

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

POSGRADO EN CIENCIAS EN BIOLOGÍA MOLECULAR

**“Identificación del transportador de glutatión en
Candida glabrata”**

Tesis que presenta:
Gloria Guadalupe Alvarado Rodríguez

Para obtener el grado de:
Maestro en Ciencias en Biología Molecular

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

San Luis Potosí, S. L. P., Julio del 2012



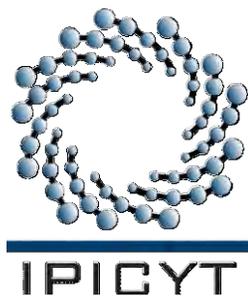
Constancia de aprobación de la tesis

La tesis “**Identificación del transportador de glutatión en *Candida glabrata***” presentada para obtener el Grado de Maestro(a) en Ciencias en Biología Molecular fue elaborada por **Gloria Guadalupe Alvarado Rodríguez** y aprobada el **20 de Junio del 2012** 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. Irene Castaño Navarro
(Miembro del Comité Tutorial)

Dra. Ana Paulina Barba De La Rosa
(Miembro del Comité Tutorial)



Créditos Institucionales

Esta tesis se elaboró 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.

Durante la realización del trabajo el autor recibió una beca académica del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (Número de registro 100460) y del Instituto Potosino de Investigación Científica 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 093 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 2 días del mes de julio del año 2012, se reunió a las 12:00 horas en las instalaciones del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C., el Jurado integrado por:

Dra. Ana Paulina Barba de la Rosa	Presidenta	IPICYT
Dra. Irene Beatriz Castaño Navarro	Secretaria	IPICYT
Dr. Alejandro De Las Peñas Nava	Sinodal	IPICYT

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

MAESTRA EN CIENCIAS EN BIOLOGÍA MOLECULAR

sustentó la C.

Gloria Guadalupe Alvarado Rodríguez

sobre la Tesis intitulada:

Identificación del transportador de glutatión en 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 2 días del mes de julio de 2012.

Mtra. Ivonne Lizette Cuevas Vélez
Jefa del Departamento del Posgrado

Dr. Marcial Bomilla Marín
Secretario Académico



Dedicatorias

En este apartado, es donde menciono a dos personas que siempre están en mi mente y corazón, Josefa Rodríguez y Luis Alvarado, mis padres, ambos me han enseñado a nunca claudicar. Todos mis logros se los dedico, una forma más de agradecerles que me hayan permitido crecer y aprender junto a ellos.

A una parte importante, mis amigos, a los que han permanecido conmigo durante años, y a los que durante estos dos años han estado a mi lado. Especialmente a Guadalupe Serna, por simplemente no dejarme caer. Tuve la dicha de tenerla a mi lado.

A Héctor Munguía Basurto, por su cariño incondicional, por ser mi impulso a seguir después del de mi padre, por confiar en mí...en lo que podía lograr.

Por último, y no por menos importante, le dedico esta tesis a Aris Quintana Nedelcos, por estar a mi lado apoyándome en todo momento, por su enseñanza continua sobre la dificultad de la vida. Y principalmente por su amor.

Agradecimientos

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

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología.

Al Dr. Alejandro De Las Peñas y a la Dra. Irene Castaño Navarro, por su paciencia, confianza y oportunas e inigualables enseñanzas, mucho he aprendido de ellos.

A la Dra. Gabriela Mancilla Montelongo, por sus atinadas sugerencias para este trabajo.

A la Dra. Ana Paulina Barba De La Rosa, por su apoyo en este proyecto.

A María Guadalupe Gutiérrez Escobedo, por compartir su conocimiento y experiencia para el desarrollo de este trabajo.

A la Dra. Candy Yuriria Ramírez Zavaleta por su colaboración en el laboratorio.

A todos mis compañeros del laboratorio 6, que me brindaron su apoyo, consejos e ideas para sacar adelante este proyecto.

A la Dra. Lina Raquel Riego Ruíz y al Dr. Sergio Casas Flores, que de alguna manera ayudaron a que este trabajo se realizara.

Contenido

Constancia de aprobación de la tesis	ii
Créditos institucionales	iii
Acta de examen	iv
Dedicatorias	v
Agradecimientos	vi
Lista de tablas	ix
Lista de figuras	x
Lista de figuras suplementarias	xi
Abreviaturas	xii
Resumen	xiv
Abstract	xv
Introducción	1
Materiales y Métodos	4
Cepas, plásmidos y oligonucleótidos	4
Medios de cultivo	12
Transformación genética de <i>C. glabrata</i>	13
Construcción de un vector de clonación con resistencia a nourseotricina	13
Preparación de los insertos del genoma de <i>C. glabrata</i>	16

Construcción de la biblioteca genómica de <i>C. glabrata</i> en pAR6	18
Cálculo de probabilidad	18
Escrutinio genético para el transportador de glutatión en <i>C. glabrata</i>	19
Construcción de las cepas sobreexpresantes del gen CAGL0A01001g	19
Resultados	20
Construcción de la biblioteca genómica de <i>C. glabrata</i> en un vector con resistencia a nourseotricina	20
Escrutinio genético en <i>C. glabrata gsh1Δ</i> para el transportador de glutatión	22
Análisis de las secuencias del inserto en los plásmidos pAR8, pAR10 y pAR12	24
El plásmido pAR10 complementa la mutación de <i>GSH1</i> en la cepa <i>Cggsh1Δ</i> y pAR8 la suprime	27
El crecimiento de la cepa <i>gsh1Δ</i> mejora al sobreexpresar el gen CAGL0A01001g (YLR326w)	27
Discusión	34
Referencias	40

Lista de tablas

	Página
1. Cepas de <i>Escherichia coli</i> y <i>Candida glabrata</i> usadas en este estudio	5
2. Plásmidos usados en este estudio	7
3. Oligonucleótidos usados en este estudio	10

Lista de figuras

	Página
1. Mapa del vector de clonación replicativo pAR6 derivado del pBR2.0	15
2. Fragmentos de ADN genómico de <i>C. glabrata</i>	17
3. Biblioteca genómica de <i>C. glabrata</i> en <i>E. coli</i> DH10B.	21
4. Los 5 plásmidos obtenidos en el escrutinio genético con la biblioteca genómica en la cepa <i>gsh1Δ pGSH1-URA3</i>	23
5. Mapas de los plásmidos obtenidos en el escrutinio genético con la biblioteca genómica de <i>C. glabrata</i>	25
6. Crecimiento de la cepa <i>gsh1Δ</i> con los plásmidos pAR8, pAR14 y pAR18	32
7. Modelo propuesto para la supresión de la mutación en <i>GSH1</i> de <i>C. glabrata</i>	38

Lista de figuras suplementarias

	Página
S1. Esquema general de la construcción del vector de clonación replicativo pAR6	44
S2. Estrategia general para el escrutinio genético en la cepa <i>gsh1Δ</i> de <i>C. glabrata</i> con la biblioteca genómica	46
S3. Los plásmido pAR10 y pAR8 complementan y suprimen respectivamente la mutación en <i>GSH1</i> de la cepa CGM876 (<i>Cggsh1Δ</i>)	48
S4. Crecimiento de la cepa <i>gsh1Δ</i> con los plásmidos pAR8, pAR14 y pAR18 en medio reducido en nitrógeno al 50%	49

Abreviaturas

(Por sus siglas en inglés)

ABC	<u>A</u> TP <u>B</u> inding <u>C</u> assette
<i>bla</i>	<u>b</u> eta- <u>l</u> actamase
CAA	<u>C</u> asa <u>A</u> mino <u>A</u> cids
CYC1	<u>C</u> Ytochrome <u>C</u>
DMSO	<u>D</u> i <u>M</u> ethyl <u>S</u> ulf <u>O</u> xide
EPA1	<u>E</u> Pithelial <u>A</u> dehesin
FUM1	<u>F</u> U <u>M</u> arase
<i>hph</i>	hygromycin phosphotransferase
KEL3	<u>K</u> E <u>L</u> ch repeat
MCS	<u>M</u> ultiple <u>C</u> loning <u>S</u> ite
NAD	<u>N</u> icotinamide <u>A</u> denine <u>D</u> inucleotide
NAT1	<u>N</u> -terminal <u>A</u> cetyl <u>T</u> ransferase
NMA1	<u>N</u> icotinamide <u>M</u> ononucleotide <u>A</u> denylyltransferase
OD	<u>O</u> ptical <u>D</u> ensity
OPT	<u>O</u> ligo <u>P</u> eptide <u>T</u> ransporter
ORF	<u>O</u> pen <u>R</u> eading <u>F</u> rame
PCR	<u>P</u> olymerase <u>C</u> hain <u>R</u> eaction
PGK1	3- <u>P</u> hospho <u>G</u> lycerate <u>K</u> inase
TEF1	<u>T</u> ranslation <u>E</u> longation <u>F</u> actor
URA3	<u>U</u> R <u>A</u> cil requiring

UTR Untranslated Region
YPD Yeast extract-Peptone-Dextrose
5-FOA 5 FluOrotic Acid

Resumen

Identificación del transportador de glutatión en *Candida glabrata*

Candida glabrata es un hongo patógeno oportunista, capaz de contrarrestar el estrés oxidante intrínseco, y externo al ser fagocitada por los macrófagos. Los sistemas de defensa de esta levadura hacia el estrés oxidante son la catalasa, las superóxido dismutasa y peroxidasas. También, el glutatión participa como compuesto antioxidante en esta respuesta. El glutatión es esencial en casi todos los organismos eucariotes. Está involucrado en la eliminación de especies reactivas de oxígeno, en la desintoxicación de drogas y metales, y en el almacenamiento de azufre y nitrógeno. La biosíntesis de este metabolito requiere de las enzimas γ -Glutamilcisteína Sintetasa y la Glutatión Sintetasa, codificadas por los genes *GSH1* y *GSH2*, respectivamente. Por datos del laboratorio sabemos que el gen *GSH1* es esencial, y que la mutante *gsh2 Δ presenta un mejor crecimiento en presencia de glutatión. Estos datos sugieren que *C. glabrata* posee un transportador de glutatión, aunque no tenga los ortólogos de los transportadores de glutatión de *Saccharomyces cerevisiae* (levadura filogenéticamente cercana a *C. glabrata*), Opt1 y Opt2. Para empezar a caracterizar el transporte de glutatión en *C. glabrata*, construimos una biblioteca genómica de esta levadura y realizamos un escrutinio genético con la cepa *gsh1 Δ complementada con el gen *GSH1* en un plásmido, buscando clonas de la librería que permitieran la pérdida del *pGSH1*. En este escrutinio encontramos en un plásmido el gen *GSH1* y en otro los genes contiguos CAGL0A01067g, CAGL0A01045g, CAGL0A01023g y CAGL0A01001g. La caracterización del gen CAGL0A01001g indicó que es el responsable de suprimir la ausencia de *GSH1*.**

PALABRAS CLAVE: *Candida glabrata*, complementación, escrutinio genético librería genómica, sobreexpresión.

Abstract

Identification of glutathione transporter in *Candida glabrata*

Candida glabrata is an opportunistic human fungal pathogen, able to counteract oxidative stress both intrinsic and extrinsic generated by macrophages. Some of defense systems of *Candida glabrata* toward oxidative stress are catalases, superoxide dismutases and peroxidases. Also, glutathione is important for this response. This metabolite is a non-protein thiol essential in almost all eukaryotic organisms, which participates in the detoxification of drugs and metals, and is important for the storage of sulfur and nitrogen. The biosynthesis of glutathione requires two enzymes, the γ -Glutamylcysteine Synthase and Glutathione Synthase, encoded by the *GSH1* and *GSH2* genes, respectively. We know that *GSH1* is an essential gene, and growth of the *gsh2* Δ mutant strain is improved when grown in the presence of glutathione. These results suggest that *Candida glabrata*, despite not having the orthologues Opt1 and Opt2 which are glutathione transporters in *Saccharomyces cerevisiae* (closely phylogenetically related yeast), could have a glutathione transporter which helps to improve its growth. In this study, we constructed a genomic library of *C. glabrata* and developed a genetic screening to identify the glutathione transporter in a *gsh1* Δ strain complemented with the *GSH1* gene in a plasmid. We screened for genomic library plasmid that would allow the *gsh1* Δ p*GSH1* strain loose the covering plasmid. We identified 2 plasmids, one containing the *GSH1* and the second which contains 4 contiguous genes CAGL0A01067g, CAGL0A01045g, CAGL0A01023g y CAGL0A01001g. Further characterization of this plasmid showed that CAGL0A01001g is responsible for suppressing the lose of *GSH1*.

KEY WORDS: *Candida glabrata*, complementation, genetic screening, Genomic library, overexpression.

INTRODUCCIÓN

Candida glabrata es una levadura haploide, no dimórfica, comensal de mucosas en individuos sanos. Sin embargo, puede causar infecciones sistémicas en individuos inmunocomprometidos (Jacobsen *et al.*, 2010). *C. glabrata* ha aumentado su incidencia como agente causal de candidemias, se aísla de entre 20% y 24% del total de estas infecciones (Trick *et al.*, 2002; Pfaller & Diekema, 2007). *C. glabrata* y *Candida albicans*, a pesar de ser organismos muy diferentes, provocan manifestaciones clínicas similares (Kaur *et al.*, 2005). *C. glabrata* está filogenéticamente relacionada con *S. cerevisiae*, una levadura no patógena. Los genomas de estas dos levaduras, muestran un grado de sintenia elevado. El genoma de la cepa CBS138 de *C. glabrata* tiene un tamaño de 12.3 Mb con 13 cromosomas, con un total de 5,283 secuencias codificantes (Kaur *et al.*, 2005).

Se han descrito varios factores de virulencia para *C. glabrata*: 1) adherencia a células epiteliales *in vitro*, capacidad que depende del gen *EPA1* en la cepa BG14 (Castaño *et al.*, 2006); 2) resistencia innata a antifúngicos azólicos, especialmente fluconazol y esta resistencia consiste en la sobreexpresión de transportadores ABC que expulsan el antifúngico al exterior de la célula (Kaur *et al.*, 2005); 3) supervivencia y replicación en macrófagos J774A.1. Al ser fagocitada por el macrófago, en *C. glabrata* se induce la expresión de genes de la familia *YPS* que codifican para aspartil proteasas (Kaur *et al.*, 2007) y genes que codifican enzimas involucradas en la β -oxidación, el ciclo del glioxilato y gluconeogénesis (Lorenz *et al.*, 2004); y 4) resistencia a estrés oxidante. A nivel enzimático, *C. glabrata* contrarresta el daño oxidante con la catalasa (Cuellar *et al.*, 2008), las superóxido dismutasas, las peroxidasas, las

glutarredoxinas y las tiorredoxinas. Asimismo, está reportada la participación de compuestos antioxidantes como el glutatión (GSH) en la respuesta de defensa (Yadav *et al.*, 2011). Este metabolito es un tiol no proteínico presente en casi todos los organismos eucariotes. Las levaduras y hongos filamentosos contienen hasta 10 mM de GSH (Pócsi *et al.*, 2004). En *S. cerevisiae* la biosíntesis de GSH requiere de las enzimas γ -Glutamilcisteína Sintetasa y Glutatión Sintetasa, codificadas por los genes *GSH1* y *GSH2*, respectivamente. Por datos de nuestro laboratorio, sabemos que en *C. glabrata* el gen *GSH1* es esencial y la mutante *gsh2* Δ presenta un crecimiento lento e incrementa su sensibilidad a peróxido de hidrógeno, menadiona y cadmio. El crecimiento de la mutante *gsh2* Δ se mejora en un medio con GSH. Este dato sugiere que *C. glabrata* tiene la posibilidad de incorporar GSH exógeno, probablemente a través de un transportador de GSH. Sin embargo, *C. glabrata* no tiene genes ortólogos a *OPT1* y *OPT2* de *S. cerevisiae*, que codifican para transportadores de oligopéptidos que permiten el transporte de GSH exógeno (Bourbouloux *et al.*, 2000). Consistente con estos datos, la mutante *gsh1* Δ de *C. glabrata* que expresa el gen *S.c.OPT1* de manera episomal, muestra un crecimiento similar a la cepa silvestre en un medio con GSH. Además, disminuye su sensibilidad a peróxido de hidrógeno, menadiona y cadmio.

En este trabajo buscamos identificar las proteínas involucradas en el transporte de GSH. La búsqueda se llevó a cabo por medio de un escrutinio genético con una biblioteca genómica de la cepa silvestre BG14 de *C. glabrata*. Diseñamos y construimos un vector para generar la biblioteca genómica. La estrategia consistió en transformar la biblioteca genómica en la mutante *gsh1* Δ complementada con el gen *GSH1* en un plásmido (pGE59 [p*GSH1-URA3*]) con

el marcador *URA3*. Mediante la subsecuente contraselección del gen *URA3* en medio 5-FOA, buscamos las células que pudieran perder el p*GSH1* debido a la presencia de algún plásmido de la biblioteca genómica, que contenga algún gen que codifique para una molécula que suprima la ausencia de *GSH1*.

MATERIALES Y MÉTODOS

Cepas, plásmidos y oligonucleótidos

Todas las cepas, plásmidos y oligonucleótidos usados en este trabajo se listan en las tablas 1, 2 y 3.

Tabla 1. Cepas de *Escherichia coli* y *Candida glabrata* usadas en este estudio.

Cepa de <i>E. coli</i>				
Cepa		Genotipo		Referencia
DH10B		F ⁻ <i>mcrA</i> Δ (<i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i>) f80 <i>dlacZ</i> Δ <i>M15</i> Δ <i>lacX74 deoR recA1 endA1 araD139</i> Δ (<i>ara,leu</i>)7697 <i>galU galK</i> Γ <i>rpsL nupG</i>		(Calvin & Hanawalt, 1988)
Cepas de <i>C. glabrata</i>				
Cepa	Parental	Genotipo	Comentario	Referencia
BG2	-	Aislado clínico	Ura ⁺	(Fidel <i>et al.</i> , 1996)
BG14	BG2	<i>ura3</i> Δ::Tn903 G418 ^R	Ura ⁻ , Hyg ^S	(B P Cormack and Falkow, 1999)
CGM876	M865	<i>gsh1</i> Δ::hph pGSH1-URA3	Ura ⁺ , Hyg ^R	Colección del laboratorio.
CGM1513	M876	<i>gsh1</i> Δ::hph pAR8 (<i>C.g. CEN ARS NAT1</i>)	Ura ⁻ , Nat ⁺ , Hyg ^R	Este trabajo
CGM1515	M876	<i>gsh1</i> Δ::hph pAR10 (<i>C.g. CEN ARS NAT1 GSH1</i>)	Ura ⁻ , Nat ⁺ , Hyg ^R	Este trabajo
CGM1517	M876	<i>gsh1</i> Δ::hph pAR6 (<i>C.g. CEN ARS NAT1</i>)	Ura ⁺ , Nat ⁺ , Hyg ^R	Este trabajo

CGM1580	BG14	<i>ura3Δ::Tn903 G418^R pAR8 (C.g. CEN ARS NAT1)</i>	Nat ⁺	Este trabajo
CGM1582	BG14	<i>ura3Δ::Tn903 G418^R pAR14 (C.g. CEN ARS NAT1)</i>	Nat ⁺	Este trabajo
CGM1584	BG14	<i>ura3Δ::Tn903 G418^R pAR18 (C.g. CEN ARS NAT1</i> <i>P_{-PGK1}:: CAGL0A01001g:: 3'UTR -CYC1)</i>	Nat ⁺	Este trabajo

Tabla 2. Plásmidos usados en este estudio.

Plásmido	Descripción	Referencia
Plásmidos para la construcción del vector para la biblioteca genómica de <i>C. glabrata</i>		
pGRB2.0	Vector de clonación replicativo <i>C.g.</i> <i>CEN ARS URA3 ori Amp^R</i>	(Domergue et al., 2005)
pGRB2.2	pGRB2.0::P- <i>PGK1</i> :: 3'UTR- <i>CYC1</i>	Laboratorio B. Cormack
pAP636	Vector de clonación <i>sacB</i> Cm ^R Sacarosa ^S	Colección del laboratorio
pAP701	Vector de clonación replicativo <i>S.c.</i> <i>CEN ARS NAT1 URA3 Amp^R</i>	Colección del laboratorio
pGE59	<i>GSH1</i> clonado en pGRB2.0	Colección del laboratorio
pAR1	Fragmento <i>Sac</i> I/ <i>Kpn</i> I de 1.245 Kb de pAP701, clonado en pGRB2.0 digerido con <i>Nde</i> I/ <i>Nsi</i> I, <i>C.g.</i> <i>CEN ARS NAT1 ori Amp^R</i>	Este trabajo

pAR4	Fragmento <i>Sac I/Xba I</i> de 0.558 Kb de pAP636, clonado en pAR1 digerido con <i>Sac I/Sal I</i> , C.g. <i>CEN ARS NAT1 sacB ori Amp^R Sacarosa^S</i>	Este trabajo
Plásmido para la construcción de la biblioteca genómica de <i>C. glabrata</i>		
pAR6	Fragmento <i>Sac I/Sal I</i> de 1.474 Kb de pGRB2.2, clonado en pAR4 digerido con <i>Kpn I/Xba I</i> , C.g. <i>CEN ARS NAT1 P-PGK1 sacB ori Amp^R Sacarosa^S</i>	Este trabajo
Plásmidos obtenidos en el escrutinio genético para el transportador de glutatión		
pAR8	Fragmento de biblioteca genómica de <i>C. glabrata</i> de 7.801 Kb, digerido con <i>Tsp509 I</i> y clonado a pAR6 digerido con <i>EcoR I</i> , C.g. <i>CEN ARS NAT1 P-PGK1 CAGL0A01001g CAGL0A01023g CAGL0A01045g CAGL0A01067g ori Amp^R Sacarosa^R</i>	Este trabajo
pAR10	Fragmento de biblioteca genómica de <i>C. glabrata</i> de 2.941 Kb, digerido con <i>Tsp509 I</i> y clonado a pAR6 digerido con <i>EcoR I</i> , C.g. <i>CEN ARS NAT1 P-PGK1 GSH1 ori Amp^R Sacarosa^R</i>	Este trabajo
Plásmidos para evaluar el gen CAGL0A01001g		
pAR14	Fragmento <i>BamH I</i> de 2.228 kb de pAR8, clonado en pAR6 digerido con <i>BamH I</i> , C.g. <i>CEN ARS NAT1 P-PGK1 ori Amp^R Sacarosa^R</i>	Este trabajo

pAR16	Fragmento <i>Sac</i> I/ <i>Kpn</i> I de 1.024 kb de pGRB2.2, clonado en pAR1 digerido con <i>Sac</i> I/ <i>Kpn</i> I, C.g. <i>CEN ARS NAT1 P_{-PGK1} 3'UTR-_{CYC1} ori Amp^R Sacarosa^R</i>	Este trabajo
pAR18	Fragmento de PCR <i>Xba</i> I/ <i>Xho</i> I (oligonucleótidos #1055, #1056) de 686 pb clonado en pAR16 digerido con <i>Xba</i> I/ <i>Xho</i> I, C.g. <i>CEN ARS NAT1 P_{-PGK1}:: CAGL0A01001g:: 3'UTR -_{CYC1} ori Amp^R Sacarosa^R</i>	Este trabajo

Tabla 3. Oligonucleótidos usados en este estudio.

Oligonucleótido	Nombre	Secuencia (5'-3')	Sitio
Oligonucleótidos usados en el diagnóstico de la clonación del P-<i>PGK1</i>			
14	pUC Rv	TATGTTGTGTGGAATTGTGAGGA	-
165	MCS PGK Fw	GACTCACTATAGGGAATTGG	-
325	P- <i>PGK1</i> <i>EcoR</i> I Rv	GGGAATTCTGTTTTATATTTGTTGTAAAAAGTAG	<i>EcoR</i> I
326	P- <i>PGK1</i> <i>Sac</i> I Fw	GGGGAGCTCCATAAAGCATGGCCTCTTAT	<i>Sac</i> I
Oligonucleótidos para el diagnóstico de la clonación de <i>TEF1::NAT1::CYC1</i> para la construcción de pAR6			
466	Nat-MX4@40 Fw	CCAGTGTCGGGAC	-
467	Nat-MX4@606 Rv	CCTGCCTCTCAG	-
Oligonucleótidos usados para diagnosticar la clonación del gen <i>CAGL0A01001g</i> en pAR6			
604	<i>sacB</i> @181bp Fw	AAAATATCAAGTTCCTGAATT	-
605	<i>sacB</i> @321bp Rv	CAAAGAATGTGGTAGCC	-
Oligonucleótidos usados diagnosticar la presencia del gen <i>GSH1</i> en los plásmidos obtenidos en el escrutinio genético			

798	<i>GSH1@69bp Fw</i>	GGAAAGGGTGTTGAGC	-
799	<i>GSH1@301bp Fw</i>	ATGAACCCTACTCC	-
Oligonucleótidos usados para la construcción del plásmido para sobreexpresar el gen CAGL0A01001g			
1055	<i>SUP1@ATG Xba I Fw</i>	AATTTCTAGAAAAATGTCTGGGCTAGTGAGAGAC	<i>Xba I</i>
1056	<i>SUP1@TGA Xho I Rv</i>	AATTCTAGTTTTCAAATACTGTTG	-

Medios de cultivo

Las cepas de *C. glabrata* se cultivaron en medio YPD. El medio contiene extracto de levadura 10g/L, peptona 20g/L y suplementado con glucosa al 2% y uracilo 25mg/L (Sigma Aldrich®). Al requerirse, se suplementó con nourseotricina a una concentración final de 100 µg/mL (YPD Nat100). Para evaluar la presencia del gen *URA3*, se usó el medio casaminoácidos (CAA), que contiene base nitrogenada de levadura 1.7g/L, sulfato de amonio [(NH₄)₂SO₄] 5g/L, casaminoácidos 6g/L y glucosa 2%. En algunos casos, al medio CAA se le adicionó glutatión (GSH) 0.5 mM y para la contraselección del plásmido *URA3*, se adicionó ácido-5-fluorótico 0.85g/L (5-FOA; Toronto Research Chemicals®) y uracilo 50mg/L. A las cajas con este medio, se les adicionó GSH 0.5 mM. En ocasiones, a este medio con 5-FOA, se le redujo el nitrógeno al 10% y 50%. Las cepas se resguardaron en glicerol 15% a -80°C.

Las cepas de *E. coli* DH10B se crecieron a 30°C en medio Luria-Bertani (LB). El medio contiene extracto de levadura 5g/L, triptona 10g/L y NaCl 5g/L. Todas las construcciones de plásmidos se introdujeron a la cepa DH10B por electroporación, y para la selección se usó carbenicilina a una concentración final de 50µg/mL (LB-Cb50). Para la contraselección de *sacB*, el medio LB-Cb50 no contiene NaCl y se suplementa con sacarosa al 5%. Las cepas se almacenaron en glicerol 10% a -80°C. Para los medios sólidos se añadió agar a concentración final de 1.5%. La biblioteca genómica de *C. glabrata* en *E. coli* se guardó a -80°C en M9 1X con glicerol 10%. La solución M9 5X contiene Na₂HPO₄ 30 g/L, KH₂PO₄ 15 g/L, NH₄Cl 5 g/L, NaCl 2.5 g/L y CaCl₂ 15 mg/L.

Transformación genética de *C. glabrata*

Una modificación del método de transformación con acetato de litio (LiAcO) (Gietz, *et al.*, 1992) se utilizó para transformar a *C. glabrata* con ADN lineal o superenrollado. Las cepas a transformar se crecieron en medio YPD durante toda la noche a 30°C con agitación. Al día siguiente, el cultivo se diluyó 100 veces en medio fresco. El medio inoculado se incubó con agitación a 30°C hasta alcanzar una OD₆₀₀ de 0.8-1.0. Las células se centrifugaron, y se lavaron con agua didestilada estéril. Se concentraron 100 veces con LiAcO 10 mM. Para cada transformación se utilizaron 50 µL de la suspensión de células, 240 µL de polietilenglicol 50% (Fluka Biochemica® (PM 400)) (concentración final ~30%), 36 µL de LiAcO 1M (concentración final ~90 mM), 25 µL de ADN de salmón de cadena sencilla (Invitrogen® 2 mg/mL) desnaturalizado por calor (concentración final ~125 ng/ µL) y el ADN a transformar resuspendido en Tris 10 mM hasta un volumen de 50 µL. La mezcla se incubó a 30°C por 1 hora, después se le agregaron 43 µL de DMSO y se sometió a choque térmico por 15 min a 42°C. Las células se centrifugaron para retirar la mezcla de transformación, y se resuspendieron en 1 mL de YPD. Se recuperaron por 4 horas a 30°C. Se sembraron en cajas de YPD con nourseotricina 100 µg/mL para la selección, y se incubaron 48 horas a 30°C.

Construcción de un vector de clonación con resistencia a nourseotricina

Para hacer la biblioteca genómica de *C. glabrata* se construyó el vector de clonación replicativo pAR6 [Figura S1] (Figura 1). El vector se basa en el plásmido pGRB2.0 (Domergue *et al.*, 2005). Se intercambió el gen *URA3* por el marcador *NAT1* que proviene del pAP701. El gen *NAT1* está bajo el promotor

TEF1 y el terminador *CYC1*. Para eliminar la posibilidad de tener plásmidos vacíos en la biblioteca, se clonó el gen de contraselección *sacB* del plásmido pAP636 en el sitio de clonación múltiple. Para proveer de un promotor de *C. glabrata* extra en el plásmido, se clonó el promotor de *PGK1* del plásmido pGRB2.2.

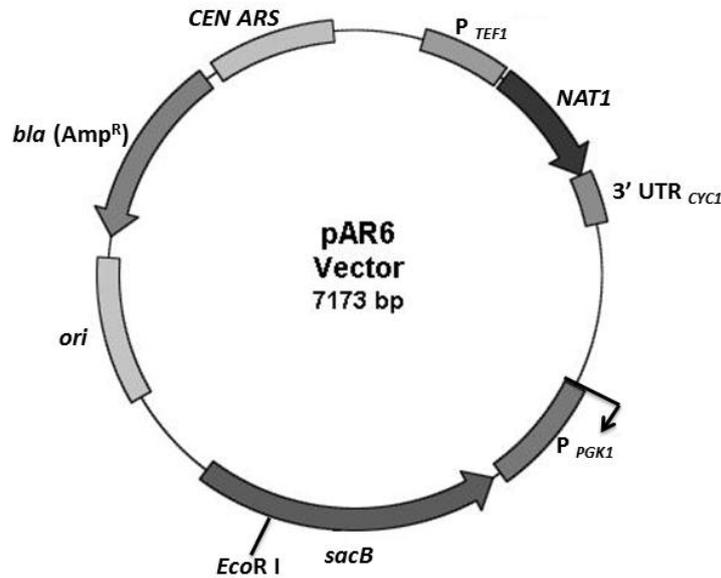


FIGURA 1.- Mapa del vector de clonación replicativo pAR6 derivado del pBR2.0 (Domergue, et al 2005). El vector pAR6 de 7173 pb contiene el gen *NAT1* que confiere resistencia a nourseotricina, en la posición 746-1318 pb, bajo el promotor de *TEF1* y con el terminador de *CYC1*. El promotor fuerte de *PGK* en la posición 2338-2895, promotor para los genes de la biblioteca genómica que no contengan su propio promotor. El gen *sacB*, bajo el promotor de *lacZ*, en la posición 3282-4343. Este gen es el marcador de contraselección en presencia de sacarosa. Un origen de replicación, *ColE1 ori*, ubicado en la posición 4799-5481. Es un origen de replicación unidireccional de *E. coli*, de bajo número de copias (10-30/célula). El gen *bla*, en la posición 5576-6436. Marcador de selección bacteriano que confiere resistencia a carbenicilina., Contiene una secuencia *C.g. CEN ARS*, en la posición 65-664 para la replicación autónoma del plásmido y segregación del mismo. En el único sitio *EcoR I* en la posición 4140, se clonaron los fragmentos de la biblioteca genómica de *C. glabrata*.

Preparación de los insertos del genoma de *C. glabrata*

Para generar los insertos de la biblioteca genómica, se obtuvo ADN genómico de la cepa BG14 (silvestre), 50 µg de ADN genómico en 100 µL de reacción se digirió parcialmente con *Tsp509 I* 0.095 U/µL (New England Biolabs). La digestión se incubó por 1 min 40 seg a 65 °C. (Ausubel *et al.*, 2001). La reacción se detuvo con azul de bromofenol y se cargó en un gel de agarosa al 0.8%. Se purificaron los fragmentos de ADN correspondientes a un tamaño entre 8 a 12 Kb con un kit de purificación de gel (Promega). Se visualizó el ADN purificado en un gel de agarosa 0.8% con bromuro de etidio (Figura 2).

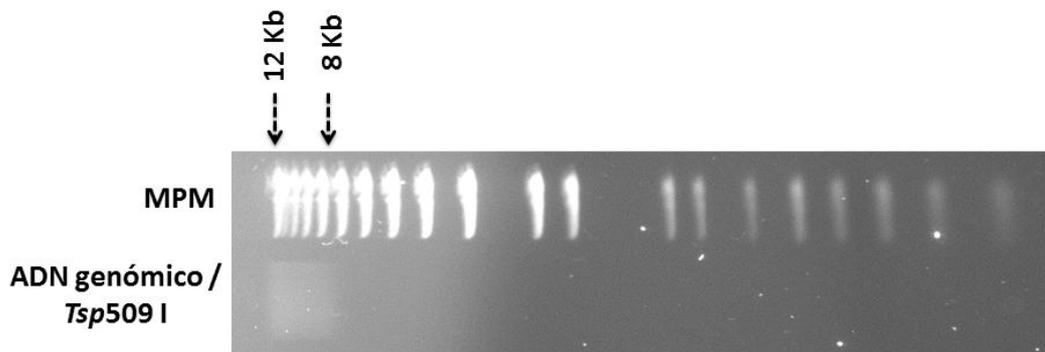


FIGURA 2.- Fragmentos de ADN genómico de *C. glabrata*. ADN genómico purificado de una digestión parcial con *Tsp509 I*, y visualizado en un gel de agarosa al 0.8% con bromuro de etidio. MPM (1 Kb Plus DNA Ladder) marcador de peso molecular. Los fragmentos tienen un tamaño de 8 a 12 Kb.

Construcción de la biblioteca genómica de *C. glabrata* en pAR6

El plásmido pAR6 se digirió con *EcoR* I (las enzimas *EcoR* I y *Tsp509* I dejan sitios compatibles para ligarse) y se trató con 1.5 U de fosfatasa alcalina de intestino de ternera (CIP, New England Biolabs) en 30 μ L de reacción, incubada por 10 minutos a 37°C. La reacción se detuvo con azul de bromofenol y se cargó en un gel de agarosa al 0.8%. El plásmido digerido y desfosforilado se purificó del gel con un kit de purificación (Promega). Un total de 315.2 ng de inserto se ligaron a 100 ng de vector con 400 U de T4 ADN Ligasa (New England Biolabs) en 20 μ L de reacción. La reacción de ligación se incubó a 4°C por 17 horas. La ligación se purificó con fenol:cloroformo:alcohol isoamílico y el ADN se precipitó con etanol. Se realizaron ocho transformaciones con la cepa DH10B de *E. coli*, de las cuales, dos se dividieron a la mitad para la siembra en cajas, y el resto se dividió en tres partes. La selección fue en cajas de LB con carbenicilina 50 μ g/mL y 5% de sacarosa para la contraselección de *sacB* para los plásmidos con inserto. Las colonias transformantes de *E. coli*, se resguardaron como se describe arriba. La biblioteca genómica en *E. coli* se purificó con el kit de Promega.

Cálculo de probabilidad

La probabilidad de la inclusión de un gen particular en la biblioteca genómica se estimó con base en la distribución de Poisson. El número de clonas independientes, **N**, que deben ser analizadas para aislar una secuencia particular con probabilidad **P** está dada por $N = \ln(1 - P) / \ln[1 - (\frac{I}{G})]$, donde **I** es el tamaño promedio del fragmento clonado en pares de bases, y **G** es el tamaño del genoma blanco en pares de bases (Jauert *et al.*, 2005).

Escrutinio genético para el transportador de glutatión en *C. glabrata*.

La biblioteca genómica se transformó en la cepa CGM876 (*gsh1Δ::hph pGSH1-URA3*) de *C. glabrata* con el método modificado de transformación con acetato de litio (LiAcO) (Gietz, *et al.*, 1992). Las transformantes se seleccionaron en cajas de YPD con nourseotricina 100 µg/mL (YPD Nat100) incubadas a 28°C por 2 días. Para evaluar la pérdida del plásmido *pGSH1-URA3* en las transformantes a causa de la complementación o supresión de la mutación en *GSH1*, se realizaron parches de las colonias individuales en cajas de 5-FOA con GSH 0.5 mM y se incubaron a 28°C por 2 días y 4 días a temperatura ambiente.

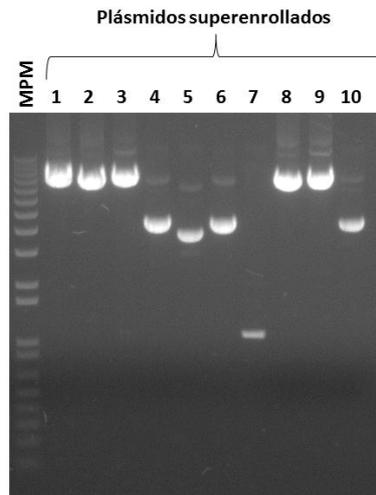
Construcción de las cepas sobreexpresantes del gen CAGL0A01001g

Un producto de PCR de 686 pb que contiene el ORF de CAGL0A01001g con extremos *Xba* I y *Xho* I, se clonó en el vector pAR16 digerido con *Xba* I y *Xho* I. El gen quedó bajo el promotor fuerte de *PGK1*, y la construcción (*P_{-PGK1}::CAGL0A01001g::3'UTR-CYC1*) dio lugar al plásmido pAR18. Este plásmido se transformó en las cepas BG14 y CGM876 (*gsh1Δ::hph pGSH1-URA3*). Se seleccionaron las transformantes en cajas de YPD con nourseotricina 100 µg/mL. La pérdida del plásmido *pGSH1-URA3* de la cepa CGM876 se evaluó con el crecimiento en cajas de 5-FOA con GSH 0.5 mM, incubadas a 30°C por 2 días y a temperatura ambiente por 3 días.

RESULTADOS

Construcción de la biblioteca genómica de *Candida glabrata* en un vector con resistencia a nourseotricina. Para obtener una biblioteca genómica de *C. glabrata*, diseñamos y construimos un nuevo vector de clonación replicativo, pAR6 [Figura S1] (Figura 1), que contiene el marcador de resistencia a nourseotricina, y un sistema de contraselección en sacarosa para las clonas con inserto, además de un promotor fuerte de *C. glabrata*, *PGK1*. Para la obtención de la biblioteca genómica, los fragmentos de *Tsp509 I* de aproximadamente 8 a 12 Kb del ADN genómico de la levadura (Figura 2), se ligaron en el sitio único *EcoR I* del vector (*Tsp509 I* y *EcoR I* son sitios compatibles, ver Materiales y Métodos). Se generaron 4 grupos de 1665 colonias y 16 de 1110 colonias aproximadamente de *E. coli* DH10B, con una combinación total aproximada de 24420 plásmidos independientes. Se seleccionaron 65 transformantes de la biblioteca al azar y los plásmidos se purificaron (Figura 3A), y 10 de ellos se linearizaron con *EcoR I* para verificar presencia de inserto (Figura 3B). De las 24420 colonias que cubren 3.5 veces el genoma de *C. glabrata*, al menos 19912 contienen plásmidos con inserto (81.54%), con un 99% de probabilidad de que la biblioteca contenga un gen específico en un fragmento de 8 Kb del genoma, dado el tamaño del mismo que es de 12.3 Mb (Jauert *et al.*, 2005).

A



B

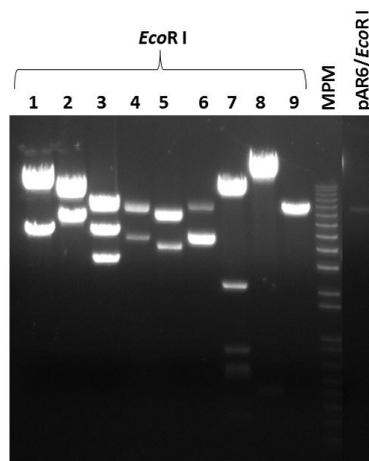
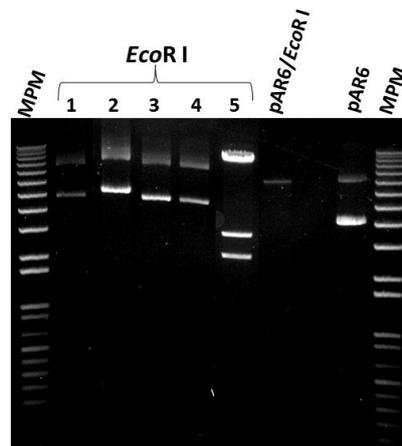


FIGURA 3.- Biblioteca genómica de *C. glabrata* en *E. coli* DH10B. (A) Plásmidos purificados de 10 colonias *E. coli* DH10B. Se visualizaron en un gel de agarosa al 0.8% con bromuro de etidio. MPM, marcador de peso molecular. Carriles 1-10, ADN plasmídico de 10 colonias individuales. (B) Digestión de los plásmidos mostrados en la Figura 3A, con la enzima *EcoR* I., carriles 1 - 9. MPM, marcador de peso molecular, pAR6/*EcoR* I, vector vacío linearizado con *EcoR* I.

Escrutinio genético en *C. glabrata gsh1Δ* para el transportador de glutatión. Con el propósito de identificar el gen o los genes que codifiquen para las proteínas involucradas en el transporte de GSH, desarrollamos un escrutinio genético (Figura S2) en la cepa CGM876 (*gsh1Δ::hph pGSH1-URA3*) con la biblioteca genómica descrita arriba. La cepa no puede perder el plásmido ya que el gen *GSH1* es esencial. La selección de las transformantes con la biblioteca genómica fue en YPD Nat100. Se analizaron 1400 transformantes (colonias). De estas, sólo 7 colonias fueron capaces de crecer en ausencia del *pGSH1-URA3* ya que al transferirse al medio 5-FOA con GSH 0.5 mM, este medio es un compuesto tóxico para células que expresan el gen *URA3*. De las 7 colonias, 2 crecieron a los 2 días de incubación a 28°C, y el resto crecieron 4 días después a temperatura ambiente. Se extrajo plásmido de las 7 colonias de *C. glabrata* y se transformaron individualmente en la cepa DH10B de *E. coli*. Se encontró la presencia del gen *GSH1* por PCR en dos de los 7 plásmidos (datos no mostrados). Se analizaron los patrones de restricción de 5 plásmidos con las enzimas *EcoR* I (Figura 4A), y *Mfe* I y *Sma* I (Figura 4B). Este análisis de restricción indica que se obtuvieron 3 plásmidos diferentes (pAR8, pAR10 y pAR12) en el escrutinio genético. (Figura 4B).

A



B

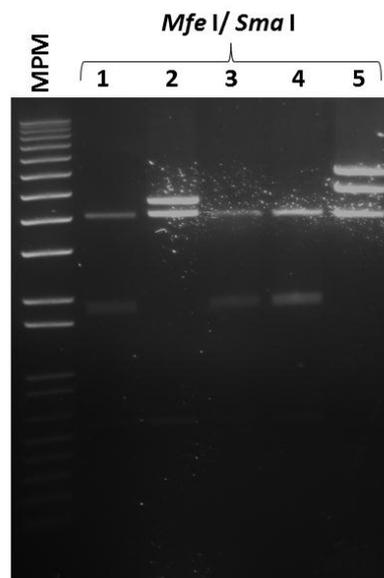
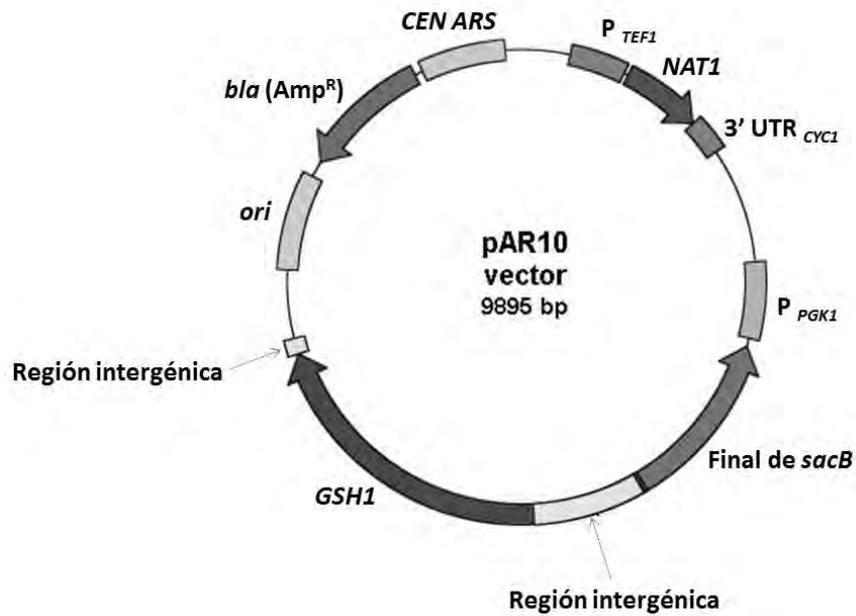


FIGURA 4.- Los 5 plásmidos obtenidos en el escrutinio genético con la biblioteca genómica en la cepa *gsh1Δ pGSH1-URA3*. (A) Digestión con *EcoR* I. MPM, marcador de peso molecular, carriles 1 - 5, (digestión con *EcoR* I), pAR6/*EcoR* I (vector vacío linearizado con *EcoR* I), vector vacío no digerido (pAR6), y MPM (marcador de peso molecular). (B) Digestión con *Mfe* I y *Sma* I. MPM (marcador de peso molecular), carriles 1 - 5, (digestión con *Mfe* I y *Sma* I).

Análisis de las secuencias del inserto en los plásmidos pAR8, pAR10 y pAR12. Para identificar el gen o los genes presentes en el inserto genómico de los plásmidos pAR8, pAR10 y pAR12, se secuenciaron 800 pb de cada extremo del inserto con los oligos #14 y #605. Las secuencias obtenidas se compararon por medio de Blastn en las páginas de Génolevures y *Saccharomyces* Genome Database (SGD). Los plásmidos pAR10 (Figura 5A) y pAR12 contienen un inserto que contiene el gen *GSH1*, en cambio, el inserto del plásmido pAR8 (Figura 5B), contiene un fragmento que lleva los genes CAGL0A01067g, CAGL0A01045g, CAGL0A01023g y CAGL0A01001g. Estos genes son ortólogos a los genes de *S. cerevisiae*, *KEL3*, *FUM1*, *NMA1* y YLR326w, respectivamente. *KEL3*, es un gen que codifica para una proteína citoplasmática de función desconocida, la cual contiene repetidos KELch. *FUM1* codifica para la enzima fumarasa del ciclo de Krebs, que convierte el ácido fumárico a ácido L-málico. El gen *NMA1* codifica para la enzima ácido nicotínico mononucleótido adenil transferasa que participa en la biosíntesis de NAD; y YLR326w, gen que corresponde a CAGL0A01001g en *C. glabrata*. Este es un ORF no caracterizado que posee dos dominios transmembranales.

A



B

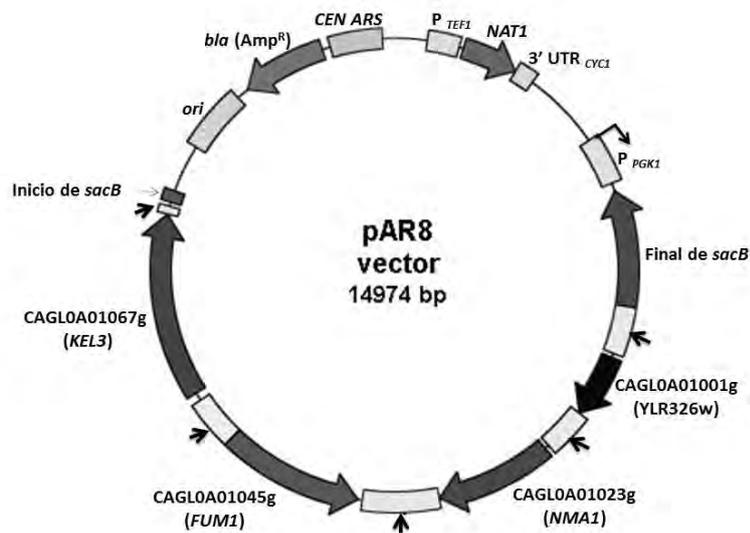


FIGURA 5.- Mapas de los plásmidos obtenidos en el escrutinio genético con la biblioteca genómica de *C. glabrata*. (A) Plásmido pAR10 de 9895 pb, contiene un inserto de 2941 pb, en el cual se encuentra el gen *GSH1* en la posición

4905-6941. El gen tiene un tamaño de 2037 pb, ubicado en el cromosoma L del genoma de *C. glabrata*. Las flechas indican las regiones intergénicas, las cuales forman parte del inserto. Los demás componentes del plásmido están descritos en la Figura 1. (B) Plásmido pAR8 de 14974 pb, contiene un inserto de 7801 pb. Contiene los genes CAGL0A01067g, CAGL0A01045g, CAGL0A01023g y CAGL0A01001g, genes ortólogos a *KEL3*, *FUM1*, *NMA1* y YLR326w de *S. cerevisiae*. CAGL0A01067g (*KEL3*), gen de 1926 pb en la posición 9900-11825. CAGL0A01045g (*FUM1*), de 1452 pb en la posición 7899-9350. CAGL0A01023g (*NMA1*), tiene un tamaño de 1236 pb, ubicado en la posición 5827-7062. El gen YLR326w (CAGL0A01001g) en la posición 4676-5335, con un tamaño de 660 pb. Las flechas negras indican a las regiones intergénicas del inserto.

El plásmido pAR10 complementa la mutación de *GSH1* en la cepa *gsh1Δ* y pAR8 la suprime. Para determinar si los plásmidos individuales pAR8 y pAR10 pueden suprimir y complementar respectivamente la mutación en el gen *GSH1*, cada uno se transformó en la cepa CGM876 (*gsh1Δ::hph pGSH1-URA3*) como en el experimento que se describió anteriormente (Figura S2). Los controles de crecimiento fueron las cepas CGM876 (*gsh1Δ::hph pGSH1-URA3*); BG2 (Ura⁺); y BG14 (Ura⁻). Se analizaron 2 colonias transformantes para cada plásmido. Se observó crecimiento de las cepas *gsh1Δ* pAR10 y *gsh1Δ* pAR8 en medio 5-FOA con GSH 0.5 mM y ausencia de crecimiento en medio sin uracilo (CAA) confirmando la pérdida del p*GSH1*. La presencia de los plásmidos pAR8 y pAR10 permiten que el p*GSH1-URA3* se pierda y puedan crecer en este medio. La cepa *gsh1Δ* pAR10 presenta mayor crecimiento que la cepa *gsh1Δ* pAR8 consistente con el dato de que el plásmido pAR10 (*GSH1*) está complementando a la cepa *gsh1Δ*. En cambio, el plásmido pAR8 que no lleva el gen *GSH1* está suprimiendo la ausencia de *GSH1*. Además, la cepa que contiene a pAR8 presenta crecimiento en CAA, que indica que algunas células de la población aún no han perdido el plásmido p*GSH1-URA3* (Figura S3).

El crecimiento de la cepa *gsh1Δ* mejora al sobreexpresar el gen CAGL0A01001g (YLR326w). Del plásmido pAR8 decidimos caracterizar el gen CAGL0A01001g de manera individual, al cual a partir de aquí llamamos *GMS*. Subclonamos *GMS* en un plásmido con su propio promotor (pAR14) y también subclonamos su ORF en un plásmido bajo el promotor fuerte del gen *PGK1* (pAR18) para sobreexpresarlo. Los plásmidos se transformaron en la cepa CGM876 (*gsh1Δ pGSH1-URA3*). Se seleccionaron las transformantes en YPD Nat100, y dos colonias de cada transformación se analizaron en el medio 5-

FOA a diferentes concentraciones de nitrógeno (10% y 50%) con GSH 0.5 mM (Figura 6). La cepa sobreexpresante de *GMS* (*gsh1Δ* pAR18) presenta un crecimiento más rápido que las cepas *gsh1Δ* pAR8 y *gsh1Δ* pAR14 en los medios 5-FOA reducido en nitrógeno al 10% y al 50% (Figuras 6C y 6D). Las cepas *gsh1Δ* pAR8 y *gsh1Δ* pAR14 si logran crecer, y se observa este crecimiento a los 6 días de incubación (Figura S4).

A

YPD Nat100

gsh1 Δ /pCAGL0A01001g

CAGL0A01023g

CAGL0A01045g

CAGL0A01067g

gsh1 Δ /vector

gsh1 Δ /p*GSH1*



gsh1 Δ /p
CAGL0A01001g



gsh1 Δ /p
P-_{PGK1} CAGL0A01001g



B

5-FOA GSH 0.5 mM

gsh1Δ/pGSH1

BG2 (Ura⁺)

BG14 (Ura⁻)

gsh1Δ/vector



gsh1Δ/pCAGL0A01001g

CAGL0A01023g

CAGL0A01045g

CAGL0A01067g

gsh1Δ/p

CAGL0A01001g

gsh1Δ/p

P-_{PGK1} CAGL0A01001g



C

5-FOA rN 10% GSH 0.5 mM

gsh1Δ/pGSH1



BG2 (Ura⁺)



BG14 (Ura⁻)



gsh1Δ/vector



gsh1Δ/pCAGL0A01001g

CAGL0A01023g
CAGL0A01045g
CAGL0A01067g



gsh1Δ/p
CAGL0A01001g



gsh1Δ/p
P_{-PGK1} CAGL0A01001g



D

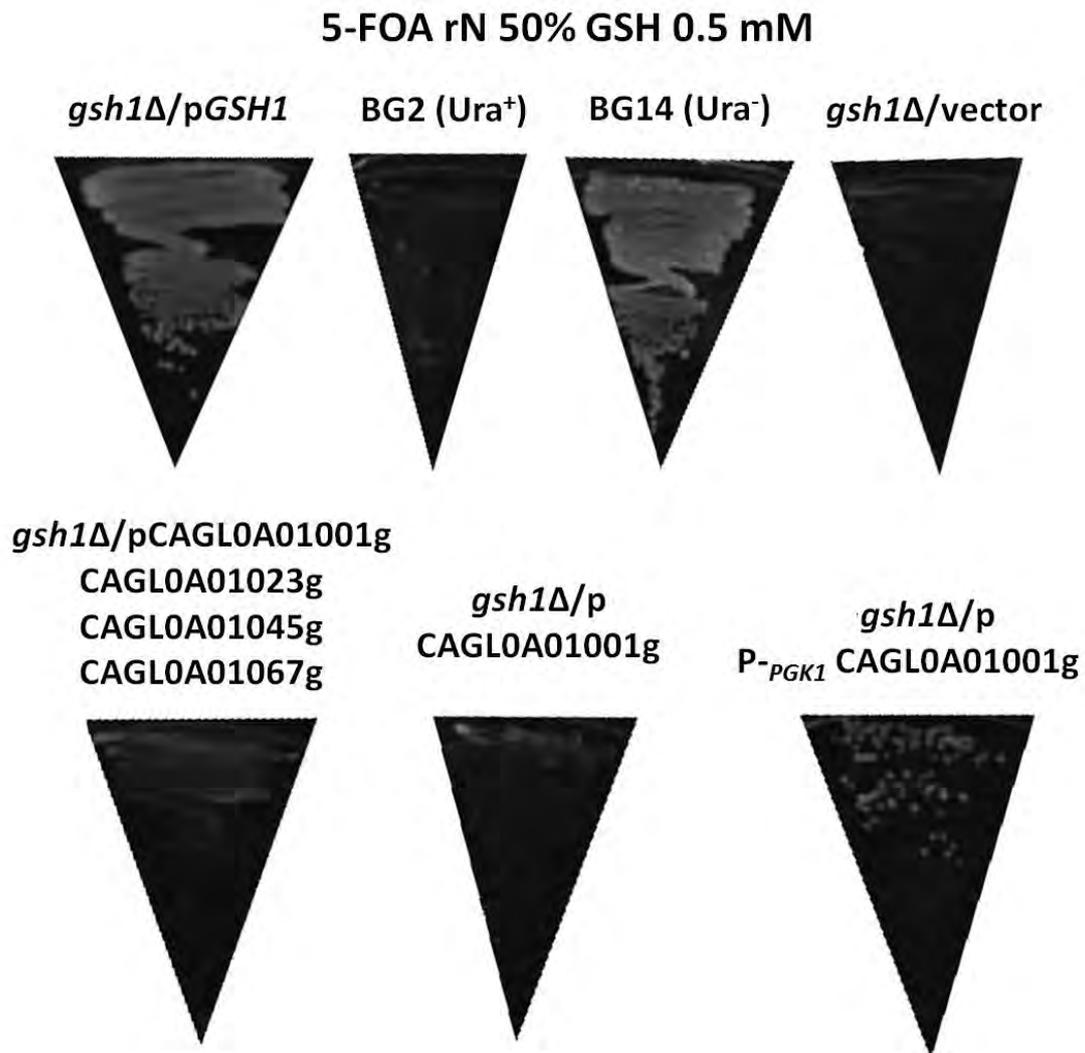


FIGURA 6.- Crecimiento de la cepa *gsh1Δ* con los plásmidos pAR8, pAR14 y pAR18. La cepa *gsh1Δ* complementada con *pGSH1-URA3*, se transformó con los plásmidos pAR8, pAR14 y pAR18. El pAR8 es el plásmido que resultó del escrutinio genético, contiene los genes CAGL0A01067g, CAGL0A01045g, CAGL0A01023g y CAGL0A01001g, genes ortólogos a *KEL3*, *FUM1*, *NMA1* y YLR326w de *S. cerevisiae*. El pAR14 tiene clonado el gen *GMS* (CAGL0A01001g) bajo su propio promotor, y el pAR18 lo contiene bajo el promotor fuerte de *PGK1*. Se eligieron 2 colonias por plásmido, y se crecieron

por 2 días a 30°C en cajas con medio 5-FOA, o 5-FOA reducido en Nitrógeno al 10% (5-FOA rN 10%) y 50% (5-FOA rN 50%), en presencia de GSH 0.5 mM. Como controles se usaron las cepas BG2 (Ura⁺), BG14 (Ura⁻), *gsh1Δ* vector (pAR6) y *gsh1Δ* pAR10 (pGSH1-NAT1). (A) Crecimiento en medio YPD Nat100 de las colonias transformantes, junto con los controles *gsh1Δ* vector y *gsh1Δ* pAR10. (B) Crecimiento en medio 5-FOA con GSH 0.5 mM. (C) Crecimiento en medio 5-FOA reducido en Nitrógeno al 10% con GSH 0.5 mM. (D) Medio 5-FOA reducido en Nitrógeno al 50% con GSH 0.5 mM.

DISCUSIÓN

Para *C. glabrata*, como patógeno oportunista, es muy importante la respuesta de protección al estrés oxidante generado por las células fagocíticas, tales como los macrófagos, células dendríticas y neutrófilos; las cuales actúan para eliminar a los patógenos (Seider *et al.*, 2011). Estas células, al reconocer un microorganismo patógeno, lo engullen por fagocitosis exponiéndolo a un ambiente hostil, con enzimas hidrolíticas, pH ácido, especies reactivas de oxígeno (ROS), en las cuales se incluyen el superóxido, peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y radicales hidroxilo (Cuéllar-Cruz *et al.*, 2008).

C. glabrata puede sobrevivir e incluso replicarse dentro de los macrófagos después de ser engullida (Kaur *et al.*, 2007). Un factor importante para su supervivencia en el fagosoma, es que posee una alta resistencia intrínseca a estrés oxidante en comparación con *S. cerevisiae*, e incluso, en comparación con *C. albicans* (Cuéllar-Cruz *et al.*, 2008). *C. glabrata* contrarresta el daño oxidante con la catalasa, las superóxido dismutasas, las peroxidasas, las glutarredoxinas y las tiorredoxinas (Roetzer *et al.*, 2010). Entre los mecanismos no enzimáticos se incluye el glutatión, el cual, se ha demostrado que en *S. cerevisiae* juega un papel importante en la respuesta a H_2O_2 (Izawa *et al.*, 1995).

La función del glutatión en *C. glabrata* se está estudiando en nuestro laboratorio, y sabemos que una mutación en el gen *GSH1*, conduce a una auxotrofia a glutatión que lo hace esencial, y que mutantes en *GSH2*, a diferencia de la cepa silvestre, crecen lento y son más sensibles a diferentes agentes generadores de estrés oxidante, tales como H_2O_2 , menadiona y cadmio. Sin embargo, la velocidad de crecimiento y la resistencia a estos

agentes oxidantes aumenta, al crecerlas en un medio con glutatión. Aún no se ha descrito un transportador de glutatión en *C. glabrata*, sin embargo, la evidencia apunta a que si existe. En este trabajo, desarrollamos una biblioteca genómica de *C. glabrata*, precisamente como herramienta para tratar de encontrar dicho transportador.

La biblioteca genómica se construyó en un nuevo vector con resistencia al antibiótico nourseotricina, debido a que necesitábamos un vector con un marcador diferente al que contenía la cepa receptora (*gsh1Δ*), la cual está complementada con *GSH1* en un plásmido con marcador *URA3*. El vector contiene el gen *sacB*, para la contraselección en sacarosa de clonas con inserto, de esta manera se incrementa la eficiencia de clonación al seleccionar positivamente a las transformantes.

Basados en que al menos 19,912 colonias poseen inserto genómico en la biblioteca, se cubren aproximadamente 2.8 veces el genoma de *C. glabrata*, ya que si consideramos un inserto de 8 Kb y una probabilidad del 99% de encontrar un gen específico en ese inserto, se necesitan 7,078 clonas para cubrir una vez todo el genoma de la levadura. Consideramos que la representatividad del genoma pudo haber sido mayor que 2.8 veces, si se hubiesen considerado tamaños menores a 12 kb de los insertos, ya que el inserto más grande de los plásmidos encontrados en el escrutinio, es de 7.801 kb. Los otros dos plásmidos poseen insertos de aproximadamente 3 Kb, y no se encontraron completos, por lo que se pudiera pensar que se haya perdido una parte de la secuencia del inserto genómico junto con la del vector. Jauert *et al.*, (2005) reportaron la construcción de una biblioteca genómica de *S. cerevisiae*, en la cual, el tamaño de los insertos fue de 6-10 Kb, representando

5 veces el tamaño completo del genoma. Sin embargo, nosotros logramos validar la biblioteca genómica y el escrutinio genético al encontrar el gen *GSH1* en más de un plásmido (pAR10 y pAR12).

Se evaluó la capacidad del plásmido pAR10 (p*GSH1*) para complementar a la cepa CGM876 (*gsh1Δ*), y se observó que el plásmido si es capaz de complementar a la cepa mutante en *GSH1* (Figura S3), permitiendo la pérdida del plásmido (p*GSH1-URA3*) que la complementaba inicialmente. Además de los plásmidos con *GSH1*, encontramos un tercero (pAR8), que contenía 4 genes, en *S. cerevisiae* *KEL3*, *FUM1*, *NMA1* y YLR326w. Este mostró capacidad de suprimir la mutación *gsh1Δ*, aunque en algunas células no se logró perder el plásmido p*GSH1-URA3*. Mostramos mayor interés en el gen YLR326w (CAGL0A01001g), al cual llamamos *GMS*. Este gen en *S. cerevisiae* codifica para una proteína de 240 aminoácidos de función desconocida con dos dominios transmembranales, que tiene interacciones con permeasas o transportadores, tales como *MUP1*, una permeasa de metionina de alta afinidad, también involucrada en captación de cisteína; *HNM1*, transportador de colina/etanolamina; *TPO1*, transportador de poliamina, que reconoce espermina, putrescina y espermidina; *FTR1*, permeasa de hierro de alta afinidad; entre otros. La proteína de *GMS* no tiene características estructurales de transportador, sin embargo, podría tener alguna participación con el posible transportador para internalizar el glutatión a la célula.

Evaluamos la capacidad del gen YLR326w, en *C. glabrata*, CAGL0A01001g (*GMS*), para suprimir la mutación de *GSH1* en la cepa CGM876. Se clonó en un plásmido individualmente, ya sea bajo su propio promotor (pAR14) o bajo el promotor fuerte de *PGK1* para sobreexpresarlo (pAR18). Se realizó el ensayo

de resistencia a 5-FOA con GSH 0.5 mM reducido en nitrógeno al 10% o 50%. El crecimiento de la cepa sobreexpresante es más rápido en comparación con aquellas que no lo sobreexpresan. Esto sugiere que la expresión del gen *GMS* está regulado de tal forma que en las condiciones de crecimiento en el laboratorio no se expresa lo suficiente ya que no se pudo obtener la mutante en el gen *GSH1* (*gsh1Δ*) en presencia de glutatión. El incremento en el crecimiento en condiciones limitantes de nitrógeno indica que el promotor de *GMS* o del gen que codifique al transportador de glutatión está controlado por la utilización de nitrógeno. Se podría estar activando el gen *GMS*, cuando la célula detecta bajos niveles de nitrógeno, y la proteína generada pudiera ser que interaccionara directa o indirectamente con el transportador activando la entrada de glutatión a la célula que carece de *GSH1*, permitiéndole así crecer (Figura 7). Ya se ha reportado que algunos miembros de los transportadores *OPT* de *C. albicans* son inducidos durante condiciones limitantes de nitrógeno (Lubkowitz *et al.*, 1997; Reuss & Morschhauser, 2006). Así también, *isp41* de *S. pombe*, se induce en condiciones de limitación de nitrógeno y durante la esporulación (Lubkowitz *et al.*, 1998; Sato *et al.*, 1994).

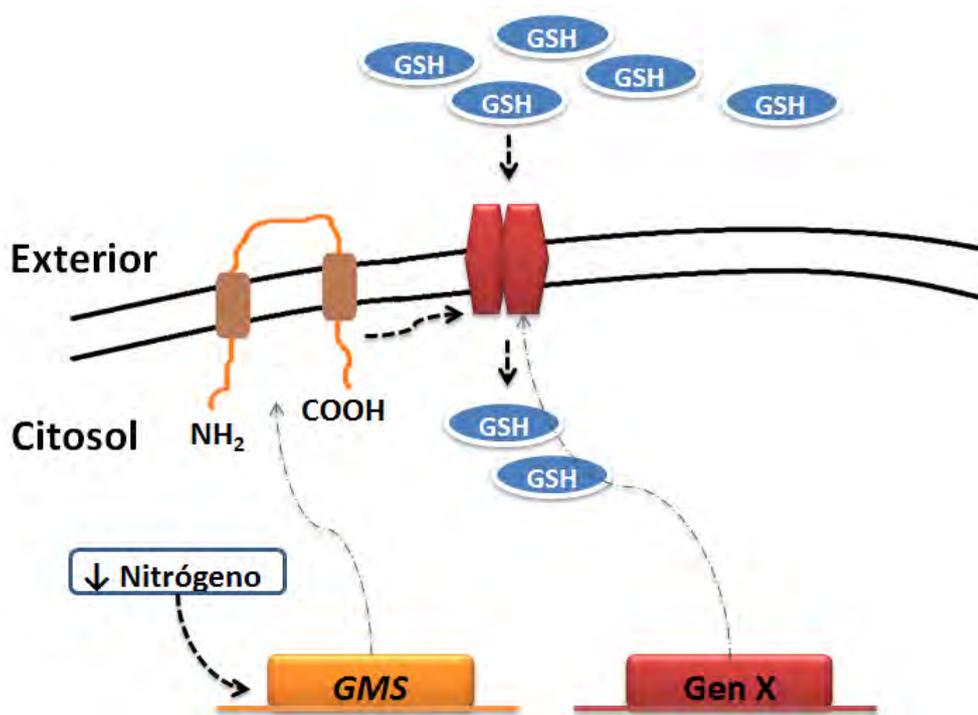


FIGURA 7.- Modelo propuesto para la supresión de la mutación en *GSH1* de *C. glabrata*. La cepa mutante en *GSH1* que sobreexpresa el gen *GMS* (CAGL0A01001g) episomalmente, incrementa su crecimiento en medio limitante de nitrógeno, esta figura muestra el modelo propuesto para explicar el fenotipo. El agotamiento de nitrógeno activa al gen *GMS*, produciéndose la proteína que a su vez podría interactuar con la proteína responsable del transporte de glutatión. O bien, la limitación de nitrógeno podría estar activando directamente al gen que codifica para la proteína que transporta el metabolito. Ambas vías permiten la entrada de glutatión al interior de la célula.

Se pretende evaluar si la sobreexpresión del gen *GMS* (CAGL0A01001g) en la cepa BG14 (silvestre) permite que se obtenga la mutación del gen *GSH1* en el cromosoma bajo condiciones limitantes de nitrógeno. Además, pretendemos analizar utilizando el sistema de dos híbridos, si la proteína de *GMS* interacciona con alguna proteína responsable del transporte de glutatión hacia el interior de la célula.

REFERENCIAS

- Ausubel, F., Brent, R., Kingston, R. E., Moore, D. D., Seidman, J., Smith, J. and Struhl, K., 2001. *Current Protocols in Molecular Biology*. Wiley and Sons, Inc., New York, N Y.
- Bourbouloux, A., Shahi, P., Chakladar, A, Delrot, S., and Bachhawat, A. K., 2000. Hgt1p, a high affinity glutathione transporter from the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *The Journal of biological chemistry*, 275(18), 13259-65.
- Castaño, I., Cormack, B., and Peñas, A. D. L., 2006. Artemisa Virulencia del hongo patógeno oportunista *Candida*. 48 (2), 66-69.
- Cormack, B. P., and Falkow, S., 1999. Efficient homologous and illegitimate recombination in the opportunistic yeast pathogen *Candida glabrata*. *Genetics*, 151(3), 979-87.
- Cuéllar-Cruz, M., Briones-Martin-del-Campo, M., Cañas-Villamar, I., Montalvo-Arredondo, J., Riego-Ruiz, L., Castaño, I., and De Las Peñas, 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. *Eukaryotic cell*, 7(5), 814-25.
- Domergue, R., Castaño, I., De Las Peñas, A., Zupancic, M., Lockett, V., Hebel, J. R., Johnson, D., 2005. Nicotinic acid limitation regulates silencing

of *Candida* adhesins during UTI. *Science* (New York, N.Y.), 308(5723), 866-70.

Fidel, P. L., Vazquez, J. a, and Sobel, J. D., 1999. *Candida glabrata*: review of epidemiology, pathogenesis, and clinical disease with comparison to *C. albicans*. *Clinical microbiology reviews*, 12(1), 80-96.

Gietz, D., St Jean, A., Woods, R. A., and Schiestl, R. H., 1992. Improved method for high efficiency transformation of intact yeast cells. *Nucleic acids research*, 20(6), 1425.

Izawa, S., Inoue, Y., & Kimura, a., 1995. Oxidative stress response in yeast: effect of glutathione on adaptation to hydrogen peroxide stress in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS letters*, 368(1), 73-6.

Jacobsen, I. D., Brunke, S., Seider, K., Schwarzmüller, T., Firon, A., d' Enfert, C., Kuchler, K. and Hube, B., 2010. *Candida glabrata* persistence in mice does not depend on host immunosuppression and is unaffected by fungal amino acid auxotrophy. *Infection and immunity*, 78(3), 1066-77.

Jauert, P. a, Jensen, L. E., and Kirkpatrick, D. T., 2005. A novel yeast genomic DNA library on a geneticin-resistance vector. *Yeast* (Chichester, England), 22(8), 653-7.

Kaur, R., Domergue, R., Zupancic, M. L., and Cormack, B. P., 2005. A yeast by any other name: *Candida glabrata* and its interaction with the host. *Current opinion in microbiology*, 8(4), 378-84.

- Kaur, R., Ma. B., and Cormack, B. P., 2007. A family of glycosylphosphatidylinositol-linked aspartyl proteases is required for virulence of *Candida glabrata*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 104(18), 7628-33.
- Lorenz, M. C., Bender, J. A., and Fink, G. R., 2004. Transcriptional Response of *Candida albicans* upon Internalization by Macrophages. Society, 3(5), 1076-1087.
- Lubkowitz MA, Hauser, L., Breslav, M., Naider, F. and Becker J. M., 1997. An oligopeptide transport gene from *Candida albicans*. Microbiology 143, 387-396.
- Lubkowitz M. A., Barnes D., Breslav M., Burchfield A, Naider F. and Becker J.M., 1998. *Schizosaccharomyces pombe* isp4 encodes a transporter representing a novel family of oligopeptide transporters. Mol Microbiol 28: 729–741.
- Pócsi, I., Prade, R. a, and Penninckx, M. J., 2004. Glutathione, altruistic metabolite in fungi. Advances in microbial physiology, 49(04), 1-76.
- Reuss O &Morschhauser J (2006) A family of oligopeptide transporters is required for growth of *Candida albicans* on proteins. Mol Microbiol 60: 795–812
- Roetzer, A., Gratz, N., Kovarik, P., and Schüller, C., 2010. Autophagy supports *Candida glabrata* survival during phagocytosis. Cellular microbiology, 12(2), 199-216.

- Sato, S., Suzuki, H., Widyastuti, U., Hotta, Y., and Tabata, S., 1994. Identification and characterization of genes induced during sexual differentiation in *Schizosaccharomyces pombe*. *Curr Genet* 26: 31–37.
- Seider, K., Brunke, S., Schild, L., Wilson, D., Majer, O., Barz, D., Haas, A., *et al.*, 2011. The Facultative Intracellular Pathogen *Candida glabrata* Subverts Macrophage Cytokine Production and Phagolysosome Maturation. *The Journal of Immunology*.
- Trick, W. E., S. K. Fridkin, J. R. Edwards, R. A. Hajjeh, R. P. Gaynes, and the National Nosocomial Infections Surveillance System Hospitals. 2002. Secular trend of hospital-acquired candidemia among intensive care unit patients in the United States during 1989–1999. *Clin. Infect. Dis.* 35:622–630.
- Yadav, A. K., Desai, P. R., Rai, M. N., Kaur, R., Ganesan, K., and Bachhawat, A. K., 2011. Glutathione biosynthesis in the yeast pathogens *Candida glabrata* and *Candida albicans*: essential in *C. glabrata*, and essential for virulence in *C. albicans*. *Microbiology (Reading, England)*, 157(Pt 2), 484–95.

FIGURAS SUPLEMENTARIAS

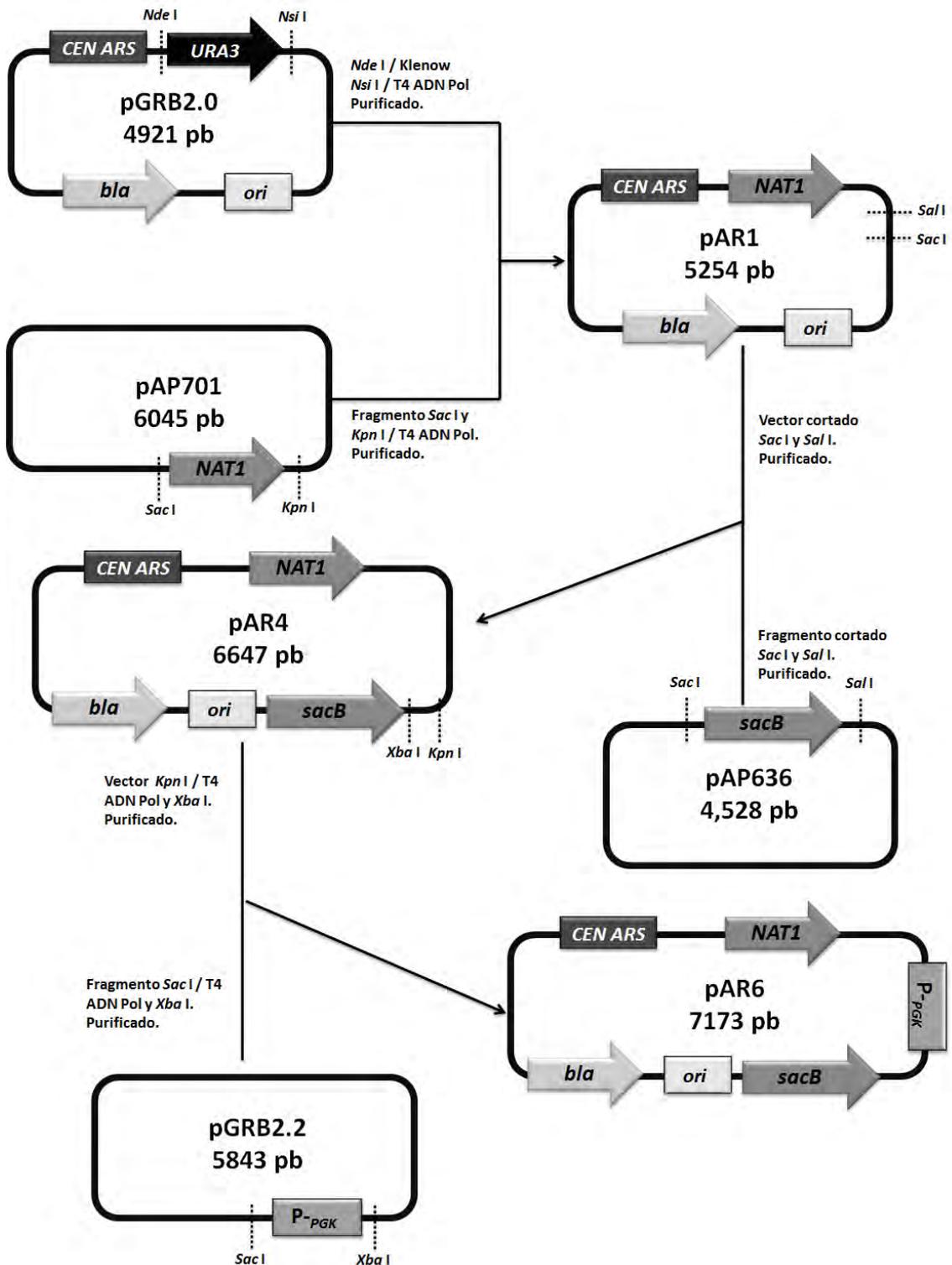


Figura S1 Esquema general de la construcción del vector de clonación replicativo pAR6. El vector pGRB2.0 se digirió con *Nde I* y *Nsi I* para liberar el

gen *URA3*. Se generaron extremos romos con las enzimas *klenow* y T4 ADN Polimerasa, respectivamente. El vector pAP701 se digirió con las enzimas *Sac* I y *Kpn* I para obtener el gen *NAT1*. Al fragmento se le generaron extremos romos con T4 ADN Polimerasa. Tanto el vector como el inserto se purificaron y se ligaron con T4 ADN Ligasa. El plásmido resultante, pAR1, se digirió con *Sac* I y *Sal* I al igual que el vector pAP636. De este último se obtuvo el gen de contraselección *sacB*. El vector (pAR1) y el inserto (*sacB*) se purificaron y se ligaron, dando lugar a el vector pAR4. A este vector se le subclonó el promotor constitutivo de la 3-fosfoglicerato cinasa, *PGK1*, el cual se obtuvo de la digestión del vector pGRB2.2 con las enzimas *Sac* I y *Xba* I. El extremo generado por *Sac* I se trató con T4 ADN Polimerasa para convertirlo en romo. El vector pAR4 se digirió con *Xba* I y *Kpn* I. El extremo *Kpn* I se convirtió en romo con T4 ADN Polimerasa. Se purificaron el vector y el fragmento que corresponde al promotor de *PGK1*, y se ligaron. Con esta última subclonación se originó el vector pAR6.

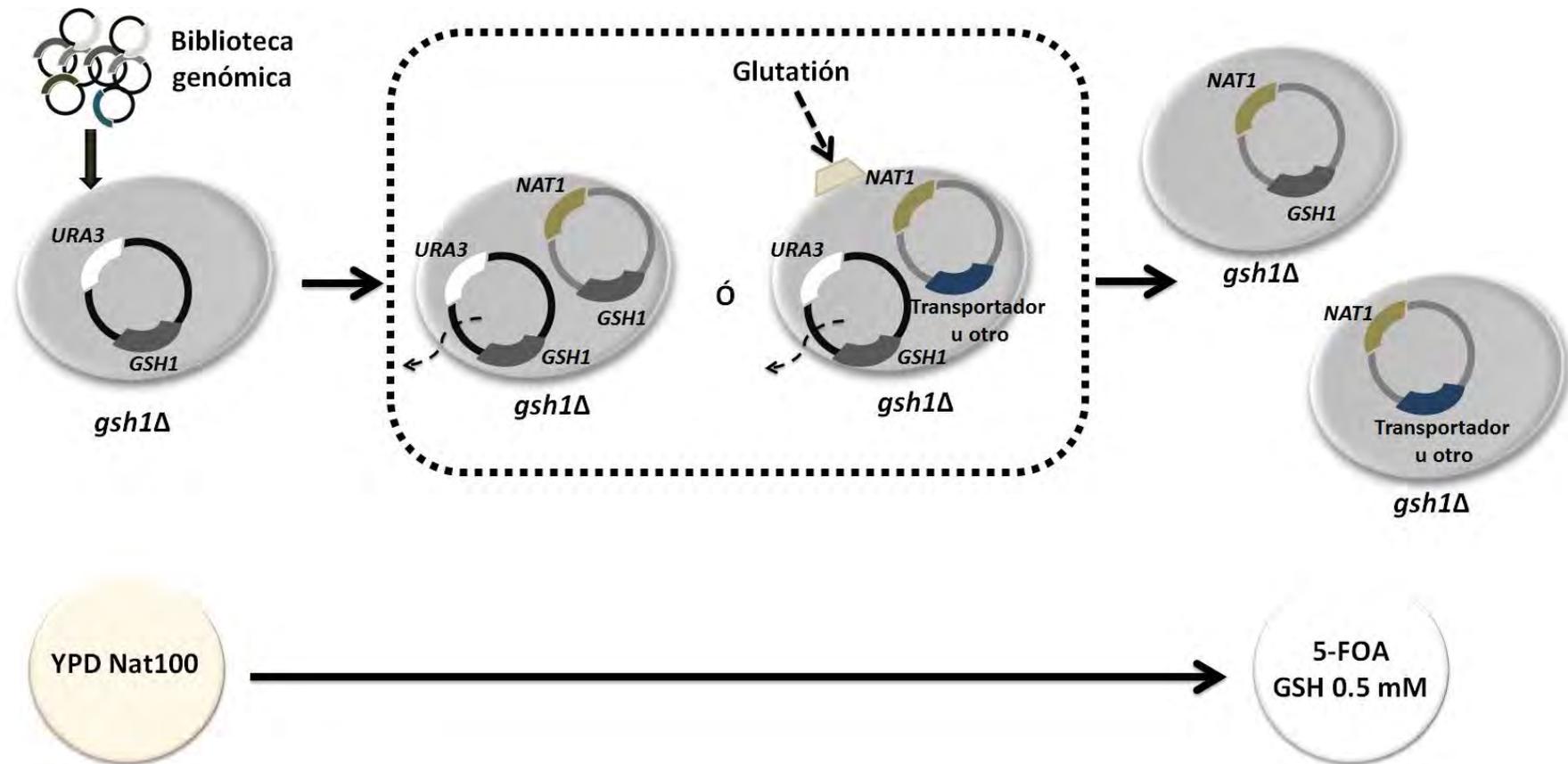


Figura S2 Estrategia general para el escrutinio genético en la cepa *gsh1Δ* de *C. glabrata* con la biblioteca genómica. Transformación de la biblioteca genómica en la mutante *gsh1Δ* (CGM876) complementada con *pGSH1-URA3* (pGE59). El medio

de selección para las transformantes con los plásmidos de la biblioteca genómica fue YPD con nourseotricina 100 µg/mL (YPD Nat100). En el recuadro punteado se muestran las maneras en las que la cepa *gsh1Δ* p*GSH1-URA3* podría perder el plásmido que complementa la mutación en *GSH1*. Sólo los plásmidos de la biblioteca que contengan el gen *GSH1* o algún otro gen involucrado en el transporte de glutatión (GSH), permitirá el crecimiento de las colonias, facilitando la pérdida del plásmido p*GSH1-URA3* en un fondo *gsh1Δ*. La selección de éstas colonias es en un medio 5-FOA con GSH 0.5 mM. La flecha gruesa discontinua indican la entrada de glutatión extracelular por la presencia del gen que codifica para un transportador de éste metabolito, o bien algún gen involucrado en su transporte. Las flechas delgadas discontinuas indican la salida del plásmido p*GSH1-URA3*.

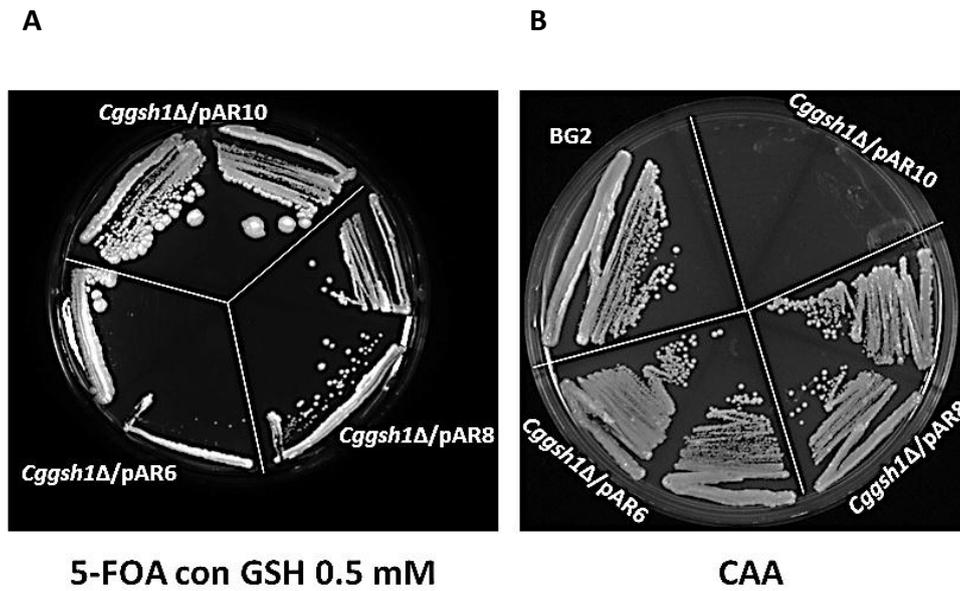


Figura S3 Los plásmido pAR10 y pAR8 complementan y suprimen respectivamente la mutación en *GSH1* de la cepa CGM876 (*gsh1Δ*). La mutante en *GSH1* complementada con p*GSH1-URA3* fue transformada con los plásmidos pAR6 (vector vacío), pAR8 y pAR10. La selección fue en el medio YPD con nourseotricina 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Dos transformantes independientes con cada uno de los plásmidos se crecieron en medio 5-FOA con GSH 0.5 mM. Estas mismas colonias se crecieron en medio CAA, junto con la cepa control BG2 (*Ura*⁺). (A) Crecimiento de las colonias en medio 5-FOA con GSH 0.5 mM, incubadas 2 días a 28°C y 4 días a temperatura ambiente. (B) Crecimiento en cajas con CAA, incubación de 2 días a 28°C y 1 día a temperatura ambiente.

5-FOA rN 50% GSH 0.5 mM

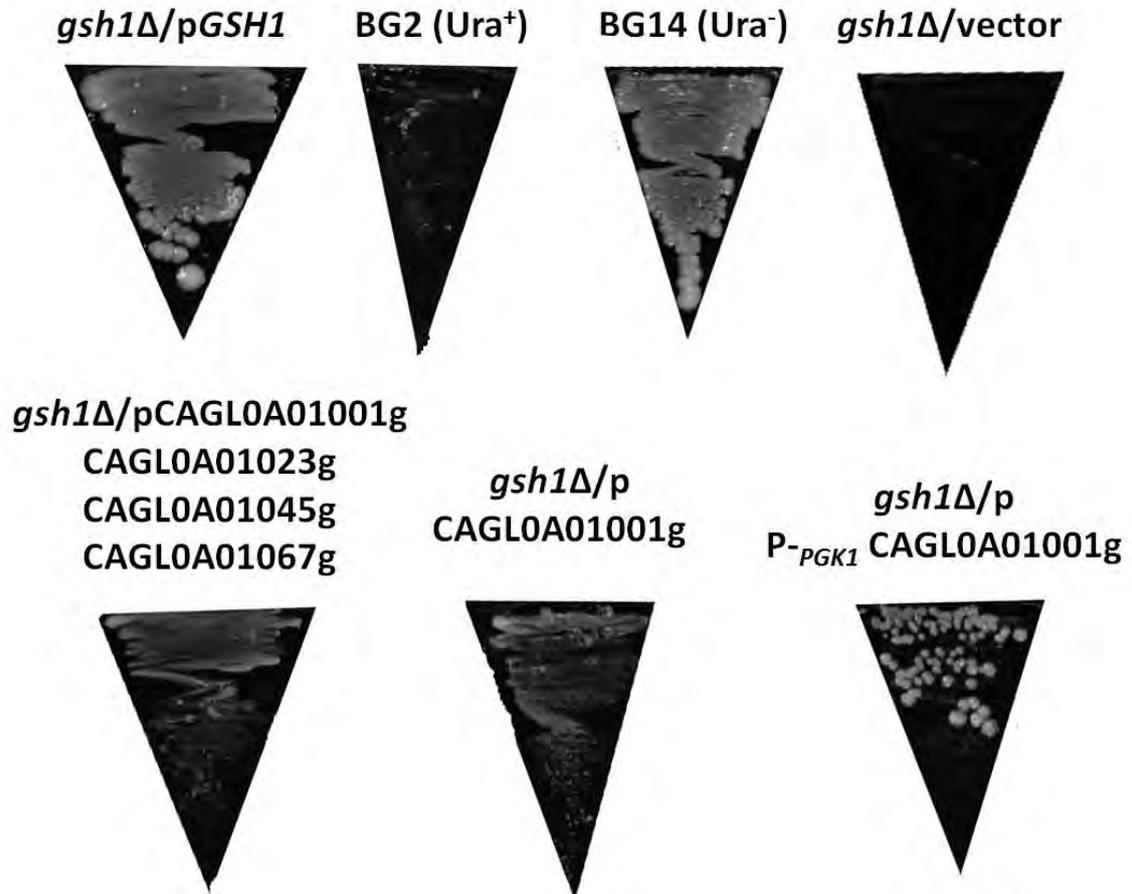


Figura S4.- Crecimiento de la cepa *gsh1Δ* con los plásmidos pAR8, pAR14 y pAR18 en medio reducido en nitrógeno al 50%. Crecimiento hasta los 6 días de incubación a 30°C de las cepas que se muestran en la figura 6D.