

INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL



ESCUELA NACIONAL DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA

Expresión de genes codificantes de aspartil
proteasas
de *Candida glabrata* durante la infección
in vitro de células epiteliales

T E S I S

PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRÍA EN CIENCIAS QUIMICOBIOLOGICAS

P R E S E N T A:

CAMILO MORENO MENDOZA



MÉXICO, D. F.

DICIEMBRE DEL 2008

El presente trabajo se realizó en los Laboratorios de Microbiología General y Genética Microbiana del Departamento de Microbiología de la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas del Instituto Politécnico Nacional, bajo la dirección de la Dra. Ma. De Lourdes Villa Tanaca y del Dr. César Hugo Hernández Rodríguez.

Este trabajo formó parte de los proyectos:

- CONACYT- Salud 2007-1 69984. Búsqueda de nuevos antimicóticos contra cepas de *Candida* spp resistentes a los antifúngicos convencionales e identificación de nuevos blancos moleculares.
- CONACYT -61918- 2007. Ciencia básica 2006. Clave Las proteasas de *Candida glabrata* como factores de virulencia: identificación de genes, regulación de la expresión (in vivo e in vitro), caracterización de proteínas recombinantes e interrupción de genes.
- CONACYT-Salud-14299 2006-2008. Presencia de genes SAP`s codificantes de aspartil proteinasas secretadas en *Candida* spp de aislados mexicanos.
- SIP 20082350. Análisis bioquímico y molecular del papel de las proteasas en la virulencia, metabolismo nitrogenado y control post-traducciona l de hongos de interés médico, fitopatógico y biotecnológico.
- SIP 20070248. Diversidad de genes codificantes de proteasas de hongos patógenos y de interés biotecnológico.
- SIP 2006442. Identificación, caracterización y expresión de diversos genes codificantes de proteasas en hongos patógenos de humanos y plantas.

El sustentante fue becario CONACyT con registro 202141 y fue becario Institucional del IPN durante el periodo agosto-diciembre de 2008.

| | |
|-------------------|-----|
| Índice | i |
| Índice de figuras | ii |
| Índice de tablas | iii |
| Abreviaturas | iv |
| Resumen | v |
| Abstract | vi |

1.- INTRODUCCIÓN _____ **1**

- 1.1. Candidosis
- 1. 2. Factores de virulencia del género *Candida*
- 1.3. *Candida glabrata*
 - 1.3.1. Factores de virulencia de *C. glabrata*

2.- ANTECEDENTES _____ **9**

- 2.1. Aspartil proteasas en *Saccharomyces cerevisiae*
- 2.2. Aspartil proteasas de *C. albicans*
 - 2.2.1. Expresión de los genes *SAP in vitro*
 - 2.2.2. Expresión y regulación de los genes *SAP in vivo*
 - 2.2.3. Importancia de las aspartil proteasas no secretadas de *C. albicans* (Sap9 y Sap10)
- 2.3. Aspartil proteasas en *Candida glabrata*

3.- JUSTIFICACIÓN _____ **21**

4.- OBJETIVOS _____ 23

4.1.-Objetivo general

4.2.- Objetivos particulares

5.- DIAGRAMA GENERAL DE TRABAJO _____ 25

6.- MATERIAL Y MÉTODOS _____ 27

6.1. Microorganismos utilizados y medios de cultivo

6.2. Conservación de cepas

6.3. Medios de Cultivo

6.3.1. Medio de conservación:

6.3.2. Medio rico YPD

6.3.3. Medio selectivo para *Candida* (Nickerson):

6.3.4. Medios sólidos

6.4. LÍNEA CELULAR

6.4.1. Medio de propagación de la línea celular (Medio A)

6.4.2. Medio simple para infección (Medio B)

6.4.3. Medio de conservación y criogenia

6.5. Búsqueda bioinformática de los genes codificantes de probables aspartil proteasas en el genoma de *C. glabrata*

6.6. Análisis bioinformático de las secuencias nucleotídicas y aminoacídicas deducidas de los genes *YPS1-12* y *PEP4* putativos de *C. glabrata*

6.7. Relación filogenética de las aspartil proteasas y diseño de iniciadores

6.8. Obtención de DNA total de levaduras

6.9. Determinación de la concentración de DNA

- 6.10. Amplificación de los genes *YPS1-12* y *PEP4* de *C. glabrata*
- 6.11. Análisis de secuencias reguladoras y probables sitios de unión a factores de transcripción en las aspartil proteasas del genoma de *C. glabrata*
- 6.12. Preparación del inóculo de *Candida glabrata* CBS 138
- 6.13.- Análisis de la expresión de los genes codificantes de aspartil proteasas de *C. glabrata*
 - 6.13.1.- Cultivo celular para ensayos de expresión de los genes *YPS1-12* y *PEP4* de *C. glabrata* durante la adherencia a células epiteliales
- 6.14. Extracción de RNA total
- 6.15. Determinación de la concentración de RNA total
- 6.16. Comprobación de la integridad de los RNAs
- 6.17. RT-PCR
- 6.18. Procesamiento y análisis de los resultados

7.- RESULTADOS **48**

- 7.1.-Análisis bioinformático
 - 7.1.1.- Análisis *in silico* de la secuencias nucleotídicas y aminoacídicas de los genes *YPS1-12* y *PEP4* de *C. glabrata*
 - 7.1.2.- Análisis de las regiones reguladoras de los genes *YPS1-12* y *PEP4* de *C. glabrata* y *SAP* de *C. albicans*
- 7.2.- Amplificación de los genes *YPS1-12* y *PEP4* de *C. glabrata*
- 7.3.- Perfil de expresión de los genes *YPS1-12* y *PEP4* de *C. glabrata* durante la infección a células epiteliales HeLa
 - 7.3.1.- Expresión de el gen *YPS1* de *C. glabrata*
 - 7.3.2.- Expresión del gen *YPS2* de *C. glabrata*
 - 7.3.3.- Expresión del gen *YPS3* de *C. glabrata*
 - 7.3.4.- Expresión del gen *YPS4* de *C. glabrata*
 - 7.3.5.- Expresión del gen *YPS5* de *C. glabrata*
 - 7.3.6.- Expresión del gen *YPS6* de *C. glabrata*

7.3.7.- Expresión del gen *YPS7* de *C. glabrata*

7.3.8.- Expresión del gen *YPS8* de *C. glabrata*

7.3.9.- Expresión del gen *YPS9* de *C. glabrata*

7.3.10.- Expresión del gen *YPS10* de *C. glabrata*

7.3.11.- Expresión del gen *YPS11* de *C. glabrata*

7.3.12.- Expresión del gen *YPS12* de *C. glabrata*

7.3.13.- Expresión del gen *PEP4* de *C. glabrata*

7.3.14.- Expresión del gen *EPA1* de *C. glabrata*

8.- DISCUSIÓN _____ **73**

9.- CONCLUSIONES _____ **86**

10.- PROSPECTIVAS _____ **89**

11.- BIBLIOGRAFÍA _____ **91**

| | |
|--|----|
| Fig. 1.- Árbol filogenético de los miembros del género <i>Candida</i> de importancia médica y especies relacionadas basado en la secuencia del gen 18S rDNA _____ | 6 |
| Fig. 2.- Estructura y síntesis de las Sap _____ | 13 |
| Fig. 3.- Dendrograma de la familia de isoenzimas Sap de <i>C. albicans</i> , basado en la de secuencias de aminoácidos _____ | 14 |
| Fig. 4.- Perfil de transcripción de los genes <i>YPS</i> de <i>C. glabrata</i> fagocitada por macrófagos _____ | 20 |
| Fig. 5.- Amplificación de un fragmento de los genes <i>YPS1-12</i> y <i>PEP4</i> de <i>C. glabrata</i> _____ | 53 |
| Fig. 6.- Perfil de expresión del gen <i>YPS1</i> de <i>C. glabrata</i> bajo las condiciones del estudio _____ | 55 |
| Fig. 7.- Perfil de expresión del gen <i>YPS2</i> de <i>C. glabrata</i> bajo las condiciones del estudio _____ | 56 |
| Fig. 8.- Perfil de expresión del gen <i>YPS3</i> de <i>C. glabrata</i> bajo las condiciones del estudio _____ | 57 |
| Fig. 9.- Perfil de expresión del gen <i>YPS4</i> de <i>C. glabrata</i> bajo las condiciones del estudio _____ | 58 |
| Fig. 10.- Perfil de expresión del gen <i>YPS5</i> de <i>C. glabrata</i> bajo las condiciones del estudio _____ | 59 |
| Fig. 11.- Perfil de expresión del gen <i>YPS6</i> de <i>C. glabrata</i> bajo las condiciones del estudio _____ | 60 |
| Fig. 12.- Perfil de expresión del gen <i>YPS7</i> de <i>C. glabrata</i> bajo las condiciones del estudio _____ | 61 |
| Fig. 13.- Perfil de expresión del gen <i>YPS8</i> de <i>C. glabrata</i> bajo las condiciones del estudio _____ | 62 |

Fig. 14.- Perfil de expresión del gen *YPS9* de *C. glabrata* bajo las condiciones del estudio _____63

Fig. 15.- Perfil de expresión del gen *YPS10* de *C. glabrata* bajo las condiciones del estudio _____64

Fig. 16.- Perfil de expresión del gen *YPS11* de *C. glabrata* bajo las condiciones del estudio _____65

Fig. 17.- Perfil de expresión del gen *YPS12* de *C. glabrata* bajo las condiciones del estudio _____67

Fig. 18.- Perfil de expresión del gen *PEP4* de *C. glabrata* bajo las condiciones del estudio _____68

Fig. 19.- Perfil de expresión del gen *EPA1* de *C. glabrata* bajo las condiciones del estudio _____69

Fig. 20.- Relación filogenética entre las aspartil proteasas de las principales levaduras patógenas del género *Candida* y *S. cerevisiae* _____77

| | |
|--|----|
| Tabla 1.- Especies de <i>Candida</i> no <i>Candida albicans</i> (CNCA) de importancia médica más comúnmente aisladas _____ | 3 |
| Tabla 2.- Factores de virulencia de <i>C. albicans</i> y su papel en la virulencia _____ | 5 |
| Tabla 3.- Características generales de los genomas de <i>C. glabrata</i> y <i>S. cerevisiae</i> _____ | 7 |
| Tabla 4.- Parámetros utilizados en los alineamientos múltiples de las secuencias nucleotídicas y aminoacídicas obtenidas de “GenBank” y experimentalmente _____ | 35 |
| Tabla 5.- Iniciadores diseñados para amplificar por PCR un fragmento de los genes putativos <i>YPS</i> y <i>PEP4</i> de <i>C. glabrata</i> _____ | 36 |
| Tabla 6.- Mezcla de reacción para la amplificación por PCR de cada uno de los genes <i>YPS</i> y <i>PEP4</i> de <i>C. glabrata</i> de manera independiente _____ | 39 |
| Tabla 7.- Condiciones de amplificación de los genes <i>YPS1-12</i> y <i>PEP4</i> de <i>C. glabrata</i> _____ | 39 |
| Tabla 8.- Características de los iniciadores diseñados para amplificar el gen <i>EPA1</i> de <i>C. glabrata</i> _____ | 41 |
| Tabla 9.- Características de los iniciadores empleados para amplificar el gen 18S rDNA de <i>C. glabrata</i> _____ | 46 |
| Tabla 10.- Análisis <i>in silico</i> de las proteínas putativas Yps1-12 y PrA de <i>C. glabrata</i> reportadas en la base de datos del NCBI y en el genoma de <i>C. glabrata</i> _____ | 50 |
| Tabla 11.- Sitios de unión a factores de transcripción detectados en las regiones reguladoras de los genes <i>SAP</i> de <i>C. albicans</i> , <i>YPS</i> y <i>PEP4</i> de <i>C. glabrata</i> y el <i>YPS1</i> de <i>S. cerevisiae</i> _____ | 51 |

Tabla 12.- Análisis estadístico comparativo entre las condiciones del estudio para el gen *YPS1* de *C. glabrata* mediante la prueba de Mann-Whitney_____55

Tabla 13.- Análisis estadístico comparativo entre las condiciones del estudio para el gen *YPS2* de *C. glabrata* mediante la prueba de Mann-Whitney_____56

Tabla 14.- Análisis estadístico comparativo entre las condiciones del estudio para el gen *YPS3* de *C. glabrata* mediante la prueba de Mann-Whitney_____57

Tabla 15.- Análisis estadístico comparativo entre las condiciones del estudio para el gen *YPS4* de *C. glabrata* mediante la prueba de Mann-Whitney_____58

Tabla 16.- Análisis estadístico comparativo entre las condiciones del estudio para el gen *YPS5* de *C. glabrata* mediante la prueba de Mann-Whitney_____59

Tabla 17.- Análisis estadístico comparativo entre las condiciones del estudio para el gen *YPS6* de *C. glabrata* mediante la prueba de Mann-Whitney_____60

Tabla 18.- Análisis estadístico comparativo entre las condiciones del estudio para el gen *YPS7* de *C. glabrata* mediante la prueba de Mann-Whitney_____61

Tabla 19.- Análisis estadístico comparativo entre las condiciones del estudio para el gen *YPS8* de *C. glabrata* mediante la prueba de Mann-Whitney_____62

Tabla 20.- Análisis estadístico comparativo entre las condiciones del estudio para el gen *YPS9* de *C. glabrata* mediante la prueba de Mann-Whitney_____63

Tabla 21.- Análisis estadístico comparativo entre las condiciones del estudio para el gen *YPS0* de *C. glabrata* mediante la prueba de Mann-Whitney_____64

Tabla 22.- Análisis estadístico comparativo entre las condiciones del estudio para el gen *YPS11* de *C. glabrata* mediante la prueba de Mann-Whitney_____66

Tabla 23.- Análisis estadístico comparativo entre las condiciones del estudio para el gen *YPS12* de *C. glabrata* mediante la prueba de Mann-Whitney_____67

Tabla 24.- Análisis estadístico comparativo entre las condiciones del estudio para el gen *PEP4* de *C. glabrata* mediante la prueba de Mann-Whitney_____68

Tabla 25.- Análisis estadístico comparativo entre las condiciones del estudio para el gen *EPA1* de *C. glabrata* mediante la prueba de Mann-Whitney_____70

Tabla 26.- Representación del análisis estadístico comparativo entre las condiciones del estudio para los genes *YPS1-12*, *PEP4* y *EPA1* de *C. glabrata* mediante la prueba de Mann-Whitney _____72

| | |
|----------|---|
| 18S rDNA | Gen que codifica para rRNA 18S |
| cDNA | DNA complementario |
| DAP | Dipeptidil aminopeptidasa |
| Cp | Carboxipeptidasa |
| Ape | Aminopeptidasa |
| PrA | Proteasa Acida |
| PrB | Proteasa B |
| FWD | forward (iniciador <i>sentido</i>) |
| ORF | Open Reading Frame (Marco de lectura abierto) |
| PCR | Reacción en Cadena de la Polimerasa |
| pI | Punto isoeléctrico |
| REV | Reverse (iniciador <i>antisentido</i>) |
| RT | Transcriptasa Reversa |
| YNB | Base nitrogenada para levaduras |
| Dntp | Desoxinucleótido trifosfato |
| EDTA | Acido etilén diamino tetraacético |
| ORF | Open Reading Frame (marco de lectura abierto) |
| RT-PCR | Reverse Transcriptase-PCR (Transcriptasa inversa – PCR) |

Candida glabrata es una levadura haploide, no dimórfica que está más relacionada filogenéticamente a *Saccharomyces cerevisiae* que a cualquier otra levadura patógena del género *Candida*. Esta especie ocupa actualmente el segundo lugar como agente causal de candidosis, en ocasiones es de difícil tratamiento ya que algunos aislamientos presentan resistencia innata a agentes fungicidas como el fluconazol.

Ya que las aspartil proteasas se encuentran ampliamente distribuidas en las levaduras patógenas del género *Candida* y han sido consideradas factores de virulencia, el objetivo de este trabajo fue el de buscar, mediante herramientas bioinformáticas, genes codificantes de aspartil proteasas en el genoma de *C. glabrata*. Se encontraron trece genes codificantes de aspartil proteasas en el genoma de *C. glabrata*, nueve de los cuales se encuentran en el cromosoma E, ocho en tándem (*YPS2-6* y *YPS8-11*), el resto se encuentran en los cromosomas A (*YPS7*), M (*YPS1* y *PEP4*) y J (*YPS12*).

Todas las secuencias traducidas de estos genes presentan estructuras típicas de aspartil proteasas, 12 de ellas tienen una localización extracelular (*YPS1-12*) y una de ellas es probablemente de localización vacuolar (*PEP4*).

La mayoría de los productos codificados presentan un probable sitio GPI (*YPS1-2* y *YPS5-11*) lo que las hace similares a las yapsinas de *S. cerevisiae* y a la Sap 9 y 10 de *C. albicans* lo que sugiere que podrían estar implicadas en el mantenimiento de la integridad de la superficie celular así como en el procesamiento y maduración de otras proteínas que podrían participar en la virulencia.

Las regiones reguladoras tienen sitios de unión a activadores de genes regulados por nitrógeno (excepto el gen *YPS7*) y algunos tienen sitios de activación por respuesta a estrés.

Para ver si la expresión de estas proteasas está relacionada con la interacción con las células del hospedero, se determinó el perfil de expresión de los genes *CgYPS* a nivel transcripcional mediante RT-PCR durante la infección *in vitro* de células epiteliales HeLa.

Los genes *CgYPS* mostraron una expresión diferencial durante la infección del cultivo celular HeLa. *YPS1*, *YPS2*, *YPS4*, *YPS5*, *YPS8*, *YPS9*, *YPS10*, *YPS11*, *PEP4* y *EPA1* de *C. glabrata* aumentaron su expresión por la presencia de células HeLa. *CgYPS2*, *CgYPS5* y *CgPEP4* mostraron expresión significativa en las levaduras no adheridas. *CgYPS5*, el *CgYPS8* y *CgYPS11* pueden asociarse al proceso de adherencia. *CgYPS7* y *CgYPS12* no se expresaron en ninguna de las condiciones probadas.

Los resultados obtenidos nos permitirán seleccionar a los genes candidatos para ser mutados, la caracterización de mutantes deficientes de yapsinas permitirá inferir el papel que desempeñan estas proteasas en los procesos de infección y/o en la integridad de la pared de *C. glabrata*.

Candida glabrata is a haploid and non dimorphic yeast phylogenetically more related to *Saccharomyces cerevisiae* than to any other pathogenic yeast of the genus *Candida*. The species currently occupies the second place as a causative agent of candidiasis, it is sometimes difficult to treat it because some isolates have innate resistance to fungicide agents as fluconazole.

Since the aspartyl proteases are widely distributed in the pathogenic yeast of the genus *Candida*, and have been considered virulence factors, the objective of this study was to explore, through bioinformatics tools, aspartyl protease coding genes in the genome of *C. glabrata*. We found 13 aspartyl protease coding genes, 9 of which are located on chromosome E, 8 of them in tandem (*YPS2-6* and *YPS8-11*), the rest of the genes are found on chromosomes A (*YPS7*, M (*YPS1* and *PEP4*) and J (*YPS12*) in the genome of *C. glabrata*.

All translated sequences of these genes have typical aspartyl proteases structures, 12 of them have extracellular location (*YPS1-12*) and one probably has vacuolar location (*PEP4*).

Most products have a probable GPI binding site (*YPS1-2* and *YPS5-11*) which makes them similar to those of *S. cerevisiae* yapsines and the Sap 9 and 10 of *C. albicans*, suggesting that they might be involved in maintaining the integrity of the cell surface and in the processing and maturation of other proteins that might be involved in virulence.

The upstream regions have regulatory binding sites for activating factors regulated by nitrogen (except *YPS7* gene) and some sites may be responsive to stress.

To see if the expression of these proteases is related to the interaction with the host cell, it was determined the transcriptional gene expression profile of *CgYPS* genes during the *in vitro* infection of HeLa epithelial cells, by RT-PCR.

The *CgYPS* genes showed a differential expression during the infection of HeLa cells. The *YPS1*, *YPS2*, *YPS4*, *YPS5*, *YPS8*, *YPS9*, *YPS10*, *YPS11*, *PEP4* and *EPA1* *C. glabrata* genes increased their expression under the epithelial cells presence. *CgYPS2*, *CgYPS5* and *CgPEP4* genes of the non adherent yeast increased significantly their expression. The genes that can be related to the adherence process are *CgYPS5*, *CgYPS8* and *CgYPS11*. *CgYPS7* and *CgYPS12* not express under any of the conditions tested.

These results will enable us to select candidates to get null mutants in yapsines, the characterization of the mutants, will allow us to infer the role of these proteases in the process of infection and/or integrity of the wall of *C. glabrata*.

1.- INTRODUCCIÓN

1.- INTRODUCCIÓN

1.1. Candidosis

La candidosis se define como una micosis de expresión clínica variable, que ocurre como una infección oportunista causada por algunas levaduras del género *Candida* (Koelsch y col. 2000). Puede ser aguda o crónica, superficial, profunda, sistémica o diseminada (Cutler, 1991). Puede causar desde efectos menores en individuos inmunocompetentes (algodoncillo en bebés o infecciones vaginales en mujeres) hasta infecciones fatales en pacientes inmunocomprometidos. El uso de antibióticos de amplio espectro, esteroides y otras condiciones inmunosupresoras (diabetes mellitus, SIDA, quimioterapia y radioterapia contra cáncer y así como el tratamiento que sigue a un trasplante de órganos) pueden incrementar el riesgo de infección con *Candida* (Naglik y col., 2003).

Las infecciones provocadas por algunas especies del género *Candida* son un problema de importancia clínica creciente ya que su incidencia ha aumentado en las últimas décadas (Naglik y col., 2004), de hecho *Candida* causa más infecciones en sangre que *Streptococcus spp.*, *Enterococcus faecalis*, y que todas las especies bacterianas de gram-negativos incluyendo a *Escherichia coli*, además las candidosis representan del 10 al 15% del total de las infecciones en sangre y están asociadas a una elevada morbilidad y mortalidad por lo que tienen un gran impacto clínico y económico. *Candida albicans* continúa siendo la especie que se aísla con mayor frecuencia (Kamran y col. 2004), sin embargo, especies distintas a *Candida albicans* causan

actualmente 50% de los casos de candidosis profunda (Tabla 1) (Haynes, 2001).

Tabla 1.- Especies de *Candida* no *Candida albicans* (CNCA) de importancia médica más comúnmente aisladas (Moran y col., 2002).

| Especie de <i>Candida</i> | Sitios afectados | Enfermedad subyacente o factor de riesgo^a |
|----------------------------------|---|---|
| <i>C. glabrata</i> | Tracto urinario, mucosa, sangre, infección diseminada | Infección por VIH, tumores sólidos, leucemia, TMO, embarazo, diabetes |
| <i>C. tropicalis</i> | Mucosa oral, sangre, infección diseminada, infección de huesos y articulaciones | Infección por VIH, tumores sólidos, TMO, Leucemia |
| <i>C. dubliniensis</i> | Mucosa oral, sangre | Infección por VIH, TMO |
| <i>C. krusei</i> | Mucosa oral, sangre, infección diseminada | Infección por VIH, TMO, Leucemia |
| <i>C. parapsilosis</i> | Sangre, endocarditis, infección de huesos/articulaciones | Nacimiento prematuro, nutrición parenteral, catéter intravenoso |

^aTMO, trasplante de médula ósea

1. 2. Factores de virulencia del género *Candida*

Para establecer una infección, los patógenos oportunistas deben tanto evadir la respuesta inmune del hospedero, como sobrevivir y dividirse en el ambiente de éste. Algunas levaduras de *Candida spp.* colonizan y/o causan enfermedades en un gran número de sitios anatómicos, cada uno con distinto ambiente físico, los cuales incluyen la piel, cavidad oral y esófago, tracto gastrointestinal, vagina y sistema vascular (Yang, 2003). La adherencia a los tejidos del huésped, la respuesta a cambios ambientales (cambios de pH y temperatura) y la secreción de hidrolasas son considerados como factores importantes en la virulencia de *Candida* (Haynes, 2001).

Los factores de virulencia expresados o requeridos por el género *Candida* y en particular *C. albicans* para causar infecciones varían dependiendo del sitio, etapa y tipo de infección (mucosa o sistémica), así como de la naturaleza de la respuesta del huésped. Al parecer una amplia gama de atributos de virulencia están envueltos en el proceso de infección, pero ningún factor singular le confiere la virulencia a *Candida* y no todos los expresados son necesarios en una fase particular de la infección. Se han sugerido varios atributos de virulencia en *C. albicans* como son: la formación de hifas, moléculas de reconocimiento de superficie, "switching" fenotípico y la producción de enzimas hidrolíticas, este último, es el más estudiado en años recientes (Tabla 2) (Naglik y col., 2003).

Tabla 2.- Factores de virulencia de *C. albicans* y su papel en la virulencia (Naglik y col., 2004).

| Atributo de virulencia | Papel en la virulencia |
|--|--|
| Adhesinas (ej. familia Als, Hwp1, Int1) ^a | Adhesión y colonización |
| Producción de micelio | Adhesión, invasión y daño de tejido |
| Enzimas hidrolíticas extracelulares (ej. familias de Sap, Plb, y Lip) ^b | Adquisición de nutrientes, invasión, daño de tejido, evasión de la respuesta inmune. |
| Cambio fenotípico (switching) | Adhesión, evasión de la respuesta inmune |

^a Als, secuencias parecidas a aglutininas; Hwp1, proteínas de la pared celular del micelio; Int1, proteínas parecidas a integrinas

^b Saps, aspartil proteinasas secretadas 1 a 10; Plb, fosfolipasa B1 y B2; Lip, lipasas 1 a 10.

1.3. *Candida glabrata*

Es una levadura haploide y no dimórfica que existe como comensal o patógeno en forma de una pequeña blastoconidia bajo todas las condiciones ambientales (Fidel y col., 1999). Es considerada un patógeno importante al igual que *C. albicans*, *C. tropicalis*, y *C. parapsilosis*, sin embargo, está más relacionada filogenéticamente con *S. cerevisiae*, que a cualquier otra especie de *Candida* reconocida como patógena (Fig. 1) (Barns y col. 1991). El tamaño y las características de su genoma son similares a las de *S. cerevisiae* (Tabla 3).

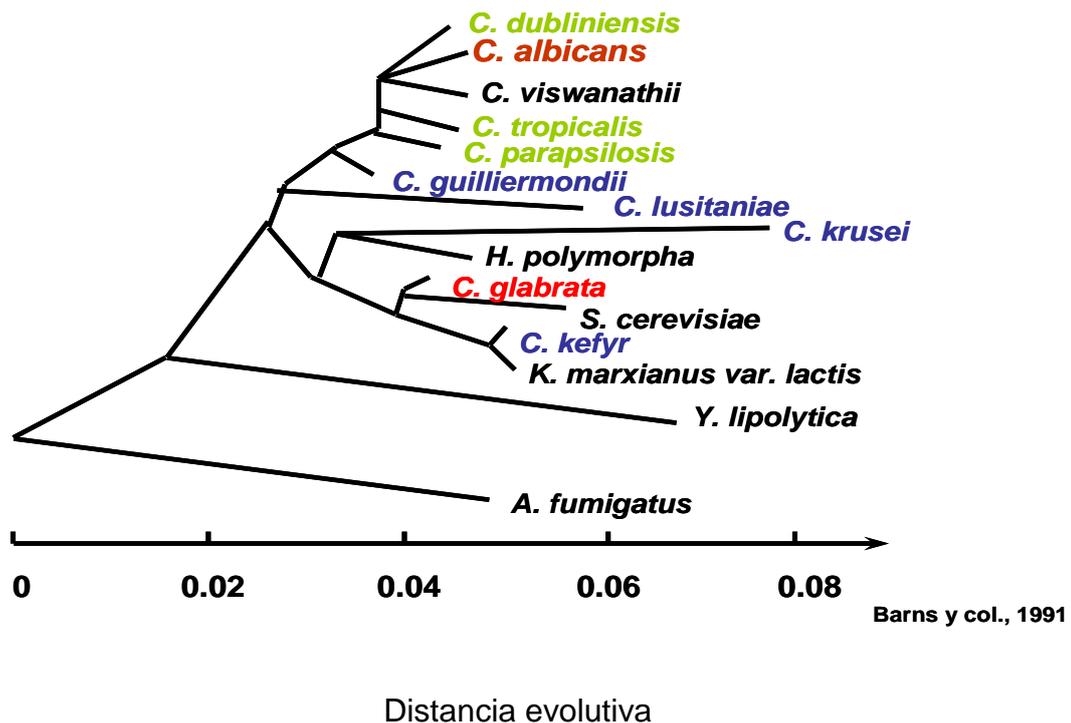


Fig. 1.- Árbol filogenético de los miembros del género *Candida* de importancia médica y especies relacionadas basado en la distancia evolutiva entre las especies. La distancia evolutiva entre los pares de organismos está indicada por la suma de los componentes horizontales de la longitud, como se indica por la escala (número promedio de cambios por posición nucleotídica). Tomado de Barns y col., 1991.

Tabla 3.- Características generales de los genomas de *C. glabrata* y *S. cerevisiae* (Castaño y col., 2006).

| Característica | <i>C. glabrata</i> | <i>S. cerevisiae</i> |
|----------------------------------|---------------------------|-----------------------------|
| Tamaño del genoma (Mb) | 12.3 | 12.1 |
| Número de cromosomas | 13 | 16 |
| Número de genes | 5283 | 5516 |
| Contenido de G + C (%) | 38.8 | 38.3 |
| Contenido de intrones (%) | 1 | 5 |

1.3.1. Factores de virulencia de *C. glabrata*

Algunas de las características identificadas como factores de virulencia en *C. albicans* no parecen tener un paralelo en *C. glabrata*, sin embargo ambas especies conservan algunas características que probablemente son importantes para su adaptación y sobrevivencia en el hospedero como comensales y patógenos oportunistas. Por ejemplo, ambas especies se adhieren a células epiteliales del hospedero con avidez. *C. glabrata* posee una familia grande de genes subteloméricos que codifican para proteínas de pared celular que median la adherencia. La expresión de estos genes está controlada por una regulación negativa llamada silenciamiento que depende de la estructura de la cromatina. *C. albicans* también posee varias proteínas de pared celular (adhesinas), pero su regulación es diferente al silenciamiento subtelomérico. Recientemente se demostró que *C. albicans* posee un ciclo

sexual críptico, y *C. glabrata* conserva intactos los genes esenciales para el apareamiento por lo que es posible que también posea un ciclo sexual altamente regulado. Tanto *C. albicans* como *C. glabrata* tienen también la capacidad de formar bio-películas, y de llevar a cabo cambios morfogénéticos que posiblemente les permitan adaptarse rápidamente a los cambios dentro del hospedero y comportarse como patógenos oportunistas. *C. glabrata* además presenta una alta resistencia innata al agente fungistático fluconazol, que se utiliza como agente profiláctico en pacientes inmuno-comprometidos (Castaño y col., 2006).

2.- ANTECEDENTES

2. ANTECEDENTES

Las proteasas poseen múltiples funciones en la naturaleza que van desde la regulación de procesos celulares sutiles mediante la activación de distintas preproteínas hasta la degradación no específica de proteínas para el reciclaje de biomoléculas. Muchos microorganismos patógenos han adaptado esta propiedad bioquímica para desempeñar un gran número de funciones especializadas durante el proceso infeccioso. La especificidad por el sustrato de estas proteasas puede ser muy reducida. En contraste, los patógenos facultativos pueden secretar proteasas que tienen efectos más generales y mucho más amplios y que juegan un papel muy importante tanto en el crecimiento saprofítico como en el infeccioso (Albrecht y col., 2006).

2.1. Aspartil proteasas en *Saccharomyces cerevisiae*

Las proteasas asociadas a la superficie celular que están expuestas al espacio extracelular con funciones regulatorias son raras en la naturaleza. Los ejemplos más prominentes son las yapsinas (Yps1p-3p, -6p y -7p), descritas en *Saccharomyces cerevisiae*. Esta familia de cinco aspartil proteasas están estrechamente relacionadas y se encuentran ancladas a membrana por medio de una molécula de glicosil fosfatidil inositol (GPI) (Krysan y col., 2005). Los genes *YPS1* y *2* se identificaron como supresores de mutantes nulos en *KEX2*, una serín proteasa que procesa proteínas secretadas (Komano y col., 1995). Al igual que la proteína Kex2p, tres de las yapsinas (Yps1p, 2p y 3p) procesan proteínas y péptidos en residuos básicos carboxilo terminal *in vivo* e *in vitro*

(Cawley y col., 1996; Komano y col., 1999), la diferencia radica en la alta selectividad que presenta la proteína Kex2p por Lys-Arg y las yapsinas rompen desde el extremo C-terminal a sitios monobásicos que contienen ya sea Lys o Arg. Estudios recientes demostraron que las yapsinas de *S. cerevisiae* son requeridas para la integridad de la pared celular y parecen ser importantes en la homeostasis de la glucana de la pared celular ya que la mutante en Yps1 presenta hipersensibilidad a caspofungina, cafeína y rojo congo (Krysan y col., 2005).

El papel que desempeñan las yapsinas parece no estar limitado únicamente a *S. cerevisiae* ya que existen genes homólogos a estas en *C. albicans* (*SAP9* y *SAP10*) y *C. glabrata* (*YPS1cg*), dichos genes, pueden complementar los defectos en la pared celular causados por la mutante *yps1Δ* de *S. cerevisiae* (Dujon y col., 2004, Krysan y col., 2005). A diferencia de Sap1-Sap8 de *C. albicans*, Sap9 es aparentemente no secretada, y al igual que *YPS1*, la expresión de *SAP9* aumenta durante la fase estacionaria y en respuesta a la perturbación de la pared celular (Copping y col., 2005; Monod y col., 1998). Además, la especificidad de Yps1p y Sap9 es similar ya que se ha demostrado que inhibidores de Yps1p inhiben la actividad de Sap9 (Cawley y col., 2003). Una diferencia importante entre Sap9 de *C. albicans* y la proteína Yps1cg de *C. glabrata* es que Sap9 complementa la mutante *yps1Δ* sólo cuando se expresa bajo el promotor heterólogo constitutivo mientras que Yps1cg complementa la mutación bajo su propio promotor (Krysan y col., 2005). Una explicación posible es la estrecha relación filogenética entre *C. glabrata* y *S. cerevisiae* (Barns y col., 1991) (Fig. 1). Además, se ha visto que Sap9 y Yps1p confieren resistencia a un importante antifúngico conocido como

casposfungina, un inhibidor de la síntesis de 1,3- β -glucana (Lesage y col., 2004).

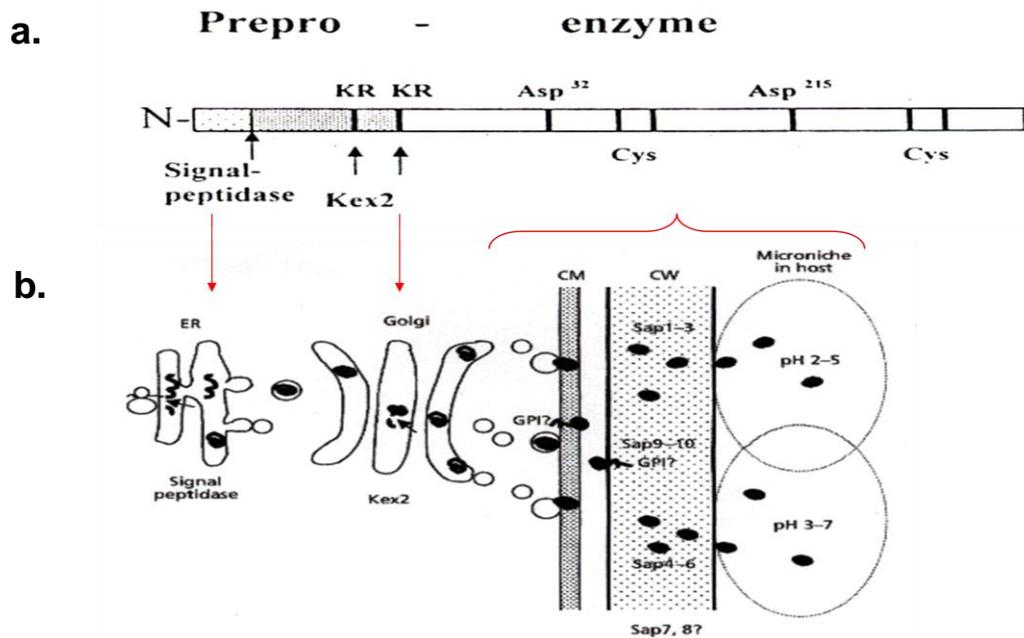
Como puede verse *S. cerevisiae* y los hongos patógenos *C. albicans* y *C. glabrata* comparten un gran número de genes similares, que pueden, sin embargo, tener funciones diferentes debido a los distintos ambientes naturales de las dos especies.

2.2. Aspartil proteasas de *C. albicans*

La actividad proteolítica de *C. albicans* reside en una familia de 10 proteinasas aspárticas (Saps) con pesos moleculares entre 35 y 50 kDa, codificadas por los genes *SAP1-10* en forma de preproenzimas de 60 – 200 aminoácidos más largas que las enzimas maduras. Las enzimas maduras contienen secuencias motivo típicas de aspartil proteinasas, incluyendo los dos residuos aspárticos conservados en el sitio activo y cuatro residuos conservados de cisteína, que probablemente estén implicados en el mantenimiento de la estructura tridimensional (Naglik y col., 2003) (Fig. 2-a).

La síntesis de proteinasas inicia en el núcleo, posteriormente, el mRNA sintetizado es transferido al citoplasma y traducido como preproenzima en el retículo endoplásmico rugoso. El péptido señal N-terminal es removido en el retículo endoplásmico rugoso por una peptidasa señal y la proenzima es transferida al aparato de Golgi donde es adicionalmente procesada después de la secuencia Lys-Arg por una proteinasa Kex2. Una vez empacada la enzima en vesículas secretorias es transportada a la membrana plasmática

donde posteriormente puede ser incorporada a la pared celular o es liberada al espacio extracelular (Fig. 2-b) (Hube y Naglik, 2001).



Hube y Naglik, 2001.

Fig. 2. Estructura y síntesis de las Sap. **a.-** Se muestran regiones compartidas en todas las Saps como los dos residuos aspartato y cuatro cisteínas conservadas implicadas en el mantenimiento de la estructura tridimensional. También se muestran los sitios de modificación postraduccional y se indican las enzimas que lo llevan a cabo. **b.-** Vía de secreción de las Saps.

Con base en su secuencia aminoacídica, las aspartil proteasas de *C. albicans* pueden formar 3 subgrupos en la familia de las Saps, en el primero Sap1-3 el porcentaje de residuos idénticos es de 67%; en el segundo Sap4-Sap 6 hay 89%; el tercero compuesto por Sap 7 en el que hay 20 a 27% entre esta y cualquier otro miembro de la familia. A diferencia de las Saps 1-8, Sap9 y Sap10 tienen en su extremo C-terminal secuencias típicas para la adición de

glicosil fosfatidil inositol (GPI) con el que se anclan a la membrana o a pared celular (Fig. 3) (Naglik y col., 2003). Sap8 y Sap9 son similares a la Sapt1 de *C. tropicalis* y Yps3p de *S. cerevisiae* (Koelsch y col., 2000).

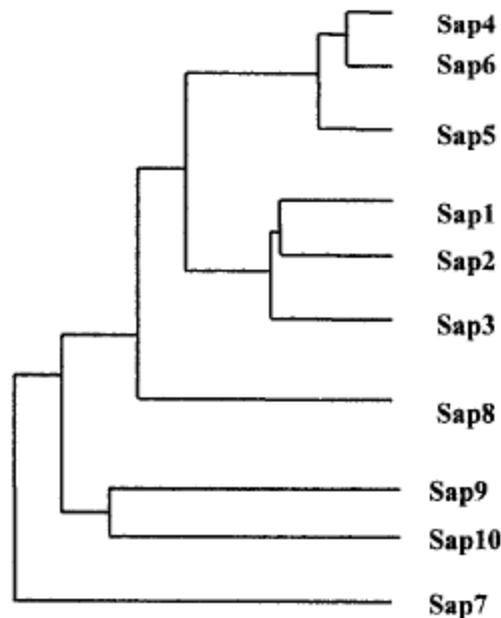


Fig. 3. Dendrograma de la familia de isoenzimas Sap de *C. albicans*, basado en la de secuencias de aminoácidos. En esta familia hay tres grupos. Sap 1 a Sap 3 son 67 % idénticas, Sap4 a Sap6, son 89 % idénticas, mientras que Sap7 es solo 20 a 27 % idéntica a otras proteínas Sap. Sap9 y Sap10 tienen secuencias consenso C-terminales típicas para proteínas GPI (Naglik y col., 2003).

2.2.1. Expresión de los genes *SAP* *in vitro*

El gen codificante para la proteinasa con mayores niveles de expresión en *C. albicans* es *SAP2*, dicho gen está regulado por un mecanismo de retroalimentación positiva, es decir, la acumulación de péptidos resultantes de la proteólisis de proteínas con alto peso molecular induce la expresión del gen *SAP2*. De forma interesante, aunque los dos alelos de *SAP2* parecen estar

regulados de forma diferente en estas condiciones, el alelo *SAP2-2* puede servir como un sensor y amplificador de señal para promover su propia expresión y para inducir la expresión del alelo *SAP2-1*. Esto puede tener importantes implicaciones *in vivo* puesto que supone que la expresión de *SAP2* estaría autorregulada con el propósito de alcanzar la actividad proteolítica óptima para cuando le sea necesario a *C. albicans* (Hube y Naglik, 2001; Naglik y col., 2004).

Se descubrió que otros dos genes *SAP*; *SAP1* y *SAP3*, son expresados diferencialmente *in vitro* cuando *C. albicans* presenta “switching” fenotípico, un fenómeno en el que el hongo modifica su fenotipo, especialmente en respuesta a estrés, lo que le permite adaptarse a distintos ambientes durante el curso de la infección *in vivo* (Naglik y col., 2004).

La expresión de *SAP8* está regulada por la temperatura *in vitro* y su expresión es mayor a 30°C que a 37°C, lo que sugiere que este gen podría expresarse preferencialmente durante infecciones superficiales (piel). Sin embargo, esto no es un indicador confiable de su función, de hecho, *SAP8* es expresado eficientemente a temperaturas fisiológicas durante infecciones humanas y animales por lo que la manera en que *Sap8* contribuye en las infecciones por *C. albicans in vivo* no está claro (Naglik y col., 2004).

Puesto que la mayoría de las aspartil proteasas son activas bajo condiciones ácidas, es sorprendente que *SAP4-6* son expresadas casi exclusivamente durante la formación de hifas a valores de pH neutros, incluso

en medios libres de proteínas. Estudios de la expresión diferencial de los genes *SAP in vitro* indicaron que la inducción de algunos miembros *SAP* es independiente de la presencia de proteínas y/o péptidos exógenos, como en el caso de *SAP2* (Naglik y col., 2004).

2.2.2. Expresión y regulación de los genes *SAP in vivo*

La demostración *in vitro* de los distintos patrones de expresión de *SAP* en distintos estadios de las células (levaduras, hifas y durante el “switching” fenotípico) indicó que la expresión de proteinasas es un proceso altamente regulado y por lo tanto, los distintos miembros de la familia *SAP* también se podrían expresar diferencialmente *in vivo*. Lo anterior ha sido confirmado en infecciones superficiales y sistémicas por *C. albicans* tanto en modelos *in vivo* como *in vitro* mediante el uso de tecnologías como la “reacción en cadena de la polimerasa por retrotranscripción” (RT-PCR) y “tecnología de expresión *in vivo*” (IVET) (Naglik y col., 2004).

Usando epitelio humano reconstituido (RHE) oral y vaginal infectado por *C. albicans*, Schaller y col. (1998, 2003) descubrieron que la subfamilia *SAP1-3* era expresada en las etapas iniciales de la colonización epitelial y subsecuentemente durante el daño al tejido cuando la infección era evidente, indicando un posible papel de *SAP1-3* en el establecimiento de las infecciones por *C. albicans* en las superficies mucosas humanas. Con el fin de determinar si los ensayos *in vitro* eran representativos de la situación *in vivo*, Naglik y col. (1999, 2003) analizaron la expresión de *SAP1-8* en 130 sujetos con infección o portadores asintomáticos de *C. albicans* oral y vaginal. *SAP2* y *SAP5* fueron los

genes más comúnmente expresados, encontrándose una correlación en la expresión de *SAP1* y *SAP3* en individuos con candidosis oral y vaginal frente a los portadores asintomáticos. Los datos indicaron que:

1. Todos los miembros de la familia *SAP* fueron expresados tanto en la colonización (portación/comensalismo) y patogenicidad (infección activa).
2. Algunos genes *SAP* tienen un papel dominante específicamente durante la infección.
3. La expresión de la familia de genes *SAP* está probablemente regulada durante la progresión de la colonización a la infección.

Los datos indicaron que la expresión y regulación de los genes *SAP* dependen del tipo y etapa de la infección por *C. albicans*, así como de las condiciones de pH, temperatura y disponibilidad de sustrato del ambiente local (Naglik y col. 2004).

2.2.3. Importancia de las aspartil proteasas no secretadas de *C. albicans* (Sap9 y Sap10)

De las 10 aspartil proteasas extracelulares (Sap1-10) de *C. albicans*, unas son secretadas (Sap1-8) y otras están asociadas a la superficie celular (Sap9 y Sap10). Sin embargo, las funciones de estas dos subclases de aspartil proteasas parecen ser diferentes. Las proteasas Sap1-6 son conocidas por hidrolizar proteínas del hospedero y de esta forma causan daño a los tejidos. En contraste Sap9 y Sap 10 están asociadas a procesos regulatorios en la

superficie celular que son fundamentales para la máxima patogenicidad durante la interacción con tejidos epiteliales.

Sap9 y Sap10 comparten varias características con las yapsinas de *S. cerevisiae*. Ambas proteínas muestran una alta similitud de en sus secuencias aminoacídicas con Yps1, Yps2, Yps3, Yps6 y Yps7 y en contraste con las otras Saps, están glicosiladas. Además las secuencias C-terminales de estas aspartil proteasas contienen sitios putativos de anclaje GPI. Se ha demostrado que sólo las versiones truncadas en su extremo C-terminal de Sap9 y Sap10 son secretadas al espacio extracelular y, por medio de microscopía inmunoelectrónica, junto con el uso del gen reportero Gfp fusionado al extremo C-terminal, que estas proteasas son ancladas predominantemente ya sea en membrana celular (Sap9) o tanto en membrana y pared celular (Sap10). Además la Sap9 nativa consiste en dos subunidades unidas por un puente disulfuro que es capaz de cortar un péptido idéntico a un sitio putativo de procesamiento de su precursor, lo cual sugiere procesamiento autocatalítico.

Hay evidencia de que Sap 9 y Sap10 actúan sobre proteínas de origen fúngico importantes para el mantenimiento de la integridad de la superficie celular y la separación celular. Lo anterior debido a que mutantes en Sap 9 y Sap10 mostraron menor adherencia ($\Delta sap9$ y $\Delta sap9/\Delta sap10$) y menor daño a tejido epitelial ($\Delta sap9$, $\Delta sap10$ y $\Delta sap9/\Delta sap10$), por otro lado componentes que actúan directa o indirectamente sobre la superficie celular del hongo como higromicina B, amorolfina, calcofluor, rojo congo e itraconazol causaron defectos de crecimiento importantes en las tres mutantes ($\Delta sap9$, $\Delta sap10$ y $\Delta sap9/\Delta sap10$). Además las tres mutantes exhibieron un fenotipo de gemación

anormal, ya que las células hijas no se separaron de las células madre (Albrecht y col., 2006).

2.3. Aspartil proteasas en *Candida glabrata*

El primer contacto que existe entre levaduras patógenas y el tejido humano ocurre a nivel de superficie celular por medio de componentes de la pared celular, en el 2004, Weig y col. realizaron un análisis *in silico* de los genes codificantes para proteínas putativas GPI de *C. glabrata*, este análisis reveló la existencia de 106 proteínas putativas GPI, de estas, nueve proteínas parecen ser aspartil proteasas que parecen sufrir una modificación GPI, lo que implica que estas proteínas están ancladas a membranas y no se secretan extracelularmente.

Por otro lado, recientemente se analizó la interacción de *C. glabrata* con macrófagos mediante un modelo de cultivo tisular (Kaur y col., 2007). En este trabajo se detectó que el perfil de transcripción de levaduras ingeridas por macrófagos presentó cambios globales en el metabolismo y aumento en la expresión de algunos genes codificantes de aspartil proteasas extracelulares unidas a glicosilfosfatidil inositol GPI (denominados en este trabajo como, *YPS1-11*, Fig. 4). El análisis genético de esta familia reveló que son requeridas para la integridad de la pared celular, la adherencia a células epiteliales, supervivencia y virulencia en macrófagos. Además, se demostró que juegan un papel importante en el procesamiento de otras proteínas como la adhesina de la pared celular, Epa1 y mutantes en algunos de estos genes vieron reducida su virulencia en un modelo de infección en ratón (Kaur y col., 2007).

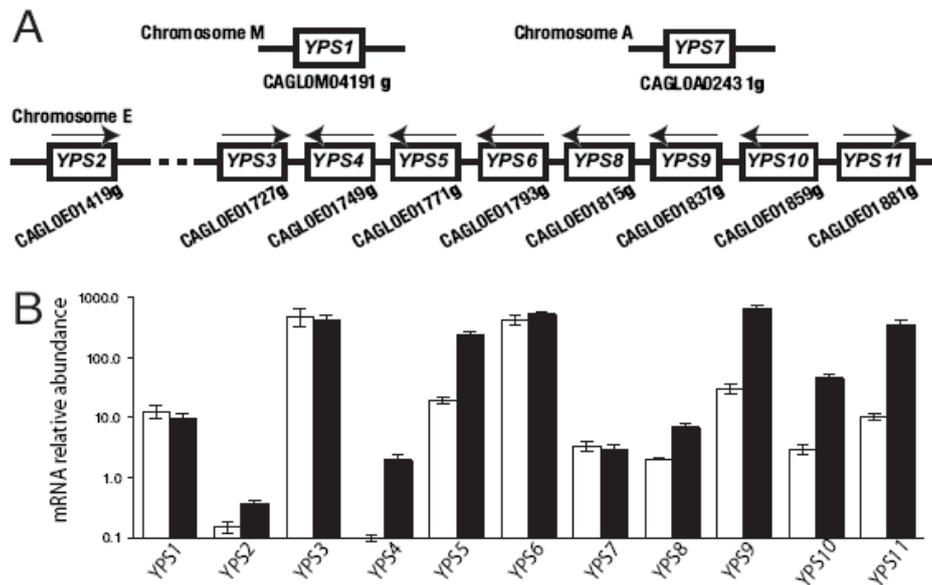


Fig 4. Perfil de transcripción de los genes *YPS* de *C. glabrata* fagocitada por macrófagos. (A) Representación esquemática de los loci de los genes *YPS*. (B) abundancia relativa de mRNA de los genes *YPS* de *C. glabrata* coincubada con macrófagos J774A.1 por 6 h (Barras negras) y levaduras crecidas en medio DMEM sin macrófagos (Barras blancas), medida por PCR en tiempo real (Kaur y col., 2007)

3.- JUSTIFICACIÓN

3.- JUSTIFICACIÓN

Las aspartil proteasas extracelulares de algunas especies de *Candida* han sido ampliamente estudiadas como factores de virulencia.

El papel biológico de las aspartil proteasas de *C. glabrata* parece estar asociado a la virulencia y al procesamiento de otras proteínas y estudios recientes apuntan a que su expresión y regulación está íntimamente relacionada con otros factores como la adherencia, adquisición de nutrientes, el sitio de la infección, etc.

Estudiar los niveles de expresión de estas proteasas a nivel transcripcional durante la infección a células epiteliales, aportará información sobre el papel de esta familia de genes en *C. glabrata*.

4.- OBJETIVOS

4.- OBJETIVOS

4.1.-OBJETIVO GENERAL.

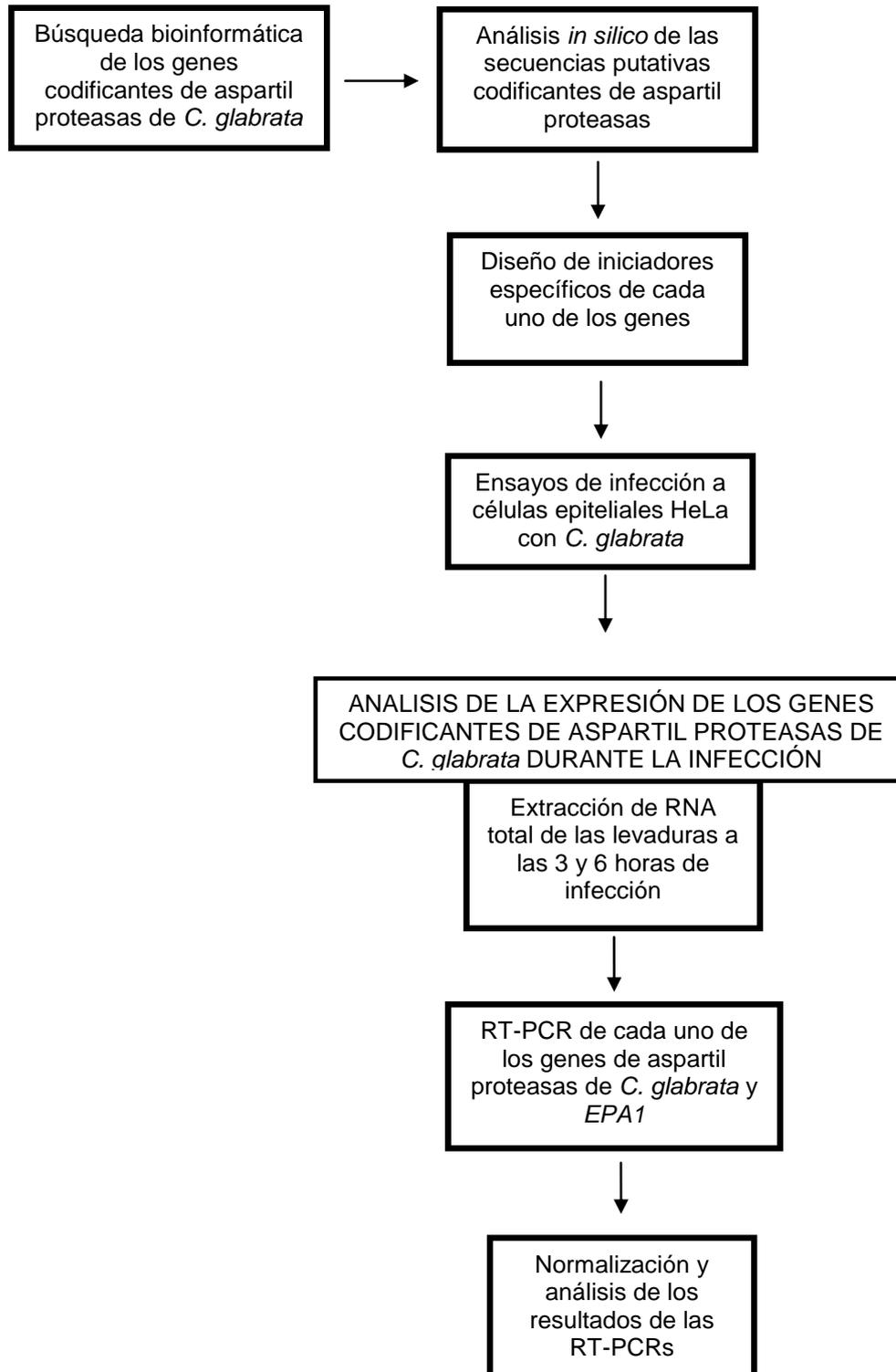
Estudiar el posible papel biológico de las aspartil proteasas putativas de *C. glabrata*, mediante el análisis de los niveles de expresión de los genes que las codifican durante la infección a células epiteliales.

4.2.- OBJETIVOS PARTICULARES.

- a) Identificar los genes codificantes de aspartil proteasas en el genoma de *C. glabrata*.
- b) Diseñar un procedimiento basado en la RT-PCR para el estudio de la expresión de genes codificantes de aspartil proteasas en *C. glabrata*.
- c) Estudiar los niveles de expresión de los genes codificantes de aspartil proteasas durante la infección a células epiteliales.

5.- DIAGRAMA GENERAL DE TRABAJO

5.- DIAGRAMA GENERAL DE TRABAJO



6.- MATERIAL Y MÉTODOS

6.- MATERIAL Y MÉTODOS

6.1. Microorganismos utilizados y medios de cultivo

Para la estandarización de la expresión y la amplificación de los genes se utilizaron dos cepas tipo de *C. glabrata*: CBS138 y BG6. Se utilizó como testigo negativo la cepa tipo: *C. albicans* ATCC 10231.

Los análisis de expresión de los genes codificantes de aspartil proteasas se realizaron a la cepa tipo de *C. glabrata* CBS138, esta cepa fue la utilizada en el proyecto de secuenciación del genoma.

6.2. Conservación de cepas

Las cepas de levaduras se cultivaron a 37°C en agar YPD (Dextrosa, Extracto de Levadura y Peptona), se conservaron a mediano plazo a 4°C a -20°C en agua desionizada estéril y en glicerol al 25% respectivamente y a largo plazo en glicerol al 25% a -70°C.

6.3. Medios de Cultivo

6.3.1. Medio de conservación:

Las levaduras se conservaron a corto plazo en Agar de Dextrosa Sabouraud: Dextrosa 4%, mezcla de peptonas 1%, agar bacteriológico 1.5% a un pH final de 5.6. A largo plazo a partir de un cultivo de 24 h en Caldo

Sabouraud y la adición de glicerol estéril al 50% para obtener una suspensión celular en glicerol al 25%, ésta se almacenó a -70° C.

6.3.2. Medio rico YPD

Extracto de levadura 1%, peptona de gelatina 2%, y dextrosa 2%. A un pH final de 6.7. Para el medio sólido se utilizó agar bacteriológico 1.5%.

Los medios líquidos se esterilizaron en autoclave a 121°C durante 15 minutos

6.3.3. Medio selectivo para *Candida* (Nickerson):

Extracto de levadura 0.1 %, glicocola 1%, dextrosa 1%, indicador de sulfito de bismuto 0.7% y agar-agar 1.5% a un pH final de 7.2. No requiere ser esterilizado.

6.3.4. Medios sólidos

Los medios sólidos se prepararon adicionando agar bacteriológico a una concentración del 1.5%. Los medios de cultivo sólidos se esterilizaron en autoclave a 120°C durante 15 min excepto el medio Nickerson.

6.4. LÍNEA CELULAR

Cultivo de células epiteliales

Línea de células epiteliales cervicales humanas HeLa.

6.4.1. Medio de propagación de la línea celular (Medio A)

La línea celular fue propagada utilizando medio DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium high glucose, con L-glutamina, sin piruvato de sodio), suplementado con suero de ternera neonata (STN) (GIBCO) al 10% y gentamicina 20µg/ml (GIBCO).

6.4.2. Medio simple para infección (Medio B)

Este medio fue el utilizado para los ensayos de infección de las células epiteliales HeLa con *C. glabrata*. El medio consistió en medio DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium high glucose, con L-glutamina, sin piruvato de sodio) con un pH de 6.8 equilibrado con regulador HEPES 25mM (Sigma-Aldrich). Este medio se preparó libre de suero y antibióticos.

6.4.3. Medio de conservación y criogenia

Este medio fue utilizado para el mantenimiento de las células epiteliales HeLa en congelación a -70°C y en nitrógeno líquido. El medio consistió en medio DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium high glucose, con L-glutamina, sin piruvato de sodio) suplementado con suero de ternera neonata, al 15% y dimetil sulfóxido (DMSO) (Sigma-Aldrich) al 10%.

6.5. Búsqueda bioinformática de los genes codificantes de probables aspartil proteasas en el genoma de *C. glabrata*

Para identificar a los genes codificantes de aspartil proteasas putativas en el genoma de *C. glabrata* (<http://cbi.labri.fr/Genolevures/elt/CAGL>) se llevaron a cabo las siguientes estrategias:

- a) Utilizando las secuencias reportadas para los genes *SAP1-10* de *C. albicans*, *SAPT1-4* de *C. tropicalis*, *SAPD1-4* de *C. dubliniensis*, *SAPP1-3* de *C. parapsilosis* y los genes codificantes de aspartil proteasas de *S. cerevisiae*, reportados en la base de datos del NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) se realizó la búsqueda de los genes codificantes de aspartil proteasas por todos los tipos de análisis BLAST (Basic Local Alignment Search Tool): búsqueda de secuencias nucleotídicas utilizando como molde secuencias nucleotídicas (blastn), búsqueda de secuencias aminoacídicas utilizando como molde secuencias aminoacídicas (blastp), búsqueda de secuencias aminoacídicas utilizando como molde secuencias nucleotídicas traducidas (blastx), búsqueda de secuencias nucleotídicas traducidas utilizando como molde secuencias aminoacídicas (tblastn), contra el genoma de *C. glabrata* y la base de datos del NCBI.
- b) Se realizó una búsqueda exhaustiva de los genes codificantes para aspartil proteasas utilizando el buscador de la página del genoma de *C. glabrata* y de la base de datos del NCBI.

- c) Con las secuencias obtenidas se realizaron nuevamente análisis BLAST (blastp, blastn, blastx y tblastn).
- d) Se efectuaron análisis BLAST (blastp, blastn y blastx) contra el genoma de *C. glabrata* utilizando las posibles combinaciones de la secuencia motif típicas de aspartil proteasas: [LIVMFGAC] - [LIVMTADN] - [LIVFSA] - D - [ST] - G – [STAV] - [STAPDENQ] - {GQ} - [LIVMFSTNC] - {EGK} - [LIVMFGTA], en donde: – separa los diferentes aminoácidos a lo largo de la secuencia, [] representa a los aminoácidos permitidos en esa posición, { } corresponde a todos los aminoácidos permitidos en esa posición excepto el indicado. Cabe aclarar que esta firma es la reportada por la base de datos de Prosite. La base de datos de Softberry varía en las posiciones marcadas con el símbolo { } en los que, de acuerdo con esta base de datos, cualquier aminoácido está permitido.

Se detectaron un total de trece genes putativos codificantes para aspartil proteasas de *C. glabrata* que denominamos *SAPGA-SAPGM*. Se realizó un análisis BLAST (blastp, blastn y blastx) contra los genomas de levaduras mas relacionadas filogenéticamente a *C. glabrata*. Posteriormente 11 de los 13 genes que arrojó nuestro análisis fueron reportados por Kaur y col., (Kaur y col., 2007) nombrándolos *YPS1* a *YPS11* debido a su parecido con las *yapsinas* de *S. cerevisiae*. Por lo anterior nos referiremos a los genes de esta forma, agregando los dos más encontrados por nosotros, uno como *YPS12* y otro, un gen codificante de una aspartil proteasa vacuolar, *PEP4*.

6.6. Análisis bioinformático de las secuencias nucleotídicas y aminoacídicas deducidas de los genes *YPS1-12* y *PEP4* putativos de *C. glabrata*

Las características analizadas fueron las siguientes:

- a) BLAST de la secuencia de aminoácidos con otras aspartil proteasas (servidor en línea <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/> y contra el genoma de *C. glabrata* (<http://cbl.labri.fr/Genolevures/elt/CAGL>).
- b) La búsqueda de ORF, secuencias reverso complementaria, mapa de restricción, la traducción para obtener la secuencia predicha de aminoácidos de cada una de las proteínas empleando el código genético alternativo para levaduras, fue realizado empleando el software DNAMAN versión v. 3.0 (LYNNON BIOSOFT, Vandreuil, Quebec, Canada. 1994-1997).
- c) La determinación del punto isoelectrico y tamaño molecular de cada una de las secuencias traducidas se realizó con el programa Antheprot 2000 versión 5.2.
- d) La predicción de “motif” (secuencias de aminoácidos específicas dentro de una proteína) fue determinada con la base de datos Prosite, disponible en el servidor <http://www.expasy.org> y la base de datos de Softberry disponible en la página <http://www.softberry.com>. Este es un

método para determinar la función de proteínas no caracterizadas y traducidas desde secuencias genómicas o de cDNA. Prosite, consta de una base de datos de secuencias de aminoácidos biológicamente significativas y patrones perfectamente formulados, de manera que con las herramientas computacionales apropiadas se pueda identificar a cuál de las familias de proteínas conocidas pertenece una proteína nueva de función desconocida (Falquet y col., 2002).

- e) La predicción de la localización celular de las proteínas hipotéticas codificadas por los genes *SAPG*, se efectuó en el servidor PSORT (Prediction of protein sorting signal and localization sites in aminoacid sequences) disponible en la dirección electrónica <http://www.psort.org/> y la base de datos de Softberry disponible en la página <http://www.softberry.com>.
- f) La predicción de regiones reguladoras se realizó con el programa MatInspector versión 2.2 (Quandt y col., 1995) disponible en la dirección electrónica (<http://www.gsf.de/biodv/matinspector.html>).

6.7. Relación filogenética de las aspartil proteasas y diseño de iniciadores

Para determinar una mejor relación entre las secuencias nucleotídicas y aminoacídicas se realizaron tres alineamientos sucesivos en el programa Clustal X versión 1.81 (Thompson y col., 1997), los parámetros de alineamiento

usados se muestran en la Tabla 4. Las secuencias se terminaron de alinear manualmente utilizando el programa “Seaview” (Galtier y col., 1996).

Tabla 4. Parámetros utilizados en los alineamientos múltiples de las secuencias nucleotídicas y aminoacídicas obtenidas de “GenBank” y experimentalmente.

| Parámetro | Valor |
|---------------------------------------|---------------|
| Apertura de Gap | 15 |
| Extensión de Gap | 6.6 |
| Eliminación de secuencias divergentes | 30% |
| Matriz de peso para proteínas | Series Gonnet |
| Uso de matriz negativa | No |

La relación filogenética entre las proteínas Saps reportadas para *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis* y *C. dubliniensis*, así como las deducidas a partir de las secuencias nucleotídicas de los genes *YPS1-12* y *PEP4* de *C. glabrata* se estableció con 297 aminoácidos, utilizando el programa MEGA (Molecular Evolutionary Genetics Analysis) versión 3.1 (Kumar y col., 2005) empleando el método de Máxima Parsimonia y se determinó el porcentaje de similitud entre los aminoácidos. Se realizaron 1000 aleatorizaciones tipo “bootstrap” para evaluar las ramas internas del árbol (Hillis y Bull, 1993).

Con base en este alineamiento se diseñaron un par de oligonucleótidos para cada gen detectado en la base de datos (Tabla 5).

Tabla 5. Iniciadores diseñados para amplificar por PCR un fragmento de los genes putativos *YPS* y *PEP4* de *C. glabrata*

| Gen | Iniciador | Localización | | Amplificado (p.b.) | Tm Individual |
|--------------|---|--------------|-------------|--------------------|---------------|
| | | Sentido | Antisentido | | |
| <i>YPS1</i> | SENTIDO 5' TTCTGGTGACAGTTGTATCTTGG 3' ANTISENTIDO 5' GATAAATGAAACCAAAGACCAGCG 3' | 1326-1348 | 1779-1803 | 477 | 56 |
| <i>YPS2</i> | SENTIDO 5' ACTCAACTGTTTTAACTTCGGTGGTGC 3' ANTISENTIDO 5' TAGCATGGAGAGTAGGATGTAAACACC 3' | 1234-1262 | 1743-1770 | 536 | 61 |
| <i>YPS3</i> | SENTIDO 5' AAAGCAAGTCGTCGATGTCATCG 3' ANTISENTIDO 5'TTGCAACTAACACTAAAGTGGTGC 3' | 951-973 | 1580-1603 | 652 | 58 |
| <i>YPS4</i> | SENTIDO 5' TTCTGTGTTACCAGCAAAGGTTGC 3' ANTISENTIDO 5' TTAATGTAGTTCTTACGGAGAGC 3' | 933-956 | 1411-1435 | 502 | 56 |
| <i>YPS5</i> | SENTIDO 5' TATACATATGCCAAGCAGCGTTGC 3' ANTISENTIDO 5'AACAAGGCAGTAACTGCTGATAAAGC 3' | 934-959 | 1528-1553 | 619 | 59 |
| <i>YPS6</i> | SENTIDO 5' ACCAGAAGGTAGCTGCATTAATCG 3' ANTISENTIDO 5' AATGGTAGCTAATATGGCAGCAACG 3' | 887-910 | 1542-1518 | 631 | 58 |
| <i>YPS7</i> | SENTIDO 5' TATGGGACCAATCTATATAACGTCC 3' ANTISENTIDO 5' TAAGTAGCATACGGTATGTAGCCC 3' | 831-855 | 1404 -1427 | 596 | 54 |
| <i>YPS8</i> | SENTIDO 5' TTGGGATTACAGGGTAATGATGC 3' ANTISENTIDO 5' AACTCTTTTTGAAGGTCAAACGCG 3' | 856-878 | 1457-1482 | 626 | 59 |
| <i>YPS9</i> | SENTIDO 5' TTCGGTAAATGTGACTGATTCATGG 3' ANTISENTIDO 5' ATCATAATGAGTATGGCAGAGTTGGC 3' | 1071-1096 | 1510-1535 | 464 | 59 |
| <i>YPS10</i> | SENTIDO 5' TAATAAGACGGAAGCCATCAGACTGC 3' ANTISENTIDO 5' TTGTAATTGCTGCTAGTACTAGGACG 3' | 978-1003 | 1479-1504 | 526 | 58 |
| <i>YPS11</i> | SENTIDO 5' TTGGTGTCCCATACAAGGAAATGGTC 3' ANTISENTIDO 5' AATCCACAAG ACCAGCAACA GGATAGC 3' | 1100-1125 | 1495-1521 | 421 | 63 |
| <i>YPS12</i> | SENTIDO 5' AATTGCACATGAAGATTCCGTTGCG 3' ANTISENTIDO 5' TATCAGTTATTGTAGCAGTTACTGGC 3' | 1001-1025 | 1542-1567 | 566 | 59 |
| <i>Pep4</i> | SENTIDO 5' TATCTGAAGAGTGTCAATGACCCAGC 3' ANTISENTIDO 5' TACAGCCTCAGCTAAACTGACAACATTGG 3' | 691-716 | 1208-1236 | 545 | 61 |

6.8. Obtención de DNA total de levaduras

Se cultivaron las cepas en 10 ml de medio YPD a 37°C por 24 h. El paquete celular se obtuvo por centrifugación (500 X g durante 5 min) en microtubos de 1.5 ml.

La extracción de DNA se realizó mediante el método de Hoffman y Winston modificado (Hoffman y Winston, 1987).

6.9. Determinación de la concentración de DNA

Se resuspendió 1 μ l del DNA en 49 μ l de agua desionizada estéril (dilución 1:50). La cuantificación de las muestras de DNA se realizó espectrofotométricamente midiendo la absorbancia a 260 y 280 nm en un espectrofotómetro Cary 50 conc (Varian).

Considerando que 1U A_{260} equivale a 50 μ g/ml de DNA de doble cadena y que una muestra de DNA puro tiene una relación A_{260}/A_{280} mínima de 1.8, la concentración de DNA se calculó de la siguiente manera:

$A_{260} \times \text{Dilución de la muestra de DNA (en este caso fue de 1:50)} \times 50 \mu\text{g/ml} = \mu\text{g/ml de DNA} \times 1000 = \text{concentración de DNA (en } \mu\text{g}/\mu\text{l)}$ (Hoffman y Winston, 1987).

La calidad del DNA total extraído de las levaduras fue confirmada por electroforesis en gel de agarosa al 1% en regulador TAE a 60 V. Los geles fueron teñidos con bromuro de etidio (1 μ g/ml) y se observaron con luz UV en

un documentador de imágenes “Eagle eye 1” (STRATAGENE) (Sambrook y Russell, 2001).

6.10. Amplificación de los genes *YPS1-12* y *PEP4* de *C. glabrata*

Se estandarizaron las condiciones de PCR de cada uno de los iniciadores diseñados de manera independiente, empleando el DNA obtenido de las cepas tipo de CBS138 y BG6, así como la cepa clínica CGL26 de *C. glabrata*. Las PCRs tanto para estandarizar como para los experimentos de expresión se llevaron a cabo en un termociclador Gene Amp PCR System 9700 (Applied Biosystems). La composición de la mezcla de reacción se muestra en la Tabla 6 y las condiciones de amplificación en la Tabla 7.

Tabla 6. Mezcla de reacción para la amplificación por PCR de cada uno de los genes *YPS1-12* y *PEP4* de *C. glabrata* de manera independiente.

| Reactivo | Concentración del reactivo | Concentración en la reacción | Volumen de reacción (µl) |
|-------------------|----------------------------|------------------------------|--------------------------|
| H ₂ O | | | 17.7 |
| Regulador de PCR | 10 X | 1 X | 2.5 |
| dNTP's | 10 mM | 0.2mM | 0.5 |
| MgCl ₂ | 50 mM | 2 mM | 1.0 |
| Iniciadores D y R | 10 mM | 0.6 mM | 1.5 c/u |
| Taq polimerasa | 5 U/µl | 1.5 U/µl | 0.3 |
| DNA | 50.0 ng/µl | 75.0 ng/µl | 1.0 |
| Volumen final | | | 25 |

Tabla 7.- Condiciones de amplificación de los genes *YPS1-12* y *PEP4* de *C. glabrata*.

| Condición | Temperatura | Tiempo |
|---------------------------|-------------------------|--------|
| Desnaturalización inicial | 94°C | 3 min |
| 38 ciclos de: | | |
| Desnaturalización | 94°C | 1 min |
| Alineamiento | variable para cada gen* | 1 min |
| Extensión | 72°C | 1 min |
| Extensión final | 72°C | 7 min |

* *YPS1* y *YPS4*= 56°C, *YPS2* y *PEP4cg*= 61°C, *YPS5*, 8, 9 y 12= 59°C, *YPS3*, 6 y 10= 58°C, *YPS11*= 63°C, *YPS7*= 54°C.

6.11. Análisis de secuencias reguladoras y probables sitios de unión a factores de transcripción en las aspartil proteasas del genoma de *C. glabrata*

La búsqueda se realizó utilizando la base de datos del genoma de *C. glabrata* (<http://cbi.labri.fr/Genolevures/elt/CAGL>). Con el fin de comparar las diferencias que existen entre las secuencias reguladoras de los genes *YPS1-12* y *PEP4* de *C. glabrata* y los genes *SAP* de *C. albicans* se realizó el análisis teórico de manera paralela de las secuencias reguladoras de los genes *SAP* de *C. albicans* utilizando la base de datos del genoma (<http://www.candidagenome.org/de>).

La búsqueda de sitios de unión a factores de transcripción, se realizó utilizando el programa en línea, MatInspector (<http://www.gsf.de/biodv/matinspector.html>) que se basa en el uso de una librería de matrices descriptivas pre-definidas para sitios de unión de proteínas reguladoras conocidas en hongos.

6.12. Preparación del inóculo de *Candida glabrata* CBS 138

Se resuspendió una colonia aislada de *C. glabrata* CBS138 en caldo YPD y se incubó 18-24 h a 37° C. Transcurrido este periodo se diluyó 40 veces en caldo YPD fresco y se incubó 3 h para obtener a las levaduras durante la fase logarítmica de crecimiento. Posteriormente se colectaron las células por centrifugación y se lavaron con DPBS (GIBCO) frío 3 veces. El paquete celular

se ajustó a una D.O. de 0.75 a 550 nm en 1 ml de DPBS equivalentes a 3×10^7 levaduras. La infección se realizó con el volumen necesario para alcanzar esta turbidez por ml de medio DMEM.

6.13.- Análisis de la expresión de los genes codificantes de aspartil proteasas de *C. glabrata*

El perfil de expresión de los genes se realizó mediante el procedimiento de RT-PCR, utilizando iniciadores específicos para cada gen. Adicionalmente se diseñaron iniciadores específicos para amplificar el transcrito del gen *EPA1*, (Tabla 8) el cual codifica para una adhesina de pared celular de *C. glabrata* la cual se ha reportado es la responsable del 95% de la adherencia de esta levadura a células epiteliales HEP2 *in vitro* (Cormack y col.1999) por lo que nos pareció conveniente monitorear su transcripción.

Tabla 8. Características de los iniciadores diseñados para amplificar el gen *EPA1* de *C. glabrata*.

| Gen | Iniciador | Localización | | Tamaño del Amplificado (pb) | Tm |
|-------------|---|--------------|--------------|-----------------------------|-------|
| | | Sentido | Anti-sentido | | |
| <i>EPA1</i> | <p>SENTIDO 5'-TGGTACTACTACTACACCCC-3'</p> <p>ANTISENTIDO 5'-GGCTAGTGGAGAAAATACCC-3'</p> | 927-946 | 1330-1311 | 403 | 56° C |

6.13.1.- Cultivo celular para ensayos de expresión de los genes *YPS1-12* y *PEP4* de *C. glabrata* durante la adherencia a células epiteliales

Se cultivaron las células HeLa en medio A para células, en frascos de Roux de 75 cm² de área cultivable (Corstar corporation) (4 frascos por cada tiempo: 3 y 6 h). Al alcanzar un 90-95% de confluencia se lavaron 3 veces con PBS estéril y se agregaron 15 ml de medio B para células. Estos frascos se inocularon con *C. glabrata* CBS 138 (3×10^7 levaduras/ml de medio B). Durante la propagación las células fueron incubadas a 37°C en atmósfera de CO₂ al 5% y durante la infección las células fueron incubadas durante 3 y 6 horas a 37°C en agitación orbital a 50 RPM.

Como control, para descartar la inducción de la expresión de los genes por el medio y condiciones de cultivo, se inocularon simultáneamente, con la misma cantidad de levaduras: frascos de Roux con medio B sin células epiteliales los cuales fueron sometidos a las mismas condiciones de incubación.

6.14. Extracción de RNA total

La extracción de RNA se realizó a las 3 y 6 horas de incubación de las siguientes muestras:

- Testigo: *C. glabrata* incubada en medio B sin células epiteliales HeLa.

- *C. glabrata* adheridas: *C. glabrata* coincubadas con células HeLa durante 3 y 6 h que fueron capaces de permanecer adheridas a la monocapa de células epiteliales tras lavar la caja 3 veces con PBS.
- *C. glabrata* no adheridas: *C. glabrata* coincubadas con células HeLa durante 3 y 6 h suspendidas en el medio .B

Tras los tiempos de infección se retiró el medio de los frascos con las levaduras no adheridas a las células epiteliales. Para la obtención del RNA de las levaduras adheridas se lavaron los frascos de cultivo celular con PBS estéril 3 veces. Posteriormente se recuperaron las levaduras agregando 5 ml de agua helada y raspando las cajas con ayuda de un gendarme para células. Esto se realizó nuevamente para recuperar el mayor número posible de levaduras. La suspensión resultante se agitó en un agitador SUPER-MIXER (LAB-LINE INSTRUMENTS, Inc.) durante un minuto para destruir las células epiteliales. Posteriormente se obtuvo el RNA de la misma forma que en el caso de las células no adheridas y e incubadas en medio B sin células epiteliales. El método se explica a continuación:

1. Se obtiene el paquete celular por centrifugación (500 x g durante 5 min).
2. Decantar y suspender el paquete celular en 400 µl de regulador AE frío (acetato de sodio 50mM, EDTA 10mM, pH de 5.2)
3. Transferir a un microtubo de 1.5 ml y agregar 40 µl de SDS al 10 % y 500 µl de fenol equilibrado con regulador AE
4. Mezclar por inversión e incubar a 65°C/ 4 minutos, y transferir rápidamente a -70°C / 10 minutos

5. Descongelar y centrifugar a 12 000 x g / 5 minutos
6. Recuperar sobrenadante y agregar 500 μ l de fenol:cloroformo:isoamílico 25:24:1 pH 8, mezclar por inversión y centrifugar a 12000 x g / 5 minutos
7. Adicionar 0.1 volúmenes de acetato de sodio 3M pH 5.2 y 2.5 volúmenes de etanol al 95%. Colocar a -20°C toda la noche para la precipitación del RNA
8. Centrifugar a 12 000 x g / 10 minutos y desechar sobrenadante. Lavar 2-3 veces con 500 μ l de etanol al 70 %
9. Dejar secar el botón e hidratar con 30 μ l de H₂O libre de RNAsas

Farell, 1998.

6.15. Determinación de la concentración de RNA total

Se tomó 1 μ l del RNA y se resuspendió en 49 μ l de agua desionizada estéril libre de RNAsas (dilución 1:50). La cuantificación de las muestras de RNA se realizó por espectrofotometría midiendo la absorbencia a 260 y 280 nm en un espectrofotómetro Cary 50 conc (VARIAN).

Considerando que 1U A_{260} equivale a 40 μ g/ml de RNA y que una muestra de RNA puro tiene una relación A_{260}/A_{280} mínimo de 1.8, la concentración de RNA se calculó de la siguiente manera:

$A_{260} \times \text{Dilución de la muestra de RNA (en este caso es 1:50)} \times 40 \mu\text{g/ml} = \mu\text{g/ml de RNA} \times 1000 = \text{concentración de RNA (en } \mu\text{g}/\mu\text{l)}$ (Farrell, 1998).

6.16. Comprobación de la integridad de los RNAs

Se verificó la calidad del RNA, mediante electroforesis en geles de agarosa en condiciones desnaturalizantes como describió Lerach y col. en 1977.

El RNA se trató con DNasa 1 de acuerdo a como se describe en el Kit Deoxyribonuclease I, Amplification Grade (Invitrogen). Posteriormente a este tratamiento se corrió un PCR contra el 18S rDNA como control para verificar la ausencia de DNA en la muestra, solo se les realizó la reacción de retrotranscripción a las muestras que no amplificaron el gen constitutivo y por ende no estuvieron contaminadas con DNA.

6.17. RT-PCR

La expresión de los genes *YPS1-12* y *PEP4* se llevó a cabo usando el kit comercial ThermoScript RT-PCR System (Invitrogen). Para sintetizar la primera cadena de cDNA se utilizaron: 2 μg de RNA total previamente tratado con DNasa1, oligo (dT) y la enzima Transcriptasa Reversa (RT). La síntesis de la segunda cadena, se llevó a cabo usando el cDNAss (200 ng) como molde y los dos oligonucleótidos específicos (sentido y antisentido), diseñados previamente

en este trabajo con base en la secuencia de los genes de interés para dar lugar a un cDNAs.

Los productos de RT-PCR se corrieron en geles de agarosa al 1% y posteriormente se tiñeron con bromuro de etidio (1 µg/ml).

El transcrito del gen 18S rDNA se usó como control positivo de la expresión y para la normalización de los resultados. Las características de los oligonucleótidos para amplificar un fragmento del gen 18S rDNA se muestran en la Tabla 9.

Tabla 9. Características de los iniciadores empleados para amplificar el gen 18S rDNA de *C. glabrata*.

| Gen | Iniciador | Localización | | Tamaño del amplificado (pb) | Tm |
|-----------------|---|--------------|--------------|-----------------------------|-----------|
| | | Sentido | Anti-sentido | | |
| 18S rDNA | <p style="text-align: center;">SENTIDO 5'-CAATTGGAGGGCAAGTCTGG-3'</p> <p style="text-align: center;">ANTISENTIDO 5'-TAAGAACGGCCATGCACCAC-3'</p> | 927-946 | 1330-1311 | 403 | 64 |

6.18. Procesamiento y análisis de los resultados

La normalización de los resultados se realizó utilizando el programa GELQUANT versión 1.5.9.

La construcción de las tablas se realizó utilizando el Programa EXCEL® 2007 (Microsoft corporation).

El análisis estadístico se realizó utilizando el programa MINITAB® Release 14.1. (1972-2003 Minitab Inc).

7.- RESULTADOS

7.- RESULTADOS

7.1.-Análisis bioinformático

Se realizó la búsqueda de los genes codificantes de aspartil proteasas en el genoma de de *C. glabrata* (<http://cbi.labri.fr/Genolevures/elt/CAGL>) y en la base de datos del NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Se detectaron 12 genes de aspartil proteasas extracelulares putativas de *C. glabrata* (YPS1-12) y una aspartil proteasa vacuolar denominada *PEP4*.

7.1.1.- Análisis *in silico* de la secuencias nucleotídicas y aminoacídicas de los genes *YPS1-12* y *PEP4* de *C. glabrata*

Se determinó la localización cromosómica, la longitud del gen, se realizó la búsqueda de intrones, se detectó el numero de acceso tanto en el genoma de *C. glabrata* como en la base de datos del NCBI y se realizó la traducción a secuencias aminoacídicas utilizando el código alternativo para levaduras. A partir de las secuencias aminoacídicas deducidas, se determinó el peso molecular de la proteína, el punto isoeléctrico y la presencia de secuencias motivo.

Las secuencias motivo de algunas aspartil proteasas (de *C. glabrata* y *C. albicans*) no cumplen de manera estricta con la firma reportada en las dos bases de datos utilizadas, sin embargo en la base de datos del NCBI y del

genoma de *C. albicans*, estas proteínas están descritas actualmente como aspartil proteasas.

En ninguna de las secuencias se detectaron intrones, el resto de las características se muestran en la Tabla 10.

Tabla 10.- Análisis *in silico* de las proteínas putativas Yps1-12 y PrA de *C. glabrata* reportadas en la base de datos del NCBI y en el genoma de *C. glabrata*.

| Proteína | No. de acceso en el genoma | a. a. | MM (kDa) | pI | Secuencia "motif" | LC (Softberry) | LC (PSORTII) | Sitios de corte de peptidasa señal | RT | C |
|----------|----------------------------|-------|----------|-----|------------------------------|---------------------------------|--------------|------------------------------------|--------------|---|
| Yps1 | CAGL0M04191g | 601 | 63.8 | 5.0 | VLVDTGSSDLWI ALLDSGTTLYL | Extracelular GPI | Nuclear | 18-19 | 585 - 601 | M |
| Yps2 | CAGL0E01419g | 591 | 63.2 | 4.4 | LLLDTGSSDMWV ALLDSGTTVSYL | Extracelular GPI | Citoplasma | 18-19 | 574- 590 | E |
| Yps3 | CAGL0E01727g | 539 | 58.9 | 6.4 | VQLDTGSSDLWF VLLDTGTTLAYA | Extracelular | Citoplasma | 14-15 | 523- 539 | E |
| Yps4 | CAGL0E01749g | 482 | 53.2 | 8.4 | VQLDTGSSDLWF TLLDTGVTTSVL | Mitocondrial | Extracelular | 1-15 | | E |
| Yps5 | CAGL0E01771g | 519 | 57.2 | 5.5 | VQLDTGSSDLWF ALLDTGTTYTYM | Extracelular GPI | Extracelular | 15-16 | 503- 519 | E |
| Yps6 | CAGL0E01793g | 516 | 55.9 | 4.6 | VQLDTGSADLWF ALIDSGTTISEF | Extracelular GPI | Extracelular | 15-16 | 499- 515 | E |
| Yps7 | CAGL0A02431g | 587 | 63.4 | 4.7 | VLLDPSFALSYL | Extracelular GPI | Extracelular | 18-19 | 571- 587 | A |
| Yps8 | CAGL0E01815g | 519 | 56.7 | 6.8 | VQLDTGSSDLWF ALLDSGTTLVV | Reticulo Endoplásmico GPI | Extracelular | 15-16 | 503- 519 | E |
| Yps9 | CAGL0E01837g | 521 | 56.9 | 5.1 | LQIDTGSSDLFV TLLDSGSTISLL | Reticulo Endoplásmico GPI | Extracelular | 1-16 | 505- 521 | E |
| Yps10 | CAGL0E01859g | 505 | 55.3 | 7.3 | AQLDTGSSDLWF ALFDSGTSYSYV | Reticulo Endoplásmico GPI | Extracelular | 13-14 | 489- 505 | E |
| Yps11 | CAGL0E01881g | 508 | 55.6 | 5.0 | LLVDTGSSDFWV ALLDTGSTDTHL | Extracelular GPI | Nuclear | 29-30 | 492- 508 | E |
| Yps12 | CAGL0J02288g | 541 | 59.5 | 4.6 | LVLDTGSSDLWV ALLDTGSTLIEL | Extracelular | Citoplasma | 19-20 | | J |
| PrAcg | CAGL0M02211g | 415 | 45.4 | 4.6 | VILDGSSNLWV AAIDTGTSLITL | Extracelular | Extracelular | 22-23 | | M |

NA: número de acceso; MM: masa molecular; pI: punto isoeléctrico, TM: tamaño molecular; LC: localización celular; RT: región transmembranal; C: cromosoma.

7.1.2.- Análisis de las regiones reguladoras de los genes *YPS1-12* y *PEP4* de *C. glabrata* y *SAP* de *C. albicans*

Las secuencias reguladoras se detectaron en la base de datos de cada uno de los genomas y se sometió a una búsqueda de sitios de unión a factores de transcripción de los genes *SAP* de *C. albicans*, así como de los *YPS* y *PEP4* de *C. glabrata* utilizando la base de datos MatInspector versión 2.2 (Quandt y col., 1995) disponible en la dirección electrónica (<http://www.gsf.de/biodv/matinspector.html>) los resultados más relevantes se resumen en la Tabla 11.

Tabla 11.- Sitios probables de unión a factores de transcripción detectados en las regiones reguladoras de los genes *SAP* de *C. albicans*, *YPS* y *PEP4* de *C. glabrata* y el *YPS1* de *S. cerevisiae*.

| Gen | Factor | <i>C. albicans</i> | | | | | | | | | | | | <i>C. glabrata</i> | | | | | | | | | | | | <i>YPS1</i> |
|---|--------|--------------------|----|---|---|---|---|---|----|---|---------------------------|---|---|--------------------|---|---|---|---|---|---|----|----|-------------------|------|------|-------------|
| | | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 | PEP4 | YPS1 | |
| Regulador de respuesta al pH (<i>Aspergillus</i>) | | | | | | | 1 | | | 1 | | | | | | | 1 | | | | | | | | | 1 |
| Factor de levaduras MCM1, coopera con los factores sexual de MAT α de <i>S. cerevisiae</i> | | | | | | | | | 1 | | | | | | | | | | | | | | 1 | | | |
| Factor de choque térmico de levaduras | | 1 | | | | | | | | | | | | 2 | | | | | 2 | | | | | | | |
| Activador de genes regulados por nitrógeno | | 6 | 18 | 5 | | 7 | 5 | 1 | 14 | 3 | 3 | 3 | 7 | | 5 | 4 | 5 | | 2 | 2 | 2 | 2 | 4 | 7 | | |
| MSN2/MSN4, STRE elemento de estrés de <i>S. cerevisiae</i> | | | 5 | | | | 3 | 2 | 1 | 1 | | | 1 | | 1 | | 1 | | | 1 | | | | | | |
| Proteína homeodominio del factor sexual α 2 | | 2 | 4 | 2 | 2 | | | | | 2 | 3 | | | 3 | 1 | 1 | 2 | 1 | | | 1 | 1 | 1 | 1 | | |
| Factor sexual α 1 de <i>S. cerevisiae</i> | | 1 | 5 | | 2 | 3 | 2 | 1 | 1 | 2 | | | | 2 | 4 | | 2 | | 1 | 1 | 1 | 1 | | | 1 | |
| Elemento de respuesta al estrés | | | | | | | | | 1 | | | | | | 1 | | 1 | | | | | | | | | |
| <i>C. albicans</i> | | | | | | | | | | | <i>C. glabrata</i> | | | | | | | | | | | | <i>S.c</i> | | | |

S.c: *Saccharomyces cerevisiae*

7.2.- Amplificación de los genes *YPS1-12* y *PEP4* de *C. glabrata*

Para estandarizar la técnica de PCR inicialmente se diseñaron procedimientos de PCR independientes para cada uno de los genes. Se utilizó como molde el DNA obtenido de una de las cepas de origen clínico (CGL26), las cepas tipo BG6 y CBS138 de *C. glabrata*, y como testigo negativo se utilizó la cepa tipo de *C. albicans* ATCC10231 (Fig.5).

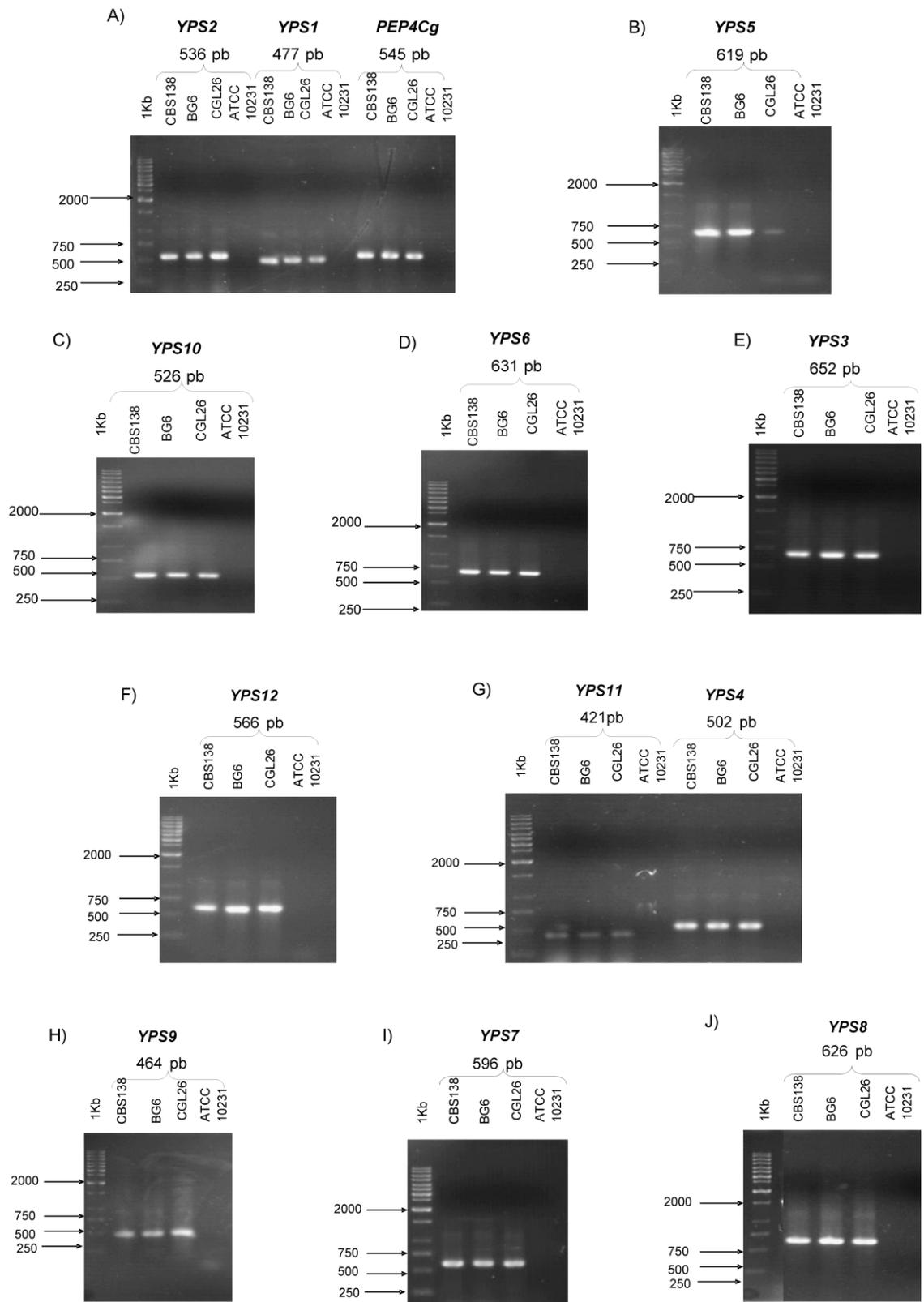


Fig. 5.- Amplificación de un fragmento de los genes *YPS1-12* y *PEP4* de *C. glabrata*. Se utilizó como molde DNA de cepas de un aislado clínico (CGL26) y las cepas tipo BG6 y CBS138, como testigo negativo se utilizó *C. albicans* ATCC10231. En cada panel se especifica el gen amplificado, así como el tamaño del fragmento esperado.

7.3.- Perfil de expresión de los genes *YPS1-12* y *PEP4* de *C. glabrata* durante la infección a células epiteliales HeLa

Se distinguen 3 condiciones, las cuales son:

- Testigo: *C. glabrata* sin células HeLa incubadas 3 y 6 h en medio B
- *C. glabrata* adheridas: *C. glabrata* coincubadas 3 y 6 h con células HeLa en medio B y que permanecieron adheridas a las células HeLa a pesar de los lavados
- *C. glabrata* no adheridas: *C. glabrata* coincubadas con células HeLa suspendidas en medio B.

Se muestra el promedio de dos muestras biológicas independientes normalizadas 3 veces cada una. Las barras de error muestran el error estándar de los promedios de las muestras.

En las tablas se observan los valores de P estadístico calculados mediante la prueba del rango para muestras independientes o prueba de Mann-Whitney, la cual es una prueba no paramétrica que realiza un estudio hipotético de la igualdad entre dos medias de dos muestras independientes cuando los datos no alcanzan a ser de tipo cuantitativo sino ordinales.

En los recuadros oscuros de las tablas se resalta las muestras que comparadas presentan diferencia significativa, ya sea por que el valor de P es igual o menor a 0.05, o porque uno de los valores es cero.

7.3.1.- Expresión de el gen *YPS1* de *C. glabrata*

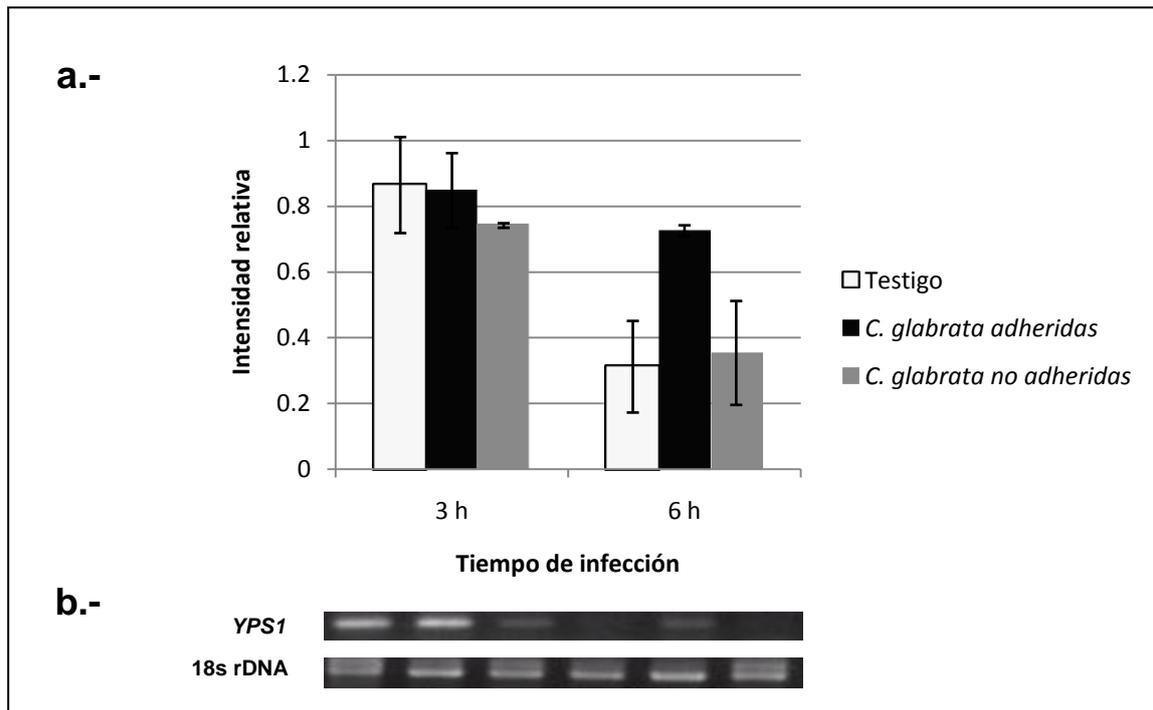


Fig. 6.- Perfil de expresión del gen *YPS1* de *C. glabrata* bajo las condiciones del estudio. a.- Promedio de la expresión del gen en dos muestras biológicas independientes. b.- se muestra el gel más representativo del efecto biológico observado.

Tabla 12.- Análisis estadístico comparativo entre las condiciones del estudio para el gen *YPS1* de *C. glabrata* mediante la prueba de Mann-Whitney.

| Análisis estadístico entre las condiciones: | | | 3 h | 6 h |
|---|-----|--------------|--------|--------|
| <i>C. glabrata adheridas</i> | vs. | Testigo | 0.9362 | 0.0051 |
| <i>C. glabrata no adheridas</i> | vs. | Testigo | 1.0 | 0.5218 |
| <i>C. glabrata adheridas</i> | vs. | no adheridas | 1.0 | 0.1735 |

Se distingue que la expresión del gen *CgYPS1* es importante en las levaduras adheridas a células epiteliales a las 6 h de infección puesto que expresión fue mayor que en el testigo sin células HeLa.

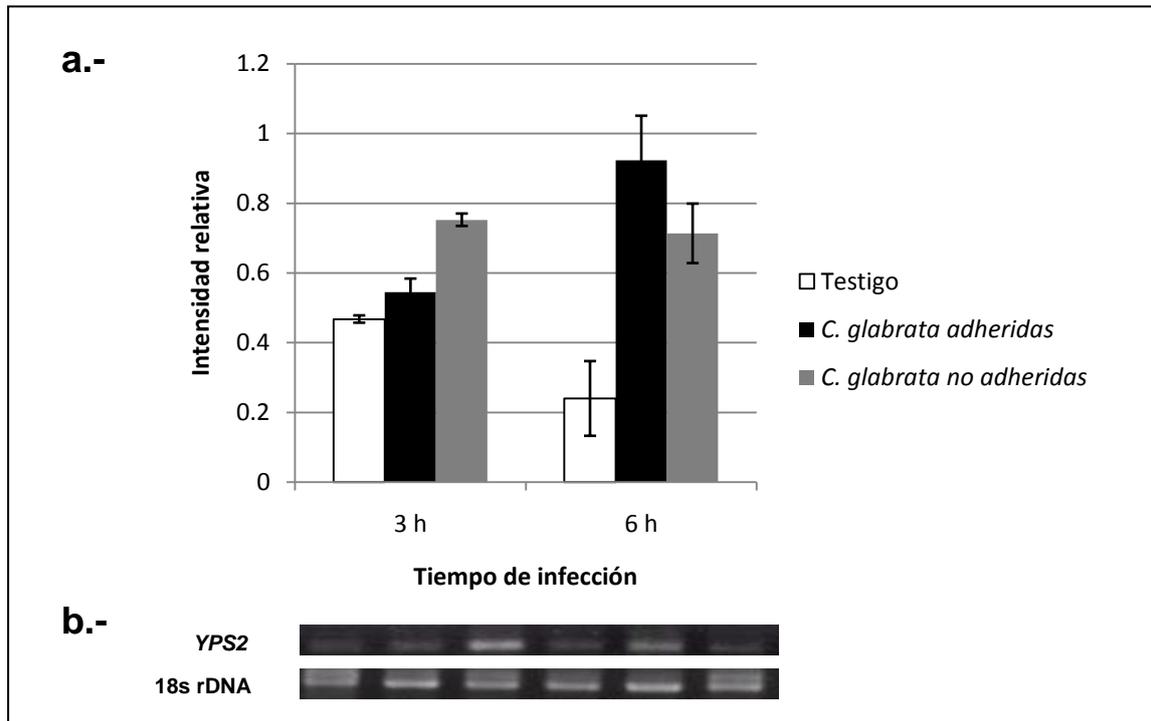
7.3.2.- Expresión del gen *YPS2* de *C. glabrata*

Fig. 7.- Perfil de expresión del gen *YPS2* de *C. glabrata* bajo las condiciones del estudio. a.- Promedio de la expresión del gen en dos muestras biológicas independientes. b.- se muestra el gel más representativo del efecto biológico observado.

Tabla 13.- Análisis estadístico comparativo entre las condiciones del estudio para el gen *YPS2* de *C. glabrata* mediante la prueba de Mann-Whitney.

| Análisis estadístico entre las condiciones: | 3 h | 6 h |
|---|--------|--------|
| <i>C. glabrata</i> adheridas vs. Testigo | 0.298 | 0.0051 |
| <i>C. glabrata</i> no adheridas vs. Testigo | 0.0051 | 0.0051 |
| <i>C. glabrata</i> adheridas vs. no adheridas | 0.0051 | 0.1735 |

El gen *CgYPS2* se expresó más en las células no adheridas a las 3 y 6 horas respecto al testigo, y en las células adheridas a las 6 h. Lo anterior sugiere que la presencia de células epiteliales juega un papel de inducción en la expresión de este gen.

7.3.3.- Expresión del gen *YPS3* de *C. glabrata*

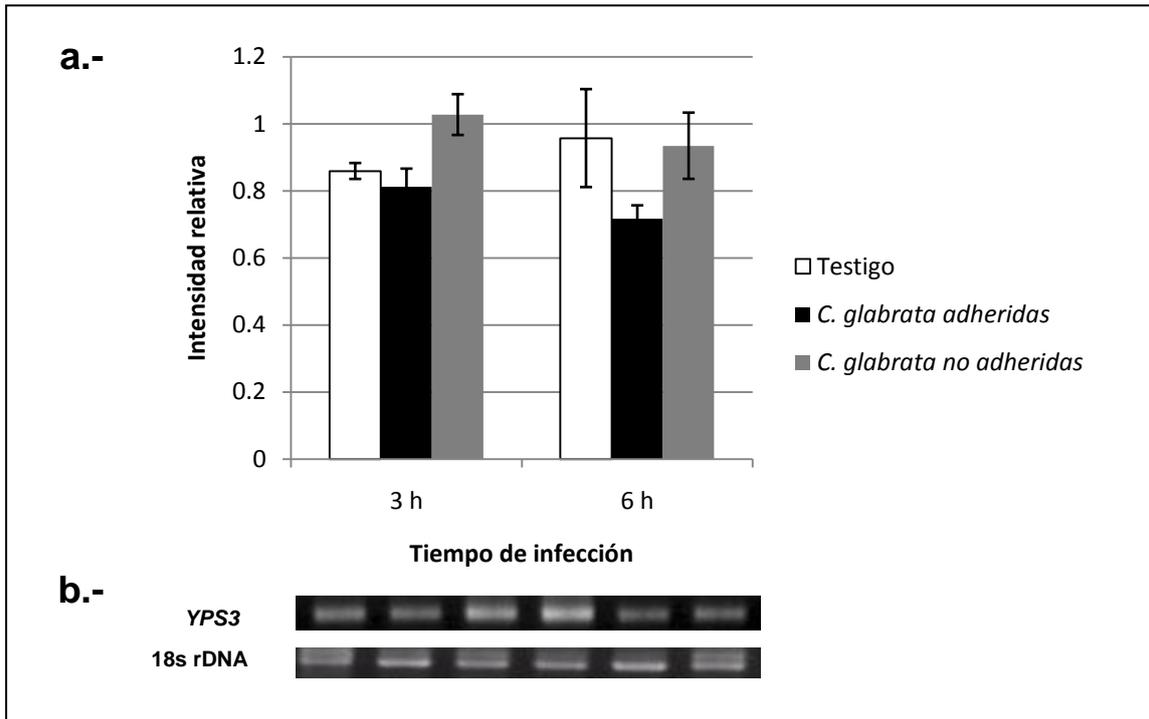


Fig. 8.- Perfil de expresión del gen *YPS3* de *C. glabrata* bajo las condiciones del estudio. a.- Promedio de la expresión del gen en dos muestras biológicas independientes. b.- se muestra el gel más representativo del efecto biológico observado.

Tabla 14.- Análisis estadístico comparativo entre las condiciones del estudio para el gen *YPS3* de *C. glabrata* mediante la prueba de Mann-Whitney.

| Análisis estadístico entre las condiciones: | | | 3 h | 6 h |
|---|-----|--------------|--------|--------|
| <i>C. glabrata</i> adheridas | vs. | Testigo | 0.8102 | 0.3785 |
| <i>C. glabrata</i> no adheridas | vs. | Testigo | 0.0927 | 1 |
| <i>C. glabrata</i> adheridas | vs. | no adheridas | 0.1282 | 0.1735 |

No existen diferencias estadísticamente significativas entre las condiciones del estudio. Sin embargo, a diferencia de otros genes, es un gen que se expresa en todas las condiciones probadas.

7.3.4.- Expresión del gen *YPS4* de *C. glabrata*

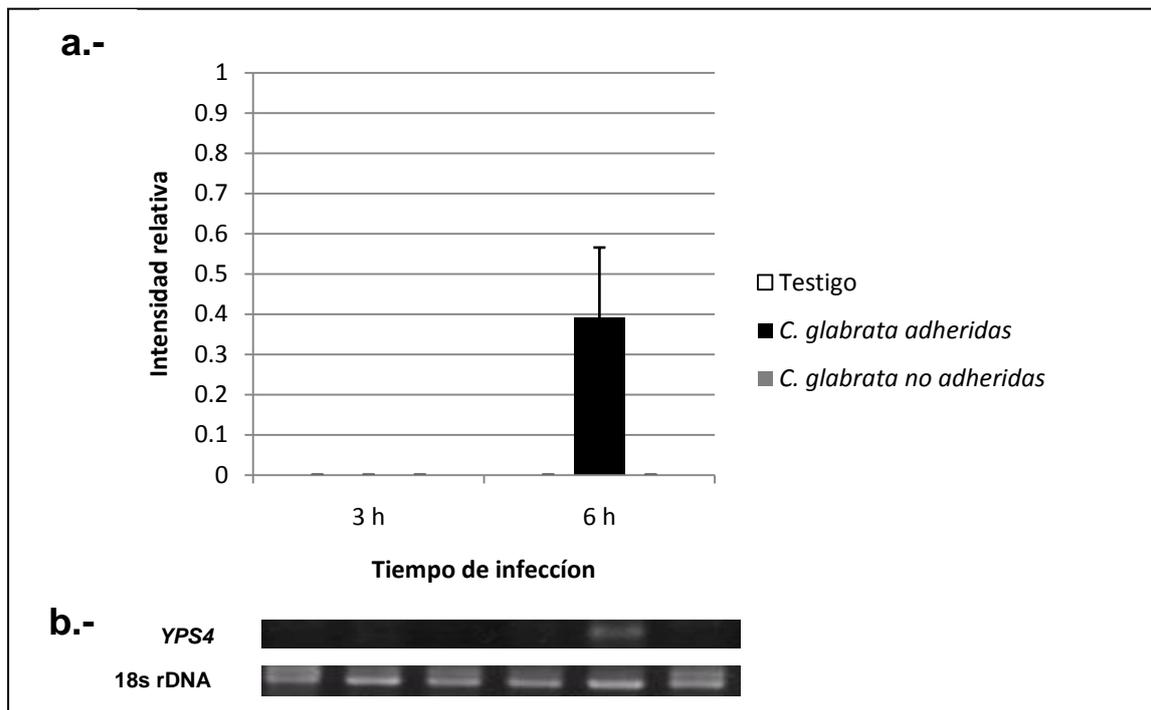


Fig. 9.- Perfil de expresión del gen *YPS4* de *C. glabrata* bajo las condiciones del estudio. a.- Promedio de la expresión del gen en dos muestras biológicas independientes. b.- se muestra el gel más representativo del efecto biológico observado.

Tabla 15.- Análisis estadístico comparativo entre las condiciones del estudio para el gen *YPS4* de *C. glabrata* mediante la prueba de Mann-Whitney.

| Análisis estadístico entre las condiciones: | | 3 h | 6 h |
|---|------------------|-----|-----|
| <i>C. glabrata</i> adheridas | vs. Testigo | | |
| <i>C. glabrata</i> no adheridas | vs. Testigo | | |
| <i>C. glabrata</i> adheridas | vs. no adheridas | | |

Solo existe expresión del gen *CgYPS4* en las células adheridas a las 6 h, lo anterior puede significar que este gen sea importante en el proceso de adherencia.

7.3.5.- Expresión del gen *YPS5* de *C. glabrata*

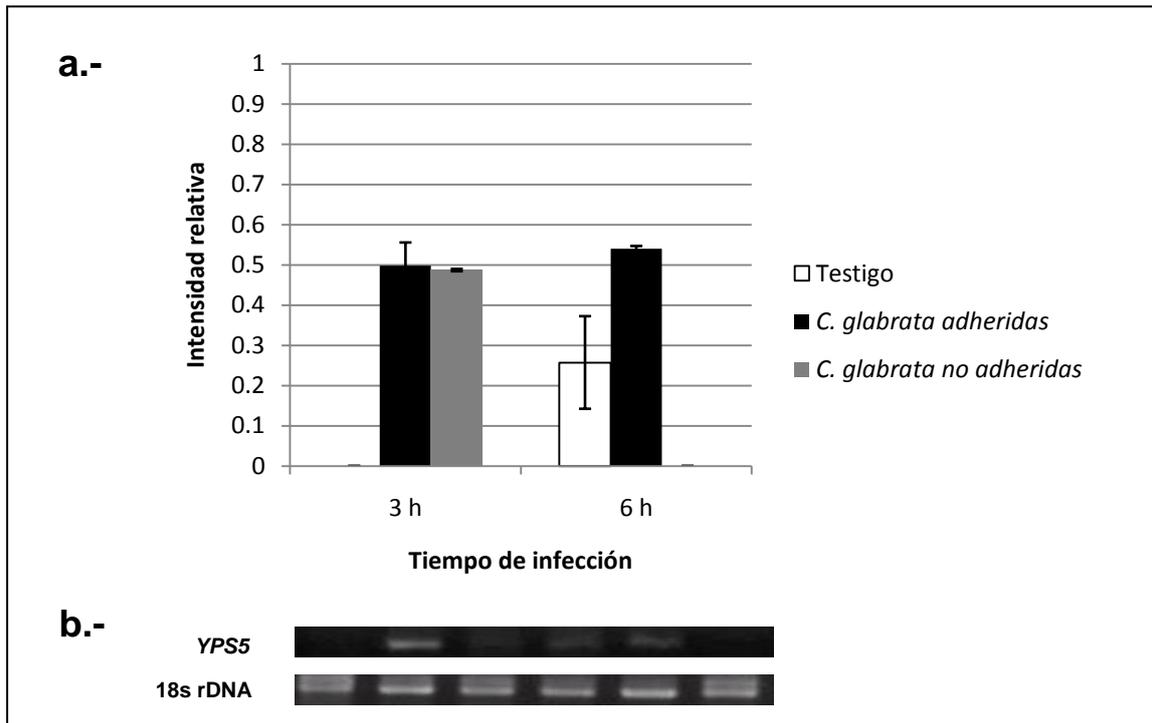


Fig. 10.- Perfil de expresión del gen *YPS5* de *C. glabrata* bajo las condiciones del estudio. a.- Promedio de la expresión del gen en dos muestras biológicas independientes. b.- se muestra el gel más representativo del efecto biológico observado.

Tabla 16.- Análisis estadístico comparativo entre las condiciones del estudio para el gen *YPS5* de *C. glabrata* mediante la prueba de Mann-Whitney.

| Análisis estadístico entre las condiciones: | 3 h | 6 h |
|---|-----|--------|
| <i>C. glabrata</i> adheridas vs. Testigo | | 0.0051 |
| <i>C. glabrata</i> no adheridas vs. Testigo | | |
| <i>C. glabrata</i> adheridas vs. no adheridas | 1 | |

La expresión del gen *CgYPS5* se ve inducida por la presencia de células HeLa a las 3 h de infección, tanto en las levaduras adheridas como en las no adheridas. Sin embargo la expresión de este gen sólo se mantiene en las

células adheridas a las 6 h mientras que en las no adheridas su expresión se ve reprimida.

7.3.6.- Expresión del gen *YPS6* de *C. glabrata*

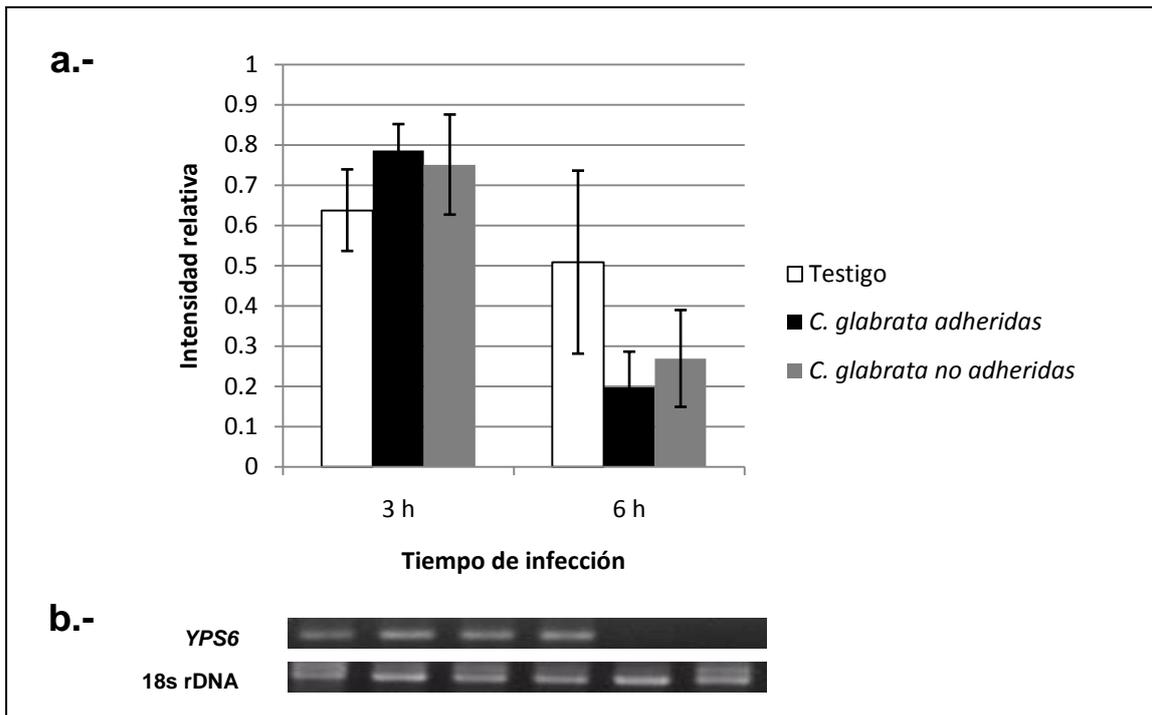


Fig. 11.- Perfil de expresión del gen *YPS6* de *C. glabrata* bajo las condiciones del estudio. a.- Promedio de la expresión del gen en dos muestras biológicas independientes. b.- se muestra el gel más representativo del efecto biológico observado.

Tabla 17.- Análisis estadístico comparativo entre las condiciones del estudio para el gen *YPS6* de *C. glabrata* mediante la prueba de Mann-Whitney.

| Análisis estadístico entre las condiciones: | | | 3 h | 6 h |
|---|-----|--------------|--------|--------|
| <i>C. glabrata</i> adheridas | vs. | Testigo | 0.1735 | 0.5218 |
| <i>C. glabrata</i> no adheridas | vs. | Testigo | 0.1735 | 0.5218 |
| <i>C. glabrata</i> adheridas | vs. | no adheridas | 1 | 0.5218 |

No existen diferencias estadísticamente significativas entre las condiciones del estudio.

7.3.7.- Expresión del gen *YPS7* de *C. glabrata*

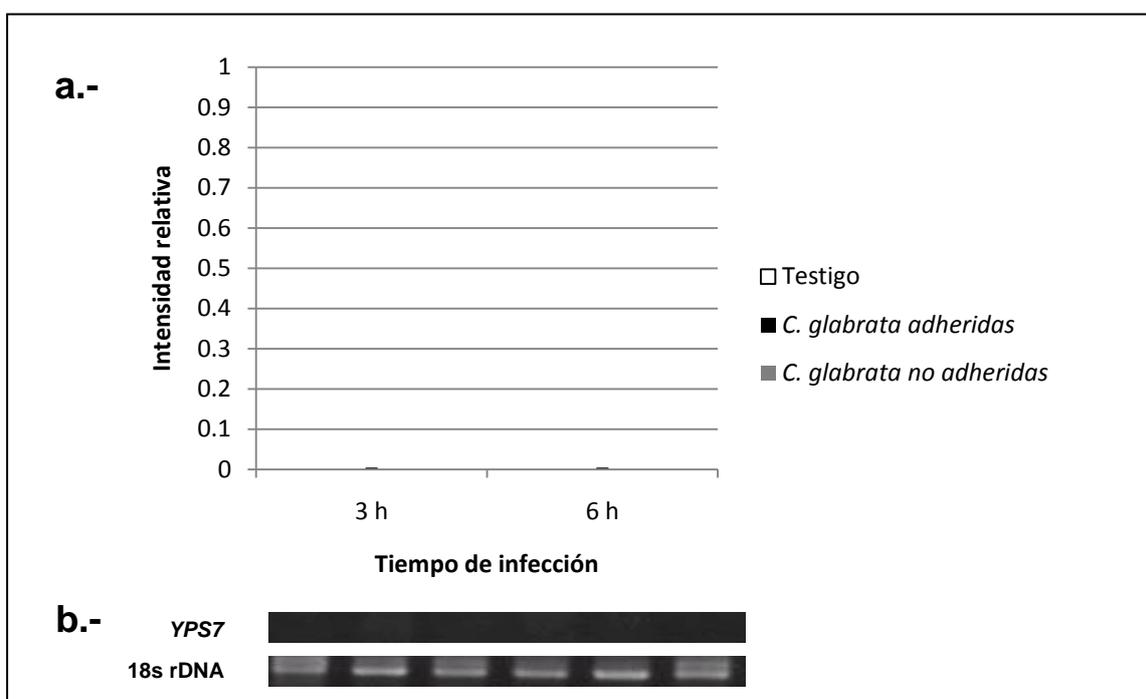


Fig. 12.- Perfil de expresión del gen *YPS7* de *C. glabrata* bajo las condiciones del estudio. a.- Promedio de la expresión del gen en dos muestras biológicas independientes. b.- se muestra el gel más representativo del efecto biológico observado.

Tabla 18.- Análisis estadístico comparativo entre las condiciones del estudio para el gen *YPS7* de *C. glabrata* mediante la prueba de Mann-Whitney.

| Análisis estadístico entre las condiciones: | | | 3 h | 6 h |
|---|-----|--------------|-----|-----|
| <i>C. glabrata adheridas</i> | vs. | Testigo | | |
| <i>C. glabrata no adheridas</i> | vs. | Testigo | | |
| <i>C. glabrata adheridas</i> | vs. | no adheridas | | |

CgYPS7 no se expresó bajo las condiciones probadas en este trabajo.

7.3.8.- Expresión del gen *YPS8* de *C. glabrata*

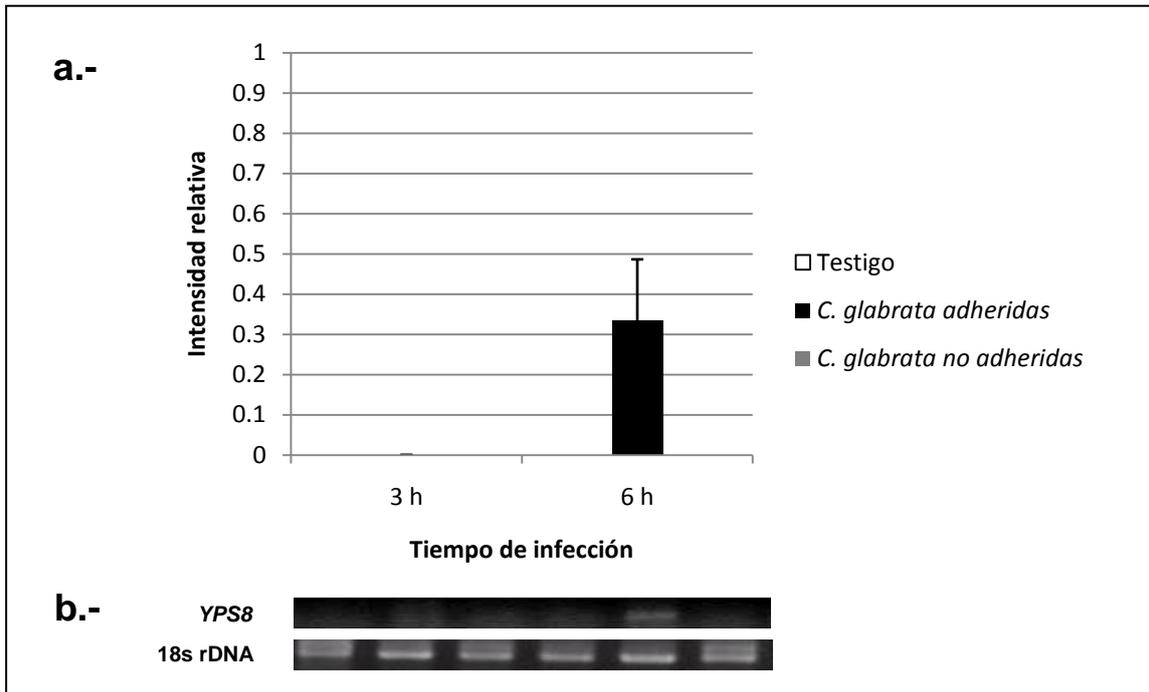


Fig. 13.- Perfil de expresión del gen *YPS8* de *C. glabrata* bajo las condiciones del estudio. a.- Promedio de la expresión del gen en dos muestras biológicas independientes. b.- se muestra el gel más representativo del efecto biológico observado.

Tabla 19.- Análisis estadístico comparativo entre las condiciones del estudio para el gen *YPS8* de *C. glabrata* mediante la prueba de Mann-Whitney.

| Análisis estadístico entre las condiciones: | | 3 h | 6 h |
|---|------------------|-----|-----|
| <i>C. glabrata</i> adheridas | vs. Testigo | | |
| <i>C. glabrata</i> no adheridas | vs. Testigo | | |
| <i>C. glabrata</i> adheridas | vs. no adheridas | | |

El gen *YPS8* de *C. glabrata* mostró expresión solo en las levaduras adheridas a las células HeLa a las 6 h, lo que sugiere que la proteína codificada en éste podría participar durante el contacto de la levadura con células epiteliales.

7.3.9.- Expresión del gen *YPS9* de *C. glabrata*

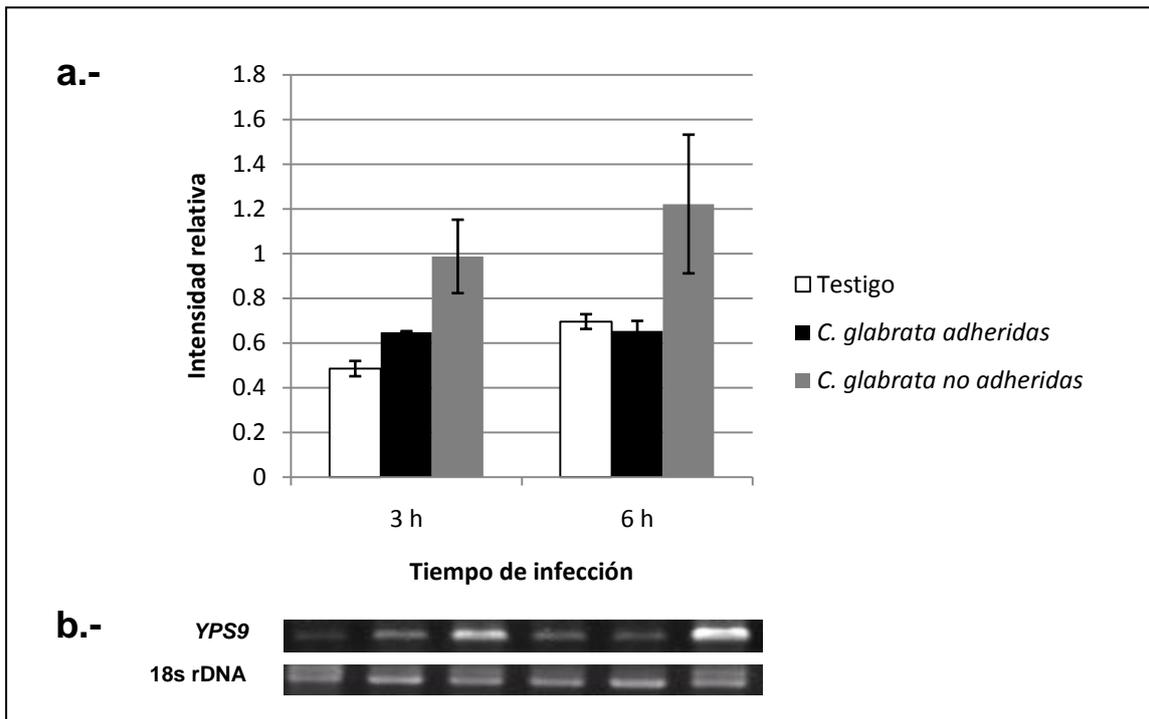


Fig. 14.- Perfil de expresión del gen *YPS9* de *C. glabrata* bajo las condiciones del estudio. a.- Promedio de la expresión del gen en dos muestras biológicas independientes. b.- se muestra el gel más representativo del efecto biológico observado.

Tabla 20.- Análisis estadístico comparativo entre las condiciones del estudio para el gen *YPS9* de *C. glabrata* mediante la prueba de Mann-Whitney.

| Análisis estadístico entre las condiciones: | | | 3 h | 6 h |
|---|-----|--------------|--------|--------|
| <i>C. glabrata</i> adheridas | vs. | Testigo | 0.0051 | 0.1735 |
| <i>C. glabrata</i> no adheridas | vs. | Testigo | 0.0051 | 1 |
| <i>C. glabrata</i> adheridas | vs. | no adheridas | 1 | 1 |

El gen *CgYPS9* se expresa en las levaduras adheridas y no adheridas con diferencia significativa respecto al testigo a las 3 horas. Por lo anterior la expresión de este gen aumenta por la presencia de células HeLa, pero no es posible atribuir este fenómeno al proceso de adherencia.

7.3.10.- Expresión del gen *YPS10* de *C. glabrata*

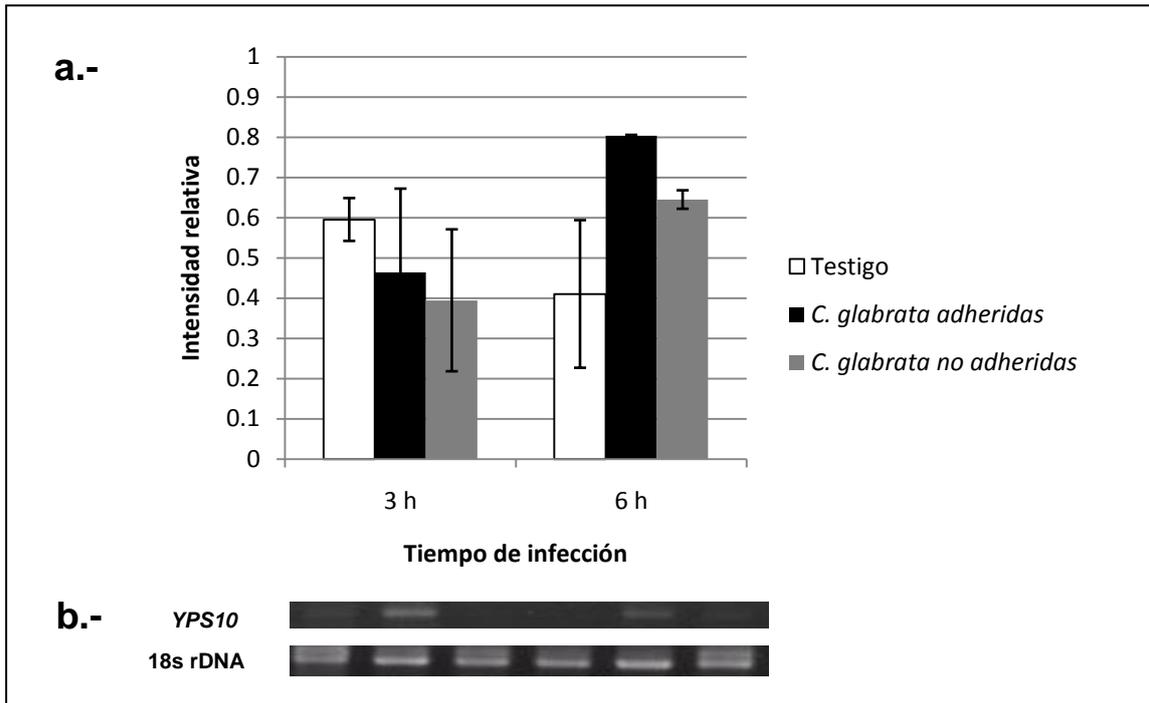


Fig. 15.- Perfil de expresión del gen *YPS10* de *C. glabrata* bajo las condiciones del estudio. a.- Promedio de la expresión del gen en dos muestras biológicas independientes. b.- se muestra el gel más representativo del efecto biológico observado.

Tabla 21.- Análisis estadístico comparativo entre las condiciones del estudio para el gen *YPS0* de *C. glabrata* mediante la prueba de Mann-Whitney.

| Análisis estadístico entre las condiciones: | | | 3 h | 6 h |
|---|-----|--------------|--------|--------|
| <i>C. glabrata</i> adheridas | vs. | Testigo | 1 | 0.9362 |
| <i>C. glabrata</i> no adheridas | vs. | Testigo | 1 | 1 |
| <i>C. glabrata</i> adheridas | vs. | no adheridas | 0.5218 | 0.0051 |

Existe diferencia significativa entre las levaduras adheridas y no adheridas a las células HeLa a las 6 h, sin embargo debido a que ninguna de

estas dos condiciones presenta diferencia significativa con las levaduras sin células HeLa, no puede atribuirse la expresión de este gen a la interacción de las levaduras con las células epiteliales durante la infección.

7.3.11.- Expresión del gen *YPS11* de *C. glabrata*

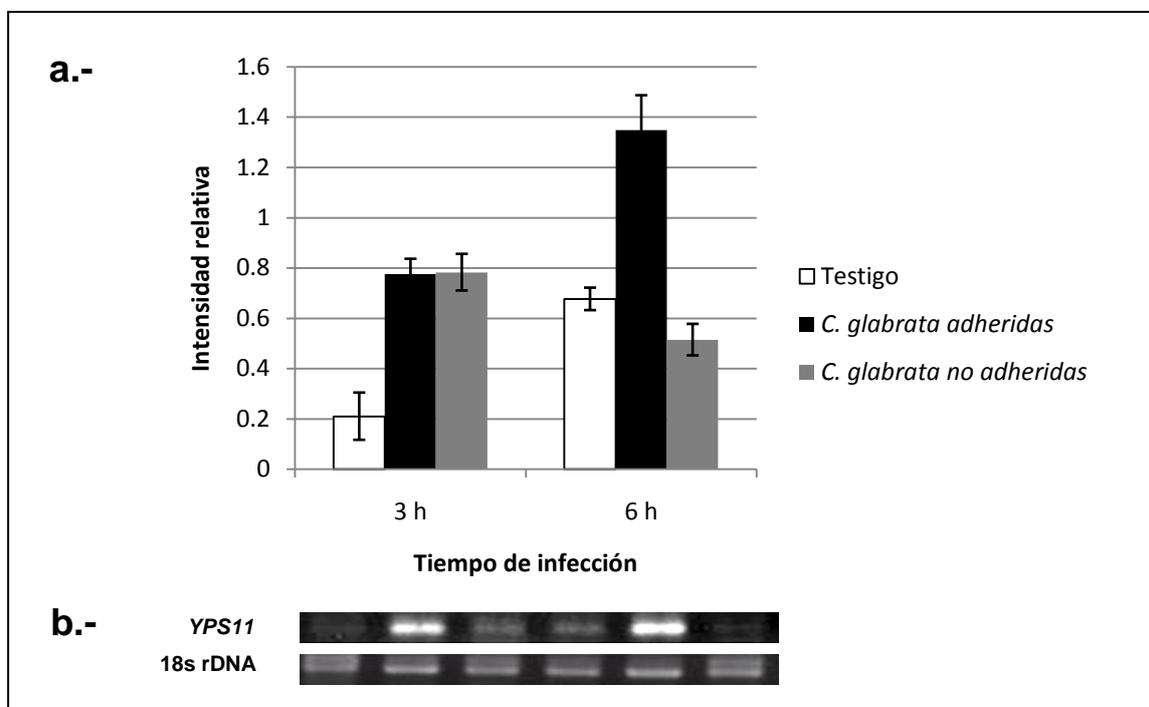


Fig. 16.- Perfil de expresión del gen *YPS11* de *C. glabrata* bajo las condiciones del estudio. a.- Promedio de la expresión del gen en dos muestras biológicas independientes. b.- se muestra el gel más representativo del efecto biológico observado.

Tabla 22.- Análisis estadístico comparativo entre las condiciones del estudio para el gen *YPS11* de *C. glabrata* mediante la prueba de Mann-Whitney.

| Análisis estadístico entre las condiciones: | 3 h | 6 h |
|--|------------|------------|
| <i>C. glabrata</i> adheridas vs. Testigo | 0.0051 | 0.0051 |
| <i>C. glabrata</i> no adheridas vs. Testigo | 0.0051 | 0.1735 |
| <i>C. glabrata</i> adheridas vs. no adheridas | 1 | 0.0051 |

El gen *YPS11* de *C. glabrata* mostró una expresión importante en las condiciones de infección a las 3 h con respecto al control sin células. Aparentemente este gen se ve fuertemente inducido con la presencia de células epiteliales. Sin embargo a las 6 h, la expresión de este gen se mantiene en niveles significativamente altos respecto al control sin células sólo en las levaduras adheridas a células epiteliales, mientras que en las no adheridas disminuye a niveles cercanos al testigo. Por tanto es probable que la expresión de este gen se vea aumentada por la interacción la levadura con alguna molécula de reconocimiento de la superficie celular en las células epiteliales HeLa.

7.3.12.- Expresión del gen *YPS12* de *C. glabrata*

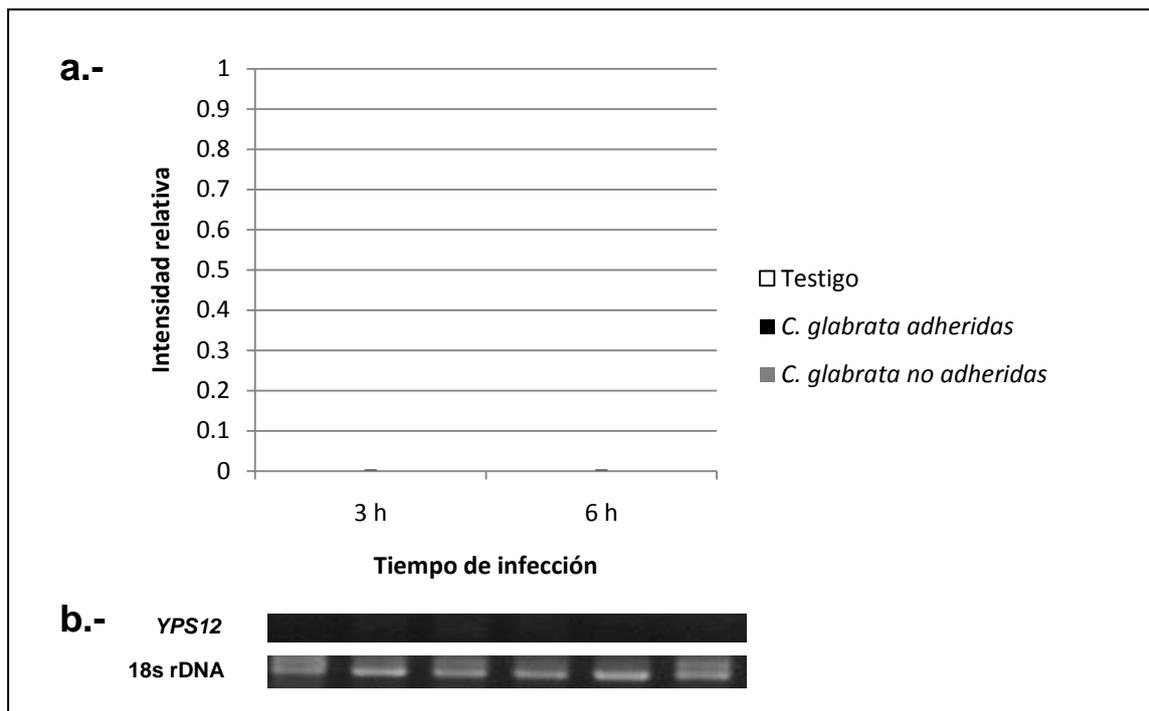


Fig. 17.- Perfil de expresión del gen *YPS12* de *C. glabrata* bajo las condiciones del estudio. a.- Promedio de la expresión del gen en dos muestras biológicas independientes. b.- se muestra el gel más representativo del efecto biológico observado.

Tabla 23.- Análisis estadístico comparativo entre las condiciones del estudio para el gen *YPS12* de *C. glabrata* mediante la prueba de Mann-Whitney.

| Análisis estadístico entre las condiciones: | 3 h | 6 h |
|---|-----|-----|
| <i>C. glabrata</i> adheridas vs. Testigo | | |
| <i>C. glabrata</i> no adheridas vs. Testigo | | |
| <i>C. glabrata</i> adheridas vs. no adheridas | | |

El gen *CgYPS12* no se expresó bajo las condiciones probadas en este trabajo.

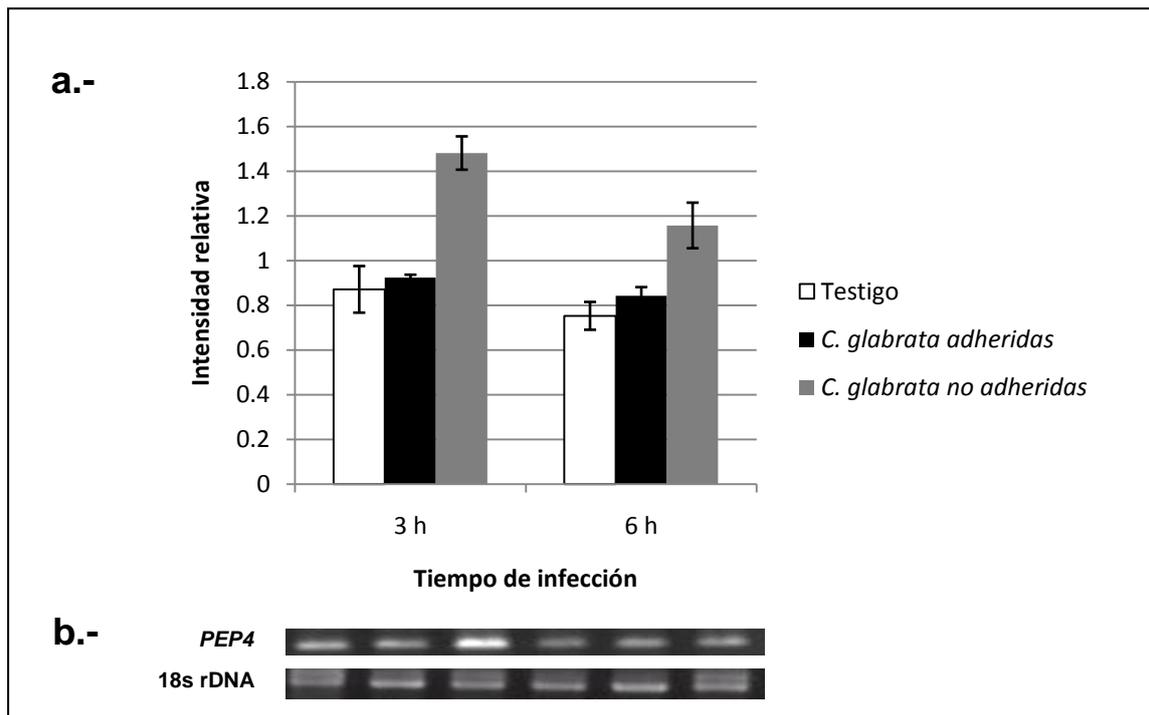
7.3.13.- Expresión del gen *PEP4* de *C. glabrata*

Fig. 18.- Perfil de expresión del gen *PEP4* de *C. glabrata* bajo las condiciones del estudio. a.- Promedio de la expresión del gen en dos muestras biológicas independientes. b.- se muestra el gel más representativo del efecto biológico observado.

Tabla 24.- Análisis estadístico comparativo entre las condiciones del estudio para el gen *PEP4* de *C. glabrata* mediante la prueba de Mann-Whitney.

| Análisis estadístico entre las condiciones: | | | 3 h | 6 h |
|---|-----|--------------|--------|--------|
| <i>C. glabrata adheridas</i> | vs. | Testigo | 0.3785 | 0.1282 |
| <i>C. glabrata no adheridas</i> | vs. | Testigo | 0.0051 | 0.0051 |
| <i>C. glabrata adheridas</i> | vs. | no adheridas | 0.0051 | 0.0051 |

El gen *PEP4* de *C. glabrata* codifica una aspartil proteasa vacuolar hipotética que podría estar implicada en procesos de carácter metabólico durante condiciones de estrés nutricional y en procesos como la autofagia, así como en el mantenimiento de los niveles proteicos intracelulares mediante el

recambio y la maduración de proteínas. La expresión de este gen muestra una diferencia significativa a las 3 h respecto a las levaduras adheridas y al testigo sin células epiteliales. Esto podría indicar que en el sobrenadante existe una condición de estrés nutricional, lo cual aparentemente no existe en las células adheridas que posiblemente estén obteniendo nutrientes de la degradación de la monocapa de células epiteliales.

7.3.14.- Expresión del gen *EPA1* de *C. glabrata*

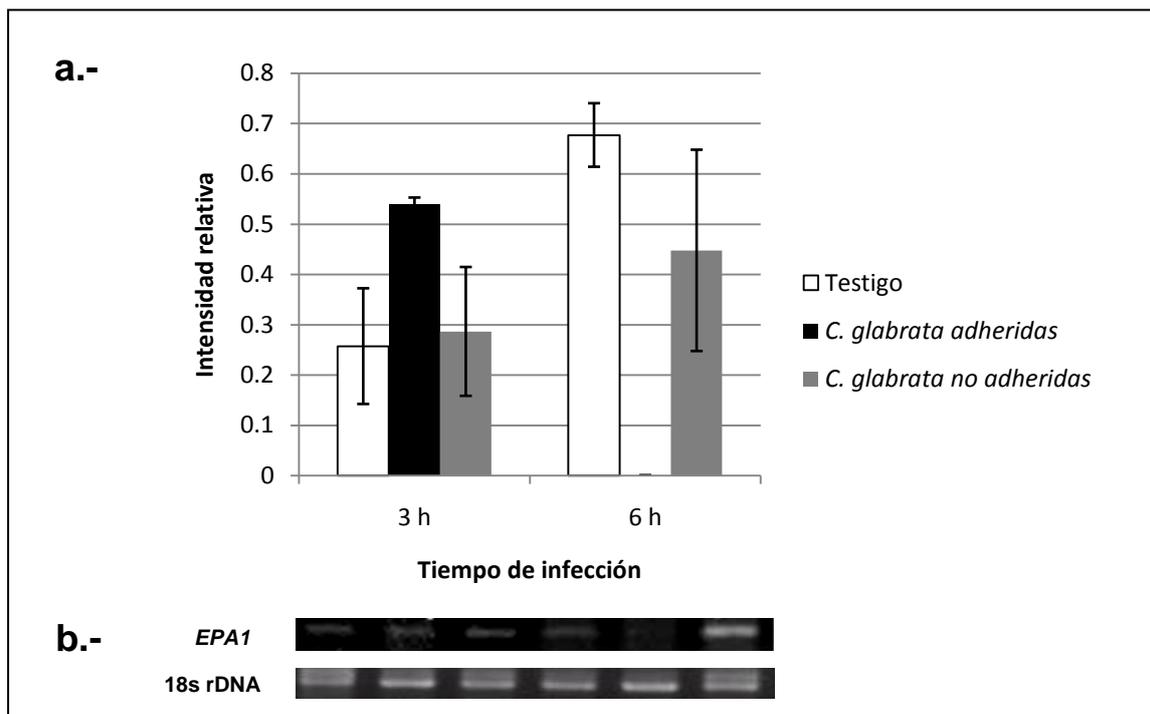


Fig. 19.- Perfil de expresión del gen *EPA1* de *C. glabrata* bajo las condiciones del estudio. a.- Promedio de la expresión del gen en dos muestras biológicas independientes. b.- se muestra el gel más representativo del efecto biológico observado.

Tabla 25.- Análisis estadístico comparativo entre las condiciones del estudio para el gen *EPA1* de *C. glabrata* mediante la prueba de Mann-Whitney.

| Análisis estadístico entre las condiciones: | | | 3 h | 6 h |
|---|-----|--------------|--------|-----|
| <i>C. glabrata</i> adheridas | vs. | Testigo | 0.0927 | |
| <i>C. glabrata</i> no adheridas | vs. | Testigo | 0.5218 | 1 |
| <i>C. glabrata</i> adheridas | vs. | no adheridas | 0.5752 | |

El gen *EPA1* de *C. glabrata* codifica para una adhesina de pared celular. Este gen se expresa a las 3 h, en las 3 condiciones del estudio y en especial en las células adheridas, sin embargo su expresión parece reprimirse a las 6 h en esta condición, mientras que continúa expresándose de forma importante en las células no adheridas y en el testigo sin células epiteliales.

Para visualizar de manera conjunta los resultados obtenidos en los experimentos de expresión, se construyó la tabla 26, donde se puede apreciar lo siguiente: los genes de *C. glabrata* que aumentaron su expresión significativamente por la presencia de células epiteliales HeLa fueron: a las 3 horas el *YPS2*, *YPS5*, *YPS9*, *YPS11*, *YPS12*, *PEP4*; y a las 6 h *YPS1*, *YPS2*, *YPS4*, *YPS5*, *YPS8*, *YPS11*, *PEP4*.

De estos, los genes *CgYPS1*, *CgYPS2*, *CgYPS9*, *CgYPS10*, *CgYPS11* y *CgPEP4*, presentaron un aumento significativo en la expresión con respecto a sus testigos; los genes *CgYPS4*, *CgYPS5*, *CgYPS8* y *EPA1*, presentaron aumento significativo en la expresión debido a que en sus testigos no hubo expresión,

Los genes que se expresaron significativamente más en las dos condiciones con células HeLa que en el testigo fueron: a las 3 horas el *CgYPS9*, *CgYPS11* y a las 6 horas solo el *CgYPS2*

Los genes que mostraron expresión importante en las levaduras no adheridas fueron a las 3 horas el *CgYPS2*, *CgYPS5* y el *CgPEP4* y a las 6 h solo el *CgPEP4*, esto puede significar que estos genes no necesitan sobreexpresarse en las células adheridas, o que es necesaria su sobreexpresión debido a las condiciones que prevalecen en el sobrenadante del cultivo.

Se consideró que para poder asociar un gen al proceso de adherencia, este debía mostrar una expresión, estadísticamente significativa, mayor o menor contra el testigo y contra las levaduras no adheridas. Siguiendo el criterio anterior no podemos asociar la expresión de ninguno de los genes al proceso de adherencia puesto que ninguno mostró diferencia significativa entre su expresión en las células adheridas y las otras dos condiciones simultáneamente; este efecto en cambio si puede observarse a las 6 h en los genes *CgYPS5*, *CgYPS8* y *CgYPS11* los cuales se expresaron más que sus testigos y las células no adheridas, y el *EPA1* que se expresó menos que los testigos por lo que posiblemente su expresión cese por no ser necesaria a las 6 horas.

Los genes *CgYPS7* y *CgYPS12* no se expresaron en ninguna de las condiciones probadas y el gen *CgYPS3* y el *CgYPS6* se expresaron en todas las condiciones pero sin diferencias significativas de las condiciones de interés con respecto a sus testigos.

Tabla 26.- Representación del análisis estadístico comparativo entre las condiciones del estudio para los genes *YPS1-12*, *PEP4* y *EPA1* de *C. glabrata* mediante la prueba de Mann-Whitney.

| Gen | 3 h | | | 6 h | | |
|--------------|-----------------------|--------------------------|----------------------------|-----------------------|--------------------------|----------------------------|
| | Adheridas vs. Testigo | No adheridas vs. Testigo | Adheridas vs. no adheridas | Adheridas vs. Testigo | No adheridas vs. Testigo | Adheridas vs. no adheridas |
| <i>YPS1</i> | - | - | - | + | - | - |
| <i>YPS2</i> | - | + | + | + | + | - |
| <i>YPS3</i> | - | - | - | - | - | - |
| <i>YPS4</i> | - | - | - | (+) | - | (+) |
| <i>YPS5</i> | (+) | (+) | - | + | (+) | (+) |
| <i>YPS6</i> | - | - | - | - | - | - |
| <i>YPS7</i> | - | - | - | - | - | - |
| <i>YPS8</i> | - | - | - | (+) | - | (+) |
| <i>YPS9</i> | + | + | - | - | - | - |
| <i>YPS10</i> | - | - | - | - | - | + |
| <i>YPS11</i> | + | + | - | + | - | + |
| <i>YPS12</i> | - | - | - | - | - | - |
| <i>PEP4</i> | - | + | + | - | + | + |
| <i>EPA1</i> | - | - | - | (+) | - | (+) |

+: Existe diferencia significativa entre las condiciones comparadas

-: No existe diferencia significativa entre las condiciones comparadas

(+): El gen no se expresó en una de las condiciones que se comparan, por lo que hay diferencia significativa aunque no sea posible realizarle análisis estadístico

11.-DISCUSIÓN

11.-DISCUSIÓN

Candida glabrata es un hongo patógeno oportunista cuyos mecanismos de colonización y supervivencia han evolucionado para poder establecerse con éxito dentro de un hospedero. Normalmente se encuentra como comensal en las mucosas de individuos sanos, pero puede invadir tejidos más profundos y causar enfermedades graves cuando el sistema inmunológico del hospedero se encuentra atenuado (Castaño y col 2006).

Las infecciones provocadas por algunas especies del género *Candida* son un problema de importancia clínica creciente ya que la incidencia de infecciones provocadas por este género ha aumentado en las últimas décadas (Naglik y col., 2004), *Candida albicans* continúa siendo la especie que se aísla con mayor frecuencia (Kamran y col. 2004). Sin embargo, especies distintas a *Candida albicans* (CNCA) causan actualmente 50% de los casos de candidosis profunda (Haynes, 2001). Algunas levaduras de *Candida spp.* colonizan y/o causan enfermedades en un gran número de sitios anatómicos, cada uno con distinto ambiente físico (Yang, 2003). La adherencia a los tejidos del huésped, la respuesta a cambios ambientales (cambios de pH y temperatura) y la secreción de hidrolasas son considerados como factores importantes en la virulencia de *Candida* (Haynes, 2001).

Durante los últimos años especies distintas a *Candida albicans* (CNCA) han tomado relevancia como agentes causales de Candidosis por lo que diferentes grupos de investigación se han enfocado al estudio de sus factores de virulencia, diagnóstico y blancos moleculares de nuevos antimicóticos, la

especie. *C. glabrata* ha surgido como un modelo alternativo de la candidosis por los motivos señalados en la sección de antecedentes.

Entre los distintos atributos de virulencia de *C. albicans* su actividad proteolítica ha sido intensamente investigada. Se ha mostrado que la patogénesis de varias formas de candidosis está asociada con la expresión temporal y diferencial de los genes codificantes de las aspartil proteasas secretadas (Saps) (Monod y col. 2002). *C. albicans* posee una familia de genes codificantes de 10 aspartil proteasas (Sap1-10), de estas la Sap1-Sap6 han sido las más estudiadas y se han considerado atributos de virulencia (Naglik y col., 2003). Dentro de esta familia de multigenes, la Sap9 y Sap10 (codificadas por los genes *SAP9* y *SAP10*) son dos proteasas de superficie consideradas yapsinas ya que presentan similitudes estructurales con las yapsinas de *S. cerevisiae*. A diferencia de las Sap's 1-6, las yapsinas Sap9 y Sap10 presentan en su extremo C-terminal un grupo GPI, mediante el cual pueden anclarse a membranas y así asociarse a la superficie de la levadura, ya sea la membrana o pared.

Las proteasas poseen múltiples funciones en la naturaleza que van desde la regulación de procesos celulares por la activación de prepro-proteínas hasta la degradación no específica de proteínas para el reciclamiento de biomoléculas. Diferentes microorganismos patógenos han adaptado estas propiedades bioquímicas para desempeñar un número de funciones especializadas durante el proceso de infección (Albrecht y col., 2006).

Aunque no se había reportado actividad proteolítica extracelular en sobrenadantes de *C. glabrata*, en el grupo de trabajo existía evidencia que

permitía suponer que *C. glabrata* poseía varios genes codificantes de aspartil proteasas (tesis de maestría de Parra-Ortega). Lo anterior, aunado a la liberación de la totalidad del genoma de esta levadura, permitió hacer una búsqueda exhaustiva de genes codificantes de aspartil proteasas en su genoma.

Con la estrategia ya descrita se encontraron 13 genes putativos codificantes de aspartil proteasas en el genoma de *C. glabrata*, 12 de ellos corresponden a yapsinas (yps1-yps12) y uno de ellos codifica una aspartil proteasa ácida vacuolar.

En nuestro grupo de investigación se construyó un árbol filogenético de las diferentes aspartil proteasas del género *Candida*, incluyendo las secuencias de aa deducidas de las secuencias encontradas en el genoma de *C. glabrata* (Fig. 20). En este árbol puede observarse que las aspartil proteasas de *C. glabrata* se agrupan con las yapsinas de *S. cerevisiae*, situación que no sucede con las aspartil proteasas de *C. dubliniensis*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis*, con excepción de las Sap9 y Sap10 de *C. albicans* que son consideradas yapsinas (Parra Ortega y col., 2008). Esta observación nos puede sugerir un papel diferente de las yapsinas de *C. glabrata* en comparación al que presentan las Sap's de *C. albicans*.

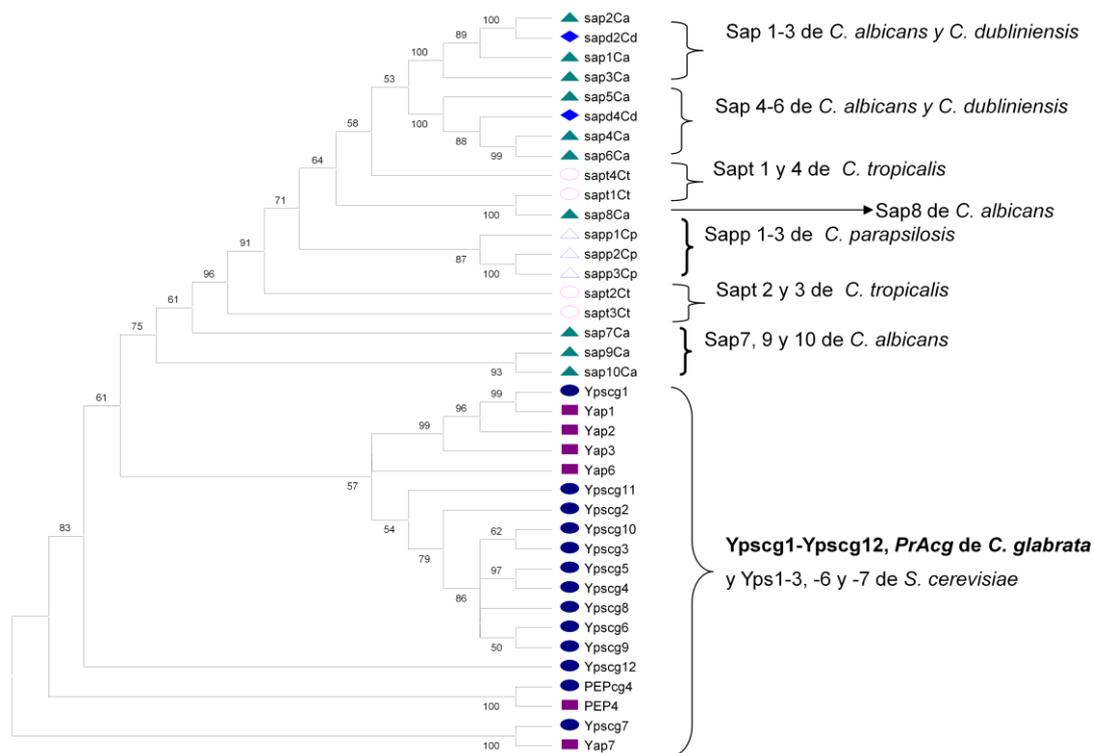


Fig. 20.- Relación filogenética entre las aspartil proteasas de las principales levaduras patógenas del género *Candida* y *S. cerevisiae*. El árbol se construyó a partir de 230 aminoácidos utilizando el método de agrupamiento Neighbor-Joining y la corrección de Poisson. Los números en las ramas representan el porcentaje de bootstrap basado en 1000 árboles., *C. albicans* (▲) *C. tropicalis*, (○) *C. dubliniensis*, (◊) *C. parapsilosis*, (△) *S. cerevisiae* (■) y *C. glabrata* (●) (Parra-Ortega y col. 2008).

De manera paralela a nuestras investigaciones, y utilizando una estrategia diferente se describieron 11 genes codificantes de aspartil proteasas en *C. glabrata*, (Kaur y col., 2007). En este trabajo se realizaron experimentos con microarreglos para ver la expresión de genes durante un proceso de infección por *C. glabrata* en un cultivo celular de macrófagos, donde se observó que en presencia de los macrófagos se inducía la expresión de un total de 131 y 288 genes a las 2 h y 6 h respectivamente. De éstos, 11 correspondían a genes codificantes de aspartil proteasas unidas a un grupo GPI; con la estrategia seguida en nuestro grupo de investigación, encontramos un gen más

el *CgYPS12*, así como el codificante de una aspartil proteasa vacuolar (*CgPEP4*).

Kaur y col., (2007) sugieren la participación de las aspartil proteasas de *C. glabrata* en la virulencia, debido a que algunas mutantes nulas en algunos de los genes codificantes de aspartil proteasas obtenidas disminuyen su capacidad de sobrevivencia en macrófagos y de causar daño a ratones, sin embargo cabe mencionar que algunos de estos experimentos se realizaron con la mutante que tenía eliminado el grupo completo de 8 genes *CgYPS* del cromosoma E de *C. glabrata*. Por lo tanto, se desconoce a cual o cuales de estos genes se atribuye el fenotipo observado, por lo que sería importante obtener mutantes individuales de cada gen. Con los resultados obtenidos en esta tesis, podemos sugerir que el gen *CgYPS11* sería un buen candidato puesto que pertenece a este grupo de genes y en presencia de un cultivo de células epiteliales HeLa, aumentó su expresión de manera significativa.

El análisis *in silico* de las yapsinas de *C. glabrata*, muestra que presentan un tamaño entre 415 y 601 aa, la mayoría presentan dos sitios activos característicos de aspartil proteasas, a excepción de la yapsina 7 (Yps7p), que presentó un único sitio, esta última es la única que se agrupa con la yapsina 7 de *S. cerevisiae*, ya que el resto de las yapsinas de *C. glabrata* formaron un grupo y las yapsinas de *S. cerevisiae* se agrupan en otro. Se ha visto que las yapsinas de *S. cerevisiae* participan en el mantenimiento de la integridad de la pared y en general en la homeostasis de la glucana ya que mutantes nulas se mostraron hipersensibles a agentes que perturban la pared celular como el rojo congo, cafeína, caspofungina, etc.(Krysan y col., 2005). En este mismo trabajo, el gen *YPS1* de *C. glabrata* complementó el fenotipo de la

mutante *yps1Δ* de *S. cerevisiae*, por lo que en nuestro grupo de investigación Parra-Ortega intenta estudiar el papel de esta yapsina y otras durante condiciones de perturbación a la pared (rojo congo, cafeína, caspofungina, etc.)

La posible localización de las YpsCg indica que la mayoría son extracelulares o que siguen la ruta de secreción clásica (RE), a excepción de la Yps4p cuyo análisis sugirió una posible localización mitocondrial.

Otro aspecto relevante para ser considerado, es el número de genes codificantes de yapsinas que presenta *C. glabrata* que es relativamente alto, de 12, en comparación con los 5 (*YPS1*, *YPS2*, *YPS3*, *YPS6* y *YPS7*) genes que presenta *S. cerevisiae*. De estos 12 genes, 8 se encuentran agrupados en tándem en el cromosoma E, por lo que Parra-Ortega y col., (2008) han intentado discutir si esta disposición es el resultado de un fenómeno de duplicación de genes.

El estudio de las secuencias promotoras reveló la presencia de sitios hipotéticos de unión a factores de transcripción, y como se puede observar la mayoría de los genes *CgYPS* podrían estar regulados por disponibilidad de la fuente de nitrógeno, y algunos por condiciones de estrés. Al respecto, Parra-Ortega está estudiando la expresión de los genes *CgYPS* en diferentes condiciones *in vitro*. Otros sitios de regulación presentes son los relacionados con el factor sexual presente en *S. cerevisiae*, este péptido participa en el apareamiento de *S. cerevisiae* entre dos cepas complementarias (α y a). Sin embargo, aunque *C. glabrata* presenta los genes relacionados con el apareamiento, aún no se ha demostrado un ciclo sexual en esta especie (Muller y col., 2008). Estudios sobre la diversidad genética de *C. glabrata*

sugieren que esta especie presenta una reproducción clonal (Boldo y col., 2003).

Antes de realizar las pruebas de RT-PCR, se probaron los iniciadores diseñados para amplificar los 12 genes *CgYPS* utilizando el DNA molde de las dos cepas de referencia: *C. glabrata* BG6 y CBS138 así como el DNA de un aislado clínico de *C. glabrata*. Sin embargo, cabe mencionar que aunque en la fig. 5 se ejemplifica con un sólo aislado clínico, se probaron los DNAs de más de 35 aislados de diferentes sitios (micosis vaginales, sangre, etc.) y todas amplificaron los 12 genes (datos no mostrados). Este resultado es diferente a lo observado para las Sap's de *C. albicans*, ya que Kalkanci y col. (2005) reportaron que los genes *SAP1*, *SAP2* y *SAP3* están más relacionados con vaginopatías y *SAP4*, *SAP5* y *SAP6* con cepas aisladas de infecciones sistémicas. En el caso de *C. glabrata*, no se encontró una distribución diferencial de genes *CgYPS* en los diferentes aislados clínicos que se probaron.

En el presente trabajo se decidió estudiar la expresión de los genes *CgYPS* durante la infección de un cultivo de células epiteliales HeLa puesto que el epitelio es la primera barrera que un patógeno debe sortear para establecerse en el hospedero. En la tabla 26 se recopilan los resultados del análisis de expresión genética y ahí puede observarse una expresión diferencial de los genes *CgYPS*, ya que no todos los genes se expresan a los mismos tiempos y en las mismas condiciones. Los genes que aumentaron su expresión significativamente por la presencia de células epiteliales HeLa

fueron: *CgYPS1*, *CgYPS2*, *CgYPS9*, *CgYPS10*, *CgYPS11* y *CgPEP4*, ya que presentaron un aumento significativo en la expresión con respecto a sus testigos; y los genes *CgYPS4*, *CgYPS5*, *CgYPS8* y *EPA1*, que presentaron aumento significativo en la expresión debido a que en sus testigos no hubo expresión, los genes que se expresaron significativamente más, en las dos condiciones con células HeLa que en el testigo fueron: a las 3 horas el *CgYPS9*, *CgYPS11* y a las 6 horas solo el *CgYPS2*.

En las levaduras no adheridas los genes que mostraron expresión significativa fueron el *CgYPS2*, *CgYPS5* y el *CgPEP4*, lo que lleva a preguntarnos si su sobreexpresión es necesaria debido a las condiciones que prevalecen en el sobrenadante del cultivo o si su sobreexpresión es tan necesaria o se ve reprimida cuando la levadura está adherida.

Tras los criterios descritos en los resultados, los genes asociados al proceso de adherencia fueron los *CgYPS5*, *CgYPS8* y *CgYPS11* a las 6 h puesto que se expresaron más que sus testigos y las células no adheridas, y el *EPA1* que se expresó menos que los testigos por lo que posiblemente su expresión cese por no ser necesaria a las 6. Ninguno de los genes *CgYPS* se pudo asociar a la adherencia a las 3 horas de infección.

El gen *CgYPS3* y el *CgYPS6* se expresaron en todas las condiciones pero sin diferencia significativa entre las condiciones de interés con respecto a sus testigos y los genes *CgYPS7* y *CgYPS12* no se expresaron en ninguna de las condiciones probadas por lo que podrían ser pseudogenes, aunque para probarlo antes sería necesario probar su expresión en otras condiciones.

Es importante hacer notar que en ninguno de los genes codificantes de aspartil proteasas de *C. glabrata* se observó expresión significativamente menor de las condiciones de interés con el testigo, por lo que no se puede hablar de que haya habido una represión en la expresión de los genes por la presencia de células HeLa.

Estos resultados nos permitirán seleccionar a los genes candidatos para la obtención de mutantes nulos carentes de la Yps-p correspondiente. Por ejem., podremos iniciar el protocolo para obtener las mutantes de los genes *CgYPS5*, *CgYPS8* y *CgYPS11*. Estos genes se encuentran coincidentemente en el cromosoma E, y los genes *CgYPS5* y *CgYPS11* pertenecen al grupo de los 8 genes que están en tándem. Una mutante de *C. glabrata* deficiente en estos 8 genes había mostrado disminución de la virulencia de *C. glabrata* en un modelo de infección diseminada en ratón (Kaur y col., 2007). Por otro lado, en el caso del gen *CgYPS1* se sabe que es capaz de complementar la mutación de *yps1Δ* de *S. cerevisiae*, lo que sugiere la participación de la Yps-pCg en el mantenimiento de la homeostasis de la pared (Krysan y col., 2005).

Desafortunadamente no existen muchos estudios de expresión diferencial de yapsinas de hongos patógenos, en *C. albicans* se han estudiado las Sap9 y Sap10 que, aunque en un principio se les había considerado erróneamente aspartil proteasas secretadas hoy se consideran yapsinas ya que presentan un grupo GPI.

Los experimentos de eliminación de los genes *SAP9* y *SAP10* de *C. albicans* demostraron que estas yapsinas participan tanto en procesos celulares como en la interacción hospedero-parásito (Albrecht y col., 2006).

Con respecto a la expresión de genes *SAP*'s de *C. albicans*, se sabe que ésta es diferencial como se mencionó en la sección de introducción de esta tesis (Nagilk y col., 2003), en general, la expresión de los genes *CaSAP*'s varía dependiendo de las condiciones fisiológicas, fuentes de nitrógeno, hospedero, polimorfismo (fases de levadura, micelio, pseudomicelio, clamidoconidias, etc.), "switching fenotípico", micosis superficiales o sistémicas, etc. En nuestro grupo de trabajo se ha abordado el estudio de la expresión de los genes *SAP*'s de *C. dubliniensis* y también se observó que ésta es diferencial (Loaiza-Loeza y col., 2008, en prensa). La expresión de los genes *CdSAP1* y *CdSAP2* fue inducida con albúmina como fuente de nitrógeno a pH 4 y pH 7 y esta expresión fue independiente del estado morfológico de *C. dubliniensis*. La expresión de *CdSAP3* fue regulada por el pH y se relacionó con el proceso de infección de queratinocitos. La expresión de *CdSAP4* predominó durante la fase micelial y el estado inicial de la infección de queratinocitos. Durante la infección con *C. dubliniensis* de la línea celular de queratinocitos HaCaT, sólo se expresaron los genes *CdSAP3-4* y se afectó la forma y el número de los queratinocitos, sin embargo este efecto disminuyó en la presencia de pepstatina A (un inhibidor específico de aspartil proteasas). En estos momentos estamos realizando los experimentos relacionados con el efecto de la pepstatina A en la infección de células epiteliales con *C. glabrata*.

Poco se sabe acerca del substrato natural de las yapsinas de levaduras. En el caso de la yapsina 2 de *S. cerevisiae* se comprobó que rompe preferencialmente residuos básicos (Lys o Arg) en el extremo carboxilo de péptidos sintéticos (Komano y col., 1999). También se ha visto que *YPS1* y *YPS2* de *S. cerevisiae* son genes que complementan la mutación de *Kex2*. La proteasa

Kex2 es la encargada del procesamiento de muchas proteínas durante la ruta de secreción. También se ha demostrado que las yapsinas de *S. cerevisiae* son capaces de madurar el precursor de la proteína β -amiloide relacionada con la enfermedad humana Alzheimer (Komano y col., 1999), por lo que este mecanismo de maduración de proteínas se encuentra ampliamente distribuido en los organismos eucariotas y el papel de la yapsinas de *C. glabrata* podría aportar mayor información acerca de este tipo de control postraducciona.

La expresión del gen *CgPEP4*, codificante de una aspartil proteasa vacuolar aumentó significativamente su expresión en la condiciones de células no adheridas en comparación con el medio B; así como en la condición de células adheridas en comparación con las no adheridas. Con estos resultados comprobamos que se trata de un gen que se expresa en un cultivo de células epiteliales y aunque se trata de una proteasa intracelular, se sabe que estas proteasas en *S. cerevisiae* participan activamente en el recambio proteico durante condiciones de estrés nutricional, así como en la maduración de otras enzimas vacuolares (Jones 1991). Es por esto que en nuestro grupo se ha abierto una línea de estudio de las proteasas vacuolares de *C. glabrata*.

Con respecto a los posibles substratos de las yapsinas de *C. glabrata*, Kaur y col., (2007) realizaron experimentos relacionados con la adhesina Epa1. Reportaron que mutantes deficientes en yapsinas ocasionaban una reducción del péptido liberado al medio y un aumento de Epa 1 estabilizada en la superficie de la célula, sin embargo, no pudieron demostrar que las yapsinas actuaran directamente sobre la adhesina como substrato o sobre otra proteasa que a su vez proteolisara a Epa1.

Con respecto a los estudios de expresión del gen *CgEPA1* en este trabajo, éstos se realizaron con la finalidad de comprobar que este gen se expresaba y por lo tanto los efectos observados durante la infección del cultivo celular HeLa eran el resultado de la adherencia de las levaduras de *C. glabrata* a las células epiteliales. Con los resultados obtenidos se comprobó que el gen codificante de esta adhesina se expresa principalmente a las 3 h y aunque los niveles del transcrito en células adheridas disminuyen a las 6 h, se sabe que la adhesina puede permanecer en la superficie de la célula por muchas más horas (Kaur y col., 2007).

Son, por tanto necesarios más estudios para elucidar el papel biológico de las aspartil proteasas de *Candida glabrata*, así como su papel en la virulencia de la especie, sin embargo con este trabajo se ha podido constatar que algunos de los genes codificantes de aspartil proteasas expresan sus genes diferencialmente por la presencia de células epiteliales, así como por el contacto directo con ellas y de esta forma asociar su expresión con el proceso infeccioso.

9.- CONCLUSIONES

9.- CONCLUSIONES

- a) En el genoma de *C. glabrata* se identificaron 12 genes putativos codificantes de aspartil proteasas unidos a un grupo GPI (por su homología con genes de *S. cerevisiae* se llamaron yapsinas), así como un gen *PEP4* codificante de una aspartil proteasas de localización vacuolar.
- b) Los genes estudiados se encuentran en tan sólo 4 de los 13 cromosomas de *C. glabrata*, 8 de ellos agrupados en tándem en el cromosoma E de la levadura.
- c) El análisis *in silico* de las proteínas deducidas de la secuencia nucleotídicas indicó que todas presentan el o los sitios característicos de aspartil proteasas, de localización extracelular o que comparten la ruta clásica de secreción (a través del Retículo Endoplásmico).
- d) La amplificación por PCR demostró que todas las cepas de *C. glabrata*, tanto las de colección como los aislados clínicos presentan los 13 genes estudiados.
- e) Los genes *CgYPS* mostraron una expresión diferencial durante la infección del cultivo celular HeLa.
- f) Los genes *YPS1*, *YPS2*, *YPS4*, *YPS5*, *YPS8*, *YPS9*, *YPS10*, *YPS11*, *PEP4* y *EPA1* de *C. glabrata* aumentaron su expresión significativamente por la presencia de células epiteliales HeLa.
- g) Los genes que se expresaron en las dos condiciones con células HeLa significativamente más que en el testigo fueron: a las 3 horas el *CgYPS9*, *CgYPS11* y a las 6 horas solo el *CgYPS2*.

- h) En las levaduras no adheridas los genes que mostraron expresión significativa fueron el *CgYPS2*, *CgYPS5* y el *CgPEP4*.
- i) Los genes que por su perfil de expresión pueden asociarse al proceso de adherencia son el *CgYPS5*, el *CgYPS8* y el *CgYPS11* y sólo a las 6 h ya que ninguno de los genes se pudo asociar a la adherencia a las 3 horas de infección.
- j) Los genes *YPS7* y *YPS12* no se expresaron en ninguna de las condiciones probadas.
- k) El gen *CgYPS3* y el *CgYPS6* se expresaron en todas las condiciones pero sin diferencia significativa entre las condiciones de interés con respecto a sus testigos.
- l) Ninguno de los genes codificantes de aspartil proteasas de *C. glabrata* se expresó significativamente menos en las condiciones de interés que en el testigo, por lo que no hubo una represión en la expresión de los estos genes por la presencia de células HeLa.

10.- PROSPECTIVAS

10.- PROSPECTIVAS

1. Estudiar el efecto de *C. glabrata* en el cultivo celular HeLa: adherencia, efecto sobre el número y forma de las células epiteliales, efecto de la pepstatina A, etc.
2. Obtener mutantes carentes de yapsinas, específicamente: *CgYPS2*, *CgYPS5* y *CgYPS11* y en segundo término *CgYPS1*, *CgYPS4* y *CgYPS6* y *CgYPS9*.
3. Estudio del fenotipo de las mutantes.
4. Localización celular de las yapsinas de *C. glabrata*.
5. Identificación de los substratos naturales.

11.- BIBLIOGRAFÍA

11. BIBLIOGRAFÍA

- Al-Abeid H.M., Abu-Elteen K.H., Elkarmi A.Z., Hamad M.A. (2004). Isolation and characterization of *Candida* spp. in jordanian cancer patients: prevalence, pathogenic determinants, and antifungal sensitivity. *Jpn J Infect Dis.* 57(6): 279 -84.
- Albrecht, A., Felk A., Pichova I., Naglik J.R., Schaller M., de Groot P., Maccallum D., Odds F.C., Schäfer W., Klis F., Monod M., Hube B. (2006). Glycosylphosphatidylinositol-anchored proteases of *Candida albicans* target proteins necessary for both cellular processes and host-pathogen interactions. *J Biol Chem.* 281 (2):688-94.
- Andreeva N.S., Rumsh L.D. (2001). Analysis of crystal structures of aspartic proteinases: on the role of amino acid residues adjacent to the catalytic site of pepsin-like enzymes. *Protein Sci.* 10: 2439-50.
- Barns S.M., Lane D.J., Sogin M.L., Bibeau C., Weisburg W.G. (1991). Evolutionary relationships among pathogenic *Candida* species and relatives. *J Bacteriol.* 173: 2250-55.

- Biosoft, L. (1994-1997). DNAMAN. version 3.0.

- Boldo X.M., Villa-Tanaca L., Zúñiga G., Hernández-Rodríguez C. (2003). Genetic diversity among clinical isolates of *Candida glabrata* analyzed by randomly amplified polymorphic DNA and multilocus enzyme electrophoresis analyses. J Clin Microbiol. 41(10): 4799-804.

- Calderone R.A. (2002). Taxonomy and biology of *Candida*. En Calderone R. A. *Candida* and candidiasis. ASM Press. EUA. pp. 15.

- Castaño I., Cormack B., De Las Peñas A. (2006). Virulence of the opportunistic pathogen mushroom *Candida glabrata*. Rev Latinoam Microbiol. 48(2): 66-9.

- Cawley N.X., Chen H.C., Beinfeld M.C., Loh Y.P. (1996). Specificity and kinetic studies on the cleavage of various prohormone mono- and paired-basic residue sites by yeast aspartic protease 3. J Biol Chem. 271: 4168-76.

- Cawley N.X., Chino M., Maldonado A., Rodriguez Y.M., Loh Y.P., Ellman J.A. (2003). Synthesis and characterization of the first potent inhibitor of

- yapsin 1. Implications for the study of yapsin-like enzymes. *J Biol Chem.* 278(8): 5523-30.
- Copping V.M., Barelle C.J., Hube B., Gow N.A., Brown A.J., Odds F.C. (2005). Exposure of *Candida albicans* to antifungal agents affects expression of *SAP2* and *SAP9* secreted proteinase genes. *J Antimicrob Chemother.* 55(5): 645-54.
 - Cormack B.P., Ghori N., Falkow S. (1999). An adhesin of the yeast pathogen *Candida glabrata* mediating adherence to human epithelial cells. *Science.* 285 (5427): 578-82.
 - Cutler J.E. (1991). Putative virulence factors of *Candida albicans*. *Annu Rev Microbiol.* 45: 187-218.
 - Dujon, B. y col. (2004). Genome evolution in yeast. *Nature.* 430: 35-44.
 - Falquet L., Pagni M., Bucher P., Hulo N., Sigrist C.J., Hofmann K., Bairoch A. (2002). The PROSITE database. *Nucleic Acids Res.* 30: 235-8.
 - Felk A., Schafer W., Hube B. (2000). *Candida albicans* secretory aspartic proteinase (*SAP10*) gene. Accession number AF146440.

- Fidel P.L., Vazquez J.A., Sobel D. (1999). *Candida glabrata*: review of epidemiology pathogenesis, and clinical disease with comparison to *C. albicans*. Clin Microbiol Rev. 12: 80-96.
- Galtier N., Gouy M, Gautier C. (1996). SEAVIEW and PHILO_WIN: two graphic tools for sequence alignment and molecular phylogeny. Comput Appl Biosci. 12: 543-48.
- Gilfillan, G.D., Sullivan D.J, Haynes K., Parkinson T., Coleman D.C., Grow N.A.R. (1998). *Candida dubliniensis*: phylogeny and putative virulence factors. Microbiology. 144: 829-38.
- Haynes K. (2001). Virulence in *Candida* species. Trends Microbiol. 9 (12): 591-6.
- Hillis D.M., Bull J.J. (1993). An empirical test of bootstrapping as a method for assessing confidence in phylogenetic analysis. Syst Biol. 42: 182–92.
- Hilt W., Wolf D.H. (1992). Stress-induced proteolysis in yeast. Mol Microbiol. 6(17): 2437-42.

- Hoffman C.S., Winston F. (1987). A ten-minute DNA preparation from yeast efficiently releases autonomous plasmids for transformation of *Escherichia coli*. *Gene*. 57: 267-72.
- Hostetter M.K. (1994). Adhesins and ligands involved in the interaction of *Candida* spp. with epithelial and endothelial surfaces. *Clin Microbiol Rev*. 7: 29-42.
- Hube B. (1998). Possible role of secreted proteinases in *Candida albicans* infections. *Rev Iberoam Micol*. 15: 65-68.
- Hube B., Monod M., Schofield D.A., Brown A.J.P., Gow N.A.R. (1994). Expression of seven members of the gene family encoding secretory aspartyl proteinases in *Candida albicans*. *Mol Microbiol*. 14: 87-99.
- Hube B., Naglik J. (2001). *Candida albicans* proteinases: resolving the mystery of a gene family. *Microbiology*. 147: 1997-2005.
- Hube B., Sanglard D., Odds F.C., Hess D., Monod M., Schäfer W., Brown A.J.P., Gow N.A.R. (1997). Disruption of each of the aspartyl proteinase genes *SAP1*, *SAP2*, and *SAP3* of *Candida albicans* attenuates virulence. *Infect Immun*. 65: 3529-38.

- Kalkanci A., Bozdayi G., Biri A., Kustimur S. (2005). Distribution of secreted aspartyl proteinase using a polymerase chain reaction assay with *SAP* specific primers in *Candida albicans* isolates. *Folia Microbiol* 50: 409-413.
- Kamran M., Calcagno A.M., Findon H., Bignell E., Jones M.D., Warn P., Hopkins P., Denning D.W., Butler G., Rogers T., Muhlschlegel F.A., Haynes K. (2004). Inactivation of transcription factor gene *ACE2* in the fungal pathogen *Candida glabrata* results in hypervirulence. *Eukaryot Cell*. 3:546-52.
- Kaur R., Ma B., Cormack B.P. (2007). A family of glycosylphosphatidylinositol-linked aspartyl proteases is required for virulence of *Candida glabrata*. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 104 (18): 7628-33.
- Koelsch G., Tang J., Loy J.A., Monod M., Jackson K., Foundling S.I., Lin X. (2000). Enzymic characteristics of secreted aspartic proteases of *Candida albicans*. *Biochim Biophys Acta*. 1480(1-2): 117-31.
- Komano, H., Rockwell N.C., Wang G.T., Krafft G.A., Fuller R.S. (1999). Purification and characterization of the yeast glycosylphosphatidylinositol-anchored, mono-basic specific aspartyl protease yapsin 2 (*Mkc7*). *J Biol Chem*. 274: 24431-37.

- Krysan D.J., Ting E.L., Abeijon C., Kroos L., Fuller R.S. (2005). Yapsins are a family of Aspartyl Protease required for cell wall integrity in *Saccharomyces cerevisiae*. *Eukaryot Cell*. 4 (8): 1364-74.
- Lesage G., Sdicu a.M., Menard P., Shapiro J., Hussein S., Bussey H.. (2004). Analysis of β -1,3-glucan assembly in *Saccharomyces cerevisiae* using a synthetic interaction network and altered sensitivity to caspofungin. *Genetics*. 167: 35-49.
- Loaiza-Loeza S., Parra-Ortega B., Cancino-Díaz J.C., Illades-Aguiar B., Hernández-Rodríguez C., Villa-Tanaca L. (2008). Differential expression of *Candida dubliniensis* secreted aspartyl proteinase genes (*CdSAP1-4*) under different physiological conditions and during infection of a keratinocytes culture. *FEMS Yeast Res*. In press.
- Monod M., Borg-von Zepelin M. (2002). Secreted aspartic proteinases as virulence factors of *Candida* species. *Biol Chem*. 383: 1087-93.
- Monod, M., Hube B., Hess D., Sanglard D. (1998). Differential regulation of *SAP8* and *SAP9* which encode two new members of the secreted aspartyl protease family in *Candida albicans*. *Microbiology*. 244: 2731-37.

- Moran G.P., Sullivan D.J., Coleman D. (2002). Emergence of Non-*Candida albicans* *Candida* species as pathogen. En: *Candida* and candidiasis. Calderone RA (ed) . ASM Press. EUA. pp. 37.
- Muller H., Hennequin C., Gallaud J., Dujon B., Fairhead C. (2008).The asexual yeast *Candida glabrata* maintains distinct a and alpha haploid mating types. *Eukaryot Cell*. 7(5): 848-58.
- Naglik J.R., Albrecht A., Bader O., Hube B. (2004). *Candida albicans* proteinases and host/pathogen interactions. *Cell Microbiol*. 6: 915–926.
- Naglik J.R., Challacombe S.J., Hube B. (2003). *Candida albicans* secreted aspartyl proteinases in virulence and pathogenesis. *Microbiol Mol Biol*. 67(3): 400-28.
- Naglik, J.R., Newport G., White T.C., Fernandes-Naglik, L.L., Greenspan J.S., Greenspan D., Sweet S.P., Challacombe S.J., Agabian N. (1999). *In vivo* analysis of secreted aspartyl proteinase expression in human oral candidiasis. *Infect Immun*. 67: 2482-90.
- Naglik, J. R., Rodgers C.A., Shirlaw P.J., Dobbie J.L., Fernandes-Naglik, L.L., Greenspan D., Agabian, N., Challacombe S.J. (2003b). Differential

- expression of *Candida albicans* secreted aspartyl proteinase and phospholipase B genes in humans correlates with active oral and vaginal infections. J Infect Dis.188: 469-79.
- Parra-Ortega B., Cruz-Torres H., Villa-Tanaca L. and Hernández-Rodríguez C. Phylogeny and evolution of the aspartyl proteases family from clinically relevant *Candida* species. 2008. Mem Inst Oswaldo Cruz. (En prensa).
 - Pichová I., Pavlíckova L., Dostál J., Dolejší E., Hrusková-Heidingsfeldová O., Weber J., Ruml T., Soucek M. (2001). Secreted aspartic proteases of *Candida albicans*, *Candida tropicalis*, *Candida parapsilosis* and *Candida lusitanae*. Inhibition with peptidomimetic inhibitors. Eur J Biochem. 268: 2669-77.
 - Samaranayake L. P., MacFarlane T.W. (1981). The adhesion of the yeast *Candida albicans* to epithelial cells of human origin in vitro. Arch Oral Biol. 26(10): 815-20.
 - Sambrook J., Russell D.W. (2001). Molecular Cloning: a laboratory manual. Cold Spring Harbor laboratory press. 3a Edición. Nueva York.

- Schaller M., Bein M, Korting H.C., Baur S., Hamm G., Monod M., Beinhauer S., Hube B.. (2003). The secreted aspartyl proteinases Sap1 and Sap2 cause tissue damage in an in vitro model of vaginal candidiasis based on reconstituted human vaginal epithelium. *Infect Immun.* 71: 3227-34.
- Schaller M., Schäfer W., Korting H.C., Hube B. (1998). Differential expression of secreted aspartyl proteinases in a model of human oral candidosis and in patient samples from the oral cavity. *Mol Microbiol.* 29: 605-15.
- Stehr F., Felk A., Kretschmar M, Schaller M., Schafer W., Hube B. (2000). Extracellular hydrolytic enzymes and their relevance during *Candida albicans* infections. *Mycoses* 43: 17–21.
- Thompson J.D., Gibson T.J., Plewniak F., Jeanmougin F., Higgins D.J. (1997). The ClustalX windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Res.* 24: 4876-82.
- Weig M., Jänsch L., Gross U., De Koster C.G., Klis F.M., De Groot P.W. (2004). Systematic identification *in silico* of covalently bound cell wall proteins and analysis of protein-polysaccharide linkages of the human pathogen *Candida glabrata*. *Microbiology.* 150(Pt 10): 3129-44.

- Wong S., Fares M.A., Zimmermann W., Butler G., Wolfe K.H. (2003). Evidence from comparative genomics for a complete sexual cycle in the 'asexual' pathogenic yeast *Candida glabrata*. *Genome Biol.* 4 (2): R10.
- Yang Y-L. 2003. Virulence factors of *Candida* species. *J Microbiol Immunol Infect.* 36: 223-28.