**C:\Users\Fernando\Dropbox\portada.tif**

**ESTUDIO DE LA RELACIÓN ENTRE RUTAS DE SEÑALIZACIÓN DE HOMEOSTASIS DE IONES Y RESISTENCIA A ANTIFÚNGICOS.**

**Trabajo de Fin de Grado**

**Alumno: Fernando Laguía Nueda**

**Directora: Lynne Yenush**

**Curso 2014 – 2015**

**Valencia, Julio de 2015**

**UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA**

ESCOLA TÈCNICA SUPERIOR D´ENGINYERIA AGRONÒMICA I DEL MEDI NATURAL



***ESTUDI DEL MECANISME DE SENSIBILITAT DE RUTAS D’HOMEOSTASIS DE IONS A ANTIFÚNGICS***

TRABAJO DE FIN DE GRADO

ALUMNO/A: FERNANDO LAGUÍA NUEDA

TUTOR/A: LYNNE YENUSH

***Curso Académico: 2010-2014***

**VALENCIA, JULIO 2015**

**ESTUDIO DE LA RELACIÓN ENTRE RUTAS DE SEÑALIZACIÓN DE HOMEOSTASIS DE IONES Y RESISTENCIA A ANTIFÚNGICOS.**

**Resumen**

Las infecciones micóticas siguen siendo un problema de salud pública en la actualidad, más importante aún para pacientes inmunosuprimidos. Entre las posibles infecciones causadas por hongos a las que son susceptibles destaca la infección por el hongo oportunista *Candida albicans*, la cual puede derivar en una infección sistémica con altos ratios de mortalidad. Con el objetivo de encontrar nuevos tratamientos enfocados en comprometer la resistencia a antibióticos que presentan ciertas cepas resistentes, vamos a estudiar los efectos que podría tener la supresión de la actividad de ciertas rutas de transducción de señales en la resistencia a antifúngicos. Para ello, vamos a utilizar como organismo modelo al hongo *Saccharomyces cerevisiae*, ya que posee rutas homólogas a *Candida albicans.*

La homeostasis de iones es un proceso esencial para la viabilidad celular, la cual está regulada por una serie de canales y transportadores, los cuales además en muchos casos son específicos de hongos. Se sabe que ciertos mutantes para estas proteínas presentan una menor virulencia y son sensibles a tratamientos antifúngicos muy contrastados y ampliamente usados como son los azoles. Entre estos sistemas está la ruta Rim101, la cual se encarga de la regulación de la respuesta al pH alcalino. Sin embargo, no está claro el mecanismo por el cual esta ruta está involucrada en la respuesta a antifúngicos. Planteamos una hipótesis basándonos en un estudio anterior de nuestro laboratorio en el cual la proteína transportadora de iones Ena1 no se acumula apropiadamente en la membrana plasmática en cepas mutantes para componentes de la ruta Rim101. Por lo cual, podemos suponer que este fenómeno puede ocurrir en otras proteínas de membrana, y que ciertas familias de proteínas relacionadas con la resistencia a antifúngicos puedan verse afectadas. Estas proteínas se encuentran englobadas en la familia ABC (*ATP-Binding Cassette* ) dentro de la cual encontramos a las subfamilias PDR (*Pleiotropic Drug Resistance proteins*) y MDR (*Multidrug Resistance-Associated proteins*). Así pues realizamos los pertinentes experimentos para comprobar que proteína presentaba un mayor papel en la detoxificación de la célula en presencia de azoles. Se examinaron los perfiles de resistencia de cepas mutantes para una serie de genes pertenecientes a estas familias mediante cultivos en medio tanto líquido cómo sólido y en presencia de estos compuestos, obteniéndose como resultado que *PDR5* era la más importante, debido a que su mutación generaba una sensibilidad muy marcada a los azoles. Así pues, se seleccionó este gen para ser estudiado en mutantes *rim8* y *rim101*, y comprobar si llegaba de manera adecuada a la membrana y en qué condiciones. Para realizar este estudio, se procedió a construir una proteína de fusión con Pdr5 y la proteína fluorescente verde (GFP), utilizando para ello la técnica de la recombinación homóloga entre el genoma de levadura Esta transformación fue exitosa, confirmándose tanto por crecimiento en medio selectivo y fluorescencia. Observamos que apenas variaba la expresión de Pdr5-GFP tras el tratamiento con azoles, permaneciendo su expresión constante, aunque si resultó inducible por la micotoxina citrinina. Por microscopía confocal se detectó que la proteína de fusión llegaba a la membrana perfectamente y que no había apenas en el citoplasma tanto en la cepa silvestre como en los mutantes *rim8* y *rim101*. Sin embargo, por ensayos de inmunoblot, pudimos comprobar que la proteína de fusión se encuentra muy degradada en las cepas transformadas que tienen suprimidos los genes *RIM8* y *RIM101*. Esta degradación de Pdr5 podría revelar el mecanismo molecular para explicar la sensibilidad a azoles de estas cepas y establecer una nueva diana terapéutica con el fin de desarrollar nuevas terapias antifúngicas. Más en detalle, los compuestos que interactúan con la ruta Rim deberían reducir la virulencia en combinación con otros tratamientos antifúngicos ampliamente usados, provocando una mayor susceptibilidad a estos tratamientos.

**Palabras clave**: *Saccharomyces cerevisiae*, Rim101, transporte de iones, dianas terapeúticas, resistencia, antifúngicos, *PDR5*, ATP-binding cassette proteins.

**ESTUDI DE LA RELACIÓ ENTRE RUTES DE SENYALITZACIÓ DE HOMEÒSTASI D'IONS I RESISTÈNCIA A ANTIFÚNGICS.**

**Resum**

Les infeccions micòtiques segueixen sent un problema de salut pública en l'actualitat, encara més important per als pacients immunosuprimits. Entre les possibles infeccions causades per fongs a què són susceptibles destaca la infecció pel fong oportunista Candida albicans, la qual pot derivar en una infecció sistèmica amb grans ràtios de mortalitat. Amb l'objectiu de trobar nous tractaments enfocats a comprometre la resistència a antibiòtics que presenten les soques resistents, estudiarem els efectes que podria tenir la supressió de l'activitat de certes rutes de transducció de senyals a la resistència a antifúngics. Per a això, farem servir com a organisme model el fong Saccharomyces cerevisiae, ja que té rutes homòlogues a Candida albicans.

L'homeòstasi d'ions és un procés essencial per a la viabilitat cel·lular, la qual està regulada per una sèrie de proteïnes de canal i transportadores, les quals, a més en molts casos, són específics de fongs. Es sap que certs mutants per aquestes proteïnes presenten una menor virulència i són sensibles a tractaments antifúngics molt contrastats i àmpliament usats com són els azoles. Entre aquests sistemes hi ha la ruta Rim101, que s'encarrega de la regulació de la resposta al pH alcalí. No obstant això, no està clar quin és el mecanisme pel qual aquesta ruta està involucrada en la resposta a antifúngics. Aprofitant l'àmplia experiència del laboratori podem plantejar una hipòtesi basant-nos en un estudi anterior en el qual la proteïna transportadora d'ions Ena1 no s'acumula apropiadament a la membrana plasmàtica en soques mutants per a components de la ruta Rim101. Per la qual cosa, podem suposar que aquest fenomen pot ocórrer en altres proteïnes de membrana, i que certes famílies de proteïnes relacionades amb la resistència a antifúngics es puguin veure afectades. Aquestes proteïnes es troben classificades en la família ABC (ATP Binding Carrier proteins) dins de la qual trobem a les subfamílies PDR (Pleiotropic Drug Resistance proteins) i MDR (Multidrug Resistance-Associated proteins). Així doncs, es van realitzar els experiments pertinents per tal de comprovar quina proteïna presentava un major paper en la detoxificació de la cèl·lula en presència de azoles, en concret ketoconazol i fluconazol. Es van examinar els perfils de resistència de soques mutants per a una sèrie de gens pertanyents a aquestes famílies mitjançant cultius en medis tant líquid com sòlid i en presència d'aquests compostos, obtenint com a resultat que *PDR5* era la més important; a causa que la seva mutació, presentava en les cèl·lules una enorme sensibilitat als azoles. Així doncs, es va seleccionar aquest gen per a ser estudiat en soques que foren mutants per als gens *RIM8* i *RIM101*, i comprovar si arribava de manera adequada a la membrana i en quines condicions ho feia. Per a realitzar aquest estudi, es va procedir a construir una proteïna de fusió amb Pdr5 i Gfp, utilitzant per a això la tècnica de la recombinació homòloga entre el genoma de llevat i un inserit format per *GFP* i *HIS3* amplificat d'un plasmidi amb encebadors que incloïen part de la seqüència de *PDR5*. Aquesta transformació va reeixir i es va poder comprovar tant per creixement en medi sense histidina com per fluorescència. El gen va demostrar que amb prou feines variava la seva expressió després del tractament amb azoles, romanent la seva expressió constant, encara que sí que va resultar induïble per la micotoxina citrinina. Per microscòpia confocal es va detectar que la proteïna de fusió arribava a la membrana perfectament i que gairebé no hi havia en el citoplasma. No obstant això, per assaig Western Blot vam poder comprovar que la proteïna de fusió es troba molt degradada en les soques transformades que tenen suprimits els gens *RIM8* i *RIM101*, a causa que es detectaven bandes borroses per sota de pes corresponent, la qual cosa indica una disrupció de la proteïna, fet que podria explicar la seva manca de funció i establir així una possible diana terapèutica per desenvolupar un nou tractament.

**Paraules Claus**: *Saccharomyces cerevisiae* rim101, transport de ions, dianes terapèutiques, resistència, antifúngics, PDR5, ATP-binding cassette proteins.

**STUDY OF THE RELATIONSHIP BETWEEN ION HOMEOSTASIS SIGNALING ROUTES AND ANTIFUNGAL RESISTANCE**.

**Abstract**

Fungal infections represent an important public health problem today, especially for immunosuppressed patients. Among opportunistic fungi that provoke infections, *Candida albicans* is the most prevalent and may develop into a systemic infection with high mortality rates. With the aim of finding new treatments focused on compromising acquired antibiotic resistance, we plan study the effects of the suppression of the activity of some signalling pathways related with antifungal compound responses. In order to carry out this study, we will employ the model organism *Saccharomyces cerevisiae*, due to its homology with *Candida albicans* and its advantages as an experimental system.

Ion homeostasis is an essential process for cell survival. It is regulated by a number of channels and transport proteins, many of which are mainly fungal specific. It is known that strains lacking certain genes important for ion homeostasis show reduced virulence and present sensitivity to well-known antifungal treatments, like azoles. Among these pathways, the Rim pathway, which responds to alkaline pH, has been reported to be involved in resistance to the azole, fluconazole. However, the mechanism by which the Rim pathway influences anti-fungal drug sensitivity is unclear. We have established a working hypothesis regarding this point based on our previous data indicating that the ion transporter protein Ena1 does not properly accumulate in the plasma membrane in Rim mutant strains. Therefore, we will test whether this phenomenon may occur for other membrane proteins, like those related to antifungal compound resistance. These proteins belong to the ABC family (ATP-Binding Cassette), within which there are two subfamilies: PDR (Pleiotropic Drug Resistance proteins) and MRP (Multidrug Resistance-Associated proteins). Therefore, we carried out growth assays in order to determine which proteins have the most important role in detoxifying azoles. Resistance profiles of a series of mutant strains lacking the genes encoding selected ABC family members were examined in both solid and liquid culture media in the presence of ketoconazole and fluconazole. This analysis revealed that *PDR5* had a major role in azole resistance, because this mutation presents marked sensitivity to azoles. Thus, this gene was selected for further studies in Rim mutant strains *rim8* and *rim101* to determine whether Pdr5 accumulation and/plasma membrane targeting could account for the azole sensitivity of these mutants. In order to accomplish this goal, we constructed a fusion protein between Pdr5 and the Green Fluorescent Protein (GFP), using homologous recombination in the yeast genome. The success of the transformation was confirmed by growing in selective medium and by fluorescence microscopy. It was found that Pdr5protein accumulation is not altered in the presence of azoles in the media, however we did observe an induction after citrinine treatment. We also observed that the Prd5-GFP fusion protein was able to properly accumulate at the cell membrane by confocal microscopy in the WT and the Rim pathway mutant strains. However, in the immunoblot assay, we found that the Pdr5-GFP protein displays marked degradation in *rim8* and *rim101* strains, with the *rim101* phenotype being more severe. This degradation of Pdr5 could provide a molecular mechanism to explain the azole sensitivity of these strains and establishing a new therapeutic target, in order to develop new anti-fungal therapies. More specifically, compounds that target the fungal specific Rim pathway should reduce virulence and be effective as combined therapies with widely used azole drugs, rendering yeast cells more susceptible to these treatments.

**Key words**: *Saccharomyces cerevisiae*, Rim101, ion transport, therapeutic targets, resistance, antifungal compounds, *PDR5,* ATP-binding cassette proteins.

**AGRADECIMIENTOS**

Para comenzar, quiero agradecer con total sinceridad a mi tutora Lynne que me aceptase como alumno para realizar mi trabajo de fin de grado con ella, así como por poder realizar esta propuesta en un ámbito que me resultaba interesante. Igualmente, sin su inmejorable e inestimable ayuda jamás habría sido capaz de realizar mi proyecto, ya que me ha estado ayudando y mostrando interés por mis resultados desde, literalmente, el primer día hasta el último momento.

Quiero agradecer también a Mª Carmen que ocupase gran parte de su tiempo en ayudarme a manejarme en el laboratorio y que me enseñase un buen número de técnicas básicas de laboratorio, así como su enorme paciencia para aguantar todos los despistes o fallos que tenía aun cuando me repetía mil veces cómo hacer las cosas.

A Ceci quiero agradecerle que siempre tuviese un momento para responder al sinfín de preguntas que me han ido surgiendo a lo largo de mi proyecto, bien desde como programar un aparato de BioScreen hasta cosas como la numeración de las páginas del Word, aun cuando estaba en la dura tarea de su tesis doctoral, así como por los buenos momentos que hemos pasado entre experimento y experimento.

A Alba, Anna, Elena, y Sasha quiero agradecerle también la ayuda que me ha prestado, así como los buenos ratos que hemos pasado a lo largo de este año en el laboratorio, que me han ayudado a realizar mi proyecto con más entusiasmo, y me ha recargado las pilas y la moral en los momentos en los que peor lo he pasado. Gracias por este año que hemos pasado juntos en el laboratorio, y por haber sido más que compañeras de laboratorio.

A Markus y Elena, del laboratorio 1.09, les agradezco también la ayuda tanto técnica como material, sin la que hubiese sido posible realizar ciertos experimentos.

Quiero agradecer también a mis amigos y compañeros de trinchera Alba, Alejandra, Amparo, Ana, Borja, Clara, Elisa, Inma, Javier, Jesús, José Juan, Nacho, Pedro, Pilar, Sandra, Sergio y Vicente por los buenos momentos a lo largo de la carrera y este último año, que también han sido una ayuda enorme para sacar todo adelante, además de los increíbles momentos que hemos pasado juntos y los recuerdos que me llevo para siempre.

Por último, pero no menos importante, quería agradecerles a mis padres todo el apoyo que me han dado a lo largo de la carrera, tanto económico como moral, para que consiguiese mi sueño de ser biotecnólogo, aunque no haya sido una tarea nada fácil, y haya costado mucho esfuerzo y sacrificio, sin vuestra ayuda nada de esto sería hoy posible.

Muchas gracias de todo corazón a todos aquellos que de alguna manera, habéis hecho algo por ayudarme en este último período de una de las fases más importantes de mi vida.

La comedia è finita.

**ABREVIATURAS**

**ABC:** *ATP-Binding Cassette.* Cassette de union de ATP

**ATP:** Adenosín Trifosfato

**BP:** *Base Pair.* Par de bases

**DMSO:** Di-metil sulfóxido

**DTE:** 1-4-DiTioEritritol

**ESCTR**: *Endosomal Sorting Complex Required for Transport*

**HRP:** *Horse Radish Peroxidase.* Peroxidasa de rábano picante

**GFP:** *Green Fluorescent Protein.* Proteína verde fluorescente.

**MDRp**: *Multidrug Resistance Protein*. Proteína de multiresistencia a antibióticos.

**MRP:** *Multidrug Resistance-Associated Protein*. Proteína asociada a la multiresistencia a antibióticos

**PDR:** *Pleiotropic Drug Resistance*. Resistencia pleiotrópica a antibióticos.

**SD:** *Synthetic Defined (medium).* Medio definido

**SDS:** *Sodium Dodecyl Sulfate.* Dodecil sulfato sódico

**SDS-PAGE:** *Sodium Dodecyl Sulfate-PolyAcrilamide Gel Elecrophoresis*. Electroforesis en gel de poliacrilamida-dodecil sulfato sódico.

**WT:** *Wild Type*. Cepa Silvestre.

**YPD*:*** *Yeast-extract Peptone Dextrose (medium)*. Medio de extracto de levadura, peptona y dextrosa.

**ÍNDICE**

|  |  |
| --- | --- |
| INTRODUCCIÓN |  |
| 1. *Saccharomyces cerevisiae* como organismo modelo | Pag 1 |
|  |  |
| 1. Proteínas de la familia ABC. Resistencia a antifúngicos y detoxificación celular | Pag 2 |
|  | Pag 3 |
| 1. *Candida Albicans,* Candidiasis, Candidemia y problemas asociados a la resistencia a antifúngicos |  |
|  |  |
| 1. Terapias contra la candidiasis y resistencias a tratamientos antifúngicos. | Pag 5 |
|  |  |
| 1. Mecanismos de resistencia a los azoles presentes en *Candida* | Pag 8 |
|  |  |
| 1. Regulación del pH en levaduras | Pag 9 |
|  |  |
| 1. Regulación de pH y patogenicidad | Pag 11 |
| OBJETIVOS | Pag 13 |
| MATERIALES Y MÉTODOS | Pag 14 |
| 1. Materiales | Pag 14 |
|  |  |
| 1. Análisis del perfil de sensibilidad en medio líquido | Pag 15 |
|  |  |
| 1. Perfil de sensibilidad en medio sólido | Pag 15 |
|  |  |
| 1. Diseño de cebadores de recombinación homóloga | Pag 16 |
|  |  |
| 1. Obtención del cassette *GFP::HIS3* | Pag 18 |
|  |  |
| 1. Recombinación mediante transformación simple | Pag 18 |
|  |  |
| 1. Comprobación de la recombinación homóloga | Pag 18 |
|  |  |
| 1. Microscopía confocal. Comprobación de la aparición de fluorescencia. | Pag 19 |
|  |  |
| 1. Fluorimetría | Pag 20 |
|  |  |
| 1. Electroforesis de proteínas y transferencia a membrana | Pag 21 |
|  |  |
| 1. Inmunodetección de proteínas transferidas a membrana | Pag 21 |
|  |  |
|  |  |
|  |  |
| RESULTADOS | Pag 23 |
| 1. Análisis del perfil de sensibilidad en medio líquido de genes de las familias PDR, MRP y RIM | Pag 23 |
|  |  |
| 1. Análisis del perfil de sensibilidad en medio sólido de genes de las familias PDR, MRP y RIM | Pag 25 |
|  |  |
| 1. Amplificación del cassette *GFP::HIS3* | Pag 26 |
|  |  |
| 1. PCR de comprobación de la recombinación homóloga | Pag 27 |
|  |  |
| 1. Resultado del ensayo de microscopía confocal | Pag 28 |
|  |  |
| 1. Ensayo de fluorimetría | Pag 28 |
|  |  |
| 1. Resultados de la observación al microscopio de las 3 cepas transformadas wt, *rim8* y *rim101* tratadas con fluconazol, ketoconazol y citrinina. | Pag 30 |
|  |  |
| 1. Inmunodetección de Pdr5-GFP mediante “Western Blot” | Pag 32 |
|  |  |
| 1. Análisis de crecimiento en cultivo líquido de genes relacionados con la estabilidad de la membrana | Pag 34 |
|  |  |
| DISCUSIÓN | Pag 37 |
| CONCLUSIONES | Pag 42 |
| BIBLIOGRAFÍA | Pag 43 |
| ANEXO | Pag 51 |

**ÍNDICE DE FIGURAS**

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| INTRODUCCIÓN | |  |
| 1. Figura 1.1 Estructura general de las proteínas de la familia ABC | | Pag 3 |
|  | |  |
| 1. Figura 1.2 Localización subcelular de las distintas proteínas pertenecientes a las subfamilias PDR y MRP | | Pag 4 |
|  | |  |
| 1. Figura 1.3 Regulación de las proteínas de las subfamilias PDR y MRP | | Pag 5 |
|  | |  |
| 1. Figura 1.4 Azoles utilizados como tratamiento contra candidiasis | | Pag 7 |
|  | |  |
| 1. Figura 1.5 Señalización de la ruta rim en distintos hongos | | Pag 10 |
| MATERIALES Y MÉTODOS | |  |
| 1. Figura 3.1 Distribución de muestras en el BioScreen | | Pag 15 |
|  | |  |
| 1. Figura 3.2 Distribución de las cepas en cada placa | | Pag 16 |
|  | |  |
| 1. Tabla 3.1 Secuencias de los cebadores utilizados para amplificar el cassette GFP::HIS3 | | Pag 16 |
|  | |  |
| 1. Figura 3.3 Región 3' del gen PDR5 y región aguas abajo. | | Pag 17 |
|  | |  |
| 1. Tabla 3.2 Diseño de cebadores de recombinación homóloga | | Pag 17 |
|  | |  |
| 1. Figura 3.4 Región final de PDR5. Diseño de cebadores de comprobación | | Pag 18 |
|  | |  |
| 1. Tabla 3.3 Cebadores utilizados en la PCR de comprobación de la inserción del cassette. | | Pag 18 |
|  | |  |
| 1. Figura 3.5 Distribución de cultivos en el ensayo de fluorescencia | | Pag 20 |
|  | |  |
| 1. Tabla 3.4 Anticuerpos utilizados en la inmunodetección | | Pag 21 |
|  | |  |
| RESULTADOS | |  |
| 1. Figura 4.1 Perfil de crecimiento del set de cepas en medio YPD | | Pag 23 |
|  | |  |
| 1. Figura 4.2 Perfil de resistencia del set de cepas en presencia de Ketoconazol en medio YPD a una concentración 1 M | | Pag 24 |
|  | |  |
| 1. Figura 4.3 Perfil de resistencia del set de cepas en medio YPD con una concentración de Fluconazol 0,2 mM | | Pag 24 |
|  | |  |
| 1. Figura 4.4 Perfil de sensibilidad de los mutantes en medio sólido | | Pag 25 |
|  | |  |
| 1. Figura 4.5 Producto de PCR resultante de la amplificación del cassette GFP:HIS3 | |  |
|  | |  |
| 1. Figura 4.6 Resultado de la PCR de comprobación de las cepas de levadura transformadas. | | Pag 27 |
|  | |  |
| 1. Figura 4.7 Microscopía confocal de cepas wt rim8 y rim101 tratadas con citrinina. | | Pag 28 |
|  | |  |
| 1. Figura 4.8 Fluorescencia vs t de la cepa wt transformada con el cassette GFP-His3 en presencia de fluconazol (dosis bajas) | | Pag 29 |
|  | |  |
| 1. Figura 4.9 Fluorescencia vs t de la cepa wt transformada con el cassette GFP-His3 en presencia de fluconazol (dosis altas) | | Pag 29 |
|  | |  |
| 1. Figura 4.10 Fluorescencia vs t de la cepa wt transformada con el cassette GFP-His3 en presencia de ketoconazol | | Pag 30 |
|  | |  |
| 1. Figura 4.11 Microscopía confocal de la cepa control transformada con GFP:HIS3 y tratada con citrinina (200 ppm) ketoconazol (40 µM) y fluconazol (200 µM) | | Pag 31 |
|  | |  |
| 1. Figura 4.12 Microscopía confocal de la cepa rim8 transformada con GFP:HIS3 y tratada con citrinina (200 ppm) ketoconazol (40 µM) y fluconazol (200 µM) | | Pag 31 |
|  | |  |
| 1. Figura 4.13 Microscopía confocal de la cepa rim101 transformada con GFP:HIS3 y tratada con citrinina (200 ppm) ketoconazol (40 µM) y fluconazol (200 µM) | | Pag 32 |
|  | |  |
| 1. Figura 4.14 Western Blot | | Pag 33 |
|  | |  |
| 1. Figura 4.15. Análisis del perfil de crecimiento en medio líquido YPD | | Pag 34 |
|  | |  |
| 1. Figura 4.16. Análisis del perfil de crecimiento en medio líquido YPD tratado con ketoconazol 1uM | | Pag 35 |
|  | |  |
| 1. Figura 4.17. Análisis del perfil de crecimiento en medio líquido YPD tratado con ketoconazol 1uM | | Pag 35 |
|  | |  |
| ANEXO | |  |
| 1. Figura 8.1 Plásmido pFA6a-GFP(S65T)-HIS3MX6. | | Pag 51 |
|  | |  |
| 1. Figura 8.2 Esquema del proceso de transformación y recombinación homóloga para generar la cepa con la inserción genómica de PDR5-GFP | | Pag 52 |
|  | |  |
| 1. Figura 8.3 Distribución de BioscreenC de cepas mutantes para genes de la membrana | | Pag 53 |
|  |  | |
|  |  | |

*INTRODUCCIÓN*

1. *Saccharomyces cerevisiae* como organismo modelo

*Saccharomyces cerevisiae* es una levadura perteneciente al reino de los hongos o *Fungi* según el sistema de los 5 reinos propuesto por R. Whittaker, y así mismo, al dominio Eukarya propuesto por Carl Woese. Dentro de los hongos pertenece a la familia de los ascomicetos, familia en la cual se encuentran hongos tanto unicelulares como pluricelulares, los cuales pueden formar micelio y reproducirse asexual y sexualmente. Se trata de un microorganismo unicelular y eucariota, de un tamaño medio aproximado de entre 4 y 6 μm según el estadio del ciclo celular en el cual se encuentra. El genoma de esta levadura está dividido en 16 cromosomas lineales, con un tamaño de genoma de 12,8 Megabases, y que contiene alrededor de 6.000 genes (Goffeau et al., 1996).

Este hongo tiene 2 sistemas de reproducción, bien asexual o bien sexual. Igualmente se pueden encontrar en 2 formas diferentes según su dotación cromosómica, pudiendo ser haploides o diploides. La reproducción asexual se lleva a cabo por gemación, con una mitosis previa para dividir el núcleo, y puede ser llevada a cabo por haploides y diploides, lo que significa que ambas formas son estables y pueden perdurar en el tiempo.

Por el contrario la reproducción sexual sólo puede ser llevada a cabo por células haploides. La reproducción sexual ocurre cuando el medio es desfavorable. Las células diploides sufren un proceso de meiosis dando lugar a cuatro células haploides conocidas como ascosporas. En levaduras la determinación sexual depende únicamente de la variación alélica de un locus denominado MAT y que está presente en el cromosoma III. Hay 2 alelos denominados MATa y MATα. Así pues, hay 2 tipos de células haploides denominados a o α, los cuales expresan unas feromonas denominados factor a o α respectivamente así como inducen cambios celulares, reprimiendo igualmente a los genes del tipo contrario (Herskowitz, 1988). Tras la división meiótica se producen 4 células haploides, 2 de cada tipo. Los factores generan una protuberancia en la superficie celular dirigida hacia la fuente de feromonas de otra célula del tipo contrario, lo que da lugar finalmente a la fusión celular entre células de distinto tipo y de sus núcleos, generando una célula diploide y cerrando el ciclo vital.

*Saccharomyces cerevisiae* constituye la especie mejor estudiada del género, debido a su importancia histórica en la industria alimentaria, principalmente en la producción de pan y bebidas alcohólicas fermentadas. Su estudio ha sido clave para mejorar estos procesos alimentarios y gracias a ello es el eucariota mejor estudiado, lo que supone una buena razón para que se utilice como modelo en la investigación biológica. Se dispone también de su secuencia genómica completa y anotada, casualmente fue el primer eucariota en ser secuenciado, así como los eficientes sistemas de predicción de proteínas (Nelissen et al, 1997). La cinética de crecimiento está muy bien estudiada, y también se debe destacar la rapidez de crecimiento, lo cual agiliza la investigación con ellas (tiempo de duplicación de 90 minutos) así como una temperatura óptima fácil de utilizar (28ºC). Cabe destacar el hecho de que es eucariota, lo cual supone un punto de referencia para el estudio de las funciones celulares básicas de eucariotas superiores. Los métodos de ingeniería genética como la transformación con plásmidos o la recombinación homóloga, base para experimentos más complejos, para estas células están también muy bien descritos en diversos protocolos.

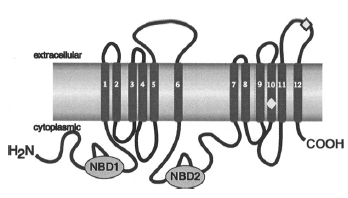
1. Proteínas de la familia ABC. Resistencia a antifúngicos y detoxificación celular

El mantenimiento de la homeostasis celular es clave para la supervivencia de los microorganismos. Uno de los aspectos del mantenimiento de ésta es eliminar del medio intracelular las sustancias que puedan interferir con estructuras o procesos celulares que comprometan al normal desarrollo del hongo. Estas sustancias reciben el nombre de antifúngicos, y pueden ser naturales o sintéticas. Normalmente, su método de actuación consiste en bloquear la acción enzimática de distintas rutas de síntesis de compuestos estructurales o bien la disrupción de la función de enzimas necesarios para mantener la homeostasis celular de todo tipo.

Normalmente, estos compuestos, si son de carácter hidrófilo y de un tamaño molecular moderado, son capaces de atravesar los canales de membrana mediante difusión facilitada (Mansfiel et al., 2010), ya que dentro de la célula no se espera que haya prácticamente ninguna molécula de estos compuestos, y entran hasta igualar a la concentración de antifúngico en el exterior (White et al., 1998). Por lo tanto para expulsar del interior celular estas sustancias, se ha de hacer en contra del gradiente, lo que implica que este transporte sea dependiente de la hidrólisis de ATP. Así pues, es de suponer que la detoxificación celular ha de ser llevada a cabo por proteínas transportadoras dependientes de la unión de ATP, conocidas por sus siglas en inglés como proteínas ABC (*ATP Binding Cassette*).

La familia de proteínas ABC es la familia que contiene un mayor número de proteínas en su seno y por tanto, la más extensa, contando con casi 1000 miembros (Wolfger et al., 2001). Estas proteínas se encuentran en todas las células vivas, desde bacterias hasta seres humanos. Su función no sólo se limita al transporte mediado por ATP, si no que otras actúan incluso como canales iónicos, reguladores de canales, receptores o proteasas (Bauer et al., 1999). Estas proteínas median el transporte de iones, metales pesados, carbohidratos, esteroides, glucolípidos, aminoácidos, glucocorticoides, micotoxinas, antibióticos pigmentos, fármacos anticancerígenos, péptidos e incluso proteínas enteras (Higgins, 1992).

Generalmente, todas las proteínas de la familia ABC comparten una estructura común si no tenemos en cuenta los mecanismos de reconocimiento específico para cada molécula o grupo de moléculas (Dean et al., 1995). Todas ellas cuentan con al menos un dominio de unión de nucleótidos abreviado como NBD (*Nucleotide Binding Domain*) de carácter hidrofílico y expuestos al citoplasma celular; y con una serie de segmentos transmembrana configurados como una α-hélice denominados TMS (*TransMembrane Segments*) de carácter hidrofóbico. Se conocen diversas configuraciones de estos dominios (Kuchler et al., 1992), pero la distribución más común consiste en un modelo especular, con 2 NBD y 12 TMS distribuidos según la figura 1. En los dominios NBD es donde ocurre la unión e hidrólisis de moléculas de ATP que permiten la translocación de compuestos (Higgins et al., 2001).



**Figura 1.1** **Estructura general de las proteínas de la familia ABC**. En la figura podemos observar los dominios NBD en la zona citoplasmática de la proteína de canal, los cuales se encuentran intercalados por las 6 α-hélices del dominio hidrofóbico que se integra en la membrana y forma el canal de transporte (Wolfger et al., 2001).

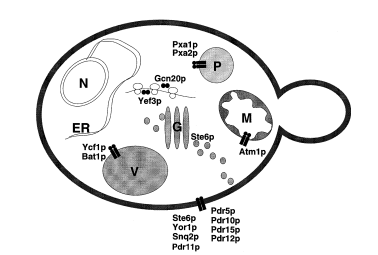
Sin embargo, el mecanismo por el cual cada proteína de la familia reconoce y actúa específicamente con cada grupo de moléculas que transporta supone aún un intrigante misterio de la biología celular.

Unas de las subfamilias comprendidas por esta familia de proteínas y que son cruciales en el desarrollo de nuestro trabajo son las de las proteínas de resistencia pleiotrópica a antibióticos, abreviada como PDR (*Pleiotropic Drug Resistance*), implicadas en la detoxificación celular y resistencia a antifúngicos y homóloga de la subfamilia presente en humanos de proteínas de multiresistencia a antibióticos (MDR, *MultiDrug Resistance*), y las de las proteínas de multiresistencia, abreviadas como MRP (*Multidrug Resistance-Associated Proteins*), las cuales están implicadas en la detoxificación vacuolar y resistencia a metales pesados.

Las proteínas de la familia PDR son transportadores del tipo ABC completos, es decir, con 12 dominios transmembrana. Los transportadores mejor caracterizados de esta familia son las proteínas Pdr5 (Balzi et al., 1994) y Snq2 (Servos et al., 1993). Ambos son transportadores ubicados en la membrana celular que se encargan de expulsar fuera de la célula un elevado número de compuestos con diversas funciones y sin una relación estructural entre ellos (Meyers et al., 1992). Pdr5 tiene 2 homólogos no esenciales, denominados Pdr10 y Pdr15, los cuales no están muy expresados, pero ante ciertos estreses aumentan su concentración en la membrana celular (Wolfger et al., 1997). Otra proteína descrita de esta familia, Pdr16, se presenta también como una proteína imprescindible en la resistencia a azoles. Posee un homólogo no esencial denominado Pdr17, cuya deleción no parece afectar a la resistencia celular a estos compuestos (van den Hazel et al., 1999).

El homólogo más destacable de Snq2 es la proteína Pdr12, encargada de expulsar fuera de la célula fluoresceínas y ácidos grasos de cadena corta (como acetato o benzoato), y se induce muy fuertemente inducido por estrés mediado por ácidos grasos y pH bajo, y su regulación es independiente de la del resto de proteínas PDR o MRP (Holyoak et al., 1992).

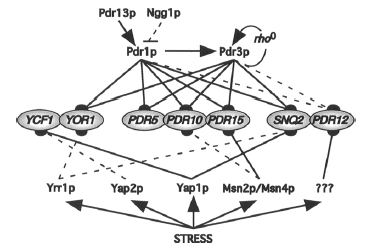
Ycf1 y Yor1 pertenecen a la subfamilia MRP y ambas regulan la detoxificación de la vacuola (Wolfger et al. 2001). Ycf1 se encarga del transporte de compuestos como el glutatión oxidado, conjugados de glutatión-S y metaloides, así como permitir el desarrollo celular en presencia de altas concentraciones de iones de cadmio (Cole et al., 1998; Tommassini et al., 1996; Piper et al., 1998). Yor1 se encuentra en la membrana plasmática y su deleción génica está ligada a la perdida de resistencia ante diversos grupos de antibióticos.



**Figura 1.2 Localización subcelular de las distintas proteínas pertenecientes a las subfamilias PDR y MRP**. Cómo podemos observar, Yor1, Pdr5, Pdr10, Pdr15 y Pdr12 se encuentran en la membrana celular, Bat1 y Ycf1 en la membrana vacuolar (Bauer et al., 1999).

Estas proteínas se encuentran reguladas principalmente por las proteínas Pdr1 y Pdr3 (Katzmann et al., 1994; Balzi et al., 1994), las cuales son factores de transcripción que se unen al DNA objetivo mediante motivos de dedos de zinc, los cuales se encuentran en la zona N-terminal de la proteína, mientras que en el extremo C-terminal se encuentran los dominios de activación (Katzmann et al., 1996). Los genes que codifican para estas proteínas son parálogos entre ellos. Al contrario que otros factores de transcripción, son unas proteínas constitutivamente fosforiladas y que se encuentran en el núcleo. Estas proteínas se activan uniéndose en cis a motivos conservados que se encuentran en todas las distintas secuencias de proteínas PDR y MPR denominados PDRE (*Pleiotropic Drug resistance Responsive Element*), cuya secuencia consenso es 5’-TCCG/aC/tGG/cA/g- 3’. Otros TF implicados en la regulación de las proteínas PDR son Yrr1 Yap2 Yap1 Msn2/Msn4 y Ngg1 (Wolfger et al., 2001). En el caso de la regulación de Pdr5, el cual es, junto con Snq2, el más destacable de los miembros de estas subfamilias, está regulado principalmente por Pdr1. Pdr3 también interviene en su regulación, pero los niveles de expresión de Pdr5 tras suprimir Pdr3 no descienden de manera tan dramática como en el caso de la deleción de Pdr1 (Katzmann et al., 1994). Igualmente, al sufrir Pdr5 una deleción, sus homólogos celulares, sobretodo Pdr15, aumentan considerablemente su expresión para suplir la falta de Pdr5 en la membrana y minimizar así los efectos de su silenciamiento (Wolfger H. et al., 1997).

Sin embargo, no es la única familia implicada en la resistencia a antibióticos. La familia *Major Facilitator Protein* cuenta con miembros que también están implicados en la resistencia a ciertas drogas, clasificados en una familia llamada DHA, (*Drug H+ Antiporter),* familia que además no tiene homólogos en eucariotas superiores (animales y plantas) pero sí en bacterias*,* en la cual se encuentros por ejemplo, *FLR1*, *TPO1, TPO3, AQR1,* y *QDR2* entre otros (Vargas et al., 2004; Alarco et al., 1998; Uemura et al., 2014; Tenreiro et al., 2002) y que tienen como función el transporte de sustancias que pueden resultar nocivas para la célula y su mantenimiento de la homeostasis, como por ejemplo, quinidina o ácidos grasos orgánicos de cadena corta. Sin embargo, su papel no parece tan importante como el de las proteínas de la familia PDR, y su relación con los azoles no parece clara, con la excepción del gen *FLR1.* (Gbelska et al., 2006) Así mismo, se han realizado estudios que comparan la implicación clínica de estos genes en tratamientos clásicos contra infecciones fúngicas causadas por levaduras y otros hongos contra la familia de genes ABC, ya que esta familia no suele ser muy tenida en cuenta en los estudios sobre la resistencia a antifúngicos (Costa et al., 2014).



**Figura 1.3 Regulación de las proteínas de las subfamilias PDR y MRP**. Como podemos observar descrito en la bibliografía, Pdr1 y Pdr3 son los principales reguladores de esta familia de proteínas, excepto de Pdr12. Igualmente, estas proteínas son inducidas por otros factores de transcripción activados en condiciones de estrés complementando la regulación y favoreciendo la expresión (Wolfger H. et al., 2001).

1. *Candida Albicans,* Candidiasis, Candidemia y problemas asociados a la resistencia a antifúngicos.

La candidiasis continúa siendo una enfermedad de gran relevancia para la salud pública. Las infecciones provocadas por *Candida spp.* representan la mayoría de las infecciones oportunistas provocadas por hongos, generando graves problemas de morbilidad y mortalidad, siendo *Candida albicans* la especie más representativa y que más casos genera (Gudlaugsson et al., 2003; Pappas et al.,2003).

De manera introductoria, *C. albicans* es un microorganismo unicelular eucariota que pertenece al reino de los hongos o *Fungi*, y dentro de este se encuentra en la familia de los hongos Ascomicetales, dentro de la cual se encuentra ubicado en la familia de los Sacaromicetos, las cuales tienen una morfología celular ovoide y crecen como blastoporos, aunque pueden desarrollar estructura de micelio y estructuras de producción de esporas (clamidoesporas). Este hongo pertenece a la microbiota habitual del ser humano desde el nacimiento como un comensal habitual e inocuo que se puede encontrar en mucosas superficiales de distintos órganos, particularmente las de la piel y la de los tractos gastrointestinales y genitourinario, resultando totalmente inocuas para el huésped mientras que el sistema inmune funcione con normalidad. Sin embargo, en el caso de que el sistema inmune no se encuentre totalmente operativo y no pueda regular el crecimiento de los hongos comensales, puede producirse un crecimiento indeseable de *C. albicans* que altere el estado normal de salud (Kavanagh, 2005). Como factores de predisposición a la candidiasis podemos citar los siguientes: inmunosupresión (bien producida por infección del HIV, o bien por un tratamiento supresor del sistema inmune como ocurre en el caso de los pacientes de trasplante de algún órgano o como efecto secundario de tratamientos anticancerígenos), cateterización (introducción de microorganismos foráneos dentro del cuerpo), parto prematuro (sistema inmune subdesarrollado), edad avanzada (sistema inmune defectivo), uso de antibióticos de gran rango de actuación o corticosteroides (alteración de la microbiota normal de las mucosas) o cirugía gastrointestinal (inoculación directa de células en el torrente sanguíneo).

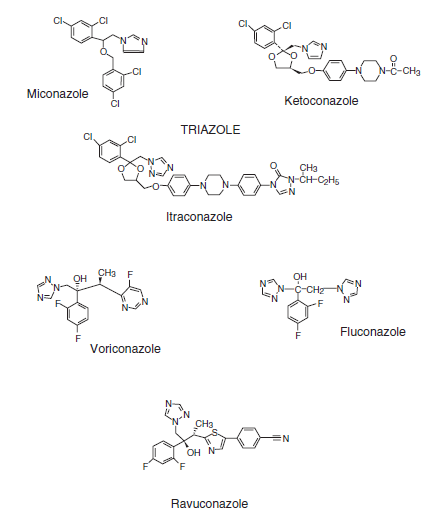
En estos casos, se produce un crecimiento anormal de *C. albicans* en las mucosas donde su presencia es habitual, siendo las más frecuentes las candidiasis asociadas a la mucosa genital y a la mucosa oral, provocando síntomas como escozor, enrojecimiento, inflamación y llagas, con particularidades según qué mucosa sea y el sexo del afectado. A nivel microscópico, se produce un desarrollo de hifas sobre estas mucosas, así como la formación de una biopelícula sobre este micelio como método de resistencia a las defensas corporales. Estas infecciones son mucho más frecuentes en pacientes inmunocomprometidos (Gow et al., 2012) y hasta el desarrollo de terapias antirretrovirales era una infección habitual en las personas afectadas por VIH. Esta infección no suele generar una respuesta inmune, ya que la piel y las mucosas disponen de mecanismos que impiden la entrada de estos microorganismos al torrente sanguíneo, así como de medios para combatirlos y eliminarlos (secreciones antimicrobianas y de moléculas antifúngicas como transferrinina y péptidos antimicrobianos conocidos como defensinas).

También puede provocar infecciones en la piel de carácter crónico principalmente en pacientes inmunocomprometidos. Sin embargo, y con poca frecuencia, hay casos en los cuales esta barrera puede ser superada y producirse una infección sistémica expandiéndose por el torrente sanguíneo, llegando y afectando a órganos como riñones, hígado o bazo, y que recibe el nombre de Candidemia (Kavanagh, 2005). Si no se trata esta sepsis puede llegar incluso a afectar al cerebro, complicando la enfermedad y provocando la muerte del paciente. En caso de llegar a esta fase la tasa de mortalidad se eleva hasta el 40% de los pacientes (Wisplinghoff et al., 2003).

Las especies pertenecientes al género de *Candida* son el tercer microorganismo más común en los casos de sepsis producidas en los hospitales. En los Estados Unidos por ejemplo, la candidiasis sistémica tiene una frecuencia de alrededor de 20 casos por cada 100.000 habitantes. Ciertamente esto supone un incremento de la frecuencia de 20 veces desde hace 2 décadas, lo cual se debe principalmente al incremento de la media de edad de la población, al incremento de casos de VIH y a la aparición de casos de resistencia a terapias habituales contra la candidiasis (Pierce et al, 2014).

1. Terapias contra la candidiasis y resistencias a tratamientos antifúngicos.

El grupo de fármacos más comunes utilizados contra la infección por cándida son los azoles. La sensibilidad a estos compuestos fue descrita hace tiempo, a mediados del siglo XX. Dentro de este grupo, los más utilizados son imidazoles como ketoconazol o miconazol; así como triazoles, principalmente fluconazol, itraconazol, voriconazol, ravuconazol, etc. (Rex et al., 2003).



**Figura 1.4** **Azoles utilizados como tratamiento contra Candidiasis**. Estructura molecular de los principales antifúngicos de la familia de los azoles utilizados en el tratamiento de la Candidiasis (Kavanagh, 2005).

El principal método de actuación de los azoles es la inhibición de un enzima citocromo-P450 dependiente de la ruta de síntesis del ergosterol implicado en la α-esterol desmetilación del C-14 mediante la unión a este citocromo, la cual es denominada como lanosterol demetilasa. Aparte de inhibir la actuación de este enzima, provoca fallos en la función de enzimas citocromo C oxidativos y peroxidativos, afectando a los ácidos grasos propios de la membrana celular, inhibiendo el sistema catalasa y disminuyendo la adhesión entre células fúngicas y la formación de micelio. El ketoconazol y miconazol igualmente pueden afectar al sistema de las ATPasas de la membrana celular, provocando un colapso electroquímico del gradiente, así como a la síntesis de glucanos, quitina y enzimas relacionados con la formación de nucleótidos (Kavanagh, 2005). El principal efecto de estos tratamientos en la célula es la acumulación de esteroles metilados que son precursores de ergosterol, alterando la permeabilidad y fluidez de la membrana, provocando a la aparición de agujeros en la membrana. En altas concentraciones provocan la desaparición de estructuras membranosas de orgánulos como mitocondrias o la membrana nuclear. Así mismo, el ketoconazol previene la formación de la forma de micelio.

El uso de los azoles está muy extendido principalmente por los escasos efectos secundarios que provocan en el organismo, incluso suministrados por la vía oral y durante largos períodos de tiempo, siempre que se utilicen cantidades adecuadas (menores de 600mg/dosis). Un 10% de pacientes sufre náuseas y vómitos en caso de uso de ketoconazol, así como también un 10% de pacientes muestra un aumento de las transaminasas en sangre bajo este tratamiento. Un 3% muestran alteraciones puntuales en la función hepática normal. En casos muy raros puede afectar también a los niveles de testosterona, disminuyendo la producción de esta hormona (Kavanagh, 2005).

No obstante, pese a la eficiencia de este tratamiento, en las últimas décadas han aparecido cepas que poseen resistencia contra los azoles. En un estudio reciente en el cual se analizaron los perfiles de resistencia de las cepas de *C. albicans* obtenidos de las mucosas de pacientes afectados que además eran VIH-positivos se demostró que entre un 10% y un 40% de las cepas eran resistentes dependiendo del tipo de azol utilizado (Ramesh et al. 2011).

1. Mecanismos de resistencia a los azoles presentes en *Candida*

Las resistencias de estos microorganismos se aceleran en ciertos casos debido a la presión selectiva que provoca la presencia de antifúngicos, lo que provoca una mayor plasticidad genómica y una evolución acelerada (Selmecki et al., 2009; Selmecki et al., 2010). Los principales mecanismos que confieren resistencia a azoles son los siguientes:

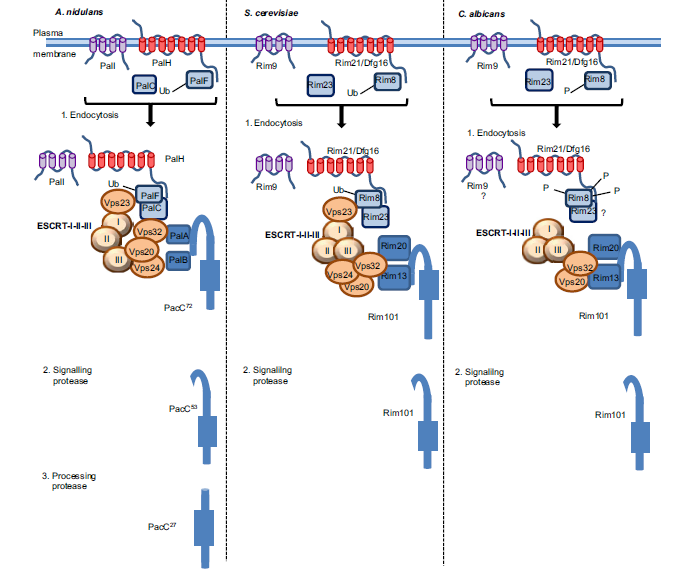
1. Mutaciones no sinónimas en la secuencia del gen de la síntesis de ergosterol *ERG11*, el cual codifica para el enzima lanosterol demetilasa, principal diana de actuación de los azoles, causando sustituciones aminoacídicas, incrementando la producción del enzima lanosterol demetilasa y reduciendo su afinidad por los azoles, provocando la necesidad de aumentar las dosis de antifúngico (Flower et al., 2014).
2. Reducción de la acumulación de azoles en el citoplasma celular. Esto ocurre de varias maneras:
   1. Reducción de la toma de azoles. En *C. albicans* los azoles entran dentro de la célula mediante el mecanismo de difusión facilitada, es decir, no son dependientes de ATP y entran dentro de la célula hasta igualar a la concentración en el exterior. Todos los azoles utilizan la misma vía de entrada, lo que puede llevar a una resistencia cruzada debido a la toma de varios azoles en baja concentración que no provoca daños celulares. Igualmente, las cepas resistentes tienen una menor tasa de adquisición de azoles, lo que sugiere la evidencia de una mutación en los genes relacionados con este transporte (Mansfield et al., 2010).
   2. Excreción de azoles mediante transportadores de la familia ABC. Aunque la toma de azoles no sea dependiente del ATP, sí que lo es su expulsión de la célula. Las proteínas de canal pertenecientes a la familia denominada como ABC son proteínas de membrana cuya función es transportar moléculas en contra de su gradiente (ver más arriba). Dentro de esta superfamilia se encuentran las subfamilias MDR y PDR encargadas de regular la concentración intracelular de estos compuestos. Se ha descubierto que una mutación en los genes reguladores de proteínas ABC denominados *TAC1* y *MRR1* aumenta la expresión de proteínas MDR como Cdr1, Cdr2 y Mdr1, conllevando al incremento de la resistencia a los azoles. Los genes *CDR1* y *CDR2* son los ortólogos del gen de *Saccharomyces cerevisiae* *PDR5* en *Candida albicans* (Gołąbek et al., 2015).
3. Tolerancia a esteroles metilados. Una mutación en el gen de síntesis de ergosterol *ERG3* cambia la concentración de esteroles de la membrana, resultando en la producción de 14α-methylfecosterol, el cual permite el desarrollo celular (Kontoyiannis, 2000).
4. Formación de biopelículas. Las biopelículas son unas estructuras de tipo matriz que los microorganismos forman como defensa ante agentes físicos externos que puedan dañar a las células que componen la colonia. Igualmente en nuestro caso, supone un factor de resistencia ya que no permite a los azoles alcanzar a las células, siendo secuestrados por los glucanos presentes en la película, impidiéndoles actuar en los enzimas diana (Taff et al., 2013).

Normalmente, la solución a estos problemas es un aumento en la dosis del tratamiento, lo cual puede significar la aparición de efectos secundarios más severos en los pacientes, como ya se ha descrito antes. Todo esto evidencia la necesidad de encontrar nuevos tratamientos que permitan actuar contra estas cepas resistentes y que no supongan comprometer el bienestar y la salud del paciente, actuando contra estructuras o enzimas propias de hongos y que no se encuentren en humanos, para así atenuar la virulencia de la infección y facilitar los tratamientos contra estas infecciones. Como primer paso, debemos encontrar nuevas dianas terapéuticas cuya interacción con fármacos comprometan la resistencia a antifúngicos de las cepas resistentes. Para ello, vamos a estudiar cómo comprometerían el perfil de resistencia la supresión de la actividad de ciertas rutas de la transducción de señales (Hani et al., 2015).

1. Respuesta a pH alcalino en levaduras

El mantenimiento de unos niveles de pH resulta determinante para el correcto desarrollo y crecimiento celular. Es uno de los estreses que más rápidamente necesita una respuesta para evitar daños celulares de importancia. En hongos, esta regulación es muy importante debido a que son capaces de crecer a niveles de pH muy distintos. La señalización de pH alcalino recae principalmente en la proteína PacC en hongos filamentosos y su homólogo en levaduras Rim101 (Cornet et al, 2014). La importancia de estudiar esta ruta es que se ha demostrado que la supresión de genes que participan en ella, como *RIM8* y *RIM101*, comprometen a la patogenicidad de las especies infectivas en el ser humano, así como al perfil general de resistencia a antifúngicos (Peñalva et al., 2008).

Cómo podemos ver en esta figura, se trata de una ruta muy conservada entre distintas especies del reino Fungi (Arechiga-Carvajal et al., 2005). Particularmente, el proceso de señalización es prácticamente igual en *S. cerevisiae*  y *C. albicans,* y sólo difieren en el reclutamiento del complejo ESCRT.



**Figura 1.5 Señalización de la ruta Rim en distintos hongos**. Cascada de señalización de la ruta Rim en el hongo filamentoso A. Nidulans, y las levaduras Saccharomyces cerevisiae y Candida albicans (Cornet et al., 2014).

La ruta comienza con las proteínas encargadas de la señalización de pH alcalino, Rim21 y su asistente Rim9, una arrestina denominada Rim8 y Rim23. Cuando se pasa de pH neutro a pH alcalino, Rim8 se une al extremo C-terminal a Rim21 y es ubiquitinada y fosforilada, siendo un paso crucial y estando la secuencia N terminal de Rim 21 muy conservada entre especies del reino fungi (Barwell et al., 2005; Herranz et al., 2005; Hervas-Aguilar et al., 2010; Bignel, 2012). Tras esta ubiquitinación, este complejo sufre un proceso de endocitosis y se procede al reclutamiento secuencial, junto con otras 2 proteínas de la familia Rim, (Rim20 y Rim13) del complejo ESCRT (*endosomal sorting complex required for transport*), el cual está relacionado con la endocitosis vesicular (Galindo et al., 2012). Un subcomplejo unido a ESCTR-I denominado Vps23, interactúa con Rim23, y recluta a Rim20 y Rim13 las cuales se unen al subcomplejo Vps32, y forman un complejo al cual se une Rim101. (Herrador et al., 2010) Tras esta unión, Rim13 media la proteólisis citosólica de Rim101 por su extremo C-terminal, generando una proteína de 53 kDa, Rim101 funcional. (Li et al., 1997)En cada organismo sin embargo esta ruta tiene unas particularidades diferentes. En el caso de *C. albicans* en lugar de sufrir Rim8 una ubiquitinación sufre una hiperfosforilación.

Una vez obtenida la proteína Rim101 funcional, adquiere su función de proteína reguladora y pasa a activar una serie de genes implicados en la respuesta a pH alcalino. Una de sus funciones es regular negativamente a genes supresores de la meiosis como *NRG1* y *SMP1*. Igualmente, regula negativamente a *RIM8*, originando una retroalimentación negativa para evitar una respuesta exagerada al estrés alcalino. Rim101 activa procesos de esporulación, activación de crecimiento invasivo, tolerancia iónica, adaptación a pH alcalino y a genes relacionados con la constitución de la pared celular. Estimula la expresión de *ENA1*, el cual codifica para una bomba de ATP reguladora del catión Na+, debido a que se encuentra regulado negativamente por *NRG1*. Igualmente, Smp1 regula negativamente el gen *CWP*, el cual es esencial en el mantenimiento de la integridad de la membrana, codificando una manoproteína. Igualmente, activa al gen *ZPS1*, el cual es suprimido por el gen *NGR1*, codificando para el transportador iónico expresado por el gen *FET4*.

1. pH alcalino y patogenicidad

El ataque a la membrana celular es una de las estrategias más efectivas para luchar contra la infección de microorganismos. Se ha constatado mediante estudios recientes que el pH afecta a la virulencia en las infecciones provocadas por levaduras en animales y plantas (Munro, 2013). Debido a que Rim101 regula la expresión de genes relacionados con la membrana celular, se puede establecer una hipótesis que relacione la supresión de este gen con un aumento a la sensibilidad debido a ciertos fallos en la membrana celular que comprometan a la resistencia a antifúngicos. El bloqueo de la toma de hierro por la célula bloqueando la síntesis del sideróforo por ejemplo compromete la viabilidad de las células, ya que la toma de hierro está relacionada con la síntesis del ergosterol y la resistencia a azoles (Leal et al., 2013) y su formación ha sido relacionada con la ruta Rim, ya que está afectada su síntesis en mutantes de genes de esta ruta (Eisendle et al., 2004). También se ve afectado el perfil de sensibilidad ante la presencia de azoles. Se comprobó que todos los mutantes de genes de la ruta Rim, así como de los genes que forman el complejo de la membrana del endosoma ESCRT Vps28 y Vps32, podían convertirse en cepas funcionales incorporando un plásmido con el gen *RIM101* con un promotor fuerte y regulable que permitía una expresión constitutiva de Rim101 anulaba la susceptibilidad a azoles producida por estos mutantes, demostrando definitivamente la importancia de la proteína Rim101 en la resistencia a azoles (Cornet et al., 2006). Los experimentos se realizaron tanto en *S. cerevisiae* como en *C. albicans* obteniendo los mismos resultados. Igualmente estudios recientes han relacionado a la falta de Ena1 y Nha1 en la membrana con la sensibilidad a la actuación de los azoles (David, 2009; Jung et al., 2012).

Aparte, una serie de experimentos previos realizados en nuestro laboratorio han demostrado que mutantes de los genes de la ruta Rim, *RIM8* y *RIM101*, comprometen a la acumulación del transportador de iones de sodio Ena1 en la membrana plasmática (Marqués et al., 2015). Esto se pudo comprobar debido a que en estos mutantes se producía una sensibilidad muy acusada al estrés salino. Así pues, en estos mutantes de genes de la ruta Rim, la proteína Ena1 no llegaba a la membrana y se observaba una acumulación anormal de esta proteína en el citoplasma, pudiendo así establecer la teoría de que esta ruta está relacionada con la correcta acumulación en la membrana de ciertas proteínas (Marques et al., 2015). Una hipótesis que podría resultar satisfactoria a la hora de explicar la sensibilidad de mutantes en la ruta Rim a azoles sería que las proteínas transportadoras de membrana implicadas en la resistencia a antifúngicos pertenecientes a la subfamilia PDR, tampoco llegan correctamente a la membrana, por lo cual la célula no podría expulsar fuera del citoplasma a estos compuestos, no pudiendo evitar los efectos nocivos que los azoles tienen sobre las células anteriormente descritos, y comprometiendo así su resistencia. Esta conexión, de demostrarse cierta, supondría un descubrimiento de una posible nueva diana terapéutica ideal, ya que, como hemos comentado, la ruta Rim no tiene ningún homólogo en humanos, lo que supone que un tratamiento que actúe suprimiendo esta vía no tendría graves consecuencias ni efectos secundarios (Sanglard et al, 2009).

*OBJETIVOS*

1. Analizar que miembros de las familias de proteínas “*Pleiotropic Drug Resistance proteins*” y “*Multidrug-associated Resistance Proteins*” (PDR y MDR) presentan un papel importante en la defensa de la célula contra la presencia de compuestos químicos de acción antifúngica del grupo de los azoles realizando un análisis del perfil de crecimiento de una serie de mutantes para genes de esa familia tanto en medio sólido como en medio líquido.
2. Comprobar si algunos genes de la ruta de homeostasis de iones Rim101 está implicado en la resistencia de *Saccharomyces cerevisiae* a antifúngicos del grupo de los azoles.
3. Realizar una construcción *PDR5*-GFP mediante recombinación homóloga para estudiar la distribución de la proteína producida por este gen en la célula en cepas WT, y cepas mutantes para los genes *RIM8* y *RIM101* y poder comprobar así si en los mutantes *rim8* y *rim101* hay alteraciones en la distribución subcelular de Prd5-GFP, o en su correcta acumulación en la membrana.
4. Cuantificar los niveles de expresión de Pdr5 tras un tratamiento con antifúngicos para determinar si se produce una inducción en la expresión de la proteína y la consiguiente acumulación de la misma en presencia de estos compuestos.
5. Analizar el papel de una serie de genes cuyo expresión cambia en mutantes *rim101* los cuales están implicados en el ensamblaje y mantenimiento de la membrana celular de la levadura en la supervivencia de las mismas a fluconazol y ketoconazol, con el objetivo de estudiar si estos genes son responsables de la sensibilidad a antifúngicos observados para mutantes en esta ruta.

*MATERIALES Y MÉTODOS*

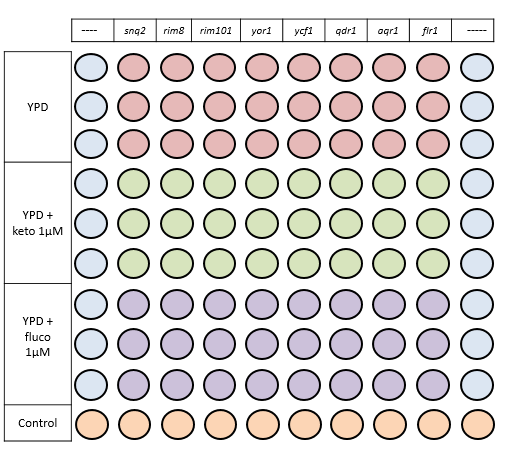
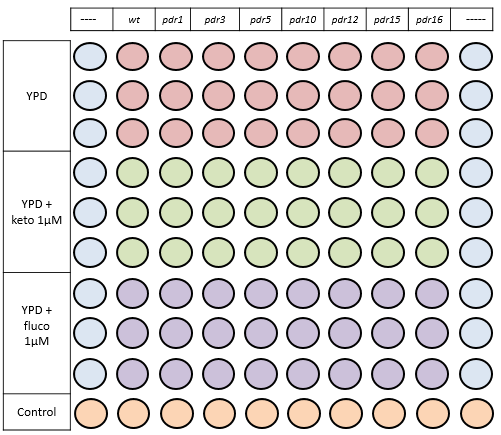
1. **Materiales**

Los medios utilizados para el crecimiento de las cepas fueron los siguientes: medio mínimo SD (URA, ADE, LEU, MET) para seleccionar las cepas que tienen el constructo Pdr5-GFP::*HIS3* ya que pueden crecer sin añadir histidina al medio, así como para la medición de fluorescencia en el fluorímetro, ya que es transparente y no interfiere en la medida. El medio YPD (peptona, extracto de levadura y glucosa) fue utilizado en el resto de experimentos ya que permite un crecimiento más rápido. Las cepas de levadura derivan de la cepa BY4741 utilizada en nuestro laboratorio (EUROSCARF). Los mutantes de la colección del EUROSCARF de los aproximadamente 4300 genes no esenciales fueron generados introduciendo un cassette de resistencia de Kanamicina (kanMX) en el orf de cada gen individualmente. Cada mutante de la colección se nombra de la siguiente forma: BY4741 *genx*::kanMX. El fluconazol y ketoconazol se obtuvieron en formato sólido de la casa Sigma-Aldrich. La micotoxina citrinina fue cedida generosamente por el laboratorio del Doctor Markus Proft en una concentración de 20.000 ppm. Los cebadores fueron diseñados y encargados a Sigma-Aldrich obteniéndose disueltos en agua a una concentración de 100µM. Como fuente del aassette de GFP::*HIS3* se utilizó el plásmido pFA6a-GFP(S65T)-*HIS3MX6* (cita?). Como polimerasa en la reacción PCR se utilizó la Phusion (Roche). Para realizar el inmunodetección se utilizaron los anticuerpos α-GFP, α-Mouse-HRP y α-rabbit-HRP (Roche), los cuales hubieron de usarse en una dilución 1:5000. Anticuerpos α-Pma1 obtenido del laboratorio del doctor Ramón Serrano fue empleados con una dilución 1:20.000. La señal de los inmunoblots fue detectado usando el kit de quimioluminiscencia de GE Healthcare empleando películas de Fujifilm.

1. **Análisis del perfil de crecimiento en medio líquido.**

Para realizar el estudio del perfil de crecimiento de mutantes que carecen de los miembros de las familias PDR y MRP y encontrar cual es la proteína que mayor implicación tiene a la resistencia a los azoles, se llevó a cabo un estudio de la cinética de crecimiento en presencia de estos compuestos utilizando cepas que tengan suprimidos estos genes disponibles de la colección del EUROSCARF. De esta colección se seleccionaron mutantes para los genes *PDR1, PDR3, PDR5, PDR10, PDR12, PDR15, PDR16, YOR1, YCF1, QDR1, AQR1, FLR1* y *SNQ2*. Se incluyeron genes de la familia MFP para comprobar su efectividad en la resistencia contra fluconazol y ketoconazol. Paralelamente se seleccionaron también mutantes para los genes de la ruta Rim101, en concreto *RIM8* y *RIM101*, para comprobar su sensibilidad a los azoles. También incluyó un WT como control. Todas estas cepas fueron crecidas en 1 ml de YPD toda la noche para obtener precultivos necesarios para inocular los medidos usados para cuantificar el crecimiento celular empleando el BioScreenC (Thermo Scientific). Aunque no pertenece a la familia de los PDR, *FLR* se sabe por la literatura que es un gen transportador de membrana perteneciente a la familia de proteínas *Major Facilitator Proteins,* y tiene también una función de resistencia a antibióticos (de hecho, el nombre del gen proviene de *Fluconazole Resistance*) (Alarco et al., 1997).

Se prepararon 3 medios diferentes para realizar el estudio, los cuales fueron medio YPD e YPD con una concentración subletal de ambos antifúngicos, en concreto, YPD con una concentración de ketoconazol de 1µM, (Voth et al., 2014) e YPD con una concentración de fluconazol de 200µM (Marques et al., 2015). Cada cepa se cultivó en los 3 medios, utilizando 3 réplicas técnicas de cada cultivo en cada medio. También se utilizó una fila con cultivo de YPD para comprobar que no hubiese contaminaciones. El volumen de cultivo por pocillo era de 350 µL. El inoculo de cultivo debía ser calculado para que la OD final de cada pocillo fuese 0,02. Se analizó el crecimiento de los cultivos durante 2 días en agitación midiendo automáticamente la densidad óptica de los cultivos cada 30 minutos. Para comprobar que el mantenimiento de los mutantes era reproducible y no era un suceso aislado se realizaron 3 réplicas biológicas para este experimento.

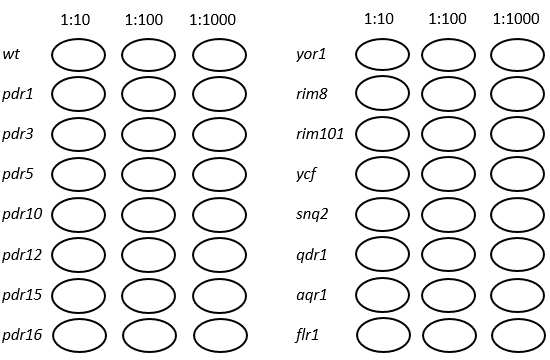


**Figura 3.1 Distribución de muestras en el ensayo de crecimiento en medio líquido**. En este esquema se muestra como se ubicaron los distintos cultivos en la placa multipocillo del BioScreenC.

Así mismo, para completar el estudio, se procedió a un análisis similar para una serie de genes regulados por el factor de transcripción Rim101 que están relaccionados con la estabilidad y el mantenimiento de la membrana celular, así como con el mantenimiento de la homeostasis de iones y el equilibrio osmótico, para así poder comprobar si alguno de estos genes puede estar relacionado con la sensibilidad a azoles y poder tener así hipótesis adicionales y continuar con el estudio. Así pues, se diseño un experimento similiar, pero se estudiaron las cepas mutantes en los siguientes genes: *QDR2, PLB2, GAS5, PHO89, FIT2, FIT3, ZTR1, CWP1, TPO1, TPO3, AQY2, PIL4, SCW10, ZFO1* y *RIM101* como control positivo para la sensibilidad en fluconazol*.* Al igual que en anterior se utilizaron concentraciones de1µM para cultivos tratados con ketoconazol y para los cultivos tratados con fluconazol una concentración de 200µM, realizándose también 3 réplicas técnicas para cada cepa en cada medio de cultivo. (Anexo). Como ya dijimos antes, entre estos genes se encuentran genes de la familia DHA, y también genes relacionados con la formación del sideroporo y su mantenimiento en la membrana *FIT2* y  *FIT3* (Philipot et al., 2002), *CWP1,* implicada en la resistencia a ácido propiónico (van der Vaart et al., 1995), *ZRT1*, implicado en el transporte de zinc (Zhao et al., 1996), PHO89, que codifica para un cotransportador de Na+/Pi (Martinez et al., 1998), AQY2, que codifica para una proteína aquaporina (Carbrey et al., 2001) y PIL1, implicado en la integridad de la pared celular (Zhang et al., 2004)

1. **Perfil de crecimiento en medio sólido.**

Se comprobó el crecimiento de estas cepas no sólo en medio líquido, sino también en medio sólido. Para ello, se prepararon una serie de placas con YPD en las cuales también se añadió una concentración subletal de estos azoles. En este caso, se realizaron placas de YPD sólido sin antifúngicos, 500 nM de ketoconazol, 1 µM de ketoconazol, 50 µM de fluconazol y 200 µM de fluconazol (Voth et al., 2015; Marques et al., 2014). Es importante remarcar que se debieron de dejar enfriar al medio YPD una vez autoclavado debido a que los azoles son termolábiles. En cada placa se crecieron las 16 cepas. Las diluciones de las células fueron preparadas en placas multipocillo, y se realizaron 3 diluciones seriadas, 1:10, 1:100 y 1:1000 de unos precultivos de estas levaduras que se crecieron durante la noche anterior. Se depositaron aproximadamente 3 µl de cada dilución con un replicador (Sigma). Las placas fueron incubadas durante 3 días a 28 ºC.



**Figura 3.2** **Distribución de las cepas en cada placa.** A la hora de realizar los goteos, los cultivos se colocaron en una placa multipocillos de 96 pocillos. De cada cultivo se realizaron diluciones seriadas. Fueron colocados consecutivamente para que a la hora de introducir el replicador que posteriormente pondremos sobre la placa de Petri, cojamos todas las cepas y diluciones y podamos cultivarlos todos a la vez.

1. **Diseño de cebadores de recombinación homóloga**

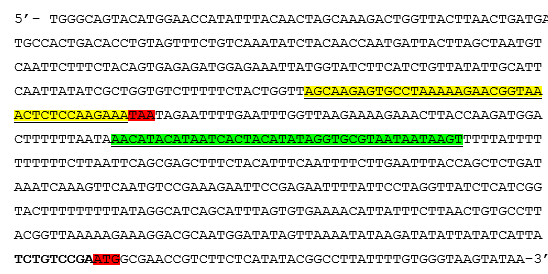
Para amplificar el cassette GFP::*HIS3* y permitir su inserción en el genoma de levadura, concretamente en el extremo 3’ de *PDR5*, se amplificó esta secuencia utilizando cebadores en los cuales se incluya el final de la secuencia de *PDR5* en el cebador directo y que esté en pauta de lectura (Longtine et al., 1998), y la secuencia inmediatamente posterior al final de la secuencia del gen, para permitir la inserción de este cassette y su expresión, ya que, al amplificar el cassette original de GFP::*HIS3*, en los extremos de éste se encontrarían estas secuencias y se generaría un sitio de recombinación homóloga, pudiendo insertarse en pauta este cassette, expresándose GFP unida a Pdr5 como proteína de fusión.

Estos cebadores son de gran tamaño, ya que tenían que incluir tanto secuencia propia del cassette como de la región del genoma en la cual se va a insertar. Por tanto, la secuencia es entre 40 y 60 pares de bases cada uno. El cassette está en el plásmido (pFAGa GFP-*HIS3* MX6) y la secuencia que debe usarse para amplificar este cassette ya está definida y es la siguiente

|  |  |
| --- | --- |
| Forward | 5’CGGATCCCCGGGTTAATTAA-3’ |
| Reverse | 5’GAATTCGAGCTCGTTTAAAC-3’ |

**Tabla 3.1 Secuencias de los cebadores utilizados para amplificar el cassette GFP::HIS3**

A estas secuencias se añade en su extremo 5’ las secuencias propias de la recombinación homóloga, que deben ser las secuencias complementarias del final del gen *PDR5* y de alguna región posterior de *PDR5* previa al inicio de otra secuencia génica, para evitar su disrupción. En la figura siguiente se muestra esta región comprendida entre el final de *PDR5* y la región inmediatamente aguas abajo. En rojo se resalta tanto el final del gen *PDR5* en primer lugar y posteriormente, el siguiente ATG, que marca el inicio de un posible nuevo gen. Por tanto, se utiliza la secuencia para la recombinación homóloga en la región comprendida entre el final del gen *PDR5* y el inicio del siguiente.



**Figura 3.3 Región 3' del gen PDR5 y región aguas abajo.** En rojo se representan tripletes de terminación del gen PDR5, así como el inicio de una nueva ORF, por lo que habrá que buscar el sitio de recombinación entre estos 2 tripletes. En amarillo se representan las últimas 40 bases de la secuencia de PDR5 que tenemos que usar inevitablemente para que GFP quede en pauta. En verde se representan la secuencia seleccionada para construir el cebador reverso, que se supone que es la que tiene unas características físico-químicas más similares a la seleccionada para el cebador directo.

Como ya hemos introducido antes, el cebador directo se va a construir utilizando como parte de la región genómica las últimas bases de la secuencia de *PDR5*. Es muy importante que se conserve la pauta de lectura para obtener una correcta expresión. El cebador reverso se construye con la parte final de la secuencia de *PDR5* que está resaltada en amarillo, la cual es de una longitud de unas 40 bases. Esta secuencia es fija, no tenemos que decidir entre varias, sólo la extensión que debe tener. Por el contrario, disponemos de cierto margen a la hora de escoger la región genómica para el cebador reverso. En esta región hemos de buscar la secuencia cuyas características sean las más similares a las de la región del cebador directo, es decir, que el porcentaje de CG, la temperatura de fusión, y la longitud de la secuencia sean lo más similares posibles. Estas características fueron analizadas con el software informático proporcionado por la web “Oligoanalyzer”. La secuencia usada está resaltada en verde.

|  |  |
| --- | --- |
| PDR5-REC-F | 5’-agcaagagtgcctaaaaagaacggtaaactctccaagaaaCGGATCCCCGGGTTAATTAA-3’ |
| [LENGTH:](https://eu.idtdna.com/analyzer/Applications/Instructions/Default.aspx?AnalyzerDefinitions=true#Length) | 60 |
| [GC CONTENT:](https://eu.idtdna.com/analyzer/Applications/Instructions/Default.aspx?AnalyzerDefinitions=true#GCContent) | 43.3 % |
| [MELT TEMP:](https://eu.idtdna.com/analyzer/Applications/Instructions/Default.aspx?AnalyzerDefinitions=true#MeltTemp) | 69.0 ºC |
| PDR5-REC-R | 5’-gaattctttcggacattgaactttgatttatcagagctggGAATTCGAGCTCGTTTAAAC-3’ |
| [LENGTH:](https://eu.idtdna.com/analyzer/Applications/Instructions/Default.aspx?AnalyzerDefinitions=true#Length) | 60 |
| [GC CONTENT:](https://eu.idtdna.com/analyzer/Applications/Instructions/Default.aspx?AnalyzerDefinitions=true#GCContent) | 38.3 % |
| [MELT TEMP:](https://eu.idtdna.com/analyzer/Applications/Instructions/Default.aspx?AnalyzerDefinitions=true#MeltTemp) | 66.3 ºC |

**Tabla 3.2 Diseño de cebadores de recombinación homóloga**. Diseño de cebadores necesarios para amplificar el cassette GFP-HIS3 e incluir en él las secuencias necesarias para la recombinación homóloga al final del gen PDR5. En mayúscula se marcan las secuencias propias del cassette y en minúscula las secuencias del sitio de recombinación homóloga.

1. **Obtención del cassette GFP::*HIS3***

El método de obtención del cassette con los extremos adecuados para realizar la recombinación homóloga consiste en realizar una amplificación con los cebadores diseñados para que incluyan estos extremos. La reacción de amplificación PCR fue diseñada según los parámetros de temperatura de fusión que indican el análisis con el software Oligoanalyzer. El cassette se encuentra localizado en el plásmido pFAGa GFP-*HIS3* MX6, el cual se hallaba en una concentración de 200 ng/µl. En la reacción se utilizó una temperatura de anillamiento de 55ºC durante 30’’ y se dejó un tiempo largo de extensión, de 2’ y a una temperatura de 72 ºC, realizándose como mínimo 40 ciclos de reacción. La polimerasa utilizada fue la polimerasa de alta eficiencia Phusion, la cual genera copias de alta fidelidad para reducir al máximo la introducción de mutaciones no deseadas.

1. **Recombinación mediante transformación.**

La recombinación homóloga del cassette GFP::*HIS3* fue llevada a cabo mediante una transformación simple con acetato de litio. La recombinación se llevó a cabos en 3 cepas distintas, WT, *rim8* y *rim101*, obtenidos de la colección y derivados de la cepa de levadura BY4741. Se realizaron 2 cultivos en medio líquido selectivo sin histidina de cada cepa, uno sirvió como control negativo y otro como sujeto del experimento. Los tubos fueron suplementados con solución PLATE (40% PEG-4000 (p/v), 100mM de acetato de litio (LiAc), 10mM Tris pH 7.5, 0.4 mM EDTA). En cada tubo se añadió 5 µL ssDNA, 0,5 L de PLATE, y en los positivos 10 µL del producto de PCR y completo el volumen hasta 50 L con agua miliQ. Los cultivos se incubaron durante toda la noche a 28ºC y al día siguiente, se calentaron durante 15’ a 42ºC, y después se enfrió 2 min en hielo y se centrifugo durante 2 minutos a 13000 rpm. El pellet se resuspendió en agua miliQ y se plaqueó en placas de medio selectivo SD sin histidina. Las placas se dejaron crecer durante 6 días a 28ºC. Una representación del proceso de integración del cassette se encuentra en los Anexos. Las cepas generadas con este abordaje se nombran de la siguiente forma:

BY4741 *PDR5*-GFP::*HIS3*

BY4741 *rim8* *PDR5*-GFP::*HIS3*

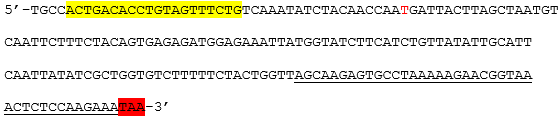
BY4741 *rim101* *PDR5*-GFP::*HIS3*

1. **Comprobación de la recombinación homóloga**

Para comprobar la eficiencia de este método y que el cassette se integró correctamente en el sitio deseado de recombinación, se llevó a cabo una extracción de DNA genómico de nuestras cepas obtenidas en la recombinación homóloga. La correcta inserción del cassette se comprobó por PCR utilizando 2 tipos de cebadores, uno de ellos, el directo, está en la región genómica adyacente al sitio de recombinación y el reverso en el inserto, así, si se obtiene producto, podemos concluir que se ha producido una recombinación homóloga en el sitio correcto.

Para la extracción de DNA se resuspendieron células crecidas en medio selectivo sin histidina en una solución compuesta por “Protoplast buffer” (100 mM tris HCl 7,5 pH, EDTA 10 mM, 0,2 mg/ml zymolyase, 10 µl β-Mercaptoetanol/ml) y “lysis buffer” (NaOH 0,2 M, 1% SDS).

Una vez extraído el DNA genómico, se pasó a realizar la PCR. Para ello, buscamos en la región final de *PDR5* una secuencia que tuviese unas características similares al cebador reverso, lo cual estaba ya disponible en el laboratorio.



**Figura 3.4 Región final de PDR5. Diseño de cebadores de comprobación**. En amarillo se refleja la secuencia seleccionada como cebador directo para la PCR de comprobación. En rojo se muestra el final de PDR5, y por tanto, el límite para la selección de este primer.

Una vez seleccionada la secuencia, se pasó a comprobar las características de cada uno. Hay que remarcar que el cebador reverso llevaba acoplada también la secuencia de corte de *Eco*RI, pero debido a que esta no va a hibridar en el genoma no era necesario tenerla en cuenta a la hora de realizar las comparaciones de características en el software informático.

|  |  |
| --- | --- |
| PDR5-3’-F | 5'- ACT GAC ACC TGT AGT TTC TG -3' |
| EcoRI-GFP 3’ | 5’- TAAAATAGAATTC TTTGTATAGTTCATCCATGCC-3’ |

**Tabla 3.3 Cebadores utilizados en la PCR de comprobación de la inserción del cassette.**

La PCR se realizó utilizando como molde el DNA genómico extraído de las cepas transformadas y el mismo DNA pero diluido 20 veces. Se utilizó una temperatura de anillamiento de 52ºC y un tiempo de extensión de 2 minutos a 72 ºC.

1. **Microscopía confocal. Comprobación de la aparición de fluorescencia.**

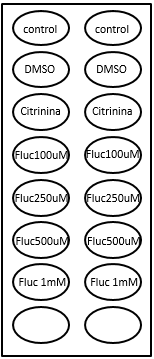
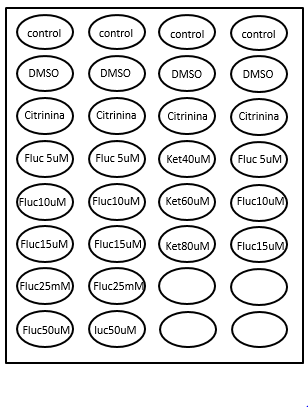
Las imágenes de fluorescencia se obtuvieron sobre células vivas en fase exponencial empleando un microscopio confocal Zeiss 780 con un objetivo plan acromático 40X aceite/1.3 de apertura numérica (Yenush et al., 2005). Las muestras se excitaron a 488nm y la emisión GFP se recogió en un rango de entre 510 y 550 nm (software ZEN 2012). Se seleccionó para este experimento las cepas WT, *rim8* y *rim101*, transformadas con el cassette GFP-*HIS3*ya que interesaba comprobar que realmente se había producido una correcta integración en el genoma de la secuencia codificante de GFP al final del gen *PDR5*, así como comprobar si era posible realizar una inducción de este gen con algún compuesto antifúngico. Las cepas fueron cultivadas en medio SD selectivo sin Histidina, para así permitir que sólo las levaduras con el inserto pudiesen crecer. Se prepararon 2 cultivos de cada uno, uno con tratamiento y otro sin tratamiento, así como una réplica biológica para cada uno. Se obtuvieron unos volúmenes de 10 ml. Al llegar a la OD595 0,4 se añadió citrinina en los tubos destinados a recibir tratamiento con una concentración de 200 ppm (stock 20.000 ppm). Los volúmenes de los cultivos se centrifugaron y se resuspendieron de nuevo en SD pero en 500 μL.

Con el fin de comprobar la localización celular de la proteína Pdr5-GFP se prepararon 3 cultivos líquidos en medio completo YPD en matraz de 10ml cada uno con las 3 cepas transformadas,

BY4741 *PDR5*-GFP::*HIS3, rim8*: BY4741 *rim8* *PDR5*-GFP::*HIS3, rim101*: BY4741 *rim101* *PDR5*-GFP::*HIS3*De cada cultivo se obtuvieron 4 eppendorfs de 1,2 ml de volumen para aplicar los distintos tratamientos en concentraciones subletales para permitir una inducción del gen *PDR5* con citrinina (200ppm) fluconazol (200 µM) y ketoconazol (40 µM) una vez que los cultivos hubiesen alcanzado una OD595 de 0,4. Tras permitir un tiempo de inducción de al menos 1,5 horas, se centrifugan los cultivos para tenerlas más concentradas para observar al microscopio.

1. **Fluorimetría**

Se cultivaron las cepas BY4741 *PDR5-*GFP*::HIS3* en medio líquido completo YPD en un volumen de 15 ml, creciendo los cultivos hasta una OD595 de 0,5, es decir, a la fase logarítmica de crecimiento. Se usaron 2 réplicas biológicas para cada tratamiento. Al llegar a la OD, se concentran en un volumen de 3,5 ml en medio mínimo SD, ya que este medio no interfiere con la fluorescencia. En cada pocillo se depositan 200 µL de cultivo, y se seleccionan tantos pocillos como diferentes concentraciones de tratamientos vayamos a utilizar. Tres tratamientos fueron realizados con antifúngicos, fluconazol, y ketoconazol, cada uno a distintas concentraciones, fluconazol a 5, 10, 15, 25 y 50 µM y ketoconazol a 40, 60 y 80 µM diluidos ambos en DMSO (Voth et al., 2014). Igualmente, uno de los pocillos se reservó para un control positivo con la micotoxina citrinina a una concentración de 200 ppm, la cual está comprobado que estimula la expresión de *PDR5*. Posteriormente también se realizó otro ensayo de fluorimetría aumentando la concentración de fluconazol a 100, 250, 500 y 1000 µM. En cada pocillo se añadía el tratamiento antifúngico a la concentración adecuada, además de añadir en uno un volumen de DMSO equivalente al del tratamiento con mayor concentración. Las lecturas fueron tomadas por el fluorímetro Glomax Multi Detection System de la casa Promega, misma casa proveedora de los filtros de fluorescencia, de los cuales utilizamos el filtro de excitación 490 nm y emisión 510-170 nm durante 200 minutos.



**Figura 3.5 Distribución de cultivos en el ensayo de fluorimetría**

1. **Electroforesis de proteínas y *Western Blot***

Se prepararon 3 cultivos líquidos en medio completo YPD de cada cepa de levadura (BY4741 *PDR5-*GFP*::HIS3*, BY4741 *rim8*::kanMX *PDR5-*GFP*::HIS3,* BY4741 *rim101*::kanMX *PDR5-*GFP*::HIS3* ,) en matraces, en un volumen de 10 ml. Tras alcanzar una OD595 de 0,4 se separaron en eppendorf unos volúmenes de cultivo de 5 ml y se realizaron los tratamientos para permitir la inducción de Pdr5 con citrinina (200 ppm) fluconazol (200 µM) y ketoconazol (40 µM) a cada cepa durante 2 horas, además de un control negativo sin tratamiento. Tras este tratamiento, se centrifugaron los tubos a máxima velocidad durante 4 minutos y se desechó el sobrenadante. Tras ello, se resuspendió el pellet en medio Laemmli (3,8 % SDS, 0.05M dithioeritritol, 5mM EDTA, 15% sacarosa, 0.125 mg/ml azul de bromofenol, 0.15M Tris HCl ajustado a pH 6.8) en un volumen de 50 µL y se le calentó durante 5 minutos a 95ºC.

Se preparó un gel SDS-PAGE al 8% de acrilamida-bisacrilamida. Estos geles están divididos en 2 zonas, una superior de empaquetamiento (6% acrilamida:bisacrilamida 30:0.8, 125mM Tris-HCl pH 6.8 y 0,1% SDS) y una zona inferior de resolución o separación (8% acrilamida:bisacrilamida 30:0.8, 375mM Tris-HCl pH 8.8 y 0,1% SDS). El tampón utilizado fue SDS-PAGE 1X (0.19 M glicina, 0,1% SDS, pH ajustado a 8.3 con Tris). El voltaje para la primera zona del gel fue de 80V y en la segunda parte fue de 120V. En cada pocillo del gel se introdujeron 25 µL de la solución con Laemmli. Debido al elevado tamaño de la proteína se dejó correr el gel hasta una hora después de la salida del frente azul de Laemmli.

Una vez separadas las proteínas en el gel, se realizó una electrotransferencia a una membrana de nitrocelulosa (Millipore), utilizando el set Mini-Trans Blot (BioRad) y el tampón TOWBIN (0.19 M glicina, 0,01% SDS y 20% metanol, ajustando el pH a 8.3 con Tris). La transferencia se realizó a 4ºC durante 2 horas a un voltaje constante de 120V y al acabar, se procedió a teñir con la solución Direct Blue (Aldrich Chemistry) en agitación, eliminar el exceso de colorante con Solución de Lavado (40% etanol absoluto (v/v) y 10% ácido acético glacial (v/v). Una vez comprobada la carga de proteína y capturada la imagen, se eliminó el colorante con la Solución Decolorante de Direct Blue (50% etanol absoluto, 1M bicarbonato sádico (NaHCO3)).

1. **Inmunodetección de proteínas transferidas a membrana**

En primer lugar se hubo de bloquear los sitios de unión inespecíficos de la membrana con leche desnatada en polvo disuelta en tampón TBS (0,1% Tween 20, 150 mM NaCl y 20 mM Tris-HCl pH 7.6) al 2% durante media hora en agitación. Seguidamente se añadió el anticuerpo primario α-GFP a la dilución adecuada (Tabla 3.4).

|  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| **Anticuerpo Primario** | **Proveedor** | **Dilución** | **Anticuerpo Secundario** | **Proveedor** | **Dilución** |
| α-GFP | Roche | 1:5000 | α-HRP-*Mouse* | Amersham | 1:10000 |
| α-Pma1 | *Home made* (R. Serrano) | 1:20000 | α-HRP-*Rabbit* | Amersham | 1:5000 |

**Tabla 3.4 Anticuerpos utilizados en la inmunodetección.** En la tabla se muestran igualmente las casas comerciales productoras de cada anticuerpo, así como la dilución a la cual se recomiendo utilizar los anticuerpos

La membrana se dejó en agitación durante toda la noche a 4ºC después de añadir 10 mL de leche en polvo disuelta en TBS y el anticuerpo primario α-GFP, el cual se unirá a la porción GFP específicamente de nuestra proteína de fusión. Al día siguiente, se eliminó la leche con el anticuerpo primario y se lavó la membrana con 10 mL de TBS por 3 veces. Después se volvió a añadir 10mL de leche con el anticuerpo secundario α-Mouse el cual se unirá al anticuerpo primario específicamente, diluido según se indica en la Tabla 3. Tras dejar incubar durante 1 hora, se volvió a lavar con solución TBS por 3 veces para eliminar el exceso de anticuerpo secundario. La detección del anticuerpo secundario se realizó con el kit de quimioluminiscencia ECL Plus Western Blotting Detection System (Amersham Biosciences). La señal se detectó usando películas de rayos X de la casa Fujifilm.

Para comprobar que el resto de proteínas se han conservado en buen estado, vamos a volver a incubar nuestra membrana con un anticuerpo que permita detectar otra proteína de membrana, en este caso lo vamos a mirar para la proton ATPasa Pma1. Para ello, realizamos un protocolo de *Stripping* para liberar los anticuerpos unidos y poder volver a realizar una inmunodetección. Para ello se incubó la membrana en una estufa a 50ºC con una agitación manual cada 5 minutos en un medio compuesto por SDS 2%, 62,5 mM Tris-HCl pH 6,8 y 100 mM β-mercaptoetanol.

Tras este tratamiento realizamos de nuevo lavados con TBS durante 10 minutos en el balancín 3 veces, y volveremos a añadir leche para bloquear durante media hora, y después, leche con el nuevo anticuerpo primario α-Pma1, el cual se unirá a la proteína de membrana Pma1 específicamente, y se lo dejará incubando durante toda la noche a 4ºC en una dilución 1:20.000

Al día siguiente se lava con TBS de nuevo y se añade la leche con el anticuerpo secundario α-*Rabbit* en una dilución 1:5000, el cual se va a unir específicamente a α-Pma1. Después volvemos a lavar y añadimos la solución de revelado durante 5 minutos y procedemos a revelar cómo se describe anteriormente.

*RESULTADOS*

1. **Análisis del perfil de crecimiento en medio líquido de genes de las familias PDR, MRP y Rim101**

Hemos analizado la cinética del crecimiento de nuestro set de cepas con genes suprimidos que codifican para transportadores de las familias PDR y MRP o la ruta Rim101, como se describe en Materiales y Métodos. Estas cepas se obtuvieron de la colección de mutantes EUROSCARF. Los ensayos se realizaron en medio líquido YPD, YPD + ketoconazol (1μM) e YPD + fluconazol (200μM) para obtener un perfil de crecimiento que nos muestre la sensibilidad de cada cepa al tratamiento con azoles. Para cada cepa en cada medio de cultivo se realizaron 3 réplicas técnicas. Igualmente, se llevaron a cabo 3 réplicas biológicas para comprobar que los comportamientos se mantenían y no variaban entre un experimento y otro. El experimento se extendió por 2 días, siendo la OD de cada pocillo medida en el aparato BioscreenC cada media hora y en agitación constante. Los datos fueron validados mediante un análisis de la desviación estándar entre las réplicas técnicas, aceptándose los datos cuyos valores de desviación no superasen un 10% del valor del dato. La corrección de fondo se realizó restando a todos los valores el valor inicial (a tiempo 0) y sumando el valor de la OD calculada en este tiempo, el cual era 0,02.

**Figura 4.1 Perfil de crecimiento del set de cepas en medio YPD**

**Figura 4.2. Perfil de resistencia del set de cepas en presencia de Ketoconazol en medio YPD a una concentración 1 M**

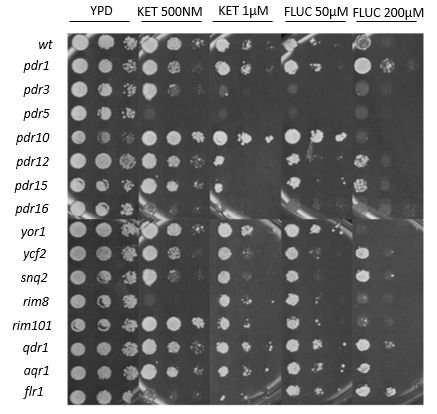
**Figura 4.3 Perfil de resistencia del set de cepas en medio YPD con una concentración de Fluconazol 0,2 mM**

Como podemos observar, la mayoría de cepas en medio YPD tiene una cinética de crecimiento muy similar a la cepa sin ninguna mutación. Sin embargo, la cepa mutante *pdr5* ya presenta un retraso ligero tanto en el crecimiento como en la cantidad final de biomasa.

En el caso de añadir ketoconazol, podemos observar como el crecimiento de una serie de cepas se encuentra dramáticamente afectado tanto en la cinética de crecimiento como en la cantidad final de cultivo producida. Son las cepas mutantes para los genes *pdr1*, *pdr3*, *pdr5*, *yor1*, y *flr1*. En el caso del fluconazol, la supervivencia se ve aún más comprometida. En este caso se observan afectadas las cepas *pdr3*, *pdr5*, *rim101*, y *flr1* tanto en su cinética como en su rendimiento final, y *pdr1*, *pdr3* e *ycf1* se ven afectados en su cinética de crecimiento, aunque al final consiguen llegar a una concentración de cultivo similar a la de la cepa control y otras cepas que no se ven afectadas.

1. **Análisis del perfil de crecimiento en medio sólido de genes de las familias PDR, MRP y Rim101**

Este experimento se llevó a cabo para comprobar que el comportamiento de los mutantes del experimento anterior se mantenía constante, independientemente de que el estudio se realizase en medio líquido o medio sólido. Para ello, se realizaron cultivos en medio YPD sólido sin tratar y con tratamientos con azoles, en este caso los tratamientos con ketoconazol fueron de 500nM y 1μM (Voth et al., 2014), y en el caso de fluconazol de 50μM y 200 μM (Marques et al., 2015). De cada cepa en cada cultivo se realizaron diluciones seriadas del cultivo inicial. El resultado se obtuvo tras dejar crecer los cultivos durante 5 días. Podemos confirmar que el gen *PDR5* sigue el mismo comportamiento que en medio líquido y que es uno de los más importantes para conservar la viabilidad de las células en presencia de antifúngicos. Así mismo, los genes de la ruta Rim, *RIM8* y *RIM101*, se muestran indispensables en el caso de una concentración elevada en el medio de fluconazol.



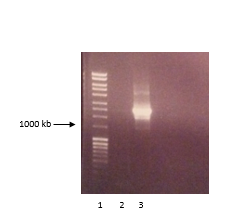
**Figura 4.4 Perfil de sensibilidad de los mutantes en medio sólido**. Resultado del crecimiento en medio sólido de las cepas mutantes en presencia de distintos tratamientos con antifúngicos.

Al contrario que en el experimento en medio líquido, aquí parece ser que *PDR3* se muestra como el factor de transcripción que más imprescindible resulta, en lugar de *PDR1. FLR1* también resulta esencial como ya se describió en la bibliografía. Es llamativo que las cepas donde no se expresa el gen *PDR16* muestra en este experimento una acusada sensibilidad, de una magnitud similar al mutante para *PDR5*, que no se ve reflejada en el experimento en medio líquido. A elevadas concentraciones, parece ser que los mutantes para homólogos de *PDR5, PDR10 y PDR15* son también imprescindibles para la supervivencia celular, pero no se conoce muy bien la causa por la cual a estas concentraciones sí que parecen tener una función necesaria para la supervivencia celular (Wolfger et al., 2001).

Juntando los datos de estos dos análisis, aunque los dos métodos no generan resultados idénticos, podemos confirmar que el mutante *pdr5* es el más sensible a los compuestos antifúngicos analizados. Estos datos sugieren que este transportador es el más importante para la resistencia a estos compuestos y por tanto, será elegido para los análisis posteriores.

1. **Amplificación del cassette GFP::*HIS3***

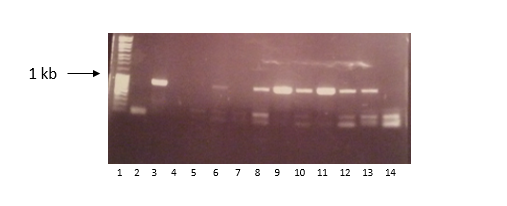
El siguiente abordaje era investigar si la sensibilidad de los mutantes en la ruta Rim101 a compuestos antifungicos se puede explicar por un defecto en la inducción y/o localización del transportador Pdr5 en la membrana plasmática. Para ello, procedemos a marcar este transportador con una proteína fluorescente para facilitar la visualización de su distribución subcelular y la acumulación de la proteína. Para lograr marcar la proteína Pdr5 con la proteína fluorescente GFP, integramos un cassette en el genoma de manera dirigida por recombinación homóloga (ver Materiales y Métodos). Para ello, era necesario obtener el inserto con los extremos compatibles para el sitio de interés de la recombinación homóloga. Así pues, se realizó una amplificación del inserto utilizando cebadores que incorporasen a este inserto las secuencias de los sitios de integración. La amplificación del cassette por PCR se produjo de una manera exitosa, ya que se estimaba un tamaño de más de 2 kb, que es el peso estimado de los genes que componen este cassette.



**Figura 4.5 Producto de PCR resultante de la amplificación del cassette GFP::HIS3**. Pocillo 1: estándar de peso molecular de DNA, Pocillo 2: control negativo de la reacción, Pocillo 3: producto de la reacción.

1. **PCR de comprobación de la recombinación homóloga**

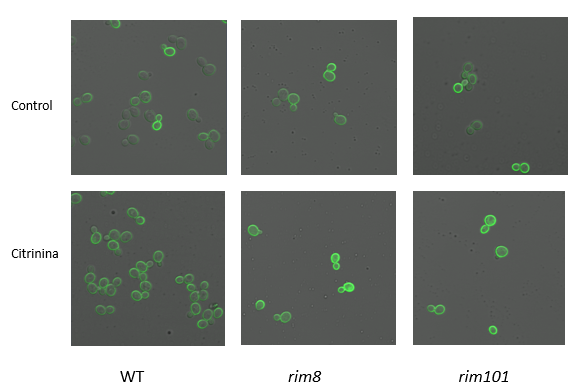
Empleamos una estrategia de PCR genómico para comprobar la correcta inserción del cassette en el genoma de cada cepa utilizada. Tras extraer el DNA genómico de las cepas transformadas y realizar una PCR con los cebadores diseñados específicamente para comprobar la integración del cassette GFP::*HIS3* aguas abajo de *PDR5*, se realizó un gel de agarosa para comprobar el resultado de esta reacción. Como se puede comprobar, se obtiene un producto de 1kb que se corresponde con el tamaño del producto que debería detectarse, es decir, GFP más 196 bp de la secuencia de la región 3’ del gen *PDR5*.



**Figura 4.6 Resultado de la PCR de comprobación de las cepas de levadura transformadas.** Pocillo 1: estándar de peso molecular de DNA, Pocillo 2: control negativo, Pocillos 3 y 4: producto de la amplificación del DNA genómico obtenido de la cepa WT, Pocillos 5 y 6 producto de la amplificación del DNA genómico obtenido de la cepa rim8 transformada, Pocillos 7 y 8: producto de la amplificación del DNA genómico obtenido de la cepa rim101 transformada. En los 6 siguientes se encuentran los productos obtenidos por los mismos genómicos, pero diluidos 20 veces antes de realizar la reacción PCR.

1. **Resultado del ensayo de microscopía confocal**.

Para comprobar la función de la integración de GFP al final del gen *PDR5* y la producción de una proteína de fusión en cada cepa generada, realizamos experimentos de microscopia confocal. Para obtener estas muestras se cultivaron células de las cepas WT *rim8* y *rim101* transformadas con el cassette GFP::*HIS3* en medio con citrinina. En las imágenes observamos claramente la presencia de GFP en la membrana celular de las levaduras en las 3 cepas (WT, *rim8* y *rim101* que contienen GFP insertado en el extremo 3’ de *PDR5)* tanto con tratamientos como el control. Empleamos la citrinina en este experimento ya que desconocíamos si el nivel de expresión de Pdr5 sería lo suficientemente alto para poder detectar la proteína. Se puede observar que la recombinación homóloga ha tenido éxito en los tres fondos genéticos, ya que la señal de GFP se observa en la membrana plasmática, como se espera para una fusión con la proteína Pdr5.



**Figura 4.7 Microscopía confocal de las cepas** BY4741 PDR5-GFP::HIS3, BY4741 rim8::kanMX PDR5-GFP::HIS3, BY4741 rim101::kanMX PDR5-GFP::HIS3 **tratadas con citrinina.** Observación al microscopio confocal de las tres cepas transformadas en medio YPD sin tratamiento y medio YPD con citrinina tras esperar 2 horas después de esta inducción.

1. **Ensayo de fluorimetría.**

El siguiente reto era determinar si el gen *PDR5* se induce por en presencia de distintos antifúngicos. Para estudiar esto, empleamos la cepa silvestre que incorpora la secuencia de GFP al final del gen *PDR5*. De esta manera, si se induce el gen, se debe poder detectar un incremento en la acumulación de la proteína Prd5-GFP por fluorimetría. Para ello, se realizó un ensayo fluorimétrico con la cepa BY4741 *PDR5*-GFP::*HIS3*, y obtuvimos los siguientes resultados. Con el fin de poder medir este incremento, se llevaron cultivos de las 2 cepas a la fase exponencial y después se resuspendieron las células en medio transparente, para evitar interferencias en la medición de fluorescencia, y en ese medio fueron llevados a cabo los tratamientos (ver Materiales y Métodos). Los resultados se presentan normalizando a 1 la fluorescencia producida por la cepa control en medio SD sin tratamiento antifúngico, para así ver con claridad si se producía una inducción con respecto al estado de normalidad. Se observó que el mejor tratamiento para inducir la fluorescencia era la citrinina, que producía un elevado incremento en la fluorescencia relativa. Igualmente, el ketoconazol conseguía levemente estimular la expresión del gen. Sin embargo, en presencia de fluconazol, tanto en altas como en bajas concentraciones, esta inducción no se consiguió, de hecho, se obtuvieron menores señales de fluorescencia, producida posiblemente por el alto nivel de DMSO que estábamos introduciendo.

**Figura 4.8 Fluorescencia vs t de la cepa BY4741 PDR5-GFP::HIS3 en presencia de fluconazol (dosis bajas).**

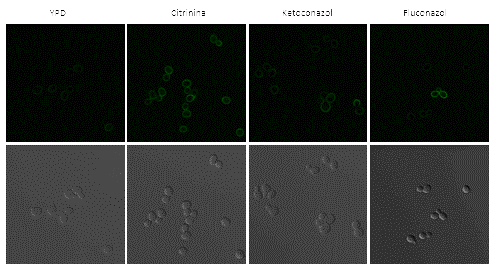
**Figura 4.9. Fluorescencia vs t de la cepa BY4741 PDR5-GFP::HIS3 en presencia de fluconazol (dosis altas)**

**Figura 4.10. Fluorescencia vs t de la cepa BY4741 PDR5-GFP::HIS3 en presencia de ketoconazol**

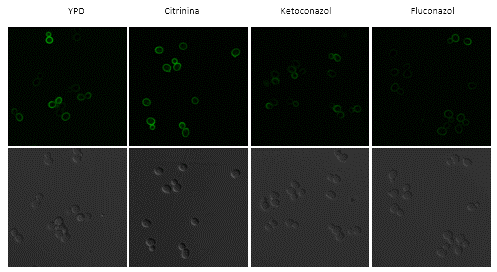
Estos resultados indican que la inducción de la expresión de la proteína Pdr5 (y muy probablemente la expresión génica de *PDR5*) no está relaccionada con la presencia en el medio de los azoles en cuestión a las concentraciones indicadas. Comprobamos gracias a la citrinina que el sistema de regulación de este gen no se encuentra afectado, ya que en el tratamiento con ella sí que se observa una clarísima inducción de la acumulación de la proteína (y por tanto, probablemente la expresión génica) en respuesta a la presencia de este compuesto en el medio extracelular. De hecho, se observa incluso una menor fluorescencia en relación con la cepa sin tratar posiblemente debido al efecto adverso del DMSO, ya que, si nos fijamos bien, el valor de la fluorescencia y su variación en el control de DMSO y la cepa con mayor cantidad de tratamiento diluido en DMSO es similar, indicando que a mayor cantidad de DMSO menos fluorescencia. A la luz de estas conclusiones, podemos deducir que la regulación transcripcional no es la causa que explica la falta de función de Pdr5, ya que no se encuentra comprometida con la cantidad de Pdr5 que llega a la membrana.

1. **Resultados de la observación al microscopio de las BY4741 *PDR5*-GFP::*HIS3*, BY4741 *rim8*::kanMX *PDR5*-GFP::*HIS3*, BY4741 *rim101*::kanMX *PDR5*-GFP::*HIS3* tratadas con fluconazol, ketoconazol y citrinina.**

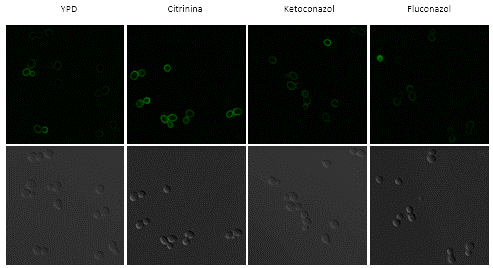
Tras la observación de que ni fluconazol ni ketoconazol induce la acumulación de Pdr5-GFP, pudimos descartar un papel para la regulación transcripcional en la resistencia de estos compuestos. Por tanto, examinamos la localización subcelular de Pdr5-GFP en la cepa silvestre y en los mutantes *rim8* y *rim101*. Postulamos que la sensibilidad de estos mutantes podría deberse a una mislocalización de este transportador de la familia ABC. Este experimento se llevó a cabo utilizando la tecnología de la microscopía confocal de fluorescencia, en la cual se pueden observar ciertas estructuras subcelulares y combinar esta observación con la de la fluorescencia producida por la GFP. De ocurrir una mislocalización de la proteína se podría observar abundante fluorescencia en el citoplasma en las cepas *rim8*::KanMX *PDR5*-GFP::*HIS3* Y *rim101*::KanMX *PDR5*-GFP::*HIS3* en contraste con la línea *wt.* Como se indica en el apartado de Materiales y Métodos, para obtener las muestras a observar se cultivaron las 3 cepas en cuestión (BY4741 *PDR5*-GFP::*HIS3* BY4741 *rim8*::KanMX *PDR5*-GFP::HIS3 Y BY4741 *rim101*::KanMX *PDR5*-GFP::*HIS3*) en 4 medios diferentes, uno de ellos YPD sin tratar, y los otros 3 tratados respectivamente con citrinina (200ppm) ketoconazol (1μM) y fluconazol (200μM) durante 2 horas una vez alcanzaron la fase de crecimiento exponencial. Los resultados es este análisis se muestran en las siguientes figuras.



**Figura 4.11 Microscopía confocal de la cepa BY4741 PDR5-GFP::HIS3 y tratada con citrinina (200 ppm) ketoconazol (40 µM) y fluconazol (200 µM).**



**Figura 4.12 Microscopía confocal de la cepa BY4741 rim8 PDR5-GFP::HIS3 y tratada con citrinina (200 ppm) ketoconazol (40 µM) y fluconazol (200 µM).**

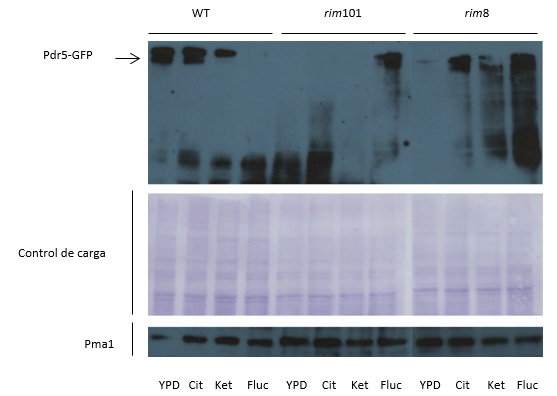


**Figura 4.13 Microscopía confocal de la cepa BY4741 rim101 PDR5-GFP::HIS3 y tratada con citrinina (200 ppm) ketoconazol (40 µM) y fluconazol (200 µM).**

En las distintas imágenes lo que observamos son las células de las distintas cepas tratadas con los antifúngicos citrinina (200 ppm) ketoconazol (40 µM) y fluconazol (200 µM). En todas ellas Pdr5-GFP está correctamente localizado en la membrana, aunque en algunas células puede observarse cierta señal en el interior de las células. No se observa una inducción fuerte ni en fluconazol ni en ketoconazol, no obstante en citrinina sí que puede observarse bien una inducción con respecto al YPD en las 3 cepas. El hecho de que se observa Pdr5-GFP localizado principalmente en la membrana plasmática, muy similar al observado para la cepa control, indica que es improbable que la sensibilidad a estos compuestos antifúngicos observada para los mutantes *rim8* y *rim101* se deba a la mislocalización de Pdr5.

1. **Inmunodetección de Pdr5-GFP**

Para complementar el análisis anterior, decidimos determinar la cantidad e integridad de la proteína de fusión Pdr5-GFP en las cepas empleadas, realizamos un experimento de inmunodetección. Analizamos la cantidad de Pdr5-GFP en extractos crudos de las cepas estimuladas con azoles y citrinina empleando un anticuerpo específico para la GFP. En la imagen podemos observar los resultados de este análisis, como el control de carga de la membrana realizado antes de comenzar la inmunodetección, así como la inmunodetección de Pma1 que empleamos como un control para comprobar la integridad del resto de proteínas. El proceso completo se encuentra descrito con detalle en el apartado Materiales y Métodos.



**Figura 4.14 Western Blot.** Western Blot de Pdr5-GFP, control de carga del mismo, y Western Blot de Pma1 para comprobar la integridad del resto de proteínas de membrana.

En nuestros resultados podemos comprobar que la proteína Pdr5-GFP se encuentra bien expresada y en buen estado en la cepa control, en presencia de los 4 tratamientos, aunque paradójicamente se detecta menos proteína en las cepas tratados con ketoconazol y fluconazol. Estos resultados concuerdan con los experimentos de microscopia confocal y de fluorimetría descritos arriba. En el mutante *rim8* se puede observar la proteína también en la altura esperada, pero a lo largo del carril se detectan productos de degradación de Pdr5-GFP, por lo cual aparece GFP a lo largo de todo el carril. Este suceso es aún más acusado en la cepa *rim101*, en la cual apenas aparece proteína en la altura esperada y todo el producto de degradación aparece mucho más abajo. Estos resultados indican que la proteína Pdr5-GFP, pero no Pma1 es muy inestable, especialmente en el mutante *rim101*.

1. **Análisis de crecimiento en cultivo líquido de genes dependientes del factor de transcripción Rim101 y relacionados con la tolerancia a fluconazol**

Aunque nuestros resultados del inmunodetección indican que la proteína Prd5-GFP es inestable en los mutantes *rim8* y *rim101*, quisimos completar nuestro análisis incluyendo una serie de mutantes en genes cuya expresión está regulada por el factor de transcripción Rim101 y cuya función está relacionada con la tolerancia a fluconazol. Empleando la información disponible en el *Saccharomyces Genome Data Base* (http://www.yeastgenome.org/), elegimos genes cuya expresión está alterada en microarrays comparando la cepa silvestre y el mutante *rim101*. Elegimos los genes de esta lista que también aparecen en la lista de mutantes que presentan sensibilidad a fluconazol o que tienen fenotipos relacionados con el transporte de iones y/o la pared celular. Hemos analizado la cinética del crecimiento de nuestro set de cepas con genes suprimidos esenciales en la formación y el mantenimiento de la membrana en medio líquido YPD, YPD + ketoconazol (1μM) e YPD + fluconazol (200μM) para obtener un perfil de crecimiento que nos muestre la sensibilidad de cada cepa al tratamiento con azoles. Para cada cepa en cada medio de cultivo se realizaron 3 réplicas técnicas. Igualmente, se llevaron a cabo 3 réplicas biológicas para comprobar que los comportamientos se mantenían y no variaban entre un experimento y otro. Los datos fueron validados mediante un análisis de la desviación estándar entre las réplicas técnicas, aceptándose los datos cuyos valores de desviación no superasen un 10% del valor del dato. La corrección de fondo se realizó restando a todos los valores el valor inicial (a tiempo 0) y sumando el valor de la OD calculada en este tiempo, el cual era 0,02.

**Figura 4.15. Análisis del perfil de crecimiento en medio líquido YPD**

**Figura 4.16. Análisis del perfil de crecimiento en medio líquido YPD tratado con ketoconazol 1uM**

**Figura 4.17. Análisis del perfil de crecimiento en medio líquido YPD tratado con ketoconazol 1uM**

En base a este experimento podemos extraer la conclusión de que esta serie de genes no juegan un papel importante en la resistencia a fluconazol, ya que en ningún caso ningún mutante para estos genes demuestra una gran sensibilidad a fluconazol. Es claramente notorio que el crecimiento en todas las cepas mutantes se ve afectado con respecto a la cepa WT en presencia de azoles, sin embargo no es tan acusado como en el caso de *rim101*. Por tanto, estos resultados refuerza la conclusión anterior de que el efecto más importante que contribuye a la sensibilidad de los mutantes de la ruta Rim a azoles podría ser la inestabilidad del transportador de la familia ABC, Pdr5, en lugar de estar relacionada con la falta de función de alguno de estos genes.

*DISCUSIÓN*

En este proyecto, el principal objetivo era establecer una nueva diana terapéutica en una ruta no homóloga a seres humanos, que permitiese comprometer la resistencia de las levaduras a los azoles, para utilizarla combinada con estos compuestos para disminuir la dosis que han de tomar los pacientes, así como salvar las dificultades que las cepas resistentes a azoles pueden suponer para pacientes de Candidemia.

Como hemos visto en la introducción, se ha demostrado que los mutantes en la ruta específica de Fungi para la señalización de pH alcalino, Rim101 están implicados de alguna manera en la resistencia a azoles, ya que mutantes para genes de esta ruta presentan sensibilidad. Sin embargo, no está claro a qué se debe esta sensibilidad, si afecta a la integridad de la membrana celular, a la ruta de síntesis de compuestos de la membrana, o bien si está relacionado con el transporte intracelular de proteínas transportadoras de la membrana.

Estudios realizados previamente en nuestro laboratorio corroboran la teoría de que la ruta Rim101 afecta a la llegada de canales y transportadores a la membrana. Este experimento estudiaba la localización subcelular del constructo Ena1-GFP mediante microscopía confocal, y en el caso de mutantes para los genes *RIM8* y *RIM101* la proteína no conseguía integrarse eficazmente en la membrana y se acumula anómalamente en el citoplasma (Marqués et al., 2015). Por lo tanto, al igual que esta proteína se encuentra afectada, quizás un transportador de la membrana implicado en la detoxificación celular podría verse también afectado por esta mutación, explicando así este aumento de la sensibilidad de los mutantes Rim101 a azoles.

Para ello, realizamos experimentos para encontrar qué genes estaban más fuertemente implicados en la resistencia a estos compuestos. Con este fin, llevamos a cabo los análisis de crecimiento de mutantes de genes implicados en la resistencia a antifúngicos. Los seleccionados fueron los miembros de la familia PDR *PDR1*, *PDR3*, *PDR5*, *PDR10* *PDR12*, *PDR15* y *PDR16*, genes de la familia de los MPR *YOR1* e *YCF1*, y las proteínas implicadas en la multiresistencia a antibióticos *FLR1*, *AQR1* y *QDR1*. *AQR1* se incluyó como control negativo debido a que está constatado que no está relacionado con la resistencia a fluconazol.

Todos estos mutantes mostraron un perfil de sensibilidad similar tanto en cultivo líquido como en placa a fluconazol y ketoconazol. Se utilizaron concentraciones subletales para las levaduras silvestres, lo cual significa que en caso de que apareciese sensibilidad no se debería a una elevada concentración de azoles que afectasen hasta las células silvestres. Se encontró que los genes *PDR1*, *PDR3*, *PDR5*, *FLR1*, y *YOR1* son imprescindibles para lograr estas resistencias. De todos ellos, el mutante que mostraba una mayor sensibilidad era la cepa *pdr5* la cual era totalmente inviable, es decir, mostraba un crecimiento nulo. Así pues, se seleccionó este mutante para continuar con el estudio e intentar establecer una relación entre los mutantes de la ruta Rim y esta proteína.

Para estudiar la localización subcelular de Pdr5 en mutantes de la ruta Rim101 y comprobar su integridad física, se realizó un constructo que combinase a Pdr5 con una proteína que fuese detectable mediante fluorescencia para comprobar así en que zona de la célula se encuentra y para analizar la acumulación e integridad de la proteína mediante un ensayo de inmunoblot. La candidata para realizar esta proteína de fusión fue la proteína fluorescente verde (GFP), ya que además de ser fluorescente cuando se excita a 488nm, se dispone de anticuerpos específicos que permiten detectar la proteína por inmunoblot.

Disponemos de la secuencia de esta proteína en un cassette integrado en un plásmido que además posee *HIS3* como marcador de selección, para, una vez realizada la transformación, seleccionar las cepas en un medio sin histidina, para obtener células que posean la construcción incorporada en su genoma y desechar las que no han conseguido incorporarlo a su genoma (ver Materiales y Métodos y el anexo para más detalles de este abordaje).

Para realizar esta construcción se diseñó cebadores que combinasen la secuencia terminadora de *PDR5* en caso del cebador directo y alguna que se encontrase entre el último codón de la secuencia y la próxima ORF del genoma. Así pues, entre estas dos secuencias se encontraba el sitio de recombinación homóloga. Mediante esta técnica, la secuencia comprendida entre el último codón y la seleccionada para combinarla con el primer reverso se sustituye por el cassette GFP::*HIS3*. Como el último codón se ha eliminado, se va a expresar la proteína de fusión Pdr5-GFP. Esta proteína de fusión es ideal, ya que permite detectar la localización en el genoma, cuantificar la inducción del gen mediante la medición del aumento de la fluorescencia, y detectar la proteína por inmunodetección. Esta transformación se realizó en 3 cepas diferentes, una cepa WT, y 2 mutantes para genes de la ruta Rim, *rim8* y *rim101,* para comparar así los efectos provocados por los mutantes de la ruta Rim en la localización de Pdr5 y su integridad.

Rim101 es un factor de transcripción, por lo cual es posible que la sensibilidad de estos mutantes a fluconazol se explique por una falta de inducción del gen *PDR5*. Para determinar el perfil de inducción de *PDR5* monitorizamos la acumulación de la proteína Pdr5-GFP en la cepa silvestre por fluorimetría. Para ello, empleamos concentraciones subletales de azoles en diferentes concentraciones (ketoconazol a 40, 60 y 60 μM y fluconazol a 5, 10, 15, 20, 100, 250, 500 y 1000 μM), y como control positivo, la micotoxina citrinina, la cual se sabe que estimula incluso en muy bajas concentraciones proteínas de detoxificación debido a la extrema toxicidad de este compuesto para las células de levadura. Para analizar esta fluorescencia se utilizó como aparato de medición un fluorímetro para detectar esta hipotética inducción. El fluconazol no logró demostrar una estimulación de este gen, por lo que suponemos que, o bien para las concentraciones utilizadas la cantidad de proteína expresada eran suficientes para combatir la presencia de este azol, o bien las células sufrían algún proceso en este experimento que causaba algún fallo y no podían funcionar correctamente. El ketoconazol sí que demostró un ligero incremento de la expresión de alrededor de un 10%.

Igualmente, cuando se observaron células WT (BY4741 *PDR5*-GFP::*HIS3*) al microscopio, se pudo comprobar que tampoco se apreciaba cualitativamente una mayor fluorescencia en los cultivos que fueron inducidos. Por lo tanto, concluimos que en las condiciones empleadas, no hay inducción de la expresión de Pdr5-GFP.

También se observó que en el caso de los mutantes *rim8* y *rim101* que incorporan la inserción de GFP en el extremo 3’ de *PDR5*, la proteína Pdr5-GFP llegaba correctamente a la membrana y no se observaba una acumulación en el citoplasma de la proteína de fusión. Aquí podríamos suponer que nuestra teoría es incorrecta y que no se observa ningún defecto en la acumulación de Pdr5-GFP en la membrana plasmática en los mutantes para genes de la ruta Rim101. Sin embargo, realmente lo que estamos viendo es que GFP llega a la membrana, pero no sabemos si la fracción de Pdr5 ha llegado íntegra a la membrana, o si está bien ensamblada, o si ha sufrido algún proceso de proteólisis que ha dañado su estructura y por ende su funcionamiento, pero le ha permitido conservar dominios TMS que permiten la integración en la membrana. De suponer esto, los procesos de proteólisis se habrían producido en el extremo N-terminal, ya que GFP está unido por el C-terminal. Para comprobar el estado de Pdr5-GFP que ha llegado a la membrana, se realizó un ensayo de inmunodetección. Para ello, obtuvimos los extractos proteínicos de las cepas silvestre, *rim8* y *rim101* que incorporan *PDR5*-GFP::*HIS3*, y además, se realizó una extracción para cada tratamiento (citrinina, fluconazol, ketoconazol) y otra para un cultivo sin ningún tratamiento. El objetivo de este experimento era detectar por una parte la proteína de fusión y tener una nueva comprobación de que está correcta, ya que debe de aparecer a una altura de 190 kDa, que es la suma de los pesos moleculares de Pdr5 y GFP, en caso de que la proteína esté completa y no haya sufrido daños. En caso contrario, si los daños no afectan al motivo de reconocimiento de anti-GFP, lo que se va a observar son bandas borrosas por debajo de la banda propia de la proteína de fusión, lo que va a indicar que tenemos productos de degradación de esta proteína de fusión. También será una última comprobación de la estimulación de la producción de proteína que pueda producir la inducción con tratamientos antifúngicos.

Tras realizar todo el ensayo, pudimos observar que efectivamente se producen estas bandas de degradación en las cepas *rim8* y *rim101*. Así pues, podemos afirmar que en estos mutantes, por un mecanismo aún desconocido, la proteína Pdr5 no es estable y se degrada, perdiendo la célula su principal defensa contra moléculas antifúngicas, entre ellas los azoles, comprometiendo la resistencia ante estos compuestos y su viabilidad. Tampoco pudimos observar aquí una especial inducción en caso de los azoles utilizando esta técnica, como en los otros casos.

Para comprobar que el resto de las proteínas de la membrana se encontraban en buen estado, en la misma membrana se volvió a realizar una inmunodetección pero en lugar de utilizar anti-GFP se utilizó anti-Pma1 para comprobar que esta proteína, la proton ATPasa de la membrana plasmática, se encontraba íntegra y no había sido afectada por las mutaciones de la ruta Rim101. Esto nos permite corroborar la idea de que efectivamente no se han dañado todas las proteínas de la membrana y que una mutación de la ruta Rim101 no compromete a todas las proteínas transportadoras de la membrana (Marqués et al., 2015).

Aunque en la literatura ya estaba descrito que la familia de genes PDR y en concreto el gen *PDR5* eran los genes que más implicados estaban en la detoxificación celular (Paul et al,. 2014) y en la resistencia a compuestos antifúngicos (Balzi et al., 1994), nunca se había analizado el perfil de resistencia de toda esta familia de genes utilizando el mismo fondo genético, en un mismo contexto, con un mismo medio y una misma temperatura, y con el mismo tratamiento para todos. De esta manera pudimos validar mucho mejor qué gen era el que más implicado estaba en la resistencia a nuestros 2 azoles para poder así estudiar su relación con la ruta Rim101. Establecemos esta relación entre la ruta Rim101 y los genes de la familia PDR y MRP por los indicios que nos facilitan algunos trabajos de investigación que señalan que mutantes de la ruta Rim101 tienen una virulencia menor y una mayor sensibilidad a sustancias antifúngicas (Sanglard et al, 2009). En los estudios de crecimiento en medio líquido y sólido, además de analizar genes de esta familia analizamos genes de la ya comentada familia DHA (Costa et al., 2014) en los cuales no ha sido muy estudiada la función de los genes pertenecientes a estas familias en la detoxificación celular por azoles debido a que se ha atribuido esta función a los genes de la familia ABC. En nuestro experimento, pudimos ver que de esa familia, sólo *FLR1* parece funcional con respecto a la detoxificación de azoles, aunque el impacto de su supresión no es tan grave como el de genes de la familia ABC como *PDR5* y *YOR1.* Por tanto, se puede argumentar que evidentemente los genes más implicados y que deben tenerse en cuenta en el estudio de la relación entre la resistencia a azoles y la señalización de pH alcalino deben de ser los genes de las familias PDR y MRP. En nuestro caso, *PDR5* parece tener el mayor papel con respecto a los otros genes, por eso resultó el escogido para los análisis posteriores (Balzi et al., 1994).

También se confirma que no sólo en un mutante con el gen suprimido *RIM101* (el cual es el final de la ruta) se observa el fenotipo sensible a azoles, si no que suprimiendo un gen intermediario de la ruta como *RIM8* también se observa esta sensibilidad, confirmándose así que cualquier delección en esta ruta afectará a la resistencia a los azoles (Sahli et al., 2012).

En estudios anteriores se ha examinado la posible relación de la ruta Rim101 con otras rutas internas celulares o procesos de formación de estructuras de la membrana, así como con transportadores de iones, para intentar encontrar un mecanismo que explique esta relación, pero nunca se había intentado relacionar con genes de la familia PDR o MRP. Previamente sí que se había relacionado con transportadores de cationes Na+ de la membrana como *ENA1* y *NHA1* (Jung et al., 2012) sin embargo esto no explicaría la resistencia a azoles, ya que se tratan de transportadoes de iones, y una posible susceptibilidad podría en realidad deberse a un estrés osmótico y no a la presencia de azoles.

Otras teorías también han sido estudiadas, como, por ejemplo, que la supresión de la función de esta ruta afectaría negativamente a la formación del sideróforo (Eisendle et al., 2004), elemento de la membrana esencial en la toma de hierro por la célula; la síntesis de ácido oxiálico (Kim et al., 2007); y a la regulación de enzimas degradadores de estructuras de tejidos del huésped como celulasa, xilanasa, catalasa y cutinasa (You et al., 2007) en distintos hongos que comparten la ruta homóloga PacC/Rim101. Sin embargo, parece ser que estos efectos vienen producidos no por una relación directa con la resistencia a antibióticos, sino más bien por el efecto que puede tener la falta de regulación del pH celular, que afecte negativamente a la regulación de genes de las rutas y procesos previamente enumerados. Igualmente, parece constatado el hecho de que la ruta Rim101 tiene cierta función en la resistencia a ácidos orgánicos débiles (Mira et al., 2009) pero las cepas mutantes de genes relacionados con la resistencia a estos compuestos no parecen verse especialmente afectadas por la presencia de azoles en el medio, descartando así este mecanismo como posible causa de esta sensibilidad.

Así pues, esta novedosa relación entre regulación de pH y familia de genes relacionados con la resistencia a antifúngicos podría suponer un buen mecanismo para explicar los interrogantes que plantea el hecho de que los mutantes para genes de la ruta Rim101 sean tan sensibles a tratamientos por fluconazol. Es necesario tener en cuenta el hecho de que una falta de regulación de pH ya está resultando dañina para la célula, pero vemos que esto se acentúa en presencia de fluconazol en nuestros experimentos de crecimiento en medio líquido. Por tanto, no podemos atribuir toda esa variación en el crecimiento sólo a la falta de regulación de pH. Además, hay que tener en cuenta que el pH del medio YPD es ligeramente ácido (alrededor de 6,5) por lo que tampoco se encuentra en presencia de un medio de marcado carácter básico que tuviese que suponer el correcto funcionamiento de la ruta Rim101, ya que cuando crece en medio YPD sin tratamiento no se observa que esté afectado ni su rendimiento ni su cinética de crecimiento.

Así pues, basándonos en nuestros resultados y en la bibliografía previa a nuestro experimento, podemos concluir que la ruta Rim101 debe de influir de alguna manera en el estado de la proteína Pdr5. Aún no tenemos claro cuál puede ser el mecanismo, que explica por qué en mutantes de la ruta Rim se observa la proteína Pdr5 degradada. Podemos intentar suponer que bien un elemento regulado por el factor de transcripción Rim101 tenga algún papel en la estabilidad de la membrana celular y que debido a un fallo en la estructura de la misma Pdr5 se encuentre expuesta a agentes proteolíticos del citoplasma. Hay estudios que dan apoyo a la teoría de que Rim101 está implicada directamente en el ensamblaje de la pared celular de levadura, lo cual podría suponer que de alguna manera este mal ensamblaje afecte a la membrana celular, y de esta manera se vean afectadas ciertas proteínas de la membrana, aunque está por determinar aún qué proteínas se ven afectadas (Castrejon et al., 2006). Puede ser que la combinación de la falta de expresión de genes regulados por la ruta Rim101 que tiene lugar cuando Rim101 es silenciado sea responsable de esta degradación de Pdr5. Lanzamos esta teoría basándonos en la cantidad de genes estabilizadores de la membrana y la pared celular que son regulados a nivel transcripcional por Rim101.

Nuestra teoría es que la única deleción de uno de estos genes no basta para acabar con la resistencia a azoles, sin embargo, la combinación de todas estas deleciones puede afectar a la llegada e integración de la membrana de proteínas de canal y transportadoras como Pdr5, provocando la degradación de ésta, aunque aún no conocemos ese mecanismo, podemos suponer que quizás sea ubiquitinada y procesada por el proteasoma, debido a que la conformación de las α-hélices no es estable en un medio no hidrófobo, ocurriendo un plegamiento erróneo de la proteína. Otra teoría que lanzamos es que parte de la proteína se integre en la membrana, pero que no ocurra de manera correcta para conferir función y sea degradada por el extremo N-terminal, no afectando así a la fluorescencia al no dañar a la porción de GFP, razón por la cual podemos observar fluorescencia en la membrana. Así pues, habría que realizar en experimentos posteriores dobles mutantes de los genes seleccionados para el último experimento de análisis de perfil de sensibilidad y continuar estudiando el posible mecanismo que explique esta degradación en el caso de que no se encuentre funcional Rim101, así como el papel que juega en la llegada a la membrana.

En definitiva, a la vista de los resultados obtenidos, podemos llegar a la conclusión de que en los mutantes *rim8 y rim101* la proteína de fusión Pdr5-Gfp no llega con éxito a la superficie celular, produciéndose una degradación que no se observa en las cepas silvestres. Ésta debe de explicarse debido a la falta de función de la ruta de señalización denominada Rim, ya que cuando se elimina una de las proteínas esenciales para su funcionamiento se producen estas alteraciones en la sensibilidad a azoles. Esta degradación puede deberse a una incorrecta integración en la membrana, ya que los genes regulados por la ruta Rim implicados en el correcto ensamblaje y mantenimiento de la membrana pueden ver su función disminuida y por tanto, se produzcan cambios físico-químicos en la membrana que impidan ésta correcta integración y debido a ello ocurran fenómenos de degradación como los que se vieron en el ensayo Western Blot. Sin embargo, es algo notorio que no se debe sólo a un gen que deja de estar regulado por esta ruta, como pudimos comprobar en el análisis del perfil de sensibilidad en medio líquido, si no que quizás sea un efecto combinado de la falta de regulación de estos genes.

*CONCLUSIONES*

En base a los resultados obtenidos en los distintos experimentos, podemos extraer las siguientes conclusiones.

1. Pdr5 es la proteína transportadora dependiente de ATP más fuertemente implicada en la resistencia a azoles utilizados en el experimento, fluconazol y ketoconazol. Igualmente se confirma la importancia de los genes Pdr1, Pdr3, Yor1, Rim8, Rim101 y Flr1, tanto en medio sólido como en medio líquido.
2. Se confirma de igual manera que las subfamilias de genes PDR (*Pleiotropic Drug Resistance)* y MRP (*Multidrug Resistance-associated Proteins)*, perteneciente a la familia ABC, es la más importante en la resistencia a antifúngicos de la familia de los azoles que la famila DHA (*Drug H+ Antiporter)*, perteneciente a la familia MFP (*Major Facilitator Protein*).

1. Las concentraciones subletales utilizadas de fluconazol y ketoconazol en el experimento no produjeron una inducción importante en la acumulación de Pdr5-GFP.
2. La inserción de GFP detrás del último codón codificante de *PDR5* permite la visualización por microscopía confocal y de fluorescencia para conocer la localización subcelular de la proteína Pdr5, así como el análisis por inmunodetección con el ensayo *inmunoblot* con un anticuerpo anti-GFP para comprobar la integridad de esta proteína en la membrana.
3. Mediante microscopía confocal se aprecia que Pdr5-GFP acumula en la membrana plasmática y no se acumula en el citoplasma en los mutantes *rim101* y *rim8*, si bien esto sólo evidencia que GFP se encuentra en buen estado y emite fluorescencia, así como que está unida igualmente a Pdr5.
4. Por inmunodetección pudimos comprobar que la proteína Pdr5 se encuentra degradada en fragmentos más pequeños en los mutantes *rim101* y *rim8*, lo que podría explicar la sensibilidad de los mutantes de la ruta Rim101 a los azoles. Sin embargo, esta degradación no parece afectar a su correcta integración en la membrana, por lo que se puede extraer que la degradación ocurre en el dominio N-terminal de la proteína Pdr5, ya que su extremo C-terminal está unido a GFP y no se observa acumulación de productos de degradación con GFP en el citoplasma, aunque tampoco serían detectables por la falta de función de GFP.
5. La proton ATPasa, Pma1 no se degrada en mutantes *rim8* o *rim101*, por lo que podemos suponer que la supresión de la ruta Rim101 no afecta generalmente a todas las proteínas transportadoras que se encuentran en la membrana celular, dando pie a establecer una relación directa entre Rim101 y la integridad de Pdr5.

*REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS*

Alarco A. M., Balan I., Talibi D., Mainville N., Raymond M. (1997). AP-1-mediated multidrug resistance in Saccharomyces cerevisiae requires FLR1 encoding a transporter of the major facilitator superfamily. J. Biol. Chem. 272 19304–19313

Arechiga-Carvajal ET, Ruiz-Herrera J. (2005). The RIM101/pacC homologue from the basidiomycete Ustilago maydis is functional in multiple pH-sensitive phenomena. Eukaryot. Cell 4:999–1008.

Balzi E., Wang M., Léterme S., Van Dyck L., Goffeau A., (1994) PDR5, a novel yeast multidrug resistance conferring transporter controlled by the transcription regulator PDR1, J.Biol. Chem. 269 2206–2214.

Barwell KJ, Boysen JH, Xu W, Mitchell AP. 2005. Relationship of DFG16 to the Rim101p pH response pathway in Saccharomyces cerevisiae and Candida albicans. Eukaryot. Cell 4:890–899.

Bauer B.E., Wolfger H., Kuchler K., (1999) Inventory and function of yeast ABC proteins: about sex, stress, pleiotropic drug and heavy metal resistance, Biochim. Biophys. Acta 1461 217–236.

Bignell EM. 2012. Conservation in Aspergillus fumigatus of pH-signaling seven transmembrane domain and arrestin proteins, and implication for drug discovery. Ann. N. Y. Acad. Sci. 1273:35–43.

Carbrey, J. M., Bonhivers, M., Boeke, J. D., & Agre, P. (2001). Aquaporins in Saccharomyces: Characterization of a second functional water channel protein. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 98(3), 1000–1005.

Castrejon F, Gomez A, Sanz M, Duran A, Roncero C. (2006) The RIM101 Pathway Contributes to Yeast Cell Wall Assembly and Its Function Becomes Essential in the Absence of Mitogen-Activated Protein Kinase Slt2p. Eukaryotic (3):507–17.

Cole S.P., Deeley R.G., (1998) Multidrug resistance mediated by the ATP-binding cassette transporter protein MRP, Bioessays 20 931–940.

Cornet M, Gaillardin C. (2014) pH signaling in human fungal pathogens: a new target for antifungal strategies. Eukaryotic Cell 342–52.

Cornet M, Gaillardin C, Richard ML. 2006. Deletions of the endocytic components VPS28 and VPS32 in Candida albicans lead to echinocandin and azole hypersensitivity. Antimicrob. Agents Chemother. 50:3492–3495

Costa, C., Dias, P. J., Sá-Correia, I., & Teixeira, M. C. (2014). MFS multidrug transporters in pathogenic fungi: do they have real clinical impact? *Frontiers in Physiology*, *5*, 197.

Davis DA. (2009). How human pathogenic fungi sense and adapt to pH: the link to virulence. Curr. Opin. Microbiol. 12:365–370.

Davis, D. et al. (2000) Candida albicans RIM101 pH response pathway is required for host-pathogen interactions. Infect. Immun. 68, 5953–5959

Dean M., Allikmets R., (1995) Evolution of ATP-binding cassette transporter genes, Curr. Opin. Genet. Dev. 5 779–785.

Eisendle, M. et al. (2004) Biosynthesis and uptake of siderophores is controlled by the PacC-mediated ambient-pH Regulatory system in Aspergillus nidulans. Eukaryot. Cell 3, 561–563

Flowers SA, Colón B, Whaley SG, Schuler MA, Rogers PD. (2015) Contribution of clinically derived mutations in ERG11 to azole resistance in Candida albicans. Antimicrob Agents Chemother 59:450–460.

Galindo A, Calcagno-Pizarelli AM, Arst HN, Jr, Peñalva, MA. 2012. An ordered pathway for the assembly of ESCRT-containing fungal ambient pH signalling complexes at the plasma membrane. J. Cell Sci. 125:1784–1795.

Gbelska Y, Krijger JJ, Breunig KD. (2006) Evolution of gene families: the multidrug resistance transporter genes in five related yeast species. FEMS Yeast Res. 6:345–355

Goffeau,A., Barrell, B.G., Bussey,H., Davis, R.w., Dujon,B., Feldmann,H., Galiber,F., Hoheisel, J.D., Jacq,C., Johnston,M., Louis,E.., Mewes,H.W., Murakami,Y., Philippsen,P., Tettelin,H., y Oliver,S.G. (1996). Life with 6000 genes. Sience 274, 546, 563-547, 567.

Gołąbek K., Strzelczyk J.K., Owczarek A., Cuber P., Ślemp-Migiel A., Wiczkowski A. (2015) Selected mechanisms of molecular resistance of Candida albicans to azole drugs. Acta Biochim Pol. 62(2):247-51.

Gow NA, Hube B. (2012). Importance of the Candida albicans cell wall during commensalism and infection. *Current Opinion in Microbiology* 15:406–412.

Gudlaugsson O, Gillespie S, Lee K, Vande Berg J, Hu J, Messer S, Herwaldt L, Pfaller M, Diekema D. (2003) Attributable mortality of nosocomial candidemia, revisited. Clinical Infectious Diseases 37:1172–1177.

Hani U, Shiva G, Vaghela R, Osmani RAM, Shrivastava A. Candidiasis (2015) A Fungal Infection- Current Challenges and Progress in Prevention and Treatment. ;42–52.

Herrador A, Herranz S, Lara D, Vincent O. 2010. Recruitment of the ESCRT machinery to a putative seven-transmembrane-domain receptor is mediated by an arrestin-related protein. Mol. Cell. Biol. 30:897–907.

Hervas-Aguilar A, Rodriguez JM, Tilburn J, Arst HNJ, Penalva MA. 2007. Evidence for the direct involvement of the proteasome in the proteolytic processing of the Aspergillus nidulans zinc finger transcription factor PacC. J. Biol. Chem. 282:34735–34747

Herskowitz,I. (1988). Life cycle of the budding yeast Saccharomyces cerevisiae Microbiol. Rev. 52, 536-553

Higgins C.F. (2001) ABC transporters: physiology, structure and mechanism--an overview. Res Microbiol 152:205–10.

Holyoak C.D., Bracey D., Piper P.W., Kuchler K., Coote P.J., (1999) The Saccharomyces cerevisiae weak-acid-inducible ABC transporter Pdr12p transports fluorescein and preservative anions from the cytosol by an energy-dependent mechanism, J. Bacteriol. 181 4644–4652.

Higgins C.F., (1992) Cell Biology. 67-113.

Jung K-W, Strain AK, Nielsen K, Jung K-H, Bahn Y-S**. (**2012). Two cation transporters Ena1 and Nha1 cooperatively modulate ion homeostasis, antifungal drug resistance and virulence of *Cryptococcus neoformans* via the HOG pathway. Fungal Genet. Biol. **49:**332–345.

Katzmann D.J., Burneyi P.B., Golin J., Mahe Y., Moye-Rowley W.S., (1994) Transcriptional Control of the Yeast PDR5 Gene by the PDR3 Gene Product. MOLECULAR AND CELLULAR BIOLOGY p. 4653-4661

Katzmann D.J., Burneyi P.B., Golin J., Mahe Y., Moye-Rowley W.S., (1996) Multiple Pdr1p/Pdr3p Binding Sites Are Essential for Normal Expression of the ATP Binding Cassette Transporter Protein-encoding Gene PDR5. The journal of Biological Chemistry vol 271 23049-23054

Kavanagh K. (2005) Fungi. Biology and applications. Wiley. (172-183)

Kim, Y.T. et al. (2007) An activating mutation of the Sclerotinia sclerotiorum pac1 gene increases oxalic acid production at low pH but decreases virulence. Mol. Plant Pathol. 8, 611–622

Kontoyiannis D.P., (2000) Efflux-mediated resistance to fluconazole could be modulated by sterol homeostasis in *Saccharomyces cerevisiae.* The Journal of Antimicrobial Therapy. 46 1999-2003

Kuchler K., Go«ransson H.M., Viswanathan M.N., Thorner J., (1992) Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 57 (579-592)

Leal SM, Jr, Roy S, Vareechon C, Carrion S deJesus Clark H, Lopez-Berges MS, diPietro A, Schrettl M, Beckmann N, Redl B, Haas H, Pearlman E. (2013) Targeting iron acquisition blocks infection with the fungal pathogens Aspergillus fumigatus and Fusarium oxysporum. PLoS Pathog. 9(7):e1003436.

Li W, Mitchell AP. (1997). Proteolytic activation of Rim1p, a positive regulator of yeast sporulation and invasive growth. Genetics 145:63–73.

Longtine MS, Iii AMK, Demarini DJ, Shah NG. (1998) Additional Modules for Versatile and Economical PCR-based Gene Deletion and Modification in Saccharomyces cerevisiae. Yeast functional Analysis Report 14; 953–61.

Mansfield BE, Oltean HN, Oliver BG, Hoot SJ, Leyde SE, et al. (2010) Azole Drugs Are Imported By Facilitated Diffusion in Candida albicans and Other Pathogenic Fungi. PLoS Pathog 6(9): e1001126.

Marqués MC, Zamarbide-Forés S, Pedelini L, Llopis-Torregrosa V, Yenush L. (2015)A functional Rim101 complex is required for proper accumulation of the Ena1 Na+-ATPase protein in response to salt stress in Saccharomyces cerevisiae. Dawes I, editor. FEMS Yeast Research ;15(4).

Martinez P., Persson B. (1998). Identification, cloning and charaterization of a derepressible Na+-coupled phosphate transporter in Saccharomyces cerevisiae. Mol. Gen. Genet. 258 628–638

Meyers S, Schauer W, Balzi E, Wagner M, Goffeau A, Golin J. (1992) Interaction of the yeast pleiotropic drug resistance genes PDR1 and PDR5. Curr Genet 21:431–6.

Mira NP, Lourenco AB, Fernandes AR, Becker JD, Sa-Correia I. (2009)The RIM101 pathway has a role in Saccharomyces cerevisiae adaptive response and resistance to propionic acid and other weak acids. FEMS Yeast Res ;9(2):202–216.

Munro CA. 2013. Chitin and glucan, the yin and yang of the fungal cell wall, implications for antifungal drug discovery and therapy. Adv. Appl.Microbiol. 83:145–172

Nelissen,B., De, W.R., y Goffeau,A. (1997) Intracellular sequestration of sodium by a novel Na+/H+ exchanger in yeast is enhanced by mutations in the plasma membrane H+-ATPase. Insights into mechanisms of sodium tolerance. J. Biol. Chem 272, 26145-26152.

Obara K, Yamamoto H, Kihara A. (2012). Membrane protein Rim21 plays a central role in sensing ambient pH in Saccharomyces cerevisiae. J. Biol. Chem. 287:38473–38481

Paul, S., & Moye-Rowley, W. S. (2014). Multidrug resistance in fungi: regulation of transporter-encoding gene expression. *Frontiers in Physiology*, *5*, 143.

Pappas PG, Rex JH, Lee J, Hamill RJ, Larsen RA, Powderly W, Dismukes WE. (2003). A prospective observational study of candidemia: epidemiology, therapy, and influences on mortality in hospitalized adult and pediatric patients. Clinical Infectious Diseases 37:634–643.

Peñalva M, Tilburn J, Bignell E, Arst HN. (2008) Ambient pH gene regulation in fungi: making connections. Trends Microbiol (6):291–300

Philpott CC, Protchenko O, Kim YW, Boretsky Y, Shakoury-Elizeh M. (2002) The response to iron deprivation in Saccharomyces cerevisiae: expression of siderophore-based systems of iron uptake.Biochem Soc Trans. 30:698–702

Pierce, C. G., Saville, S. P., & Lopez-Ribot, J. L. (2014). High Content Phenotypic Screenings to Identify Inhibitors of Candida albicans Biofilm Formation and Filamentation. Pathogens and Disease, 70(3), 423–431.

Piper P., Mahé Y., Thompson S., Pandjaitan R., Holyoak C. et al., (1998)The Pdr12 ABC transporter is required for the development of weak organic acid resistance in yeast, EMBO J. 17 4257–4265.

Ramesh, N., Priyadharsini, M., Sumathi, C. S., Balasubramanian, V., Hemapriya, J., & kannan, R. (2011). Virulence Factors and Anti Fungal Sensitivity Pattern of Candida Sp. Isolated from HIV and TB Patients. Indian Journal of Microbiology, 51(3), 273–278.

Rex JH, Pappas PG, Karchmer AW, Sobel J, Edwards JE, Hadley S, Brass C, Vazquez JA, Chapman SW, Horowitz HW, Zervos M, McKinsey D, Lee J, Babinchak T, Bradsher RW, Cleary JD, Cohen DM, Danziger L, Goldman M, Goodman J, Hilton E, Hyslop NE, Kett DH, Lutz J, Rubin RH, Scheld WM, Schuster M, Simmons B, Stein DK, Washburn RG, Mautner L, Chu TC, Panzer H, Rosenstein RB, Booth J, National Institute of Allergy and Infectious Diseases Mycoses Study Group. (2003). A randomized and blinded multicenter trial of high-dose fluconazole plus placebo versus fluconazole plus amphotericin B as therapy for candidemia and its consequences in nonneutropenic subjects. Clinical Infectious Diseases 36:1221–1228.

Sahli S, Boulahfa S, Cornet M. 2012. pH signaling inhibition in Candida albicans leads to enhanced activity and restore fungicidal effect of ergosterol synthesis inhibitors, abstrM983. Intersci. Conf. Antimicrob. Agents Chemother., San Francisco, CA. American Society for Microbiology, Washington, DC. Abstr. 52nd

Sanglard D, Coste A, Ferrari S. (2009). Antifungal drug resistance mechanisms in fungal pathogens from the perspective of transcriptional gene regulation. FEMS Yeast Res. 9:1029–1050.

Selmecki AM, Dulmage K, Cowen LE, Anderson JB, Berman J. 2009. Acquisition of aneuploidy provides increased fitness during the evolution of antifungal drug resistance.

Selmecki A, Forche A, Berman J. 2010. Genomic plasticity of the human fungal pathogen Candida albicans. Eukaryotic Cell 9:991–1008.

Servos J., Haase E., Brendel M., (1993) Gene SNQ2 of Saccharomyces cerevisiae, which confers resistance to 4-nitroquinoline-N-oxide and other chemicals, encodes a 169kDa protein homologous to ATP-dependent permeases, Mol. Gen. Genet. 236 214-218.

Taff, H. T., Mitchell, K. F., Edward, J. A., & Andes, D. R. (2013). Mechanisms of *Candida* biofilm drug resistance. *Future Microbiology*, *8*(10)

Tenreiro S., Nunes P. A., Viegas C. A., Neves M. S., Teixeira M. C., Cabral M. G., et al. (2002).AQR1 gene (ORF YNL065w) encodes a plasma membrane transporter of the major facilitator superfamily that confers resistance to short-chain monocarboxylic acids and quinidine in Saccharomyces cerevisiae. Biochem. Biophys. Res. Commun. 292, 741–748

Tommasini R., Evers R., Vogt E., Mornet C., Zaman G.J. et al., (1996) The human multidrug resistance-associated protein functionally complements the yeast cadmium resistance factor 1, Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 93 6743–6748.

Van der Vaart, J. M., Caro, L. H., Chapman, J. W., Klis, F. M., & Verrips, C. T. (1995). Identification of three mannoproteins in the cell wall of Saccharomyces cerevisiae. *Journal of Bacteriology*, *177*(11), 3104–3110.

Vargas, R. C., Tenreiro, S., Teixeira, M. C., Fernandes, A. R., & Sá-Correia, I. (2004). *Saccharomyces cerevisiae* Multidrug Transporter Qdr2p (Yil121wp): Localization and Function as a Quinidine Resistance Determinant.*Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, *48*(7), 2531–2537.

Uemura T, Tachihara K, Tomitori H, Kashiwagi K, Igarashi K (2005) Characteristics of the polyamine transporter TPO1 and regulation of its activity and cellular localization by phosphorylation. J Biol Chem 280: 9646–9652

van den Hazel HB, Pichler H, do Valle Matta MA, Leitner E, Goffeau A, Daum G. (1999). PDR16 and PDR17, two homologous genes of Saccharomyces cerevisiae, affect lipid biosynthesis and resistance to multiple drugs. J. Biol. Chem. 274:1934 –1941

Voth WP, Takahata S, Nishikawa JL, Metcalfe BM, Na¨a¨r AM, et al. (2014) A Role for FACT in Repopulation of Nucleosomes at Inducible Genes. PLoS ONE 9(1): e84092.

Wolfger,H., Mamnun,Y.M, Kuchler,K., (2001) Fungal ABC proteins: pleiotropic drug resistance, stress response and cellular detoxification. Elsevier, 375-389.

Wolfger H., Mahé Y., Parle-McDermott A., Delahodde A., Kuchler K., (1997) The yeast ATP-binding cassette (ABC) protein genes PDR10 and PDR15 are novel targets for the Pdr1 and Pdr3 transcriptional regulators, FEBS Lett. 418 269–274.

White TC, Marr KA, Bowden RA (1998) Clinical, cellular, and molecular factors that contribute to antifungal drug resistance. Clinical Microbiology Reviews 11: 382–402.

Wisplinghoff H, Seifert H, Tallent SM, Bischoff T, Wenzel RP, Edmond MB. (2003). Nosocomial bloodstream infections in pediatric patients in United States hospitals: epidemiology, clinical features and susceptibilities. *The Pediatric Infectious Disease Journal* 22:686–691.

Yenush, L., Merchan, S., Holmes, J., & Serrano, R. (2005). pH-Responsive, Posttranslational Regulation of the Trk1 Potassium Transporter by the Type 1-Related Ppz1 Phosphatase. Molecular and Cellular Biology, 25(19), 8683–8692.

You, B.J. and Chung, K.R. (2007) Phenotypic characterization of mutants of the citrus pathogen Colletotrichum acutatum defective in a PacC-mediated pH regulatory pathway. FEMS Microbiol. Lett. 277, 107–114

 Zhang X, Lester RL, Dickson RC. Pil1p and Lsp1p negatively regulate the 3-phosphoinositide-dependent protein kinase-like kinase Pkh1p and downstream signaling pathways Pkc1p and Ypk1p. J Biol Chem. 2004;279(21): 22030–8

Zhao, H., & Eide, D. (1996). The yeast ZRT1 gene encodes the zinc transporter protein of a high-affinity uptake system induced by zinc limitation. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 93(6), 2454–2458.

*ANEXO*

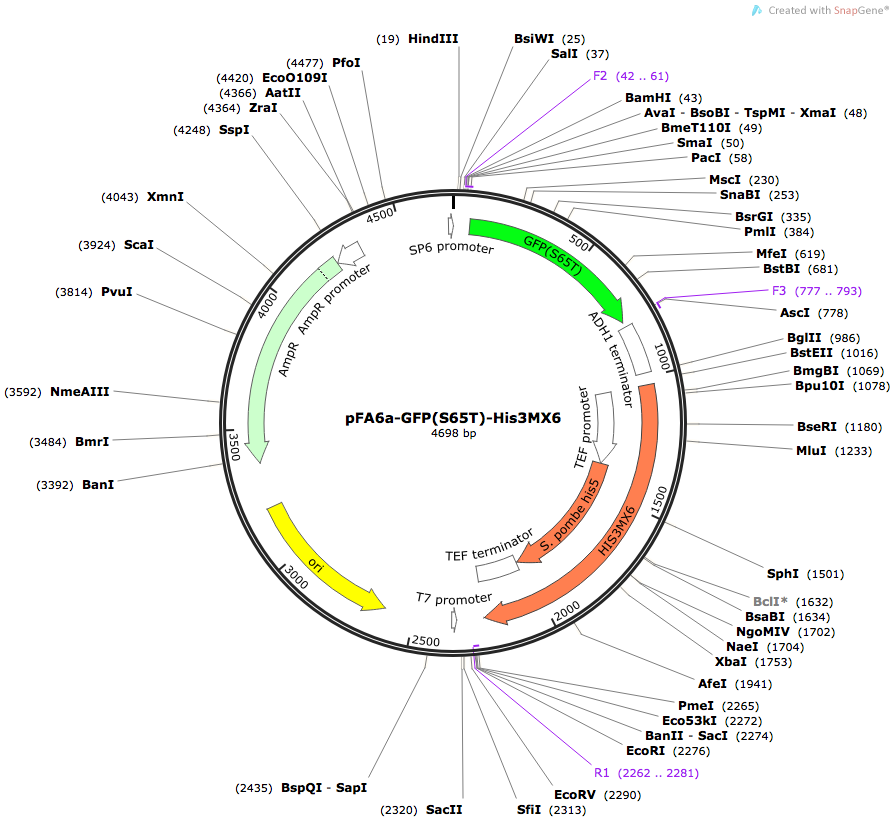
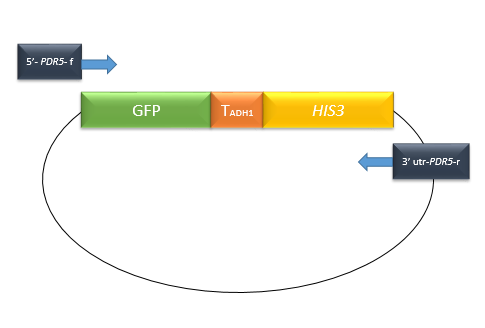


Figura 8.1 Mapa del plásmido pFA6a-GFP(S65T)-HIS3MX6. Source https://www.snapgene.com/resources/plasmid\_files/yeast\_plasmids/pFA6a-GFP(S65T)-His3MX6/



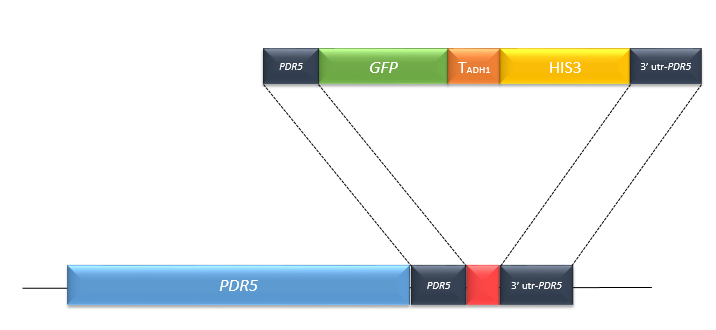
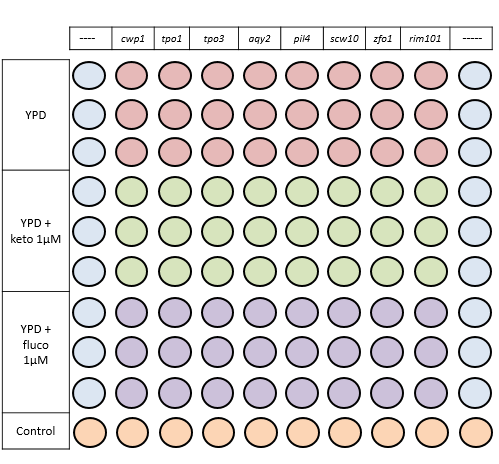
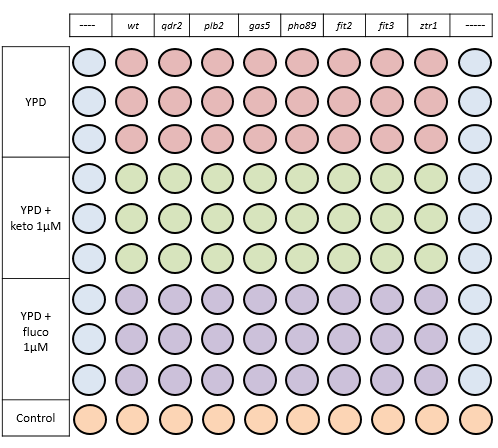




Figura 8.2 Esquema del proceso de transformacion y recombinación homóloga para generar la cepa con la inserción genómica de PDR5-GFP



**Figura 8.3 Distribución de BioscreenC de cepas mutantes para genes de la membrana. Distribución en la placa multipocillos de las cepas de BioscreenC de genes implicados en la estabilidad de la membrana y la homeostasis cellular**