



UNIVERSIDAD DE CÓRDOBA

**BIOCIENCIAS Y CIENCIAS AGROALIMENTARIAS**

**Trk1 influye en el funcionamiento de diversos  
procesos fisiológicos en *Candida glabrata***

**Trk1 affects proper functioning of several  
physiological processes in *Candida glabrata***

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR PRESENTADA POR

Gabriel Caro Ruiz

Bajo la dirección del Doctor

José Ramos Ruiz

Junio, 2020

TITULO: *Trk1 influye en el funcionamiento de diversos procesos fisiológicos en Candida glabrata*

AUTOR: *Gabriel Caro Ruiz*

---

© Edita: UCOPress. 2020  
Campus de Rabanales  
Ctra. Nacional IV, Km. 396 A  
14071 Córdoba

<https://www.uco.es/ucopress/index.php/es/>  
[ucopress@uco.es](mailto:ucopress@uco.es)

---

## **Agradecimientos**



En primer lugar me gustaría agradecer al Dr. José Ramos que me haya permitido realizar esta tesis doctoral con él, agradezco que me haya abierto las puertas de su departamento en el que he podido aprender muchas cosas. También quiero dar las gracias a la Dra. Carmen Michán por haberme ayudado con las PCRs. Agradezco a la Dra. Hanna Sychrova por proporcionarme las cepas de levadura necesarias para la realización de los estudios durante el doctorado.

En segundo lugar agradezco al Plan Propio de Investigación de la Universidad de Córdoba por financiar el material fungible utilizado durante este trabajo.

Doy las gracias a mis dos técnicas de laboratorio favoritas, Tere y Esther, dos profesionales en su trabajo y dos grandes personas que me han ayudado mucho a lo largo de mi tesis, les deseo lo mejor.

También quiero dar las gracias a todos mis compañeros de laboratorio, desde alumnos TFG hasta doctorandos. Vosotros habéis permitido que este largo camino haya sido más agradable y fácil de llevar. Todos me habéis aportado experiencias muy buenas que me han servido mucho a lo largo de este camino (Francis, Pablo etc). Espero que tengáis un gran futuro laboral y personal, porque lo merecéis.

Por supuesto dar las gracias a mi familia, en especial a mis padres porque sencillamente por ellos he llegado hasta aquí y son el pilar de mi vida. A mi hermana porque incluso desde la distancia siempre ha estado pendiente de mí y me ha apoyado muchísimo. Podría decir más palabras en este párrafo pero me quedo aquí.

También doy gracias a mis mejores amigos, con los que me divierto y discuto a partes iguales pero que me han aportado mucho a lo largo de mi vida y que me han ayudado a desconectar en momentos de estrés. Doy gracias también a mi amigo el Dr. José Aguilar, por haberse preocupado por mí a largo de la tesis.



# **Índice**



## ÍNDICE

Resumen.....	2
Introducción.....	8
-1 Importancia del potasio.....	9
1.1 Homeostasis catiónica.....	9
1.2 Homeostasis de potasio y sodio en las levaduras.....	10
-2 Transportadores de potasio en las levaduras.....	11
2.1 Transportadores de membrana plasmática de potasio.....	12
2.1.1 Trk1.....	12
2.1.2 Hak1.....	14
2.1.3 Acu1.....	15
2.2 Transportadores intracelulares de potasio.....	16
2.2.1 Vnx1.....	16
2.2.2 Kha1.....	16
2.2.3 Nhx1.....	17
-3 <i>Candida glabrata</i> : Consideraciones generales.....	17
3.1 Patogenicidad.....	19
3.2 Invasión de nichos.....	20
3.3 Multirresistencia.....	22
-4 Transporte de potasio en <i>C. glabrata</i> .....	24
Objetivos.....	28
Material y métodos.....	32
-1 Levaduras utilizadas en este estudio.....	35
-2 Medios de cultivo y condiciones de crecimiento.....	35
-3 Mantenimiento de las cepas.....	36
-4 Ensayos relacionados con los requerimientos de potasio.....	36
4.1 Crecimiento en medio sólido.....	36
4.2 Crecimiento en medio líquido.....	36
-5 Contenido intracelular de cationes.....	37

-6 Contenido extracelular de potasio.....	37
-7 Ensayos de transporte de cationes.....	38
7.1 Transporte de rubidio.....	38
7.2 Transporte de litio.....	38
-8 Determinación del volumen celular.....	38
-9 Ensayos genéticos: PCRs cuantitativas.....	39
9.1 Aislamiento de ARN.....	39
9.2 Eliminación del ADN contaminante.....	39
9.3 Cuantificación de ARN mediante nanodrop 2000.....	40
9.4 Retrotranscripción a ADNc.....	40
9.5 PCR a tiempo real.....	40
-10 Tolerancia frente a diferentes compuestos.....	41
10.1 Tolerancia a litio/sodio.....	41
10.2 Tolerancia a diferentes drogas.....	41
-11 Sensibilidad a toxinas “killer”.....	41
-12 Adhesión.....	42
-13 Estadística.....	43
Resultados.....	44
-1 Observación al microscopio óptico de <i>C. glabrata</i> silvestre y <i>trk1Δ</i> .....	47
-2 Requerimientos de potasio en un medio complejo.....	47
-3 Requerimientos de potasio en un medio mínimo.....	48
3.1 Crecimiento en medio sólido.....	48
3.2 Crecimiento en medio líquido.....	50
-4 Contenido intracelular de potasio.....	51
-5 Capacidad de absorción de potasio.....	52
-6 Transporte de rubidio.....	53
-7 Tolerancia a litio/sodio.....	59
7.1 Crecimiento en medio sólido.....	59
7.2 Crecimiento en medio líquido.....	60

-8 Contenido en litio en células normales en potasio.....	62
-9 Transporte de litio en células ayunadas de potasio.....	64
-10 Volumen celular/contenido intracelular de potasio.....	66
-11 Expresión génica.....	68
-12 Tolerancia a diferentes drogas.....	71
-13 Tolerancia a azida sódica.....	73
-14 Tolerancia a Antimicina A.....	74
-15 Toxinas “killer” .....	76
-16 Adhesión.....	77
Discusión.....	80
-1 Homeostasis de potasio y <i>CgTrk1</i> .....	83
-2 Otros fenotipos relacionados con <i>CgTrk1</i> .....	85
Conclusiones.....	90
Referencias.....	94
Anexo (publicación científica derivada de esta Tesis).....	108

## RELACIÓN DE FIGURAS

Figura 1. Transportadores catiónicos más importantes de membrana plasmática e intracelulares en <i>S.cerevisiae</i> .....	11
Figura 2. Modelo estructural de Trk1.....	13
Figura 3. Modelo estructural de KimA, un transportador de potasio de membrana en <i>B. subtilis</i> .....	15
Figura 4. Imagen al microscopio óptico (400x) (Nikon Motic BA200) de <i>C. glabrata</i> silvestre y <i>trk1Δ</i> .....	47
Figura 5. Crecimiento en medio complejo de <i>C. glabrata</i> silvestre y <i>trk1Δ</i> .....	48
Figura 6. Crecimiento en YNB Formedium a diferentes concentraciones de potasio de la cepa silvestre y <i>trk1Δ</i> de <i>C. glabrata</i> (A) y de <i>S. cerevisiae</i> BYT12 (YEp352) y (YEp-CgTRK1) (B).....	49
Figura 7. Efecto de la concentración de KCl sobre la constante específica de crecimiento en la cepa silvestre (●) y <i>trk1Δ</i> (○) de <i>C. glabrata</i> (A) o en las cepas de <i>S. cerevisiae</i> BYT12 (YEp352) (◇) y BYT12 (YEp-CgTRK1) (◆) (B).....	50
Figura 8. Contenido intracelular de potasio en la cepa silvestre y <i>trk1Δ</i> de <i>C. glabrata</i> y en las cepas de <i>S. cerevisiae</i> BYT12 (YEp352) y BYT12 (YEp-CgTRK1).....	51
Figura 9. Absorción de potasio por la cepa silvestre (●) y <i>trk1Δ</i> (○) de <i>C. glabrata</i> y en las cepas de <i>S. cerevisiae</i> BYT12 (YEp352) (◇) y BYT12 (YEp-CgTRK1) (◆).....	53
Figura 10. Representación de Lineweaver-Burk del transporte de rubidio en <i>C. glabrata</i> silvestre (●) y <i>trk1Δ</i> (○).....	55
Figura 11. Representación de Lineweaver-Buck del transporte de rubidio en <i>S.cerevisiae</i> BYT12 (YEp352) (◇) y BYT12 (YEp-CgTRK1) (◆).....	57
Figura 12. Crecimiento en medio sólido con diferentes concentraciones de LiCl y NaCl en <i>C. glabrata</i> silvestre y <i>trk1Δ</i> (A) y en <i>S. cerevisiae</i> BYT12 (YEp352) Y BYT12 (YEp-CgTRK1) (B).....	59
Figura 13. Crecimiento en medio líquido a diferentes concentraciones de LiCl y NaCl en <i>C. glabrata</i> silvestre (negro) y <i>trk1Δ</i> (blanco).....	60
Figura 14. Crecimiento en medio líquido a diferentes concentraciones de LiCl y NaCl en <i>S. cerevisiae</i> BYT12 (YEp352) (blanco) y BYT12 (YEp-CgTRK1) (negro).....	61
Figura 15. Contenido intracelular de potasio y sodio en la cepa silvestre y <i>trk1Δ</i> de <i>C. glabrata</i> y en las cepas de <i>S. cerevisiae</i> BYT12 (YEp352) y BYT12 (YEp-CgTRK1).....	62
Figura 16. Contenido en litio de células normales en potasio en ausencia o presencia de KCl en <i>C. glabrata</i> silvestre (color negro) y <i>trk1Δ</i> (color blanco).....	63

Figura 17. Contenido en litio de células normales en potasio en ausencia o presencia de KCl en <i>S. cerevisiae</i> BYT12 (YEp352) (color blanco) o en BYT12 (YEp-CgTRK1) (color negro).....	64
Figura 18. Efecto del potasio sobre la entrada de litio en células ayunadas de potasio en <i>C. glabrata</i> silvestre (A) y <i>trk1Δ</i> (B).....	65
Figura 19. Efecto del potasio sobre la entrada de litio en células ayunadas de potasio en <i>S. cerevisiae</i> BYT12 (YEp352) (A) o BYT12 (YEp-CgTRK1) (B).....	66
Figura 20. Contenido intracelular de potasio (A) y volumen celular (B) en <i>S. cerevisiae</i> BY4741 (control), BYT12 (YEp-CgTRK1) y BYT12 (YEp352).....	67
Figura 21. Expresión génica de <i>CgTRK1</i> en diferentes condiciones de pH.....	69
Figura 22. Expresión génica de <i>CgTRK1</i> con estrés salino.....	70
Figura 23. Expresión génica de <i>CgTRK1</i> en diferentes tiempos de ayuno.....	71
Figura 24. Crecimiento en medio sólido con cafeína o fluoruro de sodio de <i>C. glabrata</i> silvestre y <i>trk1Δ</i> .....	72
Figura 25. Ilustración de la cadena de transporte electrónico mitocondrial y los complejos afectados de dicha cadena por la acción de drogas que inhiben etapas del proceso.....	73
Figura 26. Crecimiento en medio sólido con diferentes concentraciones de NaN <sub>3</sub> en <i>C. glabrata</i> silvestre y <i>trk1Δ</i> (A) o <i>S. cerevisiae</i> BYT12 (YEp352) y BYT12 (YEp-CgTRK1) (B).....	74
Figura 27. Crecimiento en medio sólido con diferentes concentraciones de Antimicina A en <i>C. glabrata</i> silvestre y <i>trk1Δ</i> (A) o en <i>S. cerevisiae</i> BYT12 (YEp352) y BYT12 (YEp-CgTRK1) (B).....	75
Figura 28. Efecto inhibitorio de <i>D. hansenii</i> sobre <i>S. cerevisiae</i> EX33 (control positivo) y BY4741 (control negativo) (A), o sobre <i>C. glabrata</i> silvestre y <i>trk1Δ</i> (B).....	76
Figura 29. Adhesión a la superficie de un medio de cultivo en <i>C. glabrata</i> silvestre y <i>trk1Δ</i> .....	78
Figura 30. Adhesión a la superficie de un medio de cultivo en <i>S. cerevisiae</i> BYT12 (YEp352) y (YEp-CgTRK1).....	79

## RELACIÓN DE TABLAS

Tabla 1. Cepas utilizadas en el estudio.....	35
Tabla 2. Medios de cultivo utilizados en el estudio.....	36
Tabla 3. Parámetros cinéticos para el transporte de rubidio en <i>C. glabrata</i> silvestre y <i>trk1Δ</i> .....	56
Tabla 4. Parámetros cinéticos para el transporte de rubidio en <i>S. cerevisiae</i> BYT12 (YEp352) y BYT12 (YEpCgTRK1).....	58

## LISTADO DE LAS PRINCIPALES ABREVIATURAS DE LA TESIS

**A<sub>600nm</sub>**: Absorbancia a 600nm.

**Acyl-CoA**: acil coenzima A (*acyl coenzyme A*).

**CAX**: intercambiador de calcio (*calcium exchanger*).

**CMI**: concentración mínima inhibitoria.

**CSH**: superficie celular hidrófoba (*cell surface hydrophobicity*).

**DEPC**: dietilpirocarbonato.

**GFP**: proteína verde fluorescente (*green fluorescent protein*).

**HLP**: proteína semejante a la hemolisina (*hemolysin like protein*).

**LHL**: dominio hidrofílico largo (*long hydrophilic loop*).

**MDR**: resistente a múltiples drogas (*multidrug resistant*).

**MES**: ácido 2-(N-morfolino) etanosulfónico (*2-(N-morpholino) ethanesulfonic acid*).

**NHEs**: intercambiadores de Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> (*Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchangers*).

**PCR**: reacción en cadena de la polimerasa (*polymerase chain reaction*).

**qRT-PCR**: PCR cuantitativa a tiempo real (*real time quantitative PCR*).

**T<sub>m</sub>**: temperatura de fusión (melting).

**TMA**: tetrametilamonio.

**V<sub>max</sub>**: velocidad máxima.

**WT**: tipo salvaje o silvestre (*Wild Type*).

**YNB**: base nitrogenada de levadura (*Yeast Nitrogen Base*).

**YNB-F**: YNB Formedium.

**YPD**: levadura, peptona y dextrosa (*Yeast Peptone Dextrose*).



## **Resumen**

## RESUMEN

*Candida glabrata* es una levadura haploide, que a pesar de su nombre se encuentra filogenéticamente más cercana a *Saccharomyces cerevisiae* que a *C. albicans*. Se considera a esta levadura un patógeno emergente, ya que actualmente es la segunda causa más común de candidiasis después de *C. albicans*. Nuestro interés principal en *C. glabrata* deriva de que esta es la primera vez que se estudia a una levadura patógena con un único transportador de potasio en su membrana plasmática. En este trabajo se ha investigado el papel del transportador Trk1 de *C. glabrata* en la homeostasis de potasio y su implicación en otros parámetros fisiológicos con dos cepas de esta levadura (silvestre y *trk1Δ*). Además se realizó una segunda aproximación con dos cepas de *S. cerevisiae*: una cepa control carente de sus transportadores de potasio (BYT12 (YE<sub>p</sub>352)) y otra cepa derivada de la anterior en la que se expresa heterológamente el gen *CgTRK1* (BYT12 (YE<sub>p</sub>-CgTRK1)).

Actualmente se tiene poca información acerca de la homeostasis de potasio en *C. glabrata*. En esta tesis se ha abordado con detalle la función de *CgTrk1* como transportador de potasio en esta levadura. Para ello se han realizado ensayos relacionados con el crecimiento en medio sólido y en medio líquido en diferentes concentraciones de potasio, contenido intracelular y absorción del catión y transporte de potasio (rubidio). Todos estos ensayos han demostrado que *CgTrk1* puede trabajar en diferentes condiciones de crecimiento y que funciona como un transportador de potasio tanto en *C. glabrata* como cuando se expresa en *S. cerevisiae*, ya que permitió a las cepas que contienen este transportador crecer mejor en concentraciones micromolares de potasio. Además y en relación con el transporte de potasio, se observó que la actividad de *CgTrk1* varió entre células normales en potasio y células ayunadas de potasio, y estas variaciones se observaron en los parámetros cinéticos de  $V_{max}$  y  $K_m$ , ya que en las células que contenían este transportador, tanto la velocidad máxima como la afinidad por el sustrato aumentaron en células ayunadas de potasio, hecho que no se observó en las células que no contenían este transportador.

En la segunda parte de estas tesis se han estudiado otros fenotipos asociados al transportador *CgTrk1*. Estos fenotipos están relacionados con el estrés salino, el volumen celular, la tolerancia a sustancias tóxicas, la sensibilidad al efecto tóxico de la levadura *Debaryomyces hansenii* y la adhesión a un medio de cultivo sólido. En relación al estrés salino, se observó que las células de *C. glabrata* y *S. cerevisiae* que contienen el transportador *CgTrk1* eran menos sensibles al litio y al sodio o que la presencia de potasio redujo de forma eficiente el transporte de litio en las células que contenían este transportador. En lo referente al volumen celular, aunque no pudimos observar cambios de este parámetro dependiente de *CgTrk1* en *C. glabrata*, trabajando con *S. cerevisiae* observamos que a concentraciones bajas de potasio, solo las cepas que contenían el transportador pudieron tomar potasio, aumentar su volumen celular y su contenido intracelular de potasio. La tolerancia a sustancias tóxicas se determinó con compuestos que inhiben algún componente de la cadena de transporte electrónico mitocondrial, y se observó que algunos de ellos inhibieron más el crecimiento de las cepas que

contenían el transportador *CgTrk1*. En relación al efecto tóxico de la levadura *D. hansenii*, se observó que inhibió el crecimiento de *C. glabrata* y además inhibió más al crecimiento de la cepa silvestre de esta levadura. En la adhesión a un medio de cultivo sólido, un fenotipo que pudiera estar relacionado con la virulencia de *C. glabrata*, se observó que la cepa silvestre de esta levadura se mantuvo más tiempo adherida a un medio de cultivo sólido que la cepa *trk1Δ* cuando ambas se expusieron bajo el mismo caudal de un grifo.

En definitiva, en este trabajo se muestra como el transportador *CgTrk1* además de ser un transportador de potasio, tiene un papel importante en varios parámetros fisiológicos de la levadura *C. glabrata*, y hace pensar que esta proteína sería una posible diana para el desarrollo de nuevos tratamientos con antifúngicos.

**ABSTRACT**

*Candida glabrata* is a haploid yeast that despite its name, is phylogenetically closer to *Saccharomyces cerevisiae* than *C. albicans*. This yeast is considered an emergent pathogen as it's currently the second most common cause of candidiasis after *C. albicans*. Our main interest in *C. glabrata* originates from the fact that it is the first time a research is done on a pathogenic yeast with a unique plasma membrane potassium transporter. This paper has investigated the role of the *C. glabrata* Trk1 potassium transporter in potassium homeostasis and its involvement in other physiological parameters with two strains of this yeast (wild type and *trk1Δ*). A second approach was also done with two strains of *S. cerevisiae*: a strain without its potassium transporters (BYT12 (YE<sub>p</sub>352)) and another strain derived from the previous that express heterologously the gene *CgTRK1* (BYT12 (YE<sub>p</sub>-CgTRK1)).

There is very little information nowadays about the potassium homeostasis in *C. glabrata*. This thesis addresses in detail the *CgTRK1* function like potassium transporter in this yeast. To such purpose, trials related to growth in solid and liquid media in different potassium concentrations, potassium content and potassium (rubidium) transport have been conducted. All this trials have demonstrated that *CgTrk1* can work in different growth conditions and work as a potassium transporter both in *C. glabrata* and when it's expressed in *S. cerevisiae* because it allowed the strains that contain this transporter growing better in micromolar potassium concentrations. In addition to this and in relation to the potassium transport, it was observed that the activity of *CgTrk1* varied between normal potassium cells and free potassium cells and this variations were observed in the kinetic parameters of  $V_{max}$  and  $K_m$ ; This was due to the fact that in the cells that contain this transporter both the maximum velocity and the affinity to the substrate increased in free potassium cells, fact that was not observed in cells that didn't contain this transporter.

In the second part of this thesis other phenotypes have been researched related to the *CgTrk1* transporter. These phenotypes are related to the salt stress, the cell volume, the tolerance to toxic substances, the sensibility to the toxic effect from the yeast *Debaromyces hansenii* and the adhesion to growth solid medium. In relation to the salt stress it was observed that *C. glabrata* and *S. cerevisiae* cells containing the *CgTrk1* transporter were less sensible to lithium and sodium and that the presence of potassium efficiently decreased the lithium transport in cells containing this transporter. When it comes to the cell volume, although we couldn't observe changes of this parameter *CgTrk1*-dependent in *C. glabrata*, working with *S. cerevisiae*, we observed that at low potassium concentrations, only the strains containing this transporter could take potassium and could increase the cell volume and the potassium content. The tolerance to toxic substances was determined by compounds that inhibit some component of the mitochondrial electronic transport chain, and it was observed that some of them further inhibited the growth of the strains containing the *CgTrk1*. In relation to the toxic effect of the yeast *D. hansenii*, it was observed that it inhibited the growth of *C. glabrata* and it also inhibited more the growth of the wild type strain of this yeast. In the adhesion to

growth solid medium, a phenotype that could be related to the virulence of *C. glabrata*, it was observed that the wild type strain of this yeast remained longer attached to the growth solid medium than the *trk1Δ* strain when both strains were exposed under the same flow of a faucet.

In short, this work shows that the *CgTrk1* transporter is not only a potassium transporter, but it also has an important role in some physiological parameters of the yeast *C. glabrata*, and makes you think that this protein would be a possible target for developing new antifungal treatments.



## **Introducción**

## INTRODUCCIÓN

### 1. Importancia del potasio

El potasio es un elemento indispensable para la vida y el principal catión del organismo que se acumula en contra de altos gradientes de concentración en células vivas. Es un nutriente esencial presente en una alta variedad de alimentos, siendo el catión más abundante en los fluidos intracelulares, donde juega un rol fundamental en el mantenimiento de muchas funciones celulares, como en células excitables de músculos y nervios y, particularmente en plantas, representa un 8 % del peso seco. Dicho catión es necesario en múltiples aspectos del desarrollo y supervivencia celular, como por ejemplo el mantenimiento del volumen celular, la actividad enzimática, la síntesis de proteínas, el mantenimiento del potencial de membrana o el pH intracelular (Yenush 2016, Blanco Santos 2019). Las funciones del potasio en la célula no pueden ser reemplazadas por otros cationes sin producir alteraciones de las funciones celulares, y además las células de todos los organismos vivos tienen una alta permeabilidad para el potasio, hecho que se ha demostrado por la rápida captación celular de este catión después de una sobrecarga del mismo (Tejada Cifuentes 2008). Es un importante constituyente celular, que se mantiene en un rango de concentraciones de 50 a 500 mM en el citoplasma de las células vivas (Bañuelos *et al.* 2000). Debido al rol fundamental de este catión en todas las formas de vida, existe una alta variedad de mecanismos de transporte de potasio en diferentes tipos celulares.

#### 1.1 Homeostasis catiónica

En la mayoría de los seres vivos las células poseen sistemas de regulación catiónica como las ATPasas  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  en células animales, cuya función es transportar fuera el sodio e introducir el potasio dentro de las células, permitiendo un gradiente de potasio a través de la membrana celular y una alta acumulación intracelular (Palmer 2015). La capacidad de los microorganismos de mantener la homeostasis catiónica es esencial cuando se encuentran en diferentes condiciones ambientales y su relevancia en los estudios científicos ha sido fundamental en los últimos 100 años. En las levaduras el mantenimiento del potencial de membrana es importante en procesos y actividades celulares, acumulando altas cantidades de potasio y evitando por otro lado la acumulación de metales alcalinos como el sodio, que pueden resultar tóxicos y una alta concentración de ellos podría ser letal (Ariño *et al.* 2010, Ariño *et al.* 2014). Las levaduras no acumulan activamente sodio y este catión se encuentra en bajas concentraciones intracelulares en condiciones estándar, sin embargo esta concentración aumenta en un ambiente con mayor salinidad. El sodio es un inhibidor competitivo del transporte de potasio y es esencial para la asimilación de otros compuestos como el fosfato en levaduras como *Saccharomyces cerevisiae*. Cationes divalentes como el calcio que está presente frecuentemente en el ambiente, sirve para una variedad de funciones en todos los eucariotas y es esencial para el crecimiento de levaduras como *S. cerevisiae* o en funciones de señalización aunque para ello se debe mantener a bajas concentraciones

intracelulares. El magnesio es el segundo catión más abundante en las células de los mamíferos, es esencial en numerosos procesos celulares, incluyendo las reacciones enzimáticas, funciones de los canales iónicos, ciclos metabólicos, señalización celular y estabilidad del ADN/ARN. Su homeostasis está asociada al crecimiento, proliferación, diferenciación, metabolismo y muerte celular (Romani 2011, Yamanaka *et al.* 2019). El magnesio y el calcio son los cationes divalentes más abundantes en plantas, sirviendo como nutrientes y señalizadores, cuyos niveles en la célula están controlados por una variedad de canales iónicos. Un balance homeostático entre ambos cationes en las plantas es imprescindible para el crecimiento y desarrollo de las misma (Tang y Luan 2017). El hierro es otro catión esencial en una variedad importante de procesos biológicos incluyendo el transporte de oxígeno (en la hemoglobina), biosíntesis de ADN (como cofactor de la ribonucleótido reductasa) o en la generación de ATP (como cofactor de varias proteínas implicadas en el ciclo del ácido cítrico). En condiciones como el envejecimiento, enfermedades o estrés ambiental, incrementos en los niveles de hierro agravan el estrés oxidativo y acelera el daño celular. Por ello los niveles de hierro deben ser regulados, y levaduras como *S. cerevisiae* utilizan una serie de factores transcripcionales (Aft1p y Yap5p) para mantener la homeostasis de hierro (Bogdan *et al.* 2016, Martins *et al.* 2018).

## 1.2 Homeostasis de potasio y sodio en las levaduras

A diferencia de otros tipos celulares, la levadura se viene utilizando como modelo ideal para el estudio del transporte y la homeostasis catiónica desde hace más de 50 años. El motivo para usar *S. cerevisiae* como modelo principal en el estudio de la homeostasis catiónica es que fue el primer organismo eucariota en el que se secuenció su genoma, no es un patógeno, es unicelular y se utilizan herramientas genéticas en ella para desarrollar trabajo molecular desde hace tiempo. Presenta un alto nivel de conservación de muchas de sus proteínas de transporte iónico a lo largo de la evolución, siendo una de las primeras especies dentro del reino Fungi con la que se estudió los transportadores de potasio (Ariño *et al.* 2010, Bañuelos *et al.* 2000, Yenush 2016).

Levaduras como *S. cerevisiae*, tienen la capacidad de crecer en una gran variedad de hábitats, dentro de un amplio rango de concentraciones de potasio (10  $\mu$ M a 2,5 M) y sodio (<1,5 M), permaneciendo bastante constante la concentración de potasio intracelular, hecho que favorece el crecimiento y la división celular (Ariño *et al.* 2010, Gelis *et al.* 2012). Para mantener concentraciones óptimas intracelulares de potasio y un ratio estable de potasio/sodio, las levaduras emplean tres estrategias diferentes: una estricta discriminación de cationes, mediante transportadores que tienen mayor afinidad por el potasio respecto al sodio; un sistema eficiente de expulsión de tóxicos o exceso de cationes, y un secuestro selectivo o compartimentalización en los orgánulos. En condiciones de alta salinidad las levaduras utilizan los antiportadores Nha y las ATPasas, que eliminan los excesos de metales alcalinos como el sodio y que les proporcionan resistencia a este tipo de ambientes (Ariño *et al.* 2019). En las levaduras, los sistemas de transporte existen tanto en la membrana plasmática como en las

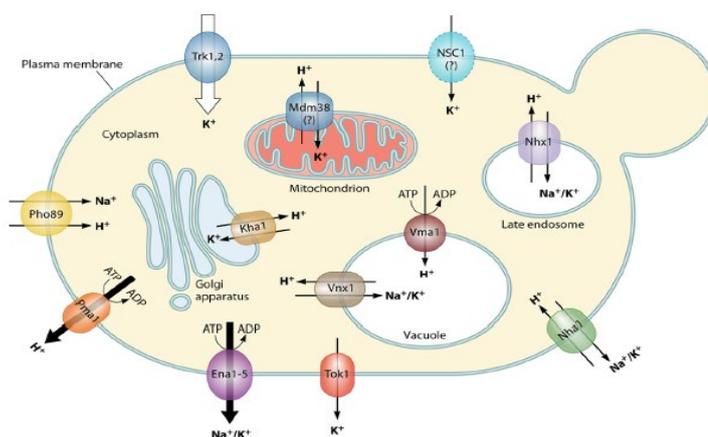
membranas de los orgánulos, con diferentes mecanismos y sustratos específicos (ATPasas, simportadores secundarios activos, antiportadores y canales pasivos) (Ariño *et al.* 2010).

Los transportadores de membrana plasmática y los transportadores intracelulares tienen varias funciones importantes, como son la de proporcionar cantidades suficientes de potasio a la célula, mantener la homeostasis de potasio, eliminar cationes tóxicos, preservar el potencial de membrana, regular el pH intracelular, mantener una turgencia positiva en la célula necesaria para la expansión de la membrana o división celular y soportar el estrés osmótico, la regulación de la homeostasis catiónica del citosol, el mantenimiento y la regulación intraorganular del potasio y el pH, o la modulación del tráfico de proteínas a través de endosomas (Ariño *et al.* 2010).

## 2. Transportadores de potasio en las levaduras

Los transportadores de potasio jugaron un papel fundamental en el momento que plantas y hongos tuvieron que adaptarse al medio terrestre donde existía déficit de potasio o sodio (Rodríguez-Navarro 2000) y contribuyen de manera fundamental en el mantenimiento de la homeostasis de potasio. Salvo algunas excepciones, la mayoría de las levaduras cuyo genoma ha sido completamente secuenciado, presentan varios transportadores de potasio en su membrana plasmática (Ariño *et al.* 2010, Ramos *et al.* 2011).

Existen dos modos de transporte de potasio en la membrana plasmática de las levaduras: una baja afinidad, cuya  $K_m$  está en el rango milimolar, observándose en células crecidas sin limitaciones de potasio, y una alta afinidad con una  $K_m$  que está en el rango micromolar en células crecidas en ayuno de potasio o en presencia de sodio (Ramos y Rodríguez-Navarro 1986, Madrid *et al.* 1998, Navarrete *et al.* 2010).



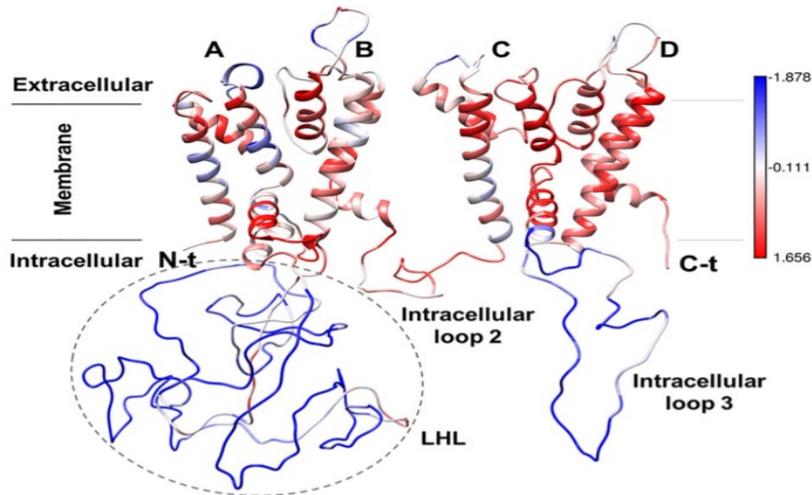
**Figura 1.** Transportadores catiónicos más importantes de membrana plasmática e intracelulares en *S. cerevisiae*. (Ariño *et al.* 2010).

## 2.1 Transportadores de membrana plasmática de potasio

Tres son los transportadores de potasio de la membrana plasmática: Trk1, Hak1 y Acu1. Estos transportadores difieren en su mecanismo de transporte y en estructura primaria proteínica y han sido identificados en una alta diversidad de especies de levaduras (Ramos *et al.* 2011).

### 2.1.1 Trk1

Los Trks pertenecen a la superfamilia de transportadores de  $K^+$ (SKT), que comprende una serie de proteínas responsables de transportar potasio, y además se encuentran tanto en procariotas como en eucariotas (no animales). Algunos de estos sistemas SKT, consisten en un canal que está acoplado a una ATPasa tipo P, y que funciona como un transportador activo que utiliza la energía de la hidrólisis de ATP (Almeida *et al.* 2013, Kale *et al.* 2019). En los años 1984 y 1985 se publica que la levadura posee un modo de transporte con alta afinidad por el potasio (Rodríguez-Navarro y Ramos 1984) y se obtiene y caracteriza el primer mutante carente de este modo de transporte (Ramos y Rodríguez-Navarro 1986). Ese mutante sirve de base para la posterior identificación de *TRK1* (Gaber *et al.* 1988). *TRK1* fue el primer gen aislado y estudiado que codificaba un transportador de potasio en células eucariotas no animales. Se ha demostrado que tiene la capacidad de mejorar el transporte defectuoso de potasio en la levadura mutante de *S. cerevisiae trk1Δ*. A partir de ese momento *TRK1* sirve como base para una caracterización más detallada de los procesos de transporte de potasio en *S. cerevisiae* (Vidal *et al.* 1990, Anderson *et al.* 1991, Ramos *et al.* 1994, Madrid *et al.* 1998, Haro y Rodríguez-Navarro 2003). Este gen codifica una proteína de membrana de 180 kilodaltons y está constituida de 1235 aminoácidos (Gaber *et al.* 1988). El transportador de potasio que codifica es el que se encuentra más ampliamente distribuido entre las levaduras, aunque en unas pocas especies su presencia no está acompañada de la existencia de otro sistema de transporte de potasio con diferente mecanismo (Ramos *et al.* 2011). El gen que codifica este transportador contiene importantes secuencias de aminoácidos que comparten un grado de identidad con los dominios de unión nucleotídicos de varias proteínas de procariotas y eucariotas, y además se han identificado ortólogos de *TRK1* en otras levaduras, hongos y plantas. Además esta proteína está compuesta de cuatro dominios (A, B, C y D), y una región llamada bucle hidrofílico largo (LHL o long hydrophilic loop) (Fig. 2), que se encuentra entre los dominios A y B (Durell y Guy 1999). En un estudio reciente (Kale *et al.* 2019) se demostró que Trk1 es funcional en ausencia del LHL, puesto que se ha comparado el crecimiento de una cepa mutante de *S. cerevisiae (Trk1ΔLHL)* con una cepa silvestre de la misma levadura a diferentes concentraciones de KCl, y ambas mostraron el mismo crecimiento. Se concluyó que Trk1 es funcional y transporta potasio en ausencia del LHL aunque en condiciones específicas, altas concentraciones de NaCl influyen negativamente en el transporte de potasio en las cepas mutantes *S. cerevisiae Trk1ΔLHL*.



**Figura 2. Modelo estructural de Trk1. (Kale et al. 2019).** Se muestran los cuatro dominios (A-D) y entre el dominio A y B el bucle hidrofóbico largo (LHL). Los colores indican la similitud entre Trk1 y Trk2 (segundo miembro de la familia de los Trk), de modo que el rojo indica alta conservación y el azul baja conservación entre un transportador y otro.

Trk1 también tiene la capacidad de discriminar entre el potasio y el sodio en esta levadura, exhibiendo dicha capacidad de forma más moderada entre el potasio y el rubidio (Rodríguez-Navarro y Ramos 1984). Aunque en *S. cerevisiae* el transporte de potasio depende principalmente de Trk1, existe un segundo transportador Trk2, con el que guarda un 55 % de identidad en su secuencia genómica (Gaber et al. 1988, Ramos et al. 1994, Rodríguez-Navarro 2000).

En varios estudios se trabajó con mutantes de *S. cerevisiae* *trk1Δ*, *trk2Δ* o dobles mutantes *trk1Δtrk2Δ*, y se demostró que los mutantes *trk1Δ* no crecían a concentraciones micromolares de potasio y no exhibían transporte de potasio en dicho rango de concentraciones a diferencia de la cepa silvestre. Por otro lado, los mutantes *trk2Δ* no mostraron diferencias aparentes en su crecimiento y transporte de potasio en comparación con la cepa silvestre, sin embargo en la cepa doble mutante *trk1Δ trk2Δ*, los requerimientos de potasio aumentaron en comparación con la mutante *trk1Δ*. Se concluyó que Trk2 en *S. cerevisiae* no influye significativamente en la homeostasis de potasio en presencia de Trk1 (Ramos et al. 1994, Ramos et al. 2011, Yenush 2016). Algo diferente ocurre con la levadura *Schizosaccharomyces pombe* (Calero et al. 2000), demostrándose que Trk1 y Trk2 son igual de importantes puesto que solo se observaron diferencias en los requerimientos de potasio en cepas mutantes carentes de los genes *TRK1* y *TRK2*. Se demostró que las proteínas Trk1 o Trk2 no funcionan solo como transportadores de potasio, sino que también actúan como reguladores del potencial de membrana, ya que una cepa mutante de *S. cerevisiae* carente de ambos genes, muestra un potencial de membrana alto respecto a la cepa silvestre (Madrid et al. 1998).

Respecto al mecanismo de transporte, no se ha llegado a una ninguna conclusión clara ya que nunca se ha podido medir con exactitud el potencial de membrana en las

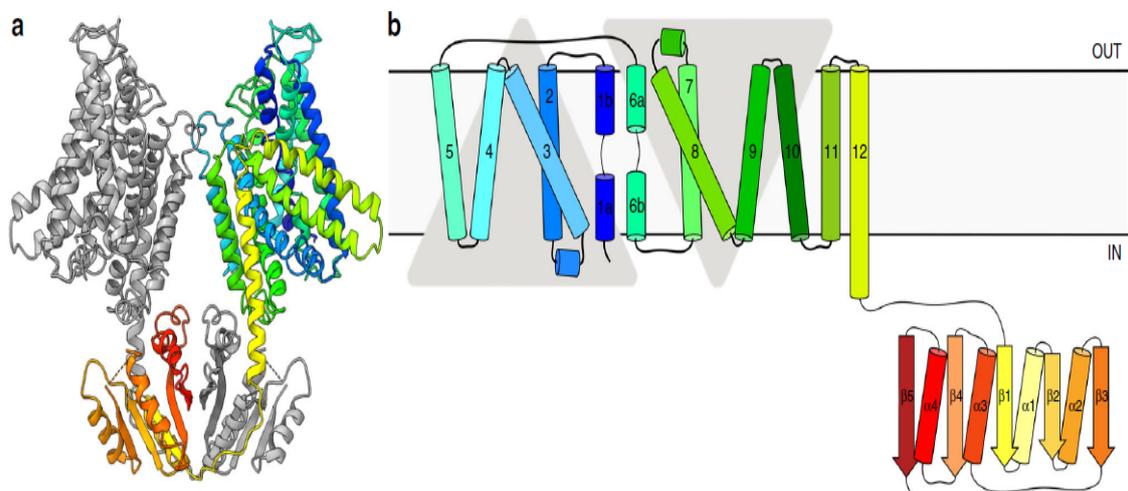
levaduras porque siempre ha resultado difícil. Los datos que se tienen acerca de dicho potencial son aproximados (-50 mV) e indican que Trk1 podría funcionar como un cotransportador de  $\text{Na}^+ : \text{K}^+$  como ocurre en la bacteria *Vibrio alginolyticus* (Tholema *et al.* 1999), o como un cotransportador de  $\text{K}^+ : \text{H}^+$ , igual que en la levadura *S. pombe* (Lichtenberg-Fraté *et al.* 1996, Rodríguez Navarro 2000). Sin embargo si se tienen datos exactos sobre el potencial de membrana de algunos hongos (-200 mV) y si se aplican al mecanismo de transporte Trk1 la teoría más aceptada es que funcionaría como un uniportador de potasio (Martínez *et al.* 2011).

### 2.1.2 Hak1

Los genes *HAK* pertenecen a la familia de genes *HAK-KUP*, y codifican un transportador de potasio que no está relacionado filogenéticamente con Trk1, que se identificó por primera vez en la levadura *Debaryomyces occidentalis*, y que era capaz de favorecer el crecimiento defectuoso de la cepa mutante *S. cerevisiae trk1Δtrk2Δ* a bajas concentraciones de potasio (Bañuelos *et al.* 1995). Posteriormente ortólogos de Hak1 también se identificaron en otras levaduras como *D. hansenii* (Prista *et al.* 2007) y *Hansenula polymorpha*. Por otro lado en 1997 se identificó en la cebada (*Hordeum vulgare*) el gen *HAK1* que codificaba un transportador de potasio y un segundo gen *HAK2* (Santa María *et al.* 1997), en *Arabidopsis thaliana* se identificó *AtKup1* que funcionaba también como un transportador de potasio (Fu y Luan 1998) o el transportador *OsHak1* de la especie del arroz *Oryza sativa*, que se demostró que proporcionaba resistencia al estrés salino o transportaba potasio en concentraciones bajas (Chen *et al.* 2015). También se demostró que Hak1 guardaba una alta homología aminoacídica respecto a los transportadores de potasio Kup de la bacteria *Escherichia coli* (Schleyer y Bakker 1993). En 1999 Hak1 se identificó en el hongo miceliar *Neurospora crassa*, cuyo gen se demostró que se expresaba en células ayunadas de potasio y que también funcionaba como un transportador de potasio (Haro *et al.* 1999). Además se demostró que este transportador en la cepa mutante de *S. cerevisiae trk1Δtrk2Δ* actuaba como un transportador de potasio, mostrando una baja afinidad ( $\text{Km K}^+$ ) en concentraciones milimolares de potasio, y una alta afinidad en concentraciones micromolares de potasio (Bañuelos *et al.* 1995, Bañuelos *et al.* 2000). Sin embargo, en otro estudio (Prista *et al.* 2007) *DhHAK1* se expresó en una cepa mutante de *S. cerevisiae trk1Δtrk2Δ*, y se observó que un incremento en la concentración de NaCl producía un efecto inhibitorio sobre el transporte de  $\text{Rb}^+$ , aunque sí mejoró la habilidad de retener potasio a bajas concentraciones. También se ha constatado que Hak1 no muestra discriminación entre potasio y rubidio, sin embargo sí muestra una discriminación leve entre potasio y cesio, y una alta discriminación entre sodio y litio (Rodríguez-Navarro 2000, Bañuelos *et al.* 2000, Ariño *et al.* 2010).

Respecto a su mecanismo de transporte se observó que tanto en *D. occidentalis* como en *N. crassa* este transportador funciona como un simportador  $\text{K}^+ : \text{H}^+$  o que varía en función de las diferentes condiciones de crecimiento, como se confirmó más tarde en el estudio de Martínez *et al.* 2011 con *D. hansenii*, que afirmaba que el transportador Hak1

es un simportador  $K^+ : H^+$  que bajo ciertas condiciones (presencia de sodio) actuaba como un simportador  $K^+ : Na^+$ , ya que un incremento en la concentración de sodio activaba el transporte de  $Rb^+(K^+)$ . En un trabajo reciente se identificó al transportador de potasio de membrana KimA de la bacteria *Bacillus subtilis* como miembro de las familias de proteínas KUP (Tascón *et al.* 2020). Se demostró que este transportador funcionaba como un simportador  $K^+/H^+$ , ya que se observó que era pH dependiente y necesitaba de un gradiente de protones para su funcionamiento. También se analizó en detalle la estructura de dicho transportador (**Fig. 3**), en la que se observó residuos de la proteína que se unen al potasio o a los protones y que se encuentran conservados entre otros miembros de la familia KUP.



**Figura 3. Modelo estructural de KimA, un transportador de potasio de membrana en *B.subtilis*.** (Tascón *et al.* 2020). a) Se observa la estructura dimérica de KimA, con un monómero coloreado en gris y el otro en varios colores, desde azul (N-terminal) hasta rojo (C-terminal). b) Representación esquemática de la topología de KimA. Cada monómero está compuesto de 12 TM (N-terminal transmembrana). La última hélice TM se extiende hasta dentro del citoplasma y conecta con el segundo monómero.

### 2.1.3 Acu1

En *Ustilago maydis* (hongo) y *Pichia sorbitophila* (levadura) se constató la existencia de un tercer tipo de transportador que pertenecía a las ATPasas tipo P y que tenía una alta afinidad por el potasio y el sodio cuando existía deficiencia de potasio (Benito *et al.* 2004, Ramos *et al.* 2011). En *U. maydis* se identificaron y estudiaron dos genes *ACU* (*UmACU1* y *UmACU2*) y en *P. sorbitophila* (*PsACU1*). Se utilizó una cepa mutante de *U. maydis* *acu1Δacu2Δ*, y una cepa mutante de *S. cerevisiae* *trk1Δtrk2Δ* que contenía el gen *UmACU2*. La expresión heteróloga del gen *PsACU1* o *UmACU2* en el mutante de *S. cerevisiae*, el mutante *acu1Δ* o *acu2Δ* y el doble mutante *acu1Δacu2Δ* de *U. maydis* demostraron en los ensayos de crecimiento con diferentes concentraciones de potasio

o en los ensayos de transporte de potasio y sodio que *ACU1* y *ACU2* codificaban un transportador que tenía una alta afinidad por ambos cationes. También se observó que después de ayunar de potasio y resuspender a *S. cerevisiae* (*trk1trk1ΔUmACU2*) en un medio con sodio y potasio, esta cepa transportó ambos cationes, por lo que se sugirió que dicho transportador funcionaba como un cotransportador de  $\text{Na}^+$ :  $\text{K}^+$ .

## 2.2 Transportadores intracelulares de potasio

Existe una alta variedad transportadores intracelulares de potasio, y en *S. cerevisiae* (Fig. 1) estos son los más estudiados: *Vnx1*, presente en las vacuolas; *Nhx1* presente en los endosomas tardíos o membranas del compartimento prevacuolar y *Kha1* presente en el aparato de Golgi (Ariño *et al.* 2010).

### 2.2.1 *Vnx1*

El gen *VNX1* contiene una secuencia que corresponde a un miembro de la familia de antiportadores  $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^+$ . En *S. cerevisiae* se caracterizó como un gen que codificaba un antiportador  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  que estaba presente en la membrana vacuolar, encargándose principalmente de mediar el intercambio de  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  o  $\text{K}^+/\text{H}^+$ . A pesar de su homología con otros miembros de la familia de transportadores que intercambian  $\text{Ca}^{2+}$  (CAX o “calcium exchanger”), es incapaz de mediar el transporte de  $\text{Ca}^{2+}$ . Está implicado en funciones como la homeostasis iónica citosólica o en la regulación del pH intracelular (Cagnac *et al.* 2007, Ariño *et al.* 2010).

### 2.2.2 *Kha1*

Debido a su secuencia aminoacídica, *Kha1* ha sido clasificado como un antiportador  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  puesto que tiene un dominio N-terminal similar a la familia de intercambiadores  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  (NHEs o  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  exchangers) (Flis *et al.* 2005). En un estudio (Maresova y Sychrová 2005) se quiso caracterizar un fenotipo específico utilizando cepas de *S. cerevisiae* mutantes carentes del gen *KHA1*, comparando su crecimiento con cepas silvestres en diferentes condiciones. Se observó que las cepas mutantes mostraron sensibilidad a pH alto y a la higromicina, sin embargo la adición de KCl suprimió este fenotipo de las cepas mutantes a pH alto. Todo esto sugirió que la función de esta proteína está relacionada con la homeostasis de potasio y la regulación del pH intracelular. Además con el empleo de la microcopía de fluorescencia y la proteína fluorescente GFP se confirmó la localización intracelular de dicho transportador, específicamente en la membrana del aparato de Golgi (Maresova y Sychrová 2005, Ariño *et al.* 2010).

### 2.2.3 Nhx1

Se trata de un antiportador  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  que se encuentra tanto en los endosomas como en la membrana de los compartimentos prevacuolares, y cuya función principal es la de participar en la tolerancia a sal mediante la compartimentalización de los cationes tóxicos dentro de la célula. También participa en el tráfico intracelular de proteínas y contribuye a la resistencia al choque hiperosmótico. Dependiendo del tipo de especie en la que se exprese esta proteína, tiene afinidad por diferentes cationes, como el  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  o el  $\text{Li}^+$ . Fue uno de los primeros antiportadores  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  caracterizados y se identificó por primera vez en *Arabidopsis thaliana*. También guarda un alto nivel de similaridad con los antiportadores  $\text{Na}^+$  o  $\text{K}^+/\text{H}^+$  bacterianos (Kinclová-Zimmermannova *et al.* 2004, Ariño *et al.* 2010).

### 3. *Candida glabrata*: consideraciones generales

Candidiasis es un término general utilizado para designar a todas aquellas infecciones fúngicas causadas por alguna levadura del género *Candida*. Es la tercera causa más común de infecciones nosocomiales en pacientes procedentes de unidades de cuidados intensivos y es frecuente en la formación de biofilms infectivos. Las infecciones producidas por las especies procedentes de dicho género producen unas grandes tasas de morbilidad y mortalidad en el mundo (Wilson *et al.* 2002, Rodrigues *et al.* 2014, Gabaldón y Carreté 2015, Arendrup y Patterson 2017). Las levaduras que actúan en la candidiasis, de forma oportunista llegan a ser patógenos bajo unas condiciones adecuadas, así como en una microbiota alterada de un hospedador o en pacientes inmunocomprometidos, y pueden afectar a la superficie o mucosas del cuerpo, o pueden llegar a invadir o colonizar los órganos internos así como el torrente sanguíneo, causando una infección denominada candidemia (Olson *et al.* 2018, Galocha *et al.* 2019).

Las infecciones por candidiasis comprenden el 75 % de todas las infecciones causadas por hongos, con una mortalidad alrededor del 46 %-75 %, y varias estimaciones globales sugieren que la candidiasis invasiva afecta a más de un millón de pacientes al año en todo el mundo, con una incidencia de candidemia de 2-14 por cada 100.000 habitantes. Se han identificado más de 20 especies diferentes que provocan la candidiasis, aunque la incidencia varía en función de la especie. *C. albicans*, *C. glabrata* y *C. parapsilosis*, y generalmente en este orden, son las tres especies más comunes que producen esta enfermedad, con una incidencia que se ha ido incrementando en los últimos años (Diekema *et al.* 2012, Gabaldón y Carreté 2015, Galocha *et al.* 2019). *C. albicans* y *C. glabrata* no solo constituyen un alto porcentaje de las especies de *Candida* presentes en el cuerpo humano, también son los patógenos más prevalentes de dicho género responsables de más de 400.000 infecciones en el mundo cada año.

A pesar de que son las levaduras patógenas más comunes en humanos, son filogenética, fenotípica y genéticamente diferentes (Galocha *et al.* 2019). Desde los primeros estudios moleculares, se demostró que *C. glabrata* está filogenéticamente más cercana a *S. cerevisiae* que a *C. albicans* o a *C. parapsilosis* (Llopis-Torregrosa *et al.* 2016). La mayoría

de las especies patógenas del género *Candida* pertenecen al llamado CTG o clado de *Candida*, un grupo de especies que comparten una rara particularidad en su código genético de modo que el codón CUG codifica el aminoácido de serina en vez de leucina. Aunque muchas levaduras patógenas pertenecen a este clado, existe en él una alta diversidad de especies, cuyos orígenes se han estimado de más de 135 millones de años y la mayoría de estas especies no son patógenas ni comensales de humanos. Sin embargo, *C. glabrata* es actualmente un nombre equivocado (Brunke y Hube 2013, Rodrigues *et al.* 2017), puesto que utiliza un código genético estándar y pertenece a un clado llamado *Saccharomycetaceae*, el cual divergió del clado CTG hace más de 230 millones de años y contiene también a la levadura modelo *S. cerevisiae* (Dujon *et al.* 2004, Muhlhausen y Kollman 2014). Las mayores diferencias entre *C. glabrata* y *S. cerevisiae* se interpretaron como una adaptación al huésped humano del primero: 1) la temperatura óptima para el crecimiento de *C. glabrata* está cerca de los 37 °C; 2) *C. glabrata* tiene una gran resistencia al estrés y soporta períodos prolongados de ayuno en comparación con *S. cerevisiae*; 3) el genoma de *C. glabrata* ha remodelado los componentes de la pared celular, resultando en una mayor adherencia a las superficies que suele colonizar; 4) *C. glabrata* ha perdido más genes que *S. cerevisiae* de su antecesor común, por lo que supondría una alta dependencia de su hospedador (Salvadó *et al.* 2011, Gabaldón y Carreté 2015).

*C. glabrata* fue originalmente denominada *Cryptococcus glabratus*, y descrita en 1917 como un componente de la microbiota humana (para una revisión reciente ver Bolotin-Fukuhara y Fairhead 2014). Años después comenzó a ser identificada como una fuente de infecciones importantes, denominada en ese momento *C. glabratus* o *Torulopsis glabrata* (Grimley *et al.* 1965). Se clasificó dentro del género *Torulopsis* debido a la ausencia en la formación de filamentos, hasta que en 1978 se determinó que la formación de hifas no era una cualidad imprescindible para pertenecer al género *Candida* y se consideró que esta levadura debía clasificarse dentro de este género debido a su patogenicidad en humanos (Cann 1992, Fidel *et al.* 1999).

*C. glabrata* es una levadura comensal que coloniza la superficie de las mucosas, así como la cavidad oral y el tracto gastrointestinal de la mayoría de individuos sanos, causando infecciones en pacientes inmunocomprometidos (Dujon *et al.* 2004, Kasper *et al.* 2015). Es un patógeno emergente, siendo el segundo predominante en la candidiasis, y llegando a constituir el 25 % de las infecciones de este tipo en las últimas décadas, y en algunos casos en pacientes con neoplasias hematológicas, es el principal patógeno fúngico en la sangre (Perlroth *et al.* 2007, Healy y Perlin 2018). Además en contraste con otras especies, *C. glabrata* no es polimórfica, creciendo solo como blastoconidio y respecto a su genética, una importante característica es su genoma haploide, en contraposición al carácter diploide de *C. albicans* u otras especies de este mismo género. Respecto a su bioquímica, *C. glabrata* fermenta y asimila únicamente glucosa y trehalosa, al contrario de otras especies como *C. albicans*, que fermentan o asimilan un alto número de azúcares, excluyendo la sacarosa (Larone 2002, Silva *et al.* 2012).

### 3.1 Patogenicidad

La virulencia microbiana es la capacidad de un microbio de causar enfermedades en un hospedador determinado, y por lo tanto es el resultado de una interacción entre hospedador-microbio, en la cual un cambio de ambos determina su desarrollo así como su capacidad de invadir las defensas del hospedador (Casadevall *et al.* 2011). Durante décadas se ha asumido que las levaduras del género *Candida* han podido infectar a un hospedador debido a su inmunodepresión. Sin embargo, actualmente se sabe que este tipo de levaduras han utilizado otro tipo de mecanismos a la hora de infectar, mediante diferentes factores de virulencia (Tamura *et al.* 2007, Silva *et al.* 2012).

*C. glabrata* es relativamente menos virulenta que *C. albicans*, sin embargo a pesar de ello, tiene la capacidad de hacer brecha en barreras naturales, invadir el torrente sanguíneo humano y causar infecciones sistémicas cuando se realizan trasplantes de órganos, en la nutrición parenteral o en la unidad de cuidados intensivos. Además *C. glabrata* utiliza como estrategia la coinfección para invadir el torrente sanguíneo y dañar las barreras naturales ya dañadas por otra especie como *C. albicans* (Chew *et al.* 2019). A todo esto se añade su capacidad de adhesión y formación de biofilms junto con la producción de enzimas hidrolíticas que dañan los tejidos, como proteasas, fosfolipasas y hemolisinas (Casadevall *et al.* 2011, Rodrigues *et al.* 2014). La adherencia es una cualidad fundamental en esta levadura, capacitándola a adherirse al tejido epitelial de un hospedador y siendo una cualidad directamente asociada a su virulencia (Gabaldón *et al.* 2013). Está mediada por proteínas asociadas a la pared celular denominadas adhesinas, pertenecientes a una diversa familia de proteínas, que facilita la capacidad de estas levaduras de colonizar humanos. Otro factor importante es la hidrofobicidad de la superficie celular (CSH), la cual depende de la arquitectura y composición de la pared celular. Después de adherirse a los tejidos o superficies del hospedador, las células crecen y desarrollan un biofilm, compuesto por varias capas de blastoconidios que proporcionan resistencia a esta levadura frente a distintas condiciones o terapias antifúngicas (Llopis-Torregrosa *et al.* 2019).

La producción de enzimas hidrolíticas como las proteasas, fosfolipasas, lipasas y hemolisinas es otro factor de virulencia fundamental que permite a este tipo de levaduras destruir los tejidos del hospedador, sobrevivir y replicarse entre los macrófagos. Al contrario del resto de levaduras de su género, *C. glabrata* no produce proteasas (Silva *et al.* 2010), sin embargo si produce fosfolipasas, que dañan las membranas de las células del hospedador destruyendo la mucosa del hospedador y permitiendo una invasión de los tejidos implicados (Marcos-Arias *et al.* 2011). Las lipasas también son producidas por *C. glabrata* y están implicadas en la hidrólisis de triacilgliceroles (Sikora *et al.* 2011). También las hemolisinas son producidas por esta levadura, cuya función es la de degradar la hemoglobina, permitiendo la obtención de hierro. Se sabe poco acerca de la expresión génica relacionada con la actividad hemolítica de esta levadura y quizás esta función este regulada principalmente por la presencia o ausencia de glucosa (Berila *et al.* 2011). En el estudio de Luo *et al.* (2004) utilizaron 34 cepas de *C. glabrata* para analizar su actividad hemolítica y relacionarla con

la expresión génica del gen *HLP* (“hemolysin-like protein”). Todas las cepas mostraron actividad hemolítica junto con una expresión génica del gen *HLP*, y este hecho evidenció que dicho gen tiene una implicación importante en la hemólisis.

La distancia evolutiva existente en *C. albicans* y *C. glabrata* se encuentra reflejada en muchos fenotipos diferentes entre ambas especies, lo que posiblemente resulte en diferentes mecanismos de virulencia. Estas diferencias influirían en el resultado de la enfermedad y deben tomarse en cuenta a la hora de manejar un tratamiento para estas infecciones. Una de las primeras diferencias constatadas por expertos clínicos es la baja susceptibilidad de *C. glabrata* frente a antifúngicos azoles comúnmente utilizados. Otra diferencia importante es el tipo de crecimiento que tiene *C. glabrata*, en el que no se forman pseudohifas, algo distinto a lo que ocurre con *C. albicans*, que tiene la habilidad de formarlas. Este crecimiento pseudohifal, implica un mecanismo virulento determinado en esta cepa, que resulta más invasivo y escapa del ataque o engullimiento de los macrófagos. En cambio, *C. glabrata* hace frente al ataque de los macrófagos de un modo diferente, ya que se ha demostrado que esta levadura permite que los macrófagos actúen sobre ella, y una vez dentro de ellos persiste y en ocasiones se divide. A pesar de todo, ambos son parásitos intracelulares y utilizan estrategias similares para sobrevivir dentro de los macrófagos, sin embargo mientras la fase intracelular de *C. albicans* en los macrófagos es corta y la fagocitosis es rápidamente seguida de un crecimiento pseudohifal y un escape, en *C. glabrata* ocurre un proceso de adaptación durante un largo periodo de tiempo dentro de los macrófagos (Roetzer *et al.* 2010, Rai *et al.* 2012, Kasper *et al.* 2015).

### 3.2 Invasión de nichos

Las células de *Candida* colonizan diferentes lugares anatómicos en los que encuentran microambientes con diferentes fuentes de carbono disponibles (Chew *et al.* 2019). Para sobrevivir y proliferar en los diferentes nichos del hospedador, *C. glabrata* se adapta a un diverso rango de estrés ambiental, así como de temperatura, variaciones de pH o disponibilidad nutricional. Algunos de estos nichos son complejos, dinámicos y frecuentemente limitados en relación a la fuente de carbono (Alves *et al.* 2020). La glucosa es una fuente eficiente de carbono y energía para el crecimiento de microorganismos *in vitro* y está presente en el torrente sanguíneo, pero es escasa en otros nichos del hospedador como el tracto gastrointestinal o dentro de los macrófagos (Chew *et al.* 2019). Por esta razón, en especies como *C. glabrata* la adaptación metabólica es esencial para el desarrollo de factores de virulencia, la morfogénesis celular, cambios en el fenotipo, las adhesinas, las invasinas y la formación de biofilm (Brown *et al.* 2014). En el estudio de Tzu *et al.* (2016) se analizó el efecto de la glucosa sobre *C. glabrata* en la formación de biofilm, la tolerancia a antifúngicos o la resistencia al estrés oxidativo. Se observó que la baja concentración de glucosa inducía la formación de biofilm y la resistencia al antifúngico Anfotericina B en *C. glabrata*, aunque por otro lado la alta concentración de glucosa fue lo que favoreció la resistencia al estrés oxidativo en esta levadura. Estos resultados demostraron el impacto que tiene la glucosa

sobre la fisiología y la virulencia de *C. glabrata*. Durante la colonización gastrointestinal y vaginal, donde la concentración de glucosa es baja, fuentes alternativas de carbono como el acetato o el lactato son abundantes y quizás sean uno de los principales sustentos que permiten el crecimiento de *C. glabrata* en este tipo de nichos (Alves *et al.* 2020).

En la colonización del tracto vaginal, las células de *C. glabrata* se encuentran con una variedad de estreses como las alteraciones en el pH, variaciones en la concentración de nutrientes, presencia de diferentes hormonas, la actividad del sistema inmune o la microbiota autóctona. En relación a este último factor, las bacterias del ácido láctico producen ácidos orgánicos que acidifican el nicho del tracto vagina y ejercen un efecto tóxico sobre patógenos como *C. glabrata* (Zhou *et al.* 2010). Sin embargo esta levadura ha desarrollado respuestas adaptativas frente a este tipo de estrés. En el estudio de Cunha *et al.* (2017) se analizó la tolerancia al ácido láctico en cepas de *C. glabrata* procedentes del laboratorio y del tracto vaginal, y se confirmó que estas últimas eran más resistentes al ácido láctico, y dicha resistencia se asoció con una alta actividad del transportador CgPma1. En la colonización del intestino, *C. glabrata* tiene que adaptarse a un nicho en el que la fuente de glucosa es escasa y la cantidad de oxígeno es limitada. Sin embargo existen grandes cantidades de lactato producido por la microbiota residente del intestino, y que puede ser utilizado por *C. glabrata* para sintetizar glucosa vía gluconeogénesis, tal y como se ha visto en el estudio de Ueno *et al.* (2011). En dicho estudio se observó que el gen *CYB2* de *C. glabrata* (que codifica la L-lactato deshidrogenasa, convirtiendo L-lactato en piruvato) juega un papel fundamental en la asimilación del lactato, y que dicha asimilación la podía realizar bajo condiciones de hipoxia. Estos dos factores son fundamentales para la proliferación de este patógeno en el intestino.

*C. glabrata* utiliza una serie de alternativas a la hora de invadir las defensas del organismo (Chew *et al.* 2019). Estas defensas son los macrófagos, y dentro de ellos hay una escasez de fuentes de carbono esenciales para *C. glabrata*, como la glucosa. Sorprendentemente en el estudio de Chew *et al.* (2019) se constató que *C. glabrata* utiliza otras alternativas como fuente de carbono como es el ciclo del glioxilato, en el cual intervienen enzimas metabólicas fundamentales para la patogénesis de esta cepa. También se ha demostrado que *C. glabrata* emplea mecanismos como la autofagia (proceso biológico utilizado por los eucariotas en la degradación de moléculas citosólicas, en el que se recicla material intracelular para suplir necesidades nutricionales bajo condiciones de ayuno, manteniendo la homeostasis y los niveles de proteínas), que le permiten soportar las condiciones de estrés a las que se ve sometida bajo la acción de los macrófagos, y que el gen *CgAtg1* es un factor fundamental en la inducción de este mecanismo (Shimamura *et al.* 2019, Roetzer *et al.* 2010).

Finalmente además de *C. glabrata*, otras levaduras como por ejemplo *S. cerevisiae* o *D. hansenii* invaden determinados nichos utilizando otro tipo de estrategias relacionadas con la producción de una serie de glicoproteínas denominadas toxinas “Killers” o micocinas (Morales-Menchén *et al.* 2018). Estas toxinas están codificadas por ARN vírico

de doble cadena procedente de la familia *Totiviridae* cuya replicación y encapsidación en partículas víricas es llevada a cabo por el virus L-A (Bostian *et al.* 1980). Estas toxinas producen un efecto tóxico sobre otras levaduras que se encuentran en el mismo medio y que son sensibles a ellas, y que disminuyen su crecimiento como consecuencia de dicho efecto. Las levaduras que producen toxinas killers están siendo útiles en varios campos como por ejemplo en la industria del vino, que utiliza este tipo de levaduras como biocontrol para evitar el sobrecrecimiento de otras especies (Santos *et al.* 2011). Además varios estudios han comprobado que estas toxinas pueden tener actividad antifúngica frente a otras levaduras patógenas, incluida *C. glabrata* (Buzzini *et al.* 2004).

### 3.3 Multirresistencia

La resistencia clínica ha ido surgiendo como consecuencia de un fallo en el tratamiento contra las infecciones (Alcazar y Mellado 2014). La sensibilidad o resistencia en el género *Candida* ha variado siempre en función del nivel de efectividad de la droga antifúngica frente a estos patógenos. La resistencia antifúngica es menos común en *C. albicans*, siendo más frecuente en *C. glabrata*, una levadura que a pesar de ser menos virulenta, ha provocado un alto número de casos por infección como consecuencia de su baja susceptibilidad a antifúngicos, desarrollando una alta resistencia. La inmunoevasión, los cambios en los componentes de su pared celular y la persistencia intracelular son factores fundamentales que permiten que *C. glabrata* persista en el curso de múltiples tratamientos antifúngicos. Consecuentemente, dependiendo del tipo de droga, los mecanismos de resistencia en *C. glabrata* son diferentes, generalmente por el modo de acción de cada tipo de antifúngico (Iraqi *et al.* 2005, Riera *et al.* 2012). Las opciones para el tratamiento de infecciones fúngicas son escasas, existiendo tan solo tres tipos de antifúngicos (azoles, polienos y equinocandinas). Los azoles como el fluconazol, itraconazol, ketoconazol, voriconazol, posaconazol y rosaconazol, tienen como función específica bloquear la biosíntesis de ergosterol mediante la inhibición de la lanosterol 14\*-desmetilasa. Además son responsables de que no se renueven los esteroides en las membranas celulares afectando a procesos vitales como la señalización celular, la exocitosis o la endocitosis (Rodrigues *et al.* 2014). Durante décadas, los antifúngicos azoles, se utilizaban como profilácticos, terapia preventiva o tratamiento frente a infecciones de *Candida*, con *C. albicans* como especie predominante (Maenza *et al.* 1997). Sin embargo aparecieron cambios epidemiológicos relacionados con infecciones por especies de *Candida* que no son *C. albicans*, como *C. glabrata*, una levadura de la que la mayoría de los aislamientos que se han obtenido presentan baja susceptibilidad a antifúngicos azoles (Tschermer *et al.* 2011). La plasticidad genómica es una importante maquinaria de adaptación a cambios ambientales, así como las respuestas en el hospedador o la resistencia a la presión de los antifúngicos, algo muy común en muchas levaduras incluyendo a *C. glabrata* (Kaur *et al.* 2005). Se analizó la relación existente entre la sobreexpresión y mutación de varios genes en *C. glabrata* con la resistencia a los antifúngicos azoles (Farahyar *et al.* 2016). Estos genes eran *CgCDR1* y *CgCDR2* que codifican transportadores pertenecientes a la familia ABC, y el gen *FAA1*, que codifica

una proteína perteneciente a las Acyl-CoA sintasas y que está implicada en el metabolismo lipídico de la levadura. A través de varios ensayos genéticos en dicho estudio, se constató que en cepas resistentes a azoles de *C. glabrata* existía una sobreexpresión de los genes *CgCDR1*, *CgCDR2* y *FAA1* respecto a las cepas susceptibles. Por ello demostraron que la implicación de estos genes es esencial en la adquisición de la resistencia de *C. glabrata* frente a antifúngicos azoles. Todos los genes implicados en la biosíntesis de ergosterol se regulan en presencia de antifúngicos azoles. Estos genes son *ERG1*, *ERG3*, *ERG6*, *ERG7*, *ERG9* y especialmente *ERG11*, que convierte el lanosterol en 4,4-dimethylcolesta-8, 14,24-trienol. Este gen es el principal implicado en el incremento de la producción de ergosterol, en respuesta al ataque de los antifúngicos azoles a la membrana de la levadura *C. glabrata* (Akins 2005). Respecto a los antifúngicos polienos, la Anfotericina B, utiliza como mecanismo de acción la unión al ergosterol y posterior formación de poros en la membrana plasmática (Ellis 2002). De la resistencia a polienos en *C. glabrata* se tiene poca información, sin embargo se ha constatado que mutaciones en el gen *EGR6* (codifica una de las enzimas implicadas en la biosíntesis de ergosterol en la levadura) disminuyen la sensibilidad a este tipo de antifúngicos (Vandeputte *et al.* 2008). La resistencia a los azoles y polienos ha generado una expansión en el uso de equinocandinas, cuya acción principal es la inhibición de la  $\beta$ -1,3-D-glucano sintasa, una enzima que sintetiza la mayoría de los componentes de la pared celular en las especies del género *Candida*. La terapia con equinocandinas es muy eficaz, sin embargo la resistencia a dicho antifúngico está creciendo y está suponiendo una amenaza para los tratamientos clínicos, siendo poco frecuente en *C. albicans* y otras especies de *Candida*, aunque esto no es cierto en relación con *C. glabrata* donde la resistencia es más severa y a menudo presenta multirresistencia a drogas (MDR) (Shields *et al.* 2012, Healy y Perlin 2018).

Los pacientes infectados con *C. glabrata* y tratados con equinocandinas se evaluaron retrospectivamente (Shields *et al.* 2012) y se buscó correlacionar las respuestas terapéuticas a estos antifúngicos con la presencia de mutaciones en los genes *FKS* (genes que codifican la enzima  $\beta$ -1,3-Dglucano sintasa) de algunas cepas de *C. glabrata*. Mediante varios análisis de regresión se constató que la presencia de mutaciones en los genes *FKS* fue el factor principal de riesgo en el fallo terapéutico con equinocandinas. Sin embargo, otros factores también influían sobre dichos fallos terapéuticos, como son los factores relacionados con la respuesta inmune, enfermedades subyacentes, extracciones de catéteres intravenosos o intervenciones quirúrgicas, puesto que algunos pacientes infectados con cepas silvestres de *C. glabrata* respondieron mal a la terapia antifúngica. El resultado de este estudio sugirió que las sustituciones aminoacídicas en los genes *FKS* están asociadas con elevadas CMI<sub>50</sub> (concentración mínima inhibitoria) de estos antifúngicos, considerando este tipo de mutaciones como el mejor indicador para detectar fallos terapéuticos puesto que hasta ahora estas mutaciones en *C. glabrata* son el único mecanismo conocido que reduce la susceptibilidad a los antifúngicos de este tipo (Denardi *et al.* 2017, Rodrigues *et al.* 2017, Arendrup y Patterson 2017).

Es importante mencionar que en algunos casos se ha observado que en varios aislamientos de *C. glabrata* existe una variabilidad en el cariotipo (Shin *et al.* 2007). La mayoría de las diferencias cariotípicas observadas entre las cepas de *C. glabrata* están relacionadas con un pequeño número de translocaciones cromosómicas. Se ha sugerido en varios estudios (Shin *et al.* 2007, Bader *et al.* 2012) que los cambios cromosómicos y las adaptaciones funcionales pueden ocurrir durante la infección y bajo condiciones de terapia antifúngica, y que este tipo de cambios facilitan la aparición de cepas resistentes a los antifúngicos.

La formación de biofilm en *C. glabrata* es otro rasgo importante que resulta ser determinante durante la candidiasis y que puede influir en la resistencia a los diferentes antifúngicos. La densidad celular es una importante característica en biofilms, que favorece la resistencia a los antifúngicos, particularmente a azoles. De hecho en un estudio con *C. albicans* se demostró que muy pocas células procedentes del biofilm presentaban sensibilidad a azoles (Perumal *et al.* 2007). Además se sabe que en biofilms densos existe una cooperación entre la población celular a través de la cual las células coordinan su comportamiento mediante la secreción de unas moléculas de señalización, y este proceso se denomina “quorum sensing” (Ramage *et al.* 2001). Varios estudios moleculares sobre la formación de biofilms podrían generar una nueva vía en el desarrollo terapéutico frente a infecciones provocadas por este tipo de patógenos. Algunos genes implicados en la formación de biofilms ya están siendo estudiados por los investigadores. Entre ellos, podemos encontrar el gen de la catalasa peroxisomal (*CTA1*), los genes implicados en la biosíntesis y degradación de tirosina (*ARO*), el gen que codifica la músculo queratina kinasa (*MSK*), el gen que codifica la proteína de choque térmico (*HSP90*) u otros genes implicados en la formación de la matriz extracelular (*ZAP1*, *GCAL1*, *ADH5*, *CSH1*) (Bandara *et al.* 2010). La respuesta al estrés se ha considerado como un mecanismo de resistencia a antifúngicos en biofilms (Cannon *et al.* 2007). En un estudio con *C. glabrata* se demostró que en los biofilms existe una regulación proteica en respuesta al estrés, y algunas de esas proteínas implicadas son la Hsp12p (proteína de choque térmico) u otras proteínas (Trx1 y Pep4) (Seneviratne *et al.* 2010). La persistencia celular en biofilms es otro factor importante en la resistencia a antifúngicos. Uno de los primeros estudios con este tipo de células procedentes de biofilms se realizó con *C. albicans*, y se observó que células supervivientes a la destrucción de un biofilm con Anfotericina B, generaron un biofilm nuevo con una subpoblación de células persistentes que eran resistentes a antifúngicos. Además en *C. glabrata* se ha demostrado que un tratamiento prolongado e inefectivo con antifúngicos podría ser beneficioso en la formación de biofilms y que este hecho sería una de las causas de la recurrencia de infecciones con este tipo de patógenos (LaFleur *et al.* 2006).

#### **4. Transporte de potasio en *C. glabrata***

En las levaduras del género *Candida* se han identificado los tres transportadores de membrana de potasio principales (Trk1 uniportador, Hak1 simportador y Acu1 ATPasa) y se ha revelado que las especies de dicho género difieren en el número y tipo de

transportadores de potasio (Husekova *et al.* 2016). Sorprendentemente, a diferencia de otras especies de este género, *C. glabrata* posee tan solo un único gen que codifica un único transportador de potasio, del tipo Trk1 (*CgTRK1*, CAGL0L05654g). Este gen comparte un 54 % de identidad con el gen *TRK1* de *S. cerevisiae*, y un 45 % con *ScTRK2*, por ello guarda más parecido al Trk1 de esta levadura que al de *C. albicans* (Llopis-Torregrosa *et al.* 2016).

La función de la proteína codificada por el gen *CgTRK1* en la homeostasis de potasio en *C. glabrata* fue el objetivo principal del estudio de Llopis-Torregrosa *et al.* 2016, así como su implicación en algunos aspectos fisiológicos, como el potencial de membrana o en el pH intracelular. Para ello trabajaron con *C. glabrata* silvestre y *trk1Δ* junto con cepas de *S. cerevisiae* que expresaban heterológamente *CgTRK1*, y se realizaron ensayos de crecimiento, contenido en rubidio, medidas de potencial de membrana y pH intracelular, y como resultado se constató que en los ensayos de crecimiento, la ausencia del gen *CgTRK1* disminuía la capacidad de las células para crecer a concentraciones bajas de potasio (Llopis-Torregrosa *et al.* 2016). También se observó que un incremento en el número de copias del gen *CgTRK1* mejoraba el crecimiento a bajas concentraciones de potasio, cuando se comparaba el crecimiento de una cepa silvestre de *S. cerevisiae* con otra que contenía un plásmido con el gen *CgTRK1* respecto a la misma cepa transformada con un plásmido vacío. Las cepas de *C. glabrata* silvestre y *trk1Δ* no diferían en su tolerancia a altas concentraciones de potasio, llegando a ser igualmente tóxico para ambas como resultado de un estrés osmótico que dicho catión generaba bajo altas concentraciones. También se observó que la cepa de *C. glabrata trk1Δ* fue más sensible a sodio y litio, confirmando que Trk1 en *C. glabrata* influía en la tolerancia a estos cationes.

Los análisis del potencial de membrana indicaron que en *C. glabrata trk1Δ* la membrana de las células se hiperpolarizó, característica que influía en la sensibilidad de la cepa mutante a ciertas drogas catiónicas como la higromicina B, la espermina y el TMA (tetrametilamonio), ya que estas células hiperpolarizadas acumulaban grandes cantidades de estas drogas, mostrando una mayor sensibilidad. La delección del gen *CgTRK1* en esta levadura también influyó en el pH intracelular y en la sensibilidad al pH externo, probablemente debido a un incremento pasivo en el influjo de protones originado por una hiperpolarización de la membrana plasmática.

En conclusión este estudio mostró que la ausencia del único transportador de potasio en *C. glabrata* provoca un efecto pleiotrópico sobre las células, modificando varios parámetros fisiológicos en la cepa mutante. Existe pues un talón de Aquiles en la fisiología de esta levadura patógena, siendo un buen punto de partida en la búsqueda de tratamientos para su inhibición específica. Es importante comentar que diferentes estudios han demostrado que levaduras mutantes carentes de sus transportadores de potasio son capaces de sobrevivir e incorporar potasio a sus células mediante un transporte de baja afinidad no específico cuando se cultivan en altas concentraciones de potasio, aunque aún no se tiene conocimiento de la identidad de esos transportadores. En la cepa *trk1Δ* de *C. glabrata* se ha propuesto a los transportadores

de amonio como posibles candidatos al transporte de potasio en estas condiciones. Esta posibilidad se basa en el hecho de que cultivando esta cepa en un medio con potasio limitante y amonio o prolina (fuente pobre de nitrógeno) como fuente de nitrógeno, se observó que esta cepa creció mejor en el medio al que se añadió prolina, hecho que confirmó que el potasio se transportaba mejor en estas condiciones que en presencia de amonio, el cual inhibiría la toma del catión alcalino (Llopis-Torregrosa *et al.* 2016).

Los rasgos fundamentales de la virulencia de *C. glabrata* han sido objeto de estudio reciente en las cepas silvestre y *trk1Δ*. Dichos rasgos son las propiedades de la superficie celular, la capacidad de causar infecciones en dos modelos de insectos hospedadores (*Drosophila melanogaster* y *Galleria mellonella*) y su comportamiento frente a la fagocitosis de los macrófagos (Llopis-Torregrosa *et al.* 2019). La ausencia o presencia de Trk1 en *C. glabrata* influyó tanto en la hidrofobicidad de la superficie celular como en la adhesión, siendo ambas cualidades más altas en la cepa *trk1Δ* cuando se incubó en condiciones limitantes de potasio. La formación de biofilm también fue diferente en *C. glabrata* silvestre y *trk1Δ* cuando se cultivaron en un amplio rango de concentraciones de KCl. En dicho rango en la cepa *trk1Δ* se observó la formación de biofilm en casi todas las concentraciones de KCl, sin embargo en la cepa silvestre solo se observó formación de biofilm en las concentraciones más altas. Esto sugirió que la disponibilidad de potasio y su transporte en las células, tuvo un efecto directo en la formación de biofilm.

Con todos estos resultados obtenidos se constató que la cepa mutante de *C. glabrata* podía ser más virulenta que la cepa silvestre, sin embargo la incapacidad de la cepa *trk1Δ* para proliferar en un medio con una concentración de potasio cercana a la existente en un hospedador (baja concentración de potasio) sugirió que dicha incapacidad correspondería a una baja virulencia sobre el hospedador y así fue, puesto que tanto en *D. melanogaster* como en *G. mellonella*, la infección por parte de la cepa mutante fue menos severa. Esto confirmó que la pérdida del transportador de potasio Trk1 conllevó a una atenuación de la virulencia en *C. glabrata*.

La ausencia de Trk1 en *C. glabrata* también influyó claramente en la interacción de esta cepa con macrófagos. Se observó que el crecimiento y la división de las células de *C. glabrata* interactuando con macrófagos indicó que la cepa *trk1Δ* exhibía un crecimiento bajo en comparación con la cepa silvestre. Este crecimiento se siguió durante horas y se constató que el porcentaje de las células de la cepa silvestre que se duplicó fue mayor que el de las células de la cepa *trk1Δ*. El bajo crecimiento de la cepa mutante sugirió que la interacción de ambas cepas con los macrófagos difiere y que un transportador de potasio en esta levadura es esencial para proliferar en estas condiciones.

En definitiva, este estudio sugirió que la ausencia del gen *TRK1* podría tener un efecto negativo en la virulencia de esta levadura debido a su incapacidad de transporte y mantenimiento de la homeostasis de potasio.

En esta tesis se ha abordado un estudio sobre el único transportador de potasio de membrana de la levadura *C. glabrata* (*CgTrk1*), un patógeno potencial cada vez más frecuente. Se ha estudiado con detalle como la ausencia o presencia de este

transportador influye en parámetros fisiológicos como los requerimientos y el contenido de potasio, el transporte de rubidio, el tamaño celular y la tolerancia a distintas sales; todo ello con el fin de conocer la implicación de este transportador en la homeostasis y transporte de potasio en *C. glabrata*.

Además se han identificado otros fenotipos que están relacionados directa o indirectamente con la presencia del transportador *CgTrk1*. Demostramos que algunos inhibidores de la cadena de transporte electrónico son más efectivos en las cepas que contenían dicho transportador que en las cepas que no lo contenían y que existen diferencias entre la cepa silvestre y la cepa *trk1Δ* en lo referente a la capacidad de adherirse a la superficie de un medio de cultivo sólido.

## **Objetivos**





## OBJETIVOS

Esta Tesis tuvo como **Objetivo General** el estudio del único transportador de potasio de la membrana plasmática de *Candida glabrata*, y esta idea se plasmó de forma más detallada en los siguientes **Objetivos Específicos**:

1- Caracterización de *CgTrk1* como un transportador de potasio en la levadura *C. glabrata*.

2- Definir la posible regulación transcripcional del gen *CgTRK1* en las diferentes condiciones de crecimiento (ayuno celular, diferentes pHs y estrés salino).

3- Buscar nuevos fenotipos relacionados con el transportador *CgTrk1*.

## **Material y métodos**





## MATERIAL Y MÉTODOS

### 1. Levaduras utilizadas en este estudio

Se utilizaron para este estudio dos cepas de la levadura *Candida glabrata*, una es silvestre y otra manifiesta una delección en el gen *CgTRK1*. Paralelamente se trabajó con dos cepas transgénicas de *Saccharomyces cerevisiae*, una (como control) que carece de sus transportadores de potasio y otra que expresa heterológamente el gen *CgTRK1*. También se utilizó la cepa *Debaryomyces hansenii* 767, y dos cepas de *S. cerevisiae*, una sensible a las toxinas “killer” (EX33) y otra silvestre que además es resistente a dichas toxinas (BY4741). Todas ellas se presentan a continuación en la Tabla 1 en negrita.

Tabla1. Cepas utilizadas en este estudio.

Cepa	Característica	Referencia/origen
<i>C. glabrata</i>	WT	Llopis-Torregrosa et al. 2016
<i>C. glabrata</i>	ATCC 2001 <i>trk1Δ::FRT</i>	Llopis-Torregrosa et al. 2016
<i>S. cerevisiae</i> BYT12	YEp352 <i>trk1trk2Δ</i>	Llopis-Torregrosa et al. 2016
<i>S. cerevisiae</i> BYT12	YEp-CgTRK1	Llopis-Torregrosa et al. 2016
<i>S. cerevisiae</i> BY4741	<i>MATa his3Δ1leu2Δmet15Δura3Δ</i>	EUROSCARF
<i>S. cerevisiae</i> EX33	<i>MATa/α HO/HO [K1<sup>0</sup> K2<sup>0</sup> K28<sup>0</sup> Klus<sup>0</sup>]</i>	Rodríguez-Cousiño et al. 2011
<i>Debaryomyces hansenii</i> 767	WT	Netherland Collection

### 2. Medios de cultivo y condiciones de crecimiento

Las levaduras utilizadas en este estudio se crecieron y se mantuvieron en medios de cultivo específicos dependiendo de las necesidades auxotróficas de cada una de ellas y del tipo de ensayo. Las cepas de *C. glabrata* silvestre y *trk1Δ* se mantuvieron en YNB completo (Tabla 2). Las cepas de *S. cerevisiae* con marcadores auxotróficos se mantuvieron en YNB sin aminoácidos/amonio (Tabla 2) junto con los requerimientos auxotróficos (histidina 40 mg/l, adenina 20 mg/l, leucina 60 mg/l, triptófano 40 mg/l, metionina 20 mg/l, inositol 50 mg/l). El pH de ambos medios de cultivo se ajustó a 5,8 con hidróxido de amonio. Para los experimentos relacionados con el ayuno de las células, se utilizó YNB-Formedium (Tabla 2). En los ensayos relacionados con la expresión génica, se utilizó el medio YPD para favorecer la velocidad de crecimiento de la cepa silvestre de *C. glabrata*. Para la solidificación en placas de todos los medios de cultivo se aplicó un 2 % de agar (Agar Bacteriological, Oxoid).

Tabla 2. Medios de cultivo utilizados en este estudio

Medio	Composición
YNB completo	YNB 0,17 %, Glucosa 2 %, KCl 100 mM
YNB sin aminoácidos/amonio	YNB 0,17 %, Glucosa 2 %, Sulfato de amonio 0,4 %, KCl 100 mM
YNB-Formedium	YNB 0,17 %, Glucosa 2 %, Sulfato de amonio 0,4 %
YPD	Glucosa 2 %, Peptona 2 %, Extracto de levadura 1 %

### 3. Mantenimiento de las cepas

Las cepas se mantuvieron para largos períodos de tiempo en tubos de 1,5 ml de volumen (Eppendorf) con glicerol (20 % del volumen) y el medio de cultivo correspondiente a cada cepa (80 % del volumen), a una temperatura de  $-80^{\circ}\text{C}$ . Para el mantenimiento en placas, la siembra de las cepas se realizó por estrías y se incubaron en una estufa a  $28^{\circ}\text{C}$  durante dos días.

### 4. Ensayos relacionados con los requerimientos de potasio

Se estudiaron los requerimientos de potasio en las cepas *C. glabrata* silvestre, *C. glabrata trk1Δ*, *S. cerevisiae* BYT12 (YEp352) y *S. cerevisiae* BYT12 (YEp-CgTRK1).

#### 4.1 Crecimiento en medio sólido

El crecimiento en gotas se estudió en medio sólido bajo diferentes concentraciones de KCl. Se partió de suspensiones de células normales en potasio (YNB + 100 mM de KCl), que se centrifugaron (2000 g) y lavaron dos veces con agua destilada estéril, y se ajustaron a 1 ( $A_{600\text{nm}}$ ). Se realizaron diluciones seriadas y se inocularon gotas de 5  $\mu\text{l}$  sobre placas de medio sólido. Dichas placas se incubaron posteriormente en una estufa a una temperatura de  $28^{\circ}\text{C}$ .

#### 4.2 Crecimiento en medio líquido

En los casos en que se realizaron curvas de crecimiento, se prepararon medios líquidos con diferentes concentraciones de potasio en tubos con 5 ml de YNB-Formedium, cada uno con su correspondiente concentración de KCl. Al igual que en los ensayos de crecimiento en gotas, se partió de suspensiones de células normales en potasio que se centrifugaron (2000 g) y lavaron dos veces con agua destilada estéril y se ajustaron a 1 ( $A_{600\text{nm}}$ ). Se partió de un inóculo inicial de 0,01-0,02 ( $A_{600\text{nm}}$ ) y el crecimiento se siguió durante 24-48 horas utilizando un Spectronic 20 (Bausch and Lomb). Durante dicho período las células se mantuvieron en agitación a  $28^{\circ}\text{C}$ .

Para obtener células normales en potasio, las levaduras se inocularon en YNB con 100 mM de KCl. Para obtener células ayunadas de potasio, se centrifugaron y lavaron con agua destilada estéril, y se resuspendieron en YNB-Formedium sin potasio durante un período de tres horas.

## 5. Contenido intracelular de cationes

Para estos ensayos se utilizaron las cepas *C. glabrata* silvestre, *C. glabrata trk1Δ*, *S. cerevisiae* BYT12 (YEp352) y *S. cerevisiae* BYT12 (YEp-CgTRK1) y se estudió el contenido en potasio, litio y sodio. Estos ensayos se realizaron tanto en células normales en potasio como en células ayunadas de potasio (solo para potasio). También se caracterizó dicho contenido cuando añadíamos 100 ó 0,5 mM de KCl a las células posteriormente al ayuno de las mismas. Se partió de suspensiones de células normales en potasio que se resuspendieron a 0,3 ( $A_{600nm}$ ) en YNB con 100 mM de KCl o en YNB-F sin potasio para los ensayos de ayuno. En el ensayo del contenido de litio las células se resuspendieron en una solución tampón (MES 10 mM suplementada con 2 % glucosa,  $MgCl_2$  0,1 mM, 25  $\mu$ M de KCl y ajustada a un pH de 5,8 con  $Ca(OH)_2$ ) con 100 mM de LiCl (control), 100 mM de LiCl + 5 mM de KCl y 100 mM de LiCl + 50 mM de KCl, y se mantuvieron en agitación a 28 °C durante 8 minutos. El contenido intracelular en sodio se analizó en células que crecieron a 0,2 M de NaCl durante 24 horas. Se tomaron tres muestras de 2 ml de suspensión celular de cada condición, se filtraron (Filtros millipore 0,8  $\mu$ m de diámetro) y se lavaron con una solución 10 mM de  $MgCl_2$ .

Para obtener el contenido intracelular de Rb,  $K^+$ , Li o  $Na^+$  mediante lisis ácida, se mantuvieron en 5 ml de solución con HCl y  $MgCl_2$  durante 24 horas. Posteriormente las muestras se analizaron por espectrofotometría de absorción atómica.

## 6. Contenido extracelular de potasio

Se estudió el contenido extracelular de potasio en *C. glabrata* silvestre, *C. glabrata trk1Δ*, *S. cerevisiae* BYT12 (YEp352) y *S. cerevisiae* BYT12 (YEp-CgTRK1). Se partió de suspensiones de células normales en potasio que se centrifugaron (2000 g) y lavaron dos veces con agua destilada estéril. Posteriormente se obtuvieron células ayunadas de potasio que se centrifugaron y lavaron dos veces con agua (Milli-Q) estéril y se depositaron en frío. Las células se resuspendieron a 0,5 ( $A_{600nm}$ ) en tampón MES. Se tomaron 5 ml de muestra celular con una jeringuilla con la cual se realizaba un filtrado para retener las células (Filtros millipore 0,8  $\mu$ m). Se tomaron muestras cada diez minutos durante un tiempo total de 50 minutos, que se midieron inmediatamente después de finalizar el experimento mediante espectrofotometría de absorción atómica.

## 7. Ensayos de transporte de cationes

Se utilizaron para estos ensayos las cepas *C. glabrata* silvestre, *C. glabrata trk1Δ*, *S. cerevisiae* BYT12 (YE<sub>p</sub>352) y *S. cerevisiae* BYT12 (YE<sub>p</sub>-CgTRK1) y se realizaron ensayos de transporte de rubidio y litio.

### 7.1 Transporte de rubidio

Para estudiar el transporte de potasio en las levaduras se utilizó rubidio (RbCl), puesto que es un análogo del potasio y resulta más fácil medir su concentración ya que a diferencia del otro catión, no está presente de forma común en la naturaleza. Se partió de suspensiones de células normales en potasio que se centrifugaron (2000 g) y lavaron dos veces con agua destilada, y posteriormente se resuspendieron a 0,3 (A<sub>600nm</sub>) en tampón MES. Las distintas concentraciones de RbCl se añadieron a tiempo cero; se tomaron muestras de 5 ml de suspensión celular, se filtraron (Filtros millipore 0,8 μm de diámetro), se lavaron con una solución 10 mM de MgCl<sub>2</sub> y se recogieron a distintos tiempos durante unos 10-15 minutos aproximadamente.

Este experimento se hizo tanto en células normales en potasio como en células ayunadas de potasio.

### 7.2 Transporte de litio

En estos ensayos se estudió el efecto del potasio sobre el transporte de litio en células ayunadas de potasio. El procedimiento de trabajo es igual al explicado anteriormente (transporte de rubidio). Se añadió a tiempo cero 100 mM de LiCl (control) o 100 mM de LiCl con 0,5 ó 5 mM de KCl, y se recogieron muestras durante 15-20 minutos aproximadamente.

## 8. Determinación del volumen celular

Se utilizaron para este ensayo las cepas *C. glabrata* silvestre, *C. glabrata trk1Δ*, *S. cerevisiae* BYT12 (YE<sub>p</sub>352), *S. cerevisiae* BYT12 (YE<sub>p</sub>-CgTRK1) y *S. cerevisiae* BY4741 (cepa control en este caso). Para obtener las medidas del volumen celular, en primer lugar se utilizaron suspensiones de células normales en potasio que se centrifugaron y lavaron del mismo modo que en los experimentos previamente descritos, y se resuspendieron en un medio de cultivo sin potasio (YNB-Formedium) a 0,3 (A<sub>600nm</sub>). Se obtuvo una suspensión de células ayunadas de potasio de la que se tomó 1 ml de dicha suspensión que se diluyó 10 veces en agua destilada estéril. De la suspensión celular diluida se tomaron 100 μl que se diluyeron en 39,9 ml de tampón isotón (glicina 0,1 M, NaCl 0,9 %, pH 7,3). El volumen celular se determinó en un aparato Z2 Coulter Particle Count and Size Analyzer (Beckman Coulter). Este nos indica el tamaño o volumen individual de las células. A las células ayunadas se añadió KCl (0,5 o 100 mM) y se repitió el mismo procedimiento para determinar el volumen celular.

## 9. Ensayos genéticos: PCRs cuantitativas

La purificación de los ácidos nucleicos resulta un requisito indispensable para realizar diversas técnicas en biología molecular, y por ello se quiso estudiar una posible regulación transcripcional del gen *CgTRK1* realizando este tipo de ensayos genéticos. Dicha regulación se estudió sometiendo a la cepa *C. glabrata* silvestre a diferentes condiciones de crecimiento: ayuno durante 1, 2 y 3 horas; estrés salino, bajo una concentración de 1 M de NaCl y diferentes condiciones de pH (7,5 y 4,5).

### 9.1 Aislamiento de ARN

Se realizaron los siguientes pasos:

- 1- Se centrifugaron 3 ml del cultivo celular 2000 *g* durante 1 minuto y se eliminó el sobrenadante.
- 2- Se añadió a cada muestra aproximadamente 0,2 ml de bolas de vidrio, para romper las células y 1 ml de TRI REAGENT para inactivar las RNAsas tanto intracelulares como extracelulares. Se selló el tubo con parafilm. Se agitó en el vortex 5 veces durante 1 minuto con intervalos de min en hielo. Se incubó 5 minutos a 70 °C. Se repitieron las 5 agitaciones con el vortex.
- 3- Se añadió a las muestras 200 µl de fenol-cloroformo para precipitar los ácidos nucleicos. Se sellaron los tubos con parafilm. Se agitaron en el vortex durante 1 minuto. Se centrifugaron 15 minutos, 4 °C a 12000 *g*. Se apreciaron tres fases: una fase inferior orgánica (contiene las proteínas), una interfase (contiene el ADN cromosómico) y una superior acuosa e incolora que contiene el ARN. Se recogió esta fase y se transfirió a un tubo limpio, sacando toda la parte acuosa en varias veces, procurando no coger las otras fases.
- 4- Se añadió 0,5 ml de isopropanol. Se añadió 0,5 ml de etanol al 70 %. Se resuspendió el precipitado. Se centrifugó 10 min a 12000 *g* 4 °C.
- 5- Se eliminó el sobrenadante. Se añadió 0,5 ml de etanol al 70 %. Se resuspendió el precipitado. Se centrifugó 10 min a 12000 *g* 4 °C.
- 6- Se eliminó el sobrenadante. Se secó el precipitado y resuspendió en 20µl de H<sub>2</sub>O (Milli-Q) tratada con dietilpirocarbonato (DEPC).

### 9.2 Eliminación del ADN contaminante

El ARN total aislado a partir de las muestras de células o tejidos está normalmente contaminado con ADN genómico que puede alterar los resultados de su análisis. Para eliminar estos restos de ADN, nuestro ARN debe ser tratado con la enzima DNasa I que degrada el ADN sin alterar el ARN. Una vez terminado el tratamiento, es imprescindible eliminar los restos de DNasa I para que no interfiera en procesos posteriores de análisis, que normalmente implican una retrotranscripción para convertir el ARN en ADNc.

Se añadieron los componentes en el siguiente orden: 20  $\mu\text{l}$  + H<sub>2</sub>O mQ DEPC 34  $\mu\text{l}$  + Tampón de DNasa 10x 5  $\mu\text{l}$  + DNasa 1  $\mu\text{l}$ . Se incubó 1 hora a 37 °C.

Se añadió 150  $\mu\text{l}$  de H<sub>2</sub>O DEPC + 100  $\mu\text{l}$  de Fenol-cloroformo-IAA. Se agitó en el vortex. Se centrifugó 5 min a 12000 *g*. Se recogió la fase acuosa superior.

Se añadió 20  $\mu\text{l}$  de acetato sódico 3 M (pH 5,2) + 1 ml de etanol. Se incubó a -20 °C 30 minutos. Se centrifugó a 12000 *g* 15 min a 4 °C. Se secó el precipitado. Se resuspendió en 10  $\mu\text{l}$  H<sub>2</sub>O (Milli-Q) DEPC.

### 9.3 Cuantificación de ARN mediante Nanodrop 2000

Se realizó una cuantificación del ARN mediante un Nanodrop 2000 de Thermo Scientific. Este es un espectrofotómetro de UV visible de espectro completo que se utilizó a lo largo de este trabajo para cuantificar y evaluar la pureza del ADN y ARN.

### 9.4 Retrotranscripción a ADNc

La retrotranscripción es un proceso que implica la generación de un fragmento de ADN copia (ADNc) a partir de ARNm. Este proceso junto a la técnica de PCR es utilizado para estudiar la expresión de un gen en distintas condiciones ambientales y de estrés. El ADNc se sintetizó a partir de 1  $\mu\text{g}$  de ARN usando el Kit iScript™ cDNA Synthesis, siguiendo las instrucciones de la casa comercial. La reacción se llevó a cabo en un tubo de 1,5 ml (Eppendorf) Mastercycler Personal, a partir de un ciclo con una etapa de hibridación a 25 °C durante 5 minutos, una etapa de elongación de 30 minutos a 42 °C y por último se desactivó la enzima durante 5 minutos a 85 °C.

### 9.5 PCR a tiempo real

Las secuencias del gen *CgTRK1* para el diseño del primer, se obtuvieron de Gene Ontology Consortium ([www.geneontology.org](http://www.geneontology.org)). Los primers se diseñaron con el programa OLIGO 7.60 (Molecular Biology Insights, Cascade, CO). El programa seleccionado incluía unos valores de T<sub>m</sub> (82,9 °C) y 3'  $\Delta\text{G}$  (>6,8 kcal mol<sup>-1</sup>). Las secuencias de los primers fueron las siguientes:

Forward (F) 5'-GAGCTCTTTCAATCGGGCAGCCTATCCACT-3'

Reverse (R) 5'-AGAAGGCCAGACTCTCCCTCAGTTGTGACA-3'

Para la PCR se utilizó como control el gen de la actina. Se utilizaron placas Elisa de 96 pocillos (Axygen™) para la preparación y cada pocillo contenía una mezcla (volumen final 20  $\mu\text{l}$ ) con IQ™ SYBR® Green Supermix (Bio-Rad), 1  $\mu\text{l}$  de ADNc más 0,1  $\mu\text{M}$  de los primers específicos. El experimento se realizó por triplicado. Las condiciones programadas para la PCR a tiempo real fueron las siguientes: desnaturalización inicial a 95 °C durante tres minutos, seguido de cuatro ciclos de PCR consistentes en 15 segundos

de desnaturalización a 95 °C, y 30 segundos de recalentamiento a 70 °C. Finalmente se determinaron las curvas de fusión o “melting”.

## 10. Tolerancia frente a diferentes compuestos

Para estos ensayos se utilizaron las cepas *C. glabrata* silvestre, *C. glabrata trk1Δ*, *S. cerevisiae* BYT12 (YE<sub>p</sub>352) y *S. cerevisiae* BYT12 (YE<sub>p</sub>-CgTRK1).

### 10.1 Tolerancia a litio/sodio

Para estudiar la tolerancia de las diferentes cepas frente a litio o sodio se realizaron ensayos de crecimiento tanto en medio sólido como en medio líquido a diferentes concentraciones de LiCl y NaCl. La metodología en ambos ensayos es similar a la explicada en los puntos 4.1 y 4.2.

### 10.2 Tolerancia a diferentes drogas

Se estudió la tolerancia de las diferentes cepas frente a compuestos que afectan a la formación de la pared celular (cafeína), que inhiben algún componente de la cadena de transporte electrónico de la mitocondria (azida sódica y Antimicina A (antibiótico)) o que afectan a la glucólisis (fluoruro de sodio). Para ello se realizaron ensayos de crecimiento en medio sólido utilizando una metodología similar a los puntos 4.1 y 4.2.

## 11. Sensibilidad a toxinas “killer”

Para este ensayo se utilizaron 5 cepas diferentes: *D. hansenii* 767 (para saber si ejerce algún efecto inhibitorio sobre otras levaduras), *S. cerevisiae* EX33 y *S. cerevisiae* BY4741 (que nos sirvieron como control positivo y control negativo respectivamente) y las dos cepas de *C. glabrata* (silvestre y *trk1Δ*).

En primer lugar se preparó como medio de cultivo 1 l de YPD para placas, al cual se añadió 100 mM de KCl para que la cepa mutante de *C. glabrata* pudiera crecer a la misma velocidad que la cepa silvestre. Paralelamente se preparó una serie de tampones, los cuales se añadieron posteriormente al medio esterilizado.

Tampones:

Tampón 1 M Citrato/Fosfato pH=4,5. Es un tampón destinado a regular el pH del medio, puesto que el efecto killer se manifiesta con mayor intensidad a un pH entre 4,2 y 4,6. Para elaborar este tampón se debió preparar previamente una serie de soluciones:

Solución 1: 1 M ácido cítrico monohidratado (100 ml). Se pesaron 21,01 g de ácido cítrico y se disolvieron en 50 ml de agua destilada (quedando a 2 M).

Solución 2: 2 M de KOH (100 ml). Se pesaron 11,21 g de KOH y se disolvieron en 50 ml de agua destilada, para que resultase una solución 4 M (Solución 2).

Solución 3: 2 M fosfato potásico monobásico ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ). Se pesaron 27,218 g y se disolvieron en 100 ml de agua destilada.

Para preparar el tampón:

25 ml de la Solución 1 (ácido cítrico monohidratado 2 M) y 25 ml de la Solución 2 (KOH 4 M) se vertieron en un mismo vaso de precipitado, quedando la molaridad de ambos compuestos reducida a la mitad y obteniendo la Solución 4 (ácido cítrico 1 M-KOH 2 M).

Se midió el pH de la Solución 4, que debió encontrarse en torno a 5,8.

Se midió el pH de la Solución 3, que debió encontrarse en torno a 3,95.

Se subió el pH de la Solución 3 con la ayuda de la Solución 4. La Solución 3 con pH 4,5 fue el tampón definitivo. El volumen que se añadió al medio de cultivo YPD fue de 100 ml aproximadamente.

Solución de azul de metileno: el azul de metileno es un colorante catiónico que tiñe el interior de las células muertas, lo cual resulta útil como indicativo de la mortalidad de las levaduras susceptibles al efecto killer. Se preparó una solución de azul de metileno de 0,3 g/L en agua destilada. El volumen final necesario para añadir al medio de cultivo YPD fue de 5 ml.

Tanto la Solución 3 como la solución de azul de metileno se esterilizaron por filtración (Filtros Millipore de 0,45  $\mu\text{m}$ ) antes de incorporarse al medio de cultivo YPD.

Se partió de una suspensión de células normales en potasio que se centrifugaron y lavaron dos veces con agua destilada estéril, y se ajustaron a 1 ( $A_{600\text{nm}}$ ). Todo ello se realizó con las 5 cepas nombradas anteriormente, aunque a la hora de realizar un césped celular sobre las placas se utilizaron todas menos *D. hansenii*, puesto que dicha cepa la utilizamos posteriormente para depositar gotas de 8  $\mu\text{l}$  sobre cada césped una vez estuviera seco. Las placas se incubaron en una estufa a 26 °C (temperatura óptima para la cepa "killer") durante 4 días. La sensibilidad se determinó mediante la aparición o no de un halo azul alrededor o en la base de cada colonia de la cepa killer, que indicó que las células eran sensibles cuando se teñían de azul y resistentes cuando no se observó ninguna coloración.

## 12. Adhesión

Para este experimento se partió de suspensiones de células normales en potasio que se centrifugaron y lavaron una sola vez con agua destilada estéril y se ajustaron a 1 ( $A_{600\text{nm}}$ ).

Se depositó una gota de 8  $\mu$ l de suspensión celular en el centro de la placa y se dejó crecer durante 3 y 5 días a 28 °C. En dichos períodos se analizó la adhesión de las levaduras disponiendo cada placa bajo el mismo caudal de un grifo (35 ml/s), de manera que se contabilizó la resistencia al lavado de la colonia adherida a la placa.

### **13. Estadística**

Todos los experimentos se repitieron al menos tres veces. Los datos fueron analizados mediante el programa Microsoft Excel software 2013 y el grado de significancia de los distintos valores se determinó mediante el programa GraphPad Prism 7. La significancia de los valores se indicó mediante asteriscos (\*  $P < 0.05$ ; \*\*  $P < 0.01$ ; \*\*\*  $P < 0.001$ ).

## **Resultados**

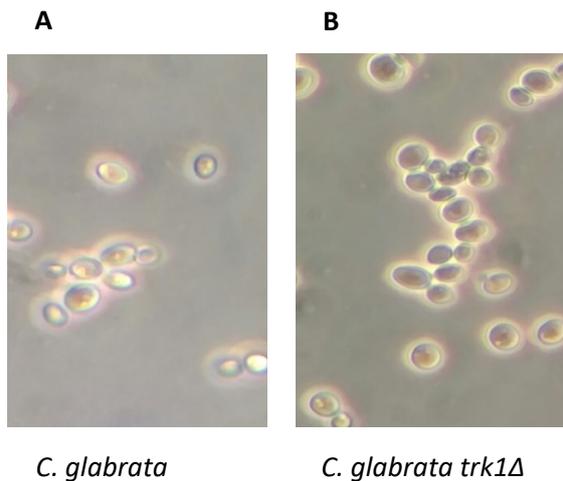




## RESULTADOS

### 1. Observación al microscopio óptico de *Candida glabrata* silvestre y *trk1Δ*

A lo largo de este trabajo se han utilizado las cepas de *C. glabrata* silvestre y *trk1Δ* con el fin de analizar si la falta de este gen podía afectar a algunas de las características de esta levadura. Para ello se comenzó realizando una serie de observaciones al microscopio óptico (400x) de las cepas de *C. glabrata* silvestre y *trk1Δ* (Fig. 4) con el objetivo de comprobar si la ausencia del gen *CgTRK1* influye en el aspecto de esta levadura o si dicha diferencia se puede observar en el microscopio.

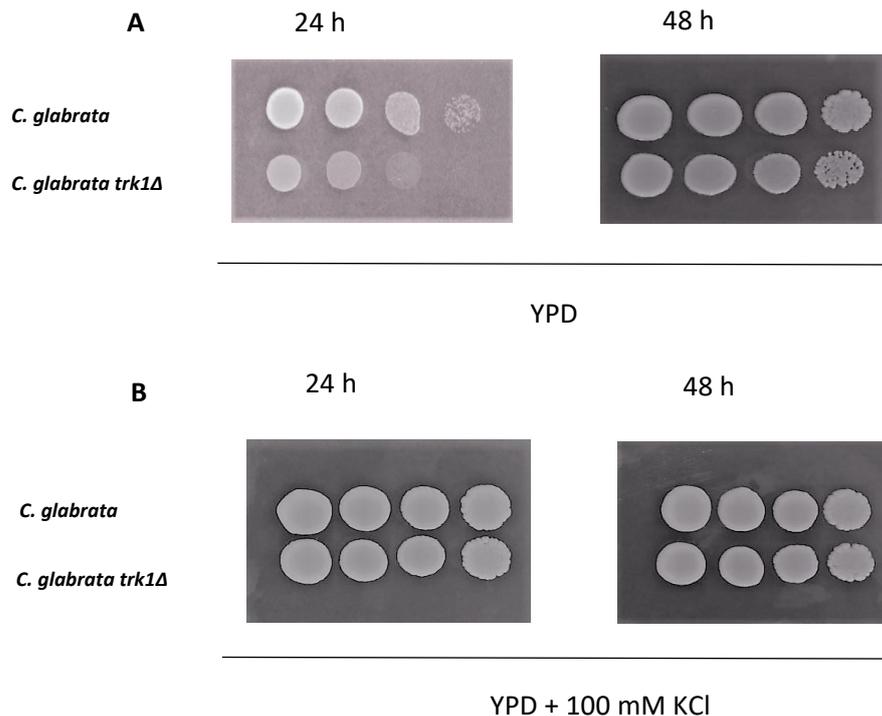


**Figura 4. Imagen al microscopio óptico (400x) (Nikon Motic BA200) de *C. glabrata* silvestre y *trk1Δ*.**

Una vez observadas ambas cepas al microscopio se confirmó que aparentemente son iguales y no se observaron diferencias ni en su tamaño ni en su aspecto.

### 2. Requerimientos de potasio en un medio complejo

Para saber si la ausencia o presencia del gen *CgTRK1* influye en el crecimiento sobre un medio complejo, se estudió el crecimiento de *C. glabrata* silvestre y *trk1Δ* en YPD. Para ello se cultivaron las células previamente tal y como se indica en material y métodos. Se inocularon en placas de YPD o de YPD suplementado con 100 mM de KCl y se incubaron a una temperatura de 28 °C durante 24 y 48 horas.



**Figura 5. Crecimiento en medio complejo de *C. glabrata* silvestre y *trk1Δ*.** Las células se cultivaron previamente como está indicado en el apartado de material y métodos. Se obtuvieron suspensiones celulares que se ajustaron a 1 ( $A_{600nm}$ ), se diluyeron 10, 100 y 1000 veces y se inocularon con 5  $\mu$ l en placas de YPD (A) o YPD con 100 mM de KCl (B). Las placas se incubaron en una estufa a 28 °C durante 24 y 48 horas. Los experimentos se repitieron al menos tres veces y los resultados mostrados son representativos.

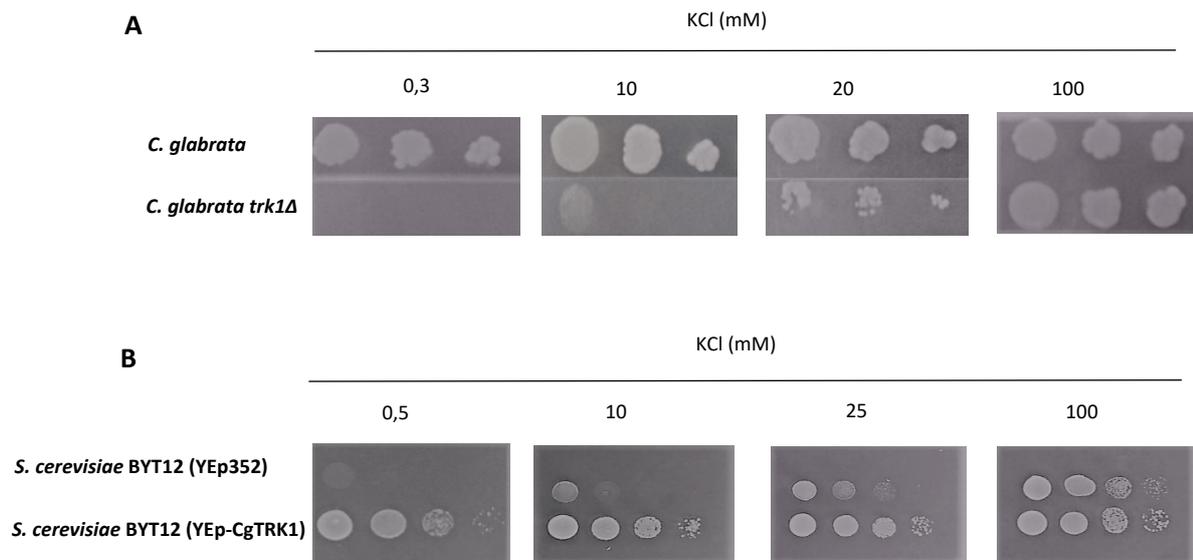
A pesar de que el YPD es un medio utilizable para la mayoría de las levaduras no posee la concentración de potasio suficiente para que la cepa *trk1Δ* de *C. glabrata* pueda crecer igual de rápido que la cepa silvestre, ya que durante las primeras 24 horas se observó que la cepa silvestre de *C. glabrata* creció mejor que la cepa *trk1Δ*, aunque una vez pasadas las 48 horas, las diferencias aparentes desaparecieron (Fig. 5A). En cambio, cuando se añadió 100 mM de KCl al YPD, las dos cepas de *C. glabrata* crecieron igual tanto a las 24 como a las 48 horas (Fig. 5B). Estos resultados indican que en ausencia del gen *CgTRK1* se incrementan las necesidades de potasio para un crecimiento óptimo en medio complejo YPD.

### 3. Requerimientos de potasio en un medio mínimo

#### 3.1 Crecimiento en medio sólido

Los resultados observados en los experimentos con YPD sugirieron que la ausencia del gen *CgTRK1* influía en la capacidad de *C. glabrata* para crecer en condiciones limitantes de potasio. Para poder confirmar esta observación y cuantificar mejor las necesidades de potasio de *C. glabrata*, se realizó un experimento más detallado en YNB Formedium

sin potasio, añadiendo diferentes concentraciones de potasio (KCl). Para ello se estudió el crecimiento en estas condiciones con *C. glabrata* silvestre y *trk1Δ* (Fig. 6A). Además se siguió otra aproximación con dos cepas de *Saccharomyces cerevisiae* que expresan o no *CgTRK1* (BYT12 (YEp352) y BYT12 (YEp-CgTRK1)) (Fig. 6B). Las células se inocularon en placas de YNB Formedium sin potasio con diferentes concentraciones de KCl y se incubaron a una temperatura de 28 °C durante dos días.

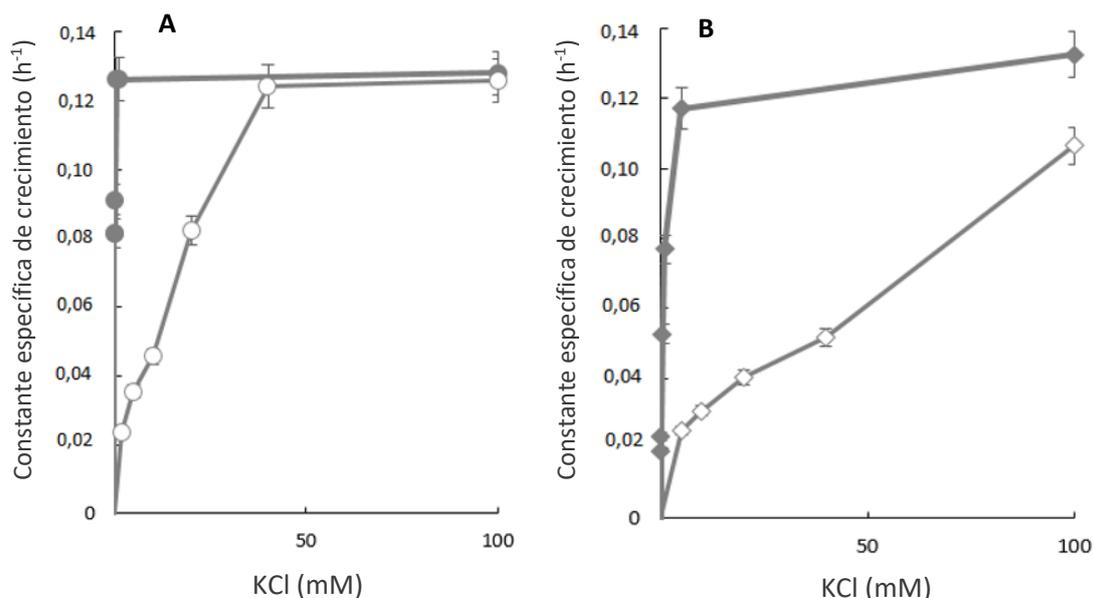


**Figura 6. Crecimiento en YNB Formedium a diferentes concentraciones de potasio de la cepa silvestre y *trk1Δ* de *C. glabrata* (A) y de *S. cerevisiae* BYT12 (YEp352) y (YEp-CgTRK1) (B).** Las células se cultivaron previamente como está indicado en el apartado de material y métodos. Se obtuvieron suspensiones celulares que se ajustaron a 1 ( $A_{600nm}$ ), se diluyeron 10, y 100 veces (A) o 10, 100 y 1000 veces (B), y se inocularon con 5  $\mu$ l en placas de YNB Formedium (A) o YNB Formedium con los requerimientos auxotróficos de las cepas (B) con diferentes concentraciones de KCl. Las placas se incubaron en una estufa a 28 °C durante 48 horas. Estos experimentos se repitieron al menos tres veces y los resultados mostrados son representativos.

Los resultados mostraron que a bajas concentraciones de KCl, la cepa de *C. glabrata trk1Δ* creció peor que la cepa silvestre de esta levadura en concentraciones de 0,3, 10 o 20 mM de KCl (Fig. 6A). En *S. cerevisiae* los resultados fueron similares, ya que la cepa BYT12 (YEp352) no creció con normalidad a diferencia de la cepa BYT12 (YEp-CgTRK1) en las concentraciones de 0,5, 10 o 25 mM de KCl (Fig. 6B). Por ello las cepas carentes de *CgTrk1* no crecieron con normalidad a diferencia de las que si contenían dicho transportador, sin embargo en 100 mM de KCl no se observaron diferencias ya que las 4 cepas crecieron con normalidad (Fig. 6A, 6B). Esto indica que el gen *CgTRK1* codifica una proteína esencial en el transporte y la homeostasis de potasio.

### 3.2 Crecimiento en medio líquido

Para seguir profundizando en el estudio del papel de *CgTrk1* sobre el crecimiento en diferentes concentraciones de potasio, se realizaron ensayos en medio líquido con las cepas de *C. glabrata* silvestre, *trk1Δ* y de *S. cerevisiae* BYT12 (YEp352) y BYT12 (YEp-CgTRK1). Las células se inocularon en tubos de YNB Formedium sin potasio con diferentes concentraciones de KCl y se incubaron en agitación a 28 °C.



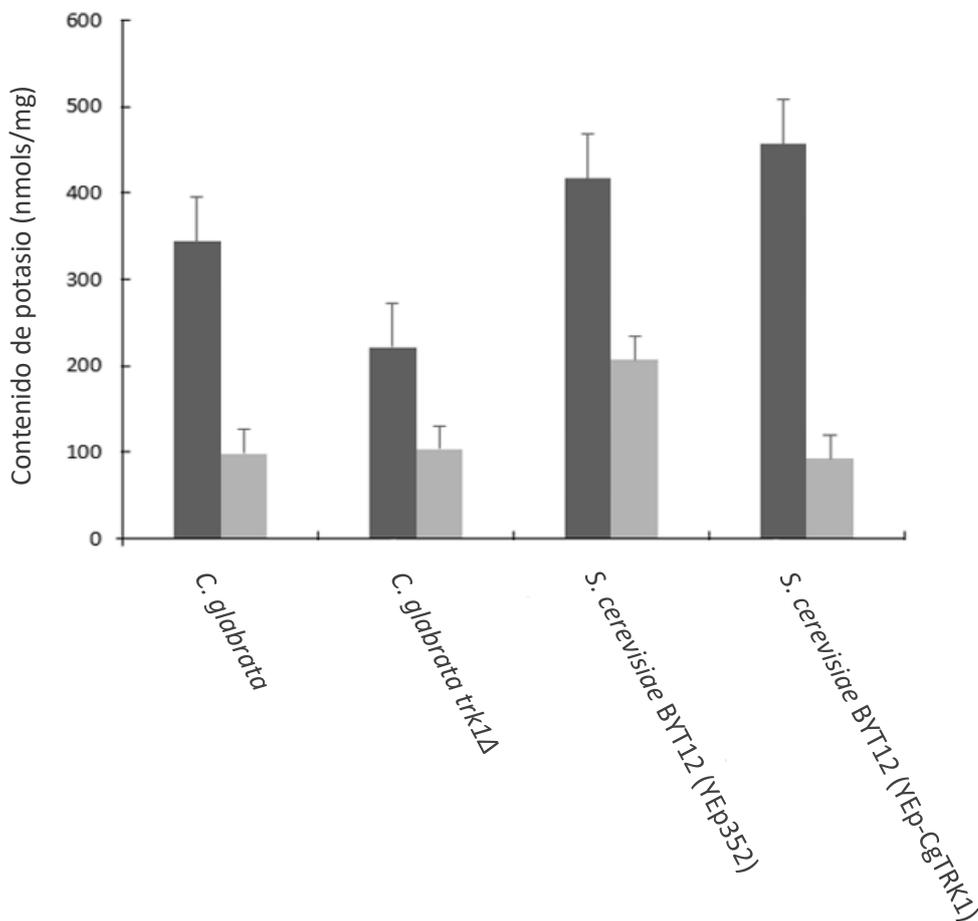
**Figura 7. Efecto de la concentración de KCl sobre la constante específica de crecimiento en la cepa silvestre (●) y *trk1Δ* (○) de *C. glabrata* (A) o en las cepas de *S. cerevisiae* BYT12 (YEp352) (◇) y BYT12 (YEp-CgTRK1) (◆) (B).** Las células se cultivaron previamente como está indicado en material y métodos. Se obtuvieron suspensiones celulares que se resuspendieron en tubos de 5 ml de YNB Formedium (A) o YNB Formedium con los requerimientos auxotróficos de las cepas (B) con diferentes concentraciones de KCl a 0,01-0,02 ( $A_{600nm}$ ) y se mantuvieron en agitación a una temperatura de 28 °C. El crecimiento se siguió durante 24-48 horas. Las barras de error indican las desviaciones típicas de los resultados obtenidos a partir de tres repeticiones.

A partir de los valores de absorbancia medidos durante 24-48 horas se pudo calcular la constante específica de crecimiento de las distintas cepas en las diferentes concentraciones de potasio utilizadas. La constante específica de crecimiento de las cepas de *C. glabrata* y *S. cerevisiae* que contienen el transportador *CgTrk1* alcanzó su máximo en concentraciones comprendidas entre 0,5 y 25 mM de KCl, sin embargo las cepas que no contienen dicho transportador no alcanzaron dicho máximo en ese rango de concentraciones. A partir de 50 mM (A) o 100 mM de KCl (B) las constantes específicas de crecimiento alcanzaron su máximo en las 4 cepas (Fig. 7A, 7B). Estos

resultados concuerdan con lo observado en medio sólido y confirman que *CgTrk1* tiene un rol fundamental en la homeostasis y el transporte de potasio.

#### 4. Contenido intracelular de potasio

Una vez conocidos los resultados de los ensayos de crecimiento, se estudió el contenido intracelular de potasio en *C. glabrata* silvestre y *trk1Δ*, o en las cepas de *S. cerevisiae* BYT12 (YEp352) y BYT12 (YEp-CgTRK1) para saber cómo influye *CgTrk1* en la cantidad de potasio que entra en las células. Se obtuvieron células crecidas sin limitación de potasio, y células ayunadas de potasio (ver Material y Métodos). En ambas condiciones la suspensión celular se ajustó a 0,3 ( $A_{600nm}$ ) y se tomaron muestras que se analizaron por espectrofotometría de absorción atómica.

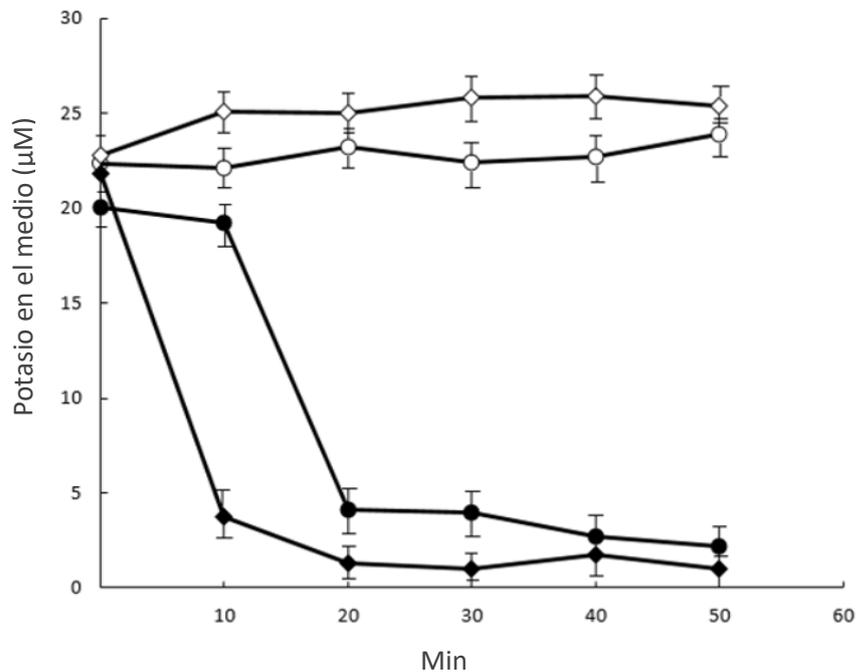


**Figura 8. Contenido intracelular de potasio en la cepa silvestre y *trk1Δ* de *C. glabrata* y en las cepas de *S. cerevisiae* BYT12 (YEp352) y BYT12 (YEp-CgTRK1).** Se determinó el contenido de potasio en células normales en potasio y en células ayunadas de potasio. Las muestras se tomaron por triplicado y se midieron por espectrofotometría de absorción atómica. Las barras de error indican las desviaciones típicas de los resultados obtenidos a partir de las tres repeticiones. Las barras oscuras indican células normales en potasio y las barras claras indican células ayunadas de potasio.

En condiciones no limitantes de potasio, la cepa de *C. glabrata* silvestre tuvo un contenido intracelular de potasio mayor respecto a la cepa *trk1Δ*, sin embargo en estas condiciones las diferencias entre *S. cerevisiae* BYT12 (YEp352) y BYT12 (YEp-CgTRK1) no fueron significativas. En condiciones de ayuno de potasio el contenido intracelular de potasio disminuyó en las dos cepas de *C. glabrata* aunque no se observaron diferencias de contenido entre ambas. En las dos cepas de *S. cerevisiae* el contenido intracelular de potasio también disminuyó en estas condiciones, aunque el contenido de *S. cerevisiae* YEp352 fue el mayor de las cuatro cepas (Fig. 8). Estos resultados nos indican que el gen *CgTRK1* influye en *C. glabrata* manteniendo el contenido intracelular de potasio en concentraciones más altas en condiciones no limitantes de potasio, aunque sorprendentemente en condiciones de ayuno de potasio no se han observado diferencias en el contenido intracelular de potasio. También estos datos indican que el transportador *CgTrk1* no influye del mismo modo en otras especies de levadura, ya que en *S. cerevisiae* no se han observado diferencias significativas.

## 5. Capacidad de absorción de potasio

Con el fin de obtener información sobre el papel de *CgTrk1* en la absorción de potasio cuando éste se encuentra a niveles micromolares en el medio, estudiamos la evolución del contenido extracelular de potasio en *C. glabrata* y *S. cerevisiae* con o sin el transportador *CgTrk1*. Para ello se obtuvieron células ayunadas de potasio que se resuspendieron en MES conteniendo niveles micromolares del catión, se mantuvieron a 28 °C y se tomaron muestras durante 50 minutos. Las muestras se analizaron por espectrofotometría de absorción atómica.



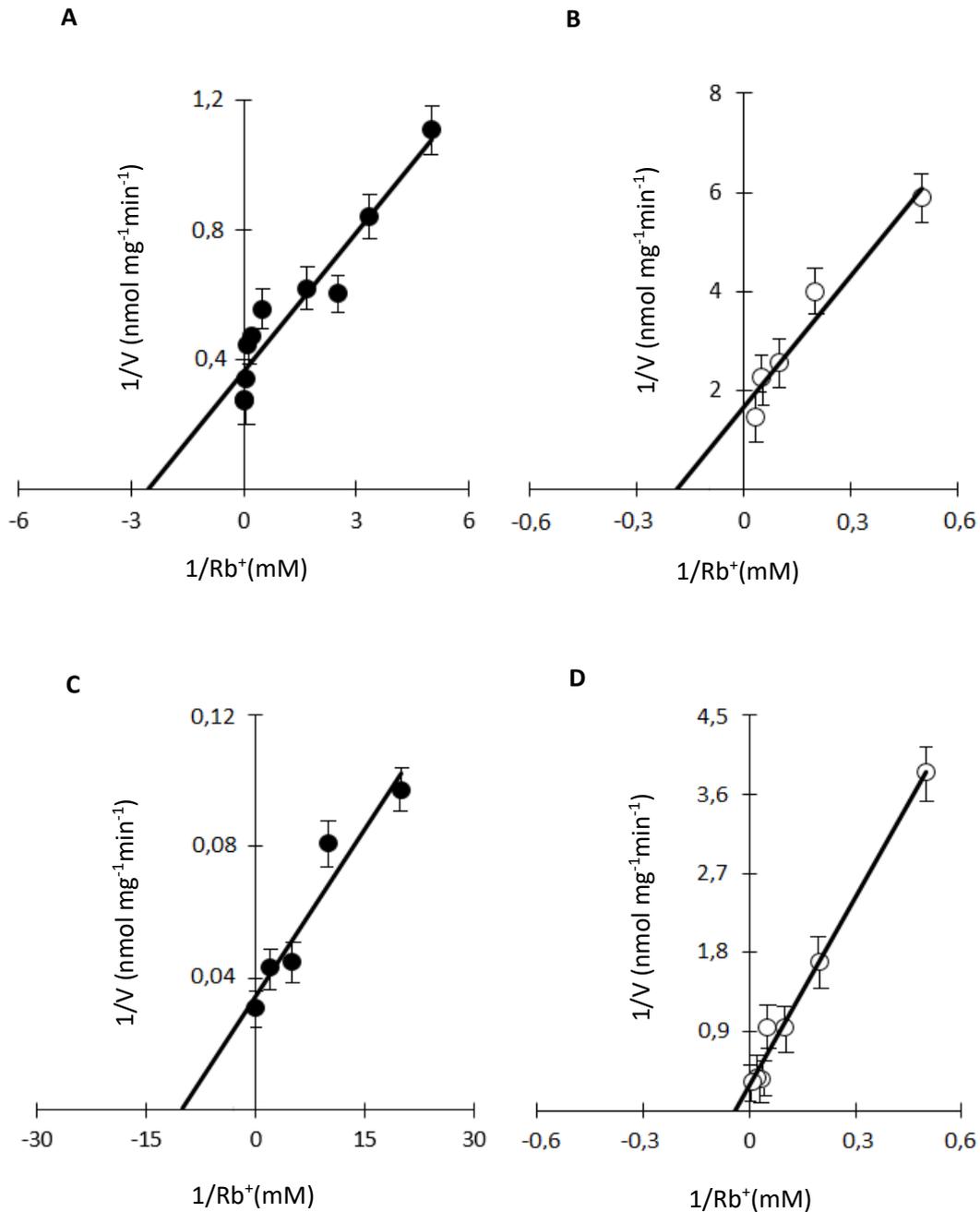
**Figura 9. Absorción de potasio por la cepa silvestre (●) y *trk1*Δ (○) de *C. glabrata* y en las cepas de *S. cerevisiae* BYT12 (YEp352) (◇) y BYT12 (YEp-CgTRK1) (◆).** Este ensayo se realizó en células ayunadas de potasio que se resuspendieron a 0,5 ( $A_{600nm}$ ) en tampón MES con una concentración aproximada de 20-25  $\mu$ M de potasio. Las células se mantuvieron en agitación a 28 °C y cada 10 minutos se tomaron muestras durante un tiempo total de 50 minutos. Las muestras se analizaron por espectrofotometría de absorción atómica. Las barras de error indican las desviaciones típicas de los resultados obtenidos a partir de tres repeticiones.

La concentración de potasio del MES donde se incubaron las cepas de *C. glabrata* y *S. cerevisiae* que contienen el transportador *CgTrk1* comenzó a disminuir ya que estas cepas consumían el potasio de dicho tampón. Durante los primeros 10 minutos de incubación, la cepa de *S. cerevisiae* BYT12 (YEp-CgTRK1) consumió el potasio del MES más rápido que la cepa de *C. glabrata*, aunque el comportamiento general de las dos levaduras fue muy parecido (Fig. 9). En el caso de las cepas de *C. glabrata* y *S. cerevisiae* que no contenían *CgTrk1* no hubo disminución en la concentración de potasio durante los 50 minutos del experimento ya que estas cepas no consumieron el potasio en ese rango de concentraciones (Fig. 9). Estos resultados indican que el transportador *CgTrk1* proporciona la capacidad a *C. glabrata* y *S. cerevisiae* de incorporar potasio del medio en el rango micromolar.

## 6. Transporte de rubidio

Otro parámetro importante que se estudió fue la cinética de transporte de rubidio para conocer como influía sobre ella el transportador *CgTrk1* en *C. glabrata* y *S. cerevisiae*. Para ello se realizaron ensayos de transporte de rubidio y se utilizó este catión porque

las propias células ya contienen potasio y el rubidio es un análogo del potasio con el que es posible hacer estas medidas cinéticas. Este ensayo se realizó con las cepas de levaduras que contenían o no el transportador *CgTrk1*, en células normales en potasio y en células ayunadas de potasio, que se resuspendieron a 0,3 ( $A_{600nm}$ ) en MES con diferentes concentraciones de RbCl y a continuación se tomaron muestras de células que se analizaron, y a partir de los valores medidos se pudieron calcular las velocidades iniciales de entrada del catión en las diferentes condiciones estudiadas. De esta manera se pudieron obtener las representaciones dobles recíprocas que aparecen en la Figura 10.



**Figura 10. Representación de Lineweaver-Burk del transporte de rubidio en *C. glabrata* silvestre (●) y *trk1Δ* (○).** Estos ensayos se realizaron en células normales en potasio (A,B) y células ayunadas de potasio (C,D). Las células se resuspendieron en tampón MES a 0,3 ( $A_{600nm}$ ) con diversas concentraciones de RbCl y se mantuvieron en agitación a 28 °C. A tiempo "0" se añadió el RbCl, se tomaron muestras durante 10-15 minutos y se analizaron por espectrofotometría de absorción atómica. A partir de los datos obtenidos se calcularon las velocidades de entrada de rubidio. Las barras de error indican las desviaciones típicas de los resultados obtenidos a partir de tres repeticiones.

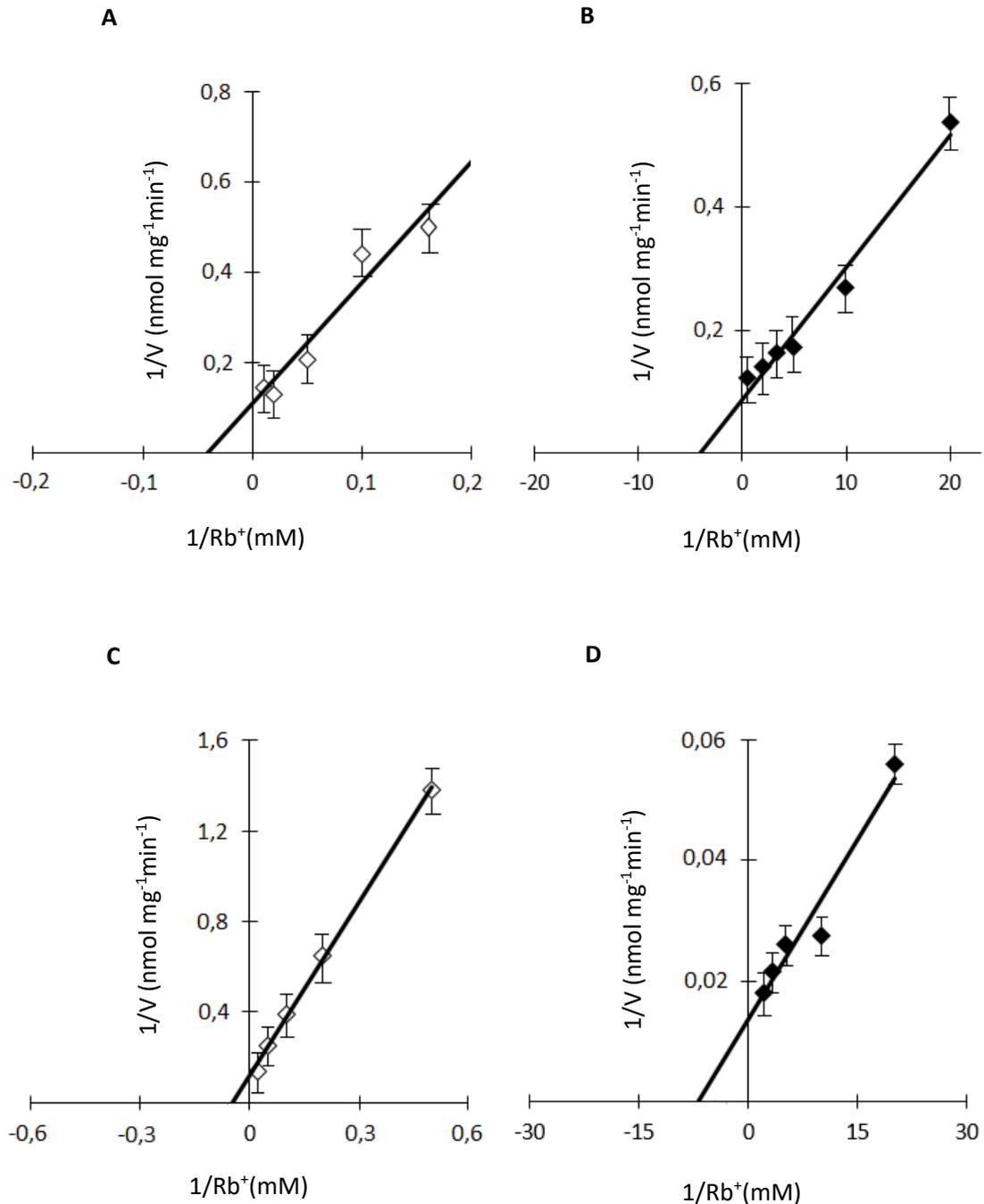
A partir de los resultados de la Figura 10 se pudieron deducir los parámetros cinéticos para el transporte de rubidio ( $V_{\max}$  y  $K_m$ ) para este tipo de células que aparecen recogidos en la Tabla 3.

Tabla 3. Parámetros cinéticos para el transporte de rubidio en *C. glabrata* silvestre y *trk1Δ*.

Cepas	Células normales en potasio		Células ayunadas de potasio	
	$V_{\max}$ ( $\text{nmol}\cdot\text{mg}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$ )	$K_m$ (mM)	$V_{\max}$ ( $\text{nmol}\cdot\text{mg}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$ )	$K_m$ (mM)
<i>C. glabrata</i>	2,7±0,1	0,39±0,06	28,9±1	0,09±0,03
<i>C. glabrata trk1Δ</i>	0,5±0,2	5,47±5,02	3,5±0,1	25,37±0,4

Los parámetros cinéticos se dedujeron a partir de los resultados de la Figura 10.

En *C. glabrata*, *CgTrk1* influyó en el transporte de rubidio mejorando los parámetros cinéticos de esta cepa. En células normales en potasio, la velocidad de transporte de rubidio de *C. glabrata* silvestre es notablemente superior a la de la cepa *trk1Δ* (2,7 y 0,5  $\text{nmol}\cdot\text{mg}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$  respectivamente) con una afinidad por el sustrato ( $K_m$ ) cinco veces superior (Fig. 10A, 10B) (Tabla 3). El ayuno de potasio de las células es un procedimiento usualmente utilizado para activar las características de transporte en las levaduras (Navarrete *et al.* 2010), y las diferencias existentes entre las cepas que contienen o no *CgTrk1* se acentuaron mucho más debido a la actividad de este transportador. En *C. glabrata* el ayuno de potasio influyó en los parámetros cinéticos de la cepa que contiene el transportador *CgTrk1*, tal y como se observa en los datos cinéticos donde la  $V_{\max}$  es mayor que en células normales en potasio, incrementándose de forma significativa (28,9  $\text{nmol}\cdot\text{mg}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$ ) y la afinidad por el sustrato es mayor (0,09 mM) (Tabla 3). El ayuno también mejoró, aunque en menor grado la velocidad de transporte de *C. glabrata trk1Δ* incrementándola tres veces respecto al dato obtenido en células normales, aunque la afinidad por el sustrato fue notablemente peor (25,37  $\text{nmol}\cdot\text{mg}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$ ) que en células normales en potasio (Fig. 10B, 10D) (Tabla 3).



**Figura 11. Representación de Lineweaver-Buck del transporte de rubidio en *S. cerevisiae* BYT12 (YEp352) (◊) y BYT12 (YEp-CgTRK1) (◆).** Estos ensayos se realizaron en células normales en potasio (A,B) y células ayunadas de potasio (C,D). Las células se resuspendieron en tampón MES a 0,3 ( $A_{600nm}$ ) con diversas concentraciones de RbCl y se mantuvieron en agitación a 28 °C. A tiempo "0" se añadió el RbCl, se tomaron muestras durante 10-15 minutos y se analizaron por espectrofotometría de absorción atómica. A partir de los datos obtenidos se calcularon las velocidades de entrada de rubidio. Las barras de error indican las desviaciones típicas de los resultados obtenidos a partir de tres repeticiones.

De igual manera que se utilizó *C. glabrata* para obtener las cinéticas de transporte (Fig. 10), también utilizamos dos cepas de *S. cerevisiae* que contenían o no el transportador *CgTrk1*, para poder contrastar los datos de los parámetros cinéticos de este transportador en otra especie de levadura. Los resultados aparecen representados en la Figura 11.

A partir de los resultados de la Figura 11 se pudieron deducir los parámetros cinéticos para el transporte de rubidio ( $V_{\max}$  y  $K_m$ ) para este tipo de células que aparecen recogidos en la Tabla 4.

Tabla 4. Parámetros cinéticos para el transporte de rubidio en *S. cerevisiae* BYT12 (YEp352) y BYT12 (YEp-CgTRK1).

Cepas	Células normales en potasio		Células ayunadas de potasio	
	$V_{\max}$	$K_m$	$V_{\max}$	$K_m$
	(nmol·mg <sup>-1</sup> ·min <sup>-1</sup> )	(mM)	(nmol·mg <sup>-1</sup> ·min <sup>-1</sup> )	(mM)
<i>S. cerevisiae</i> (BYT12 YEp352)	9,29±0,01	24,82±0,01	8,45±3,45	21,51±0,54
<i>S. cerevisiae</i> (BYT12 YEp-CgTRK1)	11,4±0,27	0,24±0,12	72,46±22,96	0,14±0,012

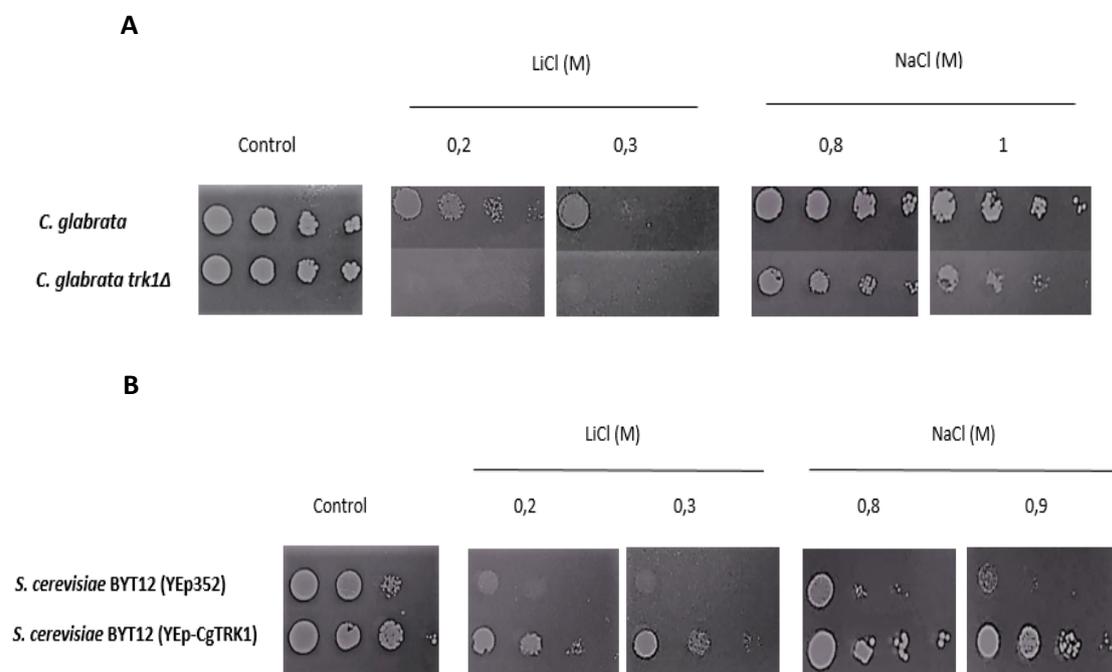
Los parámetros cinéticos se dedujeron de la Figura 11.

En *S. cerevisiae* BYT12 (YEp-CgTRK1) la velocidad de transporte y la afinidad por el sustrato fueron mayores que en *S. cerevisiae* BYT12 (YEp352) en células normales en potasio (Fig. 11A, 11B) (Tabla 4). Los valores de la  $K_m$  fueron muy similares en las cepas que contienen *CgTrk1* de *C. glabrata* y *S. cerevisiae* (0,39 y 0,27 mM respectivamente) (Tabla 3 y 4). En células ayunadas de potasio la velocidad de transporte de *S. cerevisiae* BYT12 (YEp-CgTRK1) aumentó considerablemente y también su afinidad por el sustrato (72,46 nmol·mg<sup>-1</sup>·min<sup>-1</sup> y 0,14 mM respectivamente) (Tabla 4). Sin embargo, en *S. cerevisiae* BYT12 (YEp352) no se observaron cambios significativos de los parámetros cinéticos tras el ayuno celular (Fig. 11C, 11D) (Tabla 4). Todos estos datos indican que los parámetros cinéticos del transportador *CgTrk1* fueron mejores que los de los otros sistemas de transporte que pudieran actuar en las cepas carentes de dicho transportador en *C. glabrata* y *S. cerevisiae*, especialmente en células ayunadas de potasio.

## 7. Tolerancia a litio/sodio

### 7.1 Crecimiento en medio sólido

El transportador *CgTrk1* se ha asociado a otros fenotipos en varios estudios, y en este trabajo se han querido abordar varios de ellos, como la tolerancia al estrés salino, sobre la que se ha estudiado la posible implicación de *CgTrk1* en *C. glabrata* y *S. cerevisiae*, siendo otro de los principales objetivos de este trabajo. Para ello se realizaron ensayos de crecimiento con las cepas de estas levaduras que contenían o no *CgTrk1* en presencia de litio o sodio utilizando células normales en potasio, inoculándolas en placas de YNB con diferentes concentraciones de LiCl o NaCl e incubándolas durante 48 horas a 28 °C.



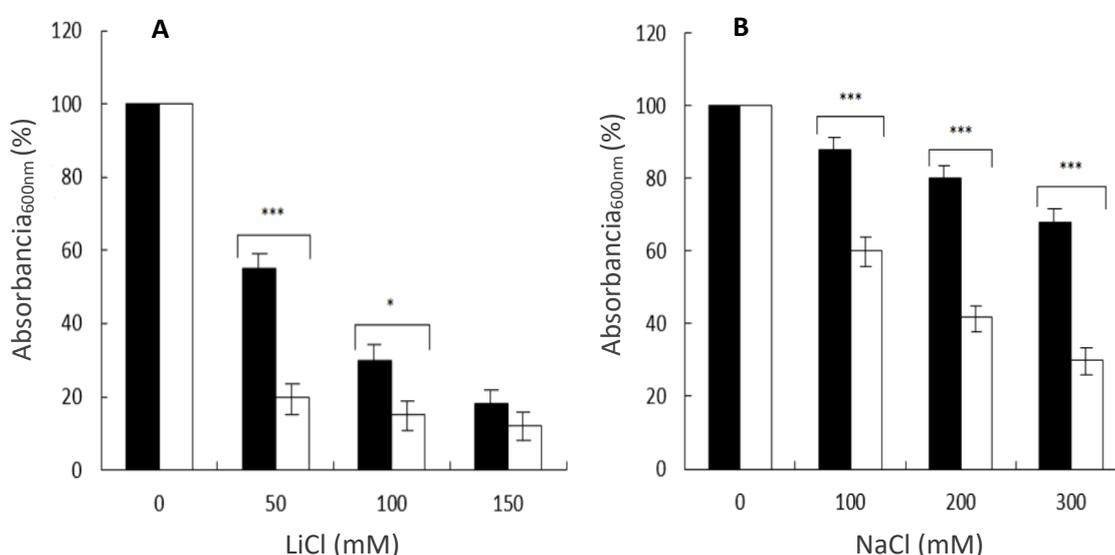
**Figura 12. Crecimiento en medio sólido con diferentes concentraciones de LiCl y NaCl en *C. glabrata* silvestre y *trk1Δ* (A) y en *S. cerevisiae* BYT12 (YE<sub>p</sub>352) y BYT12 (YE<sub>p</sub>-CgTRK1) (B).** Las células se cultivaron previamente tal y como se indica en material y métodos. Se obtuvo una suspensión celular que se ajustó a 1 ( $A_{600nm}$ ), se diluyó 10, 100 y 1000 veces y se inoculó con 5  $\mu$ l en placas de YNB completo + 100 mM de KCl (A) o YNB con los requerimientos auxotróficos de las cepas + 100 mM de KCl (B) con diferentes concentraciones de LiCl y NaCl. Finalmente las placas se incubaron a 28 °C durante 48 horas. Los experimentos se repitieron al menos tres veces y los resultados mostrados son representativos.

La presencia de *CgTrk1* en *C. glabrata* y *S. cerevisiae* mejoró el crecimiento cuando ambas cepas se expusieron a altas concentraciones de LiCl o NaCl, ya que en las cepas que no contenían dicho transportador, la sensibilidad al estrés salino fue significativamente mayor que la observada en las cepas que si lo contienen, no

creciendo con normalidad en las concentraciones 0,2 y 0,3 M de LiCl o en 0,8 y 1 M de NaCl (Fig. 12A, 12B). Esto indica que el transportador *CgTrk1* desempeña un papel importante en la tolerancia al estrés salino en *C. glabrata* y *S. cerevisiae*.

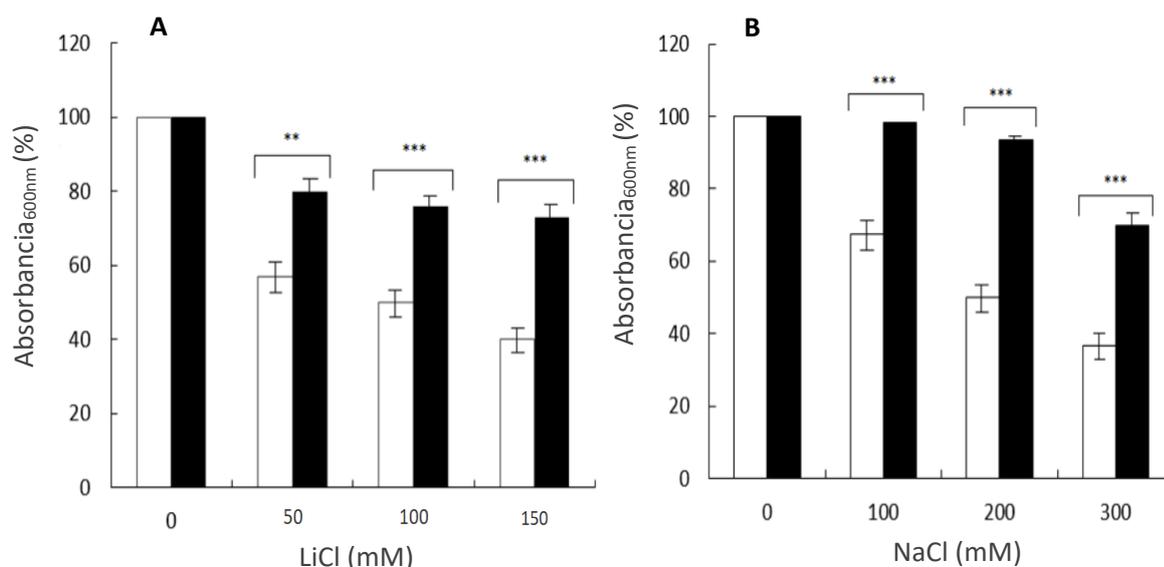
## 7.2 Crecimiento en medio líquido

Una vez conocida la influencia de *CgTrk1* en la tolerancia al estrés salino se profundizó aún más en el estudio del papel de este transportador en presencia de litio o sodio, y para ello se realizaron ensayos en medio líquido con las cepas de *C. glabrata* y *S. cerevisiae* que contienen o no el transportador *CgTrk1*. Se obtuvieron células crecidas sin limitaciones de potasio que se inocularon en YNB con diferentes concentraciones de LiCl o NaCl y se incubaron en agitación a 28 °C.



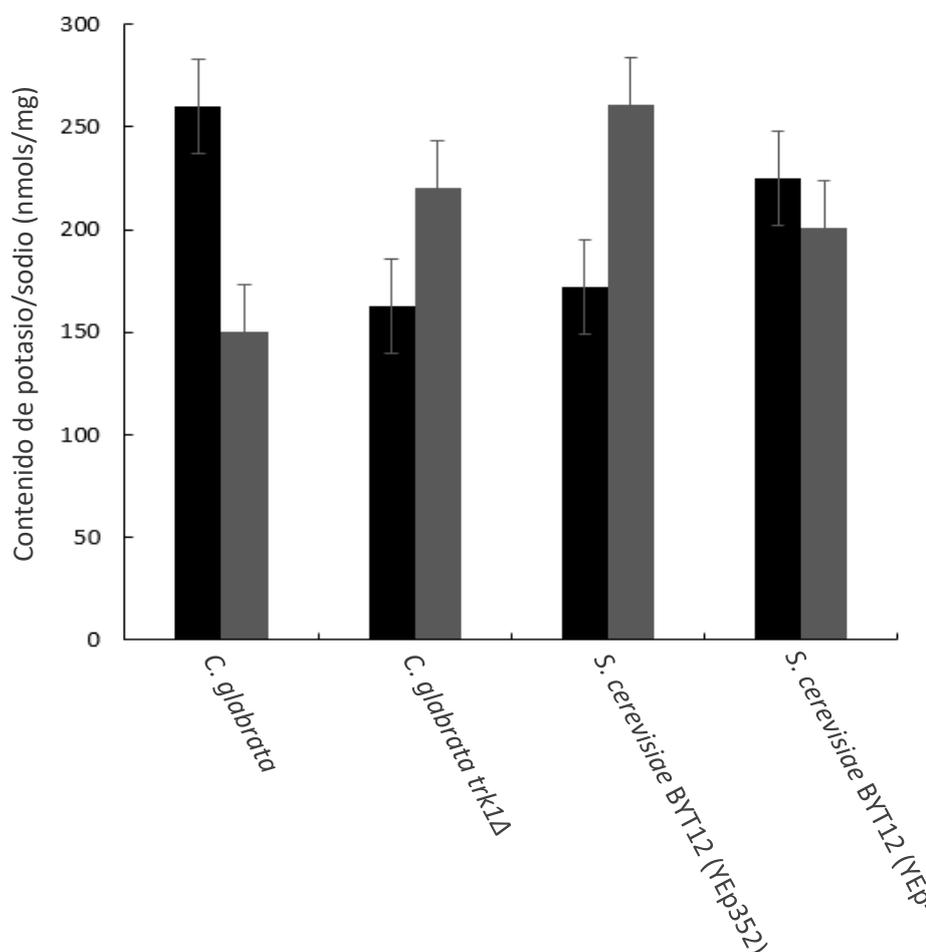
**Figura 13. Crecimiento en medio líquido a diferentes concentraciones de LiCl y NaCl en *C. glabrata silvestre* (negro) y *trk1Δ* (blanco).** Las células se cultivaron previamente tal y como se describe en material y métodos. Se obtuvieron células que se resuspendieron a 0,03 ( $A_{600nm}$ ) en YNB completo + 100 mM de KCl con diferentes concentraciones de LiCl (A) y NaCl (B) y se mantuvieron en agitación a 28 °C. El crecimiento se midió después de las 24 horas de incubación. Las barras de error indican las desviaciones típicas a partir de tres repeticiones. Los resultados de absorbancia de las células crecidas en litio o sodio se representan en % en comparación con los medidos en el control (células crecidas en YNB completo con 100 mM de KCl).

A partir de los valores de absorbancia medidos de las células crecidas en LiCl o NaCl, se pudo calcular el porcentaje de crecimiento respecto al control de las distintas cepas en las diferentes concentraciones de LiCl o NaCl utilizadas. Los resultados mostraron que el porcentaje de crecimiento de la cepa de *C. glabrata* que contiene el transportador *CgTrk1* fue mayor que el de la cepa que no contiene dicho transportador cuando se incubaron en 50, 100 y 150 mM de LiCl o en 100, 200 y 300 mM de NaCl (Fig. 13A, 13B).



**Figura 14. Crecimiento en medio líquido a diferentes concentraciones de LiCl y NaCl en *S. cerevisiae* BYT12 (YEp352) (blanco) y BYT12 (YEp-CgTRK1) (negro).** Las células se cultivaron previamente tal y como se describe en material y métodos. Se obtuvieron células que se resuspendieron a 0,03 ( $A_{600nm}$ ) en YNB sin aminoácidos con los requerimientos auxotróficos de las cepas + 100 mM de KCl con diferentes concentraciones de LiCl (A) y NaCl (B) y se mantuvieron en agitación a 28 °C. El crecimiento se midió después de las 24 horas de incubación. Las barras de error indican las desviaciones típicas a partir de tres repeticiones. Los resultados de absorbancia de las células crecidas en litio o sodio se representan en % en comparación con los medidos en el control (células crecidas en YNB sin aminoácidos con los requerimientos auxotróficos de la cepa +100 mM de KCl).

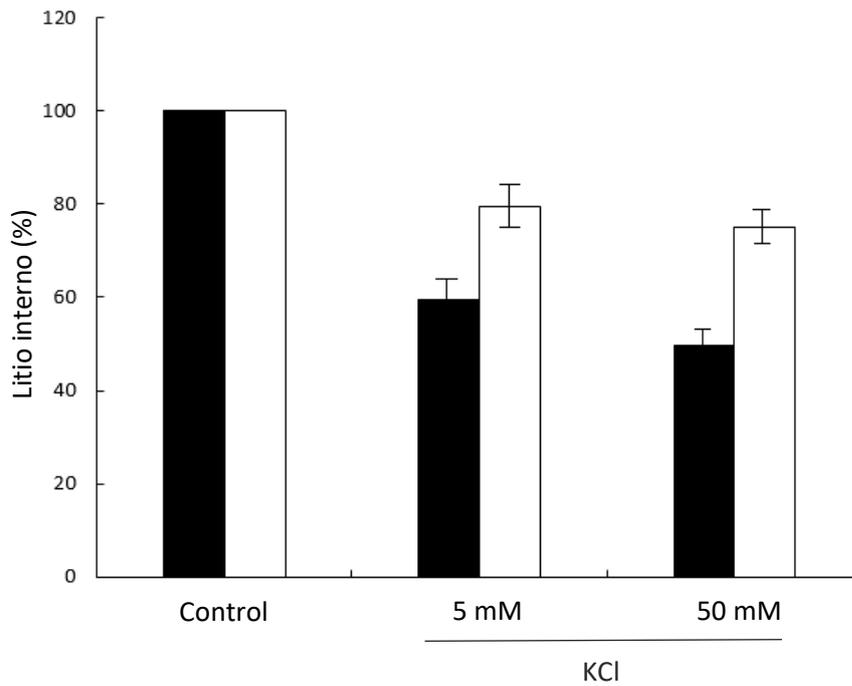
En *S. cerevisiae* los resultados obtenidos en LiCl o en NaCl fueron muy similares, ya que el porcentaje de crecimiento de la cepa que contenía *CgTrk1* fue mayor que el de la cepa que no contenía dicho transportador, como por ejemplo en las concentraciones de 150 mM de LiCl o 200 mM de NaCl, donde se observó que el porcentaje de crecimiento de la cepa que contiene *CgTrk1* es dos veces superior (Fig. 14A, 14B). Estos resultados confirman lo que se observó anteriormente en los ensayos con medio sólido e indican que el transportador *CgTrk1* influye positivamente en la tolerancia al estrés salino en *C. glabrata* y en *S. cerevisiae*. Una vez estudiado el crecimiento en medio líquido de todas las cepas seguidamente se analizó el contenido intracelular en potasio y sodio (0,2M) cuyos resultados fueron 260/150 en *C. glabrata* silvestre y 163/220 nmol/mg en *C. glabrata trk1Δ*. En el caso de las cepas de *S. cerevisiae* BYT12 (YEp352) y BYT12 (YEp-CgTRK1) los valores fueron 172/261 y 225/201 nmol/mg respectivamente (Fig. 15). Estos resultados indican una alta capacidad de discriminación entre potasio y sodio en las cepas que contienen el transportador *CgTrk1*.



**Figura 15. Contenido intracelular de potasio y sodio en la cepa silvestre y *trk1Δ* de *C. glabrata* y en las cepas de *S. cerevisiae* BYT12 (YEp352) y BYT12 (YEp-CgTRK1).** Se determinó el contenido de potasio (barras negras) y sodio (barras grises) de células crecidas en YNB con 0,2M de NaCl. Las muestras se tomaron por triplicado y se midieron por espectrofotometría de absorción atómica. Las barras de error indican las desviaciones típicas de los resultados obtenidos a partir de las tres repeticiones.

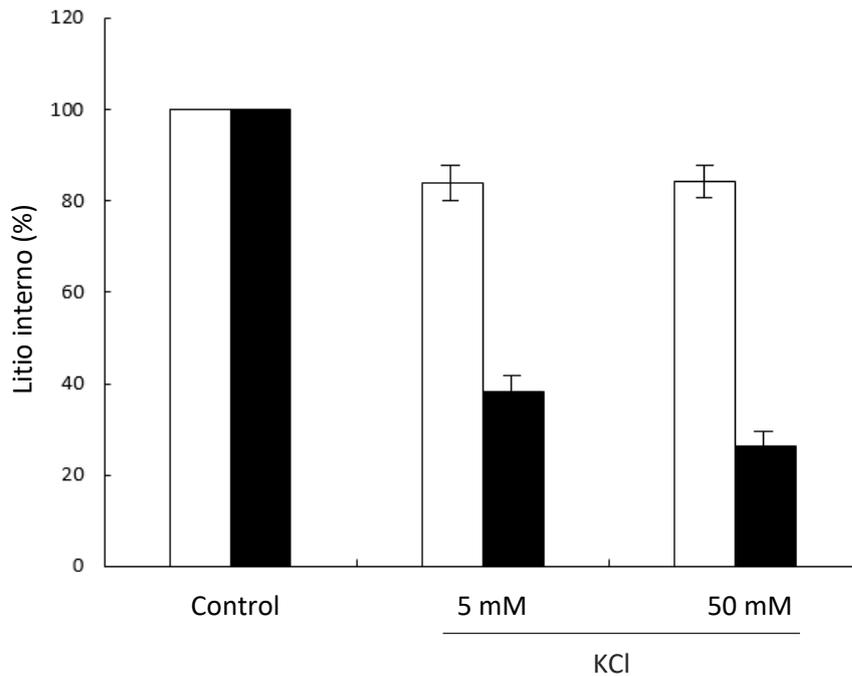
## 8. Contenido en litio en células normales en potasio

Los resultados obtenidos anteriormente en los ensayos de contenido de sodio y potasio sugirieron que el transportador *CgTrk1* tiene una alta capacidad de discriminación entre estos cationes. Para poder confirmar esta posibilidad, se estudió el efecto del potasio sobre la acumulación de litio, y para ello se realizaron ensayos con células crecidas sin limitaciones de potasio que se ajustaron e incubaron a 0,3 ( $A_{600nm}$ ) en LiCl, en ausencia y en presencia de KCl y se tomaron muestras que se analizaron por espectrofotometría de absorción atómica.



**Figura 16. Contenido en litio de células normales en potasio en ausencia o presencia de KCl en *C. glabrata silvestre* (color negro) y *trk1Δ* (color blanco).** Se obtuvieron células normales en potasio que se resuspendieron en tampón MES a 0,3 ( $A_{600nm}$ ) con 100 mM de LiCl (control), 100 mM de LiCl + 5 mM de KCl y 100 mM de LiCl + 50 mM de KCl durante 8 minutos. Las muestras se analizaron por espectrofotometría de absorción atómica. Las barras de error indican las desviaciones típicas a partir de tres repeticiones. Los resultados del contenido interno de litio se representan en % en comparación con los medidos en el control.

Tras incubar ocho minutos en presencia de litio y a partir de los datos obtenidos, se calculó el porcentaje de litio interno. En la cepa de *C. glabrata silvestre* el contenido de litio fue disminuyendo de manera importante conforme se añadió 5 o 50 mM de KCl. Sin embargo en *C. glabrata trk1Δ* la disminución en la acumulación de litio fue menor indicando una menor efectividad del potasio en la inhibición de la toma de litio. De esta manera, por ejemplo, 50 mM de KCl inhibió un 50 % aproximadamente la acumulación de litio en la cepa silvestre y sólo un 25 % aproximadamente en la cepa *trk1Δ* (Fig. 16).



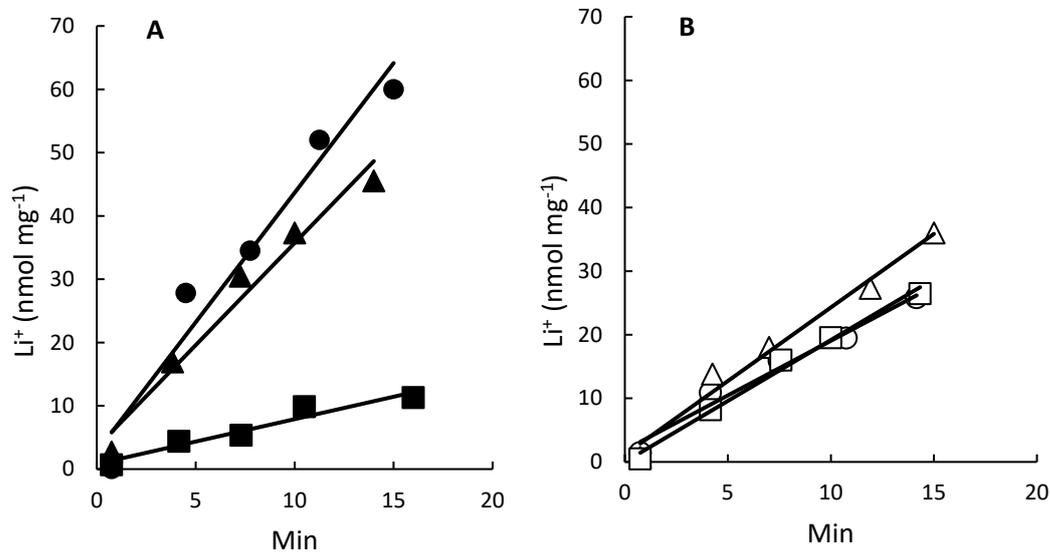
**Figura 17. Contenido en litio de células normales en potasio en ausencia o presencia de KCl en *S. cerevisiae* BYT12 (YEp352) (color blanco) o en BYT12 (YEp-CgTRK1) (color negro).** Se obtuvieron células normales en potasio que se resuspendieron en tampón MES a 0,3 ( $A_{600nm}$ ) con 100 mM de LiCl (control), 100 mM de LiCl + 5 mM de KCl y 100 mM de LiCl + 50 mM de KCl durante 8 minutos. Las muestras se analizaron por espectrofotometría de absorción atómica. Las barras de error indican las desviaciones típicas a partir de las tres repeticiones. Los resultados del contenido interno de litio se representan en % en comparación con los medidos en el control.

Algo parecido ocurrió en *S. cerevisiae*, ya que en presencia de KCl en la cepa que contiene el transportador *CgTrk1* la inhibición de la acumulación de litio fue de un 62 % en 5 mM de KCl y de un 75 % en 50 mM de KCl respecto al control, sin embargo en la cepa que no contiene dicho transportador, la inhibición de la acumulación de litio fue de alrededor de un 15 % respecto al control tanto con 5 como con 50 mM de KCl (Fig. 17). Estos resultados indican que el transportador *CgTrk1* tiene la capacidad de discriminar entre potasio y litio.

### 9. Transporte de litio en células ayunadas de potasio

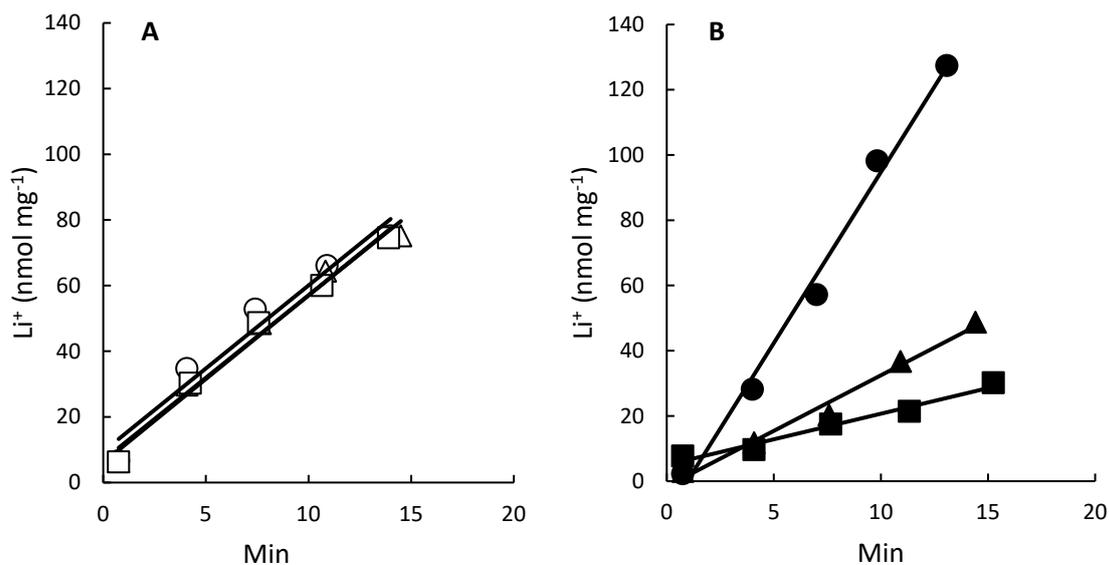
Los resultados obtenidos del contenido de litio en células normales en potasio nos dieron información acerca de la capacidad que tiene el transportador *CgTrk1* para influir en dicho contenido discriminando entre potasio y litio. Sin embargo, para ahondar aún más en el análisis de dicha función, conocer con más detalle el efecto del potasio sobre la velocidad de entrada de litio y saber si otras condiciones de crecimiento como el ayuno pueden influir en la capacidad de discriminación de este transportador, se realizaron ensayos de acumulación de litio a lo largo del tiempo en células ayunadas de potasio en presencia o ausencia de KCl con las cepas de *C. glabrata* y *S. cerevisiae* que

contienen o no *CgTrk1*. Estas células se resuspendieron a 0,3 ( $A_{600nm}$ ), se tomaron muestras a distintos tiempos que se analizaron y a partir de los valores obtenidos se pudo calcular la entrada de litio a lo largo del tiempo en las diferentes condiciones estudiadas.



**Figura 18. Efecto del potasio sobre la entrada de litio en células ayunadas de potasio en *C. glabrata* silvestre (A) y *trk1Δ* (B).** Se obtuvieron células ayunadas de potasio que se resuspendieron en tampón MES a 0,3 ( $A_{600nm}$ ) con 100 mM de LiCl (círculos), 100 mM de LiCl + 0,5 mM de KCl (triángulos) o 100 mM de LiCl + 5 mM de KCl (cuadrados). Las células se incubaron en estas condiciones a 28 °C, y en ese período a tiempo “0” se añadió LiCl y se cogieron muestras durante 15-20 minutos aproximadamente. Las muestras se analizaron por espectrofotometría de absorción atómica. Los resultados mostrados son representativos y los experimentos se repitieron al menos tres veces.

En *C. glabrata* silvestre la entrada de litio disminuyó en presencia de KCl, hecho que se observó especialmente en 5 mM de KCl, ya que en 0,5 mM de KCl hubo poca variación. Sin embargo en *C. glabrata trk1Δ* apenas se observó variación alguna en el transporte de litio en presencia de KCl (Fig. 18A, 18B).



**Figura 19. Efecto del potasio sobre la entrada de litio en células ayunadas de potasio en *S. cerevisiae* BYT12 (YE p352) (A) o BYT12 (YE p-CgTRK1) (B).** Se obtuvieron células ayunadas de potasio que se resuspendieron en tampón MES a 0,3 ( $A_{600nm}$ ) con 100 mM de LiCl (círculos), 100 mM de LiCl + 0,5 mM de KCl (triángulos) o 100 mM de LiCl + 5 mM de KCl (cuadrados). Las células se incubaron en estas condiciones a 28 °C, y en ese período a tiempo "0" se añadió LiCl y se cogieron muestras durante 15-20 minutos aproximadamente. Las muestras se analizaron por espectrofotometría de absorción atómica. Los resultados mostrados son representativos y los experimentos se repitieron al menos tres veces.

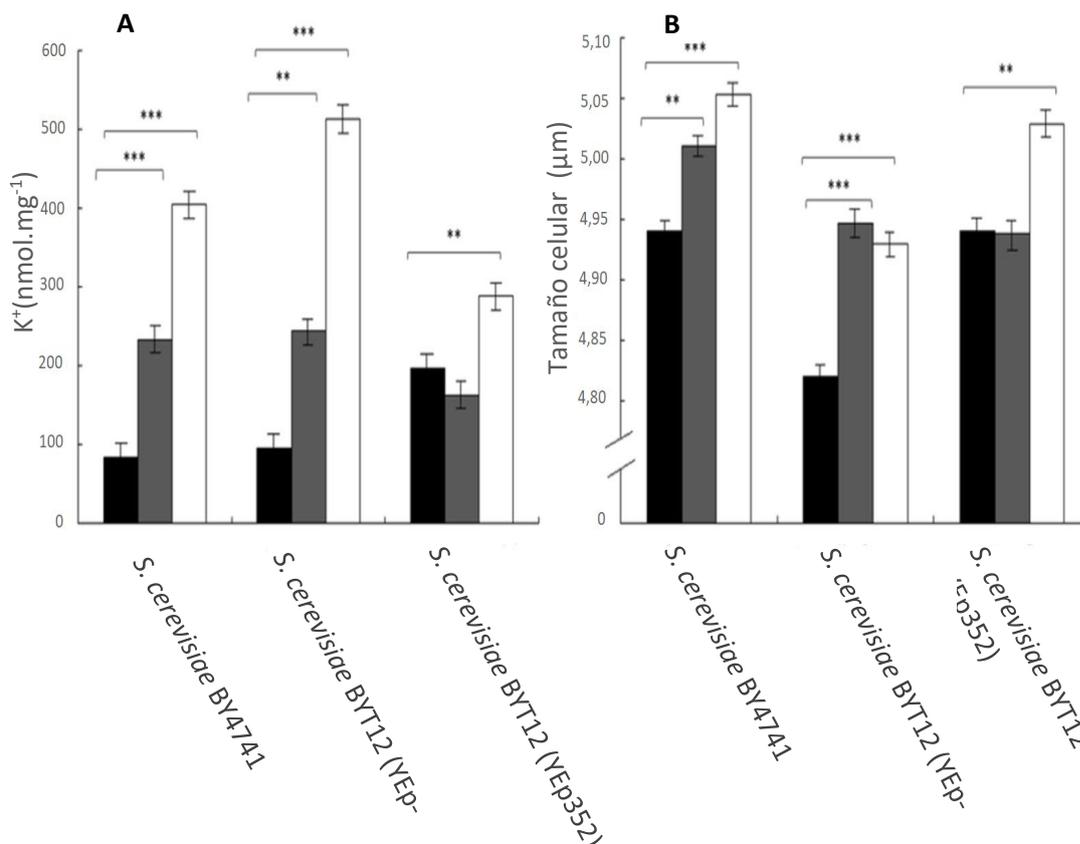
En las cepas de *S. cerevisiae* los resultados fueron muy similares, ya que en la cepa que contiene el transportador *CgTrk1* la entrada de litio en las células disminuyó en presencia de KCl, observándose en 0,5 y en 5 mM de KCl una clara disminución, al contrario de lo ocurrido en la cepa de *S. cerevisiae* que no contenía *CgTrk1*, donde apenas se observó variación de la entrada de litio en las células con ambas concentraciones de KCl (Fig. 19A, 19B). El efecto del potasio en la entrada de este catión tóxico, observado en los resultados de las cepas que contienen el transportador *CgTrk1*, fue muy significativo en células ayunadas de potasio en comparación con los resultados observados en el contenido de litio en células normales en potasio. Esto indica que el ayuno mejora la capacidad del transportador *CgTrk1* para discriminar entre potasio y litio.

## 10. Volumen celular /contenido intracelular de potasio

Para investigar si el transportador *CgTrk1* es capaz de influir de alguna manera sobre el tamaño celular, se determinó este parámetro junto con el contenido intracelular de potasio. Este experimento se realizó con *C. glabrata* silvestre y *trk1Δ* o con *S. cerevisiae* BYT12 (YE p352) o BYT12 (YE p-CgTRK1), y, en este último caso, como control se utilizó una cepa silvestre de *S. cerevisiae* (*S.cBY4741*). Se obtuvieron células ayunadas de

potasio, se midió el contenido intracelular de potasio (Material y métodos) y a continuación se tomaron muestras a las que se les midió el tamaño celular. A las células ayunadas se añadió KCl (0,5 o 100 mM), se incubaron durante una hora, se volvió a medir el contenido intracelular de potasio y seguidamente el tamaño celular.

En otros trabajos como el de Navarrete *et al.* (2010) se estudió este parámetro en *S. cerevisiae*, y se observó que en la cepa silvestre y la cepa *trk1Δtrk2Δ* existían diferencias de tamaño entre las células normales en potasio y las células ayunadas de potasio. En el caso de *C. glabrata* obtuvimos valores muy parecidos de tamaño en células normales en potasio de la cepa silvestre y en células normales en potasio de la cepa *trk1Δ* (4,80 y 4,77  $\mu\text{m}$  respectivamente). Además no observamos cambios significativos después del ayuno celular de la cepa silvestre y *trk1Δ* de *C. glabrata* (4,84 y 4,77  $\mu\text{m}$  respectivamente). Con los resultados observados en células que crecieron sin limitaciones de potasio o en células ayunadas de potasio, confirmamos que no existían cambios de este parámetro en *C. glabrata*, así que no pudimos continuar estos ensayos con esta levadura, por ello se realizó una aproximación en *S. cerevisiae* con las cepas BYT12 (YEp352) y BYT12 (YEp-CgTRK1).



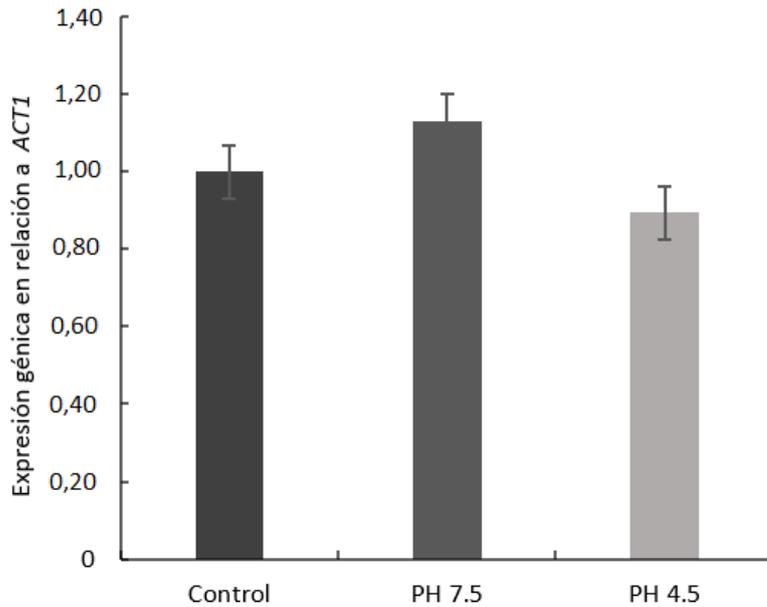
**Figura 20. Contenido intracelular de potasio (A) y volumen celular (B) en *S. cerevisiae* BY4741 (control), BYT12 (YEp-CgTRK1) y BYT12 (YEp352).** Se obtuvieron células ayunadas de potasio, se midió el contenido intracelular de potasio (tal y como se ha descrito anteriormente en material y métodos), se tomaron muestras que se diluyeron 10 veces con agua destilada estéril y se resuspendieron en tampón isotón para medir el tamaño celular. A las células ayunadas (barras

negras) se añadió 0,5 (barras grises) o 100 mM de KCl (barras blancas) y se incubaron durante 1 hora. Después de la incubación se repitió el mismo proceso de medición. Las barras de error indican las desviaciones típicas a partir de tres repeticiones.

Tras el ayuno celular, se observó que en la cepa de *S. cerevisiae* BY4741 y BYT12 (YE<sub>p</sub>-CgTRK1) el contenido intracelular de potasio fue muy similar y además fue dos veces inferior al observado en *S. cerevisiae* YE<sub>p</sub>352 (Fig. 20A). Por otro lado se observó que el volumen celular de *S. cerevisiae* BY4741 y BYT12 (YE<sub>p</sub>352) era muy similar y que este parámetro en *S. cerevisiae* BYT12 (YE<sub>p</sub>-CgTRK1) fue notablemente inferior (Fig. 20B). El contenido intracelular de potasio y el tamaño celular se incrementaron en *S. cerevisiae* BY4741 y en *S. cerevisiae* BYT12 (YE<sub>p</sub>-CgTRK1) conforme se añadió 0,5 mM de KCl al medio, sin embargo en *S. cerevisiae* (YE<sub>p</sub>352) el contenido intracelular de potasio continuó disminuyendo y el tamaño no se incrementó en dicha concentración de KCl. Esto indica que a 0,5 mM de KCl solo las cepas que contenían Trk1 pudieron tomar potasio y aumentar su volumen celular. En 100 mM de KCl todas las cepas del estudio pudieron tomar potasio aumentando su volumen celular y su contenido intracelular de potasio (Fig. 20A, 20B). Estos resultados indican que el aumento del contenido intracelular de potasio va acompañado de un aumento del tamaño celular, y que CgTrk1 y ScTrk1 influyen en este comportamiento al permitir la absorción de potasio incluso cuando el catión se encuentra a bajas concentraciones en el medio externo.

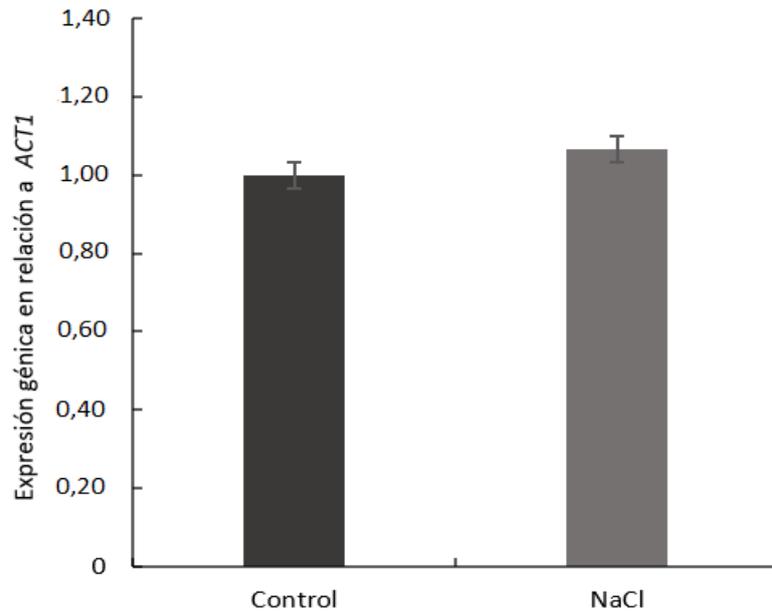
## 11. Expresión génica

A raíz de los cambios cinéticos observados en la actividad del transportador CgTrk1 durante el ayuno celular de potasio, se investigó si estos cambios estaban relacionados con una regulación transcripcional del gen *CgTRK1*, y para ello se realizaron ensayos relacionados con la expresión génica con la cepa silvestre de *C. glabrata*. Se realizó una extracción de ARN en diferentes condiciones de crecimiento (un ayuno de 1, 2 y 3 horas; diferentes pH (7,5 y 4,5) y estrés salino con 1 M de NaCl) y se efectuó una retrotranscripción del ARN extraído de las diferentes condiciones. Con el ADN obtenido se hicieron RT-PCRs cuantitativas con primers específicos de *CgTRK1* y se utilizó como control el gen de la actina (*ACT1*).



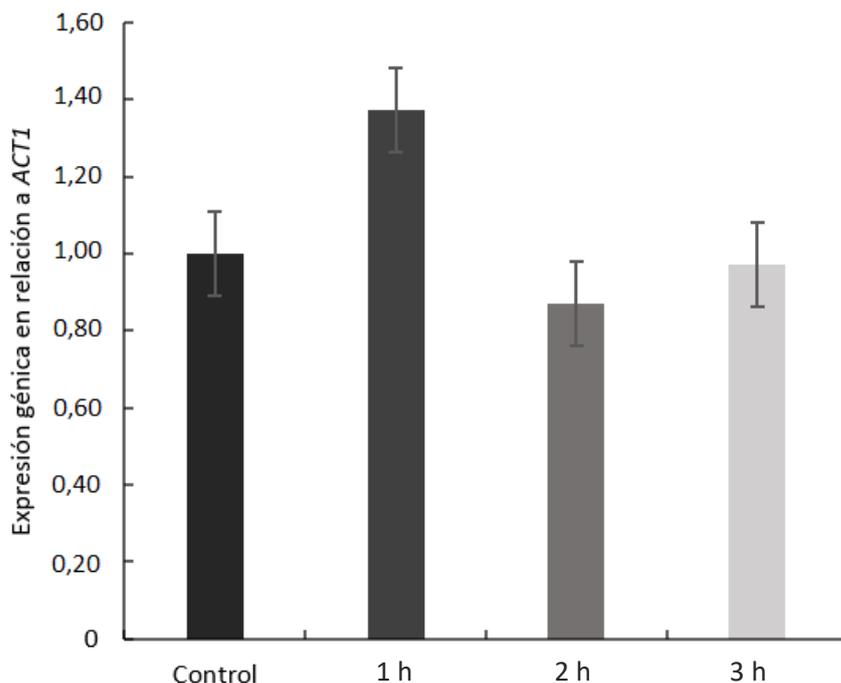
**Figura 21. Expresión génica de *CgTRK1* en diferentes condiciones de pH.** Se obtuvieron células normales en potasio que se resuspendieron a 0,1 ( $A_{600nm}$ ) en YPD con pH diferentes, que son 6 (Control) 7,5 y 4,5. Las células crecieron a 28 °C hasta alcanzar 0,6 ( $A_{600nm}$ ) y se realizó la extracción de ARN de las células suspendidas en las tres condiciones y a continuación la retrotranscripción del ARN extraído. Se efectuó una RT-PCR cuantitativa del ADN obtenido con primers específicos de *CgTRK1* y utilizando como control *ACT1*. Las barras de error indican las desviaciones típicas a partir de tres repeticiones.

Las diferentes condiciones de pH no influyeron en la expresión génica de *CgTRK1* ya que no se observaron cambios en dicha expresión cuando se relacionó con el gen *ACT1* (Fig. 21).



**Figura 22. Expresión génica de *CgTRK1* con estrés salino.** Se obtuvieron células normales en potasio que se resuspendieron a 0,1 ( $A_{600nm}$ ) en YPD sin sodio (control) y con sodio (1 M de NaCl) y las células crecieron a 28 °C hasta alcanzar 0,6 ( $A_{600nm}$ ). Se realizó la extracción de ARN de las células suspendidas en ambas condiciones y a continuación la retrotranscripción del ARN extraído. Se efectuó una RT-PCR cuantitativa del ADN obtenido con primers específicos de *CgTRK1* y utilizando como control *ACT1*. Las barras de error indican las desviaciones típicas a partir de tres repeticiones.

El estrés salino tampoco influyó en la expresión génica de *CgTRK1* cuando se relacionó dicha expresión con *ACT1* (Fig. 22).



**Figura 23. Expresión génica de *CgTRK1* en diferentes tiempos de ayuno.** Se obtuvieron células normales en potasio (control) y células ayunadas de potasio después de una, dos y tres horas de ayuno. Se extrajo el ARN de las células suspendidas en los tres tiempos y a continuación se realizó la retrotranscripción del ARN extraído. Se efectuó una RT-PCR cuantitativa del ADN obtenido con primers específicos de *CgTRK1* y utilizando como control *ACT1*. Las barras de error indican las desviaciones típicas a partir de tres repeticiones.

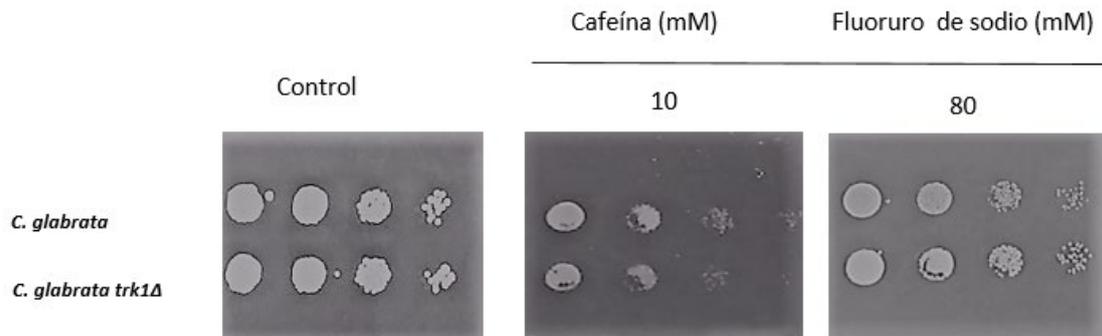
Tampoco se detectaron cambios en la expresión de *CgTRK1* en los diferentes tiempos de ayuno celular. Aunque tras una hora de ayuno se observó un ligero cambio en la expresión génica, el dato no parece de gran relevancia (Fig. 23).

En resumen, no hubo cambios significativos en la expresión génica de *CgTRK1* en ninguna de las condiciones de pH, sal o ayuno de potasio a las que se expuso la cepa de *C. glabrata* silvestre y todo ello nos indica que el gen *CgTRK1* no se regula transcripcionalmente en ninguna de las condiciones estudiadas, y que posiblemente la proteína *CgTrk1* tenga una regulación post-traduccional.

## 12. Tolerancia a diferentes drogas

El efecto de diferentes drogas sobre el crecimiento de las cepas de *C. glabrata* y *S. cerevisiae* que contienen o no el transportador *CgTrk1* fue otro tema que se quiso abordar con detalle para intentar identificar compuestos que pudieran afectar diferencialmente a cepas conteniendo o no ese transportador de potasio. Para ello se realizó una búsqueda de compuestos con diferentes mecanismos de acción para poder encontrar el fenotipo deseado. Durante esa búsqueda se ensayaron compuestos como

la cafeína (que afecta a la integridad de la pared celular) (Esher *et al.* 2018) u otros compuestos cuya función consistía en inhibir algún componente de la cadena de transporte electrónico o la glucólisis (fluoruro de sodio, azida sódica y Antimicina A) (Rikhvanov *et al.* 2002, Chaustova *et al.* 2010, Peña *et al.* 2015).



**Figura 24. Crecimiento en medio sólido con cafeína o fluoruro de sodio de *C. glabrata* silvestre y *trk1Δ*.** Las células se cultivaron previamente como se describe en material y métodos. Se obtuvo una suspensión celular que se ajustó a 1 ( $A_{600nm}$ ) y se diluyó 10, 100 y 1000 veces y se inoculó con 5  $\mu$ l en placas de YNB completo + 100 mM de KCl con diferentes concentraciones de fluoruro de sodio o cafeína (se muestra un ejemplo ilustrativo de los resultados obtenidos en cada compuesto). Las placas se incubaron a 28 °C durante 48 horas. Los resultados mostrados son representativos y los experimentos se repitieron al menos tres veces.

Los resultados obtenidos con la cafeína (una sustancia que afecta a la integridad de la pared celular) (Esher *et al.* 2018) y el fluoruro de sodio (un inhibidor de la glucólisis) (Chaustova *et al.* 2010) fueron negativos (Fig. 24) en el sentido de que no se observaron diferencias en la sensibilidad a estos compuestos entre las cepas que contenían o no el transportador *CgTrk1*. Sin embargo con la azida sódica o la Antimicina A si se observaron diferencias entre las cepas que contenían o no dicho transportador.

Los inhibidores de la cadena de transporte electrónico mitocondrial son compuestos que afectan de forma específica a algún componente de dicha cadena (Fig. 25). Dos de dichos compuestos son la Antimicina A, un antibiótico que interrumpe el flujo de electrones a nivel del citocromo  $b_H$  de la citocromo c oxidorreductasa o la azida sódica, que bloquea el flujo de electrones a nivel de la citocromo c oxidasa (Garret y Grisham 2001).

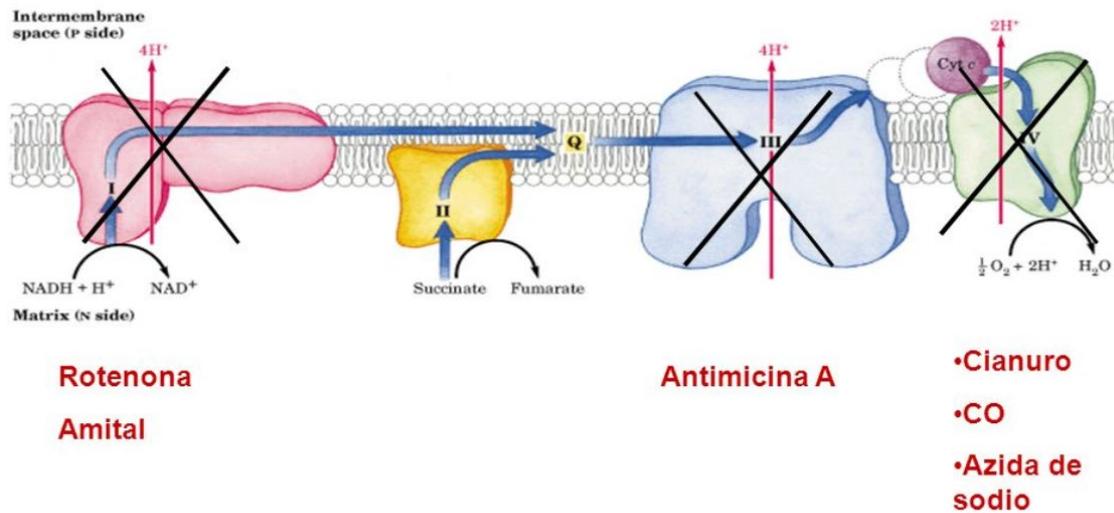
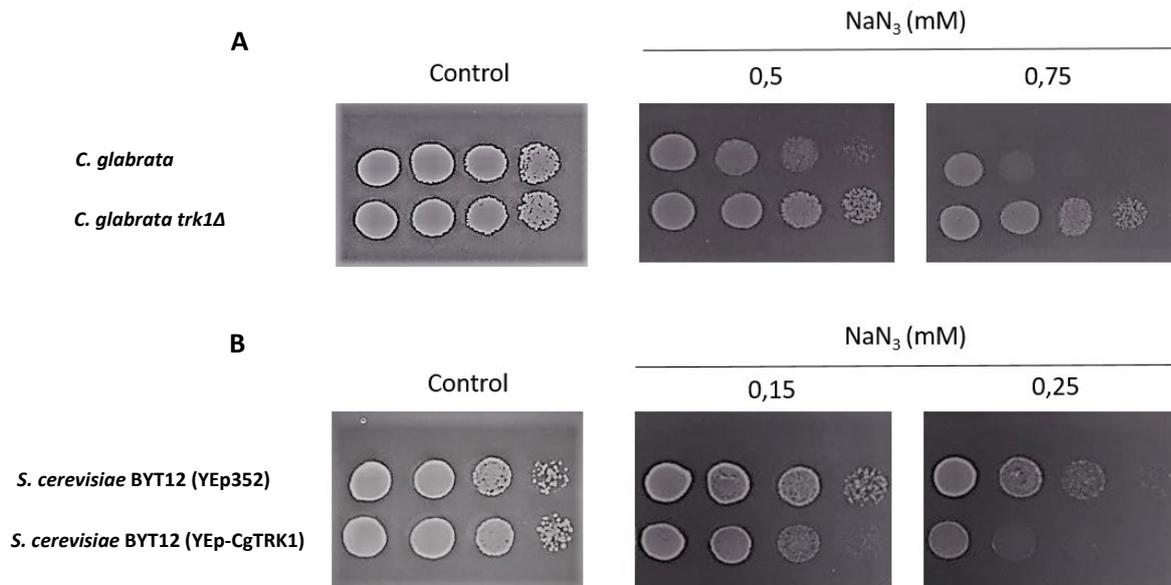


Figura 25. Ilustración de la cadena de transporte electrónico mitocondrial y los complejos afectados de dicha cadena por la acción de drogas que inhiben etapas del proceso. Tomado de Garret y Grisham 2001 con ligeras modificaciones.

### 13. Tolerancia a azida sódica

Para saber si la azida sódica, un compuesto que daña a la cadena de transporte electrónico afecta diferencialmente a cepas que portan o no el transportador, se estudió el efecto de dicho compuesto sobre el crecimiento de las cepas de *C. glabrata* y *S. cerevisiae* que contienen o no el transportador *CgTrk1*. Se obtuvieron células normales en potasio que se inocularon en placas de YNB con diferentes concentraciones de azida sódica ( $\text{NaN}_3$ ) y se incubaron a  $28^\circ\text{C}$  durante 48 horas.

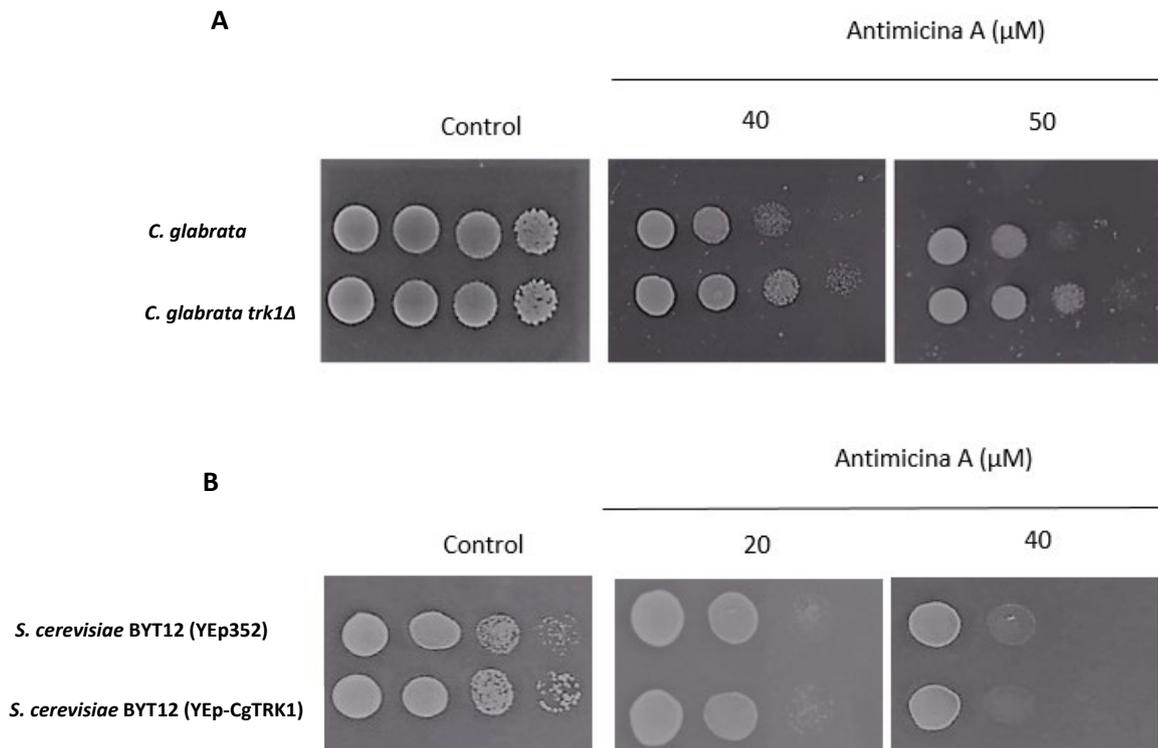


**Figura 26. Crecimiento en medio sólido con diferentes concentraciones de  $\text{NaN}_3$  en *C. glabrata* silvestre y *trk1Δ* (A) o en *S. cerevisiae* BYT12 (YEp352) y BYT12 (YEp-CgTRK1) (B).** Las células se cultivaron previamente como se describe en material y métodos. Se obtuvo una suspensión celular que se ajustó a 1 ( $A_{600\text{nm}}$ ), se diluyó 10, 100 y 1000 veces y se inoculó con 5  $\mu\text{l}$  en placas de YNB completo + 100 mM de KCl (A) o YNB sin aminoácidos con los requerimientos auxotróficos de las cepas + 100 mM de KCl (B) con diferentes concentraciones de  $\text{NaN}_3$ . Las placas se incubaron a 28  $^{\circ}\text{C}$  durante 48 horas. Los resultados mostrados son representativos y los experimentos se repitieron al menos tres veces.

La azida sódica inhibió más el crecimiento de las cepas de *C. glabrata* y *S. cerevisiae* que contenían el transportador *CgTrk1* que el de las cepas que no contenían dicho transportador, cuyo crecimiento también se vio afectado por este compuesto pero en menor grado (Fig. 26). Esto nos indica que las cepas que contienen el transportador *CgTrk1* son más sensibles a la azida sódica y que este compuesto podría afectar más claramente a las cepas que contienen el transportador, siendo una posible diana para este tipo de compuestos.

#### 14. Tolerancia a Antimicina A

Del mismo modo que con la azida sódica, se comprobó si la Antimicina A podría afectar diferencialmente a cepas que portan o no el transportador. Este compuesto se probó en *C. glabrata* silvestre y *trk1Δ* o en *S. cerevisiae* BYT12 (YEp352) y BYT12 (YEp-CgTRK1). Para ello se obtuvieron células normales en potasio que se inocularon en placas de YNB con diferentes concentraciones de Antimicina A y se incubaron a 28  $^{\circ}\text{C}$  durante 4 días, ya que en días anteriores no se observaron diferencias significativas en el crecimiento de ambas cepas.

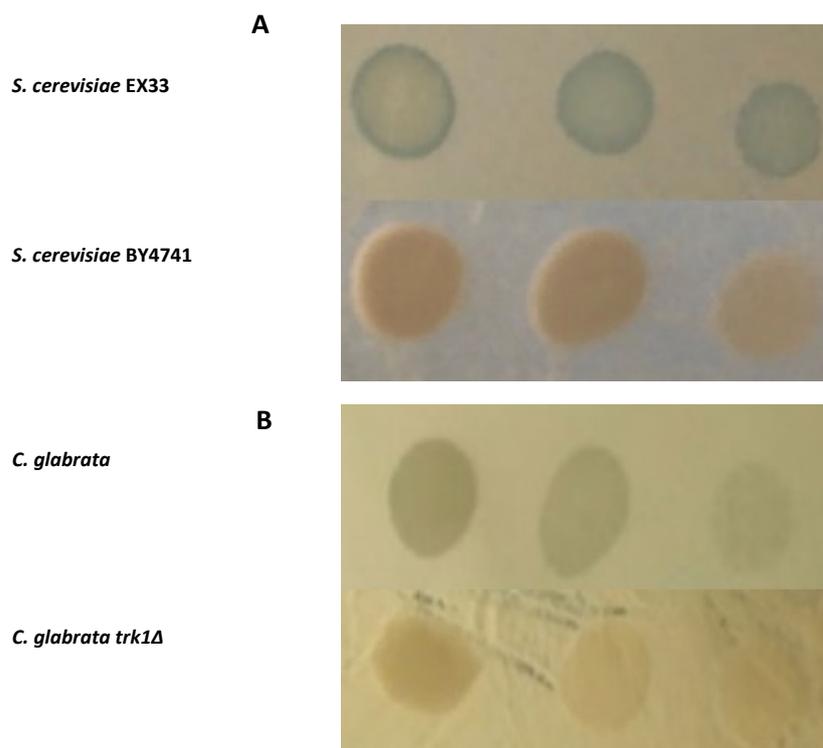


**Figura 27. Crecimiento en medio sólido con diferentes concentraciones de Antimicina A en *C. glabrata* silvestre y *trk1Δ* (A) o en *S. cerevisiae* BYT12 (YEp352) y BYT12 (YEp-CgTRK1) (B).** Las células se cultivaron previamente tal y como se indica en material y métodos. Se obtuvo una suspensión celular que se ajustó a 1 ( $A_{600\text{nm}}$ ), se diluyó 10, 100 y 1000 veces y se inoculó con 5  $\mu\text{l}$  en placas de YNB completo + 100 mM de KCl (A) o YNB sin aminoácidos con los requerimientos auxotróficos de las cepas + 100 mM de KCl (B) con diferentes concentraciones de Antimicina A. Las placas se incubaron a 28  $^{\circ}\text{C}$  durante 4 días. Los resultados mostrados son representativos y los experimentos se repitieron al menos tres veces.

La cepa de *C. glabrata* silvestre fue más sensible a la Antimicina A que la cepa *trk1Δ*, aunque las diferencias fueron mínimas, ya que tan solo se pudieron observar a partir de la dilución 1/100 después de cuatro días de incubación (Fig. 27A). Estos resultados nos indican que este antibiótico podría afectar más a las cepas que contienen el transportador de potasio de *C. glabrata*. Por otro lado las dos cepas de *S. cerevisiae* fueron igual de sensibles a la Antimicina A (Fig. 27B), hecho que indica que este antibiótico no produce el mismo efecto en todas las especies de levaduras.

## 15. Toxinas “killer”

Las toxinas “killer” o micocinas son proteínas de levaduras con un efecto tóxico frente a otras levaduras sensibles que se descubrieron por primera vez en *S. cerevisiae* (Marquina *et al.* 2002). Estas toxinas producidas por levaduras se pueden aislar de suelos, agua, plantas o comida y su potencial de aplicación es muy amplio ya que puede controlar la población de otras levaduras durante la fermentación, inhibir la población de hongos contaminantes en plantas o comida, y hacer frente a otras levaduras patógenas (Morales-Menchén *et al.* 2018). En nuestro caso se estudió si la levadura *Debaryomyces hansenii* 767, productora de toxina “killer”, ejercía algún tipo de efecto inhibitorio sobre el crecimiento de *C. glabrata* silvestre y *trk1Δ* y si podía afectar de forma diferencial a las cepas que contienen el transportador *CgTrk1*. Además se utilizaron las cepas de *S. cerevisiae* EX33 y BY4741 como control positivo y negativo respectivamente. Todas las cepas utilizadas en el ensayo se dejaron crecer previamente tal y como se indica en material y métodos, y de todas ellas se realizó un césped sobre placas de YPD que contenían azul de metileno para teñir las células muertas y una solución tampón que favorece la actividad “killer”. Sobre cada césped se inocularon gotas de *D. hansenii* y las placas se incubaron a 26 °C durante 4 días.



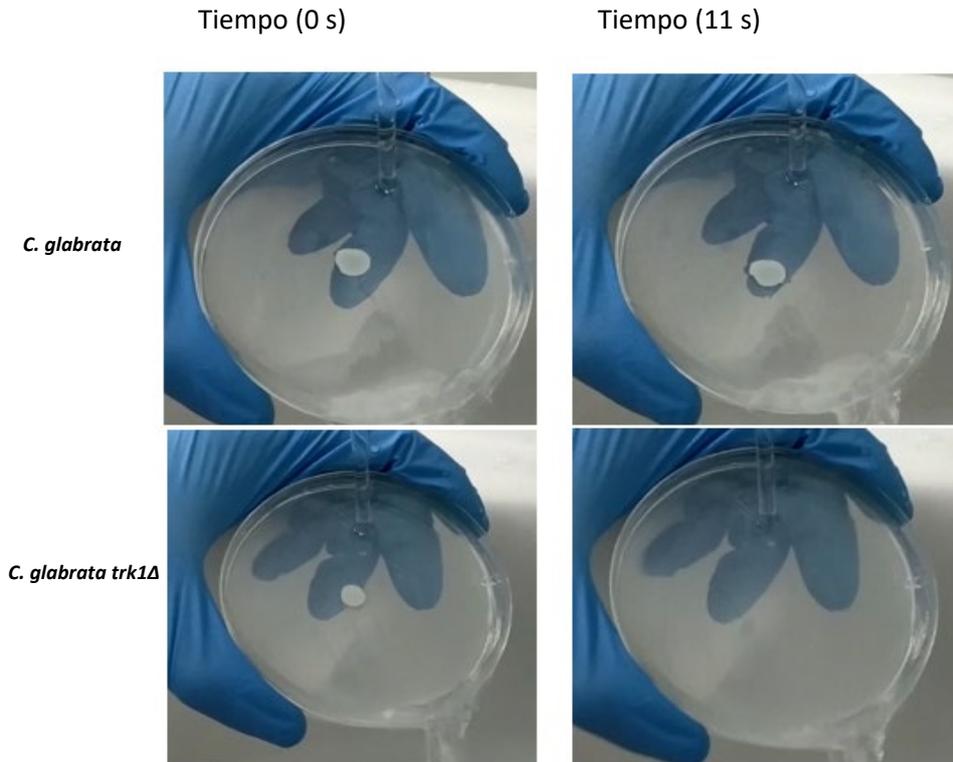
**Figura 28. Efecto inhibitorio de *D. hansenii* sobre *S. cerevisiae* EX33 (control positivo) y BY4741 (control negativo) (A), o sobre *C. glabrata* silvestre y *trk1Δ* (B).** Las células se cultivaron previamente tal y como se indica en material y métodos. Se obtuvieron suspensiones celulares de todas las cepas a estudiar que se ajustaron 1 ( $A_{600nm}$ ) y con las que se realizó un césped sobre placas de YPD que contenían azul de metileno, una solución tampón de fosfato potásico

monobásico y 100 mM de KCl. Los céspedes celulares se dejaron reposar durante 30 minutos, y se inocularon sobre ellos gotas de 10  $\mu$ l de *D. hansenii* 767. Las placas se incubaron a 26 °C durante 4 días. En el caso de células sensibles se observó la aparición de un color azul en las células del césped situadas bajo la gota y en el caso de células resistentes no se observó ninguna coloración en dicha zona. Los resultados mostrados son representativos y el experimento se repitió al menos tres veces.

El efecto killer de las toxinas procedentes de *D. hansenii* 767 se pudo observar claramente en el control positivo (*S. cerevisiae* EX33) ya que las células muertas del césped situadas bajo la gota se tiñeron de azul de metileno, hecho que se esperaba ya que se sabía que esta cepa era muy sensible a las toxinas “killer”. Del mismo modo se conocía la resistencia de la cepa de *S. cerevisiae* BY4741 a estas toxinas (Somers y Bevan 1969), hecho que se observó claramente al no teñirse sus células de azul de metileno (Fig. 28A). La cepa de *C. glabrata* silvestre fue más sensible que la cepa *trk1Δ* a estas toxinas, ya que se pudo observar como sus células se teñían de azul de metileno aunque en este caso la tinción parecía más tenue y no tan apreciable como en el control positivo. Sin embargo en la cepa *trk1Δ* no se observó ningún efecto killer ya que sus células no se tiñeron como las de la cepa silvestre de *C. glabrata* (Fig. 28B). Estos resultados indican que estas toxinas no solo pueden inhibir el crecimiento de *C. glabrata*, sino que podrían afectar más a las cepas que contienen el transportador *CgTrk1*.

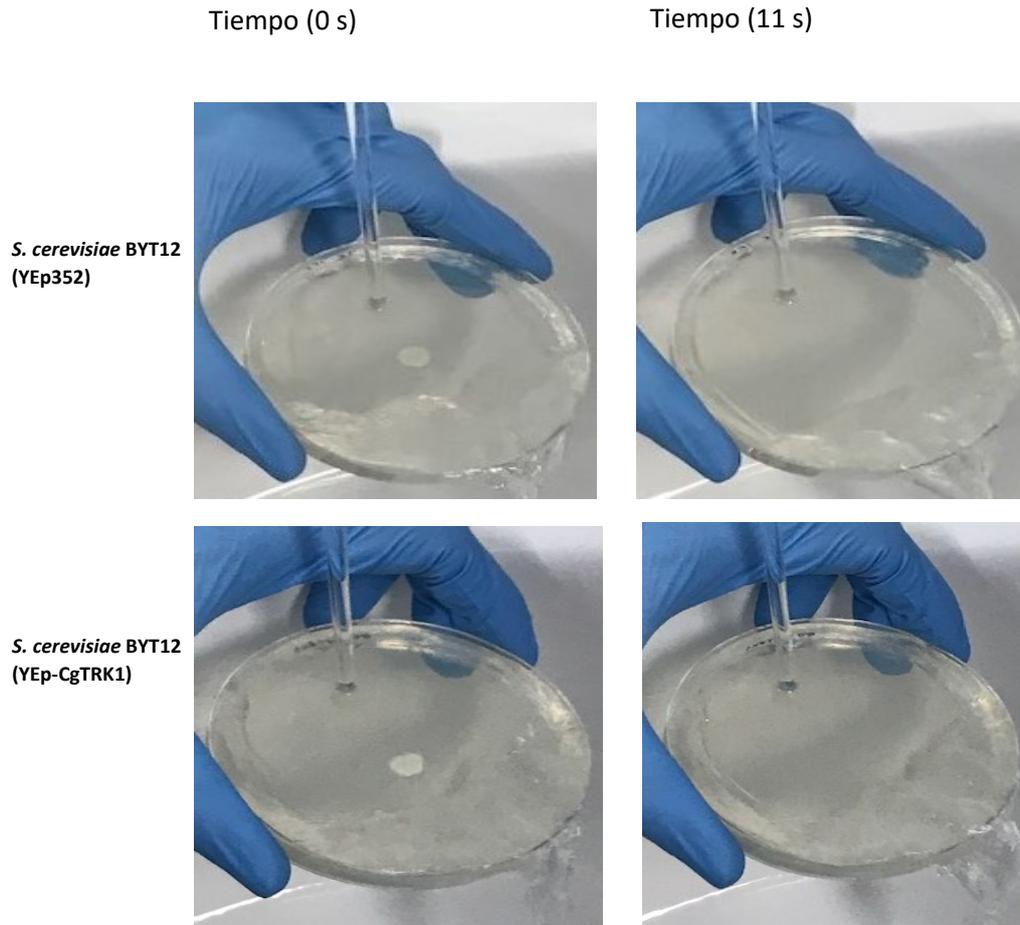
## 16. Adhesión

La adhesión es una cualidad que tienen algunas levaduras para invadir ciertas superficies y que va acompañada de la formación de estructuras y agrupaciones celulares que se adhieren y penetran a través del agar de un medio de cultivo o superficie en la que están creciendo cuando se encuentran en condiciones limitantes de nutrientes; además es un factor imprescindible para su virulencia (González *et al.* 2013). Se abordó la idea de que la proteína codificada por el gen *CgTRK1* además de funcionar como un transportador de potasio, también podría influir en la adhesión de *C. glabrata* a un medio de cultivo. Para ello se utilizaron las cepas de *C. glabrata* y *S. cerevisiae* que contenía o no el transportador *CgTrk1*. Se obtuvieron células normales en potasio que se inocularon en forma de gota (10  $\mu$ l) en placas de YNB con 100 mM de KCl y se incubaron durante 3 y 5 días a 28 °C. Se midió la resistencia al lavado de ambas cepas bajo el caudal de un grifo.



**Figura 29. Adhesión a la superficie de un medio de cultivo en *C. glabrata* silvestre y *trk1Δ*.** Se utilizaron células crecidas previamente tal y como se indica en material y métodos. Se obtuvo una suspensión celular que se ajustó a 1 ( $A_{600nm}$ ) y se inoculó con 10  $\mu$ l en placas de YNB completo con 100 mM de KCl. Las placas se incubaron durante 3 y 5 días en una estufa a 28 °C. Después de ese periodo se dispuso cada placa bajo el mismo caudal de un grifo (35 ml/s) y se contabilizó la resistencia al lavado de la colonia adherida a la placa. Los resultados mostrados son representativos y el experimento se repitió al menos tres veces.

Después de tres días de incubación, en las cepas de *C. glabrata* se observó una clara diferencia de adhesión entre la cepa silvestre y *trk1Δ*, ya que en general en las tres repeticiones del experimento la colonia de la cepa que contenía el transportador *CgTrk1* se mantuvo adherida durante más de 11 segundos bajo el caudal del grifo. Sin embargo en ninguna de las tres repeticiones la colonia de la cepa *trk1Δ* llegó a mantenerse adherida a la placa ni siquiera a los 11 segundos tras exponerse bajo el mismo caudal (Fig. 29). A los 5 días de incubación no se observaron diferencias de adhesión entre las dos cepas de *C. glabrata*.



**Figura 30. Adhesión a la superficie de un medio de cultivo en *S. cerevisiae* BYT12 (YEp352) y (YEp-CgTRK1).** Se utilizaron células crecidas previamente tal y como se indica en material y métodos. Se obtuvo una suspensión celular que se ajustó a 1 ( $A_{600nm}$ ) y se inoculó con 10  $\mu$ l en placas de YNB sin aminoácidos con los requerimientos auxotróficos de las cepas con 100 mM de KCl. Las placas se incubaron durante 3 y 5 días en una estufa a 28 °C. Después de ese periodo se dispuso cada placa bajo el mismo caudal de un grifo (35 ml/s) y se contabilizó la resistencia al lavado de la colonia adherida a la placa. Los resultados mostrados son representativos y el experimento se repitió al menos tres veces.

En el caso de las colonias de las cepas de *S. cerevisiae* que contienen o no el transportador *CgTrk1*, se desprendieron al mismo tiempo bajo el caudal del grifo tanto a los 3 días como a los 5 días, por lo que los resultados fueron completamente diferentes a los observados en las cepas de *C. glabrata* (Fig. 30). Los resultados indican que la proteína *CgTrk1* podría influir en la adhesión a un medio de cultivo en la levadura *C. glabrata* aunque no del mismo modo en otras especies de levaduras.

## **Discusión**





## DISCUSIÓN

*Candida glabrata* es una levadura haploide, que a pesar de su nombre se encuentra filogenéticamente más cercana a *Saccharomyces cerevisiae* que a *C. albicans*. Es un patógeno potencial oportunista que dependiendo de la zona geográfica puede ser la segunda (después de *C. albicans*) o tercera (después de *C. tropicalis* o *C. parapsilosis*) causa más común de candidiasis, y es frecuente en zonas como el norte de Europa, Asia o Estados Unidos (Silva *et al.* 2012, Kumar *et al.* 2019). En países como Estados Unidos, las infecciones relacionadas con la candidiasis son provocadas entre un 15 y un 20 % por *C. glabrata*. Además de la progresiva aparición de enfermedades relacionadas con especies de *Candida* diferentes a *C. albicans*, también se está incrementando la resistencia a diferentes antifúngicos en varias partes del mundo, como por ejemplo la aparición de cepas de *C. glabrata* resistentes a azoles en pacientes tratados con esta clase de antifúngicos (Whaley *et al.* 2017, Xin 2018). Nuestro interés en *C. glabrata* deriva de que es la primera levadura patógena con un único transportador de potasio en su membrana plasmática que se estudia. En este trabajo hemos procedido a una caracterización del papel de Trk1 en esta levadura, y para ello se han realizado ensayos relacionados con el transporte de potasio y rubidio, la expresión génica, la tolerancia a estrés salino, el volumen celular, la tolerancia a sustancias tóxicas, la sensibilidad a toxinas “killer” y la adhesión a la superficie de un medio de cultivo. Para hacer estos estudios seguimos generalmente dos aproximaciones, una con dos cepas de la levadura *C. glabrata* (silvestre y *trk1Δ*) y otra con dos cepas de *S. cerevisiae*: una cepa control carente de sus transportadores endógenos de potasio (BYT12 (YE<sub>p</sub>352)) y otra cepa en la que se expresa heterológicamente el gen *CgTRK1* (BYT12 (YE<sub>p</sub>-CgTRK1)).

### 1. Homeostasis de potasio y CgTrk1

Las diferentes especies de *Candida* varían en su capacidad de crecer en condiciones limitantes de potasio (Husekova *et al.* 2016, Llopis-Torregrosa *et al.* 2016), sin embargo en el caso de *C. glabrata*, se tiene poca información acerca de estos temas. La mayoría de las levaduras poseen varios transportadores de potasio en la membrana plasmática, sin embargo ya se ha visto en algunos estudios que existen levaduras como *Zygosaccharomyces rouxii* que tienen un único transportador de potasio en la membrana plasmática, además ya se ha realizado un estudio detallado del transporte de potasio en esta levadura (Zimmermannova *et al.* 2015). En el caso de *C. glabrata* solo existe un trabajo en el que se describen algunos aspectos relacionados con el transportador de potasio de la membrana plasmática de esta levadura (Llopis-Torregrosa *et al.* 2016). En nuestro trabajo se muestra que *CgTrk1* es un transportador de potasio y, por tanto, tiene una importante implicación en los procesos de homeostasis del catión. Todo esto ha sido estudiado por primera vez tanto en *C. glabrata* como en una cepa de *S. cerevisiae* que expresa heterológicamente *CgTRK1*.

Una característica importante del transportador *CgTrk1* es su capacidad de adaptación, ya que funciona bajo diferentes condiciones de crecimiento. En este trabajo se observaron importantes cambios en las características del transporte de potasio, que permitieron a las levaduras que contenían *CgTrk1* crecer en concentraciones micromolares de potasio. De hecho se ha visto en otros trabajos que la actividad de *Trk1* en el transporte de potasio varía entre células normales en potasio y células ayunadas de potasio y estas variaciones están relacionadas con los parámetros cinéticos de  $K_m$  y  $V_{max}$ . Un ejemplo lo tenemos en *S. cerevisiae*, levadura que posee dos transportadores de potasio en su membrana plasmática (*Trk1* y *Trk2*) (Navarrete *et al.* 2010) o en *Z. rouxii* que posee un único transportador de potasio en su membrana plasmática (Zimmermannova *et al.* 2015). En nuestro trabajo estos cambios en el transporte de potasio se produjeron tanto en la cepa silvestre de *C. glabrata* como en la cepa de *S. cerevisiae* con *CgTrk1*, de hecho en la cepa silvestre de *C. glabrata* durante el ayuno se observó que la  $V_{max}$  aumentó varios ordenes de magnitud y que la afinidad por el sustrato ( $K_m$ ) aumentó en comparación con los datos observados en células normales en potasio. Estas mejoras en la  $V_{max}$  y la  $K_m$  también se observaron en las células ayunadas de *S. cerevisiae* que contenía el transportador *CgTrk1*. Estos cambios no se observaron en las cepas de *C. glabrata* y *S. cerevisiae* que no contenían dicho transportador.

Las variaciones observadas en la  $V_{max}$  y la  $K_m$  tras el ayuno celular no están asociadas con una regulación transcripcional del gen que codifica el transportador *Trk1*. Aunque en *S. cerevisiae* se ha podido observar una menor expresión del gen *TRK1* en fase estacionaria (Gasch *et al.* 2000), no hay evidencias experimentales que indiquen que este gen se regula transcripcionalmente bajo condiciones de estrés de potasio, tal y como se ha podido observar en otras levaduras, como por ejemplo en *Hansenula polymorpha* (Cabrera *et al.* 2012) o en *Debaryomyces hansenii* (Prista *et al.* 2007). En nuestro trabajo, observamos que en *C. glabrata* condiciones como el ayuno celular, diferentes pHs o estrés salino no influyeron en la transcripción de *CgTRK1*. Probablemente estos cambios estén relacionados con regulaciones post-traduccionales de dicha proteína. Las regulaciones pos-traduccionales son la clave del control de muchas funciones fisiológicas en células eucariotas. Los canales y transportadores iónicos tiene un ancestro común (Zayats *et al.* 2015), y se ha descrito que estos pueden sufrir modificaciones post-traduccionales que pueden alterar su estructura cuando se le añade, entre otros grupos fosfato, acetilo o ubiquitina. Estos cambios pueden contribuir a su localización y cinética, como por ejemplo la N-acetilación, que puede modular la función de los canales iónicos (Shipston 2014).

Durante el trabajo realizado en esta Tesis con *S. cerevisiae*, el gen *CgTRK1* se expresó en un plásmido multicopia bajo el control de un promotor constitutivo débil. Tras el ayuno celular de potasio, y en relación con la capacidad de transporte del catión vía *CgTrk1*, observamos que la  $V_{max}$  fue mayor y la  $K_m$  también mejoró respecto a las condiciones no limitantes de potasio, aunque este hecho no implicaba un aumento en el número de copias de esta proteína. La variación en el contenido intracelular de potasio pudo ser el factor fundamental que influyó en la actividad de este transportador, tal y como se ha

podido demostrar en trabajos anteriores (Ramos y Rodríguez Navarro 1986, Ramos *et al.* 1994), en los que se ha visto que las células tratadas con azida sódica disminuían su contenido intracelular de potasio y la  $V_{\max}$  de transporte se incrementaba en pocos minutos. Esto sugirió que el contenido intracelular de potasio podría regular la actividad de los transportadores e influir en la  $V_{\max}$ .

En nuestro trabajo hemos observado que la cepa de *C. glabrata trk1Δ* no creció en concentraciones bajas de potasio, aunque si lo hizo en concentraciones altas de este catión. Esto indicó que podrían existir otros transportadores no específicos de potasio que median el transporte de este catión en ausencia de Trk1, hecho que ya se ha visto previamente en otras levaduras como *S. cerevisiae* (Madrid *et al.* 1998), *S. pombe* (Calero *et al.* 2004) y en *Z. rouxii* (Zimmermannova *et al.* 2015). De hecho, una información novedosa es que *C. glabrata trk1Δ* mostró una afinidad por el potasio más alta en condiciones no limitantes de potasio que en células ayunadas de potasio, ya que en los datos cinéticos se observó que la  $K_m$  se incrementó cinco veces en células ayunadas de potasio. El hecho de que una levadura sin sus transportadores de potasio reduzca su afinidad por el sustrato tras el ayuno, es algo que no se ha observado antes en ningún otro estudio.

## 2. Otros fenotipos relacionados con CgTrk1

En nuestro trabajo hemos estudiado y caracterizado a CgTrk1 como transportador de potasio tanto en *C. glabrata*, como tras su expresión heteróloga en *S. cerevisiae*. Sin embargo, los transportadores del tipo Trk se han ido asociando a otros fenotipos en varios estudios (Calero *et al.* 2000, Střibný *et al.* 2012). En una cepa de *S. cerevisiae* (*S. cerevisiae* K12) se describió una resistencia a altas concentraciones de amonio, y relacionaron dicha resistencia con una mutación en un alelo del gen *TRK1* de esta cepa (Reisser *et al.* 2013). Otros fenotipos, relacionados con el potencial de membrana o el pH intracelular se han observado en varias especies de levaduras (Bañuelos *et al.* 2000). El concepto de potencial de membrana se refiere habitualmente a la diferencia de cargas existente entre el interior y el exterior de la célula, existiendo una mayor cantidad de cargas negativas en el interior de las células respecto al exterior. Cuando la membrana celular se despolariza, la diferencia de cargas disminuye, sin embargo cuando la membrana se hiperpolariza, la diferencia de cargas aumenta. En *S. cerevisiae* se observó que la ausencia de los transportadores Trk1 y Trk2 hiperpolarizó la membrana de las células y disminuyó el pH intracelular (Navarrete *et al.* 2010). En *Z. rouxii* se caracterizó la función del gen *ZrTRK1*, y su contribución en varios parámetros fisiológicos, expresándose heterológamente en *S. cerevisiae trk1Δtrk2Δ*. Con la presencia del transportador *ZrTrk1*, la membrana de las células de esta cepa no se hiperpolarizó y el pH intracelular aumentó (Zimmermannova *et al.* 2015). En el caso concreto de *C. glabrata*, también se ha observado que la ausencia del transportador afecta al potencial de membrana y al pH intracelular. En efecto, la ausencia de este transportador en *C. glabrata* afectó al potencial de membrana, hiperpolarizando la membrana de las células y disminuyendo el pH intracelular (Llopis-Torregrosa *et al.*

2016). Más recientemente el mismo grupo de investigación profundizó aún más en el estudio de los fenotipos relacionados con el pH intracelular y el potencial de membrana, confirmando que en una cepa *S. cerevisiae* carente de sus transportadores de potasio que contiene el transportador *CgTrk1*, la hiperpolarización de la membrana celular se redujo y el pH intracelular aumentó, asemejando estos datos a los observados en la cepa silvestre de *S. cerevisiae*. Además esta disminución de la hiperpolarización de la membrana celular se asoció con un aumento en la tolerancia a compuestos tóxicos catiónicos, hecho que confirmaron con la Higromicina B y el tetrametilamonio (Caro *et al.* 2019).

En este sentido en la segunda parte de esta tesis se han estudiado otros fenotipos relacionados con el transportador *CgTrk1*. La tolerancia al estrés salino fue uno de ellos. El hecho de que los Trk influyen en la tolerancia a sal fue primero descrito en *S. cerevisiae*, en el trabajo de Gomez *et al.* (1996). En ese trabajo ya se muestra que la cepa de *S. cerevisiae* con *Trk1* absorbe más potasio y menos sodio que los correspondientes mutantes, ya que gracias a la acción de este transportador, esta cepa tenía la capacidad de discriminar entre el potasio y el sodio. Esta idea se confirmó posteriormente con *S. pombe* (Calero *et al.* 2000), demostrándose que las cepas mutantes *trk1trk2* eran más sensibles a sal, o en trabajos más recientes como el de Zimmermannova *et al.* (2015) con una cepa de *Z. rouxii* carente de sus transportadores de potasio. Incluso en *C. glabrata* en el trabajo de Llopis-Torregrosa *et al.* (2016), la ausencia de *CgTrk1* en esta levadura afectó a su resistencia al estrés salino, haciéndola más sensible a LiCl o NaCl, aunque este hecho solo lo vieron en placas y no lo estudiaron en detalle. Por otra parte también es conocido que la expresión heteróloga en *S. cerevisiae* de los transportadores *Trk1* de todas estas levaduras mejora la tolerancia a sal, como ya se ha visto en otros trabajos como el de Prista *et al.* (2007) en el que la expresión heteróloga de los genes de *D. hansenii* (*DhTRK1* y *DhHAK1*) en *S. cerevisiae* confirió a esta levadura menos sensibilidad al sodio o el de Zimmermannova *et al.* (2015) donde la expresión heteróloga del gen de *Z. rouxii* (*ZrTRK1*) en *S. cerevisiae* confirió a esta levadura una alta tolerancia a litio. En esta tesis se confirmaron estas ideas y además el estudio del fenotipo de tolerancia a sal se abordó con más detalle. Se analizó el crecimiento en medio líquido en LiCl o NaCl, el contenido de litio o sodio en células que crecen en presencia de dichos cationes con o sin KCl y el transporte de litio en presencia o en ausencia de KCl en células ayunadas de potasio. Los resultados del crecimiento en medio líquido indicaron que las cepas de *C. glabrata* y *S. cerevisiae* que contenían *CgTrk1* crecieron mejor en LiCl o NaCl que las cepas correspondientes que no contenían este transportador. Del mismo modo en relación al contenido intracelular, las cepas que contenían *CgTrk1* acumularon más potasio y menos sodio que las cepas correspondientes que no contenían dicho transportador cuando crecieron en 0,2 M de NaCl. Además también se demostró que la adición de potasio apenas influyó en la acumulación de litio en células carentes de *CgTrk1* ya que no se redujo la entrada de LiCl en presencia de potasio, mientras que en células que contenían *CgTrk1*, la presencia de potasio disminuyó de forma eficiente el transporte de este catión.

En *S. cerevisiae* la actividad de Trk1 se ha asociado a la regulación del volumen celular (Navarrete *et al.* 2010), ya que se observó que existían diferencias en este parámetro entre una cepa silvestre y una cepa *trk1Δtrk2Δ*. Estas diferencias se apreciaron en células ayunadas de potasio, donde la disminución del volumen celular fue más significativa en la cepa silvestre. Otros trabajos constataron que el transporte de potasio en *S. cerevisiae* por el transportador Nha1 es necesario para la regulación del volumen celular y se ha propuesto que Nha1 y Trk1 podrían actuar conjuntamente para esta función (Ariño *et al.* 2010, Ariño *et al.* 2019). En nuestro caso, no hemos observado cambios en el volumen celular dependientes de CgTrk1 en *C. glabrata* entre células normales en potasio y células ayunadas de potasio. Sin embargo trabajando con *S. cerevisiae* expresando o no el transportador CgTrk1, hemos observado que en concentraciones bajas de potasio la cepa silvestre y la cepa que contiene CgTrk1 de *S. cerevisiae* aumentaron su contenido intracelular de potasio y su volumen celular ya que pudieron tomar este catión del medio, hecho que no sucedió en la cepa que no contenía CgTrk1, que no pudo tomar potasio en este rango de concentraciones y como consecuencia su contenido intracelular de potasio continuó disminuyendo y su volumen celular no se incrementó. Por otra parte todas las cepas de *S. cerevisiae* del estudio pudieron aumentar su contenido intracelular de potasio y su volumen celular cuando se añadió una alta concentración de potasio al medio de cultivo. En definitiva, las cepas aumentaron su volumen celular porque tomaron potasio del medio y a concentraciones bajas del catión solo aquellas capaces de transportarlo modificaron su volumen.

En este trabajo se ha abordado otro fenotipo relacionado con la tolerancia a diferentes sustancias tóxicas, que inhiben algún componente de la cadena de transporte electrónico mitocondrial. Estos compuestos eran la azida sódica, el fluoruro de sodio y el antibiótico Antimicina A, cuyo efecto se analizó sobre *C. glabrata* silvestre y *trk1Δ*. La azida sódica y la Antimicina A inhibieron más el crecimiento de la cepa silvestre que el de la cepa *trk1Δ*, sin embargo estos resultados no se observaron con el fluoruro de sodio, ya que no hubo diferencias de sensibilidad a este compuesto entre las dos cepas. Además cuando se estudió este efecto, se quiso realizar otra aproximación en *S. cerevisiae* con y sin el transportador CgTrk1, y pudimos observar que con la azida sódica los resultados fueron muy similares a los observados en *C. glabrata*, como pudimos observar en la cepa que contenía CgTrk1, que fue más sensible a esta sustancia que la cepa que no contenía este transportador. Este hecho no se observó con la Antimicina A, ya que no hubo diferencias de sensibilidad a este compuesto entre las dos cepas de *S. cerevisiae*, y esto indicó que la Antimicina A no produce el mismo efecto en otras especies de levaduras. Es importante decir que este fenotipo no se ha observado en otras levaduras y que sería un tema interesante a desarrollar con más profundidad con objetivo final de la posible obtención de nuevos tratamientos frente a levaduras patógenas.

Las toxinas “killer” son proteasas que inhiben el crecimiento de otros microorganismos, y se han aislado de diferentes especies de levadura (Morales-Menchén *et al.* 2018). Se han identificado varias toxinas con diferentes mecanismos de acción como por ejemplo la toxina K1 de *S. cerevisiae* (Breinig *et al.* 2002) o la toxina PMKT de *Pichia*

*membranifaciens* (Santos y Marquina 2004) que inducen la formación de poros de membrana o la toxina K28 de *S. cerevisiae* que interrumpe el ciclo celular en su fase temprana (Schmitt *et al.* 1996). En el trabajo de Banjara *et al.* (2016) se utilizaron varias cepas de *Debaryomyces hansenii* para analizar el efecto “killer” de sus toxinas frente a *C. albicans*, y se observó que algunas de ellas inhibieron el crecimiento de este patógeno. Debido al interés de estos resultados, en un estudio más reciente (Morales-Menchén *et al.* 2018) se analizó con más detalle qué factores estaban implicados en la resistencia o sensibilidad a estas toxinas, y se analizó el efecto killer de las toxinas de siete de estas cepas de *D. hansenii* sobre cepas de *C. albicans* silvestres o carentes de factores de transcripción como Hog1. Este factor de transcripción se activa en respuestas al estrés celular y está implicado en otras funciones como la formación de la pared celular, la virulencia, la tolerancia a los fagocitos o la adaptación al comensalismo (Alonso-Monge *et al.* 1999). Las cepas carentes de Hog1 fueron más sensibles a estas toxinas, y este resultado sugirió que este factor de transcripción era esencial en la resistencia al efecto killer. En nuestro trabajo hemos utilizado una cepa de *D. hansenii* (*D. hansenii* 767) para analizar si ejerce algún tipo de efecto tóxico sobre *C. glabrata*, algo que no se ha estudiado anteriormente. En estos ensayos al estudiar el efecto tóxico que ejerce *D. hansenii* sobre la cepa silvestre y la cepa *trk1Δ* pudimos observar dos efectos: *D. hansenii* inhibió el crecimiento de la levadura *C. glabrata*, y además este efecto tóxico se observó en la cepa silvestre de *C. glabrata* después de 4 días de incubación y no se observó en la cepa *trk1Δ*. Este hecho indicó que *D. hansenii* ejerce un efecto tóxico que afecta más al crecimiento de la cepa de *C. glabrata* que contiene el transportador Trk1, y se supone que dicho efecto está relacionado con sus toxinas “killers”.

Hasta ahora se ha estudiado el papel del transportador Trk1 de *C. glabrata* en la homeostasis de potasio, sin embargo existen otros fenotipos que están relacionados con la virulencia de esta levadura y que se han asociado a este transportador, como por ejemplo la adhesión. En este trabajo se ha estudiado el posible papel de Trk1 en la adhesión de *C. glabrata* a un medio de cultivo sólido. Se realizaron ensayos con *C. glabrata* silvestre y *trk1Δ* en los que se midió el tiempo en el que permanecieron adheridas ambas cepas a un medio de cultivo sólido bajo el mismo caudal de un grifo. Observamos que la cepa silvestre se mantuvo más tiempo adherida al medio de cultivo que la cepa *trk1Δ*. Se realizó otra aproximación en *S. cerevisiae* con y sin el transportador CgTrk1, y observamos en este caso que los resultados fueron diferentes ya que las dos cepas de *S. cerevisiae* se desprendieron del medio de cultivo al mismo tiempo. Esto nos indicó que CgTrk1 podría influir en la adhesión de *C. glabrata* a un medio de cultivo, aunque no del mismo modo en otras especies de levaduras. Una posible relación entre Trk1 y la adhesión ha sido publicada (González *et al.* 2013), aunque en este caso en sentido contrario a lo observado en esta tesis. En dicho trabajo se estudió el crecimiento invasivo de *S. cerevisiae*, a través del cual esta levadura se adhiere al agar de un medio de cultivo. Este fenotipo se relacionó con la disponibilidad de potasio, la activación o represión de varios genes o factores de transcripción y la ausencia o presencia de los transportadores Trk1 y Trk2 de esta levadura. Los resultados de este trabajo indicaron

que la falta de potasio y la ausencia de los transportadores Trk1 y Trk2 favorecían la invasividad de esta levadura a un medio de cultivo, ya que en algunos de estos resultados se observó que la cepa *trk1trk2Δ* de *S. cerevisiae* se mantuvo más adherida a un medio de cultivo que la cepa silvestre de esta levadura después de que ambas cepas se lavaran bajo el caudal de un grifo. Además y durante el periodo en el que se ha realizado esta tesis, se ha publicado un trabajo en el que se analiza el tema en *C. glabrata* (Llopis-Torregrosa *et al.* 2019), y en el que se analizó la adhesión de *C. glabrata* silvestre y *trk1Δ* a una superficie de poliestireno. Los resultados mostraron que la cepa *trk1Δ* se adhería mejor a esta superficie que la cepa silvestre de *C. glabrata*. Aunque estos experimentos y los nuestros están hechos en diferentes superficies (superficie hidrófoba en el trabajo de Llopis-Torregrosa y adherencia a un medio de cultivo sólido en nuestro trabajo), confirman que *CgTrk1* tienen un papel importante en la adherencia de *C. glabrata* a una superficie determinada.

En resumen, en esta tesis hemos realizado un estudio sobre el único transportador de membrana de potasio de la levadura *C. glabrata* (*CgTrk1*), un patógeno que cada vez es más frecuente encontrar en casos clínicos. Se ha abordado en profundidad la importancia de este transportador en varios parámetros fisiológicos como la homeostasis y el transporte de potasio o su influencia en otros fenotipos como la tolerancia al estrés salino o el volumen celular. Además se han encontrado nuevos fenotipos que podrían estar relacionados con este transportador, ya que se ha visto que la cepa silvestre de *C. glabrata* es más sensible a algunos inhibidores de la cadena respiratoria, o a toxinas killer procedentes de otras levaduras o que en la cepa *trk1Δ* se ha alterado su capacidad de adhesión a un medio de cultivo. Todo ello indica que *CgTrk1*, además de funcionar como un transportador de potasio, es importante en diversas funciones fisiológicas de *C. glabrata*, y hace concebible imaginar que podría ser una diana para el desarrollo de nuevos tratamientos con antifúngicos, algo que sería muy interesante en el campo de la sanidad puesto que transportadores homólogos a los Trk no están presentes en los seres humanos.

## **Conclusiones**





## CONCLUSIONES

1-La proteína codificada por el gen *CgTRK1* funciona como un transportador de potasio. Los resultados obtenidos en los ensayos de crecimiento con diferentes concentraciones de potasio, absorción del catión y transporte de rubidio confirman este hecho.

2-*CgTrk1*, además de funcionar como un transportador de potasio, también se ha asociado a la presencia de otros fenotipos como la tolerancia al estrés salino, la regulación del volumen celular, la tolerancia a diferentes sustancias tóxicas, la sensibilidad a las toxinas 'killer' o la adhesión a un medio de cultivo sólido.

3-El transportador *CgTrk1* podría ser una futura diana para el desarrollo de nuevos tratamientos con antifúngicos, ya que se ha observado que algunos compuestos como la azida sódica o la Antimicina A afectan diferencialmente a las cepas silvestre y carente del gen correspondiente.

## **Referencias**





## REFERENCIAS

- Akins, R. A. 2005. An update on antifungal targets and mechanisms of resistance in *Candida albicans*. *Medical Mycology*, **43**:285-318.
- Alcazar-Fuoli, L., Mellado, E. 2014. Current status of antifungal resistance and its impact on clinical practice. *British Journal of Haematology*, **166**:471-484.
- Almeida, P., Katschnig, D., De Boer, A. H. 2013. HKT transporters—state of the art. *International Journal of Molecular Sciences*, **14**:20359-20385.
- Alonso-Monge, R., Navarro-Garcia, F., Molero, G., Diez-Orejas, R., Gustin, M. *et al.* 1999. Role of the mitogen-activated protein kinase Hog1p in morphogenesis and virulence of *Candida albicans*. *Journal of Bacteriology*, **181**:3058-3068.
- Alves, R., Kastora, S. L., Gomes-Gonçalves, A., Azevedo, N., Rodrigues, C. F. *et al.* 2020. Transcriptional responses of *Candida glabrata* biofilm cells to fluconazole are modulated by the carbon source. *npj Biofilms and Microbiomes*, **6**:1-11.
- Anderson, J. A., Best, L. A., Gaber, R. F. 1991. Structural and functional conservation between the high-affinity K<sup>+</sup> transporters of *Saccharomyces uvarum* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Gene*, **99**:39-46.
- Arendrup, M. C., Patterson, T. F. 2017. Multidrug-resistant *Candida*: epidemiology, molecular mechanisms, and treatment. *The Journal of Infectious Diseases*, **216**:445-451.
- Ariño, J., Ramos, J., Sychrová, H. 2010. Alkali metal cation transport and homeostasis in yeasts. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, **74**:95–120.
- Ariño, J., Aydar, E., Drulhe, S., Ganser, D., Jorrín, J. *et al.* 2014. Systems biology of monovalent cation homeostasis in yeast: the translucent contribution. In Poole, R. K. (Eds). *Advances in Microbial Physiology. Advances in Microbial Systems Biology* (pp. 1-63). Barcelona: Academic Press.
- Ariño, J., Ramos, J., Sychrova, H. 2019. Monovalent cation transporters at the plasma membrane in yeasts. *Yeast*, **36**:177-193.
- Bader, O., Schwarz, A., Kraneveld, E. A., Tangwattanchuleeporn, M., Schmidt, P. *et al.* 2012. Gross karyotypic and phenotypic alterations among different progenies of the *Candida glabrata* CBS138/ATCC2001 reference strain. *PLoS One*, **7**:e52218.
- Bandara, H. M. H. N., Lam, O. L. T., Watt, R. M., Jin, L. J., Samaranyake, L. P. 2010. Bacterial lipopolysaccharides variably modulate in vitro biofilm formation of *Candida* species. *Journal of Medical Microbiology*, **59**:1225-1234.
- Banjara, N., Nickerson, K. W., Suhr, M. J., Hallen-Adams, H. E. 2016. Killer toxin from several food-derived *Debaryomyces hansenii* strains effective against pathogenic *Candida* yeasts. *International Journal of Food Microbiology*, **222**:23-29.
- Bañuelos, M. A., Klein, R. D., Alexander-Bowman, S. J., Rodríguez-Navarro, A. 1995. A potassium transporter of the yeast *Schwanniomyces occidentalis* homologous to the Kup

system of *Escherichia coli* has a high concentrative capacity. The EMBO Journal, **14**:3021-3027.

Bañuelos, M. A., Madrid, R., Rodríguez-Navarro, A. 2000. Individual functions of the Hak and Trk potassium transporters of *Schwanniomyces occidentalis*. Molecular Microbiology, **37**:671-679.

Benito, B., Garciadeblás, B., Schreier, P., Rodríguez-Navarro, A. 2004. Novel P-type ATPases mediate high-affinity potassium or sodium uptake in fungi. Eukaryotic Cell, **3**:359-368.

Berila, N., Hyroššová, P., Šubík, J. 2011. Oxidative stress response and virulence factors in *Candida glabrata* clinical isolates. Folia Microbiologica, **56**:116-121.

Blanco Santos, A. 2019. Homeostasis del potasio. Nefrología, **1**:10-20.

Bogdan, A. R., Miyazawa, M., Hashimoto, K., Tsuji, Y. 2016. Regulators of iron homeostasis: new players in metabolism, cell death, and disease. Trends in Biochemical Sciences, **41**:274-286.

Bolotin-Fukuhara, M., Fairhead, C. 2014. *Candida glabrata*: a deadly companion?. Yeast, **31**:279-288.

Bostian, K. A., Hopper, J. E., Rogers, D. T., Tipper, D. J. 1980. Translational analysis of the killer-associated virus-like particle dsRNA genome of *S. cerevisiae*: M dsRNA encodes toxin. Cell, **19**:403-414.

Breinig, F., Tipper, D. J., Schmitt, M. J. 2002. Kre1p, the plasma membrane receptor for the yeast K1 viral toxin. Cell, **108**:395-405.

Brown, A. J., Brown, G. D., Netea, M. G., Gow, N. A. 2014. Metabolism impacts upon *Candida* immunogenicity and pathogenicity at multiple levels. Trends in Microbiology, **22**:614-622.

Brunke, S., Hube, B. 2013. Two unlike cousins: *Candida albicans* and *C. glabrata* infection strategies. Cellular Microbiology, **15**:701-708.

Buzzini, P., Corazzi, L., Turchetti, B., Buratta, M., Martini, A. 2004. Characterization of the *in vitro* antimycotic activity of a novel killer protein from *Williopsis saturnus* DBVPG 4561 against emerging pathogenic yeasts. FEMS Microbiology Letters, **238**:359-365.

Cabrera, E., Álvarez, M. C., Martín, Y., Siverio, J. M., Ramos, J. 2012. K<sup>+</sup> uptake systems in the yeast *Hansenula polymorpha*. Transcriptional and post-translational mechanisms involved in high-affinity K<sup>+</sup> transporter regulation. Fungal Genetics and Biology, **49**:755-763.

Cagnac, O., Leterrier, M., Yeager, M., Blumwald, E. 2007. Identification and characterization of Vnx1p, a novel type of vacuolar monovalent cation/H<sup>+</sup> antiporter of *Saccharomyces cerevisiae*. Journal of Biological Chemistry, **282**:24284-24293.

- Calero, F., Gómez, N., Ariño, J., Ramos, J. 2000. Trk1 and Trk2 define the major K<sup>+</sup> transport system in fission yeast. *Journal of Bacteriology*, **182**:394-399.
- Calero, F., Montiel, V., Caracuel, Z., Cabello-Hurtado, F., Ramos, J. 2004. On the role of Trk1 and Trk2 in *Schizosaccharomyces pombe* under different ion stress conditions. *FEMS yeast research*, **4**:619-624.
- Cann, C. 1992. Candidiasis (moniliasis, thrush, *Candida paronychia*, *Candida endocarditis*, bronchomycosis, mycotic vulvovaginitis candidosis). In Kwon-Chung, K. J., Bennett, J. E. (Eds). *Medical Mycology* (pp. 280-336). Philadelphia, London: Lea and Febiger.
- Cannon, R. D., Lamping, E., Holmes, A. R., Niimi, K., Tanabe, K. *et al.* 2007. *Candida albicans* drug resistance—another way to cope with stress. *Microbiology*, **153**:3211-3217.
- Caro, G., Bieber, J., Ruiz-Castilla, F. J., Michán, C., Sychrova, H. 2019. Trk1, the sole potassium-specific transporter in *Candida glabrata*, contributes to the proper functioning of various cell processes. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, **35**:124.
- Casadevall, A., Fang, F. C., Pirofski, L. A. 2011. Microbial virulence as an emergent property: consequences and opportunities. *PLoS Pathogens*, **7**:e1002136.
- Chaustova, L., Miliukienė, V., Zimkus, A. 2010. Cell de-energization prevents plasmid transformation of yeast *Saccharomyces cerevisiae*: evidence for the requirement of ATP. *Open Life Sciences*, **5**:78-82.
- Chen, G., Hu, Q., Luo, L. E., Yang, T., Zhang, S. *et al.* 2015. Rice potassium transporter *OsHak1* is essential for maintaining potassium-mediated growth and functions in salt tolerance over low and high potassium concentration ranges. *Plant, Cell and Environment*, **38**:2747-2765.
- Chew, S. Y., Chee, W. J. Y., Than, L. T. L. 2019. The glyoxylate cycle and alternative carbon metabolism as metabolic adaptation strategies of *Candida glabrata*: perspectives from *Candida albicans* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Biomedical Science*, **26**:52.
- Cunha, D. V., Salazar, S. B., Lopes, M. M., Mira, N. P. 2017. Mechanistic insights underlying tolerance to acetic acid stress in vaginal *Candida glabrata* clinical isolates. *Frontiers in Microbiology*, **8**:259.
- Denardi, L. B., Keller, J. T., Oliveira, V., Mario, D. A. N., Santurio, J. M. *et al.* 2017. Activity of combined antifungal agents against multidrug-resistant *Candida glabrata* strains. *Mycopathologia*, **182**:819-828.
- Diekema, D., Arbefeville, S., Boyken, L., Kroeger, J., Pfaller, M. 2012. The changing epidemiology of healthcare-associated candidemia over three decades. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, **73**:45-48.

- Dujon, B., Sherman, D., Fischer, G., Durrens, P., Casaregola, S. *et al.* 2004. Genome evolution in yeasts. *Nature*, **430**:35.
- Durell, S. R., Guy, H. R. 1999. Structural models of the KtrB, TrkH, and Trk1, 2 symporters based on the structure of the KcsA K<sup>+</sup> channel. *Biophysical Journal*, **77**:789-807.
- Ellis, D. 2002. Amphotericin B: spectrum and resistance. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, **49**:7-10.
- Esher, S. K., Ost, K. S., Kohlbrenner, M. A., Pianalto, K. M., Telzrow, C. L. *et al.* 2018. Defects in intracellular trafficking of fungal cell wall synthases lead to aberrant host immune recognition. *PLoS Pathogens*, **14**:e1007126.
- Farahyar, S., Zaini, F., Kordbacheh, P., Rezaie, S., Falahati, M *et al.* 2016. Expression of efflux pumps and fatty acid activator one genes in azole resistant *Candida glabrata* isolated from immunocompromised patients. *Acta Medica Iraní*, **54**:458-464.
- Fidel, P. L., Vazquez, J. A., Sobel, J. D. 1999. *Candida glabrata*: review of epidemiology, pathogenesis, and clinical disease with comparison to *C. albicans*. *Clinical Microbiology Reviews*, **12**:80-96.
- Flis, K., Hinzpeter, A., Edelman, A., Kurlandzka, A. 2005. The functioning of mammalian CIC-2 chloride channel in *Saccharomyces cerevisiae* cells requires an increased level of Kha1p. *Biochemical Journal*, **390**:655-664.
- Fu, H. H., Luan, S. 1998. AtKup1: a dual-affinity K<sup>+</sup> transporter from Arabidopsis. *The Plant Cell*, **10**:63-73.
- Gabaldón, T., Martin, T., Marcet-Houben, M., Durrens, P., Bolotin-Fukuhara, M. *et al.* 2013. Comparative genomics of emerging pathogens in the *Candida glabrata* clade. *BMC Genomics*, **14**:623.
- Gabaldón, T., Carreté, L. 2015. The birth of a deadly yeast: tracing the evolutionary emergence of virulence traits in *Candida glabrata*. *FEMS Yeast Research*, **16**:fov110.
- Gaber, R. F., Styles, C. A., Fink, G. R. 1988. *TRK1* encodes a plasma membrane protein required for high-affinity potassium transport in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular and Cellular Biology*, **8**:2848-2859.
- Galocha, M., Pais, P., Cavalheiro, M., Pereira, D., Viana, R. *et al.* 2019. Divergent approaches to virulence in *C. albicans* and *C. glabrata*: two sides of the same coin. *International Journal of Molecular Sciences*, **20**:2345.
- Garrett, R. H., Grisham, C. M. 2001. Principles of biochemistry: with a human focus. In Harcourt College Publishers (Eds). (pp. 893). Virginia: Brooks/Cole.
- Gasch, A. P., Spellman, P. T., Kao, C. M., Carmel-Harel, O., Eisen, M. B. 2000. Genomic expression programs in the response of yeast cells to environmental changes. *Molecular Biology of the Cell*, **11**:4241-4257.

- Gelis, S., Curto, M., Valledor, L., González, A., Ariño, J. *et al.* 2012. Adaptation to potassium starvation of wild-type and K<sup>+</sup>-transport mutant (trk1, 2) of *Saccharomyces cerevisiae*: 2-dimensional gel electrophoresis-based proteomic approach. *Microbiologyopen*, **1**:182-193.
- Gómez, M. J., Luyten, K., Ramos, J. 1996. The capacity to transport potassium influences sodium tolerance in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiology Letters*, **135**:157-160.
- González, A., Casado, C., Petrežsélyová, S., Ruiz, A., Ariño, J. 2013. Molecular analysis of a conditional hal3 vhs3 yeast mutant links potassium homeostasis with flocculation and invasiveness. *Fungal Genetics and Biology*, **53**:1-9.
- Grimley, P. M., Wright Jr, L. D., Jennings, A. E. 1965. *Torulopsis glabrata* infection in man. *American Journal of Clinical Pathology*, **43**:216-223.
- Haro, R., Sainz, L., Rubio, F., Rodríguez-Navarro, A. 1999. Cloning of two genes encoding potassium transporters in *Neurospora crassa* and expression of the corresponding cDNAs in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular Microbiology*, **31**:511-520.
- Haro, R., Rodríguez-Navarro, A. 2003. Functional analysis of the M2D helix of the Trk1 potassium transporter of *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, **1613**:1-6.
- Healey, K. R., Perlin, D. S. 2018. Fungal resistance to echinocandins and the MDR phenomenon in *Candida glabrata*. *Journal of Fungi*, **4**:105.
- Hušeková, B., Elicharová, H., Sychrová, H. 2016. Pathogenic *Candida* species differ in the ability to grow at limiting potassium concentrations. *Canadian Journal of Microbiology*, **62**:394-401.
- Iraqui, I., Garcia-Sanchez, S., Aubert, S., Dromer, F., Ghigo, J. M. *et al.* 2005. The Yak1p kinase controls expression of adhesins and biofilm formation in *Candida glabrata* in a Sir4p-dependent pathway. *Molecular Microbiology*, **55**:1259-1271.
- Kale, D., Spurny, P., Shamayeva, K., Spurna, K., Kahoun, D. *et al.* 2019. The *S. cerevisiae* cation translocation protein Trk1 is functional without its “long hydrophilic loop” but LHL regulates cation translocation activity and selectivity. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, **1861**:1476-1488.
- Kasper, L., Seider, K., Hube, B. 2015. Intracellular survival of *Candida glabrata* in macrophages: immune evasion and persistence. *FEMS Yeast Research*, **15**:fov042.
- Kaur, R., Domergue, R., Zupancic, M. L., Cormack, B. P. 2005. A yeast by any other name: *Candida glabrata* and its interaction with the host. *Current Opinion in Microbiology*, **8**:378-384.
- Kinclova-Zimmermannova, O., Flegelova, H., Sychrova, H. 2004. Rice Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup>-antiporter Nhx1 partially complements the alkali-metal-cation sensitivity of yeast strains lacking three sodium transporters. *Folia Microbiologica*, **49**:519-525.

- Kumar, K., Askari, F., Sahu, M. S., Kaur, R. 2019. *Candida glabrata*: A lot more than meets the eye. *Microorganisms*, **7**:39.
- LaFleur, M. D., Kumamoto, C. A., Lewis, K. 2006. *Candida albicans* biofilms produce antifungal-tolerant persister cells. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **50**:3839-3846.
- Larone, D. H. 2002. Introduction to fundamental mycology. In Larone, D. H. (Eds). *Medically Important Fungi: a Guide to Identification Fourth Edition* (pp. 3-30). Washington DC: ASM Press.
- Lichtenberg-Fraté, H., Reid, J. D., Heyer, M., Höfer, M. 1996. The *SpTRK* gene encodes a potassium-specific transport protein Tkhp in *Schizosaccharomyces pombe*. *The Journal of Membrane Biology*, **152**:169-181.
- Llopis-Torregrosa, V., Hušeková, B., Sychrová, H. 2016. Potassium uptake mediated by Trk1 is crucial for *Candida glabrata* growth and fitness. *PloS One*, **11**:e0153374.
- Llopis-Torregrosa, V., Vaz, C., Monteoliva, L., Ryman, K., Engstrom, Y. *et al.* 2019. Trk1-mediated potassium uptake contributes to cell-surface properties and virulence of *Candida glabrata*. *Scientific Reports*, **9**:7529.
- Luo, G., Samaranayake, L. P., Cheung, B. P. K., Tang, G. 2004. Reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR) detection of HLP gene expression in *Candida glabrata* and its possible role in *in vitro* haemolysin production. *Apmis*, **112**:283-290.
- Madrid, R., Gómez, M. J., Ramos, J., Rodríguez-Navarro, A. 1998. Ectopic potassium uptake in *trk1 trk2* mutants of *Saccharomyces cerevisiae* correlates with a highly hyperpolarized membrane potential. *Journal of Biological Chemistry*, **273**:14838-14844.
- Maenza, J. R., Merz, W. G., Romagnoli, M. J., Keruly, J. C., Moore, R. D. *et al.* 1997. Infection due to fluconazole-resistant *Candida* in patients with AIDS: prevalence and microbiology. *Clinical Infectious Diseases*, **24**:28-34.
- Marcos-Arias, C., Eraso, E., Madariaga, L., Aguirre, J. M., Quindós, G. 2011. Phospholipase and proteinase activities of *Candida* isolates from denture wearers. *Mycoses*, **54**:e10-e16.
- Maresova, L., Sychrova, H. 2005. Physiological characterization of *Saccharomyces cerevisiae* *kha1* deletion mutants. *Molecular Microbiology*, **55**:588-600.
- Marquina, D., Santos, A., Peinado, J. 2002. Biology of killer yeasts. *International Microbiology*, **5**:65-71.
- Martínez, J. L., Sychrova, H., Ramos, J. 2011. Monovalent cations regulate expression and activity of the Hak1 potassium transporter in *Debaryomyces hansenii*. *Fungal Genetics and Biology*, **48**:177-184.
- Martins, T. S., Costa, V., Pereira, C. 2018. Signaling pathways governing iron homeostasis in budding yeast. *Molecular Microbiology*, **109**:422-432.

- Morales-Menchén, A., Navarro-García, F., Guirao-Abad, J. P., Román, E., Prieto, D. *et al.* 2018. Non-canonical activities of Hog1 control sensitivity of *Candida albicans* to killer toxins from *Debaryomyces hansenii*. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, **8**:135.
- Mühlhausen, S., Kollmar, M. 2014. Molecular phylogeny of sequenced *Saccharomyces* reveals polyphyly of the alternative yeast codon usage. *Genome Biology and Evolution*, **6**:3222-3237.
- Navarrete, C., Petrezsélyová, S., Barreto, L., Martínez, J. L., Zahrádka, J. *et al.* 2010. Lack of main K<sup>+</sup> uptake systems in *Saccharomyces cerevisiae* cells affects yeast performance in both potassium-sufficient and potassium-limiting conditions. *FEMS Yeast Research*, **10**:508-517.
- Olson, M. L., Jayaraman, A., Kao, K. C. 2018. Relative abundances of *Candida albicans* and *Candida glabrata* in *in vitro* coculture biofilms impact biofilm structure and formation. *Applied and Environmental Microbiology*, **84**:e02769-17.
- Palmer, B. F. 2015. Regulation of potassium homeostasis. *Clinical Journal of the American Society of Nephrology*, **10**:1050–1060.
- Peña, A., Sánchez, N. S., González-López, O., Calahorra, M. 2015. Mechanisms involved in the inhibition of glycolysis by cyanide and antimycin A in *Candida albicans* and its reversal by hydrogen peroxide. A common feature in *Candida* species. *FEMS Yeast Research*, **15**:fov083.
- Perlroth, J., Choi, B., Spellberg, B. 2007. Nosocomial fungal infections: epidemiology, diagnosis, and treatment. *Medical Mycology*, **45**:321-346.
- Perumal, P., Mekala, S., Chaffin, W. L. 2007. Role for cell density in antifungal drug resistance in *Candida albicans* biofilms. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **51**: 2454-2463.
- Prista, C., Gonzalez-Hernandez, J. C., Ramos, J., Loureiro-Dias, M. C. 2007. Cloning and characterization of two K<sup>+</sup> transporters of *Debaryomyces hansenii*. *Microbiology*, **153**:3034-3043.
- Rai, M. N., Balusu, S., Gorityala, N., Dandu, L., Kaur, R. 2012. Functional genomic analysis of *Candida glabrata*-macrophage interaction: role of chromatin remodeling in virulence. *PLoS Pathogens*, **8**:e1002863.
- Ramage, G., Walle, K. V., Wickes, B. L., López-Ribot, J. L. 2001. Standardized method for *in vitro* antifungal susceptibility testing of *Candida albicans* biofilms. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **45**:2475-2479.
- Ramos, J., Rodríguez-Navarro, A. 1986. Regulation and interconversion of the potassium transport systems of *Saccharomyces cerevisiae* as revealed by rubidium transport. *European Journal of Biochemistry*, **154**:307-311.

- Ramos, J., Alijo, R., Haro, R., Rodríguez-Navarro, A. 1994. Trk2 is not a low-affinity potassium transporter in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Bacteriology*, **176**:249-252.
- Ramos, J., Ariño, J., Sychrová, H. 2011. Alkali–metal–cation influx and efflux systems in nonconventional yeast species. *FEMS Microbiology Letters*, **317**:1-8.
- Reisser, C., Dick, C., Kruglyak, L., Botstein, D., Schacherer, J. *et al.* 2013. Genetic basis of ammonium toxicity resistance in a sake strain of yeast: a mendelian case. *G3: Genes, Genomes, Genetics*, **3**:733-740.
- Riera, M., Mogensen, E., d'Enfert, C., Janbon, G. 2012. New regulators of biofilm development in *Candida glabrata*. *Research in Microbiology*, **163**:297-307.
- Rikhvanov, E. G., Varakina, N. N., Rusaleva, T. M., Rachenko, E. I., Voinikov, V. K. 2002. The effect of sodium azide on the thermotolerance of the yeasts *Saccharomyces cerevisiae* and *Candida albicans*. *Microbiology*, **71**:662-665.
- Rodrigues, C. F., Silva, S., Henriques, M. 2014. *Candida glabrata*: a review of its features and resistance. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, **33**:673-688.
- Rodrigues, C. F., Rodrigues, M. E., Silva, S., Henriques, M. 2017. *Candida glabrata* biofilms: how far have we come?. *Journal of Fungi*, **3**:11.
- Rodríguez-Cousiño, N., Maqueda, M., Ambrona, J., Zamora, E., Esteban, R. *et al.* 2011. A new wine *Saccharomyces cerevisiae* killer toxin (Klus), encoded by a double-stranded RNA virus, with broad antifungal activity is evolutionarily related to a chromosomal host gene. *Applied Environmental Microbiology*, **77**:1822-1832.
- Rodríguez-Navarro, A., Ramos, J. 1984. Dual system for potassium transport in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Bacteriology*, **159**:940-945.
- Rodríguez-Navarro, A. 2000. Potassium transport in fungi and plants. *Biochimica et Biophysica Acta, Reviews on Biomembranes*, **1469**:1-30.
- Roetzer, A., Gratz, N., Kovarik, P., Schüller, C. 2010. Autophagy supports *Candida glabrata* survival during phagocytosis. *Cellular Microbiology*, **12**:199-216.
- Romani, A. M. 2011. Cellular magnesium homeostasis. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, **512**:1-23.
- Salvadó, Z., Arroyo-López, F. N., Guillamón, J. M., Salazar, G., Querol, A. *et al.* 2011. Temperature adaptation markedly determines evolution within the genus *Saccharomyces*. *Applied and Environmental Microbiology*, **77**:2292-2302.
- Santa-María, G. E., Rubio, F., Dubcovsky, J., Rodríguez-Navarro, A. 1997. The *HAK1* gene of barley is a member of a large gene family and encodes a high-affinity potassium transporter. *The Plant Cell*, **9**:2281-2289.

- Santos, A., Marquina, D. 2004. Killer toxin of *Pichia membranifaciens* and its possible use as a biocontrol agent against grey mould disease of grapevine. *Microbiology*, **150**:2527-2534.
- Santos, A., Navascués, E., Bravo, E., Marquina, D. 2011. *Ustilago maydis* killer toxin as a new tool for the biocontrol of the wine spoilage yeast *Brettanomyces bruxellensis*. *International Journal of Food Microbiology*, **145**:147-154.
- Schleyer, M., Bakker, E. P. 1993. Nucleotide sequence and 3'-end deletion studies indicate that the K<sup>+</sup>-uptake protein kup from *Escherichia coli* is composed of a hydrophobic core linked to a large and partially essential hydrophilic C terminus. *Journal of Bacteriology*, **175**:6925-6931.
- Schmitt, M. J., Klavehn, P., Wang, J., Schönig, I., Tipper, D. J. 1996. Cell cycle studies on the mode of action of yeast K28 killer toxin. *Microbiology*, **142**:2655-2662.
- Seneviratne, C. J., Wang, Y., Jin, L., Abiko, Y., Samaranyake, L. P. 2010. Proteomics of drug resistance in *Candida glabrata* biofilms. *Proteomics*, **10**:1444-1454.
- Shields, R. K., Nguyen, M. H., Press, E. G., Kwa, A. L., Cheng, S. *et al.* 2012. The presence of an FKS mutation rather than MIC is an independent risk factor for failure of echinocandin therapy among patients with invasive candidiasis due to *Candida glabrata*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **56**:4862-4869.
- Shimamura, S., Miyazaki, T., Tashiro, M., Takazono, T., Saijo, T. *et al.* 2019. Autophagy-inducing factor Atg1 is required for virulence in the pathogenic fungus *Candida glabrata*. *Frontiers in Microbiology*, **10**:27.
- Shin, J. H., Chae, M. J., Song, J. W., Jung, S. I., Cho, D. *et al.* 2007. Changes in karyotype and azole susceptibility of sequential bloodstream isolates from patients with *Candida glabrata* candidemia. *Journal of Clinical Microbiology*, **45**:2385-2391.
- Shipston, M. J. 2014. Ion channel regulation by protein S-acylation. *The Journal of General Physiology*, **143**:659-678.
- Sikora, M., Dabkowska, M., Swoboda-Kopec, E., Jarzynka, S., Netsvyetayeva, I. *et al.* 2011. Differences in proteolytic activity and gene profiles of fungal strains isolated from the total parenteral nutrition patients. *Folia Microbiologica*, **56**:143-148.
- Silva, S., Henriques, M., Oliveira, R., Williams, D., Azeredo, J. 2010. *In vitro* biofilm activity of non-*Candida albicans* *Candida* species. *Current Microbiology*, **61**:534-540.
- Silva, S., Negri, M., Henriques, M., Oliveira, R., Williams, D. W. *et al.* 2012. *Candida glabrata*, *Candida parapsilosis* and *Candida tropicalis*: biology, epidemiology, pathogenicity and antifungal resistance. *FEMS Microbiology Reviews*, **36**:288-305.
- Somers, J. M., Bevan, E. A. 1969. The inheritance of the killer character in yeast. *Genetics Research*, **13**:71-83.

- Stříbný, J., Kinclová-Zimmermannová, O., Sychrová, H. 2012. Potassium supply and homeostasis in the osmotolerant non-conventional yeasts *Zygosaccharomyces rouxii* differ from *Saccharomyces cerevisiae*. *Current Genetics*, **58**:255-264.
- Tamura, N. K., Negri, M. F. N., Bonassoli, L. A., Svidzinski, T. I. E. 2007. Virulence factors for *Candida* spp recovered from intravascular catheters and hospital workers' hands. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, **40**:1.
- Tang, R. J., Luan, S. 2017. Regulation of calcium and magnesium homeostasis in plants: from transporters to signaling network. *Current Opinion in Plant Biology*, **39**:97-105.
- Tascón, I., Sousa, J. S., Corey, R. A., Mills, D. J., Griwatz, D. *et al.* 2020. Structural basis of proton-coupled potassium transport in the KUP family. *Nature Communications*, **11**:1-10.
- Tejada Cifuentes, F. 2008. Alteraciones del equilibrio del potasio: hipopotasemia. *Revista Clínica de Medicina de Familia*, **2**:129-133.
- Tholema, N., Bakker, E. P., Suzuki, A., Nakamura, T. 1999. Change to alanine of one out of four selectivity filter glycines in KtrB causes a two orders of magnitude decrease in the affinities for both K<sup>+</sup> and Na<sup>+</sup> of the Na<sup>+</sup> dependent K<sup>+</sup> uptake system KtrAB from *Vibrio alginolyticus*. *FEBS Letters*, **450**:217-220.
- Tscherner, M., Schwarzmüller, T., Kuchler, K. 2011. Pathogenesis and antifungal drug resistance of the human fungal pathogen *Candida glabrata*. *Pharmaceuticals*, **4**:169-186.
- Tzu, S. Ng, Mohd, N. M. D., Sandai, D., Chong, P. P., Than, L. T. L. 2016. Growth, biofilm formation, antifungal susceptibility and oxidative stress resistance of *Candida glabrata* are affected by different glucose concentrations. *Infection, Genetics and Evolution*, **40**:331-338.
- Ueno, K., Matsumoto, Y., Uno, J., Sasamoto, K., Sekimizu, K. *et al.* 2011. Intestinal resident yeast *Candida glabrata* requires Cyb2p-mediated lactate assimilation to adapt in mouse intestine. *PloS One*, **6**:e24759.
- Vandeputte, P., Tronchin, G., Larcher, G., Ernoult, E., Bergès, T. *et al.* 2008. A nonsense mutation in the ERG6 gene leads to reduced susceptibility to polyenes in a clinical isolate of *Candida glabrata*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **52**:3701-3709.
- Vidal, M., Buckley, A. M., Hilger, F., Gaber, R. F. 1990. Direct selection for mutants with increased K<sup>+</sup> transport in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*, **125**:313-320.
- Whaley, S. G., Berkow, E. L., Rybak, J. M., Nishimoto, A. T., Barker, K. S. *et al.* 2017. Azole antifungal resistance in *Candida albicans* and emerging non-albicans *Candida* species. *Frontiers in Microbiology*, **7**:2173.
- Wilson, L. S., Reyes, C. M., Stolpman, M., Speckman, J., Allen, K. *et al.* 2002. The direct cost and incidence of systemic fungal infections. *Value in Health*, **5**:26-34.

- Xin, H. 2018. Effects of immune suppression in murine models of disseminated *Candida glabrata* and *Candida tropicalis* infection and utility of a synthetic peptide vaccine. *Medical Mycology*, **57**:745-756.
- Yamanaka, R., Shindo, Y., Oka, K. 2019. Magnesium is a key player in neuronal maturation and neuropathology. *International Journal of Molecular Sciences*, **20**:3439.
- Yenush, L. 2016. Potassium and sodium transport in yeast. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, **892**:187-228.
- Zayats, V., Stockner, T., Pandey, S. K., Woerz, K., Ettrich, R. *et al.* 2015. A refined atomic scale model of the *Saccharomyces cerevisiae* K<sup>+</sup>-translocation protein Trk1p combined with experimental evidence confirms the role of selectivity filter glycines and other key residues. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, **1848**:1183-1195.
- Zhou, X., Hansmann, M. A., Davis, C. C., Suzuki, H., Brown, C. J. *et al.* 2010. The vaginal bacterial communities of japanese women resemble those of women in other racial groups. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*, **58**:169-181.
- Zimmermannova, O., Salazar, A., Sychrova, H., Ramos, J. 2015. *Zygosaccharomyces rouxii* Trk1 is an efficient potassium transporter providing yeast cells with high lithium tolerance. *FEMS Yeast Research*, **15**:fov029.

**Anexo (publicación científica derivada de esta Tesis)**







# Trk1, the sole potassium-specific transporter in *Candida glabrata*, contributes to the proper functioning of various cell processes

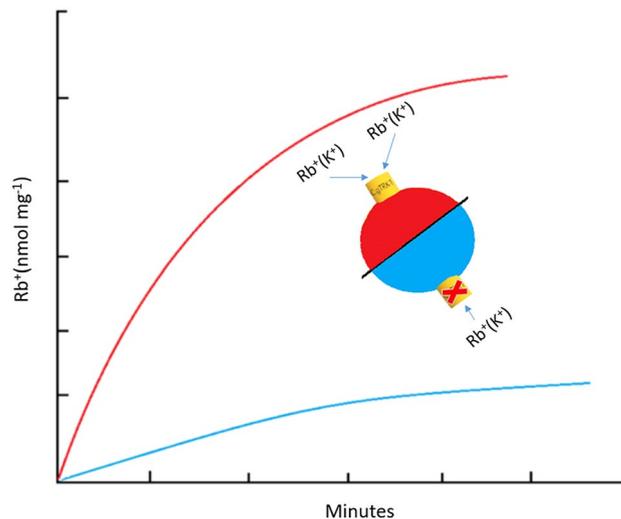
Gabriel Caro<sup>1</sup> · Jan Bieber<sup>2</sup> · Francisco J. Ruiz-Castilla<sup>1</sup> · Carmen Michán<sup>3</sup> · Hana Sychrova<sup>2</sup> · José Ramos<sup>1</sup>

Received: 30 April 2019 / Accepted: 17 July 2019  
© Springer Nature B.V. 2019

## Abstract

*Candida glabrata* is a haploid yeast that is considered to be an emergent pathogen since it is the second most prevalent cause of candidiasis. Contrary to most yeasts, this species carries only one plasma membrane potassium transporter named CgTrk1. We show in this work that the activity of this transporter is regulated at the posttranslational level, and thus Trk1 contributes to potassium uptake under very different external cation concentrations. In addition to its function in potassium uptake, we report a diversity of physiological effects related to this transporter. CgTRK1 contributes to proper cell size, intracellular pH and membrane-potential homeostasis when expressed in *Saccharomyces cerevisiae*. Moreover, lithium influx experiments performed both in *C. glabrata* and *S. cerevisiae* indicate that the salt tolerance phenotype linked to CgTrk1 can be related to a high capacity to discriminate between potassium and lithium (or sodium) during the transport process. In summary, we show that CgTRK1 exerts a diversity of pleiotropic physiological roles and we propose that the corresponding protein may be an attractive pharmacological target for the development of new antifungal drugs.

## Graphic abstract



**Keywords** *Candida glabrata* · Potassium transport · Trk1 · Salt tolerance · *Saccharomyces cerevisiae* · Membrane potential

## Introduction

Potassium is a crucial element for life. This alkali cation is accumulated against high concentration gradients and intervenes in the regulation of multiple factors such as

✉ José Ramos  
mi1raruj@uco.es

Extended author information available on the last page of the article

enzymatic activities, intracellular pH, osmotic pressure or membrane potential in yeast. (Ariño et al. 2010, 2018; Ramos et al. 2011). Most of the yeast species, are endowed with several plasma-membrane potassium-specific transporters that assure its appropriate influx and intracellular accumulation. These transporters may be grouped into three families: transport of potassium (Trk), high affinity potassium (Hak) or Alkali cation uptake (Acu) (Ramos et al. 2011). While the members of Trk family are present in all yeasts, including the model *Saccharomyces cerevisiae*, Hak and Acu transporters have been found only in some non-conventional yeast species such as *Debaryomyces hansenii* (Hak) (Martínez et al. 2011), *Pichia sorbitophila* or *Candida albicans* (Hak and Acu) (Benito et al. 2004; Elicharová et al. 2016).

*Candida glabrata* is a haploid yeast that is part of the human microbiome. Although classified into the genus, this yeast is more phylogenetically related to *S. cerevisiae* than to *C. albicans* (Dujon et al. 2004; Fitzpatrick et al. 2006; Gabaldón et al. 2013). This yeast may behave as an opportunistic pathogen and, in fact is considered to be an emergent pathogen since it is the second most prevalent cause of candidiasis (Bolotin-Fukuhara and Fairhead 2014; Hazen 1995; Perloth et al. 2007; Ribeiro de Carvalho et al. 2018). In relation to cation homeostasis, *C. glabrata* is one of the few yeast species that contains only one plasma-membrane potassium transporter but the information on potassium homeostasis in this yeast, although exciting is very scarce (Hušeková et al. 2016; Llopis-Torregrosa et al. 2016). It was shown that *CgTrk1* has a higher level of identity with *ScTrk1* than with the corresponding *C. albicans* *Trk1* (54 and 32% respectively), that *CgTrk1* is a plasma membrane protein and deletion of the corresponding gene impaired growth at limiting potassium concentrations. *C. glabrata* mutant lacking the *TRK1* gene also showed phenotypes related to disturbance of basic physiological parameters, such as intracellular pH and plasma-membrane potential. Heterologous expression of the *CgTRK1* gene in a *S. cerevisiae* mutant lacking its endogenous *Trk1* and *Trk2* potassium transporters suppressed the

growth deficiency of cells at low external potassium (Llopis-Torregrosa et al. 2016).

In this work we have performed a detailed study of the characteristics of potassium transport mediated by *CgTrk1*, we show that the activity of the transporter is highly regulated being able to contribute to potassium uptake under very different conditions (low or high potassium or the presence of toxic amounts of salts) and its presence in *S. cerevisiae* cells contributes to the intracellular pH and membrane-potential regulation. In addition, we show that the involvement of *CgTrk1* in salt tolerance is directly related to a higher inhibition of lithium or sodium influx by potassium in the presence of the *CgTrk1* transporter.

## Materials and methods

### Yeast strains and cultivation

Yeast strains used in this study are listed in Table 1. YNB based media adjusted at pH 5.8 with  $\text{NH}_4\text{OH}$  were used (0.17% YNB or 0.17% YNB-F, Formedium™). For intracellular pH measurements, a filter-sterilised YNB-F<sup>pH</sup> medium (0.17% YNB-F without amino acids, ammonium sulphate, riboflavin, folic acid; Formedium™) or YNB<sup>pH</sup> medium (0.17% YNB without amino acids, ammonium sulphate, riboflavin and folic acid; MP Biomedicals) were used. The media were supplemented with 2% glucose, auxotrophic supplements and the indicated amounts of KCl. Solid media were prepared by adding 2% (w/v) agar to the previously described recipes (Navarrete et al. 2010; Llopis-Torregrosa et al. 2016).

### Growth assays

Growth curves at several potassium concentrations were performed in tubes with 5 ml of YNB-F medium supplemented with the indicated amounts of KCl. Absorbance at 600 nm ( $A_{600}$ ) of cultures was followed for 24–48 h using a

**Table 1** Yeast strains used in this study

Strain	Feature	References
<i>C. glabrata</i>	Wild type	Llopis-Torregrosa et al. (2016)
<i>C. glabrata</i>	ATCC 2001 <i>trk1</i> Δ::FRT	Llopis-Torregrosa et al. (2016)
<i>S. cerevisiae</i> BY4741	Wild type. <i>MATa his3</i> Δ1 <i>leu2</i> Δ <i>met15</i> Δ <i>ura3</i> Δ	Navarrete et al. (2010)
<i>S. cerevisiae</i> BYT12	YEp-CgTRK1	Llopis-Torregrosa et al. (2016)
<i>S. cerevisiae</i> BYT12	YEp352	Llopis-Torregrosa et al. (2016)
<i>S. cerevisiae</i> BY4741	YEp352	EUROSCARF
<i>S. cerevisiae</i> BY4741 <sup>pHI</sup>	YEp352	Zimmermannova et al. (2015)
<i>S. cerevisiae</i> BYT12 <sup>pHI</sup>	YEp352	Zimmermannova et al. (2015)
<i>S. cerevisiae</i> BYT12 <sup>pHI</sup>	YEp-CgTRK1	This work

Spectronic 20 (Bausch and Lomb) (Prista et al. 1997). Specific growth rates were calculated from the growth curves. To obtain normal  $K^+$  cells, yeasts were grown in YNB supplemented with 100 mM KCl. For  $K^+$  starvation experiments, normal  $K^+$  cells were washed with sterile water and resuspended in synthetic  $K^+$ -free medium (YNB-F) without added potassium. Cells were potassium starved for 3 h.

Lithium, sodium and drug tolerances were determined in solid and liquid media. Drop tests were performed with fresh cells resuspended in water and adjusted to the same initial  $A_{600}$  1.0. Tenfold serial dilutions were prepared, and 3  $\mu$ l aliquots of each dilution were spotted on the appropriate media containing salts and drugs as indicated in the text. The effect of LiCl or NaCl on growth in liquid media was analysed measuring  $A_{600}$  after an overnight growth in media supplemented with indicated amount of salts.

### Cation content and transport

To estimate intracellular  $K^+$ ,  $Li^+$  and  $Na^+$  content, cell samples were collected from liquid media on Millipore filters, which were rapidly washed with 20 mM  $MgCl_2$ . The cells were then extracted with 0.2 M HCl and 10 mM  $MgCl_2$  and the extracts were analysed by atomic emission spectrophotometry (Ramos et al. 1990).

To study the characteristics of  $Rb^+$  uptake, cell samples were washed and suspended ( $A_{600}$  0.3) in the uptake buffer (MES 10 mM supplemented with 2% glucose,  $MgCl_2$  0.1 mM at pH 5.8 adjusted with  $Ca(OH)_2$ ). The required amount of  $RbCl$  (0–100 mM) was added to the buffer at time zero and aliquots were withdrawn at various times. Cells were treated as described above.

The effect of potassium on lithium transport was studied in potassium starved cells suspended in uptake buffer. At time 0, LiCl or LiCl with KCl were added and lithium accumulation was followed for 10–15 min approx.

All values are expressed as nanomols of cation per milligram dry weight of cells (Navarrete et al. 2010).

### Real-time PCR

The sequences of *CgTRK1* gene for primer design was obtained from Gene Ontology Consortium ([www.geneontology.org](http://www.geneontology.org)). Primers were designed with OLIGO 7.60 program (Molecular Biology Insights, Cascade, CO). The selection used included high  $T_m$  ( $> 82.9$  °C) and optimal  $3'\Delta G$  ( $> 6.8$  kcal mol $^{-1}$ ) values, as detailed (Pueyo et al. 2002). Sequence for forward (F) primer was: 5'-GAGCTC TTTCAATCGGGCAGCCTATCCACT-3', and reverse (R) was: 5'-AGAAGGCCAGACTCTCCCTCAGTTGTGACA-3'. No primer dimers were detected, and amplification efficiency was close to 100%.

The PCR amplification was carried out in a mixture (20  $\mu$ l final volume) with IQ<sup>TM</sup> SYBR<sup>®</sup> Green Supermix (Bio-Rad), 1  $\mu$ l of cDNA, plus 0.1  $\mu$ M of the specific primers. PCR reactions were performed in triplicate. Real-time PCR conditions were an initial denaturation step, 95 °C 3 min, followed by forty PCR cycles consisting of 15 s of denaturation at 95 °C, and 30 s of annealing plus elongation at 70 °C. Finally, melting curves were determined.

### Estimation of cell size

Cell volume was analysed in a Cell Counter Z2 (Beckman-Coulter) and expressed in micrometres ( $\mu$ m). The experiment was repeated at least five times, each time  $6 \times 10^4$  cells were analysed for each strain and each condition (Navarrete et al. 2010).

### Measurement of relative membrane potential (diS-C<sub>3</sub>(3) assay)

The relative membrane potential of yeast cells was estimated by a fluorescence assay based on the potential-dependent redistribution of the fluorescence probe diS-C<sub>3</sub>(3) (3,3'-dipropylthiacarbocyanine iodide) (Gášková et al. 1998), as described in (Kodedová and Sychrová 2015). The probe was added to a final concentration of 0.02  $\mu$ M to the yeast suspension in 10 mM MES-TEA buffer (pH 6.0). Fluorescence emission spectra ( $\lambda_{ex}$  = 531 nm,  $\lambda_{em}$  = 560–590 nm) of the cell suspensions were measured in a FluoroMax-4 spectrofluorimeter (Horiba Scientific). Scattered light was eliminated by a colored-glass alternative filter with a cut-off wavelength of 550 nm. The staining curves represented the dependence of the fluorescence emission maximum wavelength  $\lambda_{max}$  on the time of staining.

### Measurement of the intracellular pH

For intracellular pH measurements, yeast strains with chromosomally integrated pHluorin sequence (Table 1) were grown in YNB-F<sup>pH</sup> or YNB<sup>pH</sup> media supplemented with the indicated amount of KCl to  $A_{600}$  ~ 0.5. The fluorescence intensities were recorded using a Cytation 3 microplate reader (BioTek Instruments) with emission filter 516/20 nm and excitation filters 400/30 and 485/20 nm according to (Marešová et al. 2010) and the intracellular pH was calculated as described in Felcmanova et al. (2017).

### Statistics

All experiments were repeated at least two times. Data were analysed in Microsoft Excel software 2013 and the significance of differences between mean values was determined

by GraphPad Prism 7. Significant differences are indicated with asterisks (\* $P < 0.05$ ; \*\* $P < 0.01$ ; \*\*\* $P < 0.001$ ).

## Results

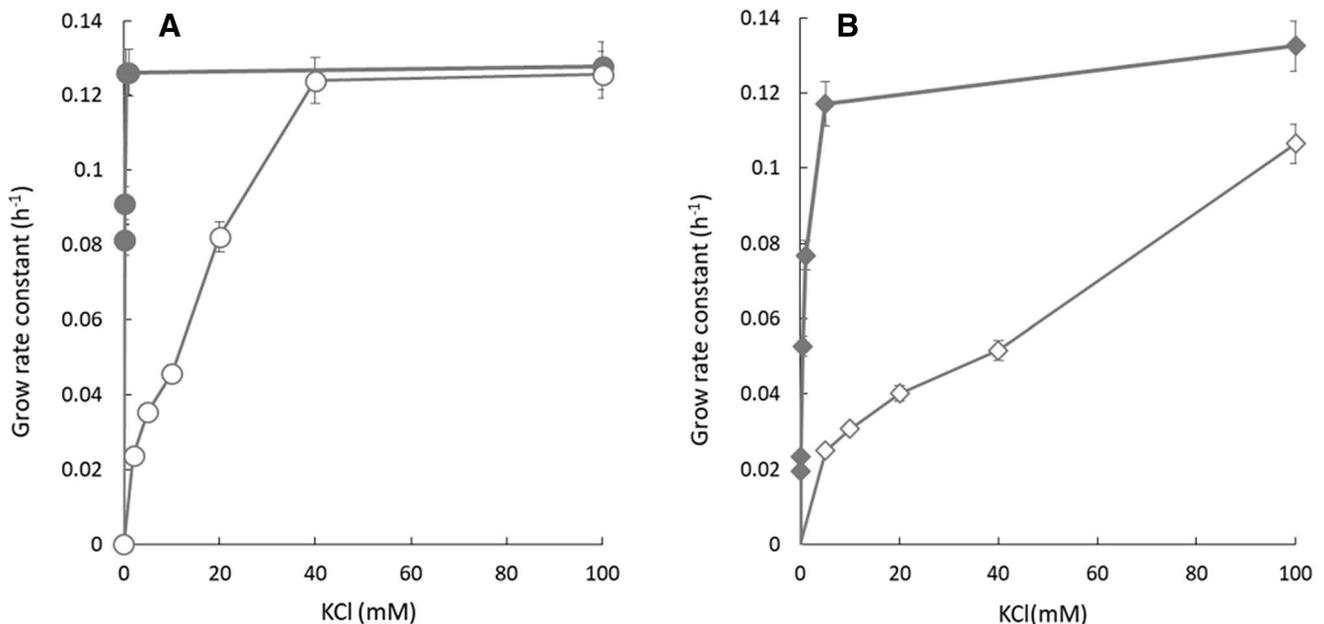
### Potassium requirements and transport characteristics

To investigate in detail the role of Trk1 in *C. glabrata* potassium requirements, we determined specific growth rates in liquid YNB-F medium supplemented with several KCl amounts. Figure 1a shows that while *C. glabrata* wild type grew at very low potassium concentrations, the *trk1* mutant required 40 mM KCl to reach maximum growth rate. Additionally, similar experiments were performed in a *Saccharomyces cerevisiae* strain lacking its endogenous transporters and expressing the *CgTRK1* gene, to determine the impact of this transporter in the model yeast. As in *C. glabrata*, the presence of the Trk1 transporter greatly improved growth and decreased external potassium requirements (Fig. 1b). These results are in accordance with those previously published (Llopis-Torregrosa et al. 2016). All together they suggest that *CgTrk1* plays a pivotal role in potassium transport, therefore we decided to characterize this transporter biochemically and physiologically.

It is known that the kinetic characteristics of potassium fluxes are highly regulated by the previous history of the cell

(Navarrete et al. 2010). For this reason, we used normal  $K^+$  cells and  $K^+$ -starved cells of *C. glabrata* wild-type and *trk1* mutant strains to determine the kinetic constants of transport. Normal  $K^+$  cells were grown in 100 mM KCl and  $K^+$  starved cells were prepared from normal  $K^+$  cells by an incubation in YNB-F medium without added KCl for 3 h (see “Materials and methods” section). Under these conditions, the intracellular  $K^+$  content of *C. glabrata* wild type and *trk1* mutant was  $388 \pm 32$  and  $240 \pm 7$  nmol/mg, respectively, in the case of normal  $K^+$  cells, and  $116 \pm 15$  and  $97 \pm 15$  nmol/mg, respectively, for  $K^+$ -starved cells.

Further, we used rubidium as a potassium transport analogue to be able to perform zero-trans experiments (Navarrete et al. 2010; Martínez et al. 2011) and to determine the kinetic constants of  $Rb^+$  transport. We performed these  $Rb^+$  transport experiments both in *C. glabrata* cells and in *S. cerevisiae* expressing or not *CgTRK1* (Table 2). In normal  $K^+$  cells, the presence of *CgTrk1* improved transport characteristics both in *C. glabrata* and *S. cerevisiae* by increasing  $V_{max}$  of transport and decreasing the  $K_m$ . Interestingly the  $K_m$  values dependent on the transporter were very similar and in the same range in both yeasts (0.39 and 0.24 mM, respectively).  $K^+$  starvation is a usual procedure to activate transport characteristics and to observe high affinity potassium transport modes in yeast (Rodríguez-Navarro and Ramos 1984; Navarrete et al. 2010). In our case, starvation highlighted differences due to the activity of *CgTrk1* and these yeasts showed much higher affinity for rubidium,



**Fig. 1**  $K^+$  dependence of the growth of *Candida glabrata* and *Saccharomyces cerevisiae*. *C. glabrata* (a) or *S. cerevisiae* BYT12 (b), lacking (open circle, open diamond) or expressing (filled circle, filled diamond) the *CgTRK1* gene were inoculated into liquid YNB-F

medium supplemented with the indicated amounts of KCl, and the Absorbance at 600 nm ( $A_{600}$ ) of cultures was followed. Mean values  $\pm$  standard deviation obtained in three independent experiments are plotted

**Table 2** Effect of *CgTrk1* on the kinetic parameters for rubidium transport in yeast with a normal  $K^+$  content and in  $K^+$ -starved cells

Strains	Normal $k^+$ cells		$K^+$ -starved cells	
	$V_{max}$ (nmol $mg^{-1}$ $min^{-1}$ )	$K_m$ (mM)	$V_{max}$ (nmol $mg^{-1}$ $min^{-1}$ )	$K_m$ (mM)
<i>C. glabrata</i> wild type	2.7 ± 0.1	0.39 ± 0.06	28.9 ± 1	0.09 ± 0.03
<i>C. glabrata trk1</i>	0.5 ± 0.2	5.47 ± 5.02	3.5 ± 0.1	25.37 ± 0.4
<i>S. cerevisiae</i> BYT12 [YEp-CgTRK1]	11.4 ± 0.2	0.24±0.12	72.42±2.9	0.14 ± 0.012
<i>S. cerevisiae</i> BYT12 [YEp352]	9.2 ± 0.1	24.82 ± 0.01	8.4 ± 3.4	21.51 ± 0.54

more than two orders of magnitude, than yeasts lacking the transporter. Moreover, the presence of *CgTrk1* also greatly increased the  $V_{max}$  of transport in both yeast species. Once again, the  $K_m$  values measured in *C. glabrata* wild type and in *S. cerevisiae* expressing *CgTRK1* were comparable (0.09 and 0.14 mM, respectively).

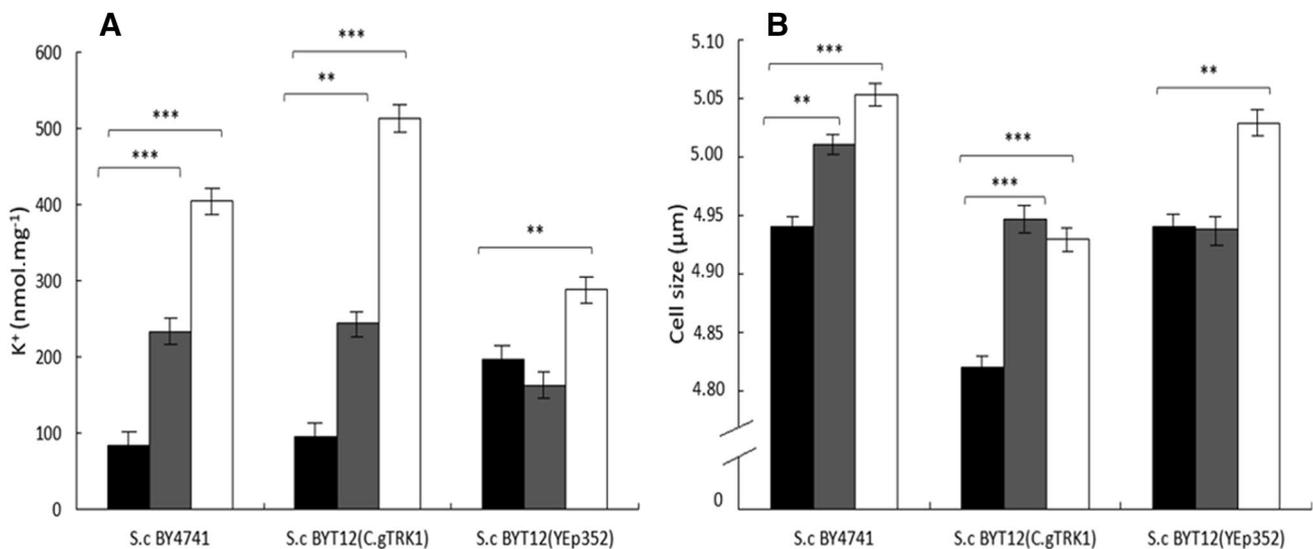
### *CgTRK1* is not regulated at transcriptional level

To study the possible transcriptional regulation of *CgTRK1*, we performed quantitative RT-PCR experiments. RNA was extracted from *C. glabrata* wild-type cells grown without potassium limitation (Normal  $K^+$  cells) or potassium starved ( $K^+$ -starved cells), retrotranscribed and amplified with specific *TRK1* primers. Additionally, to cover other environmental conditions that can affect the  $K^+$  transport process or to modulate expression of yeast plasma membrane transporters, *TRK1* transcripts were also determined from cells grown in high NaCl (1 M) or at acidic (4.5) and alkaline (7.5) pHs. No

significant changes in *TRK1* transcript levels were observed under any of the tested condition (not shown), suggesting that *TRK1* gene is not regulated at the transcriptional level.

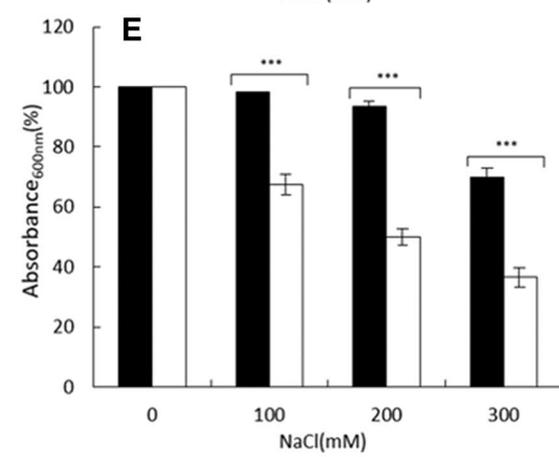
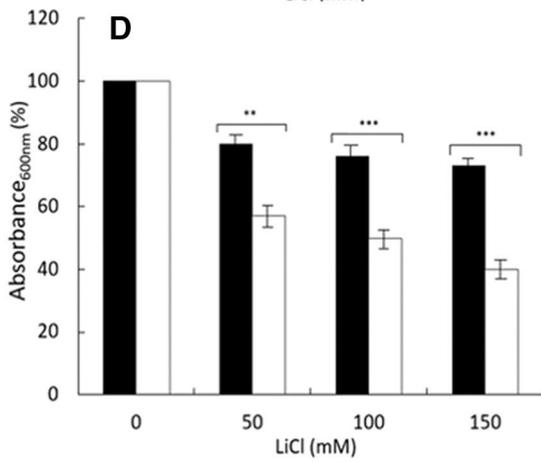
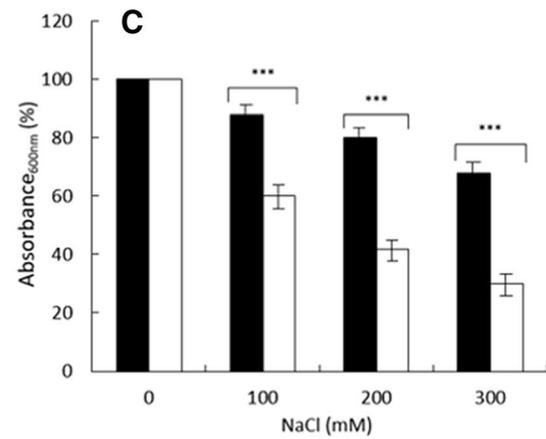
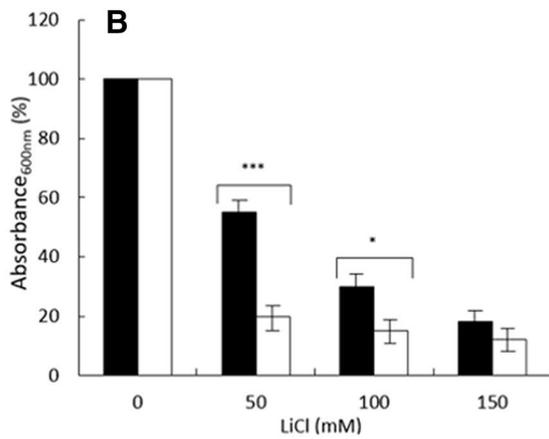
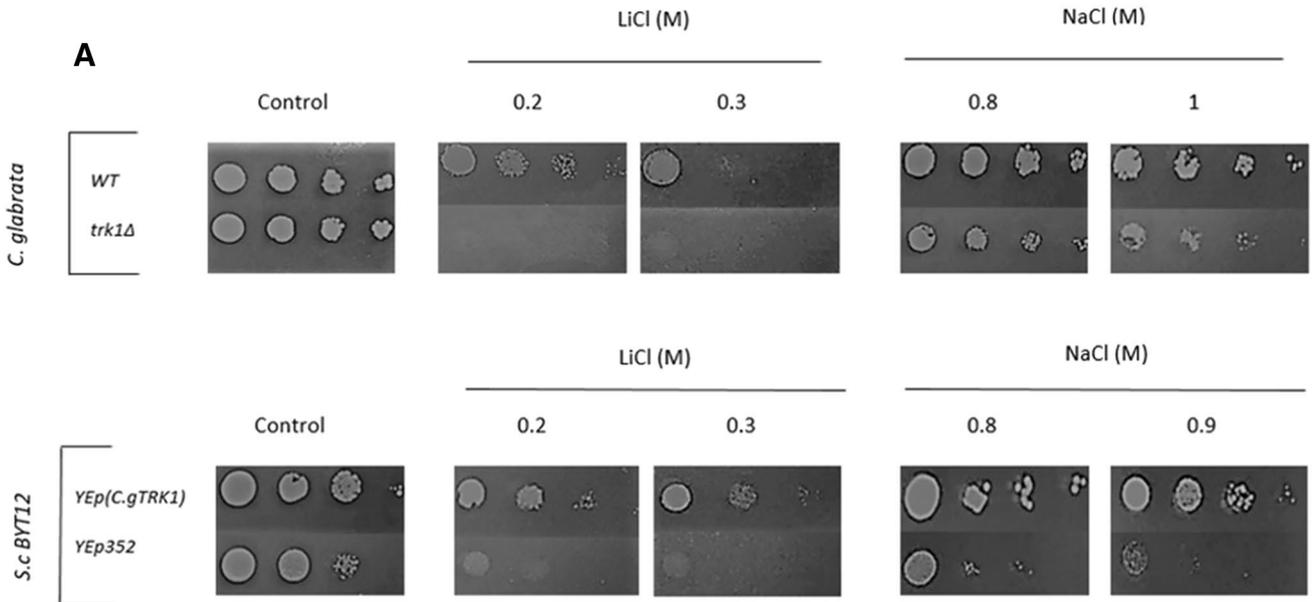
### Potassium uptake mediated by *CgTrk1* influences cell size

To investigate if *CgTrk1* was able to modulate cell size, we determined this parameter in *C. glabrata* wild-type and *trk1* mutant cells in the presence of different potassium levels. Non-significant changes in the cell size could be determined for any of the conditions tested. However, when the same experiments were performed in *S. cerevisiae* expressing the *Candida* transporter we could see a clear phenotypic effect associated to the protein. When high potassium (100 mM KCl) was added to  $K^+$ -starved cells of strains expressing or not *CgTRK1*, both strains were able to accumulate the cation and increase their size (Fig. 2a, b, compare black and white columns) but when low potassium (0.5 mM KCl)



**Fig. 2** Potassium content (a) and cellular size (b) in *S. cerevisiae* BY4741, BYT12[YEp-CgTrk1] and BYT12[YEp352] strains. Cells were pregrown overnight in YNB without amino acids plus 100 mM KCl. Then, cells were  $K^+$  starved during three hours in YNB-F medium and  $K^+$  content and cell size were determined (black). Finally, 0.5 mM (grey) or 100 mM (white) KCl were added

to the medium. And after one hour of additional incubation samples were taken and  $K^+$  content and cell size were measured. Mean values ± standard deviation obtained in three independent experiments are plotted. Significant differences are indicated with asterisks (\*\* $P < 0.01$ ; \*\*\* $P < 0.001$ )



**Fig. 3** Growth of *C. glabrata* or *S. cerevisiae* BYT12, lacking or expressing the *CgTRK1* gene, in the presence of different concentrations of LiCl or NaCl. Experiments in **a** were performed in YNB plus 100 mM KCl plates inoculated with serial dilutions of yeast suspensions and containing the indicated concentrations of toxic salts. The pictures were taken after 48 h incubation at 28 °C. The experiment was repeated twice, and a representative result is shown. **b–e** The growth of *C. glabrata* (**b, c**) and *S. cerevisiae* (**d, e**) in liquid YNB plus 100 mM KCl was determined by monitoring Absorbance at 600 nm after incubation overnight in the presence of the indicated amount of LiCl (**b, d**) or NaCl (**c, e**). (filled square) Strains expressing *CgTRK1* gene; (open square) Strains lacking *CgTRK1* gene. Results are expressed as %. Mean values  $\pm$  standard deviation obtained in three independent experiments are plotted. Significant differences are indicated with asterisks (\* $P < 0.05$ ; \*\* $P < 0.01$ ; \*\*\* $P < 0.001$ )

concentrations were added to the medium, only the strain carrying the transporter was able to transport potassium inside the cells and the subsequent increase in cell size was observed (Fig. 2a, b, compare black and grey columns). A similar behavior was observed in a control wild type *S. cerevisiae* strain (BY4741) endowed with its endogenous potassium transporters.

Two additional questions derive from experiments in Fig. 2. Why BYT12  $K^+$ -starved cells expressing *CgTrk1* contained less  $K^+$  and were smaller than the control BYT12[YEp352]? (Fig. 2a, b, black columns). One possible explanation maybe that cells expressing *CgTrk1* are actively dividing during the three hours starvation period while the ones lacking the transporter may not. Second question would be why there is no a direct/proportional relationship between intracellular  $K^+$  levels and cell size after addition of 100 mM KCl? In other words, why cells carrying *CgTrk1* accumulate more potassium but have a lower volume than the control cells carrying empty plasmid? (Fig. 2a, b, black columns). We do not have a definitive answer to this question. The topic may require a polygenic analysis and cell volume could be regulated by many factors that may be indirectly biased by *Trk1* transporter.

### ***CgTrk1* efficiently discriminates between potassium and sodium or lithium**

In order to study the possible functions of *CgTrk1* in tolerance to salt stress in yeast, cell growth in solid and liquid media supplemented with other salts as LiCl or NaCl was investigated. Figure 3 shows that under the different conditions studied, the presence of *CgTrk1* improved growth when cells were exposed to high amounts of lithium or sodium both in plates (A) or in liquid media (B–E). These results are in accordance to those published by Llopis-Torregrosa et al. (2016) who showed reduced growth of *C. glabrata trk1* cells compared to the wild type, on YPD plates containing NaCl or LiCl.

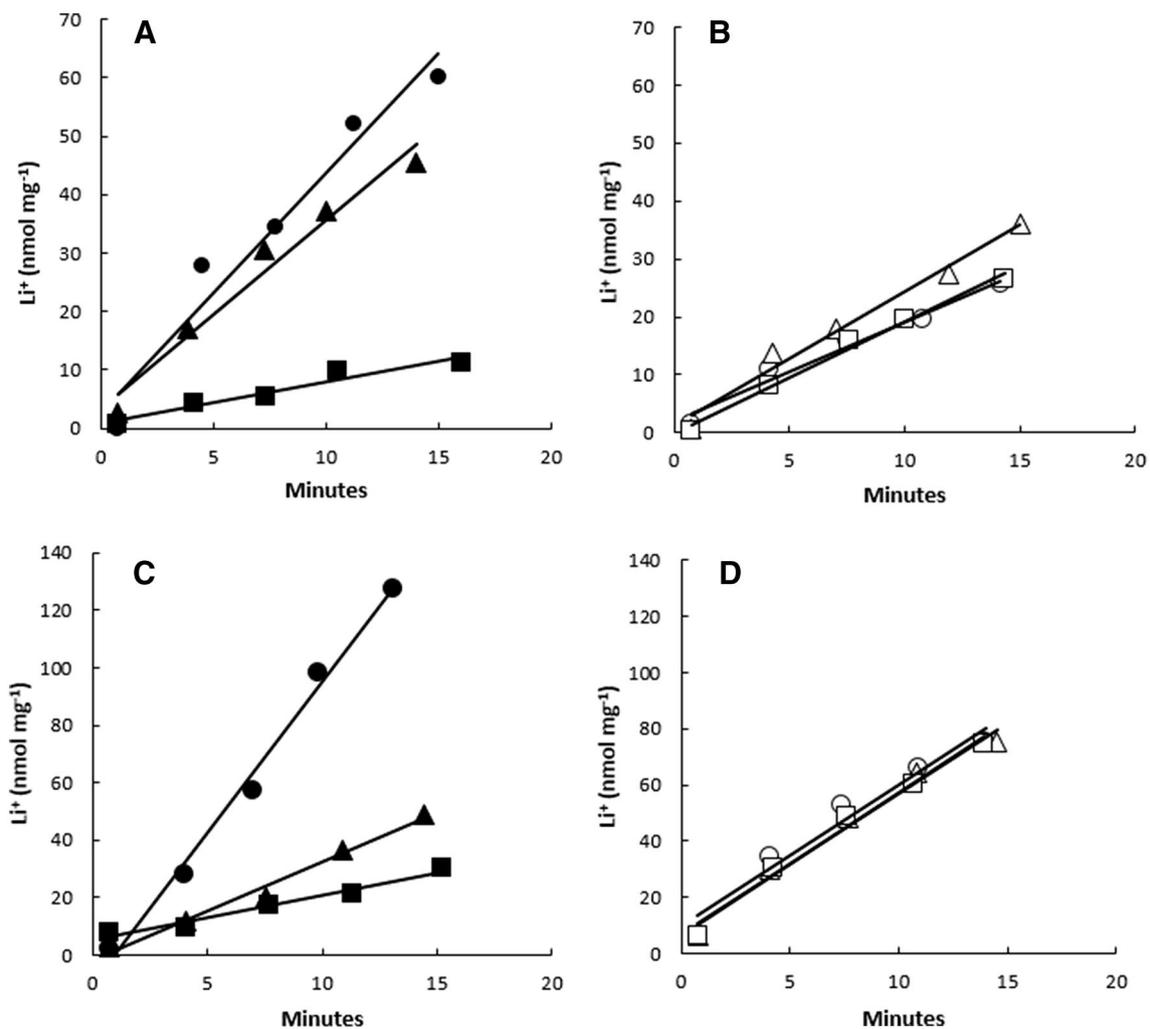
To further investigate the underneath mechanisms for this behaviour, intracellular cation content was determined in the studied conditions. The growth improvement due to the activity of the transporter was accompanied by a higher capacity to accumulate potassium instead of the toxic sodium cation. As an example, the potassium and sodium contents (nmol/mg) in NaCl (0.2 M) grown cells were 260/150 in *C. glabrata* wild type versus 163/220 in the *trk1* mutant. Similarly, in the case of the *S. cerevisiae* BYT12 strain transformed with empty plasmid or carrying *CgTRK1*, the intracellular potassium and sodium values measured in NaCl (0.2 M) grown cells were 172/261 versus 225/201 (nmol/mg) respectively.

These results point to a higher capacity to discriminate between potassium and sodium in strains expressing *CgTRK1*, as was previously shown for *S. cerevisiae* (Gómez et al. 1996). To confirm this possibility, we studied the effect of potassium on the time course of lithium influx, both in *C. albicans* wild type and *trk1* mutant and in *S. cerevisiae* expressing or not *CgTRK1*. As shown in Fig. 4, the presence of 0.5 or 5 mM KCl in the uptake buffer hardly affected lithium influx (LiCl 100 mM) in cells lacking *Trk1* (B and D) but, in the presence of the *C. glabrata* potassium transporter the uptake of the toxic cation was decreased very efficiently (A and C). All together our results suggest that *Trk1* is improving tolerance to high salt concentrations by efficiently discriminating the uptake of potassium against toxic cations during the influx process.

### ***CgTrk1* contributes to the proper intracellular pH and membrane-potential homeostasis**

The absence of active high-affinity potassium influx results in an increase of the plasma-membrane potential and a decrease in intracellular pH, both in *S. cerevisiae* and in *C. glabrata* (Navarrete et al. 2010; Llopis-Torregrosa et al. 2016). To verify whether the activity of heterologous *CgTrk1* is able, besides providing the necessary amount of potassium, to restore the wild-type level of the two physiological parameters in *S. cerevisiae* cells, we compared the relative membrane potential and intracellular pH of three strains under the same conditions. The strains were *S. cerevisiae* wild type BY4741 harbouring an empty plasmid (positive control, cells with their own *Trk1* and *Trk2* transporters) and the BYT12 cells transformed either with an empty vector (negative control) or YEp-*CgTrk1*. For intracellular pH measurements, the strains with chromosomally integrated pHluorin sequence were used (Table 1; Zimmermann et al. 2015).

The estimation of intracellular pH in cells grown either in YNB<sup>ph</sup> without added KCl or in cells grown in YNB<sup>ph</sup> supplemented with 100 mM KCl, revealed that the presence of *CgTrk1* increased the intracellular pH of BYT12 cells to



**Fig. 4** Time course of lithium influx into *C. glabrata* (a, b) or *S. cerevisiae* BYT12 (c, d), lacking (b, d) or expressing (a, c) the *CgTRK1* gene. Cells were pregrown overnight in YNB plus 100 mM KCl. Then, cells were  $K^+$  starved during 3 h in YNB-F medium, suspended in uptake buffer and LiCl (100 mM) and KCl (0, 0.5 or

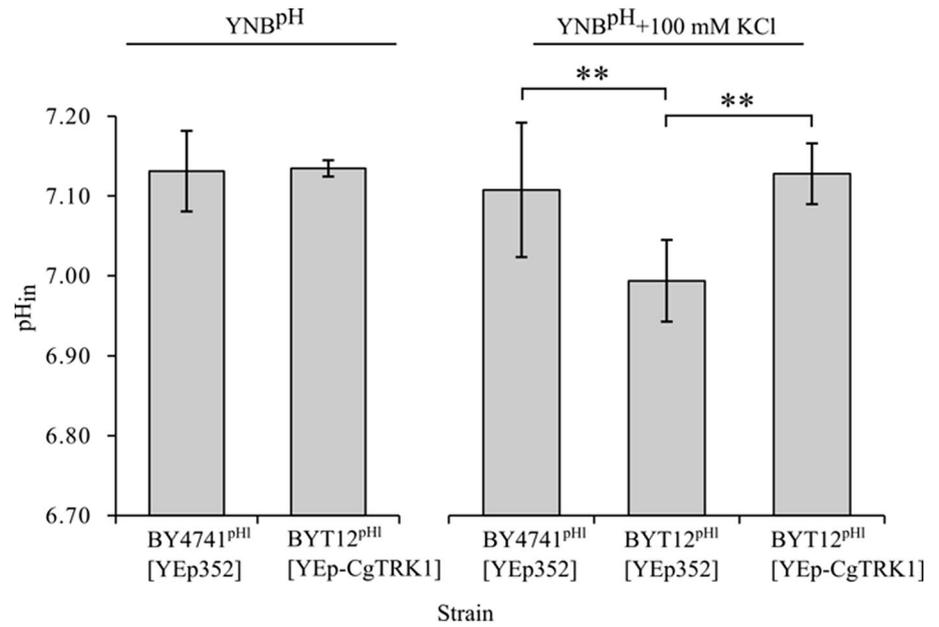
5 mM) (circles, triangles or squares) were added at time zero. Samples were taken during 15 min and intracellular lithium was measured as described in “Materials and methods” section. Experiments were repeated three times and representative results are shown

the level observed for the *S. cerevisiae* wild type (Fig. 5). In the absence of 100 mM KCl, the BYT12<sup>pHl</sup> [YEp352] strain was not growing, so its intracellular pH could not be estimated. Similar complementation was found if the three strains were grown in YNB-F<sup>pHl</sup> supplemented with 100 mM KCl (not shown). It is worth noting, that the intracellular pH of all three strains was about 0.1 unit higher in YNB-F<sup>pHl</sup>-grown cells compared to YNB<sup>pHl</sup>-grown cells (7.12 and 7.20, respectively, for BY4741[YEp352] and BYT12[YEp-CgTrk1]; 6.99 and 7.05 for BYT12[YEp352]).

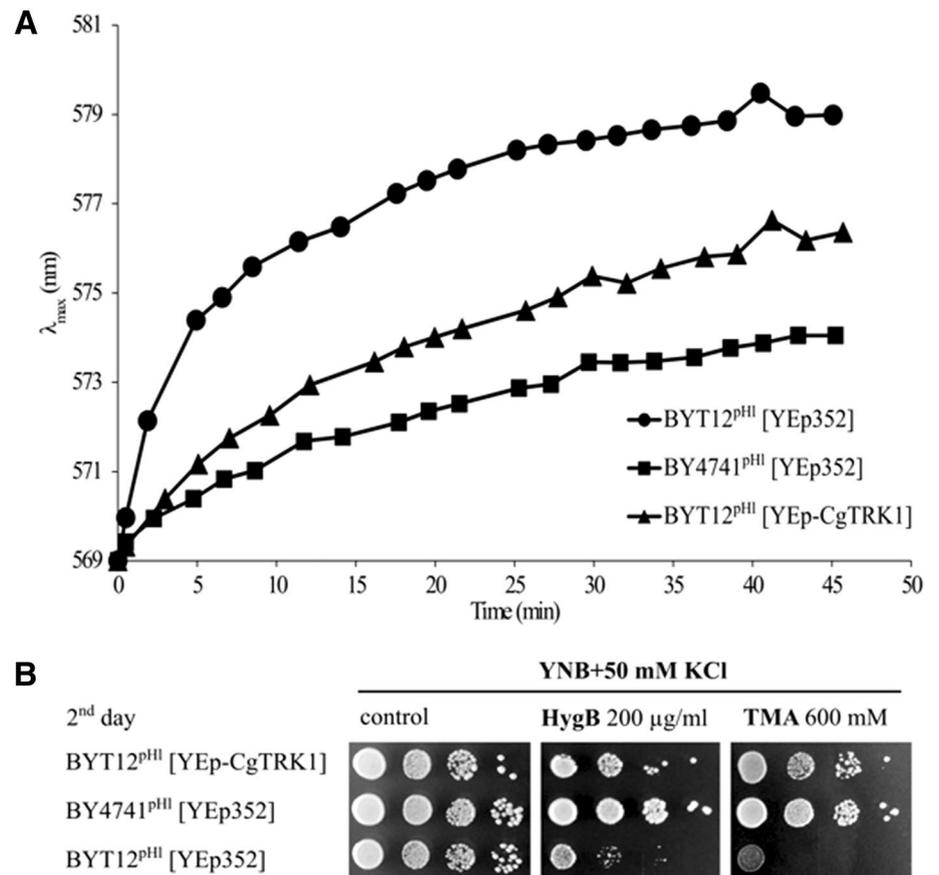
Figure 6a shows that expression of *CgTrk1* in BYT12 cells also diminished their hyperpolarization and the relative membrane potential of cells with functional *CgTrk1* was close to that of the *S. cerevisiae* wild type. A decrease in membrane potential should be accompanied with an

increase in tolerance to toxic cationic drugs and cations whose non-specific uptake is driven by the negative-inside membrane potential (Ariño et al. 2010). To verify that the observed decrease in membrane potential is accompanied with corresponding changes in drug tolerance, we compared the growth of the three strains in the presence of toxic compounds as Hygromycin B or tetramethylammonium (TMA). As shown in Fig. 6b the presence of *CgTrk1* clearly improved the drug tolerance of BYT12 cells, though the level of wild-type tolerance was not fully reached. Results of the drop tests are in agreement with the results of relative membrane potential measurement, where the staining curve of BYT12[YEp-CgTrk1] cells suggests that these cells are still slightly hyperpolarized compared to the BYT4741 wild type (Fig. 6a).

**Fig. 5** Intracellular pH of *S. cerevisiae* cells (with chromosomally integrated sequence encoding pHluorin) growing in YNB<sup>pH</sup> in the absence or presence of 100 mM KCl. BY4741<sup>pHl</sup>, wild type transformed with an empty vector; BYT12<sup>pHl</sup> expressing *CgTRK1* or transformed with an empty vector. Mean values ± standard deviation obtained in three independent experiments are plotted. Significant differences are indicated with asterisks (\*\*P<0.01)



**Fig. 6** Relative membrane potential (a) and sensitivity to cationic drugs (b) of *S. cerevisiae* cells (with chromosomally integrated sequence encoding pHluorin). BY4741<sup>pHl</sup>, wild type transformed with an empty vector; BYT12<sup>pHl</sup> expressing *CgTRK1* or transformed with an empty vector. The staining curves of cells pregrown in YNB supplemented with 50 mM KCl with the potentiometric probe were obtained as described in “Materials and methods” section. The experiments were repeated three times, representative results are shown in (a) and (b)



## Discussion

The prevalence of disease caused by non-albicans *Candida* species is on the rise, along with an increase in antifungal drug resistance. *C. glabrata* accounts for approximately 15% to 20% of all *Candida* infections in the United States and is the most common non-albicans *Candida* specie (Xin 2018).

The information on potassium homeostasis in *C. glabrata* is scarce. It has been reported that the ability to grow at limiting potassium differs in several *Candida* species and that Trk1 is the only specific plasma membrane potassium transporter in *C. glabrata* (Hušeková et al. 2016; Llopis-Torregrosa et al. 2016). *Zygosaccharomyces rouxii* is, so far, the only yeast carrying a sole potassium transporter in which the characteristics of potassium transport were studied (Zimmermannova et al. 2015). Our previous work on *C. glabrata* Trk1 consisted mainly in the description of phenotypes of *C. glabrata* mutants lacking *TRK1* (cation sensitivity, increased relative membrane potential, decreased intracellular pH) (Llopis-Torregrosa et al. 2016).

In this work we show that *CgTrk1* mediates transport processes and we used the *C. glabrata TRK1* gene to study whether its presence can complement not only the absence of the two potassium uptake systems in *S. cerevisiae* in providing its cells with necessary potassium but also in restoring the wild-type levels of physiological parameters which are changed in *S. cerevisiae* cells lacking potassium uptake systems. As far as we know, it is for the first time that the effect of the *CgTRK1* expression on *S. cerevisiae* physiological parameters related to the potassium homeostasis has been tested.

We now report insights of the kinetics of transport and other basic physiological processes depending on *CgTrk1*, in a pathogenic yeast with only that plasma membrane potassium influx system.

One important characteristic of *CgTrk1* was its adaptability to work under extremely different external conditions. Very significant changes in  $V_{\max}$  and  $K_m$  for  $Rb^+$  transport were detected when cells grown under normal potassium conditions were  $K^+$ -starved for 3 h. These adaptations, with increased affinity and velocity of cation transport, were observed only in the presence of *CgTRK1* and most probably took place at protein level since no transcriptional regulation was observed under any of the conditions studied. Posttranslational modification are key events for controlling many physiological functions of eukaryotic cells. Ion channels and ion transporters share a common ancestor (Zayats et al. 2015) and it has been previously described that ion channels can be modified by posttranslational modifications that alter their structure,

adding phosphate, acetyl or ubiquitin, among other groups. These changes can contribute to the regulation of their number, their location or their kinetics. It has been proposed S-acylation as a major contributor for the channel kinetics (Shipston 2014). Also, the members of the TRK family have several conserved glycines that are key residues for *S. cerevisiae* Trk1. For that reason, they have been proposed to participate in the selectivity filter for the ion (Zayats et al. 2015). Other key residues have also been identified that contribute to the folding of the protein (Zayats et al. 2015) but further studies are necessary to predict which residues participate in the active site of the transporter and which modifications can alter their function and kinetic parameters.

The *CgTRK1* was expressed in BYT12 from a weak constitutive promoter (*ScNHA1*) and multicopy plasmid, so its expression is not influenced by potassium starvation. The fact that the  $V_{\max}$  of transport via *CgTrk1* in  $K^+$ -starved cells is significantly higher may imply that during the starvation process there are no changes in the number of transporters but in their activity. In fact, we have shown previously (Ramos and Rodríguez-Navarro 1986; Ramos et al. 1994) that those treatments, for example with sodium azide, that rapidly decreases internal potassium, increases  $V_{\max}$  of transport in few minutes. This suggests that actors such as potassium content, directly or indirectly, could down regulate the activity of the transporters and influence the  $V_{\max}$ .

Llopis-Torregrosa et al. (2016) have shown, and we have confirmed here, that the mutant *Cgtrk1* still grows at high potassium suggesting the existence of nonspecific potassium transporters that would mediate the influx of potassium in the absence of Trk1 as previously reported in *S. cerevisiae* (Madrid et al. 1998). In fact, it is interesting to mention that the *trk1* deletion mutant shows a higher affinity for potassium in normal potassium cells than in starved cells, something that was not reported previously for other yeast species.

In addition to the potassium transport phenotypes we observed a diversity of pleiotropic effects on other basic processes such as cellular size, salt tolerance, membrane potential or intracellular pH that are affected by the absence of *CgTrk1*. In relation to cellular size, and although no significant results could be obtained in *C. glabrata*, we could observe a direct relationship between the capacity to take potassium and cell volume increase in *S. cerevisiae* expressing or not *CgTrk1*. Even though, both *ScTrk1* and *CgTrk1* decreased the amount of external potassium needed to trigger this effect.

In BYT12, *CgTrk1* brings back the values of two basic physiological parameters to almost the wild-type level. Our results prove that not only the amount of intracellular  $K^+$  but

the rate of its influx is important to regulate the activity of Pma1 and thus the membrane potential and intracellular pH.

The higher tolerance to sodium observed in *S. cerevisiae* wild-type cells has been related to the capacity to discriminate between potassium and the toxic sodium cations by the Trk transporters (Gómez et al. 1996). Two results here support that proposal. On the one hand, *C. glabrata* or *S. cerevisiae* expressing *CgTRK1* accumulated more K<sup>+</sup> and less Na<sup>+</sup> than the corresponding strains lacking the transporter, when grown in high NaCl (0.2 M). On the other hand, we show that while in the absence of *CgTrk1*, external potassium (0.5–5 mM KCl) barely affected the time course of lithium uptake (100 mM LiCl) in *C. glabrata* and ScBYT12, in the presence of the transporter, potassium addition efficiently inhibited lithium influx in both yeast species. In conclusion, our results show that the maintenance of membrane potential, intracellular pH and efficiency of the cation transport process are factors that depend on *CgTrk1* and that interact and are linked to salt tolerance.

Our findings show that *CgTRK1* exerts a diversity of pleiotropic physiological roles. Moreover, taking into consideration that the corresponding protein is the only specific plasma membrane potassium transporter in *C. glabrata*, it is conceivable to imagine *CgTrk1* as an attractive pharmacological target for the development of new antifungal drugs.

**Acknowledgements** This work was supported by Grant Nos. XX and XXII Plan Propio Investigación, University of Córdoba (JR) and by Grant No. 16-03398S from the Czech Science Foundation (HS).

## Compliance with ethical standards

**Conflict interest** The authors declare that they have no conflict of interest.

## References

Ariño J, Ramos J, Sychrová H (2010) Alkali metal cation transport and homeostasis in Yeasts. *Microbiol Mol Biol Rev* 74:95–120

Ariño J, Ramos J, Sychrová H (2018) Monovalent cation transporters at the plasma membrane in yeasts. *Yeast*. <https://doi.org/10.1002/yea.3355>

Benito B, Garciadeblás B, Schreier P, Rodríguez-Navarro A (2004) Novel p-type ATPases mediate high-affinity potassium or sodium uptake in fungi. *Eukaryot Cell* 3:359–368

Bolotin-Fukuhara M, Fairhead C (2014) *Candida glabrata*: a deadly companion? *Yeast* 31:279–288

Dujon B, Sherman D, Fischer G et al (2004) Genome evolution in yeasts. *Nature* 430:34–35

Elicharová H, Hušeková B, Sychrová H (2016) Three *Candida albicans* potassium uptake systems differ in their ability to provide *Saccharomyces cerevisiae* *trk1trk2* mutants with necessary potassium. *FEMS Yeast Res* 16:1–10

Felcmanova K, Neveceralova P, Sychrova H, O (2017) Yeast Kch1 and Kch2 membrane proteins play a pleiotropic role in membrane potential establishment and monovalent cation homeostasis regulation. *FEMS Yeast Res* 17:fox053

Fitzpatrick DA, Logue ME, Stajich JE, Butler G (2006) A fungal phylogeny based on 42 complete genomes derived from supertree and combined gene analysis. *BMC Evol Biol* 6:99

Gabaldón T, Martin T, Marcet-Houben M et al (2013) Comparative genomics of emerging pathogens in the *Candida glabrata* clade. *BMC Genomics* 14:623

Gášková D, Brodská B, Heřman P, Vecer J, Malínský J, Sigler K, Benada O, Plásek J (1998) Fluorescent probing of membrane potential in walled cells: diS-C3(3) assay in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* 14:1189–1197

Gómez M, Luyten K, Ramos J (1996) The capacity to transport potassium influences sodium tolerance in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiol Lett* 135:157–160

Hazen KC (1995) New and emerging yeast pathogens. *Clin Microbiol Rev* 8:462–478

Hušeková B, Elicharová H, Sychrová H (2016) Pathogenic *Candida* species differ in the ability to grow at limiting potassium concentrations. *Can J Microbiol* 62:394–401

Kodedová M, Sychrová H (2015) Changes in the sterol composition of the plasma membrane affect membrane potential, salt tolerance and the activity of multidrug resistance pumps in *Saccharomyces cerevisiae*. *PLoS ONE* 10:e0139306

Llopis-Torregrosa V, Hušeková B, Sychrová H (2016) Potassium uptake mediated by Trk1 is crucial for *Candida glabrata* growth and fitness. *PLoS ONE* 11:e0153374

Madrid R, Gómez MJ, Ramos J, Rodríguez-Navarro A (1998) Ectopic potassium uptake in *trk1 trk2* mutants of *Saccharomyces cerevisiae* correlates with a highly hyperpolarized membrane potential. *J Biol Chem* 273:14838–14844

Marešová L, Hošková BJ, Urbánková E, Chaloupka R, Sychrová H (2010) New applications of pHluorin—measuring intracellular pH of prototrophic yeasts and determining changes in the buffering capacity of strains with affected potassium homeostasis. *Yeast* 27:317–325

Martínez J, Sychrova H, Ramos J (2011) Monovalent cations regulate expression and activity of the Hak1 potassium transporter in *Debaryomyces hansenii*. *Fungal Genet Biol* 48:177–184

Navarrete C, Petreszélyová S, Barreto L, Martínez JL, Zahrádka J, Ariño J, Sychrová H, Ramos J (2010) Lack of main K<sup>+</sup> uptake systems in *Saccharomyces cerevisiae* cells affects yeast performance in both potassium-sufficient and potassium-limiting conditions. *FEMS Yeast Res* 10:508

Perlroth J, Choi B, Spellberg B (2007) Nosocomial fungal infections: epidemiology, diagnosis, and treatment. *Med Mycol* 45:321–346

Prista C, Almagro A, Loureiro-Dias MC, Ramos J (1997) Physiological basis for the high salt tolerance of *Debaryomyces hansenii*. *Appl Environ Microbiol* 63:4005–4009

Pueyo C, Jurado J, Prieto-Alamo MJ, Monje-Casas F, López-Barea J (2002) Multiplex reverse transcription-polymerase chain reaction for determining transcriptional regulation of thioredoxin and glutaredoxin pathways. *Methods Enzymol* 347:441–451

Ramos J, Rodríguez-Navarro A (1986) Regulation and interconversion of the potassium transport systems of *Saccharomyces cerevisiae* as revealed by rubidium transport. *Eur J Biochem* 154:307–311

Ramos J, Haro R, Rodríguez-Navarro A (1990) Regulation of potassium fluxes in *Saccharomyces cerevisiae*. *BBA Biomembranes* 1029:211–217

Ramos J, Alijo R, Haro R, Rodríguez-Navarro A (1994) TRK2 is not a low-affinity potassium transporter in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Bacteriol* 176:249–252

- Ramos J, Ariño J, Sychrová H (2011) Alkali–metal–cation influx and efflux systems in nonconventional yeast species. *FEMS Microbiol Lett* 317:1–8
- Ribeiro de Carvalho R, Chaves Silva N, Cusinato M, Tranches Dias KS, Dos Santos MH, Viegas Junior C, Gonçalves Silva É, Tranches Dias AL (2018) Promising synergistic activity of fluconazole with bioactive Guttiferone-A and derivatives against non-albicans *Candida* species. *J Mycol Méd* 28:645–650
- Rodriguez-Navarro A, Ramos J (1984) Dual system for potassium transport in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Bacteriol* 159:940–945
- Shipston MJ (2014) Ion channel regulation by protein S-acylation. *J Gen Physiol* 143:659–678
- Xin H (2018) Effects of immune suppression in murine models of disseminated *Candida glabrata* and *Candida tropicalis* infection and utility of a synthetic peptide vaccine. *Med Mycol* 1:1. <https://doi.org/10.1093/mmy/myy122>
- Zayats V, Stockner T, Pandey SK, Wörz K, Ettrich R, Ludwig J (2015) A refined atomic scale model of the *Saccharomyces cerevisiae* K<sup>+</sup>-translocation protein Trk1p combined with experimental evidence confirms the role of selectivity filter glycines and other key residues. *BBA Biomembranes* 1848:1183–1195
- Zimmermannova O, Salzar A, Sychrova H, Ramos J (2015) The *Zygosaccharomyces rouxii* Trk1 is an efficient potassium transporter providing yeast cells with high lithium tolerance. *FEMS Yeast Res* 15:fov029

**Publisher's Note** Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

## Affiliations

Gabriel Caro<sup>1</sup> · Jan Bieber<sup>2</sup> · Francisco J. Ruiz-Castilla<sup>1</sup> · Carmen Michán<sup>3</sup> · Hana Sychrova<sup>2</sup> · José Ramos<sup>1</sup> 

<sup>1</sup> Department of Microbiology, University of Córdoba, 14071 Córdoba, Spain

<sup>2</sup> Department of Membrane Transport, Institute of Physiology, Czech Academy of Sciences, 142 20 Prague 4, Czech Republic

<sup>3</sup> Department of Biochemistry and Molecular Biology, University of Córdoba, 14071 Córdoba, Spain



**TÍTULO DE LA TESIS: Trk1 influye en el funcionamiento de diversos procesos fisiológicos en *Candida glabrata*.**

**DOCTORANDO/A: Gabriel Caro Ruiz**

**INFORME RAZONADO DEL/DE LOS DIRECTOR/ES DE LA TESIS**

(se hará mención a la evolución y desarrollo de la tesis, así como a trabajos y publicaciones derivados de la misma).

Esta tesis contiene resultados originales y de interés que contribuyen a la comprensión de la función del transportador Trk1 de *Candida glabrata* en la fisiología de esta levadura, un patógeno emergente, cada día más importante.

Parte de los resultados de la Tesis han sido presentados en Congresos Científicos Internacionales y en un artículo publicado en la revista World Journal of Microbiology and Biotechnology, en el que el doctorando figura como primer autor.

Por todo ello, se autoriza la presentación de la tesis doctoral.

Córdoba, 28 de mayo de 2020

Firma del/de los director/es



Fdo.: José Ramos Ruiz

Fdo.: \_\_\_\_\_

Fdo.: \_\_\_\_\_