazol con las mutantes sencillas *pdr1* Δ (CGM1094), *cdr1* Δ (CGM1096) y las dobles mutantes *hst1* Δ *pdr1* Δ (CGM1117), *hst1* Δ *cdr1* Δ (CGM1207). También hicimos este experimento inhibiendo la actividad de Hst1 en presencia de 10 mM de NAM para simular la pérdida del silenciamiento mediado por Hst1. La cepa silvestre (wt) incrementó su resistencia a fluconazol en presencia de NAM, de 4 μ g/mL a 64 μ g/mL (Figura 3A). Esto sugiere que la inhibición de Hst1 con NAM, desreprime genes implicados en la adquisición de resistencia a fluconazol. La adición de NAM no incrementó la resistencia a fluconazol de la cepa *hst1* Δ de 64 μ g/mL (Figura 3A), es decir, este dato indica que la resistencia de la cepa silvestre a fluconazol en presencia de NAM se puede deber a la inhibición de Hst1 y no por la inhibición de otra sirtuina.

FIGURA 1.

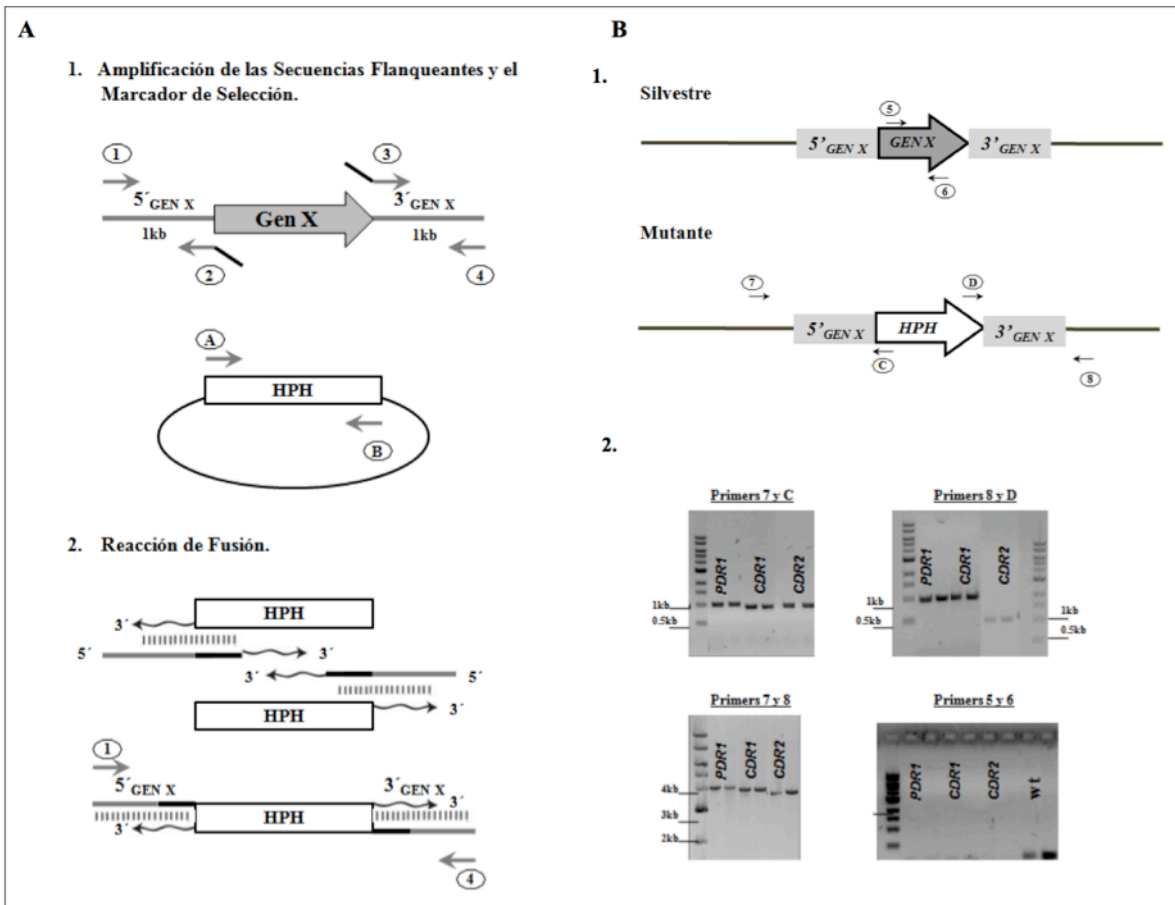


Fig. 1. Construcción de mutantes por reemplazo génico de un solo paso mediante PCR de fusión. (A) La PCR de fusión consistió en 2 rondas de PCR. En la primera ronda (A1), se amplificó a partir de DNA genómico las regiones 5' y 3' del gen a interrumpir: se usaron los oligonucleótidos 1 y 2 para amplificar la secuencia 5', los oligonucleótidos 3 y 4 para la región 3' y los oligonucleótidos A y B para amplificar el marcador de selección (*hph*). En negro se señalan los extremos de los oligonucleótidos 2 y 3 que contienen secuencias complementarias al marcador de selección y que son utilizados como cebadores para fusionar los 3 fragmentos en la segunda ronda de PCR. En la segunda ronda de PCR (A2), se fusionan los 3 fragmentos generados en la primera ronda: los 3 fragmentos se fusionan en una reacción de PCR con los oligonucleótidos 1 y 4. (B) Diagnóstico de las mutantes por PCR. El correcto reemplazo se verificó al 5' con los oligonucleótidos 7 y C, mientras que al 3' con los oligonucleótidos 8 y D (B1). La ausencia del gen en las cepas mutantes se determinó con la pareja de oligonucleótidos internos al gen, 5 y 6 (B1). Finalmente, el reemplazo del gen silvestre se confirmó con los oligonucleótidos 7 y 8 (B1). Análisis por PCR de las mutantes (B2).

FIGURA 2.

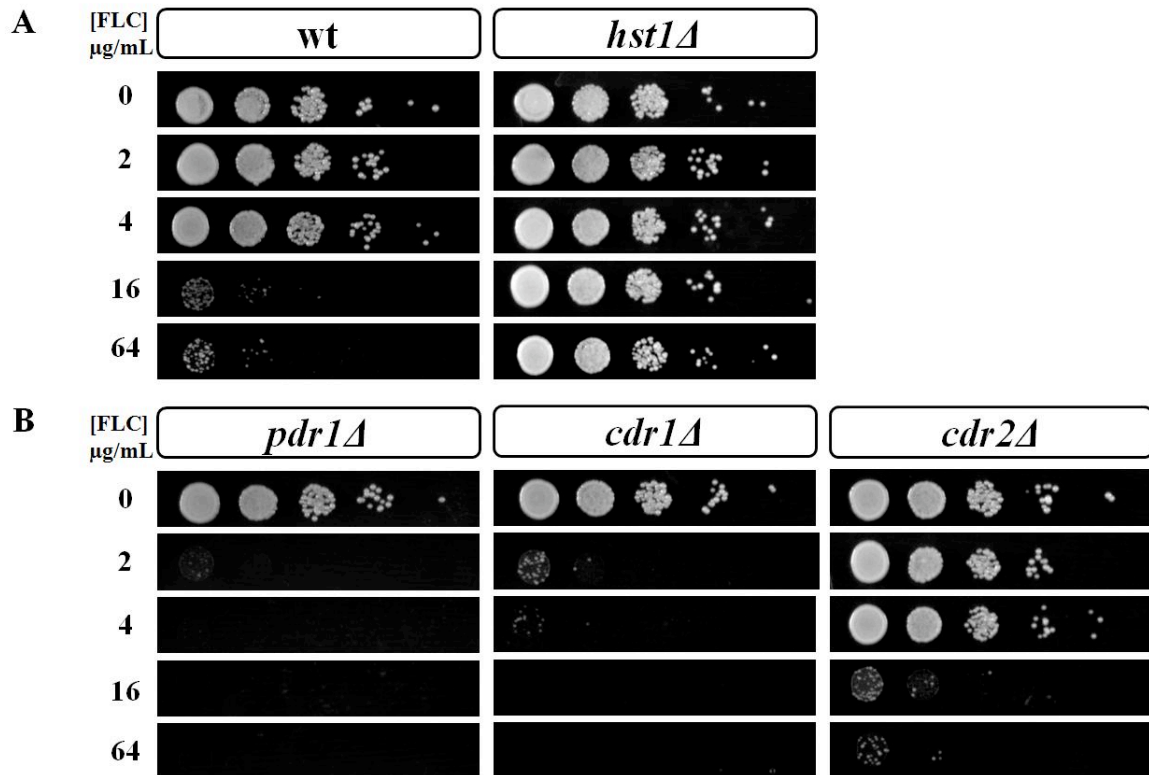


Fig. 2. *PDR1* y *CDR1* son los principales efectores del fenotipo de resistencia a fluconazol de *C. glabrata* CGM1. Ensayo de sensibilidad a fluconazol en el tratamiento crónico de la cepa silvestre y las mutantes *hst1Δ*, *pdr1Δ*, *cdr1Δ* y *cdr2Δ*. Cultivos saturados en fase estacionaria de las cepas CGM1 (WT) y las mutantes *hst1Δ* (CGM84), *pdr1Δ* (CGM1094), *cdr1Δ* (CGM1096) y *cdr2Δ* (CGM1098) de *C. glabrata*, se diluyeron a OD_{600nm} de 0.5 en agua destilada. Se hicieron diluciones logarítmicas seriadas y se inocularon en medio rico YPD con diferentes concentraciones (0 a 64 μg/mL) de fluconazol. Las cajas se incubaron a 30°C durante 2 días (ver Materiales y Metodos). La cepa silvestre es sensible a 16μg/mL de fluconazol mientras que la cepa *hst1Δ* puede crecer hasta 64 μg/mL. Tanto la cepa que carece del factor transcripcional *PDR1* como la que carece del transportador *CDR1* son sensibles a 2 μg/mL del antifúngico. Y la cepa mutante en el transportador *CDR2* se comporta como la cepa silvestre.

De forma interesante, las mutantes *pdr1Δ* y *cdr1Δ* que son sensibles a una concentración baja de fluconazol [2μg/mL] (Figuras 2B y 3), en ausencia de Hst1 o en presencia de NAM en el medio, incrementa ligeramente su resistencia a fluconazol, a 4μg/mL (Figura 3). Esto indica que la ausencia o la inhibición de Hst1 causa la desrepresión de *PDR1* y *CDR1* pero también de genes adicionales que participan en la respuesta pleiotrópica farmacológica. Estos datos también sugieren que Pdr1 pudiera transcribir con mayor facilidad a sus genes blanco en ausencia de la represión mediada por Hst1. Estos datos genéticos que describen a Hst1 como un regulador negativo de la expresión de *PDR1* y *CDR1* se confirmaron mediante el análisis de los transcritos de estos genes por medio RT-PCR. Ambos genes, principalmente *CDR1*, se inducen en ausencia del silenciamiento mediado por Hst1 o en presencia de NAM (Figura S1, J. Juárez, datos no publicados). En resumen, estos datos indican que Hst1 actúa como represor tanto del factor transcripcional *PDR1* como del transportador *CDR1* y la ausencia de represión da como resultado el incremento de la resistencia de la cepa silvestre a fluconazol.

Materiales y métodos

Cepas y condiciones de crecimiento.

La cepa de *Escherichia coli* y todas las cepas de *C. glabrata* utilizadas en este estudio están descritas en la Tabla 1. Los cultivos de *C. glabrata* se hicieron en YPD (del inglés *Yeast extract-Peptone-Dextrose*) que contiene extracto de levadura al 1%, peptona al 2%, glucosa al 2% y 25mg/L de uracilo (Sigma Aldrich®). El medio YPG para identificar las mutantes petite, es igual que YPD pero se substituye la glucosa por 3% de glicerol. Para el medio de selección con higromicina (A. G. Scientific®), se agregó al medio el antibiótico a una concentración final de 440μg/mL. Para medio sólido, se agregó 2% de agar. Las cepas de *C. glabrata* se resguardaron en glicerol al 15% a -80°C.

Construcción de mutantes

Para generar los fragmentos para construir las mutantes en los genes *PDR1*, *CDR1* y *CDR2* de *C. glabrata*, se realizó una PCR de fusión. La estrategia de PCR de fusión está descrita en la figura 1 y los oligonucleótidos utilizados están descritos en la tabla 2. Los fragmentos para hacer las mutantes se construyeron de la siguiente manera: la primera ronda de PCR se llevó a cabo en 30μl de volumen final con 0.3μl de polimerasa *Phusion* de Finnzymes®, 1X de Buffer HF, 100nM de cada oligonucleótido, y 400μM de dNTPs y de templado. El templado para las secuencias flanqueantes de *PDR1*, *CDR1* y *CDR2* fue DNA genómico de la cepa CGM1 y el templado para el marcador de higromicina (*P_{PGK1}::hph::3' HIS3*) fue el plásmido pAP599. La reacción de PCR se realizó de la siguiente manera: 98°C por 1min 15seg; 25 ciclos de 98°C por 10seg, 61°C por 30seg, 72°C por 15seg y finalmente 72°C por 5min. Las secuencias flanqueantes y el casete de higromicina se purificaron por QIAquick gel extraction kit (Qiagen®). La reacción de fusión se llevó a cabo en 30μl de volumen final con 0.5μl de polimerasa *Expand Long Template PCR System* de Roche®, 1X de Buffer 3, 500nM de cada

FIGURA 3.

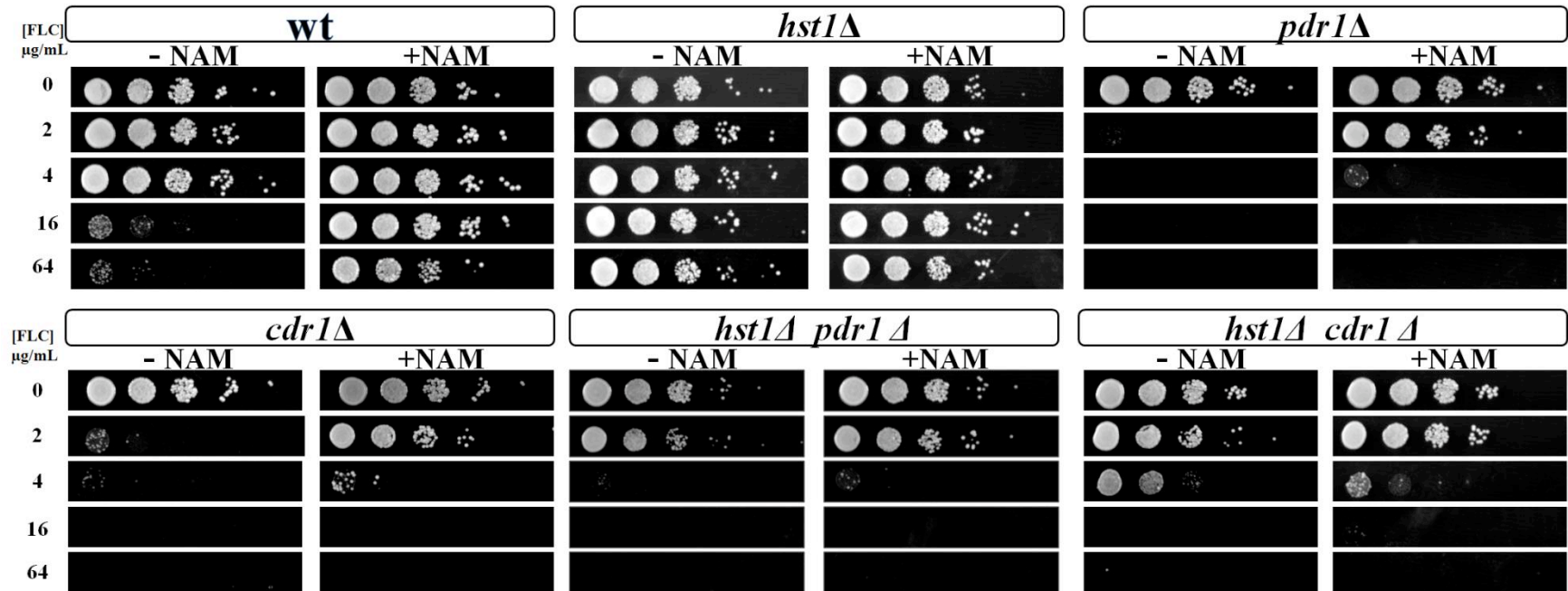


Fig. 3. La ausencia o inhibición de la actividad de Hst1 incrementa la resistencia a fluconazol de la cepa silvestre y de las mutantes *pdr1Δ* y *cdr1Δ*. Ensayo de sensibilidad a fluconazol de la cepa silvestre, *pdr1Δ* y *cdr1Δ* en ausencia e inhibición de Hst1. Diluciones seriadas de cultivos saturados de las cepas CGM1 (WT), *hst1Δ* (CGM84), *pdr1Δ* (CGM1094), *cdr1Δ* (CGM1096), *hst1Δ/pdr1Δ* (CGM1117) y *hst1Δ/cdr1Δ* (CGM1207) de *C. glabrata* se inocularon en YPD con diferentes concentraciones de fluconazol (-NAM). Para inhibir la actividad de Hst1 se agregó NAM al medio a una concentración final de 10mM. Las cajas se incubaron a 30°C durante 2 días.

oligonucleótido, y 350 μ M de dNTPs. Para la reacción de PCR de fusión, los templados se utilizaron en proporción 2:1 (2X del fragmento del marcador de resistencia y 1X de cada uno de los fragmentos del 5' y del 3'). La temperatura de reacción fueron: 93°C por 3min, 10 ciclos de 93°C por 10seg, 58°C por 30seg, y 68°C por 2min 30seg, seguidos de 20 ciclos de 93°C por 15seg, 58°C por 30seg, 68°C por 2min 30 seg mas 20 seg de incremento cada ciclo. La extensión final se realizó a 68°C por 7min y el fragmento se purificó para después transformar la cepa silvestre CGM1 o la mutante *hst1 Δ* de *C. glabrata*. El diagnóstico de la correcta interrupción de los genes *PDR1*, *CDR1* y *CDR2*, se realizó por PCR. Para verificar las regiones 5' y 3', se utilizaron oligonucleótidos que hibridan ya sea al 5' o al 3', externos a la secuencia utilizada para generar los fragmentos (oligonucleótidos 7 y 8, Figura 1B) y dos oligonucleótidos que hibridan en el casete de resistencia con dirección hacia afuera del casete (C y D).

Transformación genética de C. glabrata.

Para transformar la cepa de *C. glabrata* con los fragmentos generados por PCR de fusión, se utilizó una modificación del método de transformación con acetato de litio (LiAcO) (Gietz *et al.*, 1992). Cada cepa a transformar se creció en medio YPD durante la noche. Al día siguiente, se transfirieron 0,3mL de este inóculo a 30mL de YPD fresco (dilución 1:100) y se incubó con agitación hasta alcanzar una OD₆₀₀ de 0,8-1,0. Las células se colectaron por centrifugación y se lavaron con un volumen equivalente de agua estéril. Posteriormente, se concentraron 100 veces en LiAcO 100mM y se dividieron en alícuotas de 50 μ L c/u. Para cada transformación, a una alícuota de células se le añadieron 240 μ L de polietilenglicol (PEG) 50% Fluka Biochemica® (PM 400 y concentración final ~30%), 36 μ L de LiAcO 1M (concentración final ~90mM), 25 μ L de DNA acarreador de cadena sencilla (Invitrogen® 2mg/mL) desnaturalizado por calor (concentración final ~125ng/ μ L) y el fragmento generado por PCR de fusión, suspendido en un volumen de 50 μ L de Tris 10mM. La mezcla se incubó a 30°C por 45min, después se le agregaron 43 μ L de DMSO y se sometió a choque térmico por 15min a 42°C. Por último, las células se centrifugaron para retirar el PEG y se suspendieron 1mL de YPD y se recuperaron por 4h a 30°C. Al término de este periodo, se sembraron en cajas de YPD-Hyg. Las cajas se incubaron a 30°C, por 48 horas. Se eligieron en promedio 8 colonias de cada transformante y se purificaron dos veces en cajas de YPD-Hyg. Se estriaron en medio YPG para analizar su capacidad de utilizar glicerol como fuente de carbono no fermentable y de este modo descartar las cepas que tengan alterada su función mitocondrial (*petite*). Posteriormente, se extrajo DNA genómico y se diagnosticó por PCR la modificación genética correspondiente (ver arriba).

Reacción en cadena de la polimerasa de transcripción inversa (RT-PCR)

El RNA de células de fase estacionaria se extrajo con el reactivo TRIzol de Invitrogen® de acuerdo con las instrucciones del fabricante y se trató con DNasa I de Sigma-Aldrich®. La síntesis de cDNA y la reacción de PCR se llevó a cabo con AccessQuick reverse transcription-PCR (RT-PCR) system de Promega®. Los oligonucleótidos para la reacción de transcriptasa reversa (RT) se describen en la Tabla 2. La síntesis del cDNA se llevó a cabo a 58°C durante 20 min. Para la reacción de PCR se utilizó una temperatura de alineamiento de 58°C durante 25 ciclos. Una mezcla de reacción sin transcriptasa reversa se incluyó como control negativo para descartar contaminación por DNA.

LISTA DE TABLAS

TABLA 1. Cepas usadas en este estudio

Cepas de <i>E. coli</i>		Referencia
Cepa	Genotipo	
DH10B	<i>F-mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC)</i> <i>Φ80d/lacZΔM15ΔlacX74 deoR recA1</i> <i>endA1 araD139 Δ(ara, leu)7697 galU</i> <i>galk λ- rpsL nupG</i>	(Calvin and Hanawalt, 1988)

Cepas de <i>Candida glabrata</i>			
Cepa	Parental	Genotipo	
BG2	—	Aislado clínico (Cepa B)	(Fidel <i>et al.</i> , 1996)
BG14 wt	BG2	<i>ura3Δ::Tn903 G418^R</i>	(Cormack & Falkow, 1999)
CGM84 <i>hst1Δ</i>	BG14	<i>ura3Δ::Tn903 G418^R</i> <i>hst1Δ</i>	Colección del laboratorio.
CGM1094 <i>pdr1Δ</i>	BG14	<i>ura3Δ::Tn903 G418^R</i> <i>pdr1Δ::hph</i> <i>Hyg^R</i>	Este trabajo.
CGM1096 <i>cdr1Δ</i>	BG14	<i>ura3Δ::Tn903 G418^R</i> <i>cdr1Δ::hph</i> <i>Hyg^R</i>	Este trabajo.
CGM1098 <i>cdr2Δ</i>	BG14	<i>ura3Δ::Tn903 G418^R</i> <i>cdr2Δ::hph</i> <i>Hyg^R</i>	Este trabajo.
CGM1117 <i>hst1Δ/pdr1Δ</i>	CGM84	<i>ura3Δ::Tn903 G418^R</i> <i>hst1Δ/pdr1Δ::hph Hyg^R</i>	Este trabajo.
CGM1207 <i>hst1Δ/cdr1Δ</i>	CGM84	<i>ura3Δ::Tn903 G418^R</i> <i>hst1Δ/cdr1Δ::hph Hyg^R</i>	Este trabajo.
CGM1209 <i>hst1Δ/cdr2Δ</i>	CGM84	<i>ura3Δ::Tn903 G418^R</i> <i>hst1Δ/cdr2Δ::hph Hyg^R</i>	Este trabajo.

TABLA 2. Plásmidos usados en este estudio

Plásmido	Genotipo	
pAP599	Vector de clonación con un casete de resistencia a higromicina, flanqueado por dos secuencia repetidas directas, <i>FRT</i> . [<i>FRT-P_{PGK}::hph::(3' UTR_{HIS3})-FRT</i>]; <i>URA3 Hyg^R</i> <i>Amp^R</i> .	Colección del laboratorio.

TABLA 2. Oligonucleótidos usados en este estudio

Nombre	Secuencia	Numero
<i>PDR1 A</i>	GACTCACTATAGGGCGAATTGG	165
<i>PDR1 B</i>	CCTTTAGTGAGGGTTAATTCCGA	166
<i>PDR1 C</i>	CGATAAGAGGCCACGTGCTTTATG	15
<i>PDR1 D</i>	AGAAATACGCACGAACACGATATAGAGG	16
<i>PDR11</i>	GGAGCTCCAATTCGCCCTATAGTGAGTCTCTCAATAACGTAGCTAAAGAATGAC	736
<i>PDR12</i>	CTTGCACGAGTATCATAACGC	737
<i>PDR13</i>	TTGTTCCCTTTAGTGAGGGTTAATTCAGACAGTGTGCATAGCCTGTA	739
<i>PDR14</i>	GGCAATGAATGTGGTGAAATAG	740
<i>PDR15</i>	CGCCATTGAGTTACAACCTAG	742
<i>PDR16</i>	CAAGACTAAATCCCACTCTCC	743
<i>PDR17</i>	TTCAGCAATTTCTAGTCTCTGC	738
<i>PDR18</i>	GTTGAATCCAGAAGATTCACAG	741
<i>CDR11</i>	GGAGCTCCAATTCGCCCTATAGTGAGTCTGTTACTTTTCTTTACTTTGTATATATCAAGAG	744
<i>CDR12</i>	CGCGTAATAGGACTGCAAAG	745
<i>CDR13</i>	TTGTTCCCTTTAGTGAGGGTTAATTCGCTCATAATCTGGCTCTGGTA	747
<i>CDR14</i>	GTTATCTGGTAAATCAGCAGG	748
<i>CDR15</i>	GTATTGGTCTGGCCTATGTG	750
<i>CDR16</i>	GGCTTCAGATTGAGATAAACC	751
<i>CDR17</i>	GGAAAGGATGAGTAGAAATCG	746
<i>CDR18</i>	TTGTGAATACAAACAAGTTGTCC	749
<i>CDR21</i>	GGAGCTCCAATTCGCCCTATAGTGAGTCACTGAGGTGAGCTGAGTGG	752
<i>CDR22</i>	GAACTATCCAATACCAGAGC	753
<i>CDR23</i>	TTGTTCCCTTTAGTGAGGGTTAATTCGCATCAGAATTCAGTGACGTTTAG	755
<i>CDR24</i>	GGCCAATTTGTACAAGGG	756
<i>CDR25</i>	AACAGCGATGAGTTCTCCAG	758
<i>CDR26</i>	AAGTGCTCTGGTATGACACATC	759
<i>CDR27</i>	CGACAACATGATAGCACAAAC	754
<i>CDR28</i>	CGAAAGACTGTCTTGTGCGATG	757

La secuencia en negritas hibridan en el marcador de resistencia a higromicina

Discusión

La emergencia de *C. glabrata* como agente fúngico de importancia médica está asociado a la adquisición de resistencia a los compuestos azólicos como el fluconazol. La resistencia al fluconazol se debe a varios factores, uno de ellos es la transcripción de los genes *CDR1* y *CDR2* que codifican proteínas de pared encargadas de expulsar el fármaco de la célula (Bennett *et al.*, 2004, Sanglard *et al.*, 2001). La expresión de *CDR1* y *CDR2* está regulada por el factor transcripcional Pdr1 (Thakur *et al.*, 2008, Tsai *et al.*, 2006). Algunos de los aislados clínicos de *C. glabrata* resistentes a fluconazol, sobreexpresan estos transportadores *CDR1* y *CDR2* y en menor medida *SNQ2* (Torelli *et al.*, 2008, Tsao *et al.*, 2009, Wada *et al.*, 2002). El aumento en la expresión de los transportadores tipo ABC y la subsecuente adquisición de resistencia a fluconazol se debe a mutaciones de ganancia de función en el factor transcripcional Pdr1 (Ferrari *et al.*, 2009), al incremento en la dosis génica de los transportadores por amplificación (Polakova *et al.*, 2009) o mutaciones en el DNA mitocondrial (Ferrari *et al.*, 2011).

Sin embargo, hasta el momento no existen reportes que indiquen la participación de mecanismos epigenéticos que regulen la respuesta pleiotrópica farmacológica de *C. glabrata*. Los cambios epigenéticos les confieren a las poblaciones la capacidad de generar variabilidad sin la necesidad de comprometer la integridad del genoma. Está documentado que en microorganismos patógenos existen mecanismos de regulación epigenética que les confieren mayor capacidad de adaptación y de virulencia. Tal es el caso de *Trypanosoma brucei* y *Plasmodium falcifarum* que evaden la respuesta inmune del hospedero mediante la variación antigénica de las proteínas de superficie celular, a través de la expresión de una variante antigénica y del silenciamiento de las otras (Tonkin *et al.*, 2009, Chaves *et al.*, 1999). En *C. glabrata* existe una regulación epigenética similar en donde Sir2, una sirtuina dependiente de NAD⁺ silencia genes teloméricos. La ausencia de Sir2 o su inhibición confiere a *C. glabrata* mayor capacidad de adherirse a células epiteliales; característica que está asociada a una mayor virulencia de la levadura (Domergue *et al.*, 2005).

Hst1 es un sirtuina paróloga a Sir2, pero a diferencia de Sir2, Hst1 actúa como un represor local de genes (Ma *et al.*, 2009). Al igual que Sir2, Hst1 requiere de NAD⁺ para llevar a cabo su función enzimática de desacetilasa de histonas. La actividad de Hst1 puede inhibirse a baja concentración de ácido nicotínico (NA) o por una elevada concentración de NAM, un precursor del NAD⁺. Cuando Hst1 se inactiva, se promueve la expresión de sus genes blanco, como los transportadores transmembranales de niacina, *TNA1*, *TNR1* y *TNR2* (Ma *et al.*, 2009). En este trabajo demostramos que la inhibición de Hst1 por NAM, también incrementa la expresión de *PDR1* y *CDR1*, genes efectores de la respuesta pleiotrópica farmacológica de *C. glabrata*. La posible relevancia de esta regulación radica en que la actividad de Hst1 se inhibe en bajas concentraciones de NA *in vivo* (Ma *et al.*, 2009), como en las vías urinarias del hospedero. Es posible que en esta condición, además de sobreexpresarse los transportadores de niacina *TNR1* y *TNR2*, también se desrepriman *PDR1* y *CDR1*, que tendría como efecto incrementar la resistencia de *C. glabrata* a xenobióticos. Consistente con esta observación, nosotros demostramos que la ausencia o la inhibición de Hst1 incrementa la resistencia a fluconazol y esta resistencia está mediada por Pdr1 y Cdr1 y posiblemente por otros transportadores.

Nosotros proponemos que Hst1 podría funcionar como un detector central de señales del medio ambiente para después responder y adaptarse a las nuevas condiciones. Como ejemplo, la baja concentración de NA del medio es la señal que provoca la inhibición de la actividad de las sirtuinas, entre ellas Sir2 y Hst1. En ausencia de estas sirtuinas activas se remodela el perfil de expresión génica para responder de manera eficaz ante las nuevas condiciones del ambiente en el hospedero. Así, la expresión de genes controlados negativamente por Sir2 y Hst1, podría ocurrir y permitir la adaptación al medio, el adherirse al epitelio y resistir a los antifúngicos.

REFERENCIAS

- Bedalov, A., M. Hirao, J. Posakony, M. Nelson & J. A. Simon, (2003) NAD⁺-dependent deacetylase Hst1p controls biosynthesis and cellular NAD⁺ levels in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* 23: 7044-7054.
- Bennett, J. E., K. Izumikawa & K. A. Marr, (2004) Mechanism of increased fluconazole resistance in *Candida glabrata* during prophylaxis. *Antimicrob Agents Chemother* 48: 1773-1777.
- Cormack, B. P. & S. Falkow, (1999) Efficient homologous and illegitimate recombination in the opportunistic yeast pathogen *Candida glabrata*. *Genetics* 151: 979-987.
- Chaves, I., G. Rudenko, A. Dirks-Mulder, M. Cross & P. Borst, (1999) Control of variant surface glycoprotein gene-expression sites in *Trypanosoma brucei*. *Embo J* 18: 4846-4855.
- De Las Penas, A., S. J. Pan, I. Castano, J. Alder, R. Cregg & B. P. Cormack, (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.
- Domergue, R., I. Castano, A. De Las Penas, M. Zupancic, V. Locketell, J. R. Hebel, D. Johnson & B. P. Cormack, (2005) Nicotinic acid limitation regulates silencing of *Candida adhesins* during UTI. *Science* 308: 866-870.
- Ferrari, S., F. Ischer, D. Calabrese, B. Posteraro, M. Sanguinetti, G. Fadda, B. Rohde, C. Bauser, O. Bader & D. Sanglard, (2009) Gain of function mutations in CgPDR1 of *Candida glabrata* not only mediate antifungal resistance but also enhance virulence. *PLoS Pathog* 5: e1000268.
- Ferrari, S., M. Sanguinetti, F. De Bernardis, R. Torelli, B. Posteraro, P. Vandeputte & D. Sanglard, (2011) Loss of mitochondrial functions associated with azole resistance in *Candida glabrata* also results in enhanced virulence in mice. *Antimicrob Agents Chemother*.
- Fidel, P. L., Jr., J. L. Cutright, L. Tait & J. D. Sobel, (1996) A murine model of *Candida glabrata* vaginitis. *J Infect Dis* 173: 425-431.
- Gietz, D., A. St Jean, R. A. Woods & R. H. Schiestl, (1992) Improved method for high efficiency transformation of intact yeast cells. *Nucleic Acids Res* 20: 1425.
- Ma, B., S. J. Pan, R. Domergue, T. Rigby, M. Whiteway, D. Johnson & B. P. Cormack, (2009) High affinity transporters for NAD⁺ precursors in *Candida glabrata* are regulated by Hst1p and induced in response to niacin limitation. *Mol Cell Biol*.
- Marichal, P., H. Vanden Bossche, F. C. Odds, G. Nobels, D. W. Warnock, V. Timmerman, C. Van Broeckhoven, S. Fay & P. Mose-Larsen, (1997) Molecular biological

- characterization of an azole-resistant *Candida glabrata* isolate. *Antimicrob Agents Chemother* 41: 2229-2237.
- Miyazaki, H., Y. Miyazaki, A. Geber, T. Parkinson, C. Hitchcock, D. J. Falconer, D. J. Ward, K. Marsden & J. E. Bennett, (1998) Fluconazole resistance associated with drug efflux and increased transcription of a drug transporter gene, PDH1, in *Candida glabrata*. *Antimicrob Agents Chemother* 42: 1695-1701.
- Morschhauser, J., (2010) Regulation of multidrug resistance in pathogenic fungi. *Fungal Genet Biol* 47: 94-106.
- Parkinson, T., D. J. Falconer & C. A. Hitchcock, (1995) Fluconazole resistance due to energy-dependent drug efflux in *Candida glabrata*. *Antimicrob Agents Chemother* 39: 1696-1699.
- Perea, S. & T. F. Patterson, (2002) Antifungal resistance in pathogenic fungi. *Clin Infect Dis* 35: 1073-1080.
- Pfaller, M. A. & D. J. Diekema, (2007) Epidemiology of invasive candidiasis: a persistent public health problem. *Clin Microbiol Rev* 20: 133-163.
- Pfaller, M. A. & D. J. Diekema, (2010) Epidemiology of invasive mycoses in North America. *Crit Rev Microbiol* 36: 1-53.
- Polakova, S., C. Blume, J. A. Zarate, M. Mentel, D. Jorck-Ramberg, J. Stenderup & J. Piskur, (2009) Formation of new chromosomes as a virulence mechanism in yeast *Candida glabrata*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106: 2688-2693.
- Richardson, K., K. Cooper, M. S. Marriott, M. H. Tarbit, P. F. Troke & P. J. Whittle, (1990) Discovery of fluconazole, a novel antifungal agent. *Rev Infect Dis* 12 Suppl 3: S267-271.
- Robert, F., D. K. Pokholok, N. M. Hannett, N. J. Rinaldi, M. Chandy, A. Rolfe, J. L. Workman, D. K. Gifford & R. A. Young, (2004) Global position and recruitment of HATs and HDACs in the yeast genome. *Mol Cell* 16: 199-209.
- Sanglard, D., (2002) Clinical relevance of mechanisms of antifungal drug resistance in yeasts. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 20: 462-469; quiz 470, 479.
- Sanglard, D., F. Ischer & J. Bille, (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.
- Sanglard, D., F. Ischer, D. Calabrese, P. A. Majcherczyk & J. Bille, (1999) The ATP binding cassette transporter gene CgCDR1 from *Candida glabrata* is involved in the resistance of clinical isolates to azole antifungal agents. *Antimicrob Agents Chemother* 43: 2753-2765.
- Sanglard, D. & F. C. Odds, (2002) Resistance of *Candida* species to antifungal agents: molecular mechanisms and clinical consequences. *Lancet Infect Dis* 2: 73-85.
- Thakur, J. K., H. Arthanari, F. Yang, S. J. Pan, X. Fan, J. Breger, D. P. Frueh, K. Gulshan, D. K. Li, E. Mylonakis, K. Struhl, W. S. Moye-Rowley, B. P. Cormack, G. Wagner & A. M. Naar, (2008) A nuclear receptor-like pathway regulating multidrug resistance in fungi. *Nature* 452: 604-609.
- Tonkin, C. J., C. K. Carret, M. T. Duraisingh, T. S. Voss, S. A. Ralph, M. Hommel, M. F. Duffy, L. M. Silva, A. Scherf, A. Ivens, T. P. Speed, J. G. Beeson & A. F. Cowman, (2009) Sir2 paralogues cooperate to regulate virulence genes and antigenic variation in *Plasmodium falciparum*. *PLoS Biol* 7: e84.
- Torelli, R., B. Posteraro, S. Ferrari, M. La Sorda, G. Fadda, D. Sanglard & M. Sanguinetti, (2008) The ATP-binding cassette transporter-encoding gene CgSNQ2 is

- contributing to the CgPDR1-dependent azole resistance of *Candida glabrata*. *Mol Microbiol* 68: 186-201.
- Trick, W. E., S. K. Fridkin, J. R. Edwards, R. A. Hajjeh & R. P. Gaynes, (2002) Secular trend of hospital-acquired candidemia among intensive care unit patients in the United States during 1989-1999. *Clin Infect Dis* 35: 627-630.
- Tsai, H. F., A. A. Krol, K. E. Sarti & J. E. Bennett, (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.
- Tsao, S., F. Rahkhoodae & M. Raymond, (2009) Relative contributions of the *Candida albicans* ABC transporters Cdr1p and Cdr2p to clinical azole resistance. *Antimicrob Agents Chemother* 53: 1344-1352.
- Vermitsky, J. P. & T. D. Edlind, (2004) Azole resistance in *Candida glabrata*: coordinate upregulation of multidrug transporters and evidence for a Pdr1-like transcription factor. *Antimicrob Agents Chemother* 48: 3773-3781.
- Wada, S., M. Niimi, K. Niimi, A. R. Holmes, B. C. Monk, R. D. Cannon & Y. Uehara, (2002) *Candida glabrata* ATP-binding cassette transporters Cdr1p and Pdh1p expressed in a *Saccharomyces cerevisiae* strain deficient in membrane transporters show phosphorylation-dependent pumping properties. *J Biol Chem* 277: 46809-46821.

Datos Suplementarios
FIGURA S1.

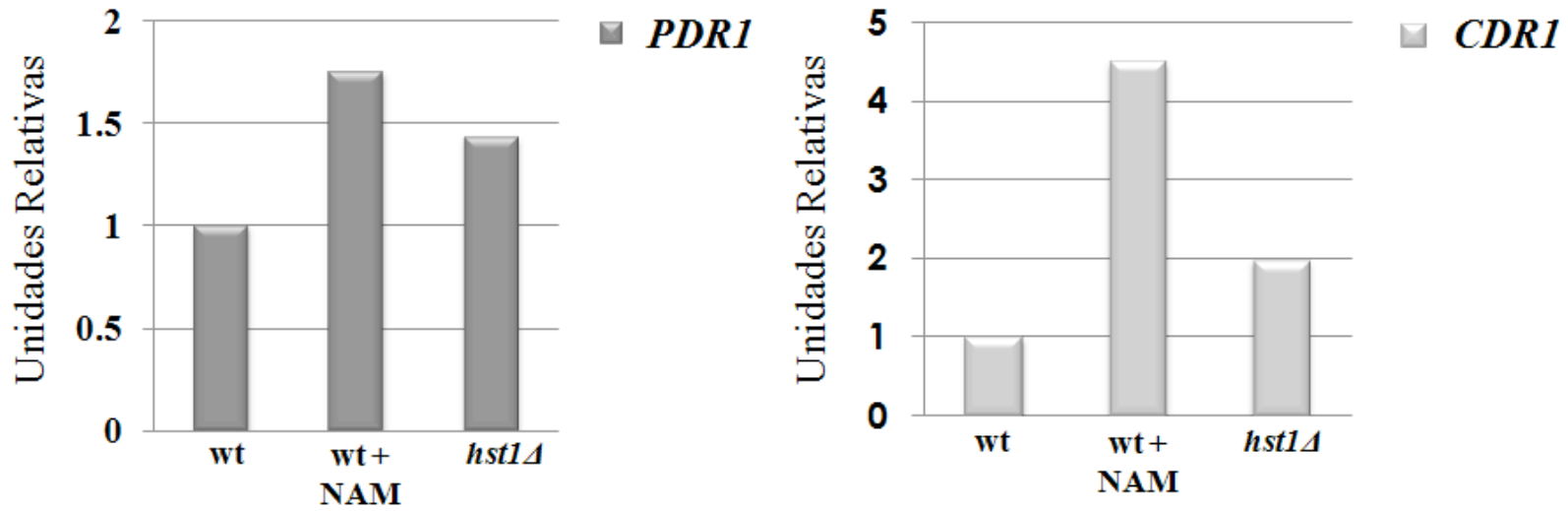


Fig. S1. Hst1 regula negativamente la expresión del factor transcripcional *PDR1* y del transportador *CDR1*. Ensayo de expresión génica semi-cuantitativa (RT-PCR) para medir los niveles de los transcritos de los genes *PDR1* y *PDR5* en ausencia de Hst1 (*hst1 Δ*) o en presencia de 10 mM de NAM. (J Juárez, datos no publicados)

CAPITULO II

PARTICIPACIÓN DE DOS GLUTATIÓN PEROXIDASAS SUBTELOMÉRICAS EN LA RESPUESTA A ESTRÉS OXIDANTE DE *Candida glabrata*

Introducción

Las Especies Ractivas de Oxígeno (ERO); como el anión superóxido ($O_2^{\bullet -}$), el radical hidroxilo (OH^{\bullet}) y el peróxido de hidrogeno (H_2O_2) son subproductos de la respiración aerobia que en cantidades excesivas dañan todas las biomoléculas (Cadenas & Davies, 2000). Como respuesta a esta desventaja del metabolismo aerobio, las células han desarrollado mecanismos enzimáticos (catalasa, superóxido dismutasas, y glutatión peroxidasas) y no enzimáticos (glutatión), para contrarrestar los efectos deletéreos de las ERO y preservar el estado oxidoreductor fisiológico (Scandalios, 2005). En mamíferos, la primera línea de defensa en contra de las infecciones fúngicas son las células fagocíticas (Lyman & Walsh, 1994). Tras la fagocitosis, las células polimorfonucleares generan ERO para eliminar a los patógenos invasores. Sin embargo, los patógenos han adaptado sus mecanismos antioxidantes para evadir el estallido respiratorio de los fagocitos y sobrevivir en el hospedero (Hamilton & Holdom, 1999).

Candida glabrata es un hongo patógeno oportunista que en los últimos años ha emergido como el segundo agente causal de las candidemias (Pfaller & Diekema, 2010). Se han identificado algunos factores implicados en la virulencia de este patógeno, como la capacidad de adherirse a células epiteliales (De Las Penas *et al.*, 2003, Domergue *et al.*, 2005), su elevada resistencia a azoles (Ferrari *et al.*, 2009, Sanglard *et al.*, 1999), y algunos componentes de su respuesta a estrés oxidante (Saijo *et al.*, 2010, Cuellar-Cruz *et al.*, 2009, Roetzer *et al.*, 2011).

Se ha descrito que *C. glabrata* cuenta con una sola catalasa involucrada en la depuración de H_2O_2 en fase de crecimiento estacionario y logarítmico (Cuellar-Cruz *et al.*, 2009). Además, existen dos superóxido dismutasas codificadas en el genoma de esta levadura (*SOD1* y *SOD2*) y se ha demostrado que Sod1 es necesaria para contrarrestar el estrés generado por $O_2^{\bullet -}$ (Roetzer *et al.*, 2011). En cuanto a mecanismos no-enzimáticos, *C. glabrata* sintetiza glutatión para amortiguar el daño oxidante y en reportes recientes se ha demostrado que este compuesto es esencial (Yadav *et al.*, 2011). Así mismo, el glutatión es necesario para la reducción de las glutatión peroxidasas (Carmel-Harel & Storz, 2000), sin embargo, hasta el momento no se ha descrito la presencia de estas enzimas en *C. glabrata*. Las glutatión peroxidasas están distribuidas en todos los organismos vivos y se sabe que tienen aún mayor afinidad por el H_2O_2 que la catalasa (Jacob *et al.*, 1965).

En este trabajo nos preguntamos si *C. glabrata* cuenta con genes que codifican para glutatión peroxidasas y si estos genes son funcionales. Encontramos que *C. glabrata* tiene 3 genes ortólogos a *S.c. GPX2* y *S.c. GPX3* de *Sacharomyces cerevisiae*: *GPX2*, *GPX3A* y *GPX3B*. Al evaluar el fenotipo de la doble mutante *gpx3AΔ gpx3BΔ* en exposición a diferentes oxidantes, encontramos que la mutante es más sensible a hidropéroxido de cumeno y a H_2O_2 . En resumen, nuestros resultados sugieren que estas enzimas están implicadas en la depuración de hidropéroxidos orgánicos y/o H_2O_2 .

Resultados

Identificación y análisis de la secuencia de los genes GPX de C. glabrata

En el genoma de *C. glabrata* identificamos 3 marcos de lectura abiertos (ORF) para glutatión peroxidasa en el brazo izquierdo del cromosoma I. El ORF *CAGLOC01705g*, es órtologo a *GPX2* de *Saccharomces cerevisiae* por sintenia y 88% similar a nivel de aminoácidos (Figura 1A). Los marcos de lectura *CAGLO100264g* y *CAGLO100242g* son 2 repetidos directos ubicados en la región subtelomérica del brazo izquierdo del cromosoma I y tienen una similitud en secuencia de aminoácidos a *GPX3* de *S. cerevisiae* de 84% y 74% respectivamente. Las secuencias de Gpx3A y Gx3B tienen los principales residuos estructurales y catalíticos de la *S.c.Gpx3* (Figura 1 B).

Determinación del estado transcripcional de la cromatina en el telómero izquierdo del cromosoma I.

Dado que en *C. glabrata* las regiones subteloméricas están silenciadas por efecto de la estructura de la cromatina y los genes *GPX3A* y *GPX3B* están aproximadamente a 20 Kb del telómero, decidimos determinar el estado transcripcional de la cromatina en el locus *GPX3AB* (Figura 2). Construimos un plásmido integrativo (pGL3, Tabla 2), que tiene secuencias homólogas del 5' de *GPX3B* y del 3' de *GPX3A* que flanquean un marcador de resistencia a higromicina, y el gen reportero *URA3*. Este plásmido se integró en el 5' de *GPX3B* y se analizó el estado transcripcional de la cromatina con el gen reportero *URA3* mediante el ensayo de crecimiento en 5-FOA (Figura 2A). La correcta integración de pGL3 en el cromosoma se verificó mediante PCR (Figura 2A). La cepa CGM1315 (CI₁: *URA3*) con el plásmido pGL3 integrado en el cromosoma, creció en medio rico (YPD) y en medio sin uracilo (CAA). Sin embargo, no creció en medio 5FOA. La ausencia de crecimiento en 5FOA indica que el gen *URA3* se expresa y que la cromatina en el 5' de *GPX3B* no se encuentra silenciada. El producto del gen *URA3* forma un compuesto tóxico con el 5FOA y las células no son viables (Figura 2B, ver Materiales y Métodos).

Construcción de la mutante doble de los genes GPX3A y GPX3B

Para evaluar la función de los genes *GPX3A* y *GPX3B* de *C. glabrata*, construimos una doble mutante nula en estos genes. La mutante la construimos a partir de la cepa con el plásmido pGL3 integrado en el cromosoma (CGM1315). La resolución del plásmido integrante por recombinación se obtuvo creciendo a las células en medio rico (YPD) sin selección y luego estas células se expusieron a medio con 5FOA. Las células resistentes a 5-FOA (Ura⁻) se verificaron que fueran resistentes a higromicina y que perdieran las secuencias del plásmido mediante la incapacidad de crecer en medio CAA sin uracilo. Para confirmar la estructura correcta en el cromosoma de la doble mutante *gpx3AΔ gpx3BΔ*, se verificó mediante un análisis por PCR usando oligonucleótidos (#4 y #5) que alinean al 5' y

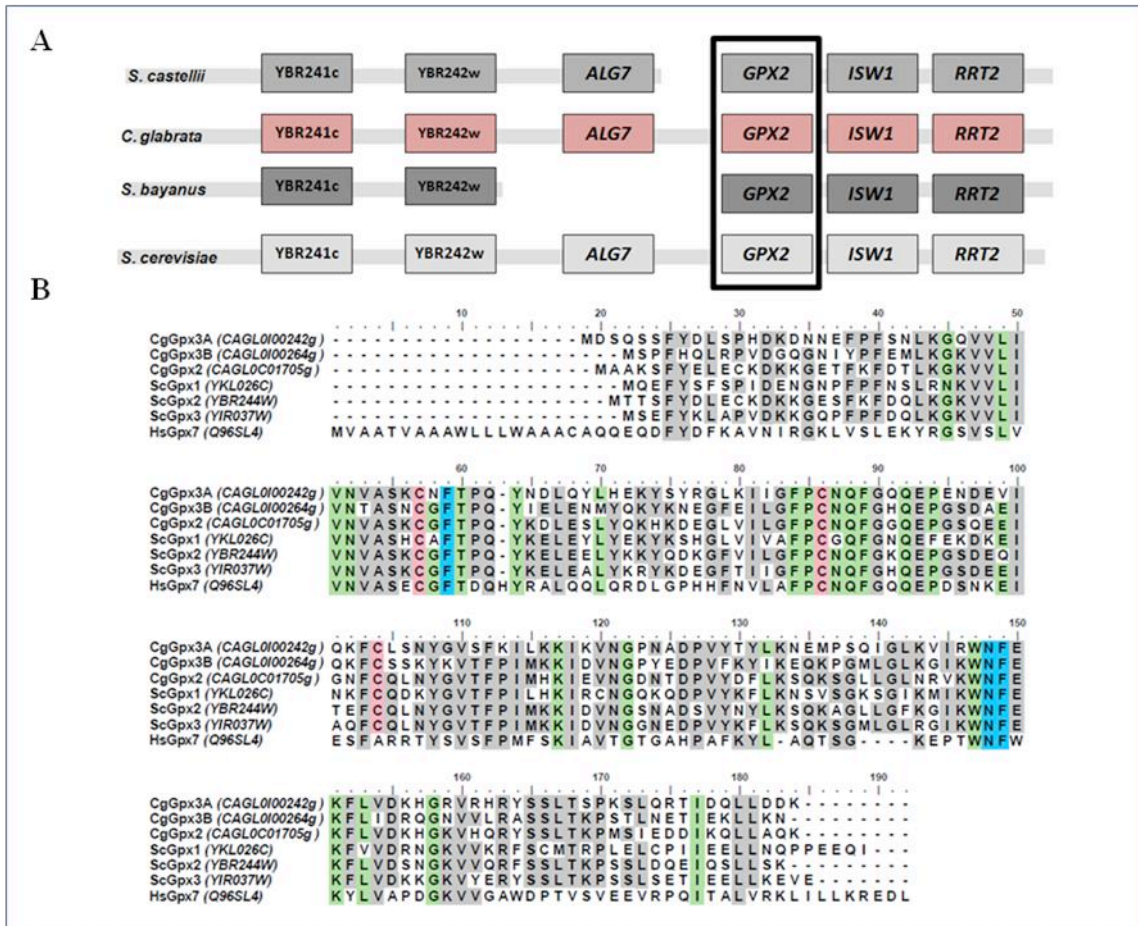


Fig.1. Análisis bioinformático de las glutatión peroxidadas predichas de *C. glabrata*. (A) Mapa que esquematiza la sintenia existente entre *GPX2* de *S. cerevisiae* y *GPX2* de *C. glabrata*. (B) Alineamiento de *GPX7* humana, *GPX1*, *GPX2* y *GPX3* de *S. cerevisiae* y *GPX2*, *GPX3A* y *GPX3B* de *C. glabrata*. Se muestran los aminoácidos similares en gris, los sitios conservados de las glutatión peroxidasa en verde, los aminoácidos importantes para la interacción con el sustrato en azul, y las cisteínas catalíticas en rosa.

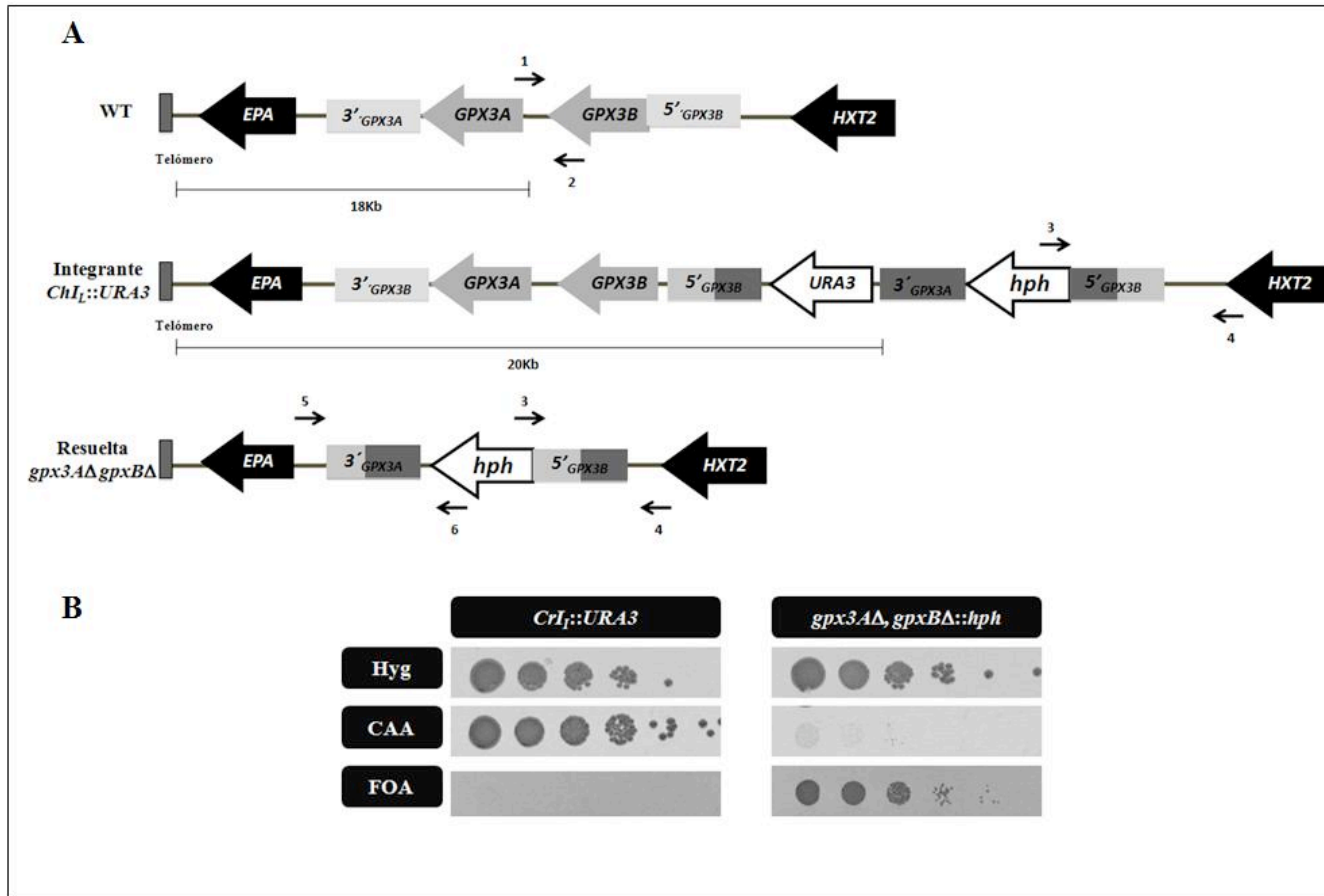


Fig.2. Construcción de la mutante doble *gpx3AΔ gpx3BΔ* y silenciamiento del *loci GPX3*. (A) Esquema del brazo izquierdo del cromosoma I de *C. glabrata*. La integración del plásmido pGL3 se verificó mediante PCR con los oligos 3 y 4. La mutante doble generada por la resolución del plásmido integrado se verificó con los oligos 1 y 2 que indican la ausencia de los genes. El 3' se verificó con los oligos 5 y 6 y el 5' con los oligos 3 y 4. El PCR final se realizó con los oligos 4 y 5. (B) La cepa integrante *CrI₁::URA3* (CGM1315) es incapaz de crecer en medio 5-FOA. Las cepa mutante doble *gpx3AΔ gpx3BΔ* (CGM1316) es resistente a higromicina ya que tiene el marcador *hph* y a 5-FOA debido a la pérdida del marcador *URA3*.

al 3' de *GPX3A* y *GPX3B* y que no alinean en las secuencias del plásmido pGL3 (Figura 2A). Además, se hizo una análisis de PCR con oligonucleótidos (#1 y #2) que alinean en la secuencia intergénica de *GPX3A* y *GPX3B* para verificar la ausencia de los genes silvestres (Figura 2A).

Participación de GPX3A y GPX3B en la respuesta a estrés oxidante

Para determinar si Gpx3A y Gpx3B participan en la respuesta a estrés oxidante, hicimos ensayos de sensibilidad con la mutante *gpx3AΔ gpx3BΔ* en presencia de tres agentes oxidantes: Menadiona, Cumeno y H₂O₂. Se evaluó la resistencia de la cepa mutante a los oxidantes tanto en fase estacionaria como en fase logarítmica (ver Materiales y Metodos). La cepa mutante *gpx3AΔ gpx3BΔ* fue más sensible que la cepa silvestre a hidróperóxido de cumeno en fase estacionaria y no en fase logarítmica (Figura 3A y B). Además, esta cepa fue ligeramente más sensible a 15mM de H₂O₂ que la cepa silvestre tanto en fase logarítmica como estacionaria (Figura 3A y B). Sin embargo, la doble mutante *gpx3AΔ gpx3BΔ* en presencia de menadiona se comporto como la cepa silvestre. Estos resultados sugieren que *GPX3A* y/o *GPX3B* se requieren en la depuración de hidróperóxido de cumeno y posiblemente también para H₂O₂, tanto en fase de crecimiento exponencial como estacionaria (Figura 3).

Materiales y métodos

Cepas y condiciones de crecimiento.

La cepa de *Escherichia coli* y las cepas de *C. glabrata* están descritas en la Tabla 1. Todas las cepas de *C. glabrata* se resguardaron en glicerol al 15% a -80°C y se cultivaron en YPD (del inglés *Yeast extract-Peptone-Dextrose*). El medio contiene extracto de levadura al 1%, peptona 2%, glucosa 2% y se complementa con 25mg/L de uracilo (Sigma Aldrich®). Para medio de selección, el medio YPD se suplementó con higromicina (A. G. Scientific®) a una concentración final de 440µg/mL. El medio casaminoácidos (CAA), es base nitrogenada de levadura sin amonio 1,7g/L, sulfato de amonio [(NH₄)₂SO₄] 5g/L, casaminoácidos 6g/L y de glucosa 2% (w/v). Cuando fue necesario, se suplementó con ácido-5-fluorótico 0,9g/L (Toronto Research Chemicals®) medio 5-FOA. El medio solido YPG (1% extracto de levadura, 2% peptona, 3% glicerol, 25mg/mL de uracilo) se uso para identificar las cepas petite. Para los medios sólidos se añadió agar bacteriológico a una concentración final de 2% (w/v).

Plásmidos y construcción de cepas

Los plásmidos usados en este estudio se describen en la Tabla 2. Todos los plásmidos se extrajeron de *E. coli* y se purificaron con el Plasmid Kit QIAprep de Qiagen®. Los fragmentos para construir el plásmido pGL1 se generaron por PCR con los oligonucleótidos que se describen en la Tabla 3. Se llevó a cabo PCR de fusión para crear el fragmento para interrumpir a los genes *GPX3A* y *GPX3B* de *C. glabrata*. Se amplificó 1kb de la región 3' de *GPX3A* y 1Kb del la región 5' de *GPX3B* los cuales se fusionaron con

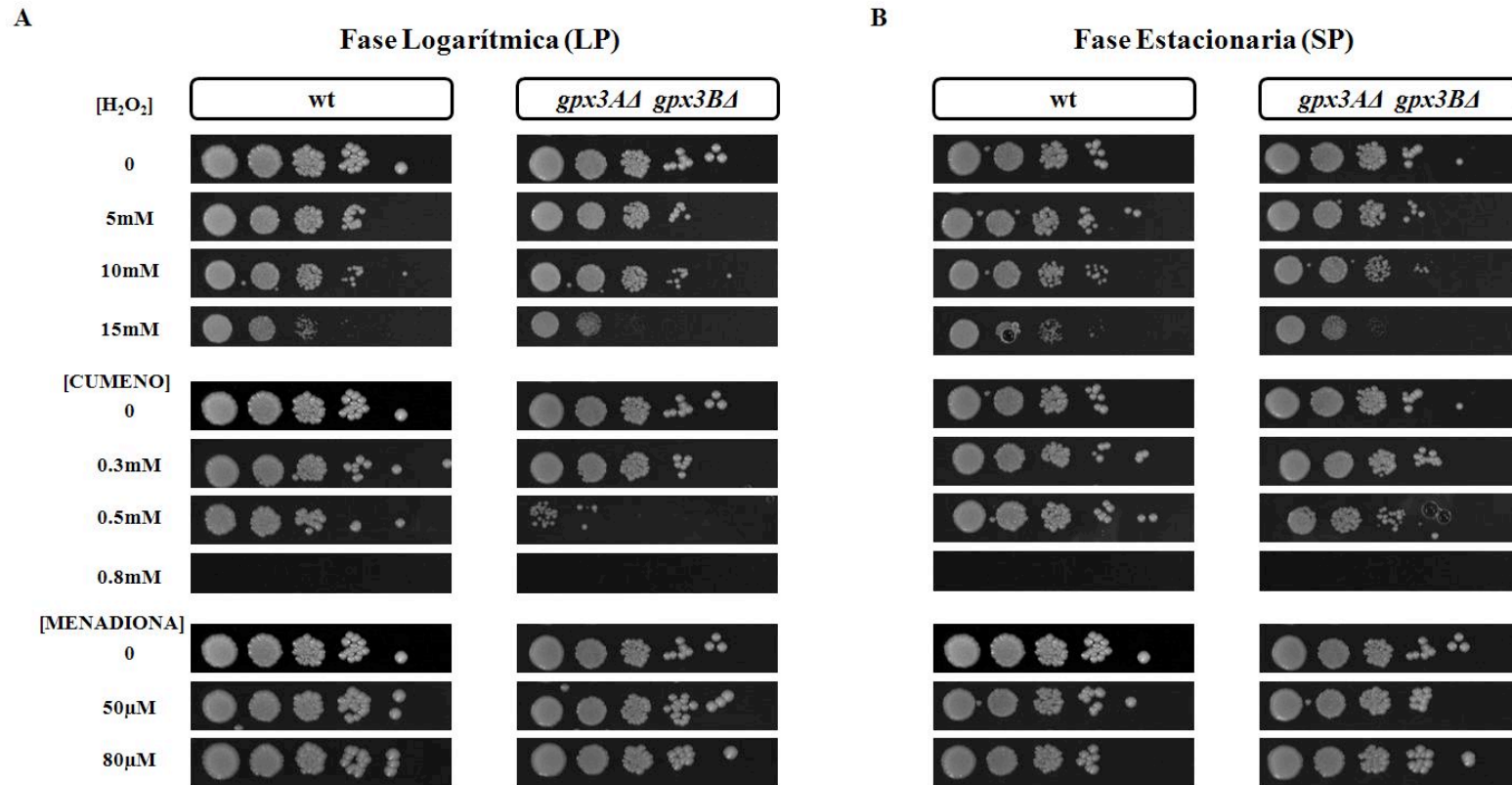


Fig. 3. Participación de *GPX3A* y *GPX3B* en la respuesta a estrés oxidante. Ensayo de sensibilidad a oxidantes en tratamiento crónico de la cepa silvestre y la mutante doble *gpx3AΔ gpx3BΔ*. (A) Resistencia a oxidantes en fase logarítmica. A partir de cultivos saturados de las cepas CGM1(wt), CGM1316 (*gpx3AΔ gpx3BΔ*) de *C. glabrata* se tomó la cantidad de células necesaria para que al término de siete duplicaciones alcanzaran una OD₆₀₀ = 0,5. Se hicieron diluciones seriadas y se gotearon en cajas de YPD con diferentes concentraciones de oxidante. Las cajas se incubaron a 30°C. (B) Fase estacionaria. Cultivos saturados de las cepas CGM1 (wt) y CGM1315 (*gpx3AΔ gpx3BΔ*) de *C. glabrata* se diluyeron a OD_{600nm} de 0.5 en agua destilada. Se hicieron diluciones seriadas y se gotearon en cajas de YPD con diferentes concentraciones de oxidante. Las cajas se incubaron a 30°C.

el casete de resistencia a higromicina ($3'_{GPX3B}::P_{PGK1}::hph::3'_{HIS3}::5'_{GPX3A}$). El fragmento de fusión se clonó en el vector intermediario pGEM para después subclonarlo en el vector pYIp/*lac211* y generar pGL3 un plásmido integrativo que contiene el gen reportero *URA3*. La interrupción de los genes se llevo a cabo por el método de dos pasos descrito previamente (De Las Penas et al., 2003, Cuellar-Cruz *et al.*, 2008). El plásmido pGL3 se introdujo a células de *C. glabrata* por transformación por medio del método de acetato de litio.

Ensayo de silenciamiento.

Posterior a la integración de pGL3 en el loci *GPX3A / GPX3B* se determino el estado transcripcional de la cromatina mediante ensayos de crecimiento en 5FOA. El cultivo saturado en YPD de la cepa integrante se diluyó en agua para obtener una $OD_{600} = 1$. Se hicieron diluciones seriadas en placas Costar[®] y se gotearon 5µl en cajas de YPD con higromicina, CAA sin uracilo y 5FOA. El producto del gen *URA3* en presencia de ácido-5-fluorótico genera un compuesto tóxico para la célula, de manera que si el gen *URA3* se encuentra silenciado, no se genera el compuesto tóxico y las células pueden crecer. En cambio si el locus es transcripcionalmente activo, se genera el compuesto toxico 5 Fluoruracilo y no hay crecimiento.

Ensayos de sensibilidad a oxidantes.

Cultivos de las cepas de *C. glabrata* se crecieron por 36h en medio YPD a 30°C, hasta alcanzar una $OD_{600} \approx 30$. Como agente oxidante se utilizaron H₂O₂ 30%, Menadiona 88% e hidropéroxido de cumeno 88% (w/w) de Sigma-Aldrich[®]. Para evaluar la sensibilidad a oxidantes en fase de crecimiento exponencial, a partir de un cultivo saturado de cada cepa, se tomo la cantidad de células necesaria de tal forma que al término de siete duplicaciones alcanzaran una $OD_{600} = 0,5$. Las células se centrifugaron y se resuspendieron en 1mL de agua destilada estéril. Posteriormente se realizaron cinco diluciones logarítmicas en placas Costar[®] de 96 pozos y se gotearon 5µL en cajas con medio YPD y YPD con 5, 10 y 15 mM de H₂O₂, 0.3, 0.5 y 0.8mM de hidropéroxido de cumeno y 50 y 80µM de menadiona. Para los ensayos de sensibilidad de células en fase estacionaria, los cultivos de una $OD_{600} \approx 30$, se diluyeron a una OD_{600} de 0,5 con el mismo medio YPD agotado por la misma cepa. Las células se resuspendieron en 1mL de agua destilada estéril. Se realizaron diluciones logarítmicas y se gotearon en cajas con medio YPD y YPD con oxidantes. Las cajas se incubaron a 30°C durante 2 días.

Análisis bioinformáticos.

Para los análisis comparativos entre *C. glabrata* y *S. cerevisiae*, las secuencias génicas se extrajeron de la base de datos del proyecto *Genólevures* (<http://www.genolevures.org>) y de la base de datos de *S. cerevisiae*, *SGD* (<http://www.yeastgenome.org>). Los alineamientos y filogenias se hicieron con el programa BioEdit y con la base de datos del laboratorio de Ken Wolfe (<http://wolfe.gen.tcd.ie/ygob/>)

Lista de tablas

Tabla 1. Cepas

<i>C. glabrata</i>	Genotipo	Referencia
CGM1 wt	<i>ura3Δ::Tn903</i> G418 ^R	(Cormack & Falkow, 1999)
CGM1315	<i>ura3Δ::Tn903</i> G418 ^R <i>gpx3AB Δ::pGL3</i>	Este trabajo
CGM1316	<i>ura3Δ::Tn903</i> G418 ^R <i>gpx3AB Δ::hph</i>	Este trabajo
<i>E. coli</i>	Genotipo	Referencia
DH10B	<i>F-mcrAΔ(mrr-hsdRMSmcBC)</i> <i>Φ80d/lacZΔM15ΔlacX74deoR</i> <i>recA1endA1araD139Δ(ara,leu)7697</i> <i>galUgalKλ- rpsL nupG</i>	(Calvin and Hanawalt, 1988)

Tabla2. Plásmidos

Plásmido	Genotipo	Referencia
pGEM [®] -T	Vector de clonación. Amp ^R .	(Cormack & Falkow, 1999)
pAP599	Vector de clonación con un casete de resistencia a higromicina, flanqueado por una secuencia <i>FRT</i> al extremo 3'. [<i>P_{PGK}::hph::(3' UTR_{HIS3})-FRT</i>]; <i>URA3</i> Hyg ^R Amp ^R .	Colección del laboratorio.
pYIPlac211	Vector de clonación integrativo. <i>URA3</i> Amp ^R .	(Gietz & Sugino, 1988)
pGL1	Producto de fusión de PCR (oligos #838 y #831) de 4,195Kb clonado en pGEM [®] -T. la región 5' <i>GPX3B</i> y 3' de <i>GPX3A</i> que flanquea el casete de higromicina. [<i>3' ^{GPX3A} -FRT-P_{PGK}::hph::(3' UTR_{HIS3})-FRT-(5' ^{GPX3B})</i>]; Hyg ^R Amp ^R .	Este trabajo
pGL3	Fragmento de 3,684 Kb derivado de pGL1 digerido con SphI. [<i>3' ^{GPX3A} -FRT-P_{PGK}::hph::(3' UTR_{HIS3})-FRT-(5' ^{GPX3B})</i>]; <i>URA3</i> Hyg ^R Amp ^R .	Este trabajo

Tabla3. Oligonucleótidos

Nombre	Secuencia	Numero
1 <i>GPX3</i>	ATGAGGAAGCAAGAGTTCAG	834
2 <i>GPX3</i>	GGAATGCTAGGTCTGAACG	833
3 <i>hph</i>	CGATAAGAGGCCACGTGCTTTATG	15
4 <i>GPX3</i>	GATGCACGATGACAAGCCATGG	829
5 <i>GPX3</i>	TGTCATCAATGCTGGTACG	832
6 <i>hph</i>	AGAAATACGCACGAACACGATATAGAGG	16
7 <i>GPX3</i>	GGAGCTCCAATTGCGCCCTATAGTGAGTCAGTGATCGCCAAATAAAGACA	827
8 <i>GPX3</i>	ACAGAGGACTCCATTCATTA	828
9 <i>GPX3</i>	TTGTTCCCTTTAGTGAGGGTTATTTCCAGGAGCCGAAAATAACTCTCT	830
10 <i>GPX3</i>	GCCTGCCTTTATTTAATACTGC	831

- La secuencias en negritas hibridan en el marcador de resistencia a higromicina

Discusión.

Las células polimorfonucleares forman parte de la primera línea de defensa del hospedero en contra de las infecciones fúngicas, sin embargo, los microorganismos han desarrollado mecanismos antioxidantes para contender de una manera eficaz al ataque del fagocito. *C. glabrata* resiste al ataque oxidativo de células fagocíticas y puede dividirse dentro de los macrófagos (Kaur *et al.*, 2007, Roetzer *et al.*, 2010) es por esto que en los últimos años ha aumentado el interés en el estudio de la respuesta a estrés oxidativo por parte de este levadura patógena.

En experimentos *in vitro*, se ha descrito que *C. glabrata* es extremadamente resistente al estrés oxidativo. La resistencia de *C. glabrata* a H₂O₂ *in vitro* esta mediada por su única catalasa, sin embargo, una cepa carente de la catalasa no pierde capacidad de adaptación a H₂O₂. Así mismo la ausencia de catalasa no tiene efecto en modelos de ratón de infección sistémica (Cuellar-Cruz *et al.*, 2008, Cuellar-Cruz *et al.*, 2009). Esto sugiere la existencia de otros mecanismos enzimáticos que compensan la ausencia de la catalasa y que le confieren a la levadura la capacidad de adaptarse a hidroperóxidos.

C. glabrata es más resistente al estrés oxidativo generado por cumeno que *C. albicans* y *S. cerevisiae* (Cuellar-Cruz *et al.*, 2009). El cumeno es un hidroperóxido orgánico que desencadena peroxidación lipídica (Bindolli 1982). Nuestros resultados sugieren que *C. glabrata* cuenta con tres glutatión peroxidasas, dos de las cuales pudieran participar en la resistencia innata de esta levadura al cumeno. Además, no son las únicas enzimas responsables de esta resistencia a cumeno ya que la doble mutante *gpx3AΔ gpx3BΔ* resiste todavía a 0.3mM de cumeno. Nosotros creemos que la resistencia residual a cumeno esta dada por *GPX2*. Para *S. cerevisiae* se ha reportado que el fenotipo de sensibilidad a hidroperóxidos orgánicos solo se observa en ausencia de sus 3 glutatión peroxidasas (Avery & Avery, 2001). Es importante, entonces, construir la triple mutante *gpx2Δ gpx3AΔ gpx3BΔ* y mutantes individuales de cada gen para evaluar la contribución de cada uno de ellos a la resistencia a estrés oxidante generado por cumeno. Otro aspecto importante en la caracterización del sistema de glutatión peroxidasas de *C. glabrata*, es determinar la localización celular de cada una de estas enzimas codificantes.

Las regiones subteloméricas son zonas de cromatina represiva que en microorganismos patógenos albergan genes que les confiere mayor virulencia. Tal es el caso de los genes *VSG* de *Trypanosoma brucei*, los genes *VAR* de *Plasmodium falcifarum* y los genes *EPA* de *C. glabrata* (Chaves *et al.*, 1999, Halme *et al.*, 2004, Chookajorn *et al.*, 2007). Asimismo la presencia y actividad de enzimas antioxidantes en microorganismos patógenos tiene implicaciones en su virulencia (Hamilton & Holdom, 1999, Roetzer *et al.*, 2010) Hwang *et al.*, 2002, Narasipura *et al.*, 2005). *GPX3A* y *GPX3B* se encuentran a 18kb del telómero izquierdo del cromosoma I por lo que pudieran estar bajo silenciamiento subtelomérico, de manera que decidimos analizar el estado transcripcional de la cromatina en este telómero. Con el ensayo realizado determinamos que esta región no se encuentra silenciada. Sin embargo, la presencia del promotor fuerte PPGK1 a 2kb del gen *URA3* pudo haber suprimido el silenciamiento en este telómero. Por datos de laboratorio sabemos que la presencia de P_{PGK1} suprime el silenciamiento en los telómeros estudiados (A. Juárez, Datos no publicados). Por lo que habrá que escindir el marcador de higromicina para evaluar el silenciamiento de este telómero sin la influencia de P_{PGK1}.

Las glutatión peroxidasas forman parte del sistema del glutatión, el cual se sabe es uno de los principales sistemas antioxidantes en la célula. La expresión de estas enzimas se ha

estudiado en *S. cerevisiae* en donde la inducción de estos genes se observa durante estrés oxidativo y depleción de glucosa. La importancia de las GPx en la virulencia de los patógenos ha sido estudiada únicamente en *Streptococcus pyogenes* y *C. neoformans* (Brenot 2004, Missall 2005) en los que se ha determinado que estas enzimas son indispensables para la virulencia de estos patógenos. Sin embargo, las glutatión peroxidasas no han sido estudiadas en ninguna especie del género *Candida* ni sus implicaciones con su virulencia. Proponemos generar la mutante triple de las glutatión peroxidasas de *C. glabrata* para realizar estudios de infección sistémica en ratones y así determinar si estas enzimas contribuyen a la virulencia de este hongo patógeno.

Referencias.

- Avery, A. M. & S. V. Avery, (2001) *Saccharomyces cerevisiae* expresses three phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidases. *J Biol Chem* 276: 33730-33735.
- Cadenas, E. & K. J. Davies, (2000) Mitochondrial free radical generation, oxidative stress, and aging. *Free Radic Biol Med* 29: 222-230.
- Carmel-Harel, O. & G. Storz, (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.
- Cormack, B. P. & S. Falkow, (1999) Efficient homologous and illegitimate recombination in the opportunistic yeast pathogen *Candida glabrata*. *Genetics* 151: 979-987.
- Cuellar-Cruz, M., M. Briones-Martin-del-Campo, I. Canas-Villamar, J. Montalvo-Arredondo, L. Riego-Ruiz, I. Castano & A. De Las Penas, (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.
- Cuellar-Cruz, M., I. Castano, O. Arroyo-Helguera & A. De Las Penas, (2009) Oxidative stress response to menadione and cumene hydroperoxide in the opportunistic fungal pathogen *Candida glabrata*. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 104: 649-654.
- Chaves, I., G. Rudenko, A. Dirks-Mulder, M. Cross & P. Borst, (1999) Control of variant surface glycoprotein gene-expression sites in *Trypanosoma brucei*. *Embo J* 18: 4846-4855.
- Chookajorn, T., R. Dzikowski, M. Frank, F. Li, A. Z. Jiwani, D. L. Hartl & K. W. Deitsch, (2007) Epigenetic memory at malaria virulence genes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104: 899-902.
- De Las Penas, A., S. J. Pan, I. Castano, J. Alder, R. Cregg & B. P. Cormack, (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.
- Domergue, R., I. Castano, A. De Las Penas, M. Zupancic, V. Lockett, J. R. Hebel, D. Johnson & B. P. Cormack, (2005) Nicotinic acid limitation regulates silencing of *Candida adhesins* during UTI. *Science* 308: 866-870.

- Ferrari, S., F. Ischer, D. Calabrese, B. Posteraro, M. Sanguinetti, G. Fadda, B. Rohde, C. Bauser, O. Bader & D. Sanglard, (2009) Gain of function mutations in CgPDR1 of *Candida glabrata* not only mediate antifungal resistance but also enhance virulence. *PLoS Pathog* 5: e1000268.
- Gietz, R. D. & A. Sugino, (1988) New yeast-*Escherichia coli* shuttle vectors constructed with in vitro mutagenized yeast genes lacking six-base pair restriction sites. *Gene* 74: 527-534.
- Halme, A., S. Bumgarner, C. Styles & G. R. Fink, (2004) Genetic and epigenetic regulation of the FLO gene family generates cell-surface variation in yeast. *Cell* 116: 405-415.
- Hamilton, A. J. & M. D. Holdom, (1999) Antioxidant systems in the pathogenic fungi of man and their role in virulence. *Med Mycol* 37: 375-389.
- Jacob, H. S., S. H. Ingbar & J. H. Jandl, (1965) Oxidative Hemolysis and Erythrocyte Metabolism in Hereditary Acatlasia. *J Clin Invest* 44: 1187-1199.
- Kaur, R., B. Ma & B. P. Cormack, (2007) A family of glycosylphosphatidylinositol-linked aspartyl proteases is required for virulence of *Candida glabrata*. *Proc Natl Acad Sci USA* 104: 7628-7633.
- Lyman, C. A. & T. J. Walsh, (1994) Phagocytosis of medically important yeasts by polymorphonuclear leukocytes. *Infect Immun* 62: 1489-1493.
- Pfaller, M. A. & D. J. Diekema, (2010) Epidemiology of invasive mycoses in North America. *Crit Rev Microbiol* 36: 1-53.
- Roetzer, A., N. Gratz, P. Kovarik & C. Schuller, (2010) Autophagy supports *Candida glabrata* survival during phagocytosis. *Cell Microbiol* 12: 199-216.
- Roetzer, A., E. Klopff, N. Gratz, M. Marcet-Houben, E. Hiller, S. Rupp, T. Gabaldon, P. Kovarik & C. Schuller, (2011) Regulation of *Candida glabrata* oxidative stress resistance is adapted to host environment. *FEBS Lett* 585: 319-327.
- Saijo, T., T. Miyazaki, K. Izumikawa, T. Mihara, T. Takazono, K. Kosai, Y. Imamura, M. Seki, H. Kakeya, Y. Yamamoto, K. Yanagihara & S. Kohno, (2010) Skn7 is involved in oxidative stress response and virulence of *Candida glabrata*. *Mycopathologia* 169: 81-90.
- Sanglard, D., F. Ischer, D. Calabrese, P. A. Majcherczyk & J. Bille, (1999) The ATP binding cassette transporter gene CgCDR1 from *Candida glabrata* is involved in the resistance of clinical isolates to azole antifungal agents. *Antimicrob Agents Chemother* 43: 2753-2765.
- Scandalios, J. G., (2005) Oxidative stress: molecular perception and transduction of signals triggering antioxidant gene defenses. *Braz J Med Biol Res* 38: 995-1014.
- Yadav, A. K., P. R. Desai, M. N. Rai, R. Kaur, K. Ganesan & A. K. Bachhawat, (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.