



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
Secretaría de Investigación y Posgrado

**ESCUELA NACIONAL DE CIENCIAS
BIOLÓGICAS**

Sección de Estudios Posgrado e Investigación

**ESTUDIO BIOQUÍMICO Y MOLECULAR DE
LAS PROTEASAS VACUOLARES DE
*Candida glabrata***

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:

**MAESTRÍA EN CIENCIAS
QUIMICOBIOLOGICAS**

PRESENTA:

Q.F.B. YULIANA BETANCOURT CERVANTES

DIRECTORES:

**DRA. MARÍA DE LOURDES VILLA TANACA
DR. CÉSAR HUGO HERNÁNDEZ RODRÍGUEZ**

MÉXICO D.F., Enero 2009





INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

SIP-14

ACTA DE REVISIÓN DE TESIS

En la Ciudad de México D. F., siendo las 11:00 horas del día 13 del mes de enero del 2009 se reunieron los miembros de la Comisión Revisora de Tesis designada por el Colegio de Profesores de Estudios de Posgrado e Investigación de la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas para examinar la tesis titulada:

Estudio bioquímico y molecular de las proteasas vacuolares de *Candida glabrata*.

Presentada por el alumno:

BETANCOURT

Apellido paterno

CERVANTES

Apellido materno

YULIANA

Nombre(s)

Con registro:

B	0	6	1	0	7	3
---	---	---	---	---	---	---

aspirante de:

Maestría en Ciencias Quimicobiológicas

Después de intercambiar opiniones los miembros de la Comisión manifestaron **SU APROBACIÓN DE LA TESIS**, en virtud de que satisface los requisitos señalados por las disposiciones reglamentarias vigentes.

LA COMISIÓN REVISORA

Director de tesis


 DRA. MARÍA DE LOURDES VILLA
 TANACA

Director de tesis


 DR. CÉSAR HUGO HERNÁNDEZ
 RODRÍGUEZ



DR. EN TAO WANG HU



DR. JUAN CARLOS CANCINO DÍAZ



DRA. MARÍA DE LOS ANGELES
 MARTÍNEZ RIVERA



DRA. MARÍA GUADALUPE GUERRA
 SÁNCHEZ

EL PRESIDENTE DEL COLEGIO



DR. MANUEL JESÚS PIÑÓN LÓPEZ



S. E. P.
 Escuela Nacional de
 Ciencias Biológicas
 Sección de Estudios
 de Posgrado
 e Investigación

CONTENIDO

Abreviaturas	<i>i</i>
Resumen	<i>ii</i>
Abstract	<i>iii</i>
Índice de Tablas y Figuras	<i>iv</i>
INTRODUCCIÓN.....	1
ANTECEDENTES.....	7
JUSTIFICACIÓN.....	17
OBJETIVOS.....	18
MATERIAL Y MÉTODOS.....	19
RESULTADOS.....	35
DISCUSIÓN.....	67
CONCLUSIONES.....	78
PROSPECTIVAS.....	79
BIBLIOGRAFÍA.....	80

Abreviaturas.

AOX1	Gen codificante de la alcohol oxidasa de <i>P. pastoris</i> .
Ape	Aminopeptidasa
cDNA	DNA complementario
Cp	Carboxipeptidasa
DAP	Dipeptidil aminopeptidasa
Dntp	Desoxinucleótido trifosfato
FWD	forward (iniciador <i>sentido</i>)
ORF	Open Reading Frame (Marco de lectura abierto)
PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa
pI	Punto isoeléctrico
PrA	Proteasa ácida
PrB	Proteasa B
rDNA	Gen que codifica para rRNA 18S
REV	Reverse (iniciador <i>antisentido</i>)
RT	Transcriptasa Reversa
RT-PCR	Reverse Transcriptase-PCR (Transcriptasa inversa)
YNB	Base nitrogenada para levaduras
α -Factor	Señal de secreción del factor sexual α de <i>S. cerevisiae</i> .

Resumen.

Candida glabrata es la segunda o tercera causa más común de candidosis sistémica después de *C. albicans*. Durante los últimos años se ha convertido en un nuevo modelo ya que esta especie está más relacionada filogenéticamente con *Sacharomyces cerevisiae* que con cualquier otra especie patógena del género *Candida*. Las proteasas intracelulares y en especial las vacuolares juegan un papel fundamental en el recambio proteico y en el control post-traducciona, sin embargo, poco se sabe acerca de las proteasas vacuolares de *C. glabrata*.

En este trabajo en el genoma de *C. glabrata* se detectaron los siguientes genes putativos codificantes de proteasas vacuolares, homólogos a los existentes en *S. cerevisiae*: gen *PEP4cg* (codificante de una proteasa ácida PrAcg), *PRB1cg*, *PRB2cg*, *PRB3cg* (proteasas neutras PrB1cg, PrB2cg y PrB3cg), *LAP4cg* y *APE3cg* (aminopeptidasas *Apelcg* y *ApeYcg*), *PRC1cg* y *CPScg* (carboxipeptidasas *CpYcg* y *CpScg*) y *DAP2cg* (dipeptidil aminopeptidasa *DapBcg*). El análisis de las proteínas deducidas de las secuencias nucleotídicas arrojó los siguientes resultados: PrAcg es una proteína de 45.4 kDa con un pl de 4.6, las pruebas de inhibición comprobaron que se trata de una aspartil proteasa. Las proteasas PrB1cg, PrB2cg y PrB3cg presentan PM de 50, 53.4 y 63.5 kDa y pl de 5.7, 6.1 y 4.9, respectivamente, la actividad bioquímica sugiere que se trata de serín proteasas. Las aminopeptidasas *Apelcg* y *ApeYcg* presentan PM de 57 y 62.2 kDa y pl de 6.0 y 5.4 respectivamente, la *ApeYcg* es una metaloaminopeptidasa. Las carboxipeptidasas *CpYcg* y *CpScg* presentan PM de 65 y 57.2 y pl de 4.9 y 5.2, respectivamente, se comportaron como serín proteasas. La *DapBcg* presenta PM de 94 y pl de 5.4, se comportó como serínproteasa. Todas las proteasas estudiadas presentan características bioquímicas semejantes a las reportadas para *S. cerevisiae*, se detectaron principalmente en la fracción soluble, a excepción de la actividad *DapBcg* que se localizó además en la fracción membranal. Se confirmó que las actividades PrAcg, *Apelcg*, *ApeYcg* y *CpYcg*, se encuentran en la vacuola de *C. glabrata*.

La expresión de los genes codificantes de proteasas vacuolares está regulada de manera diferencial por las fuentes de N y C. Las proteasas codificadas por los genes *PEP4cg*, *PBR2cg* Y *LAP4cg* muy probablemente participen en el recambio proteico inducido por estrés por fuente de N inducido por prolina, *PBR2cg* fue el único gen que se sobreexpresó en ausencia de una fuente de N. Se clonó el gen completo codificante de la proteasa PrAcg (*PEP4cg*), para su posterior expresión heteróloga.

Abstract .

Candida glabrata is the second or third most common cause of systemic candidiasis after *C. albicans*. Over the past few years has become a new model since this species is phylogenetically more related to *Sacharomyces cerevisiae* with any pathogenic species of the genus *Candida*. Intracellular proteases and particularly vacuolar proteases play a key role in protein turnover and post-translational control, however, few is known about the vacuolar proteases in *C. glabrata*.

In this work were detected in genome of *C. glabrata* the following genes encoding putative vacuolar proteases, homologous to those in *S. cerevisiae*: *PEP4cg* gene (encoding an acid protease PrAcg) *PRB1cg*, *PRB2cg*, *PRB3cg* (neutral proteases PrB1cg, PrB2cg and PrB3cg), *LAP4cg* and *APE3cg* (aminopeptidases Apelcg and ApeYcg), *PRC1cg* and *CPScg* (carboxypeptidases CpYcg and CpScg), and *DAP2cg* (dipeptidyl aminopeptidase DapBcg). The analysis of deduced proteins from nucleotide sequences produced the following results: PrAcg proteinase is a protein of 45.4 kDa and a pI of 4.6, the inhibition tests proved that it is an aspartyl protease. PrB1cg, PrB2cg and PrB3cg proteases presents 50, 53.4 and 63.5 kDa and pI of 5.7, 6.1 and 4.9, respectively, the biochemical activity suggests that are serine proteases. Apelcg and ApeYcg aminopeptidases present 57 and 62.2 kDa and pI of 6.0 and 5.4 respectively, ApeYcg is a metalloaminopeptidase. CpScg and CpYcg carboxypeptidases present 65 and 57.2 kDa and pI of 4.9 and 5.2, respectively, may be are serine proteases. DapBcg dipeptidylaminopeptidase presents 94 kDa and pI of 5.4, behaved as serine protease. All studied proteases show biochemical characteristics similar to those reported for *S. cerevisiae*, the proteolytic activities were detected mainly in the soluble fraction, with the exception of DapBcg activity that is also located in the membrane fraction. It was confirmed that the activities PrAcg, Apelcg, ApeYcg and CpYcg are present in the vacuole of *C. glabrata*.

The expression of encoding vacuolar proteases genes is differential regulated by N and C sources. Proteases encoded by genes *PEP4cg*, *PBR2cg* and *LAP4cg* may participate in the protein turnover induced by stress by proline as N source, *PBR2cg* was the only gene that is overexpressed in the absence of a N source. *PEP4cg* gene (coding PrAcg protease) was cloned for subsequent heterologous expression.

Índice de Tablas y Figuras.

Fig. 1	Participación de las proteasas en la hidrólisis de proteínas.	1
Fig. 2	Rutas de secreción de proteínas en <i>S. cerevisiae</i>	11
Fig. 3	Vías de maduración de proteasas vacuolares de <i>S. cerevisiae</i>	12
Fig. 4	Filogenia de hemiascomicetos.....	15
Fig. 5	Cinética de crecimiento en medio YPD.....	38
Fig. 6	Formación de esferoplastos de <i>C. glabrata</i>	45
Fig. 7	Gradiente discontinuo de sacarosa para la obtención de vacuolas de <i>C. glabrata</i>	46
Fig. 8	Vacuolas de <i>C. glabrata</i> observadas por microscopia de contraste diferencial de interferencia.....	47
Fig. 9	Expresión del gene <i>PEP4cg</i> de <i>C. glabrata</i> determinada por RT-PCR semicuantitativo.....	52
Fig.10	Expresión del gene <i>PRB1cg</i> de <i>C. glabrata</i> determinada por RT-PCR semicuantitativo.....	53
Fig. 11	Expresión del gene <i>PRB2cg</i> de <i>C. glabrata</i> determinada por RT-PCR semicuantitativo.....	54
Fig. 12	Expresión del gene <i>PRB3cg</i> de <i>C. glabrata</i> determinada por RT-PCR semicuantitativo.....	55
Fig. 13	Expresión del gene <i>LAP4cg</i> de <i>C. glabrata</i> determinada por RT-PCR semicuantitativo.....	56

Índice de Tablas y Figuras.

Fig. 14	Expresión del gene <i>APE3cg</i> de <i>C. glabrata</i> determinada por RT-PCR semicuantitativo.....	57
Fig. 15	Expresión del gen <i>CpSCcg</i> de <i>C. glabrata</i> determinada por RT-PCR semicuantitativo.....	58
Fig. 16	Expresión del gene <i>PrC1cg</i> de <i>C. glabrata</i> determinada por RT-PCR semicuantitativo.....	59
Fig. 17	Expresión del gene <i>DAP2cg</i> de <i>C. glabrata</i> determinada por RT-PCR semicuantitativo.....	60
Fig. 18	Amplificado del gen <i>PEP4cg</i> a partir de DNA genómico... ..	62
Fig.19	Amplificado del gen <i>PEP4cg</i> a partir de la construcción <i>PEP4cg</i> -TOPO.....	63
Fig.20	Análisis de restricción de la construcción <i>PEP4cg</i> -TOPO.....	65
Tabla 1.	Proteasas vacuolares de <i>S. cerevisiae</i>	8
Tabla 2.	Genes homólogos a las proteínas vacuolares de <i>S. cerevisiae</i> y <i>C. glabrata</i>	16
Tabla 3.	Características bioquímicas de las proteínas deducidas de los genes codificantes de proteasas vacuolares de <i>C. glabrata</i>	37
Tabla 4.	Localización de la actividad de proteasas ácidas (PrAcg).....	39
Tabla 5.	Localización de la actividad de proteasas ácidas	

Índice de Tablas y Figuras.

	(PrAcg).....	40
Tabla 6.	Localización de la actividad de proteasas neutras (PrBcg).....	40
Tabla 7.	Localización de la actividad aminopeptidasa (APEcg).....	41
Tabla 8.	Localización de la actividad carboxipeptidasa (CPcg).....	42
Tabla 9.	Localización de la actividad de dipeptidilaminopeptidilpeptidasa (DAPcg).....	43
Tabla 10.	Inhibición de las actividades proteolíticas de <i>C. glabrata</i>	44
Tabla 11.	Incremento de la actividad de proteasas vacuolares a partir de las vacuolas obtenidas <i>C. glabrata</i>	48
Tabla 12.	Iniciadores para la amplificación de genes codificantes de proteasas vacuolares de <i>C. glabrata</i>	49
Tabla 13.	Mezcla de reacción para la amplificación de los genes vacuolares de <i>C. glabrata</i>	50
Tabla 14.	Condiciones estandarizadas para la amplificación de los genes vacuolares de <i>C. glabrata</i>	51
Tabla 15.	Condiciones estandarizadas para la amplificación del gen <i>PEP4cg</i>	61

Introducción.

1. Proteólisis

La proteólisis se define como la hidrólisis de proteínas, dando como resultado la producción de péptidos y aminoácidos, en células eucarióticas esta reacción está catalizada por enzimas denominadas proteasas (Fig. 1) (Hirsch y col., 1989).

Schönenheimer en 1942, reconoció el papel central de las enzimas proteolíticas en el mantenimiento de los niveles proteicos intracelulares, estableciendo así el equilibrio entre las velocidades de síntesis y degradación de proteínas. De esta manera, la actividad proteolítica se convierte en un mecanismo regulador que mantiene los niveles de proteína constantes durante los procesos celulares (Schimke y Doley 1970). Actualmente se sabe que la degradación de determinadas proteínas es el punto de control de diversos procesos biológicos, algunos tan fundamentales como la progresión del ciclo celular (Hirsch y col., 1989). De esta manera, la actividad proteolítica se convierte en un mecanismo regulador que mantiene normales los niveles proteicos celulares.

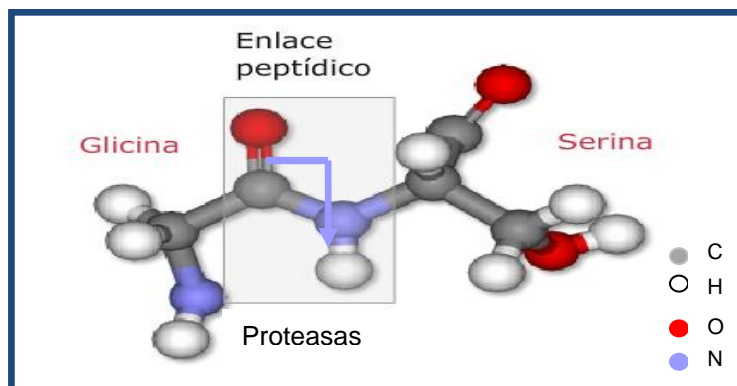


Fig.1. Participación de las proteasas en la hidrólisis de proteínas. (Modificado de Mercado-Flores, 2004).

2. Clasificación de la proteólisis

La proteólisis intracelular se clasifica en tres sistemas de acuerdo a su especificidad por el sustrato:

a) Proteólisis altamente específica: Este tipo de proteólisis se dirige específicamente a proteínas localizadas en cualquier compartimento celular. Es llevada a cabo por enzimas muy específicas que reconocen determinadas secuencias de aminoácidos, conformación estructural o actúan bajo ciertas condiciones de pH y fuerza iónica. Algunos ejemplos de este tipo de proteólisis son la activación de zimógenos, la eliminación de secuencias señal en proteínas extracelulares o bien de la metionina en el extremo N- terminal durante la producción de proteínas nacientes y la activación selectiva de proteínas.

b) Proteólisis inespecífica: Este proceso se lleva a cabo principalmente en el citoplasma, por un complejo multienzimático llamado proteosoma. A este mecanismo se le relaciona con la degradación selectiva de proteínas de vida corta marcadas por la ubiquitina, para dar lugar al recambio proteico y la eliminación de proteínas plegadas inadecuadamente.

c) Proteólisis altamente inespecífica: Las enzimas que participan en este tipo de proteólisis tienen baja especificidad por el sustrato y son capaces de degradar una gran diversidad de proteínas, generalmente se

Introducción.

encuentran dentro de organelos como los lisosomas o vacuolas (Suárez y Wolf, 1988).

Existen importantes evidencias de que los dos sistemas principales de proteólisis, el no lisosomal y el lisosomal, se encuentran en el citosol y en los lisosomas, respectivamente. Se sabe que las proteínas pertenecientes a membranas intracelulares así como a la membrana plásmatica suelen ser degradadas por el sistema vacuolar (Klionsky y col., 1990; Sarry y col., 2007).

3. Señales para la proteólisis

La célula debe reconocer aquellas proteínas que han de ser procesadas o degradadas por diversos motivos que pueden ir desde la activación o reutilización de algunas proteínas ya sintetizadas hasta la eliminación de proteínas y péptidos completos debido a la pérdida de su funcionalidad, esto ha llevado a la detección de distintas señales proteolíticas, algunas de ellas son:

La regla del extremo amino: cuando las proteínas de eucariotas son sintetizadas, presentan en su extremo amino un residuo de metionina, esta metionina inicial debe ser retirada dejando otro aminoácido como cabeza del extremo amino. En levaduras se ha comprobado que en esta posición existen una serie de aminoácidos desestabilizantes y otros aminoácidos estabilizantes. Además, parece que la mayoría de las proteínas citosólicas maduras llevan el extremo amino bloqueado por acetilación.

Introducción.

Secuencias PEST: son un motivo proteico que se encuentra en un gran número de proteínas de vida media corta. Estas regiones se caracterizan por ser ricas en residuos de prolina (P), glutamato/aspartato (E/D), serina (S) y treonina (T) flanqueadas por aminoácidos básicos. Las secuencias PEST se encuentran en enzimas claves del control metabólico, en factores de transcripción, en proteínas quinasas, fosfatasa y en ciclinas (Suarez–Rendules y Wolf, 1988).

Las ciclinas y cajas de destrucción: son proteínas relacionadas con el control del ciclo celular de eucariotas que han de ser degradadas para que la célula continúe desde metafase a anafase. Se trata de una degradación muy controlada, dependiente de un paso previo de 'marcado' de la ciclina con un polipéptido llamado ubiquitina. En todas las ciclinas se ha localizado una secuencia señal (caja de destrucción) formada por 9 aminoácidos (RAALGNISN) que se encuentra presente entre los residuos 13 y 66 de la secuencia proteica.

Los motivos KFERQ: son secuencias peptídicas que marcan proteínas citosólicas para la proteólisis lisosomal, siendo este motivo una de las señales para que las proteínas entren en los lisosomas. Esta secuencia hace susceptibles de degradación lisosomal a aquellas proteínas que la presentan en ciertas condiciones de estrés, como puede ser la retirada del suero en células en cultivo o en tejidos y organismos en condiciones de inanición (Hirsch y col., 1988).

4. Clasificación de las proteasas

De acuerdo a la posición a escindir se han clasificado en exopeptidasas y endopeptidasas, las primeras hidrolizan exclusivamente enlaces peptídicos situados en el extremo amino o carboxilo terminal de la cadena polipeptídica, liberando aminoácidos terminales de las proteínas (Suarez–Rendules y Wolf, 1988). Este grupo comprende:

a) **Aminopeptidasas (L-aminoacil péptido hidrolasas EC 3.4.11):**

Catalizan la reacción de liberación secuencial de aminoácidos del extremo amino terminal.

b) **Carboxipeptidasas (Peptidilaminoácido hidrolasas EC 3.4.12):**

Catalizan la liberación secuencial de aminoácidos del extremo carboxilo terminal.

c) **Dipeptidilaminopeptidasas (Dipeptidil péptido hidrolasas EC**

3.4.15): Liberan dipéptidos a partir del extremo amino terminal

Las endopeptidasas catalizan la hidrólisis de enlaces peptídicos situados preferentemente en el interior de la cadena polipeptídica y son capaces degradar a las proteínas hasta péptidos.

De acuerdo a su mecanismo catalítico las proteasas se clasifican en:

a) **Serín proteasas (EC 3.4.21):** Poseen un residuo de serina en su sitio activo y son inhibidas específicamente por diisopropil-fluorofósforo y otros organofosforados.

Introducción.

- b) **Tiol proteasas (EC 3.4.22):** Son enzimas que requieren de la presencia de un grupo SH en su sitio activo. Estas son inhibidas por iones de metales pesados, agentes alquilantes y agentes oxidantes.

- c) **Proteasas ácidas (EC 3.4.23):** Poseen uno o más grupos carboxilo en su sitio activo.

- d) **Metalo proteasas (EC 3.4.24):** Requieren de cationes metálicos divalentes. Son inactivadas en presencia de agentes quelantes y por procesos de diálisis (Suarez–Rendules y Wolf, 1988).

Antecedentes.

1. SISTEMA PROTEOLÍTICO DE *Saccharomyces cerevisiae*

En *S. cerevisiae* se ha reportado la presencia de tres sistemas proteolíticos intracelulares: el proteosoma citosólico, proteasas de la vía de secreción y las proteasas vacuolares (Jones, 1991).

Proteosoma citosólico: Este complejo enzimático cataliza la hidrólisis de enlaces en la porción carboxilo terminal de residuos de aminoácidos neutros hidrofóbicos, básicos y ácidos (Achtetter y col., 1988; Kleinschmidt y col., 1988; Tanaka y col., 1988). En *S. cerevisiae*, el proteosoma participa en el control del ciclo celular, la degradación de proteínas incorrectamente plegadas y en el recambio proteico (Jones, 1991).

Proteasas de la vía de secreción: Este sistema consiste en un conjunto de proteasas con regiones transmembranales ubicadas a lo largo de la vía de secreción (retículo endoplásmico y aparato de Golgi), cuya función es procesar péptidos precursores secretados, teniendo como ejemplo de productos el factor sexual α (feromona) y la toxina killer. Las proteasas de la vía de secreción son: la peptidasa señal (codificada por el gen *SEC11*), la carboxipeptidasa Kex1 (codificada por el gen *KEX1*), la endoproteasa Kex2 (codificada por el gen *KEX2*), la dipeptidil aminopeptidasa A (codificada por el gen *STE13*) y la proteasa Yap3, (codificada por el gen *YPS1*) (Jones, 1991).

Proteasas vacuolares: En la Tabla 1. se describe el sistema proteolítico vacuolar de *S. cerevisiae*. Las proteínas de dicho sistema se han asociado con la reutilización de pequeños péptidos y de proteínas de vida larga, cuando la célula

Antecedentes.

se encuentra en condiciones de estrés nutricional se han descritos mecanismo como la autofagia (Achstetter y Wolf, 1985; Chao-Wen y Klionsky, 2003). También participan en la degradación de proteínas durante la esporulación (Achstetter y Wolf, 1985).

Tabla 1. Proteasas vacuolares de *S. cerevisiae*

Abreviatura	Nombre de la proteína	Gen
^a CPY	Carboxipeptidasa Y, carboxipeptidasa yscY	<i>PRC1</i>
^a PrA	Proteasa A, proteasa yscA	<i>PEP4, PRA1,</i>
^a PrB	Proteasa B, proteasa yscB	<i>PRB1</i>
^a API; ApCo	Aminopeptidasa I, Aminopeptidasa yscI, leucina aminopeptidasa IV, aminopeptidasa V, aminopeptidasa dependiente de cobalto	<i>LAP4, APEI</i>
^b DPAP B	Dipeptidil aminopeptidasa B, dipeptil aminopeptidasa yscV, X-prolildipeptidil aminopeptidasa	<i>DAP2, DPP2</i>

^a Soluble

^b Asociado a membrana

Se sabe que las proteasas vacuolares catalizan la maduración de precursores y de proteínas, mismos que participan en el recambio proteico, en

Antecedentes.

respuesta a estímulos de estrés nutricional. Estas proteasas tienen la facultad de catalizar la degradación masiva y facilitar así los procesos metabólicos celulares, particularmente durante el proceso de la esporulación (Jones, 1991). Colaboran en funciones tales como la acidificación del lumen vacuolar, el transporte y la eliminación de metabolitos, y en procesos de osmorregulación celular (Klinosky y col., 1990).

La vacuola ha sido estudiada principalmente como un organelo degradativo debido a la gran variedad de actividades hidrolíticas presentes en ella. Dichas actividades son llevadas a cabo por proteasas, ATPasas, RNasas, α -manosidasa, fosfatasa alcalina, etc. Dichas enzimas pueden estar implicadas en procesos relacionados con la adaptación a cambios de pH y de condiciones nutricionales entre otras. Sus niveles de actividad varían de acuerdo a la fase de crecimiento y a las condiciones nutricionales en las que se encuentre la célula. En condiciones limitadas de carbono y nitrógeno tienden a alcanzar sus niveles de actividad máximos (Achstetter y Wolf, 1985).

2. Rutas de secreción de proteínas

Al parecer algunas enzimas residentes de la vacuola como la aminopeptidasa I y la α -manosidasa pueden acceder a ésta por la ruta que va directamente del citoplasma hacia la vacuola es decir por la ruta Citoplasma-Vacuola (ruta CVT) (Chao-Wen y Klionsky, 2003). Sin embargo, la mayoría de las proteínas vacuolares siguen la ruta clásica de secreción y la mejor estudiada es la que sigue la carboxipeptidasa Y. Dicha proteína es sintetizada en el citoplasma y

Antecedentes.

secuestrada en el lumen del retículo endoplásmico (ER) donde sufre N-glicosilaciones y posteriormente es acarreada a la vacuola a través de otras proteínas, que con ayuda de vesículas secretorias (como es el caso de la invertasa) ayudan en la ruta de maduración. Durante esta ruta, son necesarias proteínas secretorias para transportar a la proteína final, dentro de ellas se conocen algunas como SEC62 que lleva a cabo la traslocación del citoplasma al retículo endoplásmico, SEC18 transporta del lumen de retículo endoplásmico hacia el aparato de Golgi, SEC7 transporta la proteína través del complejo de Golgi y en el caso de la invertasa, interviene la proteína SEC1 que participa en la vía de la secreción vesicular (Fig. 2) (Deshaies y col., 1989; Deshaces y Schekman, 1987; Novick y col., 1981; Stevens y col., 1982; Franzusoff y Schekman, 1989).

Antecedentes.

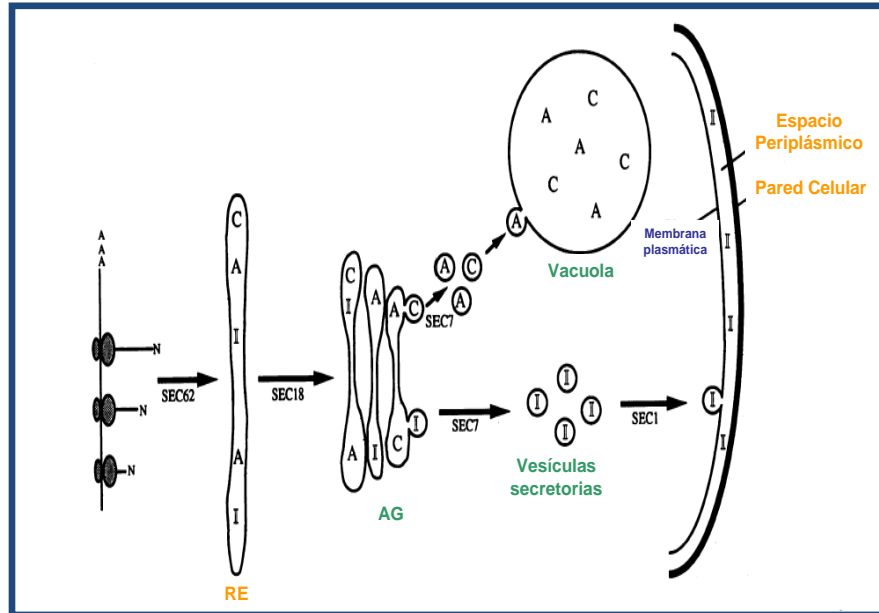


Fig. 2. Rutas de secreción de proteínas en *S. cerevisiae*. La enzima secretora invertasa (I), la hidrolasa vacuolar CPY (C) y PrA (A), son sintetizadas en el lumen del retículo endoplásmico (RE) donde sufrirán N-glicosilaciones, posteriormente pasaran al aparato de Golgi (AG) para ser transportadas a la vacuola. SEC62 proteína traslocadora de ribosomas a RE, SEC18, SEC7 son proteínas transportadoras de RE a AG y de AG a vacuola respectivamente, SEC1 es una proteínas secretora. (Klionsky, 1990).

Algunas de las proteasas vacuolares (PrA, PrB, CpY, CpS Apl, ApCo DAPB) son sintetizadas como precursores inactivos por lo que requieren del procesamiento proteolítico durante la ruta de maduración, pueden ser autocatalizadas o catalizadas por PrB o PrA por lo que el papel de estas últimas es de suma importancia a nivel fisiológico. Sin embargo PrA juega un papel esencial en la auto catálisis, y en la maduración de otras proteasa (Jones, 1991).

Antecedentes.

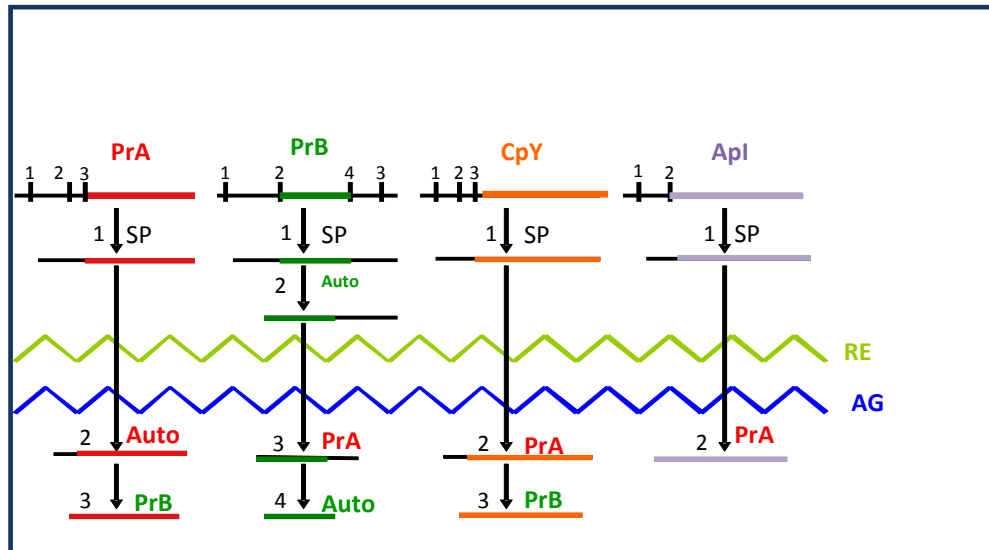


Fig. 3. Vías de maduración de proteasas vacuolares de *S. cerevisiae*. Las proteasas vacuolares PrA proteasa ácida, PrB proteasa neutra, CpY carboxipeptidasa Y, Apl aminopeptidasa I, son sometidas a diversos procesamientos proteolíticos post traducciónales (señalados con números arábigos: 1, 2, 3 y 4). El procesamiento inicia con la eliminación del péptido señal (SP), algunas de estas proteasas se auto procesan tal es el caso de PrA y PrB (Auto). Cabe señalar que estos procesamientos se llevan a cabo principalmente en retículo endoplásmico (RE) y en aparato de Golgi (AG). (Jones, 1991).

3. Proteasa vacuolar PrA de *s. cerevisiae*

La proteasa PrA está implicada en el procesamiento de muchos otros precursores vacuolares incluso, se ha visto que sufre un auto procesamiento (Ammerer y col., 1986; Klionsky y col., 1990). La proteasa PrA, codificada por el gen *PEP4*, es sintetizada como zimógeno, sigue la ruta clásica de secreción y una vez que llega a vacuola se activa por un mecanismo auto catalítico.

En 1986, Ammerer y col., demostraron que la proteína PrA es homóloga a las aspartil proteasas de mamíferos como la pepsina (40% de identidad), renina y catepsina D (46% de identidad), estas proteínas son idénticas entre ellas en un 40 a 50%. La proteína PrA es una glicoproteína de 42 kDa con dos dominios típicos

Antecedentes.

de aspartil proteasas y cuatro cisteínas que forman los puentes disulfuro (Jones, 1991). Algunas aspartil proteasas eucarióticas son secretadas o vacuolares y todas, excepto la pepsina tienen al menos un sitio de glicosilación. Es sintetizada como un precursor de 405 aminoácidos que es procesado proteolíticamente a una proteasa A madura de 329 aminoácidos.

Papel de la proteína PrA en el procesamiento de otras proteasas vacuolares.

Mutaciones en *PEP4*, producen diferentes fenotipos y acumulan precursores inactivos de otras proteasas vacuolares como PrB, CPY, fosfatasa alcalina vacuolar, la aminopeptidasa vacuolar y al menos una especie de RNasa (Jones, 1991; Woolford y col., 1986). Se ha reportado que la proteína complementa la deficiencia de varias hidrolasas vacuolares observadas en mutantes *PEP4*, dichas mutantes reducen un 90-95% los niveles de actividad algunas proteasas vacuolares adicionales (Zubenko y col., 1983).

Papel fisiológico de PrA en *S. cerevisiae*

El papel fisiológico de esta proteasa es exclusivo y no puede ser sustituida por otra proteasa vacuolar, esto se demuestra porque su ausencia provoca la muerte celular bajo condiciones de estrés nutricional. La razón exacta del papel central de esta proteasa bajo condiciones de inanición es desconocida hasta el momento. Por otro lado, la acumulación desfavorable de proteínas vegetativas o péptidos en la célula puede ser la razón por la cual la esporulación se ve afectada. Una explicación podría ser la carencia de aminoácidos necesarios para

Antecedentes.

la síntesis de proteínas necesarias la generación de este evento fisiológico (Teicherts y col., 1989).

Las proteasa PrA y PrB contribuyen de manera equitativa a la degradación de proteínas bajo condiciones de estrés nutricional por fuente de carbono (acetato) y en ausencia de nitrógeno, constituyendo un 70 y 65%, respectivamente a la capacidad degradativa *in vivo*. En ausencia de ambas proteínas, la capacidad degradativa de la vacuola disminuye en un 86% bajo las mismas condiciones. Cuando las células crecen en un medio con glucosa, la degradación de proteínas es alta durante la primera hora y disminuye casi a la mitad después de este periodo de tiempo. Sin embargo, estos datos no descartan la posibilidad de que otros sistemas proteolíticos participen en la degradación de proteínas bajo estas condiciones de crecimiento (Teicherts y col., 1989).

4. Sistema proteolítico vacuolar de *Candida glabrata*

C. glabrata es una levadura haploide con un genoma de aproximadamente 12.3 Mb. Esta levadura está filogenéticamente más relacionada con *S. cerevisiae* que con cualquier especie patógena del género *Candida* (Fig. 4) (Wong y col., 2003).

Antecedentes.

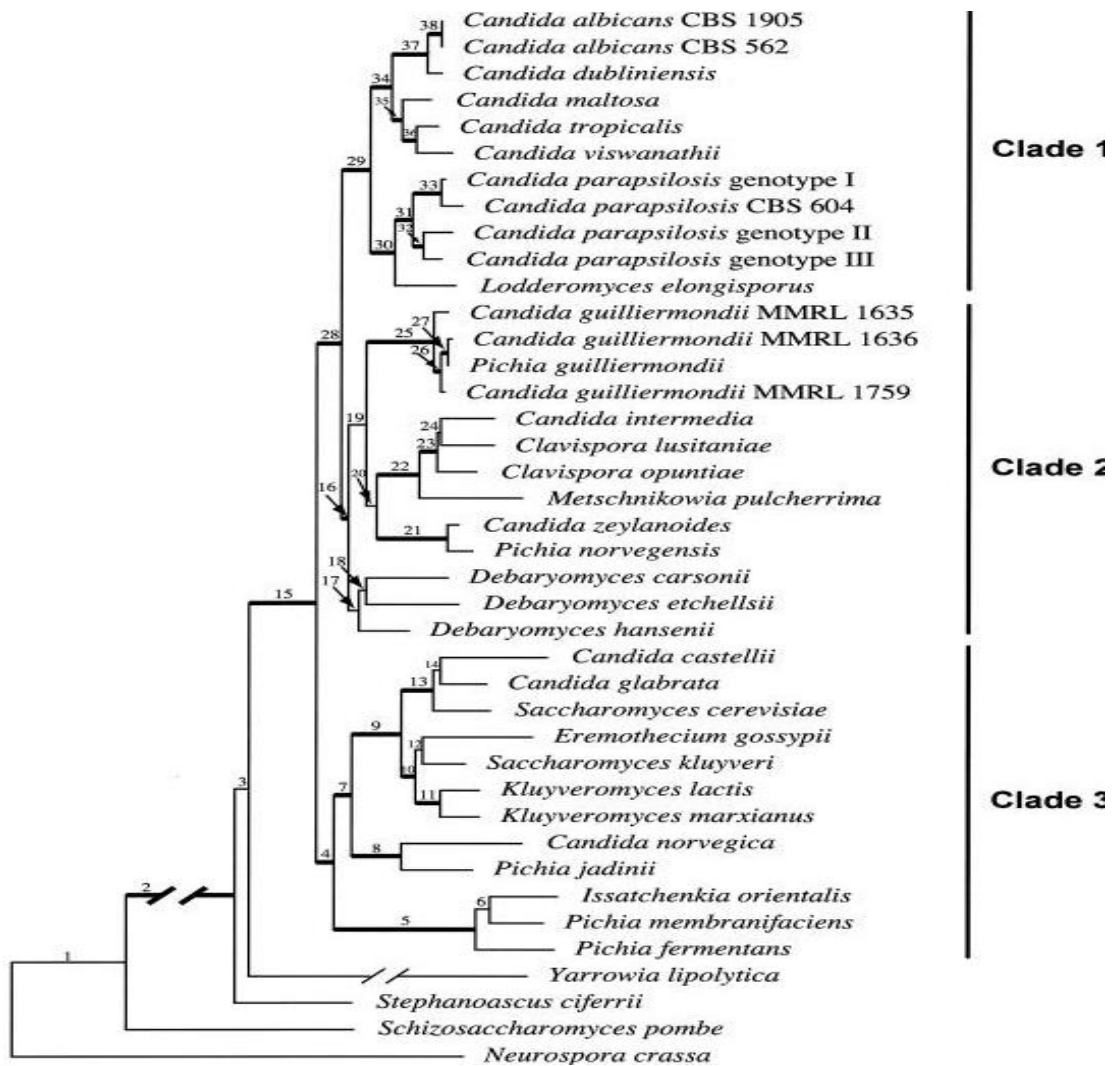


Fig.4. Filogenia de hemiascomicetos. Análisis multigenético (*ACT1*, *EF2*, *RPB1*, *RPB2*, 18S rDNA y 26S rDNA) mediante máxima verosimilitud de 38 taxa de hemiascomicetos y dos grupos externos un Archiascomycete (*S. pombe*) y un Euascomycete (*N. crassa*). (Diezmann y col., 2004)

Las infecciones por *C. glabrata* pueden ser superficiales o sistémicas y son comunes en huéspedes inmunocomprometidos.

Dependiendo del sitio de infección *C. glabrata* es recientemente la primera o segunda causa más común de candidiasis sistémica después de *C. albicans*.

Antecedentes.

El incremento en la frecuencia de estas enfermedades causadas por algunas de estas especies se ha asociado con resistencia a drogas antifúngicas como fluconazol, especialmente en *C. glabrata* (Calderone, 2002). Se conoce muy poco sobre el sistema proteolítico de esta especie, algunas investigaciones han demostrado que *C. glabrata* produce proteinasas y que la hidrofobicidad de su superficie celular es similar a la de *C. albicans*, lo que asegura su capacidad de adherencia a las células del huésped (Fidel y col., 1999). En nuestro grupo de trabajo se realizó la búsqueda bioinformática de los genes codificantes del sistema proteolítico vacuolar de *C. glabrata*, en dicha búsqueda se detectaron genes homólogos a las proteínas vacuolares de *S. cerevisiae* (Tabla 2). Sin embargo, a pesar del posible papel que pudieran desempeñar estas enzimas, aun no se sabe nada acerca de su función en *C. glabrata*.

Tabla 2. Genes homólogos a las proteínas vacuolares de *S. cerevisiae* y *C. glabrata*

Proteína de <i>S. cerevisiae</i>	Proteína homóloga en <i>C. glabrata</i>	Definición
PrA	CAGL0M02211g	Proteasa A
PrB	CAGL0B03619g CAGL0E02651g	Proteasa B1a Proteasa B2
CpS	CAGL0C00319g	Carboxipeptidasa S
CpY	CAGL0G01232g	Carboxipeptidasa Y
Apl	CAGL0K08536 CAGL0I01298g	Aminopectidasa Ia, dependiente de Zn Aminopectidasa Ib, dependiente de Zn

Antecedentes.

Justificación.

En años recientes han surgido nuevas especies causantes de candidosis, entre las que se encuentra *C. glabrata*, especie que además puede presentar resistencia a los antifúngicos convencionales. La aparición de esta especie se ha convertido en un reto para la búsqueda de nuevos blancos terapéuticos, la caracterización de factores de virulencia, así como el estudio de los factores que le permitan sobrevivir en diferentes condiciones.

En *S. cerevisiae* se ha demostrado la participación de las proteasas vacuolares en el recambio proteico, en el control post-traducciona l y en procesos como la autofagia, sin embargo nada se sabe acerca del papel de las proteasas vacuolares de *C. glabrata*. Debido a la importancia de las proteasas vacuolares reportadas en *S. cerevisiae*, en nuestro grupo de trabajo se realizó un análisis *in silico* para identificar la presencia de genes putativos codificantes de proteasas vacuolares homólogas a las descritas en *S. cerevisiae*.

El estudio de las proteínas deducidas de los genes identificados, la localización de las actividades proteolíticas y los estudios de expresión a nivel transcripcional, aportarán información acerca del posible papel de estas proteasas en diferentes condiciones fisiológicas, su participación en el recambio proteico de proteínas así como en el control post-traducciona l (maduración de otras proteínas).

Diversos estudios respaldan la importancia de la PrA (aspartil proteasa vacuolar codificada por el gen *PEP4*) en el metabolismo celular de *S. cerevisiae* y en la maduración de otras proteínas vacuolares, la ausencia de la misma puede derivar en la muerte celular en condiciones de estrés nutricional. Por este motivo la expresión heteróloga del gen *PEP4cg* en el sistema de *P. pastoris* permitirá determinar las características bioquímicas de esta enzima y comprobar la naturaleza proteolítica de la enzima PrAcg.

Objetivos.

GENERAL

- Caracterizar el sistema proteolítico vacuolar de *C. glabrata*

PARTICULARES

- Identificar en el genoma de *C. glabrata* los genes putativos codificantes de proteasas vacuolares así como caracterizar *in silico* a las proteínas deducidas.
- Determinar las actividades bioquímicas enzimáticas de las proteasas vacuolares en diferentes fracciones celulares, así como en una fracción enriquecida de vacuolas.
- Determinar los niveles de expresión de los genes putativos codificantes de proteasas vacuolares bajo diferentes fuentes de nitrógeno y condiciones de estrés por ausencia de carbono o nitrógeno.
- Obtener una construcción genética que nos permita la expresión heteróloga del gen *PEP4cg* codificante de una aspartil proteasa vacuolar hipotética.

Material y Métodos.

1. Microorganismos

- Se trabajó con la cepa tipo CBS138 de *Candida glabrata*
- Células competentes de *Escherichia coli* DH10B
- Las cepas fueron conservadas en glicerol al 25% a -70° C.

2. Reactivos químicos

Los reactivos utilizados en este trabajo fueron provistos por las casas comerciales Amersham, Bachem, BioRad, Difco, ICN, InVitrogen, Merck, Oxoid, Roche y Sigma.

3. Medios de cultivo para *E. coli*

Medio de Luria (LB): Bacto Triptona 1 %, extracto de levadura 0.5 %, NaCl 1 %, pH 7. Añadir ampicilina 100 µg/mL. Al medio sólido añadir además: X-gal e IPTG, para seleccionar las colonias que contengan la construcción.

4. Medios de cultivo para hongos

Medio rico YPD: Extracto de levadura al 2 %, dextrosa 2 % y Bacto Peptona 2 %.

Medio mínimo (YNB): Base nitrogenada de levadura, sin aminoácidos y sin sulfato de amonio, 0.17 %, dextrosa 2 %, fuente de nitrógeno deseada al 1.5 %.

Material y Métodos.

Los medios de cultivo se esterilizaron a 120 °C durante 15 min, los suplementos nutricionales se esterilizaron por filtración. Los medios sólidos se prepararon adicionando agar a una concentración de 15 g/L de medio.

5. Determinación la actividad de proteasas en diferentes fracciones celulares de *C. glabrata*

Crecimiento de *C. glabrata*

Se inocularon 100 mL de medio YPD con la cepa *C. glabrata* CBS138 incubando a 37°C por 24 h en agitación constante. Este cultivo fue utilizado para inocular 2 matraces Fernbach con 1000 mL de YPD, incubado a 37°C durante 14 h.

Obtención de biomasa

El cultivo anterior se centrifugó a 8,000 x *g* por 10 min a 4°C. El sobrenadante se desechó y las células se lavaron dos veces con solución reguladora (Tris-HCl, 0.1 M, pH 7.0). El paquete celular fue resuspendido en 2 mL del mismo regulador por cada gramo de y biomasa

Fraccionamiento celular y obtención del extracto enzimático

Las células resuspendidas se rompieron en un homogenizador Braun, colocando en las botellas 2 g de perlas de vidrio (0.5 mm de diámetro) por 1 mL de la suspensión. El rompimiento se efectuó con 10 ciclos de 20 segundos cada uno con intervalos de 60 segundos en baño de hielo entre cada ciclo. El rompimiento celular se verificó por observación al microscopio de una preparación en fresco a 400 X (Modificado de Parra, 2003).

Material y Métodos.

La suspensión correspondiente a las células rotas se transfirió a botellas de 45 mL y se centrifugó a 2,500 x *g* a 4°C durante 10 min para eliminar las células no rotas. El sobrenadante obtenido se centrifugó 20,000 x *g*, a 4°C durante 10 min. El sobrenadante fue conservado hasta su uso y el sedimento se resuspendió en regulador de fosfatos 0.1 M pH 7 con DTT 10 mM y EDTA 1mM y centrifugado a 100,000 x *g* por 90 min a 4°C.

De esta manera se obtuvieron 3 fracciones para la determinación de las actividades enzimáticas y concentración de proteína: Sobrenadante de 20,000 x *g*, correspondiente al Extracto Libre de Células (ELC), Sobrenadante de 100,000 x *g*, correspondiente a la fracción soluble (SN 100,000 x *g*) y el precipitado de 100,000 x *g* correspondiente a la fracción membranal (PP 100,000 x *g*).

6. Aislamiento y obtención de vacuolas

El aislamiento de vacuolas se realizó con el método modificado de Nakanishi y col. (2001) y Kakinuma y col. (1981). Se realizó un pre-cultivo en medio YPD de la cepa CBS138 *C. glabrata* incubando a 37°C por 24 h en agitación constante, con 200 µl de este precultivo se inocularon matraces con 100 mL de YPD y se incubó a 37°C durante 14 h.

El cultivo anterior se centrifugó a 5000 x *g* por 10 min a 4°C. El sobrenadante se desechó y las células se resuspendieron en 50 mL de una solución con Tris 0.1 M, 10 mM de Ditiotreitól (DTT), 0.1 M de glucosa a pH final

Material y Métodos.

de 9.5 y se incubaron con agitación suave por 20 min a 30°C. Se obtuvo el paquete celular por centrifugación a 5,000 x *g* durante 10 min a 4°C. El sobrenadante se desechó y la pastilla se resuspendió en 50 mL de regulador de digestión con 0.1 M de glucosa, 1 M de Sorbitol, 50 mM de Tris/MOPS pH 7.6, zimoliasa 20T al 0.05 %, DTT al 5 mM.

Se incubó durante una h a 30°C con agitación suave para la digestión de la pared celular de las levaduras. Posteriormente se centrifugó a 6,000 x *g* en 10 ml de una solución de Sorbitol 1.4 M durante 10 min a 4°C. El paquete celular se resuspendió en 20 mL de solución amortiguadora de lisis que contenía: Glicerol al 1.1 M, Tris/MOPS 50 Mm pH 7.6 y DTT 1 mM, los esferoplastos formados se lisaron a 4°C, con ayuda de un homogenizador de tejidos de vidrio con pistón de teflón (Potter Elvehjem) liberando su contenido. Para determinar el porcentaje de esferoplastos rotos, fue necesario el monitoreo en el microscopio óptico (Olympus CH30) con un aumento de 400X.

Posteriormente se centrifugó a 6,000 x *g* por 10 min para eliminar remanentes, el sobrenadante (mismo que deberá estar turbio debido a la presencia de las endomembranas) se ultracentrifugó a 200,000 x *g* a 4°C en una centrifuga Beckman Modelo L-80, con un rotor tipo 90Ti.

La pastilla obtenida se resuspendió en un regulador de sacarosa: Tris/MOPS 10 mM pH7.6, Glicerol 50 Mm, Cloruro de potasio 125 Mm, DTT 1 mM y Sacarosa al 15 % , se formó un gradiente discontinuo al estratificar 6 mL de la solución de sacarosa al 15 % de sacarosa por encima de 6 mL de la solución de sacarosa al 35 %.

Material y Métodos.

Los tubos se centrifugaron para formar el gradiente discontinuo de sacarosa a $125,000 \times g$ por tres h a 4°C en un rotor de columpio SW28 en una ultracentrífuga Beckman.

Las vesículas se colectaron de la interfase y se diluyeron 20 veces en un regulador de lavado el cual contenía, Sorbitol 0.15 M, Tris/MOPS 5 mM, Cloruro de Magnesio 0.25 mM, Cloruro de Potasio 5 Mm y DTT 0.5 mM y se centrifugó a $200,000 \times g$ durante 50 min a 4°C en un rotor tipo 90Ti en una ultracentrífuga modelo Beckman L-80. La pastilla obtenida se resuspendió en un regulador de conservación (Sorbitol 0.15 M, Tris/MOPS 5 mM, Cloruro de Magnesio 0.25 mM, Cloruro de Potasio 5 Mm y DTT 0.5 Mm) la suspensión que contiene vesículas ricas en vacuolas, se congeló a -70°C hasta su uso.

Las vacuolas se resuspendieron en regulador de rompimiento que contiene Sorbitol 0.3 M, Tris/MOPS 5 mM pH 7.6 y DTT 1 mM, y mediante congelación y descongelación continua se obtienen los lisados vacuolares.

7. Determinación de la concentración de proteínas

La determinación de proteínas se realizó a cada fracción con el método de Bradford utilizando albúmina sérica bovina como patrón (Bradford, 1951)

a) Determinación de actividades proteolíticas

Determinación de la actividad aminopeptidasa (APE)

La actividad APE en las diferentes fracciones se determinó siguiendo el método descrito por Hirsh y col. (1988). La mezcla de reacción se formó con 250 μl de regulador de fosfato de potasio 0.1 M pH 6.5, 100 μl del extracto enzimático

Material y Métodos.

y 30 μ l de substrato cromogénico Lys-p-nitroanilida 10 mM disuelto en agua. Se incubó a 37°C durante 20 min., la reacción se paró adicionando 500 μ l de ZnSO₄ al 5 % y 100 μ l de Ba(OH)₂ al 7.5 %. Se centrifugó a 12,000 \times g durante 10 min. Para valorar la nitroanilina liberada, el sobrenadante se leyó a una λ de 405 nm en un espectrofotómetro interpolando una curva tipo de p-nitroanilina.

Una unidad de actividad de aminopeptidasa se define como la cantidad de enzima necesaria para hidrolizar 1 μ mol de substrato Lys-p-nitroanilida por minuto bajo las condiciones de ensayo descritas.

b) Determinación de la actividad dipeptidilaminopeptidasa (DAP)

La actividad DAP se determinó siguiendo el método descrito por Hirsh y col. (1988). La mezcla de reacción se formó con 250 μ l de regulador de Tris- HCl 0.1 M, pH 7.0, 100 μ l del extracto enzimático y 30 μ l de substrato cromogénico Ala-pro-p-nitroanilida 10 mM disuelto en agua. Se incubó a 37 °C durante 20 min, la reacción se paró adicionando 500 μ L de ZnSO₄ al 5 % y 100 μ l de Ba(OH)₂ al 7.5 %. Se centrifugó o a 12,000 \times g durante 10 min. Para valorar la nitroanilina liberada, el sobrenadante se leyó a una λ de 405 nm en un espectrofotómetro interpolando en una curva tipo de p-nitroanilina.

Una unidad de actividad de dipeptidilaminopeptidasa se define como la cantidad de enzima necesaria para hidrolizar 1 μ mol de substrato Ala-pro-p-nitroanilida por minuto bajo las condiciones de ensayo descritas.

c) Determinación de la actividad carboxipeptidasa (CP)

Material y Métodos.

La actividad CP se determinó siguiendo el método descrito por Hirsh y col. (1988). La mezcla de reacción se formó con 250 μ l de regulador de Tris- HCl 0.1 M, pH 7.6, 100 μ l del extracto enzimático, 60 μ l de desoxicolato de sodio al 5 % y 25 μ l de substrato cromogénico N-benzoil-L- tirosil-p-nitroanilida 10 mM disuelto en dimetilformamida. Se incubó a 37 °C durante 20 min, la reacción se detuvo adicionando 500 μ l de ZnSO₄ al 5 % y 100 μ l de Ba(OH)₂ al 7.5 %. Se centrifugó a 12,000 x g durante 10 min. Para valorar la nitroanilina liberada, el sobrenadante se leyó a una λ de 405 nm en un espectrofotómetro interpolando en una curva tipo de p-nitroanilina.

Una unidad de actividad de carboxipeptidasa se define como la cantidad de enzima necesaria para hidrololizar 1 μ mol de N-benzoil-L-tirosil-p-nitroanilida por minuto bajo las condiciones de ensayo descritas

d) Determinación de la actividad aspartil proteasa ácida (PrA) con BSA

Esta actividad se determinó siguiendo el método descrito por Saheki y Holzer (1974). La mezcla de reacción se formó con 100 μ L de extracto enzimático y 400 μ L de substrato albúmina sérica bovina al 1 % (BSA) disuelta en regulador de citratos 0.05 M pH 3.2. Se incubó a 37°C durante 2 h, la reacción se paró adicionando 1000 μ L de ácido tricloroacético al 10 %. Se centrifugó a 12,000 x g durante 10 min. Posteriormente se desarrolló color al sobrenadante para cuantificar péptidos liberados por el método de Bradford (1951) y se leyó a una λ de 660 nm en un espectrofotómetro. Una unidad de proteasa A se define como la

Material y Métodos.

cantidad de enzima necesaria para liberar 1 μmol de tirosina por minuto bajo las condiciones de ensayo descritas.

e) Determinación de la actividad aspartil proteasa ácida (PrA) con Hb

Esta actividad se determinó siguiendo el método descrito por Saheki y Holzer (1974). La mezcla de reacción se formó con 100 μL de extracto enzimático y 500 μl de hemoglobina a pH 3.0 con hidróxido de sodio 1.0 M. Se incubó a 37 $^{\circ}\text{C}$ durante 30 min, la reacción se paró adicionando 500 μL de ácido tricloroacético al 10 %. Se centrifugó a 12,000 $\times g$ durante 10 min. Posteriormente se determinaron péptidos por Micro Lowry.

f) Determinación de la actividad proteasa B (Pr B)

Esta actividad se determinó siguiendo el método descrito por Saheki y Holzer (1974). La mezcla de reacción se formó con 100 μL del extracto enzimático, 500 μL de muestra de Hide Power Azure (Polvo de Cuero Azul) 20 mg/ml en regulador de fosfatos de sodio 0.1 M, pH 7.0 como substrato cromogénico y 50 μL de SDS al 5 %. La reacción se incubó a 37 $^{\circ}\text{C}$ en agitación durante 30 min., hasta la aparición de color azul intenso en el sobrenadante, la reacción se paró adicionando 550 μl de agua desionizada estéril fría (4 $^{\circ}\text{C}$). Se centrifugó a 12,000 $\times g$ durante 10 min y el sobrenadante se leyó a una λ de 578 nm en un espectrofotómetro. Una unidad de actividad de proteasa B se define como la cantidad de enzima necesaria para aumentar en 1 U la densidad óptica a 578 nm de λ por minuto bajo las condiciones de ensayo descritas.

8. Efecto de inhibidores de proteasas sobre la actividad enzimática.

Material y Métodos.

Se evaluó el efecto de los inhibidores: Pepstatina A, PMSF, EDTA, Fenantrolina, Bestatina, Pefabloc, E64 y Leupeptina. Los extractos enzimáticos se preincubaron a 37°C con cada inhibidor y se determinaron las actividades proteolíticas correspondientes utilizando como testigos de 100 % de actividad las determinaciones enzimáticas sin inhibidores. La actividad residual se expresó en porcentaje tomando como referencia el valor obtenido en ausencia de inhibidor.

9. Análisis bioinformático

Las secuencias codificantes de proteasas vacuolares putativas de *C. glabrata* fueron identificadas por un análisis BLAST, utilizando los posibles genes ortólogos de *S. cerevisiae*, contra el genoma de *C. glabrata* disponible en: <http://ncbi.labri.fr/Genolevures/elt/CAGL>. Las secuencias de aa fueron deducidas a partir de las secuencias nucleotídicas de los genes utilizando el código genético nuclear alternativo del programa DNAMAN version 3 (Lynnon BioSoft 1994-97). La predicción de secuencias firma o “motifs” (secuencias consenso que representan una actividad, sitio activo, sitio de modificación post-traducciona, etc.) fueron detectadas con el programa ScanProsite (<http://www.expasy.org>). El punto isoeléctrico, la predicción de regiones de hidrofobicidad y de regiones transmembranales, se realizaron con el programa ANTHEPROT. La predicción de localización subcelular se realizó utilizando los programas PSORTII (<http://www.psort.org/>) y Softberry (<http://www.softberry.com>).

a) Diseño de oligonucleótidos

Para determinar los niveles de expresión bajo diferentes condiciones de fuentes de nitrógeno y carbono, se diseñaron iniciadores específicos para

Material y Métodos.

amplificar un fragmento de los genes codificantes de proteasas vacuolares (Tabla 3). En el caso del gen *PEP4Cg*, se diseñaron además un par de iniciadores para la amplificación completa del gen y su posterior expresión heteróloga en el sistema de *P. pastoris*. Dichos iniciadores están flanqueados por un sitio de restricción en el extremo 5' con el objetivo de asegurar la correcta inserción del gen en el plásmido pPICZ α A. Las secuencias se obtuvieron en la base de datos del genoma de *C. glabrata* (ver iniciadores en la sección de Resultados).

Extracción de RNA

La extracción de RNA se realizó de acuerdo al método descrito por Schmitth y col., (1990) y modificado por Farrel (1988), el cual consiste en calentamiento, congelación y descongelación de cada muestra en presencia de fenol (pH 5.2) y SDS al 10% seguido de una extracción con fenol –cloroformo-alcohol isoamilico (25:24:1), extracción con cloroformo-alcohol isoamilico (24:1) y precipitación con etanol al 95% y acetato de sodio 3 M.

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

Material y Métodos.

Comprobación de la integridad de los RNAs

Se verificó la calidad del RNA, mediante electroforesis en geles de agarosa en condiciones desnaturizantes 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 así se comprobó que estuvieron contaminadas con DNA.

RT-PCR

La expresión de los genes 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 cDNAds.

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.

Procesamiento y análisis de los resultados

Material y Métodos.

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

TÉCNICAS DE BIOLOGÍA MOLECULAR

Extracción de DNA genómico

Para obtener DNA genómico de *C. glabrata* se utilizó el método descrito por Hoffman y Winston (1987). La cantidad y calidad del DNA se determinó a A_{260} y la relación de A_{260}/A_{280} , respectivamente.

Electroforesis de DNA en geles de agarosa

El DNA genómico y los productos de amplificación fueron evidenciados por electroforesis en geles de agarosa al 1%, teñidos con bromuro de etidio y observados con luz UV.

Purificación de los productos de PCR

Los fragmentos amplificados fueron purificados empleando el Kit QIAEX II Extracción a partir de gel (QIAGEN, USA).

Para corroborar la calidad y cantidad aproximada de los productos de PCR purificados se colocaron 3 μ l de DNA purificado y se realizó una electroforesis en un gel de agarosa al 1%.

Clonación de los productos de PCR

Para determinar si el producto amplificado y purificado pertenece al gen esperado se clonó con el Kit TOPO-TA Cloning (Invitrogen) que utiliza el vector

Material y Métodos.

pCR®2.1-TOPO, se transformó la cepa quimiocompetente DH10B de *E. coli* y se extrajo el DNA plasmídico.

Extracción de DNA plasmídico (miniprep)

Para obtener el DNA plasmídico por lisis alcalina

Secuenciación del gen clonado

El producto de PCR clonado se amplificó utilizando los iniciadores M13 “forward” y M13 “reverse” que flanquean el sitio de clonación múltiple del vector pCR®2.1-TOPO. El amplificado se purificó a partir de agarosa utilizando el Kit QIAEX II, Gel Extraction (QIAGEN, USA) y se secuenció en un secuenciador AB PRISM. La secuencia fue visualizada y editada con en los programas BioEdit (Hall, 1999) y “Seaview” (Galtier y col., 1996) respectivamente.

10. Sistema de clonación y expresión en *P. pastoris*.

Desarrollo de las técnicas de clonación

Se usó el equipo y reactivos comerciales del kit Easy Select *Pichia* Expresión de Invitrogen. El plásmido pPICZ α A y el amplificado por PCR fueron restringidos con las enzimas *EcoRI* y *NotI*. Los fragmentos obtenidos de la digestión que correspondan con el tamaño esperado se purificaron y se sometieron a una reacción de ligación con la ligasa T4. Con el producto de la reacción de ligación se transformarán las células de *E. coli* quimiocompetentes utilizando 5 μ l de la reacción de ligación y 100 μ l de células.

Material y Métodos.

Las colonias que se desarrollen se consideran transformantes. Las colonias transformantes se transferirán a tubos con 5 mL de medio LB bajo en sales con 25 µg/ml de zeocina y se incubarán en agitación a 37 °C durante 18 h. Las cepas transformadas de *E. coli* y confirmadas con la construcción deseada, serán conservadas a -70°C en glicerol al 25%. A partir de estas cepas se seleccionarán algunas y se propagará para recuperar el DNA plasmídico por el método de lisis alcalina.

La confirmación de la inserción del ORF del gen en el vector se determinará mediante la electroforesis de los productos de la digestión, con la enzima de restricción *EcoRI*. Se empleó esta enzima debido a que mediante un análisis de restricción teórico se corroboró que no existiera un sitio de restricción en el ORF del gen *PEP4cg* de *C. glabrata* y a su vez es un sitio de corte único en el vector pPICZ α A. El plásmido linearizado se purificará y se usará para transformar células sensibilizadas de *P. pastoris*.

Transformación de *P. pastoris* X-33

Las células de *P. pastoris* X-33 se sensibilizarán de acuerdo a las especificaciones del manual de EasySelect *Pichia* Expresión Kit de Invitrogen.

En una celda de electroporación se colocarán 80 µL de células sensibilizadas de *P. pastoris* X-33 y 10 µg de DNA plasmídico linearizado, la mezcla se dejará enfriar en baño de hielo durante 5 min y posteriormente se someterá a una descarga de 1.8V. Las células electroporadas se recuperarán en 1 ml de sorbitol 1 M y se incubarán a 30°C durante 2 h sin agitar. Al finalizar las 2 h

Material y Métodos.

se adicionará 1 mL de medio YPD y se incubará durante 1 h. Posteriormente se tomarán 200 μ L del cultivo y se sembrarán de forma masiva en una caja de agar YPDS con 100 μ g/mL de zeocina, el resto del cultivo se sigue incubando hasta completar 4 h, al finalizar la incubación se siembran de forma masiva 200 μ L del cultivo en agar YPDS con 100 μ g/mL de zeocina, las placas se incuban a 30°C durante 2 a 4 días. Las colonias que se desarrollen se considerarán como transformantes.

El procedimiento se realizará por duplicado con la incorporación de un testigo negativo que consiste en transformar células de *P. pastoris* con el plásmido sin el gen de interés (plásmido vacío).

Caracterización fenotípica y genotípica de las transformantes

Las colonias de las transformantes obtenidas se recuperarán y se harán crecer por estría cruzada en agar YPDS con 100 μ g/ml de zeocina; a partir de este cultivo se determinará el fenotipo de las transformantes cultivándolas en medio Mínimo Metanol Histidina (MMH) y medio Mínimo Dextrosa Histidina (MDH). Las transformantes que crezcan lentamente en medio MMH, en comparación con las cepas silvestres se consideran fenotipo Mut^S teóricamente son las que poseen integrado el vector con la construcción deseada. La confirmación del genotipo se realizará mediante la amplificación del gen en *P. pastoris* mediante PCR.

Purificación y caracterización parcial de la proteína recombinante

Material y Métodos.

La proteína recombinante extracelular se purificará en una columna con resina de Níquel, siguiendo las instrucciones del fabricante.

Se determinará el efecto del pH y temperatura (estabilidad y condiciones óptimas), especificidad por diferentes substratos, efecto de inhibidores, etc.

Resultados

1. Búsqueda de los genes vacuolares putativos codificantes de proteasas vacuolares, en el genoma de *C. glabrata*

Los genes se buscaron en el genoma de *C. glabrata* (<http://cbi.labri.fr/Genolevures/elt/CAGL>) siguiendo la siguiente estrategia:

a) Utilizando las secuencias reportadas para los genes de *S. cerevisiae* reportados en la base de datos del NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) se realizó la búsqueda con 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) Con las secuencias obtenidas se realizaron nuevamente análisis BLAST (blastp, blastn, blastx y tblastn).

Se detectaron 11 genes putativos de proteasas vacuolares los cuales se describen en la Tabla 3: *PEP4cg* (aspartil proteasa ácida A), *PRB1cg* (proteasa neutra), *PRB2cg*, *PRB3cg*, *LAP4cg* (metaló aminopeptidasa), *APE3cg* (aminopeptidasa), *CPSc* (carboxipeptidasa S), *PRC1cg* (carboxipeptidasa Y), *CPCcg* (Kex1), *DAP2cg* (dipeptidil aminopeptidasa B).

Resultados

2. Análisis de las secuencias nucleotídicas y aminoacídicas de los genes codificantes de proteasas vacuolares de *C. glabrata*

Las características analizadas fueron los siguientes:

a) 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, Canadá. 1994-1997).

b) La determinación del punto isoeléctrico, peso molecular, se realizó con el programa Antheprot 2000 versión 5.2.

c) 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).

Resultados

d) La predicción de la localización celular de las proteínas hipotéticas codificadas por los genes vacuolares, 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>. Los resultados obtenidos del análisis bioinformático de las secuencia se describen en la Tabla 3.

Tabla 3. Características bioquímicas de las proteínas deducidas de las secuencias de genes codificantes de proteasas vacuolares de *C. glabrata*

Gen (pb) Proteína	Peso molecular (kDa) Punto Isoeléctrico (PI)	Definición	Posible función
<i>PEP4cg</i> (1248) PrA_{cg}	45.4 4.6	Aspartil proteinasa A	Participa en procesamiento pos traduccional la maduración de otras proteasas.
<i>PRB1cg</i> (1407) PrB1_{cg}	50.0 5.7	Son serín proteasas de la familia de las subtilisinas	Asociadas a la degradación de proteínas vacuolares y son necesarias para procesos de esporulación
<i>PRB2cg</i> (1458) PrB1_{cg}	53.4 6.1		
<i>PRB3cg</i> (1740) PrB3_{cg}	63.5 4.9		
<i>LAP4cg</i> (1530) APEI_{cg}	57.0 6.0	Metaló aminopeptidasa dependiente de Zn	Asociada a procesos de autofagia y es de la ruta citoplasma vacuola (CVT)
<i>APE3</i> (1692) APEY_{cg}	62.2 5.4	Aminopeptidasa Y	Degradación de proteínas y aminoácidos.
<i>CPScg</i> (1743) CpS_{cg}	65.0 4.9	Carboxipeptidasa vacuolar metalo –ion dependiente	Asociada a procesos de esporulación
<i>PRC1cg</i> (1527) CpY_{cg}	57.2 5.2	Carboxipeptidasa Y (proteínasa C)	Asociada a degradación de proteínas de la vacuola
<i>CpSCg</i> (1743) CpS_{cg}	65.0 4.9		
<i>DAP2cg</i> (2454) DapB_{cg}	94 kDa PI 5.4	Dipeptidilaminopeptidasa	Sintetizada y glicosilada como precursor, localizada en la membrana vacuolar

Resultados

3. Actividades enzimáticas proteolíticas en fracción soluble y membranal

En estudios previos realizados en nuestro grupo de investigación, se había observado que los mayores niveles de actividad proteolítica de la mayoría de las enzimas, se encontraban durante la fase de crecimiento estacionaria temprana. Con el fin de determinar el tiempo de incubación en YPD para cosechar a las células durante esta fase de crecimiento, se realizó una curva de crecimiento para cosechar a las células, romperlas y obtener las fracciones solubles y membranal. Como se puede observar en la Fig. 5, las células se encuentran en la fase estacionaria temprana a las 6 h de incubación en medio YPD.

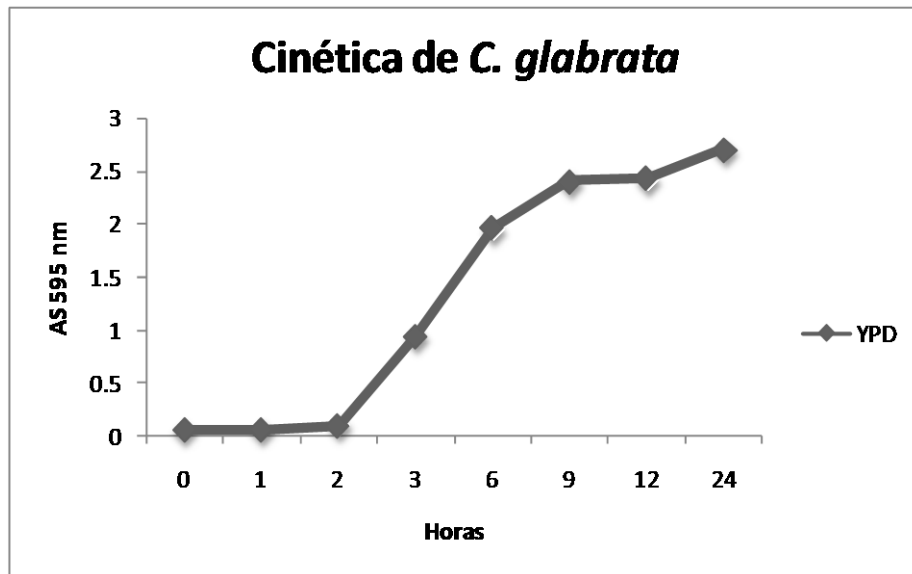


Fig. 5. Cinética de crecimiento de *C. glabrata* en medio YPD.

Las células de la cepa de *C. glabrata* CBS 138 se cosecharon a las 6 h de incubación en medio YPD y se realizó un fraccionamiento celular para determinar la localización celular en fracciones solubles o membranales. Las fracciones analizadas fueron: el extracto libre de células (ELC, SN 20,000 x g), la fracción soluble

Resultados

(SN 100,000 x g) y la fracción membranal (PP 100,000 x g). Se determinaron las actividades proteolíticas en dichas fracciones.

Actividad de PrAcg (Hemoglobina desnaturalizada)

La Tabla 4 muestra los resultados correspondientes a la producción de proteasas ácidas utilizando como sustrato Hemoglobina desnaturalizada a pH 3.0. Los resultados sugieren que esta proteasa ácida se encuentra principalmente en fracción soluble.

Tabla 4. Localización de la actividad de proteasas ácidas (PrAcg)

Fracción	Actividad mU /mL	Proteína mg /mL	Actividad específica mU/mg de proteína
ELC SN 20,000 xg	0.4107	0.68	0.60
SN100,000 xg	0.937	1.82	0.54
PP100,000 xg	0.227	1.74	0.13

Resultados

Actividad de de PrAcg (BSA)

Tabla 5. Localización de la actividad de proteasas ácidas (PrAcg)

Fracción	Actividad mU /mL	Proteína mg /mL	Actividad específica mU/mg de proteína
ELC SN 20,000 xg	0.5427	0.68	0.79
SN 100,000 xg	0.3919	1.82	0.21
PP 100,000 xg	0.1764	1.74	0.11

Los resultados obtenidos nos sugieren que esta proteasa se presenta principalmente en la fracción soluble.

Actividad de proteasa PrBcg (HPA)

La Tabla 6 sugieren que la PrBcg se localiza principalmente en la fracción soluble (Utilizando Hide Powder Azure como sustrato), tal y como se ha descrito en *S. cerevisiae*.

Tabla 6. Localización de la actividad proteasas neutras (PrBcg)

Fracción	Actividad mU /mL	Proteína mg /mL	Actividad específica mU/mg de proteína
ELC SN 20,000 xg	2.2974	0.68	3.36
SN 100,000 xg	3.2682	1.82	1.7
PP 100,000 xg	1.9088	1.74	1.0

Resultados

Actividad de Aminopeptidasa (Lys-pNA)

La Tabla 7 muestra los resultados correspondientes a la producción de APE durante la estacionaria temprana de crecimiento, utilizando como sustrato cromogénico Lisina-p-nitroanilida.

Tabla 7. Localización de la actividad aminopeptidasa (APEcg)

Fracción	Actividad mU /mL	Proteína mg /mL	Actividad específica mU/mg de proteína
ELC SN 20,000 xg	1.22	0.68	1.7
SN 100,000 xg	1.47	1.82	0.80
PP 100,000 xg	0.19	1.74	0.1

Con lo anterior se sugiere que la actividad APE intracelular de *C. glabrata* se encuentra principalmente en la fracción soluble.

Actividad de Carboxipeptidasa (N-Benzoil-L-Tyr-pNA).

La actividad de carboxipeptidasa se determinó utilizando como sustrato cromogénico N-benzoil-L-tirosil-p-nitroanilida. Los resultados sugieren que esta actividad se encuentra principalmente en la fracción soluble. Con lo anterior podemos decir que la actividad de CPcg se localiza principalmente en la fracción soluble.

Resultados

Tabla 8. Localización de la actividad carboxipeptidasa (CPcg)

Fracción	Actividad mU /mL	Proteína mg /mL	Actividad específica mU/mg de proteína
ELC SN 20,000 x g	2.67	0.68	3.8
SN 100,000 x g	2.89	1.82	1.58
PP 100,000 x g	0.97	1.74	0.55

Actividad de Dipeptidilaminopeptidasa (DAP)

La Tabla 9 muestra los resultados correspondientes a la producción de actividad DAPcg como sustrato cromogénico Ala-pro-p-nitroanilida. La actividad DAP se encontró tanto en fracción soluble como membranal.

Tabla 9. Localización de la actividad dipeptidilaminopeptidasa (DAPcg)

Fracción	Actividad Total mU/mL	Proteína mg/mL	Actividad específica mU/mg de proteína
ELC SN 20,000 x g	1.71	0.68	2.5
SN 100,000 x g	4.08	1.82	2.24
PP 100,000 x g	2.92	1.74	1.6

4. Inhibición de actividades enzimáticas

Se probaron el efecto de 8 inhibidores de proteasas (descritos en Material y Métodos) en la fracción del SN 100,00 x *g* (soluble) para las actividades PrA, PrB, APE y CP y la fracción PP 100,000 x *g* para la actividad DAP ya que ésta se localiza probablemente en la fracción membranal.

En la Tabla 10 se muestran únicamente los inhibidores que inhibieron las actividades proteolíticas a la concentración que se indica. Se consideró como 100 % de actividad a las determinaciones enzimáticas determinadas en ausencia del inhibidor.

Resultados

Tabla10. Inhibición de las actividades proteolíticas de *C. glabrata*

Actividad específica *mU* /*mg* de proteína

Enzima	Inhibidor	Actividad Residual (%) / (Conc*)
PrAcg	Pepstatina A	10 / 2 mM
PrBcg	PMSF	12 / 5 mM
APEcg	EDTA,1-10	25 / 10 mM
	Fenantrolina	45 / 10 mM
	Bestatina	10 / 250 μ M
DAPcg	PMSF	14 / 5 mM
	Pefabloc	5 / 5 mM
CPcg	PMSF	3 / 1 mM

*Con=Concentración del inhibidor

Resultados

5. Aislamiento de vacuolas y determinación de las actividades proteolíticas

Para verificar que las actividades proteolíticas estudiadas en este trabajo se encuentran en vacuola, se desarrolló el protocolo, descrito en el capítulo de material y métodos, para la obtención de estos organelos. Se obtuvieron esferoplastos de *C. glabrata* por medio de un tratamiento con zimoliasa. En la Fig. 6 se observa la formación de esferoplastos a diferentes tiempos de tratamiento con zimoliasa, utilizando un microscopio óptico (Olympus CH30) con un aumento de 400X. A los 5 min se observa un 10 % de formación de esferoplastos y a los 20 min un 80 %.

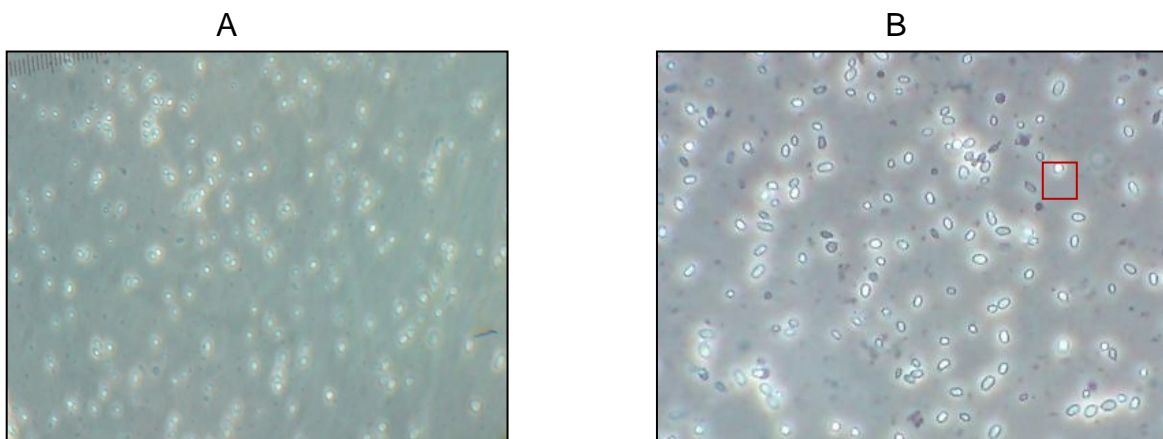


Fig. 6. Formación de esferoplastos de *C. glabrata* utilizando zimoliasa. El tratamiento se realizó a los tiempos de 5 min (A) y 20 min (B)

Los esferoplastos obtenidos (a los 20 min) se sometieron a rompimiento mecánico para liberar a las vacuolas y realizar un gradiente discontinuo de sacarosa, para obtener las membranas microsomaes de la levadura (Nathan y col., 1999).

En la Fig. 7 se puede observar el gradiente de sacarosa obtenido y la banda correspondiente a la fracción rica en vacuolas.

Resultados



Fig. 7. Gradiente discontinuo de sacarosa para la obtención de vacuolas de *C. glabrata*.

La obtención de las vacuolas se siguió por microscopia de contraste de fases en un microscopio Axiphot1 Zeiss y las imágenes fueron observadas en un aumento de 400X imagen que se muestra en la Fig 8.

Resultados



Fig. 8. Vacuolas de *C. glabrata* observadas por microscopia de contraste diferencial de interferencia (aumento 400X)

Para comprobar que las partículas obtenidas con el gradiente de sacarosa y observadas al microscopio correspondían a vacuolas, se determinó la actividad de carboxipeptidasa (debido a que esta enzima es el marcador vacuolar por excelencia). Las vacuolas fueron sometidas a procesos de congelación y descongelación (como se describe en la sección de material y métodos), se verificó al microscopio de contraste de fases el rompimiento y se determinaron las actividades proteolíticas. En la Tabla 11 se muestran los resultados obtenidos. La actividad de carboxipeptidasa aumenta su actividad específica 60 veces, lo que nos indica que se obtuvieron vacuolas de *C. glabrata* con este protocolo.

Resultados

Tabla 11. Actividad enzimática de proteasas en extracto enriquecido de vacuolas de *C. glabrata*

Enzima	Fracción	Actividad total mU/mL	Proteína mg/mL	Actividad específica	Número de veces purificada
PrAcg	ELC	0.4	0.68	0.6	1
	Vacuola	1.6	1.78	5.7	9.5
Apelcg	ELC	1.28	0.68	1.8	1
	Vacuola	10.2	1.78	5.7	3.2
ApeYcg	ELC	1.22	0.68	1.7	1
	Vacuola	28.5	1.78	16.01	9.4
CPcg	ELC	2.67	0.68	3.8	1
	Vacuola	409	1.78	229.77	60.46

5. Análisis de la expresión de genes codificantes de proteasas vacuolares

a) Diseño de iniciadores para la amplificación de los genes

Se diseñaron los iniciadores para la amplificación de los genes codificantes de las proteasas vacuolares de *C. glabrata*, mismos que se muestran en la Tabla 12.

Resultados

Tabla 12. Iniciadores para la amplificación de genes codificantes de proteasas vacuolares de *C. glabrata*

Gen	Secuencia	Amplificado (pb)
<i>PEP4cg</i> RT-PCR	SENT 5' -TATCTGAAGAGTGTCAATGACCCAGC-3' ANTI-SEN 5' -TACAGCCTCAGCTAAACTGACAACATTGG-3'	545
<i>PEP4cg</i> <i>Completo</i>	SENT 5' AAAAGAATTCATGAGACTATCACTAAGTGTATTAATGCC3 ANTI-SENT 5' AAAAAGCGGCCGCAGCAGAGTGTACAGCCTCAGC 3'	1248
<i>PRB1cg</i>	SENT 5' -AAGAAGGCGTCTCTCCGGAGG-3' ANTI-SEN 5' -CGTAGTGTTTGGGAAGCGATGGTACC-3'	541
<i>PRB2cg</i>	SENT 5' -TGATATTTCAACCAGAGGGATTGGCC-3' ANTI-SEN 5' -ACTTCTGCCTGCTTAGCAATGCC-3'	449
<i>PRB3cg</i>	SENT 5' -AAGAATGGAGTTCTCGGTGCAGTCGTCC-3' ANTI-SEN 5' -GCAGTGGGTACTATCTCACTACCATCG-3'	569
<i>LAP4cg</i>	SENT 5' -AACACATACCACGTCATTGAGTTC-3' ANTI-SEN 5' -ATCATCAATGTCACAGCACCATCC-3'	522
<i>APE3cg</i>	SENT 5' -GACCTGTCCGCTCTGAAGGAGAC-3' ANTI-SEN 5' -AGCGGCGAAGTCCTTCTCGTG-3'	575
<i>CPScg</i>	SENT 5' -CGTCAAGACGGAAGTTCTGGGGC-3' ANTI-SEN 5' -CTTACAATCATTGAGCCTCTGCCCC-3'	518
<i>CPCcg</i>	SENT 5' -GGGGCATTACCAGCTACTCG-3' ANTI-SEN 5' -TGCTGGATCCTCCTCTTTATGATACC-3'	584
<i>PRC1cg</i>	SENT 5' -ATGACCCTGTCATCCTATGGTTGAACGG-3' ANTI-SEN 5' -ACTGGGTCAGCACCACTTCCTCACC-3'	532
<i>DAP2cg</i>	SENT 5' -CCTGAACGGATCAGAGATGATGCC-3' ANTI-SEN 5' -GGCAACATCCACTGAGTTTGGCG-3'	587
18S rDNA	SENT 5' -CAATTGGAGGGCAAGTCTGG-3' ANTI-SEN 5' -TAAGAACGGCCATGCACCAC-3'	743

Resultados

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 *C. glabrata* CBS138. La mezcla de reacción se describe en la Tabla 13 y las condiciones en la Tabla 14.

Tabla 13. Mezcla de reacción para la amplificación de los genes vacuolares de *C. glabrata*

Reactivo	Concentración del reactivo	Concentración en la reacción	Volumen de reacción (µl)
H ₂ O			16.2
Regulador de PCR	10 X	1 X	2.5
dNTP's	10 mM	0.2 mM	0.5
MgCl ₂	50 mM	2 mM	1.0
Iniciadores D y R	10 mM	0.6 mM	1.5 c/u
<i>Taq</i> polimerasa	5 U/µl	1.5 U/µl	0.3
DNA	50.0 ng/µl	75.0 ng/µl	1.5
Volumen final			25

Resultados

Tabla 14. Condiciones estandarizadas para la amplificación de los genes vacuolares de *C. glabrata*

Proceso	Temperatura (°C)	Tiempo (min)
Desnaturalización inicial	94	3:00
Desnaturalización	94	1:0
*Alineamiento	57,60,61,63,64 y 65	1:30
Extensión	72	1:30
Extensión final	72	7

b) Expresión de los genes codificantes de proteasas vacuolares de *C. glabrata*

Se ha observado que la mayoría de los genes codificantes de proteasas en levaduras están regulados por las fuentes de nitrógeno y por las condiciones de estrés.

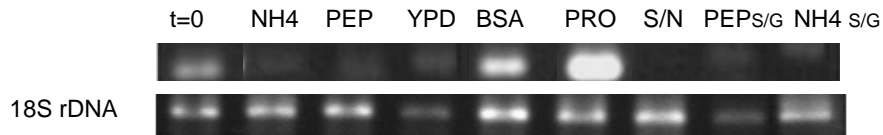
Se estudió la expresión de los genes del sistema proteolítico vacuolar de *C. glabrata* en fase estacionaria temprana de crecimiento. Las células procedentes de medio YPD se lavaron como se describe en la sección de material y métodos y fueron sometidas durante 6 h a diferentes condiciones fisiológicas: diferentes fuentes de nitrógeno, inanición por fuente de **N** e inanición por fuente de **C**.

A continuación se muestran los resultados obtenidos de la expresión de los genes putativos codificantes de proteasas vacuolares de *C. glabrata*.

Resultados

El gen *PEP4cg* sólo aumentó su expresión en prolina, como su aumento no fue el doble no se puede considerar sobreexpresión, sin embargo se puede observar la inducción en esta condición. En el resto de las condiciones se observa represión.

A)



B)

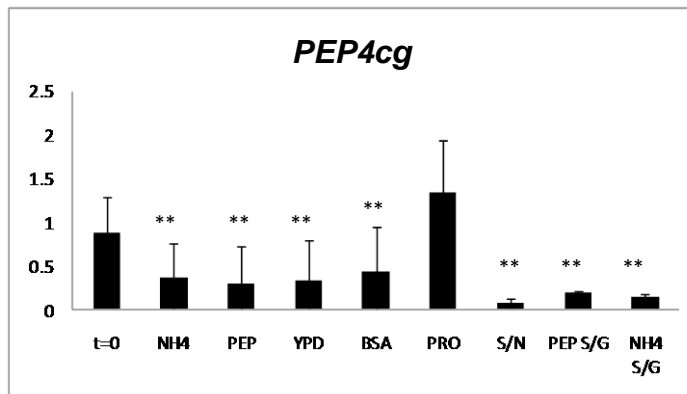


Fig. 9. Expresión del gene *PEP4cg* de *C. glabrata* determinado por RT-PCR semicuantitativo. A) Se muestra el gel más representativo del efecto biológico observado. B) Expresión del gen representada en unidades de intensidad relativa en las condiciones de estudio, la barra muestra SD. (*) Sobreexpresión, aumento de la expresión 2X o más con respecto al t = 0. (**) Represión, disminución de la expresión 2X o menos con respecto al t = 0.

Resultados

El gen *PRB1cg* no mostró aumento de la expresión en ninguna de las condiciones probadas, inclusive la ausencia de glucosa en presencia de peptona reprime la expresión del gen.

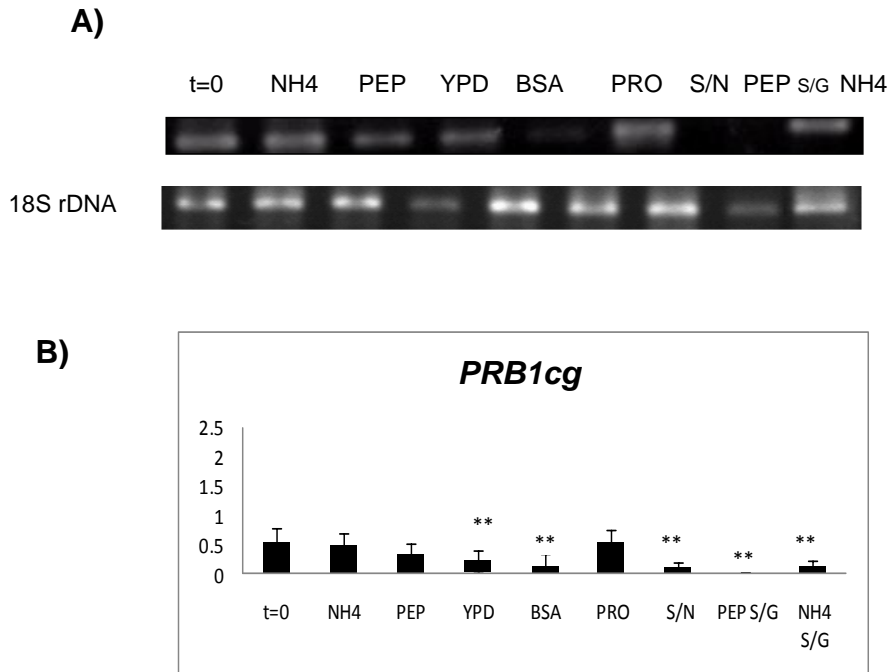


Fig.10 Expresión del gene *PRB1cg* de *C. glabrata* determinado por RT-PCR semicuantitativo. A) Se muestra el gel más representativo del efecto biológico observado. B) Expresión del gen representada en unidades de intensidad relativa en las condiciones de estudio, la barra muestra SD. (*) Sobreexpresión, aumento de la expresión 2X o más con respecto al t = 0. (**) Represión, disminución de la expresión 2X o menos con respecto al t =0.

Resultados

El gen *PRB2cg* presentó inducción en los medios con: amonio, peptona, albúmina, prolina y sin fuente de nitrógeno, así como represión en los medios de YPD y en condiciones de estrés por ausencia de carbono.

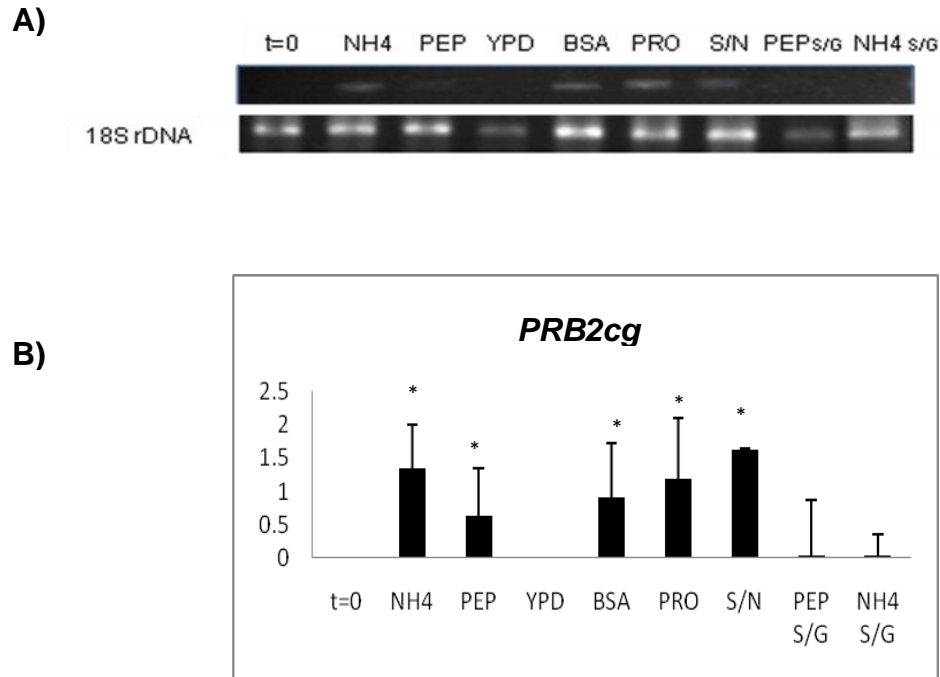


Fig. 11. Expresión del gene *PRB2cg* de *C. glabrata* determinado por RT-PCR semicuantitativo. A) Se muestra el gel más representativo del efecto biológico observado. B) Expresión del gen representada en unidades de intensidad relativa en las condiciones de estudio, la barra muestra SD. (*) Sobreexpresión, aumento de la expresión 2X o más con respecto al t = 0. (**) Represión, disminución de la expresión 2X o menos con respecto al t = 0.

Resultados

El gen *PRB3cg* mantiene su expresión prácticamente en todas las condiciones, sin embargo se reprime en estrés por ausencia de nitrógeno y por ausencia de carbono cuando el amonio es su fuente de nitrógeno.

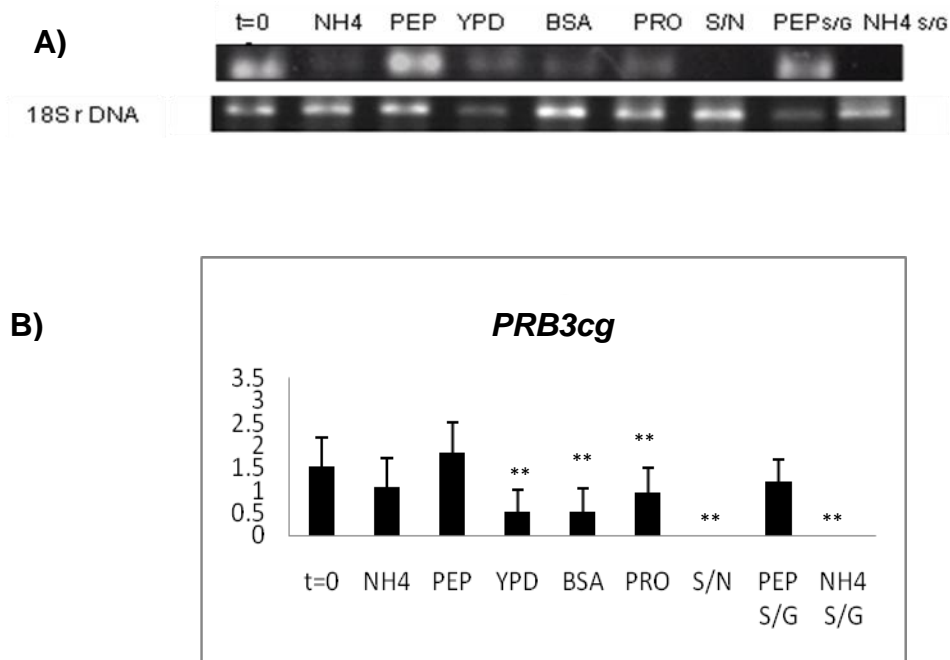


Fig. 12. Expresión del gen *PRB3cg* de *C. glabrata* determinado por RT-PCR semicuantitativo. A) Se muestra el gel más representativo del efecto biológico observado. B) Expresión del gen representada en unidades de intensidad relativa en las condiciones de estudio, la barra muestra SD. (*) Sobreexpresión, aumento de la expresión 2X o más con respecto al t = 0. (**) Represión, disminución de la expresión 2X o menos con respecto al t = 0.

Resultados

El gen *LAP4cg* induce su expresión en medios con: amonio, peptona, prolina y en los medios con peptona y amonio carentes de glucosa. Se mantiene reprimido en los medios de YPD, albúmina y sin fuente de nitrógeno.

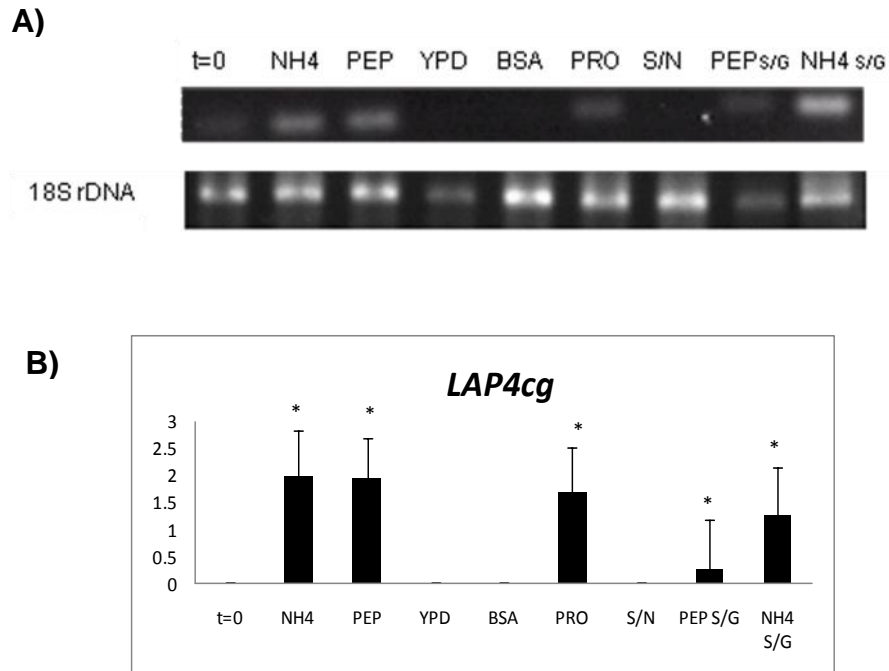


Fig. 13. Expresión del gene *LAP4cg* de *C. glabrata* determinado por RT-PCR semicuantitativo. A) Se muestra el gel más representativo del efecto biológico observado. B) Expresión del gen representada en unidades de intensidad relativa en las condiciones de estudio, la barra muestra SD. (*) Sobreexpresión, aumento de la expresión 2X o más con respecto al t = 0. (**) Represión, disminución de la expresión 2X o menos con respecto al t = 0.

Resultados

El gen *APE3cg* aumenta su expresión en medios con: amonio y peptona, se mantiene en prolina y sobreexpresa en los medios con peptona y amonio carentes de glucosa. Se mantiene reprimido en los medios de YPD, albúmina y sin fuente de nitrógeno.

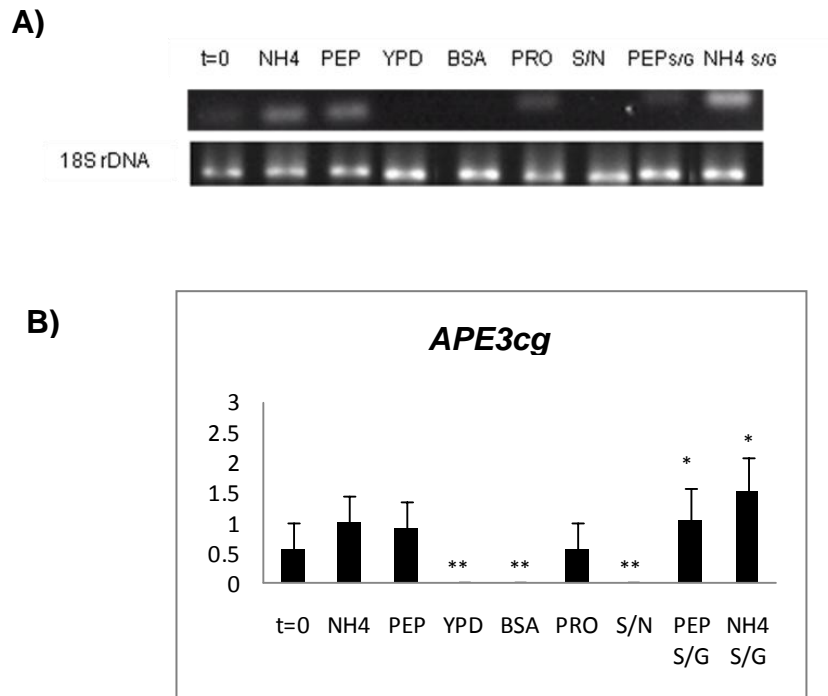


Fig. 14. Expresión del gene *APE3cg* de *C. glabrata* determinado por RT-PCR semicuantitativo. A) Se muestra el gel más representativo del efecto biológico observado. B) Expresión del gen representada en unidades de intensidad relativa en las condiciones de estudio, la barra muestra SD. (*) Sobreexpresión, aumento de la expresión 2X o más con respecto al t = 0. (**) Represión, disminución de la expresión 2X o menos con respecto al t = 0.

Resultados

El gen *CPSCcg* no se expresó en ninguna de las condiciones probadas en este trabajo.

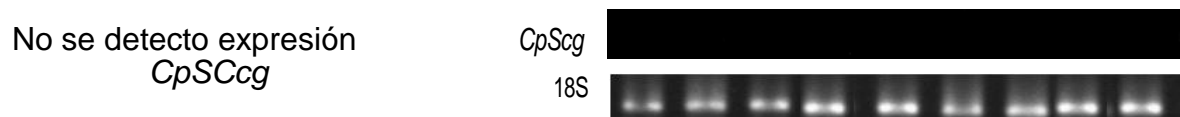
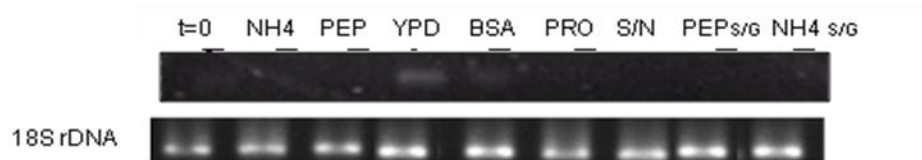


Fig. 15. Expresión del gene *CpSCcg* de *C. glabrata* determinado por RT-PCR semicuantitativo. A) Se muestra el gel más representativo del efecto biológico observado. B) Expresión del gen representada en unidades de intensidad relativa en las condiciones de estudio, la barra muestra SD. (*) Sobreexpresión, aumento de la expresión 2X o más con respecto al t = 0. (**) Represión, disminución de la expresión 2X o menos con respecto al t = 0.

Resultados

El gen *PrC1cg* presenta inducción en su expresión en medios con: YPD y albúmina, mientras que en el resto de los medios no hubo expresión.

A)



B)

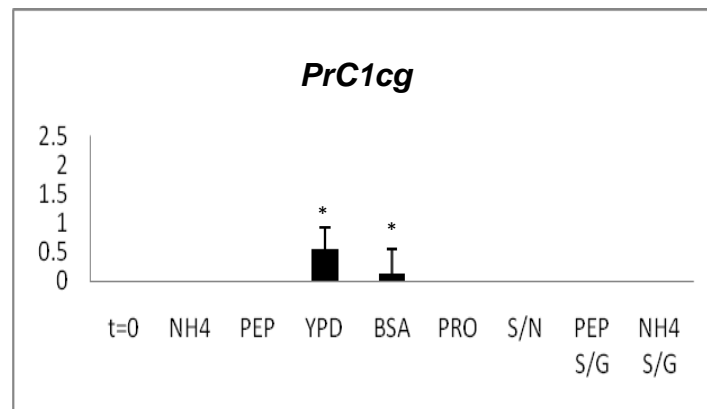


Fig. 16. Expresión del gene *PrC1cg* de *C. glabrata* determinado por RT-PCR semicuantitativo. A) Se muestra el gel más representativo del efecto biológico observado. B) Expresión del gen representada en unidades de intensidad relativa en las condiciones de estudio, la barra muestra SD. (*) Sobreexpresión, aumento de la expresión 2X o más con respecto al t = 0. (**) Represión, disminución de la expresión 2X o menos con respecto al t = 0.

Resultados

El gen *DAP2cg* no se expresó en ninguna de las condiciones probadas en este trabajo.

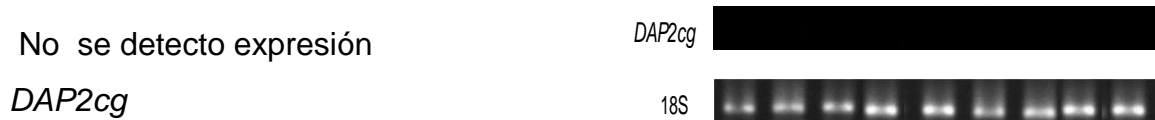


Fig. 17. Expresión del gene *DAP2cg* de *C. glabrata* determinado por RT-PCR semicuantitativo. A) Se muestra el gel más representativo del efecto biológico observado. B) Expresión del gen representada en unidades de intensidad relativa en las condiciones de estudio, la barra muestra SD. (*) Sobreexpresión, aumento de la expresión 2X o más con respecto al t = 0. (**) Represión, disminución de la expresión 2X o menos con respecto al t = 0.

6. Expresión heteróloga del gen *PEP4cg*

Como ya se describió anteriormente, la PrA codificada por el gen *PEP4* de *S. cerevisiae* juega un papel importante en la maduración de otras proteínas vacuolares y en el metabolismo nitrogenado durante condiciones de estrés por fuente de nitrógeno. Por este motivo se decidió obtener una construcción genética que permita la expresión heteróloga del gen *PEP4cg* en el sistema de *P. pastoris*. Dicha construcción permitirá la expresión y caracterización bioquímica de la proteína recombinante.

a) Diseño de iniciadores y amplificación del gen *PEP4cg*

Resultados

Se diseñaron los iniciadores para amplificar el gen completo y se les agregaron sitios de restricción en el extremo 5' para restringir el amplificado y poder clonarlo en el vector pPICZ α A del sistema de expresión de *P. pastoris*. Los iniciadores y sus características se muestran en la Tabla 12

Se estandarizaron las condiciones de PCR de cada uno de los iniciadores diseñados de manera independiente, empleando el DNA obtenido de la cepa tipo de CBS138. Se utilizó la mezcla de reacción descrita en la Tabla 13, las condiciones de PCR se describen en la Tabla 15.

Tabla 15. Condiciones estandarizadas para la amplificación del gen *PEP4cg*

Proceso	Temperatura (°C)	Tiempo (min)
Desnaturalización	94°C	1:0
*Alineamiento	69C	1:30
Extensión	72°C	1:30
Extensión final	72°C	7

Con las condiciones descritas en la Tabla 15, se amplificó el gen *PEP4cg* utilizando el DNA de la cepa tipo (CBS138) y de un aislado clínico (CGL126) de *C.*

Resultados

glabrata y como testigo negativo el DNA de *C. albicans* (ATCC10231). El amplificado esperado de 1248 pb se puede observar en Fig. 18

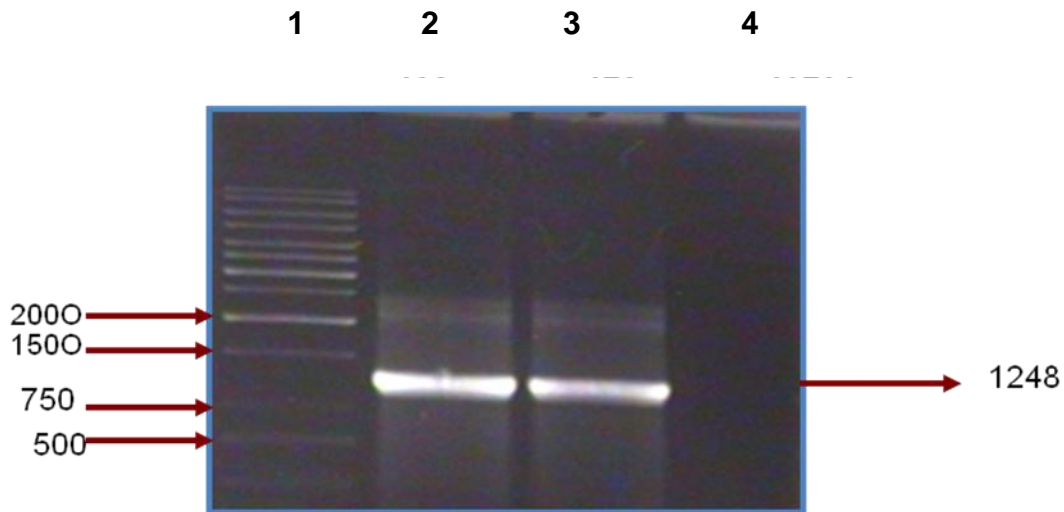


Fig. 18. Amplificado del gen *PEP4cg* a partir de DNA genómico. 1) M (Marcador de talla molecular de 1 kb), Utilizando como molde DNA genómico de: 2) *C. glabrata* CBS138, 3) *C. glabrata* CGL 127(aislado clínico), 4) *C. albicans* ATCC 10231 (testigo negativo).

b) Clonación del gen *PEP4cg* en el vector pCR®2.1 TOPO

El amplificado obtenido de 1248pb (Fig. 18) se purificó para realizar su clonación en el vector pCR®2.1 TOPO, se procedió a la reacción de ligación y transformación para dar lugar a colonias transformantes, seleccionado por el marcador de resistencia a ampicilina y colonias blancas, de las cuales se picaron al menos 30 clonas.

Para comprobar la inserción del fragmento se realizó la extracción de plásmidos por el método descrito por (Sambrook y Russell, 2001), se digirió con la enzima *EcoRI*

Resultados

y por medio de una electroforesis en gel de agarosa se observaron las 2 bandas correspondientes: 4000 pb aproximadamente correspondiente al vector pCR®2.1-TOPO y una más de 1248 pb correspondiente al inserto. La construcción obtenida se denominó *PEP4cg*-TOPO.

c) Secuenciación de *PEP4cg*

A partir de la construcción anterior se amplificó el gen *PEP4cg* utilizando los iniciadores M13 “forward” y M13 “reverse” que flanquean el sitio de clonación múltiple del vector pCR®2.1-TOPO, el amplificado obtenido con estos iniciadores se muestra en la Fig. 19.

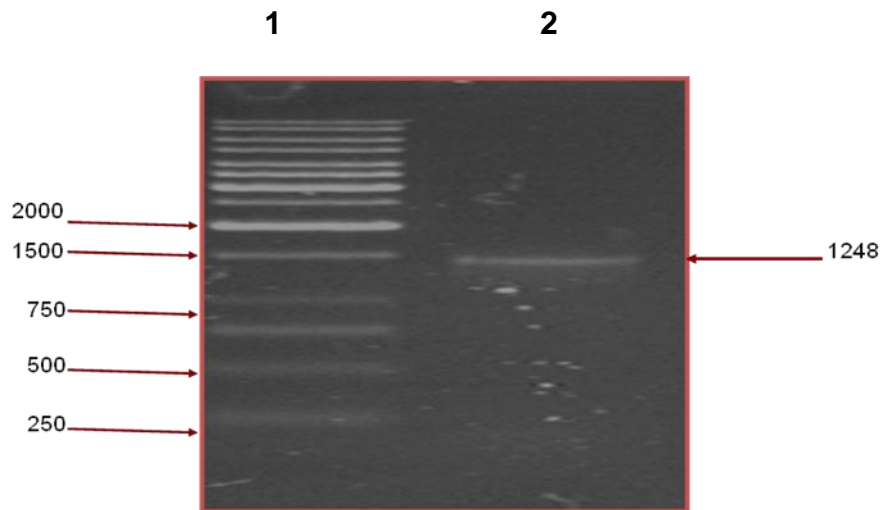


Fig.19. Amplificado del gen *PEP4cg* a partir de la construcción *PEP4cg*-TOPO. 1) M (Marcador de talla molecular de 1 kb), 2) Amplificado del gen *PEP4cg*.

El amplificado se purificó a partir de agarosa utilizando el Kit QIAEX II, Gel Extraction (QIAGEN, USA) y se secuenció en el secuenciador AB PRISM del Instituto

Resultados

de Biología de la UNAM. Las secuencias fueron visualizadas y editadas con los programas BioEdit (Hall, 1999) y “Seaview” (Galtier y col., 1996) respectivamente

d) Análisis de las secuencias

Cada una de las secuencias obtenidas se sometió a una búsqueda de secuencias similares en la base de datos del “GenBank” por medio del programa en línea: BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>). La secuencia aminoacídica fue deducida a partir de las secuencias nucleotídicas con ayuda del programa DNAMAN versión V.3.0 (BioSoft, 1994-1997). Posteriormente se realizó un análisis blastp y se seleccionaron las secuencias que nos permitieron reflejar las posibles relaciones de las proteínas *PEP4cg* reportados con las secuencias traducidas. Las secuencias tenían un grado de similitud de 96.9 % lo que nos permitió comprobar que el inserto correspondía a fragmento esperado.

7. Clonación en el vector pPICZ α .

Para la clonación del gen *PEP4cg* en el vector pPICZ α , la construcción Topo*PEP4cg* obtenida en la sección anterior y el vector se sometieron a restricción con las enzimas *EcoR1* y *NotI*. En la Fig. 20 se observan los patrones de restricción obtenidos de la digestión enzimática.

Resultados

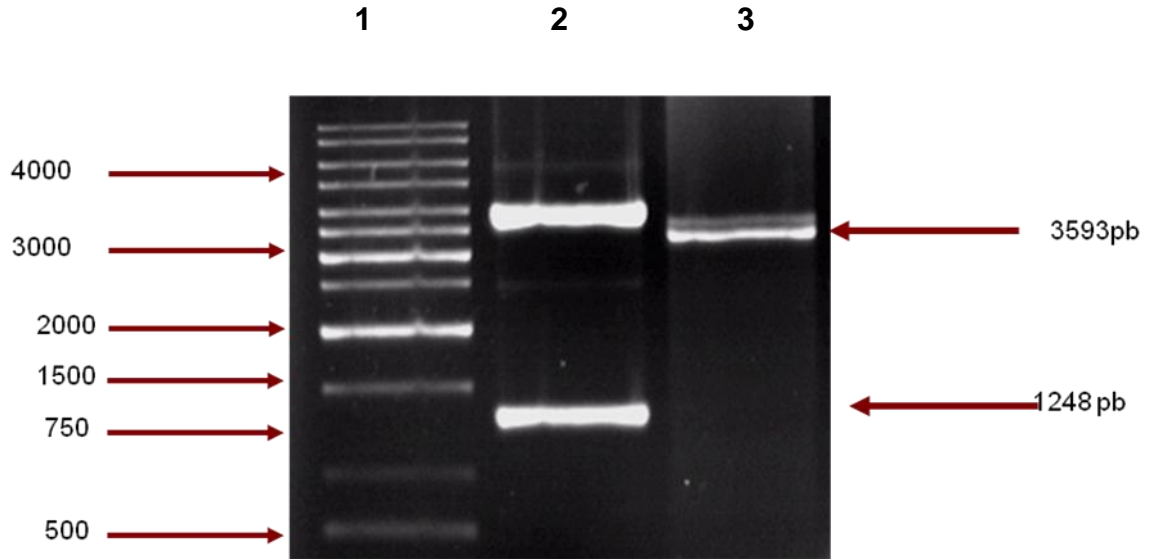


Fig. 20. Análisis de restricción de la construcción *PEP4cg*-TOPO . 1) M (marcador de talla molecular de 1 kb), 2) Construcción *PEP4cg*-TOPO digerida con las enzimas *EcoR1* y *NotI*, 3) Vector pPICZ α A digerido con las enzimas *EcoR1* y *NotI*.

El inserto de 1248 pb se purificó y se realizó la ligación con en el vector pPICZ α A digerido con las dos enzimas. Se transformó *E. coli* DH10b. No se pudieron obtener clonas con la construcción deseada. En la sección de prospectivas se describe la nueva estrategia de clonación.

Discusión

Los microorganismos son capaces de sobrevivir a cambios repentinos en el medio ambiente y desarrollar mecanismos de adaptación al entorno. La proteólisis es uno de los fenómenos más importantes dentro del metabolismo celular y juega un papel esencial en la respuesta a las condiciones de estrés, dando como resultado una completa reorganización del metabolismo celular (Erickson y col., 1984).

Así por ejemplo, el proceso de esporulación de la levadura *S. cerevisiae* se lleva a cabo en condiciones de estrés nutricional, en este caso se ha demostrado que la actividad de las enzimas proteolíticas se incrementa considerablemente, principalmente las de localización vacuolar (Hilt y Wolf, 1992).

Por otro lado, se ha descrito a la vacuola de *S. cerevisiae* como un organelo importante que participa en numerosos procesos celulares: degradación y almacenamiento de macromoléculas, regulación del pH, osmoregulación, almacenamiento de aminoácidos, ácidos carboxílicos, carbohidratos y algunas vitaminas, etc. (Sarry y col., 2007). Sin embargo el papel que este organelo pudiera tener en organismos patógenos como *C. glabrata* aún se desconoce.

Candida glabrata es un hongo patógeno oportunista que normalmente se encuentra como comensal en las mucosas de individuos sanos, pero puede invadir tejidos más profundos y causar enfermedades graves en individuos inmunocomprometidos (Castaño y col., 2006). Se ha demostrado además, que *C. glabrata* puede ser fagocitada por macrófagos y replicarse dentro de éstos, característica que se atribuye a *C. albicans* por su capacidad de formar micelio y que está ausente en *S. cerevisiae* (Kaur y col., 2007). Por lo tanto, *C. glabrata*

Discusión

debe de presentar diferentes estrategias que le permitan sobrevivir y adaptarse a las diferentes condiciones fisiológicas que se presentan durante su ciclo de vida.

Por lo tanto, es importante entender a nivel bioquímico y molecular cuáles son los mecanismos que le permiten a *C. glabrata* sobrevivir en diferentes ambientes y ser un patógeno exitoso, con el fin de diseñar mejores estrategias para el tratamiento de estas infecciones.

En este estudio se identificaron en el genoma de *C. glabrata* genes putativos homólogos a los de *S. cerevisiae* codificantes de proteasas vacuolares: el gen *PEP4cg* (codificante para una proteasa ácida PrAcg), *PRB1cg*, *PRB2cg*, *PRB3cg* (proteasas neutras PrB1cg, PrB2cg y PrB3cg), *LAP4cg* y *APE3cg* (aminopeptidasas Apelcg y ApeYcg), *PRC1cg* y *CPScg* (carboxipeptidasas CpYcg y CpScg) y *DAP2cg* (dipeptidil aminopeptidasa DapBcg).

Mediante el análisis *in silico* fue posible determinar algunas características de cada una de las proteínas mencionadas, deducidas de la secuencia nucleotídica. De las 13 proteasas ácidas detectadas, sólo una de ellas es de localización vacuolar, a la cual hemos denominado (PrAcg). PrAcg está compuesta por 416 aminoácidos, un peso molecular teórico de 45.4 kDa y un pI de 4.6, valores muy parecidos a los reportados en PrA de *S. cerevisiae* con un peso molecular de 44.5 kDa y un punto isoeléctrico de 4.7 (Sarry y col., 2007).

En *S. cerevisiae* se sabe que PrA es capaz de responder a favor de la célula frente a estrés nutricional ya que PrA es capaz de mantener la viabilidad de la célula en condiciones de inanición y durante el estrés nutricional se encarga de la proteólisis masiva de los distintos componentes proteicos de la célula (Rupp y

Discusión

Wolf, 1995). PrA es codificada por el gen *PEP4* y es una aspartil proteasa que se encarga de una cascada de reacciones que derivan en la activación de muchas hidrolasas vacuolares, incluida la proteinasa B y la carboxipeptidasa Y (Jones, 1991). Para la activación de las preproenzimas vacuolares, PrA sufre un auto procesamiento que se realiza gracias a señales propias de la célula como son cambios de presión, pH y nutrientes (Hemmings y col. 1981). De esta manera la célula evita la concentración de proteínas inmaduras y el acúmulo incontrolado de estos precursores. Existen reportes que sugieren que la ausencia de PrA podría incluso, derivar en la muerte celular en condiciones de inanición por fuente de nitrógeno (Stevens y col., 1982) y se ha observado que disminuye la capacidad hidrolítica de la vacuola (Palmer y col., 2007) debido al acúmulo de pre-proteínas inactivas en la vacuola (Rupp y Wolf 1995.). Se han obtenido mutantes deficientes en *Pep4* de *C. albicans*, sin embargo no se observó un fenotipo claro, ya que la capacidad hidrolítica de la vacuola no se vió afectada, lo que sugiere que el sistema proteolítico vacuolar de *C. albicans* es muy diferente al de *S. cerevisiae* y probablemente la primera, posee un sistema proteolítico alternativo compensatorio de la deficiencia de *Pep4* (Palmer, 2007). Al respecto, en nuestro grupo se está trabajando con la obtención de una mutante en el gen *PEP4cg* para su posterior caracterización fenotípica y molecular (Comunicación personal, Tesis de maestría, Cervantes-Manzanilla Mariela).

Las determinaciones de la actividad bioquímica de la proteasa ácida en diferentes fracciones celulares de *C. glabrata* demostraron que ésta se encuentra principalmente en la fracción soluble y que se trata de una aspartil proteasa ya que

Discusión

fue inhibida por pestatina, lo que coincide con las características de la PrA de *S. cerevisiae*. Muy probablemente esta actividad se encuentre en vacuola ya que su actividad específica aumentó en las vacuolas aisladas con respecto a la actividad detectada en la fracción correspondiente al ELC. La expresión del gen *PEP4cg* aumentó con respecto al tiempo cero en el medio con prolina, fuente de nitrógeno considerada como de difícil asimilación (Magazanik and Kaiser, 2002). Por otro lado, la expresión de *PEP4cg* se vio reprimida en condiciones de estrés nutricional: ausencia de fuente de nitrógeno y de carbono lo que podría indicar que se necesitan estas fuentes para la síntesis de esta proteasa. Por el contrario, la expresión en medios con amonio, peptona y albúmina como fuentes de nitrógeno indicaría que se necesita la enzima PrAcg cuando la levadura crece en estas condiciones de fuentes de nitrógeno convencionales.

Con respecto a los genes codificantes de proteasas neutras vacuolares, a diferencia de lo que sucede en *S. cerevisiae* quien presenta un sólo gen, en el genoma de *C. glabrata* se encontraron tres genes codificantes de estas proteínas: PrB1cg, PrB2cg y PrB3cg. Dichas proteínas presentaron un pI de 5.7, 4.9 y 6.1 respectivamente, con una masa molecular de 50.0, 53.4 y 63.5 kDa, todas ellas pertenecen a la familia de las serín proteasas. Se conoce la presencia de este gen en otros hongos fitopatógenos como *U. maydis*, con una longitud de 1620 pb, la proteína codificada en el gen *prb1* tiene 539 aminoácidos, con una masa molecular de 56.58 kDa, en su forma zimógena; su pI es 5.5, estas características coinciden con las reportadas en *S. cerevisiae* (Miramón 2005.). En *S. cerevisiae*

Discusión

se ha descrito la presencia de sólo una proteína PrB1 cuyo peso molecular de la proteína completa es de 66 kDa y de la proteína madura es de 33 kDa. El papel de esta proteína en *S. cerevisiae* parece estar asociado con procesamientos postraduccionales de otras proteínas vacuolares como la proteína PrA y CPY e incluso es capaz de autoprocesarse a nivel de retículo endoplásmico, así mismo, se ha observado que es importante en el proceso de esporulación (Suárez-Rendueles y Wolf 1988). En este trabajo se detectó una actividad de proteasa neutra principalmente en la fracción soluble (SN 100,000 x g), este dato sugiere que la(s) proteína(s) neutra(s) podrían ser de localización vacuolar. La inhibición con PMSF sugiere que se trata de una serín proteasa. Además, en *S. cerevisiae* se ha propuesto que PrB1 está involucrada con el reclutamiento de fuentes de nitrógeno internas (Zubenko y Jones 1981), ya que mutantes en *PRB1* han mostrado una disminución importante en la capacidad hidrolítica (Jones y col.,1981). Debido a las evidencias detectadas sobre el papel que juega esta proteasa en el metabolismo de *S. cerevisiae*, se decidió analizar la expresión de los genes codificantes de las proteínas PrB de *C. glabrata*. Se observó que los genes *PRB1cg*, *PRB2cg* y *PRB3cg* están regulados por la fuente de nitrógeno de manera diferencial. El gen *PRB1cg* no mostró aumento de la expresión en ninguna de las condiciones probadas, inclusive la ausencia de glucosa en presencia de peptona reprime la expresión del gen. El gen *PRB2cg* presentó inducción en los medios con: amonio, peptona, albúmina, prolina y sin fuente de nitrógeno, así como represión en los medios de YPD y en condiciones de estrés por ausencia de carbono. Cabe mencionar que el gen *PRB2* es el único gen, de

Discusión

los estudiados en este trabajo, que presentó sobreexpresión en condiciones de estrés por ausencia de una fuente de nitrógeno, por lo que sería interesante evaluar su participación en el recambio proteico de proteínas. El gen *PRB3cg* mantiene su expresión prácticamente en todas las condiciones, sin embargo se reprime en estrés por ausencia de nitrógeno y por ausencia de carbono cuando el amonio es su fuente de nitrógeno. Debido a que este último gen sí se expresa en medio YPD, es muy probable que la actividad bioquímica detectada en este medio se deba a la PrB3cg. Los análisis de sintenia del gen correspondiente nos podrán indicar si este gen es el homólogo a gen *PBR1* de *S. cerevisiae*.

Por otro lado mediante este mismo análisis se detectó la presencia de dos aminopeptidasas posiblemente de localización vacuolar en *C. glabrata*: *Apelcg* y *ApeYcg* (codificadas por *LAP4cg* y *APE3cg*, respectivamente). *Apelcg* es una proteína dependiente de Zinc conformada por 510 aminoácidos con un peso molecular de 57.0 kDa y un pI de 6.0. La *Apel* de *S. cerevisiae* está compuesta de 414 con un peso molecular 57.0 kDa, un pI de 5.5, la proteína madura pesa 44.8 kDa lo que comprueba que esta proteína sufre un procesamiento postraduccional (Cueva y col., 1989). Hasta el momento se desconoce el papel que desempeña esta enzima en el metabolismo celular de *S. cerevisiae*, únicamente se ha asociado a procesos de autofagia y en condiciones óptimas de crecimiento, esta proteína sigue la ruta Cvt (Abeliovich y Klyonsky, 2001). Recientemente se ha propuesto al fenómeno de la autofagia como un posible blanco terapéutico, sin embargo sólo se ha estudiado en parásitos *Schistosoma mansoni* y *Leishmania donovani*, así como en el hongo fitopatógeno del arroz *Magnaporthe grisea*

Discusión

(Palmer, 2007). La actividad de *ApeIcg* se encuentra probablemente en vacuola ya que la actividad específica aumentó en la fracción enriquecida de este organelo (substrato Leu-pNA). El gen *LAP4cg* induce su expresión en medios con: amonio, peptona, prolina y en los medios con peptona y amonio carentes de glucosa. Se mantiene reprimido en los medios de YPD, albúmina y sin fuente de nitrógeno. La proteasa *ApeIcg* podría ser un modelo de estudio de la formación de autofagosomas y ruta Cvt en *C. glabrata*.

La aminopeptidasa *ApeYcg* es una proteína compuesta por 564 aminoácidos con un peso molecular de 62.2 KDa y un pI de 5.4, características distintas a las que presenta este gen en *S. cerevisiae* ya que el peso molecular de la proteína es de 75 KDa. Esta proteína también se ha detectado en otro tipo de hongos como *Ustilago maydis* (un hongo fitopatógeno), su localización es probablemente vacuolar, en la fracción soluble (Mercado y col., 2004). La actividad aminopeptidásica Y (substrato Lys-pNA) se detectó principalmente en la fracción soluble (SN 100,000 x g), así como un aumento de actividad en la fracción vacuolar sugiere su localización. Los experimentos de inhibición sugieren que se trata de una metaloproteasa. La *ApeYcg* podría participar en el recambio proteico de proteínas o en la maduración de péptidos. El gen *APE3cg* aumenta su expresión en medios con: amonio y peptona, se mantiene en prolina y sobreexpresa en los medios con peptona y amonio carentes de glucosa. Se mantiene reprimido en los medios de YPD, albúmina y sin fuente de nitrógeno. Este gen podría ser un modelo de estudio para ver el efecto que tienen las fuentes de carbono en la expresión de genes codificantes de proteasas vacuolares ya que en este caso la

Discusión

glucosa ejerce probablemente de una manera indirecta una regulación negativa ya que en su ausencia, aumentan los niveles de expresión.

En cuanto a los genes codificantes de carboxipeptidasas vacuolares, se detectaron dos: *CPScg* y *CPYcg*, codificantes de las proteasas *CpScg* y *CpYcg*. Ambas proteínas comparten algunas características bioquímicas con las descritas en *S. cerevisiae*.

Con respecto a la *CpScg*, está compuesta por 581 aminoácidos con un peso molecular de 65.0 kDa y un punto isoeléctrico de 4.9, en *S. cerevisiae* esta proteína contiene 532 a.a con una masa molecular de 59.8 kDa y pl de 4.56, estas características nos podrían dar una idea de la alta similitud funcional que podría existir entre ambas proteínas. Sin embargo, en *S. cerevisiae* su función es totalmente desconocida, únicamente se ha descrito su ruta de maduración y que es más activa en pH ácidos (Wolf y Schäfer, 2005; Gabriely y col., 2007). En cuanto a su expresión, no se detectó transcrito del gen *CPScg* en ninguna de las condiciones estudiadas. Se ha descrito que la *CPScg* de *S. cerevisiae* participa en el recambio proteico y en el metabolismo nitrogenado en general (Suárez-Rendueles y Wolf, 1988).

La carboxipeptidasa *CpYcg* es una proteína de 509 aminoácidos con un peso molecular de 57 kDa y un pl de 5.2, mientras que esta proteína en *S. cerevisiae* está compuesta de 498 a.a con un peso molecular de 52 kDa y pl de 4.9. Hasta el momento la presencia de esta proteína en organismos como *S. cerevisiae* se ha considerado como un marcador vacuolar por excelencia (Sarry y col., 2007). En *S. cerevisiae*, esta proteasa participa en la esporulación, metabolismo nitrogenado

Discusión

y recambio proteico (Suárez-Rendueles y Wolf, 1988; Jones, 1991). La actividad Cp de *C. glabrata* se detectó principalmente en la fracción soluble, se comportó como una serín proteasa y su localización fue evidentemente vacuolar, ya que su actividad específica en vacuolas aumentó 60 veces con respecto a la fracción del ELC. En este sentido, a partir de los resultados de este trabajo, podemos proponer a la CpYcg como un marcador vacuolar en esta especie. El gen PrC1 (codificante de la carboxipeptidasa CpYcg) presentó inducción de su expresión en medios con: YPD y albúmina, mientras que en el resto de los medios no hubo expresión. Aquí existe una aparente contradicción, ya que los niveles de expresión son muy bajos y los niveles enzimáticos en YPD no lo son, probablemente el transcrito de este gen sea inestable.

Se detectó el gen *DAP2cg* codificante de una dipeptidil aminopeptidasa vacuolar a la cual hemos denominado DapBcg, con un peso molecular de 94 kDa y un punto isoeléctrico de 5.4. La dipeptidilaminopeptidasa vacuolar de *S. cerevisiae* denominada yscDap2 codificada por el gen *DAP2* (Bordallo y col., 1984), es una proteína de 818 a.a con un peso molecular de 120 kDa, y de 96 kDa en su forma madura, con un pI de 5.38. La ausencia de esta proteína no afecta la cascada de activación de las proteasas vacuolares reportadas en este organismo (Roberts y col., 1989). Sin embargo esta actividad puede complementar a las mutantes deficientes en Ste13, otra dipeptidilaminopeptidasa de *S. cerevisiae* encargada de madurar a factor sexual-alfa (Suarez-Rendueles y Wolf, 1988). Aunque *C. glabrata* no presenta un ciclo sexual, la actividad Dap2cg podría

Discusión

participar en la maduración de péptidos como sucede con otras dipeptidilaminopeptidasas. La actividad Dapcg se encontró tanto en la fracción soluble como membranal, utilizando el substrato Ala-pro-pNA y se comportó como una serín proteasa al igual que la descrita en *S. cerevisiae*. Sin embargo, en las condiciones estudiadas, el gen *DAP2cg* no se expresó (ni en el duplicado). Por lo anterior sería importante buscar otras condiciones en las que el gen se pudiera expresar (pH, estrés, temperatura, etc.), o probablemente se pueda tratar problemas técnicos en el momento de amplificar el cDNA (ausencia de cola de poliA, etc.).

En los resultados discutidos anteriormente se asume que algunas de las actividades detectadas bioquímicamente son las codificadas por los genes descritos, sin embargo puede existir más de un gen que codifique para la proteasa en estudio. Por lo anterior, se han diseñado estrategias para expresar genes en sistemas heterólogos, que permitan además la purificación de la proteína recombinante en un solo paso.

Como se ha mencionado en este trabajo, las proteasas estudiadas de *C. glabrata*, podrían tener un papel relevante en el metabolismo nitrogenado, en el recambio proteico y en la respuesta a las condiciones de estrés. Debido al papel de la PrA en el procesamiento y maduración de otras proteasas y su participación durante el estrés nutricional, en otros sistemas como el sistema vacuolar de *S. cerevisiae*, se decidió clonar el gen completo *PEP4cg* para su expresión en el sistema heterólogo de *P. pastoris*.

Discusión

Por tal motivo se decidió realizar los experimentos pertinentes para poder obtener una construcción genética que diera lugar a la obtención de la proteasa acida rec-PrAcg. Hasta ahora el gen *PEP4cg* se tiene clonado en el vector pCR®2.1 TOPO. Sin embargo, se tuvieron problemas en la ligación del inserto con el vector pPICZ α . Por lo que ahora se está trabajando con nuevas estrategias, las cuales se describen en la sección de perspectivas.

La purificación de la proteína recombinante permitirá caracterizar bioquímicamente a la enzima codificada por el gen *PEP4cg*, confirmar su naturaleza proteolítica, que se trata de una aspartil proteasa ácida, etc.

Los resultados obtenidos en este trabajo establecen las bases para el estudio de las proteasas vacuolares de *C. glabrata*, su papel el metabolismo nitrogenado, respuesta a condiciones de estrés, nuevos blancos moleculares de antimicóticos, etc.

Conclusiones.

- En el genoma de *C. glabrata* se detectaron los siguientes genes putativos codificantes de proteasas vacuolares: *PEP4cg* (proteasa ácida PrAcg), *PRB1cg*, *PRB2cg*, *PRB3cg* (proteasas neutras PrB1cg, PrB2cg y PrB3cg), *LAP4cg* y *APE3cg* (aminopeptidasas Apelcg y ApeYcg), *PRC1cg* y *CPScg* (carboxipeptidasas CpYcg y CpScg) y *DAP2cg* (dipeptidil aminopeptidasa DapBcg).
- Todas las actividades proteolíticas probadas son de localización principalmente soluble, a excepción de la actividad DapBcg que se localizó además en la fracción membranal.
- Se confirmó que las actividades PrAcg, Apelcg, ApeYcg y CpYcg, se encuentran en la vacuola de *C. glabrata*.
- La expresión de los genes codificantes de proteasas vacuolares está regulada de manera diferencial por las fuentes de N y C. Las proteasas codificadas por los genes *PEP4cg*, *PBR2cg* Y *LAP4cg* muy probablemente participen en el recambio proteico inducido por estrés por fuente de N inducido por prolina, *PBR2cg* fue el único gen que se sobreexpresó en ausencia de una fuente de N.
- Se clonó el gen completo codificante de la proteasa PrAcg (*PEP4cg*), para su posterior expresión heteróloga

Prospectivas.

- La interrupción de los genes codificantes de proteasas vacuolares descritos en este trabajo, así como la caracterización fenotípica y molecular de las mutantes aportarían información para conocer la participación de estas proteasas en el metabolismo nitrogenado, recambio proteico y en otros fenómenos como autofagia, autocatálisis y procesamiento postraduccional.
- Se deberán obtener de nuevo vacuolas para comprobar la localización de las proteasas vacuolares (incluyendo la PrB y la DapB), utilizando inclusive otros marcadores vacuolares no proteolíticos como la RNAasa y Fosfatasa así como marcadores fluorescentes de vacuola, para detectar al organelo por microscopía de fluorescencia.
- La purificación y la caracterización bioquímica de cada una de las proteínas mencionadas en este trabajo (ya sea de la proteína nativa o de la recombinante), aportará más datos que ayuden a comprender el papel que juegan estas proteasas en el metabolismo celular de esta levadura patógena oportunista.
- En cuanto a la expresión heteróloga del gen *PEP4cg*, se han diseñado nuevos iniciadores con sitios de cortes *EcoRI*, lo que permitirá la clonación en el vector pPICZ α para transformar *P. pastoris* y obtener la proteína recombinante.

Bibliografía.

- Abeliovich H. y Klionsky D.J. (2001). Autophagy in Yeast: Mechanistic Insights and Physiological Function. *Microbiol. Biol. Rev.* 65:463-479.
- Achstetter T. y Wolf D.H. (1985). Proteinases, proteolysis and biological control in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biochem.* 173:659-663.
- Achstetter T., Franzusoff A., Field C. y Sheckman R. (1988). *SEC7* encodes an Unusual, high molecular weight protein required for membrane traffic from the yeast Golgi apparatus. *J. Biol. Chem.* 263:11711-11717.
- Ammerer G., Hunter C.P., Rothman J.H., Saari G.C., Valls L.A. y Stevens T.H. (1986). *PEP4* gene of *Saccharomyces cerevisiae* encodes proteinase A, a vacuolar enzyme required for processing of vacuolar precursors. *Mol. Cell Biol.* 6:2490-2499.
- Barns S.M., Lane D.J., Sogin M.L., Bibeau C. y Weisburg W.G. (1991). Evolutionary relationships among pathogenic *Candida* species and relatives. *J. Bacteriol.* 173:2250-55.
- Bautista-Muñoz C., Hernández-Rodríguez C. y Villa-Tanaca L. (2005). Analysis and expression of *STE13ca* gene encoding a putative X-prolyl dipeptidyl aminopeptidase from *Candida albicans*. *FEMS. Immun. Med. Microbiol.* 45:459-469.
- Bordallo C., Schwencke J. y Suárez-Rendueles P. (1984). Localization of the thermosensitive X-prolyl dipeptidyl aminopeptidase in the vacuolar membrane of *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS.* 173:199-203.
- Castaño I., Cormack B. y De Las Peñas A. (2006). Virulencia del hongo oportunista *C. glabrata*. *Rev. Latinoam. Microbiol.* 2:66-69.
- Chao-Wen W. y Klionsky D.J. (2003). The molecular mechanism of autophagy. *Mol. Med.* 9:65-76.
- Cueva R., García-Álvarez N. y Suárez-Rendueles P. (1989). Yeast vacuolar aminopeptidase yscl. Isolation and regulation of the *APE1 (LAP4)* structural gene. *FEBS.* 259:125-9.
- Deshaies R.J. y Schekman R. (1989). *SEC62* encodes a putative membrane protein required for protein translocation into the yeast endoplasmic reticulum. *J. Cell Biol.* 109:2653-2664.

Bibliografía.

- Diezmann S., Cox C.J., Schönian G., Vilgalys R.J. y Mitchell T.G. (2004). Phylogeny and evolution of medical species of *Candida* and related taxa: a multigenic analysis. *J. Clin Microbiol.* 42:5624-5635.
- Ella K.M., Qi C., Dolan J.W., Thompson R.P y Meier K.E. (1997). Characterization of a sphingomyelinase activity in *Saccharomyces cerevisiae*. *Arch. Biochem Biophys.* 340:101-110.
- Erickson A.H y Blobel G. (1983). Carboxyl-terminal proteolytic processing during biosynthesis of the lysosomal enzymes beta-glucuronidase and cathepsin. *Biochem.* 225:201-5.
- Farrell RE 1998. RNA methodologies. A laboratory guide for isolation and characterization, 384 p. 92-94 2a ed. Ed. Academic Press. USA.
- Falquet G., Luka N. y Ziswiler, J.C. A Virtual Hyperbooks Model to Support Collaborative Learning. In AIED 2002 Supplemental Proceedings, Sydney, Australia
- Franzusoff A. y Schekman R. (1989). Functional compartments of the yeast Golgi apparatus are defined by the sec7 mutation. *EMBO. J.* 8:2695-2702.
- Gabriely G., Kama R. y Gerst J.E. (2007). Involvement of specific COPI subunits in protein sorting from the late endosome to the vacuole in yeast. *Mol. Cell Biol.* 27:526-40.
- Galtier N., Gouy M. y Gautier C. (1996). Seaview and Phylo_Win: two graphic tools for sequence alignment and molecular phylogeny. *Comput Appl. Biosci.* 12:543-8.
- Hemmings B.A., Zubenko G.S., Hasilik A. y Jones E.W. (1981). Mutant defective in processing of an enzyme located in the lysosomelike vacuole of *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 78:435-439.
- Hernández-Montañez Z., Araujo-Osorio J., Noriega-Reyes Y., Chávez Camarillo G. y Villa-Tanaca L. (2007). The intracellular proteolytic system of *Yarrowia lipolytica* and characterization of an aminopeptidase. *FEMS. Microbiol. Lett.* 268:178-186.
- Hilt W. y Wolf D.H. (1992). Stress-induced proteolysis in yeast. *Mol. Microbiol.* 6:2437-2442.
- Hirsch H.H., Suárez-Rendeules P., Aschtetter T. y Wolf D.H. (1988). Aminopeptidase yscII of yeast. Isolation of mutants and their biochemical and genetic analysis. *J. Biochem.* 1973:589-598.

Bibliografía.

- Hoffman C.S. y Winston F. (1987) A ten-minute DNA preparation from yeast efficiently releases autonomous plasmids for transformation of *Escherichia coli*. *Gene*. 57: 267-272.
- Holzer H. y Heinrich P.C. (1988). Control of proteolysis. *Annu. Rev. Biochem.* 49:63-91.
- Jones E.W. (1991). Three proteolytic systems in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol Chem.* 266:7963-7966.
- Jones E.W., Zubenco S.G. y Roy R. (1982). PEP4 gene function is required for expression of several vacuolar hydrolases in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*.102:665-77.
- Kakinuma Y., Ohsumi Y y Anraku Y. (1981). Properties of H⁺-translocating adenosine triphosphatase in vacuolar membranes of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol Chem.* 256 10859-10863.
- Kato M., Kirisako T., Kamei K., Murata S., Fukumoto H., Kanie M., Sano S., Tokunaga F., Tanaka K. e Iwai K.A. (2006). Ubiquitin ligase complex assembles linear polyubiquitin chains. *EMBO. J.* 25:4877-87.
- Kaur R., Biao M. y 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.* 104:7628-7633.
- Kleinschmidt J.A., Escher C. y Wolf D.H. (1988). Proteinase yscE of yeast shows homology with the 20 S cylinder particles of *Xenopus laevis*. *FEBS. Lett.* 239:35-40.
- Klionsky D.J., Herman P.K. y Emr S.D. (1990). The fungal vacuole: Composition, function and biogenesis. *Microbiol. Rev.*54:266-292.
- Kronstad J.W. y Leong S.A. (1989). Isolation of two alleles of de b locus of *Ustilago maydis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 86:978-982.
- Leger S., Joshi R.J., y Roberts L.D. (1997). Adaptation of proteases and carbohydrases of saprophytic, phytopathogenic and entomopathogenic fungi to the requirements of their ecological niches. *Microbiology.* 143:1983-1992.
- Magasanik B. y Kaiser C.A. (2002). Nitrogen regulation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Gene* 290:1–18.

Bibliografía.

- Mercado-Flores Y., Noriega-Reyes Y., Ramírez-Zavala B., Hernández-Rodríguez C. y Villa-Tanaca L. (2004). Purification and characterization of Aminopeptidase (pumAPE) from *Ustilago maydis*. FEMS Microbiol. Lett. 235:369-375.
- Miramón-Martínez P. (2005). Estudio molecular del gen *APEum* que codifica para una aminopeptidasa de *Ustilago maydis*. Tesis de Licenciatura. ENCB. Instituto Politécnico Nacional, México, D.F.
- Nathan C.O., Kim T.S., Harris J.P., Koutnouyan H.A.y Ryan A.F.(1999). Absence of mRNA encoding estrogen receptor in the rat cochlea. Acta Otolaryngol. 119: 853-857.
- Novick P., Ferro S. y Schekman R. (1981). Order of events in the yeast secretory pathway. Mol. Cell Biol. 25:461-469.
- Orozco I., Ortiz L., Elorza M.V., Ruiz H.J. y Sentandreu R. (2002). Cloning and characterization of PRB1, a *Candida albicans* gene encoding a putative novel endoprotease B and factors affecting its expression. Res Microbiol. 153:611-620.
- Palmer G.E., Michelle N.K. y Sturtevant J.E. (2007). Autophagy in the pathogen *Candida albicans*. Microbiol. 153:51–58.
- Pfaller M.A., Messer S.A., Millis K., Bolmstrôm A. y Jones R.N. (2001). Evaluation of Etest method for determining caspofungin (MK-0991) susceptibilities of 726 clinical isolates of *Candida* species. J. Clin. Microbiol. 39:4387-4389.
- Roberts C.J., Pohlig G., Rothman J.H. y Stevens T.H. (1989). Structure, biosynthesis, and localization of dipeptidyl aminopeptidase B, an integral membrane glycoprotein of the yeast vacuole. J. Cell Biol.108:1363-1373.
- Rupp S. y Wolf D.H. (1995). Biogenesis of the yeast vacuole (lysosome). The use of active-site mutants of proteinase yscA to determine the necessity of the enzyme for vacuolar proteinase maturation and proteinase yscB stability. Eur. J. Biochem. 23:115-125.
- Sambrook J. y Russell D.W. (2001). Molecular Cloning: a laboratory manual. Cold Spring Harbor laboratory press. 3a Edición.
- Saheki T., Matsuda Y. y Holzer H. (1974). Purification and characterization of macromolecular inhibitors of proteinase A from yeast. Eur. J. Biochem. 47:325-332.

Bibliografía.

- Sarry J.E., Chen R.P., Collum S., Liang M., Peng A., Lang B., Naumann F., Dzierszynski C., Yuan X., Hippler M. y Rea P.A. (2007). Analysis of the vacuolar luminal proteome of *Saccharomyces cerevisiae*. FEBS. J. 274: 4287-4305.
- Schimke R.T. y Doyle D. (1970). Control of enzyme levels in animal tissues. Microbiol. 26:103-126.
- Scott S.V., Misuzu B., Masako O., Klionsky D.J. y Ohsumi Y. (1997). Two Distinct Pathways for Targeting Proteins from the Cytoplasm to the Vacuole/Lysosome. J. Cell Biol. 29:1687–1695.
- Stevens T.H, Esmon B. y Schekman R. (1982) Early stages in the yeast secretory pathway are required for transport of carboxypeptidase Y to the vacuole. Cell. 30:439–448.
- Schoenheimer R. (1942) Studies in protein metabolism. J. Biol Chem. 144 541
- Suárez-Rendueles P. y Wolf D.H. (1988). Proteinase function in yeast: Biochemical and genetic approaches to a central mechanism of post-translational control in the eukaryotic cell. FEMS. Microbiol. Lett. 54:17-46.
- Suárez-Rendueles, P., Villa L., Arbesu M.J. y Escudero B. (1991). The proteolytic system of the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. FEMS. Microbiol. Lett. 81:215-220.
- Tanaka K., Yoshimura T., Kumatori A., Ichihara A., Ikai A. y Nishigai M, (1988). Proteasomes (multi-protease complexes) as 20 S ring-shaped particles in a variety of eukaryotic cells. J. Biol. Chem. 263:16209-17.
- Teichert U., Mechler B., Muller H. y Wolf D.H. (1989). Lysosomal (vacuolar) proteinases of yeast are essential catalysts for protein degradation, differentiation, and cell survival. Rev. Microbiol. 6:2500-2510.
- van den Hazel H.B., Kielland-Brandt M.C. y Winther J.R. (1992). Autoactivation of proteinase A initiates activation of yeast vacuolar zymogens. J. Biochem. 207:573–579.
- Woolford C.A., Daniels L.G., Park F.J., Jones E.W., Van Arsdell J.N. e Innis M.A. (1986). The PEP4 gene encodes an aspartyl protease implicated in the posttranslational regulation of *Saccharomyces cerevisiae* vacuolar hydrolases. Mol. Cell Biol. 19:235-342.

Bibliografía.

- Zubenko G.S. y Jones E.W. (1981). Protein degradation, meiosis and sporulation in proteinase-deficient mutants of *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*. 97:45-64.
- <http://www.expasy.org/prosite/>
- <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>.
- <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>.
- <http://www.psort.org/>.
- <http://www.gsf.de/biodv/matinspector.html>