



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

POSGRADO EN CIENCIAS EN BIOLOGÍA MOLECULAR

**“Estudio de la regulación de la *CTA1* (catalasa I)
de *Candida glabrata* en la respuesta a estrés
oxidativo”**

Tesis que presenta

Elizabeth Medina Castellanos

Para obtener el grado de

Maestra en Ciencias en Biología Molecular

Director de la Tesis:

Dr. Alejandro De Las Peñas Nava

San Luis Potosí, S.L.P., Agosto del 2010



Constancia de aprobación de la tesis

La tesis con el título "**Resistencia a estrés oxidativo y regulación de la catalasa I de *Candida glabrata***" presentada para obtener el grado de Maestra en Ciencias en Biología molecular fue elaborada por **Elizabeth Medina Castellanos** y aprobada el **20 de Agosto del 2010** por los suscritos, designados por el Colegio de Profesores de la División de Biología Molecular del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C.

Dr. Alejandro De Las Peñas Nava
Director de tesis

Dr. Ángel Gabriel Alpuche Solís
Asesor de tesis

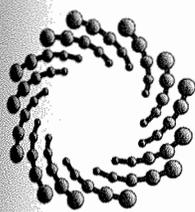
Dr. Juan Francisco Jiménez Bremont
Asesor de tesis



Créditos Institucionales

Este trabajo de tesis fue elaborado en el Laboratorio de Microbiología Molecular de la División de Biología Molecular del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A. C. bajo la dirección del Dr. Alejandro De Las Peñas Nava apoyado por el proyecto No. SEP-CB-2005-48279 de CONACyT.

Durante la realización del trabajo se recibió una beca académica del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología con número de registro 223334.



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

IPICYT

Acta Núm. 074

Nombre del Sustentante:

ELIZABETH MEDINA CASTELLANOS




Firma

Acta de Examen de Grado

En la ciudad de San Luis Potosí, a los 20 días, del mes de AGOSTO del año 2010, se reunió a las 17:00 horas, en las instalaciones del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C., el Jurado integrado por:

DR. ANGEL GABRIEL ALPUCHE SOUS PRESIDENTE
DR. JUAN FRANCISCO JIMENEZ BREMONT SECRETARIO
DR. ALEJANDRO DE LAS PEÑAS NAVA SINODAL

a fin de efectuar el examen, que para obtener el Grado de Maestro (a) en Ciencias en Biología Molecular, sustentó el (la)

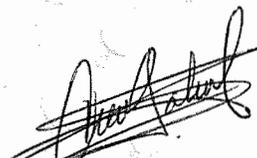
C. ELIZABETH MEDINA CASTELLANOS

sobre la Tesis intitulada: ESTUDIO DE LA REGULACION DE LA CTAT DE CANDIDA GLABRATA EN LA RESPUESTA A ESTRES OXIDATIVO

que se desarrolló bajo la dirección de: DR. ALEJANDRO DE LAS PEÑAS NAVA

El Jurado, después de deliberar, determinó: APROBARLA

Dándose por terminado el acto a las 19:00 horas, procediendo a la firma del Acta los integrantes del Jurado. Dando fé el Secretario Académico del Instituto.

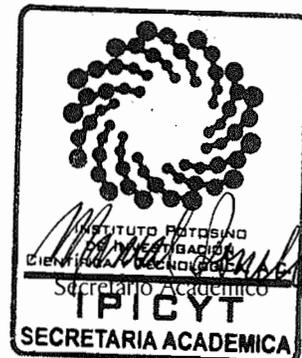

Presidente


Secretario


Sinodal

Sinodal

Sinodal



DEDICATORIAS

*Para mis padres María de Lourdes Castellanos Moreno,
José María Medina Gasca.
A mis hermanas Lulú y Stephanie Medina Castellanos.*

Solo tan alto como llegue puedo crecer, tan lejos como busque puedo ir, tan profundo como mire puedo ver y tanto como sueño podré ser.

Karen Ravn

Agradecimientos

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

Al Dr. Ángel Gabriel Alpuche Solís por su valiosa asesoría.

Al Dr. Juan Francisco Jiménez Bremont por su valiosa asesoría.

Al Dr. Alejandro De Las Peñas Nava por la aportación de valiosos conocimientos y enseñanzas.

A la Dr. Irene Castaño Navarro por su valiosa y pertinente asesoría.

Al Dr. Omar Elind Arroyo Helguera por su apoyo técnico en el presente trabajo.

A todos mis profesores y compañeros de la maestría de biología molecular generación 2008-2010.

A todos mis compañeros del laboratorio de Microbiología Molecular por sus conocimientos aportados al presente trabajo y consejos recibidos.

A mis padres por su cariño, comprensión y constante apoyo para cumplir una más de mis metas.

A mis hermanas María de Lourdes y Stephanie por su apoyo incondicional.

A Dios por llenar mi vida de dicha y de bendiciones.

ÍNDICE

	Página
Constancia de aprobación de la tesis	ii
Créditos institucionales	iii
Acta de examen	iv
Dedicatorias	v
Agradecimientos	vi
Lista de tablas	ix
Lista de figuras	x
Anexos	xi
Glosario	xii
Resumen	xiii
Abstract	xiv
I. INTRODUCCIÓN	1
1.1 Taxonomía y filogenia de <i>Candida glabrata</i>	2
1.2 Epidemiología <i>Candida glabrata</i>	4
1.3 Respiración y generación de Especies Reactivas de Oxígeno	7
1.4 La función principal del H ₂ O ₂	8
1.5 Catalasas	10
1.5.1 Catalasas monofuncionales	11
1.5.2 Catalasas-peroxidasas	12
1.6 Localización subcelular de las catalasas	13
1.7 Enzimas antioxidantes como factores de virulencia	16
1.8 Respuesta al estrés oxidativo en <i>Candida glabrata</i> y en <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	18
Justificación	22
Objetivos	23
II. MATERIALES Y MÉTODOS	

2.1 Medios de cultivo	24
2.2 Transformación de <i>Escherichia coli</i>	25
2.3 Precipitación de ADN	25
2.4 Aislamiento de ADN plasmídico	25
2.5 Extracción de ADN genómico de <i>C. glabrata</i> .	26
2.6 Construcción de las mutantes en los motivos putativos SKF de importación al peroxisoma	26
2.7 Transformación de levadura	28
2.8 Ensayos de sensibilidad a H ₂ O ₂	29
2.9 Medición de la fluorescencia de la proteína verde fluorescente (GFP) por citometría de flujo.	31
2.10 Análisis estadístico	32
2.11 Curvas de crecimiento	32
2.11 Curvas de viabilidad celular	32
III. RESULTADOS	
3.1 La catalasa se induce en presencia de oxidante	41
3.2 Los factores de transcripción Yap1p y Skn7p regulan la expresión de <i>CgCTA1</i> en fase exponencial durante estrés oxidativo	43
3.3 Yap1p y Skn7p son esenciales para el crecimiento celular durante estrés oxidativo	48
3.4 Los elementos de la expresión basal de la <i>CgCTA1</i> se encuentran dentro de 1 kb de la región promotora	51
3.5 Los motivos de importación al peroxisoma SKF149 y SKF373 pueden ser necesarios para la resistencia a H ₂ O ₂ <i>in vitro</i> .	53
3.6 La <i>CgCTA1</i> le confiere a <i>S. cerevisiae</i> una mayor resistencia a H ₂ O ₂ bajo el promotor fuerte <i>TEF-1</i>	55
3.7 La expresión de la catalasa de <i>C. glabrata</i> bajo el promotor de la catalasa peroxisomal de <i>S. cerevisiae</i> confiere mayor resistencia a H ₂ O ₂	56
3.8 El promotor de <i>CTA1</i> de <i>C. glabrata</i> es parcialmente funcional en <i>S. cerevisiae</i>	58
IV. DISCUSIÓN	62
V. CONCLUSIONES	72
VI. PERSPECTIVAS	73
Bibliografía	74

LISTA DE TABLAS

Tabla I	Microorganismos oportunistas causantes de micosis	4
Tabla II	Cepas de <i>Escherichia coli</i> usadas en este trabajo	33
Tabla III	Cepas de <i>C. glabrata</i> usadas en este trabajo	33
Tabla IV	Cepas de <i>S. cerevisiae</i> usadas en este trabajo	35
Tabla V	Plásmidos utilizados en este trabajo	37
Tabla VI	Oligonucleótidos utilizados en este trabajo	40

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Árbol filogenético de especies de <i>Candida</i> y <i>Saccharomyces</i> .	3
Figura 2	Distribución de hongos patógenos en centros médicos de EUA y Canadá.	6
Figura 3	Funciones principales del H ₂ O ₂ dentro de la célula.	9
Figura 4	Localización celular de la catalasa de <i>C. glabrata</i> .	15
Figura 5	Ensayos de sensibilidad a H ₂ O ₂ en <i>C. glabrata</i>	20
Figura 6	Sensibilidad a H ₂ O ₂ en la cepa <i>cta1Δ</i> durante fase estacionaria	21
Figura 7	Esquema de los fragmentos que contienen mutaciones puntuales en los motivos SKF generados por PCR	27
Figura 8	Protocolo de transformación de levadura por el método de acetato de litio	29
Figura 9	Esquema de los ensayos de sensibilidad a H ₂ O ₂ .	30
Figura 10	Inducción de la <i>CgCtA1</i> con diferentes concentraciones de H ₂ O ₂	42
Figura 11	Curva de crecimiento de la cepa silvestre a diferentes concentraciones de H ₂ O ₂	43
Figura 12	Inducción de la <i>CgCtA1</i> en las mutantes sencillas de los factores de transcripción <i>yap1Δ</i> , <i>skn7Δ</i> , <i>msn2Δ</i> y <i>msn4Δ</i>	45
Figura 13	Inducción de la <i>CgCtA1</i> en las cepas mutantes dobles <i>yap1Δskn7Δ</i> y <i>msn2Δmsn4Δ</i> .	47
Figura 14	Curvas de crecimiento de las mutantes sencillas <i>yap1Δ</i> , <i>skn7Δ</i> , <i>msn2Δ</i> y <i>msn4Δ</i> durante tratamiento con H ₂ O ₂	49
Figura 15	Curvas de crecimiento de las mutantes sencillas <i>yap1Δ</i> , <i>skn7Δ</i> , <i>msn2Δ</i> y <i>msn4Δ</i> y dobles durante tratamiento con H ₂ O ₂	50
Figura 16	Inducción de la <i>CgCtA1</i> de la cepa silvestre con los plásmidos P _{<i>CgCtA1</i>::GFP} (promotor de 1 kb) y P _{<i>CgCtA1CgCtA1</i>::GFP} (promotor de 4.5 kb).	52
Figura 17	Ensayos de resistencia a H ₂ O ₂ de las mutantes en los sitios de importación al peroxisoma SKF de la <i>CgCtA1</i>	54
Figura 18	Ensayos de resistencia a H ₂ O ₂ con las mutantes <i>cta1Δ</i> , <i>ctt1Δ</i> y <i>cta1Δctt1Δ</i> de <i>S. cerevisiae</i> con la construcción PTEF1 <i>CgCtA1-GFP</i> en fase estacionaria.	55
Figura 19	Ensayos de resistencia a H ₂ O ₂ con las mutantes <i>cta1Δ</i> , <i>ctt1Δ</i> y la doble mutante <i>cta1Δ ctt1Δ</i> de <i>S. cerevisiae</i> en fase estacionaria con PSc- <i>CgCtA1</i>	57
Figura 20	Ensayos de resistencia a H ₂ O ₂ con las mutantes <i>cta1Δ</i> , <i>ctt1Δ</i> y la doble mutante <i>cta1Δ ctt1Δ</i> de <i>S. cerevisiae</i> en fase estacionaria	60
Figura 21	Localización celular de la catalasa de <i>C. glabrata</i> en <i>S. cerevisiae</i> .	61
Figura 22	Modelo de la regulación de la catalasa de <i>C. glabrata</i>	71

ANEXOS

Figura 23	Viabilidad celular de la cepa silvestre	82
Figura 24	Inducción de la <i>CgCTA1</i> en las mutantes sencillas de los factores de transcripción <i>yap1Δ</i> , <i>skn7Δ</i> , <i>msn2Δ</i> y <i>msn4Δ</i> .	83
Figura 25	Inducción de la <i>CgCTA1</i> de la cepa wt $P_{CgCTA1}::GFP$.	84
Figura 26	Secuencias consenso de reguladores transcripcionales encontrados en la región intergénica de <i>CTA1</i> de <i>C.glabrata</i> y <i>S. cerevisiae</i> .	85
Figura 27	Sintenia de la catalasa de <i>C. glabrata</i> con las catalasas de <i>S. cerevisiae</i>	86
Figura 28	Alineamiento de aminoácidos de la región de dominio de unión a ADN de Yap1 y Skn7p	87
Figura 29	Estructura 3D de la catalasa de <i>C. glabrata</i> y de <i>S. cerevisiae</i> .	88

GLOSARIO

Árbol génico: Diagrama ramificado que representa las relaciones conocidas o inferidas de un grupo de genes o secuencias de aminoácidos históricamente relacionados.

Epistasis: Interacción entre los productos de dos genes en el cual un gen interfiere con la expresión del otro.

Filogenia: La secuencia de eventos involucrados en el desarrollo evolutivo de una especie o un grupo taxonómico de organismos.

Homólogo: Un gen relacionado a otro gen por descender de una secuencia ancestral de ADN.

Oportunista: Denota a un microorganismo que no causa ordinariamente una enfermedad, pero que bajo ciertas circunstancias o condiciones se vuelve patogénico.

Ortólogo: Genes en diferentes especies que evolucionaron a partir de un gen ancestral común por especiación. Normalmente, los genes ortólogos retienen la misma función a lo largo de la evolución.

Oxidante: es una sustancia química que pierde oxígeno o gana electrones en los procesos de oxidación-reducción. Una sustancia oxidante en una reacción química se reduce.

Parálogo: Genes relacionados por la duplicación dentro de un genoma. Por lo general genes parálogos evolucionan a nuevas funciones, incluso si están relacionadas a la original.

Patogenicidad: La capacidad potencial de producir una enfermedad o cambios patológicos en un hospedero.

Radical libre: Es un compuesto altamente reactivo que interacciona rápida y agresivamente con otras moléculas. Químicamente, son moléculas en cuya última órbita existe un electrón impar, inestable, altamente reactivo, que necesita quitar un electrón de otra molécula.

Sintenia: Es la localización conservada de genes en posiciones equivalentes en especies relacionadas con el mismo ancestro. También pueden expresarse como la conservación o coherencia del contenido de genes y su orden en los cromosomas de diferentes genomas.

Virulencia: El grado de patogenicidad de un agente infeccioso. Es una medida cuantitativa de la patogenicidad y representa la severidad de la infección.

RESUMEN

“Estudio de la regulación de la *CTA1* de *Candida glabrata* en la respuesta a estrés oxidativo”

Palabras clave: *Candida glabrata*, Especies Reactivas de Oxígeno (ERO), catalasa I (*CTA1*), estrés oxidativo, peróxido de hidrógeno (H_2O_2).

Candida glabrata es una levadura haploide no dimórfica más cercana filogenéticamente a *Saccharomyces cerevisiae*, levadura no patógena, que con *Candida albicans*. Parte del éxito de *C. glabrata* para sobrevivir en el hospedero, puede deberse a la habilidad para evadir eficientemente las **E**species **R**activas de **O**xígeno (ERO) producidas por las células fagocíticas. La única catalasa que posee *C. glabrata* (*CTA1*) le permite resistir a altas concentraciones de H_2O_2 (1000 mM) *in vitro*. *CgCTA1* se induce dentro de los macrófagos. *S. cerevisiae* posee dos isoenzimas de catalasa, una peroxisomal (Cta1p) y otra citosólica (Ctt1p) que son reguladas diferencialmente, sin embargo, *S. cerevisiae* no es tan resistente a H_2O_2 como *Candida glabrata* y *Candida albicans*. Estos datos sugieren que responder al estrés oxidativo juega un papel importante para la sobrevivencia de este patógeno en el hospedero.

Para determinar como se regula la catalasa de *C. glabrata* usamos dos fusiones con *GFP* como gen reportero: una traduccional $P_{CgCTA1}CTA1::GFP$ y otra transcripcional $P_{CTA1}::GFP$. La regulación transcripcional de la catalasa está mediada principalmente por los factores de transcripción Yap1p y Skn7p en fase exponencial durante estrés oxidativo, mientras que los factores Msn2p y Msn4p son importantes en fase estacionaria. Para caracterizar la importación de la Cta1p al peroxisoma realizamos mutaciones puntuales en los motivos internos de importación al peroxisoma SKF¹⁴⁹. La mutación SKF¹⁴⁹ y SKF³⁷³ son importantes para la función de la *CgCta1p*. Con el fin de comprobar si la *CgCta1p* le confiere a *S. cerevisiae* una resistencia mayor a H_2O_2 complementamos las mutantes de *S. cerevisiae* *cta1Δ*, *ctt1Δ* y *cta1Δctt1Δ* con $P_{ScCTA1}CTA1::GFP$. La *CgCta1p* le confirió una resistencia mayor a H_2O_2 en *S. cerevisiae*. Estos datos sugieren que la regulación de *CgCta1p* está finamente regulada durante estrés oxidativo y es altamente eficiente.

ABSTRACT

“Study of the regulation of *CTA1* from *Candida glabrata* in response to oxidative stress”

Key words: *Candida glabrata*, Reactive Oxidative Species (ROS), catalase I (*CTA1*), Oxidative stress, hydrogen peroxide (H_2O_2).

Candida glabrata is a haploid yeast closely related phylogenetically to *Saccharomyces cerevisiae*, a non-pathogenic yeast and distantly related to *Candida albicans*. *C. glabrata* has ability to survive inside the host may be due to its ability to efficiently evade killing by **R**eactive **O**xygen **S**pecies (ROS) produced by phagocytic cells.

C. glabrata has a single catalase (*CTA1*) and mediates resistance to high concentrations of H_2O_2 (1000 mM) *in vitro*. *CgCTA1* is induced inside macrophages. *S. cerevisiae* has two catalase genes which are regulated differentially. Cta1p is a peroxisomal catalase and Ctt1p is a cytosolic catalase, however, *S. cerevisiae* is not as resistant to H_2O_2 (100 mM) as *Candida* species. These results suggest that the oxidative stress response may be playing an important role in the survival of this pathogen in the host.

To determine the regulation of *CTA1*, we used a translational ($P_{CgCTA1}CTA1::GFP$) and transcriptional ($P_{CTA1}::GFP$) fusions with GFP as reporter gene. The transcriptional regulation of catalase is mediated mainly by Yap1p and Skn7p in exponential phase during oxidative stress whereas Msn2p and Msn4p are important in stationary phase. To characterize how *CgCTA1* is imported to the peroxisomes, we made point mutations in the putative peroxisome import motives SKF¹⁴⁹ and SKF³⁷³. The mutations SKF¹⁴⁹ and SKF³⁷³ are important for *CgCta1p* function. To determine whether the *CgCta1p* confers enhanced resistance in *S. cerevisiae* to H_2O_2 , we complemented *S. cerevisiae* mutant strains in *cta1Δ*, *ctt1Δ* and *cta1Δctt1Δ* with $P_{ScCTA1}CTA1::GFP$. The *CgCta1p* conferred increased resistance to H_2O_2 to *S. cerevisiae*. These data suggest that regulation of *CgCta1p* is finely regulated during oxidative stress and is highly efficient.

I. INTRODUCCIÓN

Ciertas especies del género *Candida* son comensales de humanos y se encuentran frecuentemente en el tracto gastrointestinal y genitourinario. Sin embargo, los individuos con el sistema inmunológico comprometido pueden adquirir infecciones causadas por patógenos oportunistas como *Candida sp.* que causan micosis superficial e infecciones sistémicas (Berman y Sudbery, 2002, Pfaller y Diekema, 2007).

Candida glabrata es un importante patógeno oportunista que se encuentra también como comensal en mucosas del tracto gastrointestinal, genitourinario y orofaríngeo. Su genoma está completamente secuenciado y está organizado en 13 cromosomas (12.3 Mb). *C. glabrata* es la segunda especie más común que causa candidiasis después de *C. albicans* (Trick *et al.*, 2002, Almirante *et al.*, 2005).

Las infecciones fúngicas han adquirido gran importancia a lo largo de estas últimas décadas. Su auge empieza a principios de los años 60, en que se establecen una serie de factores y acontecimientos que favorecieron el cambio de simple comensal a patógeno invasivo. A pesar de los recientes avances en el manejo y en el tratamiento de estas infecciones con antifúngicos la mortalidad de los pacientes con candidiasis es de un rango de 30-50 % (Viudes *et al.*, 2002, Pappas *et al.*, 2003).

1.1 Taxonomía y filogenia de *Candida glabrata*

C. glabrata es un organismo eucariote y está clasificado de la siguiente manera: Eukaryota; Fungi/grupo Metazoa; Fungi; Dirikaya; *Ascomycota*; *Saccharomycotina*; *Saccharomycetes*; *Saccharomycetales*; *Saccharomycetales mitosporico*; *Candida*. La especie-forma *C. glabrata* se clasificó inicialmente como *Cryptococcus glabratus* por Anderson en 1917 y se reclasificó en 1938 como *Torulopsis glabrata* (van der Walt *et al.*, 1978). La creación del género *Torulopsis*, distinto de *Candida*, se debió principalmente a que *Torulopsis* no presentaba blastoconidios capaces de formar pseudomicelio o hifas verdaderas, ni en los tejidos que parasita ni en los cultivos. Actualmente, estas características se consideran insuficientes para diferenciar dos géneros. Es por esto que desde 1978, se propuso su integración en el género *Candida*. Basado en su secuencia genómica, se ha propuesto, dado que se encuentra en el clado de *Saccharomyces cerevisiae*, que se llame *Saccharomyces glabrata*.

C. glabrata es una levadura que forma colonias lisas de consistencia blanda y de color crema, mide aproximadamente de 1 a 4 μm y es más pequeña que *C. albicans* que mide de 4 a 6 μm y que *S. cerevisiae* que mide de 5 a 10 μm (Fidel *et al.*, 1999). Presentan formas individuales ovoides y en condiciones de limitación de nitrógeno se ha demostrado que es capaz de formar pseudohifas o pseudomicelio (Csank y Haynes, 2000). La gemación es multilateral, no produce cápsula ni artrosporas, y tampoco se han descrito esporas sexuales (Csank y Haynes, 2000).

Filogenéticamente *C. glabrata* se ubica dentro del clado cercano a *S. cerevisiae*, levadura no patógena (**Fig. 1**). En cambio *C. albicans*, principal organismo aislado de infecciones superficiales y de infecciones sistémicas en humanos (Kaur *et al.*, 2005, Pfaller y Diekema, 2007) se encuentra dentro de un clado distante de *C. glabrata*. Esto sugiere que *C. glabrata* y *C. albicans* se hayan originado de ancestros independientes ya que se ha mostrado que los ciclos de vida asexual de

las dos especies son distintos, posiblemente debido a la asociación de estos organismos en el hospedero y a una evolución independiente (Wong *et al.*, 2003). A pesar de la lejanía filogenética derivan en una virulencia similar (Kaur *et al.*, 2005). Se estima que hace 100 millones de años ocurrió un evento de duplicación genómica en el ancestro de *C. glabrata* y *S. cerevisiae*, aun así *C. glabrata* conserva un menor número de bloques génicos duplicados que *S. cerevisiae* por lo que se ha sugerido que fue objeto de una evolución reductiva como resultado de su interacción con los hospederos (Dujon *et al.*, 2004).

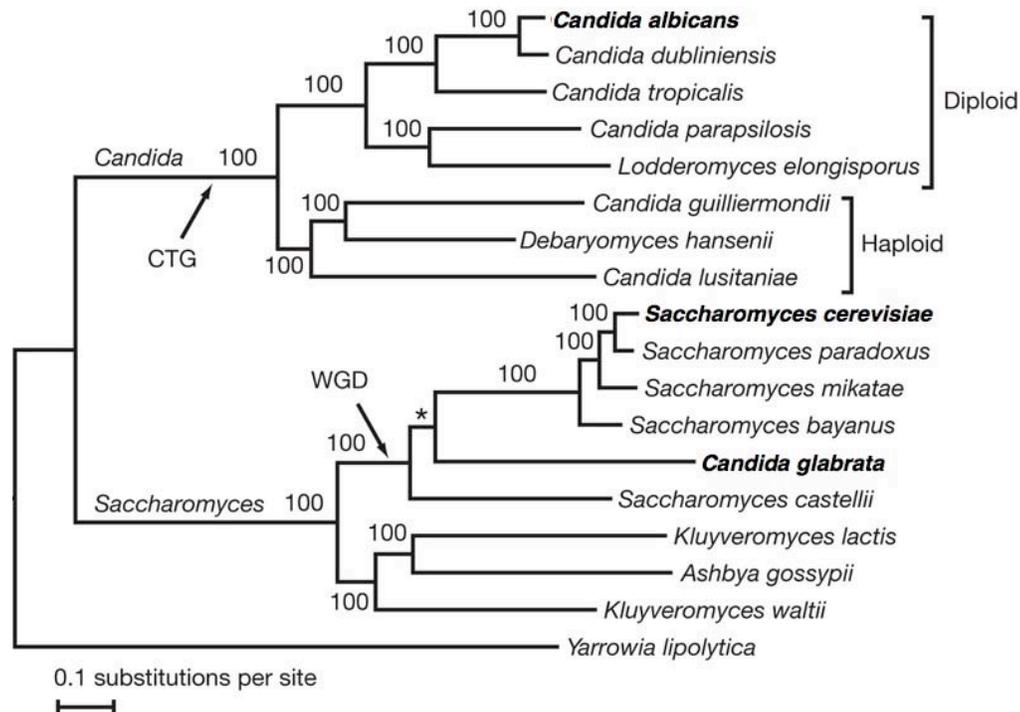


Figura 1. Árbol filogenético de especies de *Candida* y *Saccharomyces*.

El análisis está basado en secuencias peptídicas de 706 genes de *S. cerevisiae* y los ortólogos de cada una de las 17 especies. A partir de los alineamientos peptídicos, la filogenia se infirió por un programa Bayesiano (MrBayes). La leyenda CTG hace referencia a que todas las especies del clado de *Candida* utilizan este codón para traducir serina en vez de leucina. También se indica el evento de la duplicación genómica ancestral (WGD) y la rama construida en base a la conservación sinténica (*). Tomada y modificada de (Butler *et al.*, 2009).

1.2 Epidemiología de *Candida glabrata*

Con el incremento en el número de pacientes inmuno-comprometidos en hospitales y el uso indiscriminado de profilácticos, el número de aislados de hongos patógenos oportunistas se ha incrementado significativamente. A pesar de un gran número de hongos patógenos, la principal causa de infecciones invasivas por hongos en todo el mundo es ocasionada por la especie *Candida spp.* (Tabla I) (Pfaller y Diekema, 2007).

Tabla I. Microorganismos oportunistas causantes de micosis

Organismo	No. de casos/millón/año	Casos/fatalidad (%)
Levaduras		
Especies de <i>Candida</i>	72.8	33.9
<i>C. albicans</i>		
<i>C. glabrata</i>		
<i>C. parapsilosis</i>		
<i>C. tropicalis</i>		
<i>C. krusei</i>		
<i>C. lusitaniae</i>		
<i>C. rugosa</i>		
<i>C. guilliermondii</i>		
<i>C. inconspicua</i>		
<i>C. norvegensis</i>		
Especies de <i>Cryptococcus</i>	65.5	12.7
Otras levaduras		
Hongos hialinos		
Especies de <i>Aspergillus</i>	12.4	23.3
Zygomycetos	1.7	30.0
Otros hialohifomicetos	1.2	14.3
Hongos demátiaceos	1.0	0
<i>Pneumocystis jiroveci</i>		

Datos tomados de Pfaller y Diekema (2007).

Las especies del género *Candida* son la tercera causa de infecciones sistémicas en los Estados Unidos y están asociadas con los más altos índices de mortalidad entre 30 % y 81 % de todas las infecciones nosocomiales en EUA (Morgan, 2005, Chen *et al.*, 2006) y en todo el mundo (Wisplinghoff *et al.*, 2004, Pfaller y Diekema, 2007). Otro reporte reciente realizado en varios centros médicos de Estados Unidos y Canadá durante el 2006 mediante un registro de base de datos de pacientes con infecciones invasivas fúngicas (Prospective Antifungal Therapy Alliance (PATH Alliance[®]), muestra que las especies *Candida spp.* representan el mayor número de casos de infecciones sistémicas (73 %) seguido por *Aspergillus spp.* (14 %) (**Fig. 2**).

El tratamiento para la candidiasis ha sido muy variado y desde 1990 se utiliza principalmente el fluconazol (Baddley *et al.*, 2008). En los Estados Unidos ha surgido un notable cambio en la epidemiología de las infecciones sistémicas causadas por *C. albicans* y un notable incremento vinculado con ciertas especies diferentes a *C. albicans*, en particular *C. glabrata* (Baddley *et al.*, 2001, Trick *et al.*, 2002, Pfaller *et al.*, 2009).

En un estudio de susceptibilidad a fluconazol de aislados de *C. glabrata* durante 2001-2007 mostró que la frecuencia de aislados se incrementa conforme a la edad del paciente. En el grupo de ≥ 80 años se obtuvo la más alta proporción de aislados causantes de infecciones sistémicas de las cuales 32 % pertenecieron a *C. glabrata*. Esto se debe probablemente a que en personas de mayor edad sea más común el uso de profilácticos o que tengan el sistema inmuno-comprometido debido al transplante de un órgano (Pfaller *et al.*, 2009). Estudios recientes muestran que la prevalencia de *C. glabrata* como causa de infecciones sistémicas es potencialmente relacionada con varios factores como el uso del fluconazol, características geográficas que provocan variabilidad en la susceptibilidad a infecciones fúngicas (Almirante *et al.*, 2005, Arendrup *et al.*, 2008) y edad del paciente (Pfaller y Diekema, 2007, Horn *et al.*, 2009). *Candida krusei* también ha

presentado un incremento en su prevalencia debido a su resistencia innata al fluconazol (Nace *et al.*, 2009).

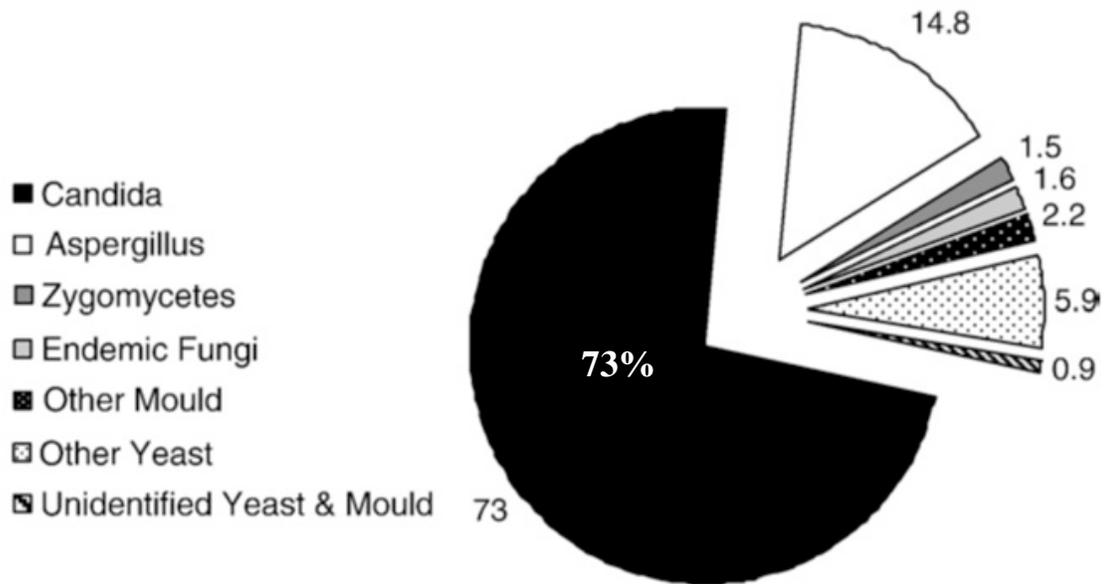


Figura 2. Distribución de hongos patógenos en centros médicos de EUA y Canadá. Los datos obtenidos de 2300 pacientes con infecciones sistémicas durante el mes de Octubre del 2006 (Horn *et al.*, 2009).

Un estudio sobre infecciones sistémicas realizado en la ciudad de Monterrey, en cinco hospitales, durante los años 2004 y 2007, con grupos de pacientes de diferentes edades, encontró que *C. parapsilopsis* presentó la mayor prevalencia para los grupos de 1 a 14 años. *C. albicans* y *C. glabrata* presentaron mayor incidencia en los grupos de personas de mayor edad, de 45 a 64 años (Gonzalez *et al.*, 2008).

1.3 Respiración y generación de Especies Reactivas de Oxígeno

Una especie reactiva de oxígeno o un radical libre es una molécula o átomo que contiene electrones no apareados y tiene en uno de sus orbitales externos únicamente un electrón que “elige” su número cuántico y puede variar. Gracias a este electrón no apareado los radicales libres son habitualmente inestables y altamente reactivos, aunque el nivel de estabilidad varía ampliamente.

Las **E**species **R**activas de **O**xígeno (ERO) incluyen, el oxígeno singulete, el anión superóxido (O_2^-), el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y el radical hidroxilo ($OH\cdot$). Estas ERO son potentes oxidantes que pueden tener un electrón desapareado (por ejemplo radicales libres como O_2^- y el $OH\cdot$). La respiración mitocondrial se considera la primera fuente intracelular de producción de ERO, ya que durante la respiración, la fosforilación oxidativa crea un flujo de electrones a través de la cadena respiratoria. Este flujo establece un gradiente de protones a través de la membrana interna mitocondrial, el cual se usa como fuente de energía para la síntesis de ATP. En el paso final de la cadena de transferencia de electrones, el complejo de la citocromo c oxidasa (complejo IV) completa la reducción del O_2 a agua sin la formación de radicales de oxígeno. Sin embargo, la reducción parcial del O_2 puede ocurrir si el O_2 interactúa con la cadena de transferencia de electrones río arriba del complejo IV. Algunos electrones pueden escapar de la cadena de transferencia de electrones especialmente de los complejos I y III, y reaccionar con el O_2 para formar O_2^- (Balaban *et al.*, 2005).

Las ERO causan daño a lípidos, proteínas y ADN. La generación de radicales libres, como consecuencia del metabolismo aeróbico, tiene efectos en la célula. Primero, la célula genera cronológicamente especies pro-oxidantes; segundo, las células sufren daño oxidativo con el tiempo (estrés oxidativo); tercero, las ERO inducen senescencia y apoptosis celular; y finalmente, las ERO, senescencia y apoptosis están mecánicamente vinculadas a enfermedades degenerativas

asociadas con el envejecimiento (Harman, 1998, Giorgio *et al.*, 2007).

Los organismos aeróbicos han desarrollado mecanismos enzimáticos y no enzimáticos para mantener el balance del estado redox en las células. Los mecanismos enzimáticos incluyen enzimas como superóxido dismutasas, catalasas, glutatión peroxidadasas, glutatión reductasas y mecanismos no enzimáticos incluyen glutatión, vitamina A, C y E, urato o bilirubina (Giorgio *et al.*, 2007).

1.4 La función principal del H₂O₂

El peróxido de hidrógeno, H₂O₂, además de ser una Especie Reactiva de Oxígeno, puede funcionar como molécula de señalización debido a su estabilidad (ya que no se considera un radical libre) y puede inducir modificaciones en las proteínas. El H₂O₂ en humanos, está directamente implicado en la regulación fisiológica de la transducción de señales mediante la activación de receptores de factores de crecimiento (Valko *et al.*, 2007). En hongos, el H₂O₂ participa en la regulación de la germinación, desarrollo y comunicación intracelular en hongos (Gessler *et al.*, 2007). Por ejemplo se ha demostrado que el H₂O₂ oxida directamente las proteínas cistein-tiol induciendo la formación de puentes disulfuro y ácidos sulfénicos e induce la glutatiónilación de residuos de cisteína o sulfoxidación de residuos de metionina en varias moléculas blanco. Estas moléculas incluyen factores de transcripción como OxyR y OhrR en bacterias (Choi *et al.*, 2001); Yap1, Pap1 y la cinasa Sty1 en levaduras (Vivancos *et al.*, 2004).

El H₂O₂ es permeable y difusible a la membrana, es menos reactivo que OH⁻ y que el O₂⁻, con un tiempo de vida media de 10⁻⁵ segundos, mayor que OH⁻ (10⁻⁹ s) y el O₂⁻ (10⁻⁶ s). Las concentraciones fisiológicas intracelulares parecen ser notoriamente conservadas en las diferentes formas de vida. En *E. coli* la concentración intracelular de H₂O₂ es constante ≈ 0.2 μM apesar de las fluctuaciones de las

actividades metabólicas y llega a ser tóxico alrededor de $\geq 0.5 \mu\text{M}$ (Seaver y Imlay, 2001). Llama la atención que entre las ERO, el peróxido de hidrógeno es la única de las especies que se genera por varias enzimas específicas (**Fig. 3**). Esto sugiere que la concentración intracelular de H_2O_2 debe regularse adecuadamente y puede servir como señal para funciones celulares específicas.

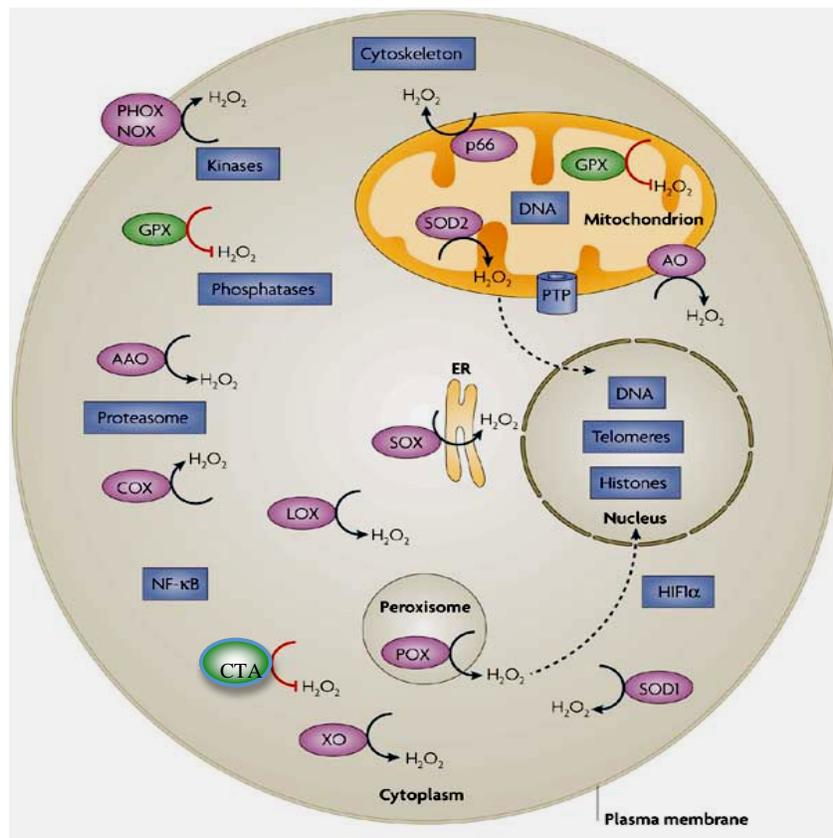


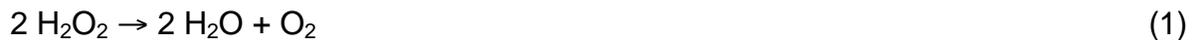
Figura 3. Funciones principales del H_2O_2 dentro de la célula.

Muchos sistemas enzimáticos (indicados en púrpura) generan peróxido de hidrógeno en diferentes compartimentos celulares. Estás incluyen oxidasas fagocíticas (PHOX) y NADP/H oxidasas (NOX) en la membrana plasmática; superóxido dismutasas (*SOD2*), mitocondrial p66^{Snc} (*p66*) y amino oxidasa (*AO*) en mitocondria; oxidasas peroxisomales (*POX*) en peroxisomas; sulfidril oxidasa (*SOX*) en el retículo endoplasmático (*ER*); y amino-acido oxidasas, cicloxigenasa (*COX*), oxigenasa lipídica (*LOX*), xantina oxidasa (*OX*) y superóxido dismutasas (*SOD1*) en el citosol. Muchas macromoléculas son blanco del H_2O_2 incluyendo actina, miosina, tubulina (citoesqueleto), diferentes cinasas, muchas Ser/Thr y Tyr fosfatasa, el proteosoma, la transición de permeabilidad mitocondrial del poro (*PTP*), ADN mitocondrial y nuclear, factores de transcripción tales como *HIF1 α* o el factor nuclear (*NF*)- κ B y las histonas y telómeros. La catalasa (*CTA*) y glutatión peroxidasa (*GPX*) evitan la acumulación de oxidaciones no específicas (Giorgio *et al.*, 2007).

1.5 Catalasas

Las catalasas o hidropoxidasas son metaloenzimas capaces de degradar el H₂O₂ a agua y oxígeno molecular con velocidades máximas de recambio que se encuentran en un rango de 54,000 a 833,000 reacciones por segundo.

La catalasa lleva a cabo la siguiente reacción:



Las catalasas están conformadas por un grupo hemo que contiene un átomo de hierro ferroso y un anillo de porfirina, tetrapirrol cíclico, en cada subunidad para formar el sitio activo de la enzima (Chelikani *et al.*, 2004).

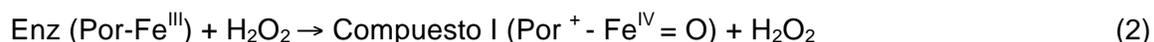
Son muy estables con alta resistencia a proteólisis y esto se considera como una ventaja evolutiva. Durante la evolución celular, la rapidez y eficiente dismutación mediante varias oxidoreductasas ha sido de gran importancia. Las células no solo evolucionaron con enzimas capaces de realizar la dismutación eficiente de H₂O₂, sino también con enzimas que reducen peróxido de hidrógeno con la ayuda de varios donadores de electrones orgánicos e inorgánicos de uno o dos electrones (hemo peroxidases y peroxidases no hemo, como las peroxiredoxinas) (Bernroitner *et al.*, 2009).

En la naturaleza han evolucionado tres familias de proteínas que catalizan esta dismutación a velocidades razonables. Dos de estas familias incluyen enzimas que contienen el grupo hemo: 1) las típicas catalasas o **monofuncionales** que a su vez se clasifican en catalasas de subunidades grandes (> 75 kDa) y las de subunidades pequeñas (< 60 kDa). Las catalasas monofuncionales son el grupo más abundante en Eubacterias, Archaeas, Protista, Fungi, Plantae y Animalia. 2) las catalasas-peroxidases o **bifuncionales** además de usar el H₂O₂ como sustrato pueden degradar compuestos orgánicos que funcionan como donadores de electrones

(Chelikani *et al.*, 2004). En su mayoría se encuentran en bacterias y archaeas (Singh *et al.*, 2008). Las catalasas-peroxidases no están presentes en plantas ni en animales. En hongos existen dos grupos distintos de catalasas-peroxidases (KatGs) extracelulares e intracelulares y difieren en su localización, estructura y propiedades funcionales (Zamocky *et al.*, 2009). Un análisis de transferencia lateral entre bacterias y hongos, revela que el origen más probable de estas KatGs es un predecesor del filo de bacterias bacteroidetes y la adquisición de KatGs está relacionada con la (fito) patogenicidad de hongos (Zamocky *et al.*, 2009) 3) El tercer grupo son las **catalasas-manganeso** es un grupo menor e incluye familias de proteínas bacterianas que contienen dimanganeso en el sitio activo y regularmente también son conocidas como pseudocatalasa. Además existe un diverso grupo de proteínas tales como cloroperoxidasas, peroxidases de plantas y mioglobina que exhiben niveles muy bajos de actividad de catalasa. Esta actividad se debe a que contienen el grupo hemo, el cual desempeña el papel de actividad catalítica (Chelikani *et al.*, 2004). Los tres grupos difieren significativamente en la arquitectura del sitio activo y en el mecanismo de reacción.

1.5.1 Catalasas monofuncionales

Las catalasas monofuncionales degradan un solo tipo de sustrato que es el H₂O₂. Todas las Hemo-catalasas tienen un mecanismo común en dos pasos para la degradación del H₂O₂ en el cual el peróxido de hidrógeno oxida y reduce alternativamente al hierro del grupo hemo. En el primer paso, una molécula de peróxido de hidrógeno oxida al grupo hemo a una especie oxiferril, compuesto I, (reacción 2)



La segunda molécula de peróxido de hidrógeno se utiliza como reductante del compuesto I para regenerar el estado de la enzima, y da como resultado agua y

oxígeno (reacción 3)



Aún cuando esta reacción es muy simple, existen grandes diferencias en la capacidad de reacción entre los miembros de esta familia de enzimas (Chelikani *et al.*, 2004).

Las estructuras de las catalasas monofuncionales contienen residuos esenciales conservados en el sitio activo y una estructura primaria muy conservada (Rocha y Smith, 1995). Otra característica que presentan estas enzimas son la inactivación enzimática mediante 1,2,4-aminotriazol, la no reducibilidad del grupo hemo con ditionito y la actividad óptima en un rango de pH de 4 y 10 (Chelikani *et al.*, 2004).

1.5.2 Catalasas-peroxidasas

Estas enzimas además de degradar el H_2O_2 pueden utilizar una variedad de sustratos orgánicos en especial el etanol, que puede actuar como donador de hidrógeno.

La reacción global de las catalasas-peroxidasas se lleva a cabo en dos pasos al igual que las catalasas monofuncionales (reacción 2 y 3) a pesar de las diferencias entre estas catalasas, la razón de esto es en parte porque ambos tipos de enzimas contienen un grupo hemo y los residuos del sitio activo están conservados (Chelikani *et al.*, 2004). La reacción de peroxidación representa otro mecanismo que involucra la presencia de donadores de electrones inorgánicos para la reducción del compuesto I y la regeneración de la enzima mediante la transferencia de dos electrones (reacción 4).



En la presencia de un donador de electrones orgánico adecuado y bajos niveles de H_2O_2 , la reacción de peroxidación se vuelve significativamente mayor. La

inhibición de la enzima por azida y cianida es una propiedad que también exhiben las catalasas bifuncionales (Chelikani *et al.*, 2004).

1.6 Localización subcelular de las catalasas

El importe de proteínas a los diferentes organelos de las células eucariotas se lleva a cabo mediante el reconocimiento de secuencias específicas en la proteína. Estas secuencias dirigen a cualquier proteína hacia un organelo en particular. Las proteínas peroxisomales están codificadas por genes nucleares sintetizadas mediante poliribosomas libres, traducidas e importadas dentro de los peroxisomas mediante secuencias señal (PTSs) que son reconocidas por sus correspondientes receptores. Las PTSs son necesarias y suficientes para dirigir proteínas al peroxisoma. Al menos tres tipos de PTSs son conocidas: un tripéptido en el C-terminal PTS1 (Gould *et al.*, 1989); un péptido en el N-terminal PTS2, y un mPTS, el cual es específico para proteínas integrales de membrana peroxisomales (Glover *et al.*, 1994, McCammon *et al.*, 1994). En todas las células eucariotas, los peroxisomas y la mitocondria comparten una gran variedad de reacciones enzimáticas que son catalizadas mediante enzimas presentes en estos organelos (Makkar *et al.*, 2006). La importancia bioquímica de la actividad de estas enzimas es que participan en reacciones del ciclo del ácido tricarbóxico, la β -oxidación de ácidos grasos y el ciclo del glioxilato. También existen enzimas presentes en ambos organelos involucradas en la detoxificación de ERO tales como la superóxido dismutasa, glutatión peroxidasa y las catalasas (Purdue y Lazarow, 2001). La función de la catalasa en el peroxisoma es eliminar el H_2O_2 generado por la β -oxidación y durante el transporte de electrones en la cadena respiratoria mitocondrial. Es esencial la actividad de esta enzima en ambos organelos (Purdue y Lazarow, 2001).

La actividad de las catalasas en estos organelos es esencial en presencia de

fuentes de carbono no fermentables (etanol, metanol ácido oléico). La catalasa de *Candida boidinii*, más cercana filogenéticamente a *C. albicans* que a *C. glabrata* (Suh *et al.*, 2006), se localiza en los peroxisomas y en el citosol en presencia de metanol como fuente de carbono y el transporte al peroxisoma se determina por la secuencia PTS1 –NKF en el C-terminal (Horiguchi *et al.*, 2001). En hongos filamentosos la localización de la catalasa se determina por las condiciones ambientales y fisiológicas, durante el desarrollo y en la formación de micelio (Gessler *et al.*, 2007) y en hongos patógenos como *Paracoccidioides brasiliensis* hay un incremento en la expresión de la catalasa P, la cual se induce en la forma infectiva de levadura y la catalasa A se induce en ácido oléico como fuente de carbono (Chagas *et al.*, 2008). En *Histoplasma capsulatum* la catalasa B es excretada y posiblemente juegue un papel importante en la virulencia (Zancoppe-Oliveira *et al.*, 1999). En *Neurospora crassa* las cuatro catalasas que posee están involucradas en las distintas etapas del desarrollo del hongo y no presentan actividad de catalasa en microcuerpos (Schliebs *et al.*, 2006).

La localización intracelular de catalasa de *C. glabrata* depende de condiciones de estrés nutricional ya que en fuentes de carbono no fermentables y en presencia de estrés oxidativo la catalasa se acumula en los peroxisomas, sin embargo, a bajas concentraciones de H₂O₂ la catalasa se encuentra en el citoplasma (Roetzer *et al.*, 2009) y **(Fig. 4)**. La presencia de pequeños puntos fluorescentes indica posiblemente la localización de la CgCta1p en la mitocondria o en los peroxisomas **(Fig. 4)**. La proteína CgCta1 contiene dos motivos putativos internos SKF (Serina, Lisina, Fenilalanina) y un tripéptido PTS1 en el C-terminal AKI (Alanina, Lisina, Isoleucina). El tripéptido AKI en el C-terminal se ha reportado como esencial para importación de la catalasa al peroxisoma en *Candida tropicalis* (Aitchison *et al.*, 1991). Sin embargo, la catalasa peroxisomal Cta1p de *S. cerevisiae* contiene dos secuencias PTS1 y PTS2, una interna y otra en el C-terminal, de las cuales solo la secuencia SKF interna es esencial para la importación al peroxisoma (Kragler *et al.*, 1993).

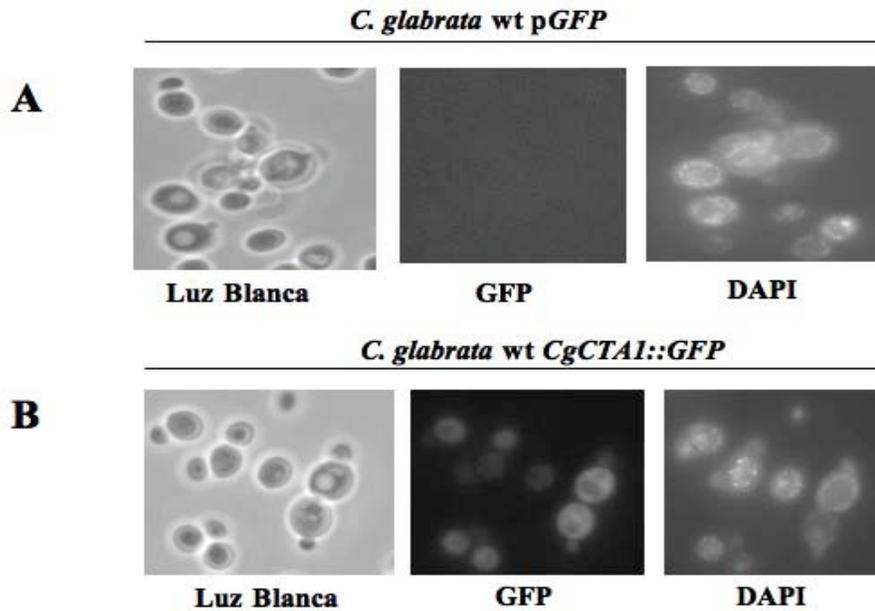


Figura 4. Localización celular de la catalasa de *C. glabrata*.

La localización fue determinada por microscopía de fluorescencia. Las células se incubaron 2 horas en medio CAA sin H₂O₂, posteriormente fueron teñidas con DAPI (1µg mL⁻¹) por 5 min. A) La cepa silvestre fue transformada con el plásmido que contiene *GFP* sin promotor. B) La cepa silvestre fue transformada con el plásmido que contiene P_{CgCTAI}CgCTAI::*GFP* (pMC18) (Datos del laboratorio).

1.7 Enzimas antioxidantes como factores de virulencia

La primera línea de defensa del hospedero contra infecciones por hongos, son las células fagocíticas, macrófagos, células dendríticas y neutrófilos (Mansour y Levitz, 2002). Estas células generan ERO como el ion superóxido (O_2^-), el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y radicales hidroxilo (OH^-) que dañan las biomoléculas y destruyen al patógeno (Thorpe *et al.*, 2004)

Todos los organismos aerobios poseen mecanismos enzimáticos y no enzimáticos para mantener bajos los niveles intracelulares de ERO que se generan normalmente por el metabolismo aeróbico. Precisamente estos mecanismos enzimáticos y no enzimáticos son utilizados por patógenos para su sobrevivencia dentro del hospedero. Su adaptación a ambientes hostiles es extremadamente importante. Durante la fagocitosis los patógenos, como bacterias y hongos, son expuestos al estallido respiratorio de neutrófilos y macrófagos (Roetzer *et al.*, 2009). Los patógenos responden con distintos mecanismos de protección: a) suprimen la producción de EROs, b) evitan el contacto con EROs, c) y/o neutralizan las EROs y esto les permite contender contra las defensas del hospedero (Tsunawaki *et al.*, 2004, Allen *et al.*, 2005, Wellington *et al.*, 2009). Por ejemplo hay hongos patógenos que han mostrado una alta resistencia a estrés oxidativo (Xie *et al.*, 1997, Cuellar-Cruz *et al.*, 2008, Cuellar-Cruz *et al.*, 2009, Nikolaou *et al.*, 2009).

Las superóxido dismutasas, catalasas, peroxirredoxinas, glutatión peroxidasa y thioredoxinas son enzimas responsables de la resistencia al estrés oxidativo en la mayoría de los microorganismos, se caracterizan por la presencia de iones metálicos como catalizadores como el cobre, zinc, manganeso, hierro y selenio (Gessler *et al.*, 2007). La superóxido dismutasa tiene un papel importante durante la infección en el hospedero. En el hongo patógeno *C. neoformans* la mutante *sod2Δ*

es avirulenta en un modelo murino de cryptococcosis (Giles *et al.*, 2005, Narasipura *et al.*, 2005) y la falta del gen *TRX1* que codifica para una tioredoxina reductasa causa la pérdida de la patogenicidad (Missall y Lodge, 2005). En *C. albicans* las células mutantes en *Sod1p*, *Sod5p* y *Sod4p* son sensibles a macrófagos (Hwang *et al.*, 2002, Frohner *et al.*, 2009) y la glutatión reductasa (*Grx2*) es necesaria para la formación de hifas y virulencia (Chaves *et al.*, 2007).

La catalasa ha sido considerada un factor de virulencia en bacterias patógenas, tales como *Edwardsiella tarda* (Srinivasa Rao *et al.*, 2003), *Mycobacterium tuberculosis* (Manca *et al.*, 1999), *Pseudomonas aeruginosa* (Lee *et al.*, 2005) y *Staphylococcus aureus* (Martinez-Pulgarin *et al.*, 2009). La presencia de catalasa les permite sobrevivir en el hospedero. También las catalasas juegan un papel importante en respuesta a ambientes contaminados (Buckova *et al.*, 2010). Se ha reportado que las catalasas juegan también un papel importante en la virulencia de hongos patógenos. La catalasa de *C. glabrata* (*CgCTA1*) se induce dentro de los macrófagos (Roetzer *et al.*, 2009), sin embargo, la mutante en *CTA1* no mostró efecto en la virulencia en un modelo murino de infección sistémica (Cuellar-Cruz *et al.*, 2008). En *C. albicans* la catalasa es considerada un importante factor de virulencia ya que la disrupción de este gen genera una cepa con virulencia atenuada (Wysong *et al.*, 1998, Chauhan *et al.*, 2006) y es incapaz de formar hifas (Nakagawa *et al.*, 2003, Nakagawa, 2008). En *Aspergillus fumigatus* la doble mutante *cat1Δcat2Δ* exhibió una infección retrasada en un modelo murino de aspergillosis (Paris *et al.*, 2003). Sin embargo, mutantes de *C. neoformans* en *cat1Δ* y *cat1Δcat2Δcat3Δcat4Δ* no afectaron la virulencia (Giles *et al.*, 2005).

Esto sugiere que los patógenos deben poseer una robusta respuesta antioxidante compuesta de elementos funcionales e inclusive redundantes que le ayuden a sobrevivir en el hospedero.

1.8 Respuesta al estrés oxidativo en *Candida glabrata* y en *Saccharomyces cerevisiae*

La regulación de la respuesta a estrés oxidativo se lleva a cabo a través de proteínas que detectan el estrés y estas son responsables de generar la respuesta. Esta respuesta genera cambios en la transcripción de genes o cambios a nivel de traducción de proteínas o afectar su estabilidad.

En condiciones específicas de estrés oxidativo, *S. cerevisiae* activa un programa de expresión génica controlado principalmente por los factores transcripcionales Yap1p, Skn7p, Msn2p y Msn4p. Además, para reparar el daño celular, se arresta el ciclo celular dependiente del factor Rad9p (Flattery-O'Brien y Dawes, 1998).

La respuesta transcripcional al estrés oxidativo de *C. glabrata* está regulada principalmente por los factores transcripcionales: Yap1p, Skn7p, Msn2p y Msn4p (Cuellar-Cruz *et al.*, 2008, Roetzer *et al.*, 2008, Roetzer *et al.*, 2009) tanto en fase exponencial como en fase estacionaria (**Fig. 5A-B**).

Recientemente se ha demostrado que el factor de transcripción Skn7p tiene un papel importante en la virulencia de *C. glabrata* (Saijo *et al.*, 2010). En *C. albicans* la mutante *skn7Δ* es sensible a H₂O₂ y su virulencia es atenuada moderadamente (Singh *et al.*, 2004).

En *S. cerevisiae* el factor de transcripción Yap1p, un factor transcripcional que contiene un dominio de unión a ADN de zipper de leucina y reconoce cajas de unión específicas (YRE), juega un papel importante en la activación de genes en respuesta a estrés oxidativo (Moye-Rowley *et al.*, 1989, Toone y Jones, 1999). La actividad de Yap1p se regula por los factores Gpx3, Ybp1 y Tsa1. En otras levaduras se ha reportado que factores homólogos a Yap1p regulan directamente genes involucrados con estrés oxidativo tales como la catalasa: en

Schizosaccharomyces pombe se ha reportado la participación del factor Pap1 (Kim *et al.*, 2008) y en *C. albicans* se ha demostrado que el factor Cap1p controla directamente la expresión de la catalasa (Znaidi *et al.*, 2009).

Msn2 y Msn4 forman parte de la respuesta general a estrés en *S. cerevisiae*, son factores de transcripción que contienen un dominio de unión a ADN mediante dedos de Zinc en el extremo C-terminal y reconocen elementos de respuesta a estrés (STRE). Actualmente existen varias vías para la activación y translocación a núcleo de Msn2 y Msn4 dependientes de la proteína cinasa A (PKA) dependiente de c-AMP, TOR y Msn5. PKA- c-AMP es responsable de la exportación nuclear de Msn2 y Msn4 (Gorner *et al.*, 1998, Gorner *et al.*, 2002), los cuales regulan genes involucrados en estrés oxidativo, estrés osmótico, estrés por calor y limitación de nutrientes. Recientemente se ha demostrado que la regulación de Msn2p y Msn4p está conservada entre *C. glabrata* y *S. cerevisiae* (Cuellar-Cruz *et al.*, 2008, Roetzer *et al.*, 2008) y que estos factores no parecen desempeñar un papel en la regulación a estrés en *C. albicans* y en *S. pombe* (Nicholls *et al.*, 2004).

Bacterias y hongos en fase estacionaria son más resistentes a estrés oxidativo que las células en fase logarítmica, ya que en fase estacionaria la célula deja de dividirse y la actividad metabólica se reduce. Debido a esto la célula activa vías metabólicas para usar fuentes de carbono no fermentables y genes que codifican para enzimas antioxidantes como catalasas, superóxido dismutasas y síntesis de glutatión en respuesta a estrés oxidativo (Jakubowski *et al.*, 2000, Cyrne *et al.*, 2003).

Por ejemplo, *C. glabrata* es capaz de sobrevivir a altas concentraciones de H₂O₂ *in vitro*, hasta 1000 mM en fase estacionaria y en fase exponencial hasta 100 mM. Esta resistencia es mediada por la única catalasa Cta1p (Cuellar-Cruz *et al.*, 2008) (**Figs 5 y 6**, además la cepa silvestre y las mutantes *yap1Δ*, *skn7 Δ* y *msn4 Δ* resisten más al H₂O₂ en fase estacionaria que en fase exponencial (**Fig. 5A-B**).

A pesar de la cercanía filogenética entre *C. glabrata* y *S. cerevisiae*, *S. cerevisiae* posee dos catalasas, una peroxisomal (ScCta1p) y otra citosólica (ScCtt1p). Aún con dos catalasas, *S. cerevisiae* es más sensible en fase estacionaria a bajas concentraciones de H₂O₂ (100 mM). En cambio *C. albicans* resiste más que *S. cerevisiae* (Izawa *et al.*, 1996, Cuellar-Cruz *et al.*, 2008). Sin embargo, es importante hacer notar que aislados clínicos de *S. cerevisiae* presentan mayor actividad de catalasa y son más resistentes a oxidantes que la cepa silvestre (Cuellar-Cruz *et al.*, 2009).

Llama la atención que la cepa mutante *cta1Δ* es todavía capaz de adaptarse a bajas concentraciones de H₂O₂ en fase exponencial (**Fig. 5A**). Esto indica que existen otros sistemas que pudieran compensar la falta de la catalasa. Esto puede explicar porque *in vivo* en un modelo de infección sistémica en ratón la *cta1Δ* no mostró ningún fenotipo (Cuellar-Cruz *et al.*, 2008).

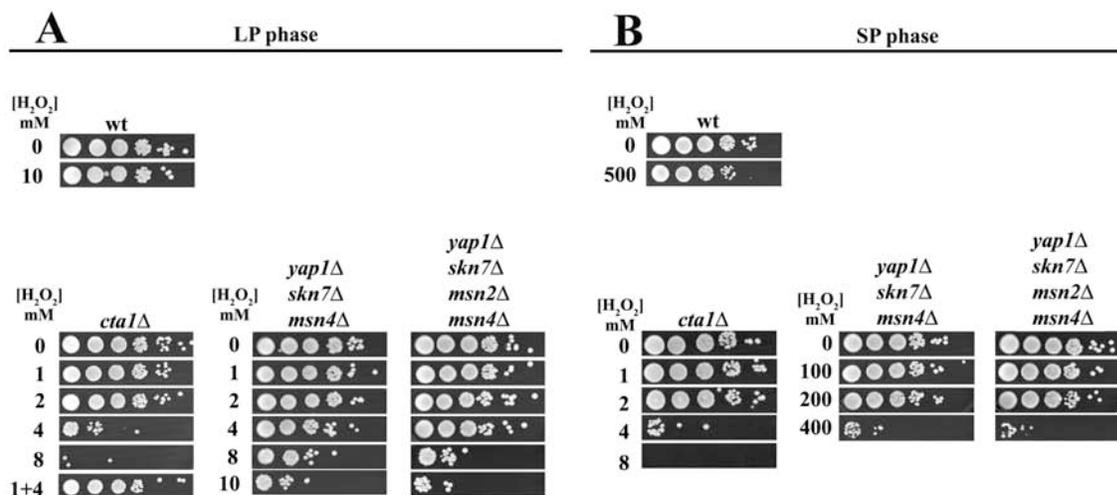


Figura 5. Ensayos de sensibilidad a H₂O₂ en *C. glabrata*. Las cepas mutantes *cta1Δ*, la triple mutante *yap1Δ skn7Δ msn4Δ* y la cuádruple mutante *yap1Δ skn7Δ msn4Δ msn2Δ* se trataron con diferentes concentraciones de H₂O₂ en fase exponencial (A) y en fase estacionaria (B) (Cuellar-Cruz *et al.*, 2008).

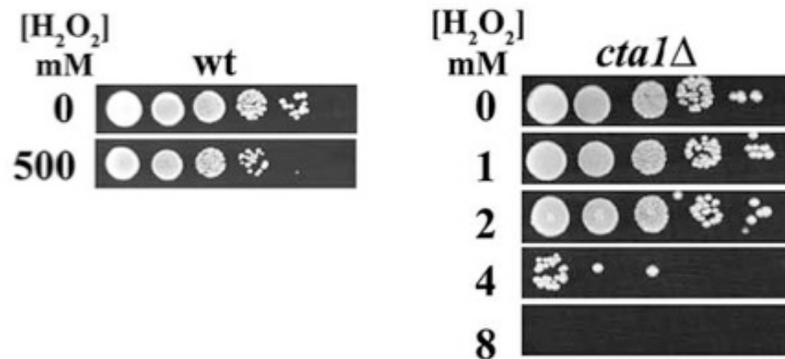


Figura 6. Sensibilidad a H₂O₂ en la cepa *cta1*Δ durante fase estacionaria. (Cuellar-Cruz *et al.*, 2008).

En esta tesis nos propusimos entender como se regula la *CTA1* de *C. glabrata* en respuesta al estrés oxidativo. Usamos una fusión traduccional con la proteína verde fluorescente como gen reportero, *CgCTA1-GFP* y analizamos su expresión en cepas mutantes en los factores de transcripción Yap1p, Skn7p, Msn2p y Msn4p. Demostramos que la *CgCTA1* se regula por Yap1p y Skn7p en fase logarítmica y Msn2p y Msn4p en fase estacionaria en presencia de H₂O₂. Para entender si la localización de la catalasa dentro de la célula es importante, realizamos mutaciones puntuales en los motivos de importación a los peroxisomas (SKF) de la catalasa y analizamos su fenotipo de resistencia a H₂O₂. El análisis de estas mutaciones sugiere que es importante la localización de la *CgCta1p* para su función. Además, expresamos la *CgCTA1* en las mutantes de *S. cerevisiae* *cta1*Δ, *ctt1*Δ y *cta1*Δ*ctt1*Δ y mostramos que no solo complementa, sino que la *CgCTA1* le confiere una mayor resistencia a H₂O₂ a *S. cerevisiae*.

JUSTIFICACIÓN

La incidencia de las infecciones sistémicas causadas por hongos patógenos oportunistas en pacientes inmuno-suprimidos se ha incrementado significativamente y constituye actualmente una causa importante de mortalidad. *C. glabrata* es la segunda especie aislada con mayor frecuencia después de *C. albicans*. Además presenta una resistencia innata a los antifúngicos azólicos. Estas características hacen que tanto el diagnóstico y el tratamiento sean importantes para tratar infecciones causadas por *C. glabrata*.

Aún cuando se han incrementado los estudios sobre *C. glabrata*, se conoce relativamente poco sobre su virulencia. *C. glabrata* posee una serie de mecanismos moleculares especializados que le permiten infectar y persistir en el huésped, tales como adherencia a células epiteliales humanas, rearrreglos genómicos que contienen genes involucrados en la resistencia pleiotrópica a fármacos, tienen la capacidad de formar biopelículas sobre materiales inertes y pueden sobrevivir y duplicarse dentro del fagolisosoma de las células fagocíticas. Esto indica que esta levadura patógena cuenta con una serie de sistemas eficientes antioxidantes y rutas metabólicas flexibles que le han permitido adaptarse a ambientes hostiles.

Por esta razón estamos interesados en estudiar la virulencia de *C. glabrata*. En general queremos entender la respuesta al estrés oxidativo y en particular la regulación de la catalasa I de *C. glabrata* en esta respuesta. Se ha demostrado que la catalasa puede ser un factor de virulencia en microorganismos patógenos.

Este trabajo contribuye en la generación de nuevos conocimientos. Principalmente puede contribuir en el desarrollo de nuevas terapias y así incidir al desarrollo de una mejor calidad de vida.

OBJETIVOS

Objetivo general

Conocer mejor la respuesta a estrés oxidativo en *C. glabrata* mediante el entendimiento de la regulación de la expresión de la catalasa I.

Objetivos específicos:

- Determinar la participación de los factores transcripcionales: Yap1p, Skn7p, Msn2p y Msn4p en la regulación de la *CTA1* de *C. glabrata*.
- Evaluar la expresión de la *CTA1* de *C. glabrata* en *S. cerevisiae*.
- Caracterizar los dos motivos putativos de importación a los peroxisomas SKF de la catalasa I de *C. glabrata*.

II. MATERIALES Y MÉTODOS

Cepas. Todas las cepas usadas en este trabajo se describen en la **Tabla II** y **Tabla III**. Las cepas se conservan a -80 °C en 15 % y 10 % de glicerol para levaduras y bacterias respectivamente.

Plásmidos. Todos los plásmidos usados en este trabajo están descritos en la **Tabla IV**.

Oligonucleótidos. Todos los oligonucleótidos usados en este trabajo están descritos en la **Tabla V**

2.1 Medios de cultivo

Para levaduras se usó el medio extracto de levadura peptona-dextrosa (YPD) que contiene extracto de levadura 10 g/L, peptona 20 g/L, glucosa 2 % y uracilo 10 mL/L. El medio casaminoácidos (CAA) contiene base nitrogenada de levadura 1.7 g/L, sulfato de amonio (NH_2SO_4) 5 g/L, casaminoácidos 6 g/L y glucosa 2 %. Para medio sólido en cajas se agregó 2 % de agar.

Para bacterias se usó el medio Luria-Bertani (LB) que contiene extracto de levadura 5 g/L, triptona 10 g/L, y NaCl 10 g/L. Se añadieron 50 µg/mL final de carbenicilina (INVITROGEN[®]) (Cb50) al medio para mantener la presencia de plásmidos.

El medio SOC contiene: extracto de levadura 5 g/L, triptófano 20 g/L, glucosa 0.4 %, NaCl 10 mM, KCl_2 10 mM, MgSO_4 , 10 mM, MgCl_2 10 mM.

El medio LB-Cloranfenicol-Sacarosa contiene: Triptona 10 g/L, extracto de levadura 5 g/L, NaCl 10 g/L y Sacarosa 50 g/L. Se añadieron 20 µg/mL final de cloranfenicol (Shelton Scientific[®]) (Cm20) para mantener la presencia de plásmidos. Para medio sólido en cajas se agregó 1.5 % de agar.

Todos los cultivos se crecieron a 30 °C (levaduras y bacterias).

2.2 Transformación de *Escherichia coli*

Para introducir plásmidos a *E. coli*, se utilizaron células electrocompetentes de la cepa DH10 preparadas de acuerdo al manual Currents Protocols in Molecular Biology (Ausubel, 1994) y se transformaron por electroporación con un choque eléctrico de 1.8Kv con el electroporador Gene Pulser Xcell Electroporation System (BIORAD®). Las células electroporadas se recuperaron en 600 µL de medio SOC y se incubaron a 30°C por 1h. Las células se seleccionaron en cajas de LBCb50 o LBCm20 Sac5 %.

2.3 Precipitación de ADN

Para concentrar ADN plasmídico y eliminar proteína y sales se realizó de la siguiente manera: la reacción se llevó a un volumen final de 100 µL con agua miliQ y se le añadió acetato de amonio a una concentración final de 2.5 M . Se agregó un volumen equivalente de Fenol:Cloroformo:Alcohol isoamílico (24:24:1) (Sigma®) y se agitó vigorosamente. Por centrifugación se separó la fase acuosa y se transfirió a un tubo limpio y se agregó 1 µL de glicógeno (20mg/mL) (Roche®). Para precipitar el ADN se agregaron 2.5 volúmenes de etanol frío al 100 % (ETOH) frío y se incubó a -20°C por 20 min. Se concentró el ADN por centrifugación y se lavó la pastilla con etanol al 70 %. La pastilla se secó y se resuspendió en 20 µL de TRIS (IBI Scientific®) HCl 10 mM pH 8.

2.4 Aislamiento de ADN plasmídico

Para la obtención del ADN plasmídico de cultivos bacterianos, se usó el kit QIAprep Spin Miniprep de QIAGEN® y para la extracción de ADN de geles de agarosa se usó el kit Gel Extraction QIAquick de QIAGEN®. Se siguieron las indicaciones del proveedor.

2.5 Extracción de ADN genómico de *C. glabrata*

Para extraer ADN genómico, las cepas de *C. glabrata* se incubaron por 36 h en medio YPD o en CAA. Las células se colectaron por centrifugación y se resuspendieron en 500 µL de amortiguador A que contiene: Tris 0.05 M, EDTA 0.01 M, NaCl 0.15M, Triton 1 % y SDS 1 %. Se añadió un volumen equivalente de Fenol:Cloroformo:Alcohol isoamílico (24:24:1) (Sigma[®]) se mezcló con agitación vigorosa y se incubó a 44 °C por 30min. Se recuperó la fase acuosa por centrifugación y se agregó 50 µL del amortiguador A sin detergente y 0.3 µL RNasa (500 U/mL RNasa A, 20,000 U/mL RNasa T1, AMBION[®]) y se incubó por 30 min a 44 °C. Para precipitar el ADN se añadieron 15 µL de NaCl 5 M y un volumen de etanol frío al 100 %. Se lavó el ADN con etanol al 70 % y una vez seca la pastilla se resuspendió en 250 µL de TER, la mezcla de TER (Tris HCl 10mM pH 7.5/EDTA 10/01) y 0.25 µL de RNasa (500 U/mL RNasa A, 20,000 U/mL RNasa T1, AMBION[®]).

2.6 Construcción de las mutantes en los motivos SKF de importación al peroxisoma.

Para construir las mutantes en los motivos SKF, se diseñaron tres pares de oligonucleótidos para amplificar por PCR los tres fragmentos que contenían el primer sitio mutado SKF149*AAA, el segundo sitio mutado SKF373*AAA y un tercer fragmento con las dos mutaciones SKF149*AAA y SKF373*AAA. Como control se amplificó la secuencia completa del ORF *CgCTA1* (**Fig. 7**). Se cambiaron los aminoácidos SKF (Serina-Lisina-Fenilalanina) por AAA (tres Alaninas).

Se generaron cuatro construcciones por PCR de fusión (Hobert, 2002). Este procedimiento fusiona fragmentos de ADN con extremos complementarios en una

sola reacción de PCR con dos oligonucleótidos complementarios en los extremos de los dos fragmentos. Se usó la técnica Hot Start para realizar la fusión. Se usó la Taq ADN polimerasa Expand (Roche®) que es una enzima termoestable de alta fidelidad con actividad de corrección “proofreading”. La proporción de las concentraciones de los tres fragmentos a fusionar fue de 1:3:1. La mezcla de la reacción incluye los oligonucleótidos #616 que contiene el sitio de restricción *BstE* II y el #129 que contiene el sitio *BamH* I. El producto de fusión se subclonó en el vector de clonación pGEM-T, posteriormente se clonó en el plásmido replicativo pMC18 previamente digerido con las enzimas de restricción *BstE* II y *BamH* I.

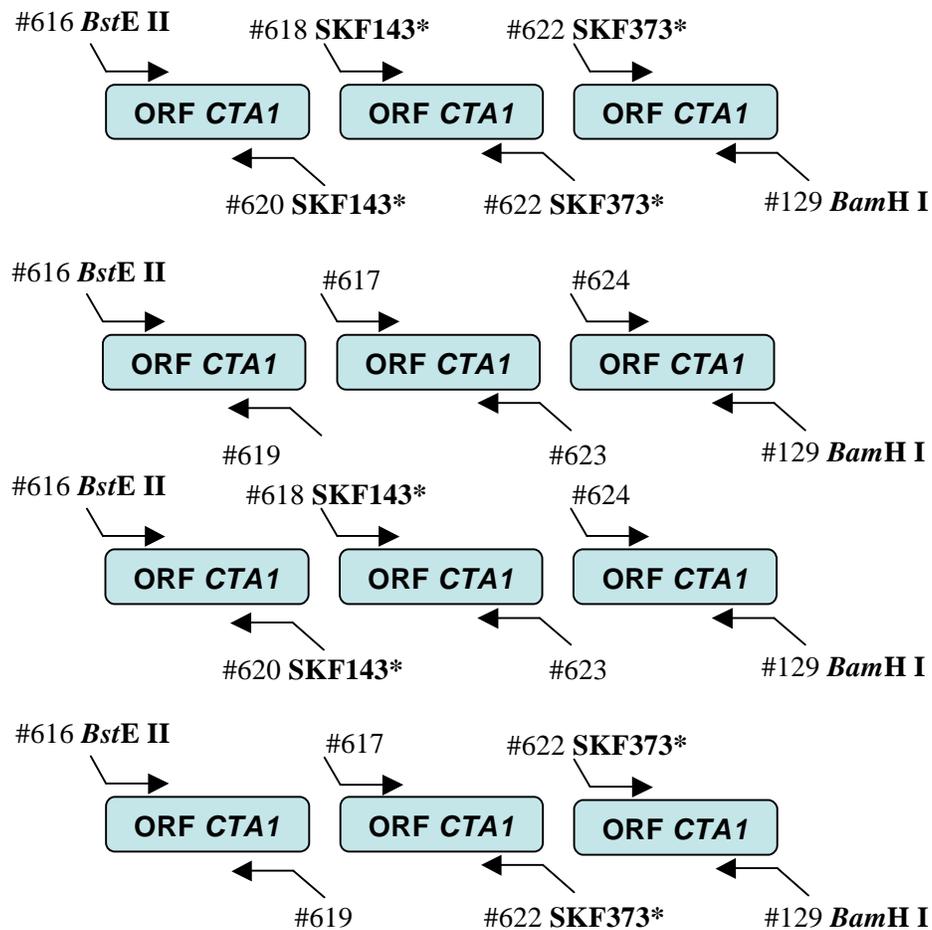


Figura 7. Esquema de los fragmentos que contienen mutaciones puntuales en los motivos SKF generados por PCR. Se usaron oligonucleótidos que contiene mutado el primer sitio SKF143*AAA, el segundo sitio mutado SKF373*AAA y ambos sitios mutados.

2.7 Transformación de levadura

Para transformar a *C. glabrata* y a *S. cerevisiae* con ADN lineal o superenrollado se utilizó una modificación del método de transformación con acetato de litio (LiAcO) (Gietz *et al.*, 1992). Las cepas se crecieron en medio YPD toda la noche hasta obtener un cultivo saturado y de este cultivo se realizó una dilución 1:100 en medio YPD fresco. Las células a una OD_{600nm} 1 se centrifugan y se lavan con agua. Las células se resuspenden en 1 mL de LiAcO 0.1 M, se centrifugan y se resuspenden en 300 μ L de LiAcO 0.1 M. A 50 μ L de células en LiAcO se les añadió la mezcla de transformación 240 μ L de polietilenglicol 50 % (Fluka Biochemica[®]) (concentración final ~30 %), 36 μ L de LiAcO 1M, 25 μ L de ADN acarreador de cadena sencilla (Invitrogen[®] 2mg/mL) (concentración final ~125ng/ μ L) desnaturalizado por calor a 100°C por 5min y el ADN a transformar a una concentración ~500 ng. La selección de células transformantes se realizó por complementación de auxotrofia a uracilo (*URA3*). Las células se incubaron a 30°C por 48 h. El procedimiento se ilustra en el esquema de abajo (**Fig. 8**).

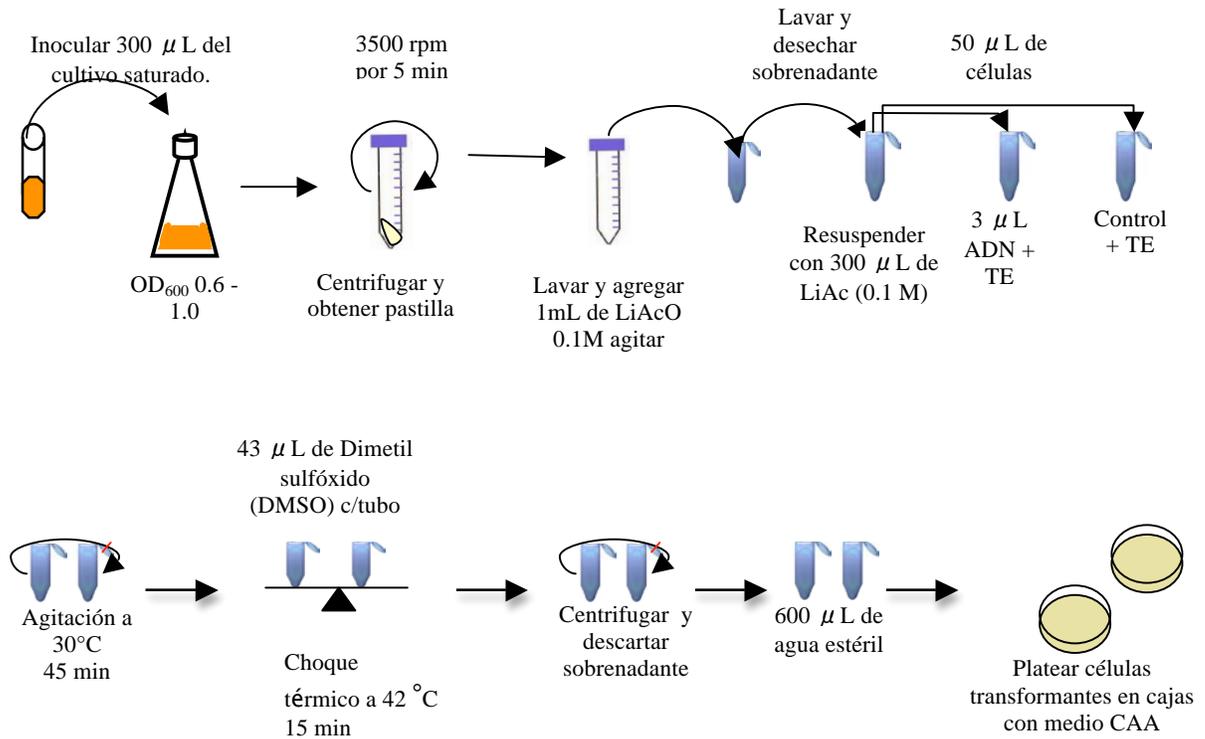


Figura 8. Protocolo de transformación de levadura por el método de acetato de litio.

2.8 Ensayos de sensibilidad a H₂O₂

Para determinar la resistencia o sensibilidad a H₂O₂, las cepas se crecieron hasta fase estacionaria en medio CAA por 48 h a 30°C con una OD₆₀₀ ~25 para *C. glabrata* y para *S. cerevisiae* con una OD₆₀₀ ~15. Las células se trataron con diferentes concentraciones de H₂O₂. Se usó H₂O₂ al 35 % (wt/wt) (Sigma-Aldrich®). Para el tratamiento se siguió el procedimiento mostrado en la **Figura 9**.

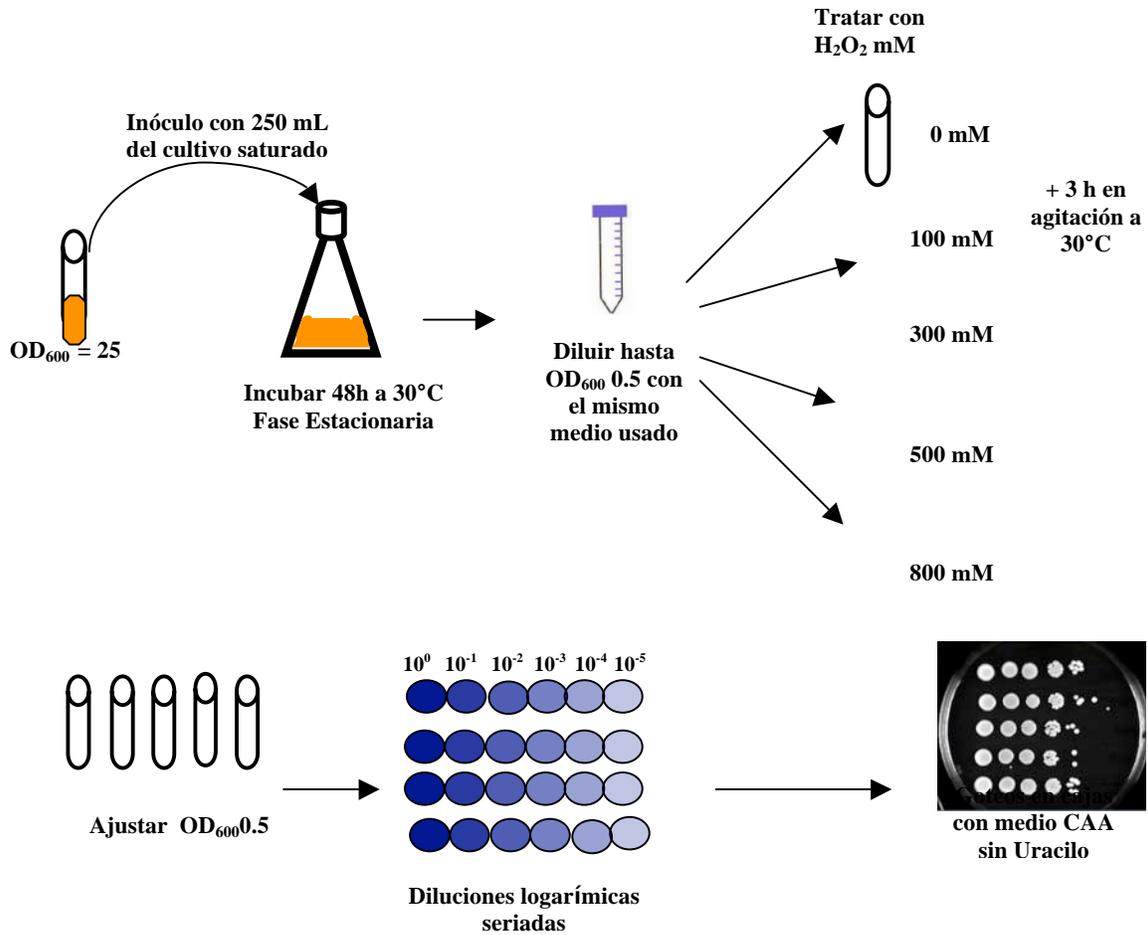


Figura 9. Esquema de los ensayos de sensibilidad a H_2O_2 .

2.9 Medición de la fluorescencia de la proteína verde fluorescente (GFP) por citometría de flujo.

Para el análisis de la expresión de *CTA1* por medio de la GFP (proteína verde fluorescente). Las cepas se incubaron en medio CAA sin uracilo a 30 °C por 48 h. Posteriormente se diluyeron 100 veces en medio fresco (100 µL del medio saturado en un volumen de 10 mL) y se trataron las células con distintas concentraciones de H₂O₂. Cada dos horas se colectó 1 mL de células, se retiró el oxidante por centrifugación y la pastilla se resuspendió en 1 mL de agua miliQ. La fluorescencia de los cultivos se midió cada dos horas en el citómetro de flujo Beckman COULTER® EPICS ALTRA con Cell Sorting (Coulter Corporation Inc, Miami, FL., USA) con filtros ópticos estándar de 525/540, 560 y 570 nm de longitud de onda, un láser de argón de 1.5 mW que excita a 488 nm. Las señales fueron captadas mediante un fotodiodo con un factor de amplificación de 10 en escala logarítmica en la gráfica PMT3. La proteína verde fluorescente se detecta en un rango de 515 mn a 545 mn. El rayo láser excita al fluoróforo FITC a una longitud de onda de 525 mn para detectar GFP. Los datos fueron procesados y analizados mediante el software Expo32 Multicomp (Coulter Corporation).

Para la calibración del citómetro se usaron 100µL de fluoroesferas en 1mL de PBS (Beckman Coulter) ajustando los parámetros side scatter (SS) en un ángulo de 45 grados y FL1 en escala logarítmica. Se programó el equipo para medir 10,000 células o hasta registrar los eventos en 30 s. La proteína GFP se excitó con el láser de argón a 488 nm y la fluorescencia se detectó a una longitud de onda de 525 nm en el canal FL1.

2.10 Análisis estadístico

Los datos experimentales obtenidos del citómetro se analizaron mediante la prueba de una vía ANOVA con el software Graphpad Prism version 5.0a. Se usó la prueba Dunnett's Multiple Comparison Test para comparar entre grupos de columnas. El nivel de $p < 0.05$ se utilizó como criterio de significancia estadística.

2.11 Curvas de crecimiento

Las cepas se crecieron en medio YPD y en CAA y se incubaron a 30°C por 48 horas hasta saturación. Las células se diluyeron en medio fresco para obtener una $OD_{600} \approx 0.25$, se incubaron a 30°C con agitación y se tomaron muestras cada dos horas para determinar su densidad óptica (OD_{600nm}). Se graficaron los datos en el programa Excel en escala lineal.

2.12 Curvas de viabilidad celular

Para determinar la viabilidad celular de las diferentes cepas usadas, las células se crecieron en medio YPD y se incubaron a 30°C por 48 horas hasta saturación. Se tomaron alícuotas y se diluyeron 100 veces en medio fresco YPD, posteriormente se trataron con diferentes concentraciones de H_2O_2 en tubos independientes y se incubaron a 30°C. Se midió la OD_{600nm} cada dos horas después del tratamiento. Además se hicieron diluciones 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} y 10^{-5} y se tomó un volumen para realizar conteos de aproximadamente 100 colonias por cada dilución basados en que una OD_{600nm} de 1 equivale aproximadamente a 2×10^7 células/mL. Se platearon en cajas con medio YPD y se incubaron a 30°C. Se calculó el porcentaje % de células viables por cada tratamiento a diferentes tiempos y se graficaron los datos de viabilidad celular tomando como control (100 %) la cepa que no recibió tratamiento con oxidante.

Tabla II. Cepas de *Escherichia coli* usadas en este trabajo

Cepa	Genotipo relevante	Referencia
DH10B	<i>F mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC)</i> <i>φ80dlacZΔM15, ΔlacX74 deoR recA1 endA1</i> <i>araD139Δ (ara,leu)7697 galU galK λ⁻ rpsL</i> <i>nupG</i>	(Calvin y Hanawalt, 1988)

Tabla III. Cepas de *C. glabrata* usadas en este trabajo

Cepa	Parental	Genotipo relevante	Referencia o fuente
BG2		Aislado clínico (cepa B)	Fidel <i>et al.</i> , 1993
BG14	BG2	<i>ura3Δ ::Tn903 G418^R; wt, Ura⁻</i>	Cormack y Falkow, 1999.
CGM833	BG14	<i>ura3Δ ::Tn903 G418^R Hyg^S; msn2Δ</i>	Colección del laboratorio de B. Cormack
CGM835	BG14	<i>ura3Δ ::Tn903 G418^R Hyg^S; msn4Δ</i>	Colección del laboratorio de B. Cormack
CGM837	CGM833	<i>ura3Δ ::Tn903 G418^R Hyg^R; msn2Δ msn4Δ::hph</i>	Colección del laboratorio de B. Cormack
CGM297	BG14	<i>ura3Δ ::Tn903 G418^R yap1Δ::hph Hyg^R</i>	Cuéllar <i>et al.</i> , 2008
CGM306	BG14	<i>ura3Δ ::Tn903 G418^R skn7Δ::hph Hyg^R</i>	Cuéllar <i>et al.</i> , 2008
CGM310	CGM297	<i>ura3Δ ::Tn903 G418^R yap1Δ skn7Δ::hph Hyg^R</i>	Cuéllar <i>et al.</i> , 2008
CGM385	CGM310	<i>ura3Δ ::Tn903 G418^R yap1Δ skn7Δ::hph Hyg^S Ura⁻</i>	Cuéllar <i>et al.</i> , 2008
CGM386	CGM385	<i>ura3Δ ::Tn903 G418^R yap1Δ skn7Δ msn2Δ::hph Hyg^R</i>	Cuéllar <i>et al.</i> , 2008
CGM388	CGM385	<i>ura3Δ ::Tn903 G418^R yap1Δ skn7Δ msn4Δ::hph Hyg^R</i>	Cuéllar <i>et al.</i> , 2008
CGM537	CGM388	<i>ura3Δ ::Tn903 G418^R yap1Δ skn7Δ msn2Δ msn4Δ::hph Hyg^R</i>	Cuéllar <i>et al.</i> , 2008

CGM295	BG14	<i>ura3Δ</i> ::Tn903 G418 ^R <i>cta1Δ</i> :: <i>hph</i> Hyg ^R	Cuéllar <i>et al.</i> , 2008
CGM518	BG14	<i>ura3Δ</i> ::Tn903 G418 ^R ; pGRB2.0 <i>URA3</i>	Colección del laboratorio
CGM519	CGM295	<i>ura3Δ</i> ::Tn903 G418 ^R <i>cta1Δ</i> ; pGRB2.0 <i>URA3</i>	Colección del laboratorio
CGM473	BG14	<i>ura3Δ</i> ::Tn903 G418 ^R ; pMC18 <i>URA3</i>	Colección del laboratorio
CGM475	CGM295	<i>ura3Δ</i> ::Tn903 G418 ^R ; <i>cta1Δ</i> , pMC18 <i>URA3</i>	Colección del laboratorio
CGM514	CGM295	<i>ura3Δ</i> ::Tn903 G418 ^R ; <i>cta1Δ</i> , pMC14 <i>URA3</i>	Colección del laboratorio
CGM762	CGM297	<i>ura3Δ</i> ::Tn903 G418 ^R Hyg ^R <i>yap1Δ</i> , pMC18 <i>URA3</i>	Este trabajo
CGM766	CGM306	<i>ura3Δ</i> ::Tn903 G418 ^R Hyg ^R <i>skn7Δ</i> , pMC18 <i>URA3</i>	Este trabajo
CGM770	CGM386	<i>ura3Δ</i> ::Tn903 G418 ^R Hyg ^R <i>yap1Δ</i> <i>skn7Δ</i> <i>msn2Δ</i> :: <i>hph</i> , pMC18 <i>URA3</i>	Este trabajo
CGM774	CGM537	<i>ura3Δ</i> ::Tn903 G418 ^R Hyg ^R <i>yap1Δ</i> <i>skn7Δ</i> <i>msn2Δ</i> <i>msn4Δ</i> :: <i>hph</i> , pMC18 <i>URA3</i>	Este trabajo
CGM778	CGM388	<i>ura3Δ</i> ::Tn903 G418 ^R Hyg ^R <i>yap1Δ</i> <i>skn7Δ</i> <i>msn4Δ</i> :: <i>hph</i> , pMC18 <i>URA3</i>	Este trabajo
CGM782	CGM835	<i>ura3Δ</i> ::Tn903 G418 ^R Hyg ^S ; <i>msn4Δ</i> , pMC18 <i>URA3</i>	Este trabajo
CGM829	CGM310	<i>ura3Δ</i> ::Tn903 G418 ^R Hyg ^R <i>yap1Δ</i> <i>skn7Δ</i> , pMC18 <i>URA3</i>	Este trabajo
CGM853	CGM833	<i>ura3Δ</i> ::Tn903 G418 ^R Hyg ^S ; <i>msn2Δ</i> , pMC18 <i>URA3</i>	Este trabajo
CGM857	CGM837	<i>ura3Δ</i> ::Tn903 G418 ^R Hyg ^R ; <i>msn2Δ</i> <i>msn4Δ</i> , pMC18 <i>URA3</i>	Este trabajo
CGM947	BG14	<i>ura3Δ</i> ::Tn903 G418 ^R ; pMC65 <i>URA3</i>	Este trabajo
CGM949	BG14	<i>ura3Δ</i> ::Tn903 G418 ^R ; pMC53 <i>URA3</i>	Este trabajo
CGM951	BG14	<i>ura3Δ</i> ::Tn903 G418 ^R ; pMC55 <i>URA3</i>	Este trabajo
CGM953	BG14	<i>ura3Δ</i> ::Tn903 G418 ^R ; pMC57 <i>URA3</i>	Este trabajo
CGM964	CGM295	<i>ura3Δ</i> ::Tn903 G418 ^R ; <i>cta1Δ</i> , pMC65 <i>URA3</i>	Este trabajo
CGM966	CGM295	<i>ura3Δ</i> ::Tn903 G418 ^R ; <i>cta1Δ</i> , pMC53 <i>URA3</i>	Este trabajo

CGM968	CGM295	<i>ura3Δ</i> ::Tn903 G418 ^R ; <i>cta1Δ</i> , pMC55 <i>URA3</i>	Este trabajo
CGM970	CGM295	<i>ura3Δ</i> ::Tn903 G418 ^R ; <i>cta1Δ</i> , pMC57 <i>URA3</i>	Este trabajo
CGM972	BG14	<i>ura3Δ</i> ::Tn903 G418 ^R ; pMC69 <i>URA3</i>	Este trabajo
CGM974	CGM295	<i>ura3Δ</i> ::Tn903 G418 ^R ; <i>cta1Δ</i> , pMC69 <i>URA3</i>	Este trabajo
CGM991	BG14	<i>ura3Δ</i> ::Tn903 G418 ^R ; pMC35 <i>URA3</i>	Este trabajo
CGM1067	BG14	<i>ura3Δ</i> ::Tn903 G418 ^R ; pMC31 <i>URA3</i>	Este trabajo
CGM1069	BG14	<i>ura3Δ</i> ::Tn903 G418 ^R ; pMC33 <i>URA3</i>	Este trabajo

Tabla IV. Cepas de *S. cerevisiae* usadas en este trabajo

Cepa	Parental	Genotipo relevante	Referencia o fuente
SCL74	BY4742	<i>MATa ura3Δ-1 leu2D-0,112 his3Δ -1,met15Δ-0</i>	Izawa <i>et al.</i> , 1996
SCL75 (<i>cta1Δ</i>)	SCL74	<i>MATα ura3Δ-1 leu2D-0,112 his3Δ -11, G418^R cta1Δ, YDR256c::KanMX4</i>	Izawa <i>et al.</i> , 1996
SCL76 (<i>ctt1Δ</i>)	SCL74	<i>MATα ura3Δ-1 leu2D-0,112 his3Δ -1,met15Δ-0G418^R, ctt1Δ, YGR088w::KanMX4</i>	Izawa <i>et al.</i> , 1996
SCL77 (<i>cta1Δctt1Δ</i>)	SCL75 SCL76	<i>ura3Δ-1 leu2D-0,112 his3Δ -1,met15Δ-0G418^R, cta1Δctt1Δ</i>	Izawa <i>et al.</i> , 1996
SCL78	SCL74	<i>ura3Δ-1 leu2D-0,112 his3Δ -1,met15Δ-0; pMC23, URA3</i>	Colección del laboratorio
SCL79	SCL75	<i>ura3Δ-1 leu2D-0,112 his3Δ -11, 15 cta1Δ; pMC23, URA3</i>	Colección del laboratorio
SCL80	SCL76	<i>ura3Δ-1 leu2D-0,112 his3Δ -1,met15Δ-0, ctt1Δ; pMC23, URA3</i>	Colección del laboratorio
SCL81	SCL77	<i>ura3Δ-1 leu2Δ -0, his3Δ -1, cta1Δctt1Δ; pMC23, URA3</i>	Colección del laboratorio
SCL82	SCL74	<i>ura3Δ-1 leu2Δ -0,112 his3Δ 1, met15Δ-0; pRS416, URA3</i>	Colección del laboratorio

SCL83	SCL75	<i>ura3Δ-1 leu2-3,112 his3-11,15 cta1Δ</i> ; pRS416, <i>URA3</i>	Colección del laboratorio
SCL84	SCL76	<i>ura3Δ-1 leu2-3,112 his3-11,15 ctt1Δ</i> ; pRS416, <i>URA3</i>	Colección del laboratorio
SCL85	SCL77	<i>ura3Δ-1 leu2Δ -0, his3Δ -1, cta1Δctt1Δ</i> ; pRS416, <i>URA3</i>	Colección del laboratorio
SCL86	SCL74	<i>ura3Δ-1 leu2Δ -0,112 his3Δ-1, met15Δ</i> ; pMC28, <i>URA3</i>	Este trabajo
SCL87	SCL75	<i>ura3Δ-1 leu2-3,112 his3-11,15 cta1Δ</i> ; pMC28, <i>URA3</i>	Este trabajo
SCL88	SCL76	<i>ura3Δ-1 leu2-3,112 his3-11,15 ctt1Δ</i> ; pMC28, <i>URA3</i>	Este trabajo
SCL89	SCL77	<i>ura3Δ-1 leu2Δ-0, his3Δ -1 cta1Δ/ctt1Δ</i> ; pMC28, <i>URA3</i>	Este trabajo
SCL112	SCL74	<i>ura3Δ-1 leu2Δ -0,112 his3Δ-1, met15Δ</i> ; pMC71, <i>URA3</i>	Este trabajo
SCL114	SCL76	<i>ura3Δ-1 leu2-3,112 his3-11,15 ctt1Δ</i> ; pMC71, <i>URA3</i>	Este trabajo
SCL116	SCL77	<i>ura3Δ-1 leu2Δ-0, his3Δ -1 cta1Δ/ctt1Δ</i> ; pMC71, <i>URA3</i>	Este trabajo
SCL118	SCL75	<i>ura3Δ-1 leu2-3,112 his3-11,15 cta1Δ</i> ; pMC71, <i>URA3</i>	Este trabajo

Tabla V. Plásmidos usados en este trabajo

Plásmidos		
Vector	Genotipo relevante	Referencia
pGEM-T	Vector de clonación. Km ^R Amp ^R	Promega [®]
pMB11	Vector de clonación, <i>sacB</i> , Cm ^R	Colección del laboratorio
pRS416	Vector replicativo de <i>S.c. CEN ARS</i> , <i>URA3</i> , Amp ^R	Sikorski y Hieter, 1989
pGRB2.0	Vector replicativo de <i>C.g. CEN ARS</i> , <i>URA3</i> , Amp ^R	Domergue <i>et al.</i> , 2005
pAP668	Vector integrativo, contiene <i>GFP Sal I/BamH I</i> . <i>URA3</i> , Amp ^R	Colección del laboratorio
pRS306	Vector integrativo. <i>URA3</i> , Amp ^R	Sikorski y Hieter, 1989
pMC1	Vector de clonación. Contiene la región intergénica de la <i>CgCTA1</i> y el gen <i>CgCTA1</i> (5.8 kb) clonado <i>Sac I/BamH I</i> . Km ^R Amp ^R	Colección del laboratorio
pMC3	Vector de clonación. Contiene la región 3'UTR de <i>CgCTA1</i> (290 pb) clonado <i>EcoRI/XhoI</i> . Km ^R Amp ^R	Colección del laboratorio
pMC5	Vector de replicación pGRB2.0. Contiene el fragmento 3'UTR de <i>CgCTA1</i> (290 pb) <i>EcoRI/Xho I</i> . <i>CEN ARS</i> , <i>URA3</i> , Amp ^R	Colección del laboratorio
pMC7	Vector de clonación. Contiene el fragmento <i>CgCTA1::3'UTR_{CTA1}</i> de 1.8 kb <i>Xba I/Kpn I</i> . Amp ^R	Colección del laboratorio
pMC9	Vector de clonación. Contiene el fragmento GFP (717 bp) <i>BamH I/EcoRI</i> . Amp ^R	Colección del laboratorio
pMC10	Vector de clonación. Contiene el fragmento de 1 kb del promotor de <i>CgCTA1</i> <i>Kpn I/Sal I</i> . Amp ^R	Colección del laboratorio
pMC12	Vector de clonación. Contiene el fragmento 3'UTR _{CTA1} (290 pb) <i>BamH I/Sac I</i> . Amp ^R	Colección del laboratorio
pMC37	Un producto de PCR del promotor de <i>CTA1</i> de <i>S. cerevisiae</i> de 308 pb (generado por los oligos 607 y 608) se clonó en pMB11 Cm ^R	Este trabajo
pMC39	Un producto de PCR de 318 pb de 3'UTR _{ScCTA1} <i>EcoRI/Kpn I</i> (generado por los oligos 609 y 610) se clonó en pMB11 Cm ^R	Este trabajo

pMC41	Un producto de PCR de 1.5 kb de ORF de <i>CTA1 Xba I/EcoR I</i> (generado con los oligos 248 y 625) se clonó en pMB11 Cm ^R	Este trabajo
pMC43	Un producto generado por PCR de fusión de 1.5 kb de ORF de <i>CTA1 BstE II/ BamH I</i> con una mutación en SKF ^{149*AAA} (generado por 3 fragmentos con los pares de oligos 616 y 620, 618 y 623, 624 y 129) se clonó en pGEM-T. Amp ^R	Este trabajo
pMC45	Un producto generado por PCR de fusión de 1.5 kb de ORF de <i>CTA1 BstE II/ BamH I</i> con una mutación en SKF ^{373*AAA} (generado por 3 fragmentos con los pares de oligos 616 y 619, 617 y 622, 621 y 129) se clonó en pGEM-T. Amp ^R	Este trabajo
pMC47	Un producto generado por PCR de fusión de 1.5 kb de ORF de <i>CTA1 BstE II/ BamH I</i> con una mutación en SKF ^{149*AAA} y en SKF ^{373*AAA} (generado por 3 fragmentos con los pares de oligos 616 y 620, 618 y 622, 621 y 129) se clonó en pGEM-T. Amp ^R	Este trabajo
pMC49	Un producto generado por PCR de fusión de 1.5 kb de ORF de <i>CTA1 BstE II/ BamH I</i> (generado por 3 fragmentos con los pares de oligos 616 y 619, 617 y 623, 624 y 129) se clonó en pMB11 Cm ^R	Este trabajo
VECTORES REPLICATIVOS		
Plásmido	Genotipo relevante	Referencia
pMC14	Contiene el fragmento GFP::3'UTR de <i>CgCTA1 BamH I/EcoR I</i> . <i>CEN ARS, URA3, Amp^R</i>	Colección del laboratorio
pMC18	Contiene el fragmento P _{<i>CgCTA1</i>} <i>CgCTA1::GFP:: 3'UTR Sac I/Xho I</i> . <i>CEN ARS, URA3, Amp^R</i>	Colección del laboratorio
pMC23	Contiene el fragmento <i>CgCTA1::3'UTR CTA1</i> de 1.8 kb <i>Xba I/Kpn I</i> . <i>CEN ARS, URA3, Amp^R</i>	Colección del laboratorio
pMC27	El fragmento de pMC18 (6.817 kb) <i>Sac I/Xho I</i> se clonó en el vector de replicación pRS416. <i>CEN ARS, URA3, Amp^R</i>	Este trabajo
pMC35	El fragmento de pMC29 que contiene el P _{<i>CgCTA1</i>} <i>::GFP</i> (2017 bp) <i>Kpn I/Sac I</i> se clonó en pGRB2.0. <i>CEN ARS, URA3, Amp^R</i>	Este trabajo
pMC51	El fragmento de 3'UTRsc <i>EcoR I/Kpn I</i> de pMC29 (318 bp) se clonó en pGRB2.0. <i>CEN ARS, URA3, Amp^R</i>	Este trabajo
pMC53	El fragmento de 1.5 kb de ORF de <i>CgCTA1 BstE II/ BamH I</i> de pMC43 se clonó en pMC18. <i>CEN ARS, URA3, Amp^R</i>	Este trabajo
pMC55	El fragmento de 1.5 kb de ORF de <i>CgCTA1 BstE II/ BamH I</i> de pMC45 se clonó en pMC18. <i>CEN ARS, URA3, Amp^R</i>	Este trabajo

pMC57	El fragmento de 1.5 kb de ORF de <i>CgCTA1 BstE II/ BamH I</i> de pMC47 se clonó en pMC18. <i>CEN ARS</i> , <i>URA3</i> , <i>Amp^R</i>	Este trabajo
pMC65	El fragmento de 1.5 kb de ORF de <i>CgCTA1 BstE II/ BamH I</i> de pMC49 se clonó en pMC18. <i>CEN ARS</i> , <i>URA3</i> , <i>Amp^R</i>	Este trabajo
pMC69	El fragmento de 2.145 kb que contiene Promotor <i>CTA1_{sc}::CgCTA1::3'UTR</i> (Ligación 4 fragmentos) se clonó <i>Sac I/Kpn I</i> en pGRB2.0. <i>CEN ARS</i> , <i>URA3</i> , <i>Amp^R</i>	Este trabajo
pMC71	El fragmento de 2.145 kb que contiene Promotor <i>CTA1_{sc}::CgCTA1::3'UTR</i> (Ligación 4 fragmentos) se clonó <i>Sac I/Kpn I</i> en pGRB2.0. <i>CEN ARS</i> , <i>URA3</i> , <i>Amp^R</i>	Este trabajo
VECTORES INTEGRATIVOS		
pMC25	Contiene 1 kb del promotor de <i>CgCTA1</i> y GFP <i>P_{CgCTA1}::GFP Kpn I/Sal I</i> . <i>URA3</i> , <i>Amp^R</i>	Colección del laboratorio
pMC29	El fragmento de 3'UTR de pMC12 <i>BamH I/ Sac I</i> se clonó en pMC25 que contiene <i>P_{CgCTA1}::GFP</i> . <i>URA3</i> , <i>Amp^R</i>	Colección del laboratorio
pMC31	Contiene <i>P_{CgCTA1}CgCTA1::GFP::3'UTR</i> El fragmento de (6.817 kb) <i>Sac I/Xho</i> . <i>URA3</i> , <i>Amp^R</i>	Colección del laboratorio
pMC59	El fragmento de 1.5 kb de ORF de <i>CgCTA1 CgCTA1 BstE II/ BamH I</i> de pMC43 se clonó en pMC31. <i>URA3</i> , <i>Amp^R</i>	Este trabajo
pMC61	El fragmento de 1.5 kb de ORF de <i>CgCTA1 BstE II/ BamH I</i> de pMC45 se clonó en pMC31. <i>URA3</i> , <i>Amp^R</i>	Este trabajo
pMC63	El fragmento de 1.5 kb de ORF de <i>CgCTA1 BstE II/ BamH I</i> de pMC47 se clonó en pMC31. <i>URA3</i> , <i>Amp^R</i>	Este trabajo
pMC67	El fragmento de 1.5 kb de ORF de <i>CgCTA1 BstE II/ BamH I</i> de pMC49 se clonó en pMC31. <i>URA3</i> , <i>Amp^R</i>	Este trabajo
pMC73	El fragmento de 2.145 kb que contiene Promotor <i>CTA1_{sc}::CgCTA1::3'UTR</i> (Ligación 4 fragmentos) se clonó <i>Sac I/Kpn I</i> en pRS306. <i>URA3</i> , <i>Amp^R</i>	Este trabajo

Tabla VI. Oligonucleótidos usados en este trabajo.

Olig	Secuencia 5´- 3´	Nombre del oligo	Sitios
# 13	GGCGATTAAGTTGGGTAACGCCAGGG	pUC Forward	
# 17	GGAAACAGCTATGACCATGA	pUC Reverse	
# 129	GCG GGATCC TAGCAGTTGGGGCG	<i>CTA1</i> @1516 REV	<i>Bam</i> H I
# 130	GCG GGATCC TAAATGTCTAAAGGTGAAGAATTATTC	<i>GFP</i> @ 1bp FW	<i>Bam</i> H I
#607	TCGT CTAGACTT CTAGGGTTCCAAATTTATTTG	<i>ScCTA1</i> @-1bp REV	<i>Xba</i> I
#608	CAAG GAGCTGCTCTTTGTGCAGCT AACCACTATTT AAAGCCGC	<i>ScCTA1</i> @-319bp FW	<i>Sac</i> I/ <i>Bsg</i> I
#609	CCG GAATTC CAAGTAACAATTGAGTGGCG	<i>ScCTA1</i> @+5 bp FW	<i>Eco</i> R I
#610	CCG GTACCGTTTCTTGGTTCCCTACTCAG	<i>ScCTA1</i> @+300 bp REV	<i>Kpn</i> I
#616	TCTACAG GTACCC CATACAATGACC	<i>CgCTA1</i> @ 58bp FW	<i>Bst</i> E II
#617	CAGAGACCCATCTAAGTTCCC	<i>CgCTA1</i> @ 443bpSKF FW	
#618	CAGAGACCCAGCTGCGGCCCCACATTTCC	<i>CgCTA1</i> @ 443bpAAA FW	
#619	GGGAACCTAGATGGGTCTCTG	<i>CgCTA1</i> @ 471bpSKF REV	
#620	GAAATGTGGGGCCGCAGCTGGGTCTCTG	<i>CgCTA1</i> @ 471bpAAA REV	
#621	ACGCCGCCGCAGCCTTCAACCCAGTTATTAGAGA	<i>CgCTA1</i> @ 1111bpAAA FW	
#622	GAAGGCTGCGGCCGCGTATGGGCAGTTGACAGG	<i>CgCTA1</i> @ 1128bpAAA	
#623	TGAAGAACTTGGAGGCGT	<i>CgCTA1</i> @ 1129bpSKF	
#624	ACGCCTCCAAGTTCTTCA	<i>CgCTA1</i> @ 1111bpSKF FW	
#625	CCG GAATTC TAGCAGTTGGGGCG	<i>CgCTA1</i> @ 1517bp REV	<i>Eco</i> R I

*Sitios de restricción indicados en negritas

III. RESULTADOS

3.1. La catalasa se induce en presencia de oxidante.

Para determinar como se regula la catalasa de *C. glabrata* de la cepa silvestre en presencia de H₂O₂ a diferentes concentraciones, se midió la expresión de *CTA1* por medio de la fluorescencia de GFP con el plásmido P_{CgCTA1}::CgCTA1::GFP (pMC18) (ver Materiales y Métodos) que contiene 4.5 kb de la región promotora *CgCTA1* y contiene el gen reportero GFP fusionado en el C-terminal de la *CTA1* con un cambio de aminoácido en K506 por R506. La fusión P_{CgCTA1}::CgCTA1::GFP es funcional ya que complementa la mutante *cta1Δ*. La fluorescencia se midió en el citómetro de flujo. Usamos como control negativo la cepa silvestre que contiene el vector con GFP sin promotor.

La expresión basal de la catalasa sin H₂O₂ es al tiempo 0. La catalasa se induce con H₂O₂ a partir de las 2 h y la inducción es proporcional a la concentración del oxidante (**Fig. 10**). Es necesario un aumento de la síntesis de la Cta1p durante el tratamiento con oxidante para contrarrestar el daño celular. Posteriormente se observa una disminución gradual en la inducción a lo largo del tiempo hasta alcanzar los niveles basales de expresión de *CTA1* a las 10 h de tratamiento con 1, 5, 10 y 20 mM (**Fig. 10**). La máxima inducción de la catalasa ocurre con 50 y 100 mM de H₂O₂. Esta acumulación de fluorescencia se debe a un incremento en la expresión de la *CTA1* (**Fig. 10**) y como las células no se están dividiendo hay acumulación de GFP (**Fig. 11**). Esto se aprecia con la cinética de crecimiento que muestra un efecto importante dependiente de la concentración de oxidante. La velocidad de crecimiento es inversamente proporcional a la concentración de H₂O₂. A una concentración de 1 y 5 mM de H₂O₂ no se observa una disminución en su crecimiento comparada con el control sin oxidante, sin embargo, las células reducen su velocidad de crecimiento a concentraciones mayores (10 y 20 mM). A concentraciones de 50 y 100 mM las células son incapaces de dividirse (**Fig. 11**) a

estas concentraciones, las células pierden viabilidad drásticamente (**Fig. 23, Anexos**).

Estos resultados indican que:

a) El promotor de *CTA1* responde a la presencia de oxidante, b) A concentraciones mayores de 20 mM, las células dejan de dividirse pero continúan expresando *CTA1* y c) A concentraciones de 50 y 100 mM las células pierden viabilidad.

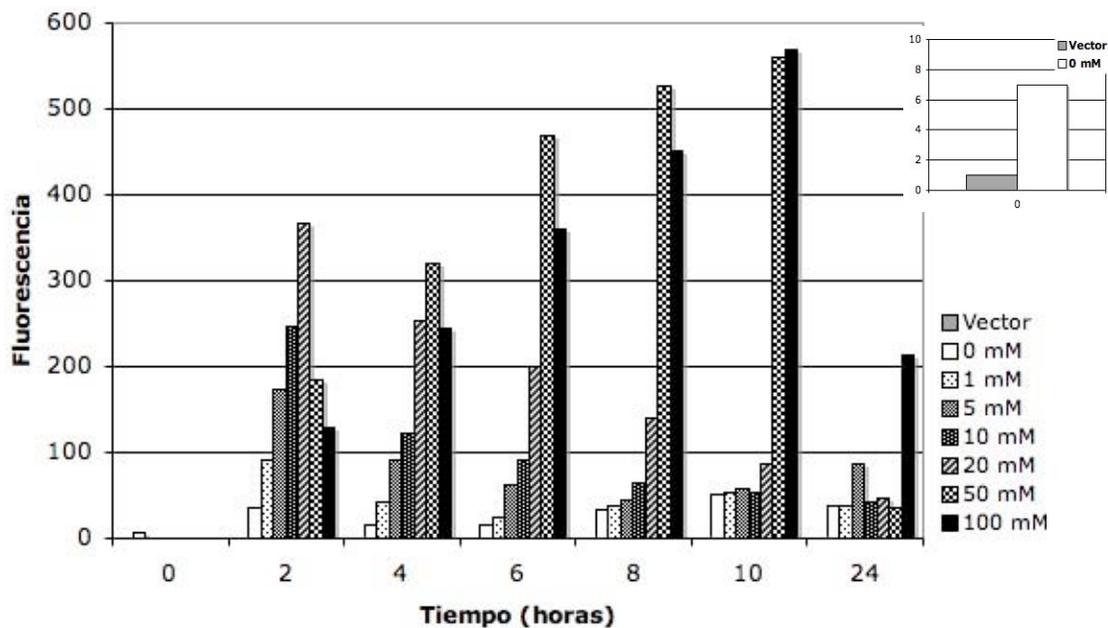


Figura 10. Inducción de la *CgCTA1* con diferentes concentraciones de H_2O_2 . Las células de la cepa silvestre que contienen el plásmido $P_{CgCTA1}::CgCTA1::GFP$ se crecieron en medio CAA por 48 horas (tiempo 0), se diluyeron en medio fresco y se sometieron a tratamiento crónico con H_2O_2 a diferentes concentraciones (1, 5, 10, 20, 50 y 100 mM), posteriormente se midió su fluorescencia cada 2 horas.

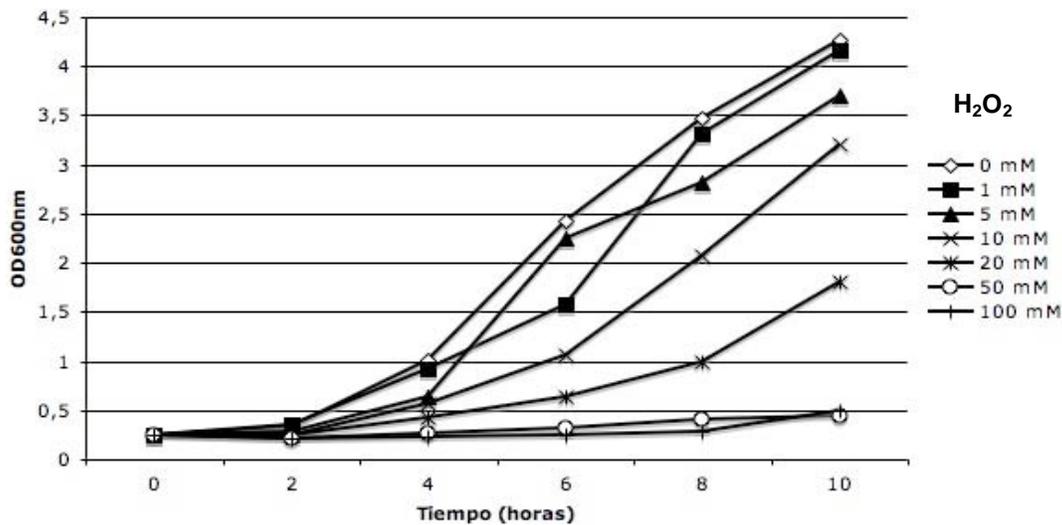


Figura 11. Curva de crecimiento de la cepa silvestre a diferentes concentraciones de H_2O_2 . La cepa silvestre se creció en medio CAA hasta fase estacionaria en medio fresco YPD, se diluyeron las células a una OD_{600nm} 0.2, se trataron con distintas concentraciones de H_2O_2 (1, 5, 10, 20, 50 y 100 mM) y se midió la densidad óptica cada dos h.

3.2 Los factores de transcripción Yap1p y Skn7p regulan la expresión de *CgCTA1* en fase exponencial durante estrés oxidativo.

Para evaluar la participación de los factores de transcripción: Yap1p, Skn7p, Msn2 y Msn4 en la regulación de la catalasa, transformamos las mutantes sencillas y dobles de estos factores con el plásmido $P_{CgCTA1}::CgCTA1::GFP$ (pMC18). Las células se trataron de la misma manera que está descrito en la Figura 10 (ver Material y Métodos).

Se analizó la expresión de la catalasa en las cepas mutantes *yap1Δ*, *skn7Δ*, *msn2Δ* y *msn4Δ* a concentraciones no letales de H_2O_2 según datos obtenidos previamente (**Fig. 11**). Las células sin tratamiento con oxidante muestran los niveles basales de *CgCTA1* (**Fig. 12A**). La expresión basal de las células de fase estacionaria (tiempo 0) no muestran diferencia, solamente la mutante en *skn7Δ* tiene niveles bajos de expresión. A las 2 horas sin tratamiento con oxidante en

medio fresco, la expresión de la catalasa disminuye en la cepa silvestre y en las mutantes *yap1Δ*, *skn7Δ*, *msn2Δ* y *msn4Δ* (**Fig. 12A**) posiblemente por efecto de dilución de la GFP por la división de las células ya que al entrar a fase exponencial los niveles de expresión de proteínas antioxidantes son menores ya que en fase estacionaria se ha reportado que hay una mayor acumulación de ERO y limitación de nutrientes. Estos datos sugieren que ninguno de los factores de transcripción Yap1p, Msn2p ni Msn4p son esenciales bajo condiciones normales ya que no presentan diferencia significativa comparada con la cepa silvestre, sólo Skn7p consistentemente se mantiene baja la expresión de la *CTA1*. Sin embargo, cuando las células entran en fase estacionaria a las 24 h, los niveles de *CgCTA1* aumentan con excepción de la mutante *skn7Δ* que muestra una disminución moderada con respecto a la cepa silvestre. Esto sugiere que Skn7p pudiera ser un regulador esencial de la *CTA1* en fase estacionaria.

Analizamos la inducción de *CgCTA1* a 1, 2 y 5 mM de H₂O₂ en las cepas mutantes. Los ensayos con 1 y 2 mM de H₂O₂ se encuentran en Anexos (**Fig. 24**). Las cepas silvestre, *msn2Δ* y *msn4Δ* exhiben un comportamiento similar con 5 mM de H₂O₂ de tratamiento a partir de 0 a 24 horas (**Fig. 12B**). Las cepas mutantes en *yap1Δ* y *skn7Δ* no mostraron inducción a los tiempos 2, 4 y 6 h. Es importante notar, que estas cepas mutantes permanece baja la expresión de la *CTA1* a lo largo del tiempo hasta las 24 h (**Fig. 12B**). Estos datos sugieren que factores Msn2p y Msn4p no son esenciales en la regulación de la *CgCTA1* en estas condiciones de estrés oxidativo, sin embargo, existe la posibilidad de que la falta de uno de estos factores compensara al otro. Los factores Skn7p y Yap1p son importantes en la regulación de la *CgCTA1* en condiciones de estrés oxidativo en fase exponencial. En fase estacionaria Skn7p y Yap1p pudieran estar compensado cada uno la falta del otro.

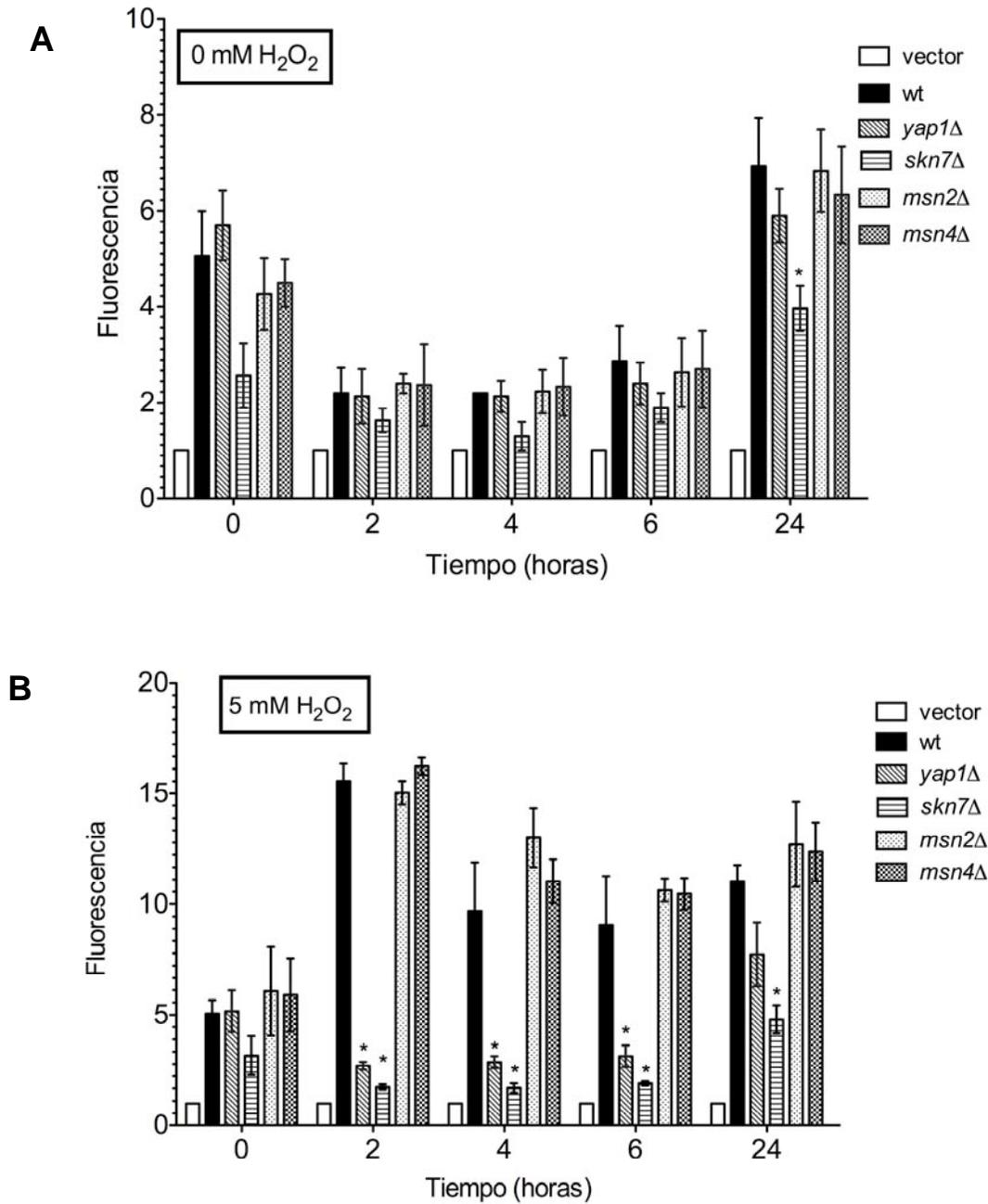


Figura 12. Inducción de la *CgCTA1* en las mutantes sencillas de los factores de transcripción *yap1Δ*, *skn7Δ*, *msn2Δ* y *msn4Δ*. Las cepas mutantes y la silvestre contienen el plásmido P_{CgCTA1}::*CgCTA1*::*GFP*. Se partió de un cultivo saturado de 48 y se diluyeron a una OD_{600nm} 0.2, las células se trataron con 0 y 5 mM de H₂O₂, posteriormente se midió su fluorescencia cada dos horas. **A)** Las células sin tratamiento con oxidante. **B)** Las células se trataron con 5 mM de H₂O₂. Las barras de error representan las desviaciones estándar. *, $p < 0.05$.

Analizamos el efecto de las dobles mutantes *yap1Δ skn7Δ* y *msn2Δ msn4Δ* en la expresión de la *CgCTA1*. La doble mutante *yap1Δ skn7Δ*, durante fase exponencial, no induce la *CTA1* con 5 mM de H₂O₂ y exhibe el mismo fenotipo que las mutantes sencillas *skn7Δ* y *yap1Δ* (**Fig. 12B** y **Fig. 13B**). Además permanece baja la expresión de la *CTA1* en fase estacionaria (24 h) y muestra un fenotipo similar a la mutante sencilla *skn7Δ* (**Fig. 12B** y **Fig. 13B**). En fase estacionaria la mutante *msn2Δ msn4Δ* no induce la expresión de la *CTA1* comparada con la cepa silvestre (**Fig. 12A-B** y **Fig. 13B**). Esto indica que en fase estacionaria se requiere al menos uno de estos factores de transcripción Msn2p y Msn4p para la expresión de la *CTA1*. Esto es consistente con la idea de que los factores Msn2p y Msn4p sean intercambiables y por tanto redundantes como en la levadura *S. cerevisiae*. Estos resultados sugieren que los factores de transcripción Yap1p y Skn7p regulan la expresión de la catalasa en fase exponencial y en fase estacionaria solo Skn7p y se requiere al menos Msn2p o Msn4p para inducir la expresión de la *CTA1* en fase estacionaria.

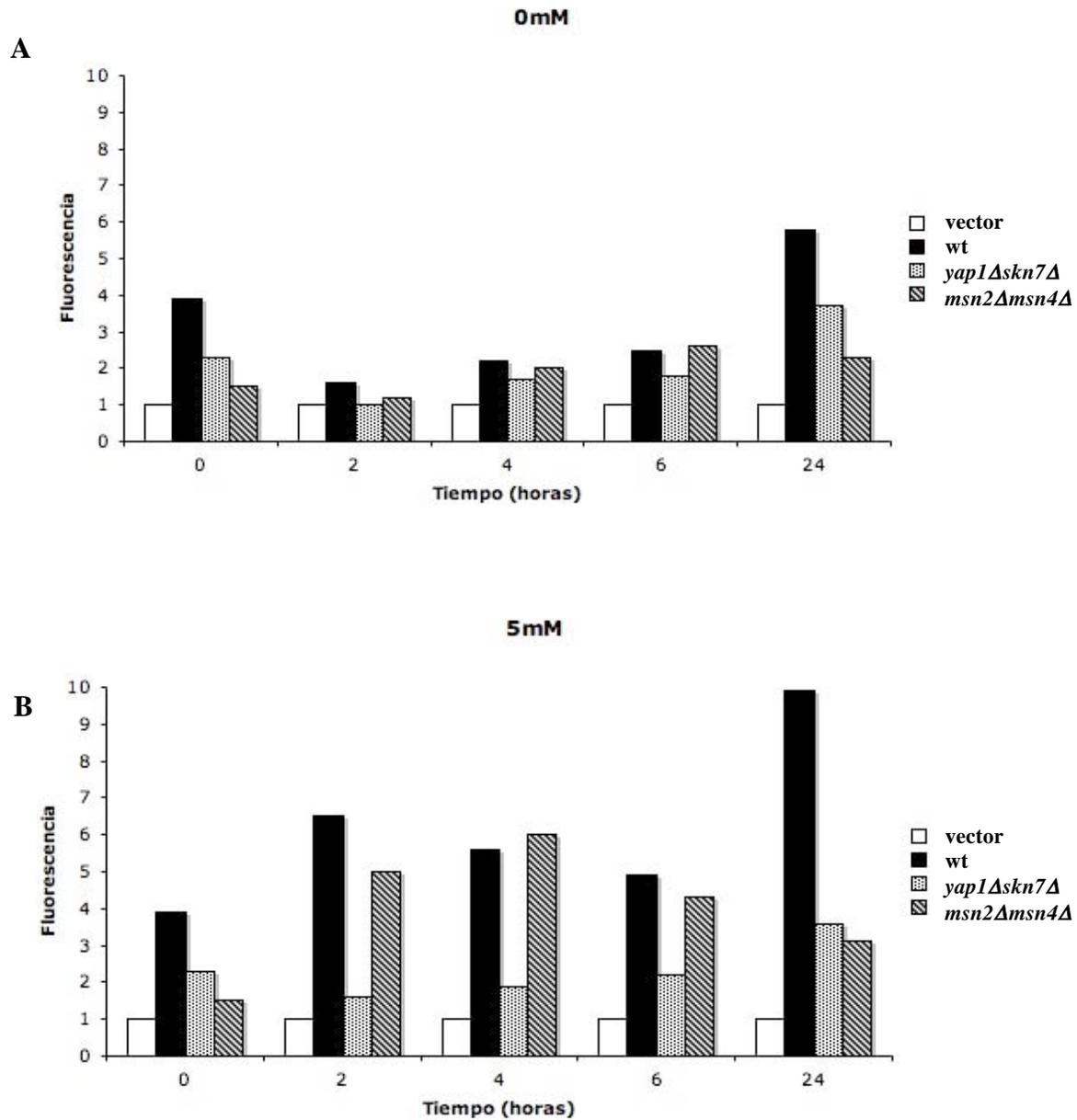


Figura 13. Inducción de la *CgCTA1* en las cepas mutantes dobles *yap1Δskn7Δ* y *msn2Δmsn4Δ*. Las cepas mutantes y la silvestre contienen el plásmido $P_{CgCTA1}::CgCTA1::GFP$. Se partió de un cultivo saturado de 48 h y se diluyeron a una OD_{600nm} 0.2, las células se trataron con 0 y 5 mM de H_2O_2 , posteriormente se midió su fluorescencia cada dos horas. **A)** Las células sin tratamiento con oxidante. **B)** Las células se trataron con 5 mM de H_2O_2 .

3.3 Yap1p y Skn7p son esenciales para el crecimiento celular durante estrés oxidativo.

Evaluamos el crecimiento de las cepas mutantes *yap1Δ*, *skn7Δ*, *msn2Δ* y *msn4Δ* a concentraciones de 10, 20 y 50 mM de H₂O₂ (**Fig. 14A-D**). El crecimiento se vió severamente afectado en las mutantes de *yap1Δ* y *skn7Δ* a concentraciones de 10, 20 y 50 mM de H₂O₂ (**Fig. 14**). Sin embargo, no se observó un efecto en el crecimiento de las mutantes *msn2Δ* y *msn4Δ* a las mismas concentraciones del oxidante (**Fig. 14**). Además y sorprendentemente las mutantes *msn2Δ* y *msn4Δ* crecen mejor que la cepa silvestre. Esto sugiere que Msn2p y Msn4p pudieran estar reprimiendo genes de la respuesta a estrés oxidativo en fase exponencial. A bajas concentraciones de H₂O₂ 1, 2 y 5 mM (**Fig. 15A-D**). El crecimiento de las mutantes *yap1Δ*, *skn7Δ* y la doble *yap1Δ skn7Δ* mostraron un decremento en la velocidad de su crecimiento en presencia de oxidante (**Fig. 15B-D**). Estos datos sugieren que Skn7p y Yap1p son esenciales para que la levadura pueda responder al estrés oxidativo durante la fase de crecimiento exponencial y estacionaria. Esto es consistente con los datos obtenidos anteriormente sobre la expresión de la *CgCTA1*. Las mutantes *msn2Δ*, *msn4Δ* y *msn2Δmsn4Δ* crecieron de manera similar que la cepa silvestre a estas bajas concentraciones de H₂O₂ (**Fig. 15A-D**).

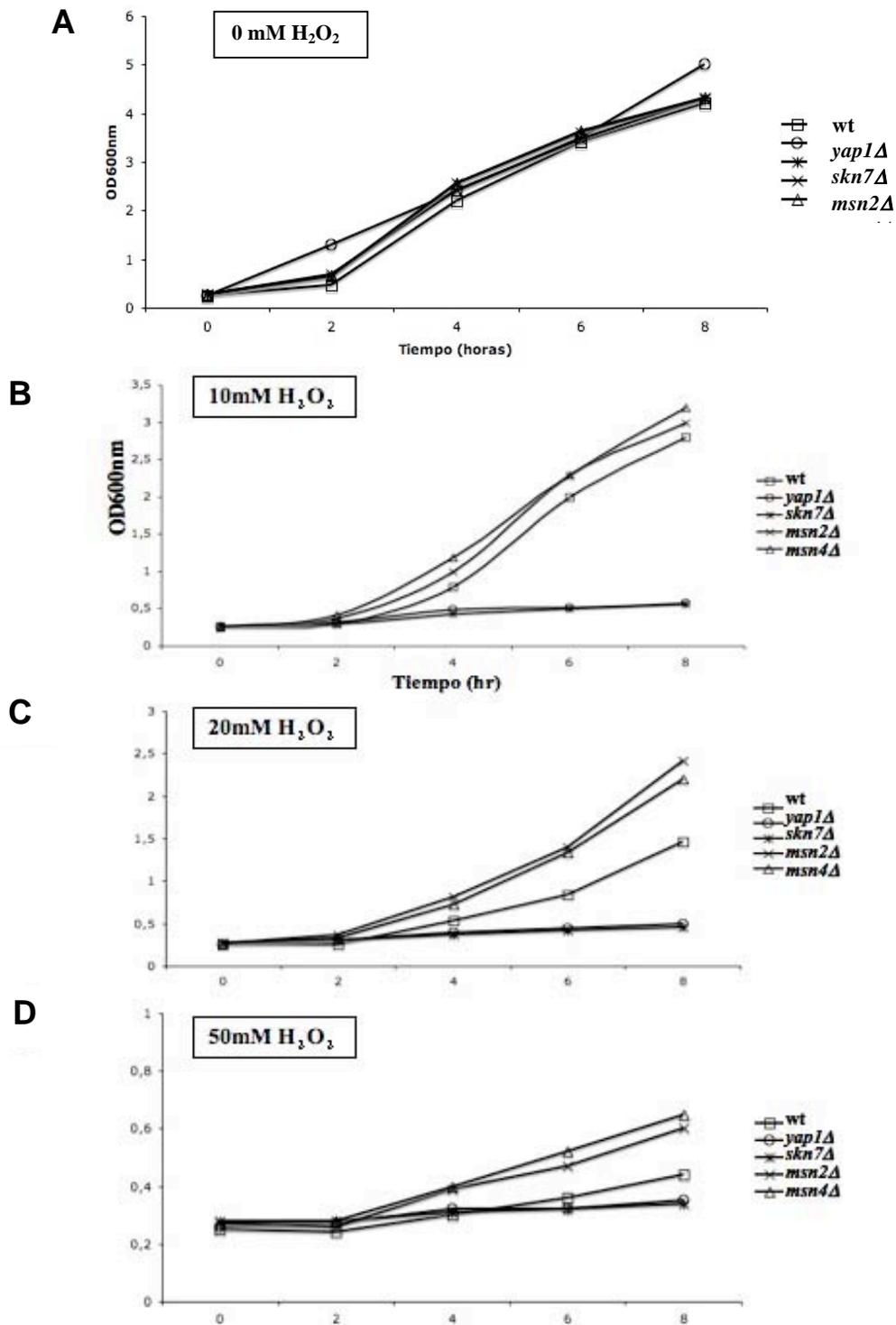


Figura 14. Curvas de crecimiento de las mutantes sencillas *yap1Δ*, *skn7Δ*, *msn2Δ* y *msn4Δ* durante tratamiento con H₂O₂. Se partió de un cultivo saturado de 48 h y se diluyeron las células a una OD₆₀₀ 0.2 (Fase logarítmica). Se sometieron a un tratamiento con diferentes concentraciones de H₂O₂ (0, 10, 20 y 50 mM). Posteriormente se midió su densidad óptica cada dos horas.

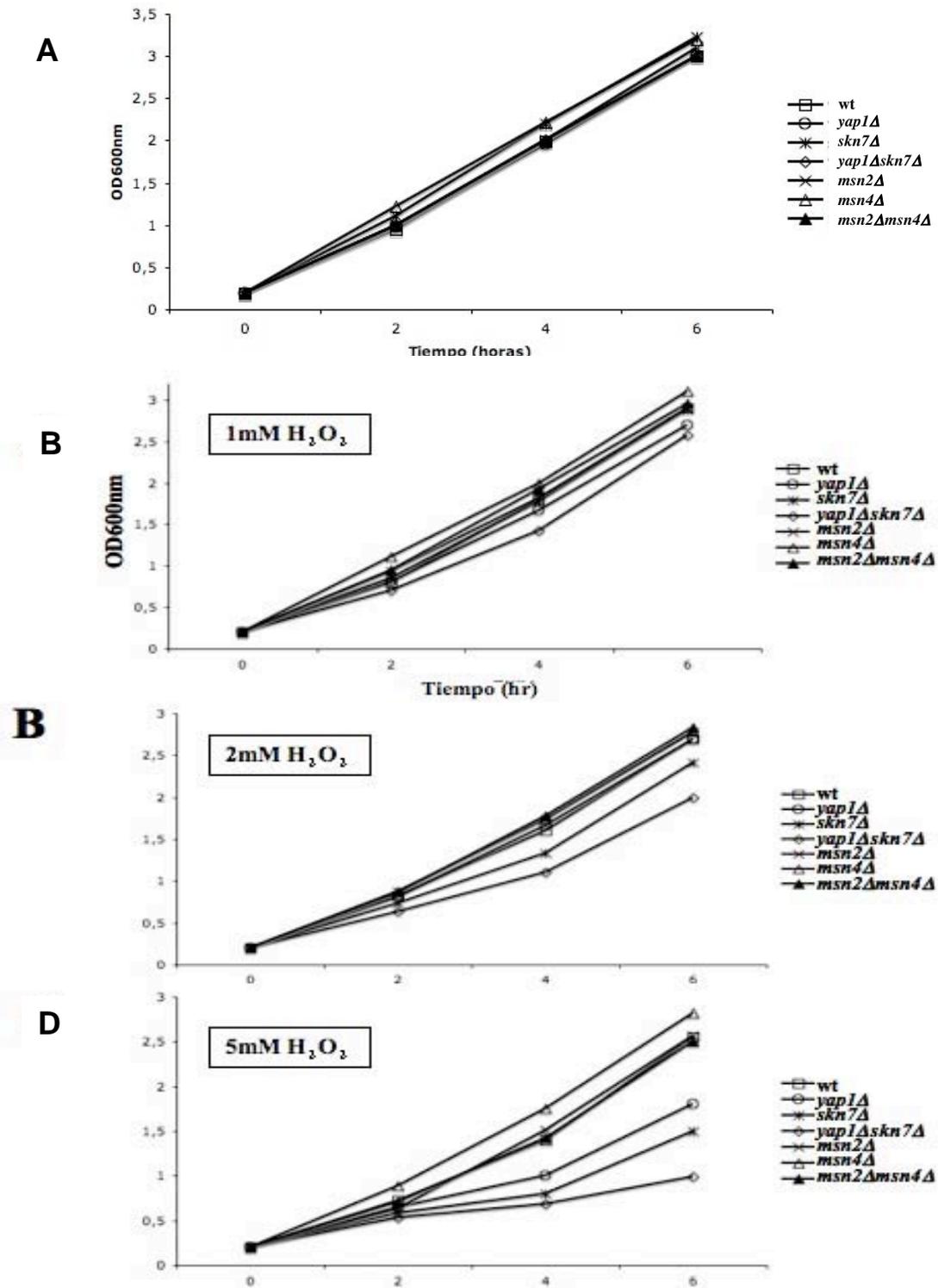


Figura 15. Curvas de crecimiento de las mutantes sencillas *yap1Δ*, *skn7Δ*, *msn2Δ* y *msn4Δ* y dobles durante tratamiento con H₂O₂. Se partió de un cultivo saturado de 48 h y se diluyeron las células a una OD₆₀₀ 0.2 (Fase logarítmica). Se sometieron a un tratamiento con diferentes concentraciones de H₂O₂ (0, 1, 2 y 5 mM). Posteriormente se midió su densidad óptica cada dos horas.

3.4 Los elementos de la expresión basal de la *CgCTA1* se encuentran dentro de 1 kb de la región promotora.

Para empezar a caracterizar la región del promotor de *CTA1*, evaluamos la fusión transcripcional, $P_{CgCTA1}::GFP$ (pMC35) con un promotor de 1 kb. El experimento se hizo de la misma forma que en la Figura 11 y medimos su inducción mediante citometría de flujo cada dos horas a diferentes concentraciones de H_2O_2 .

La fusión transcripcional $P_{CgCTA1}::GFP$ (promotor de 1 kb) sin tratamiento mostró un comportamiento similar a la construcción $P_{CgCTA1}CgCTA::GFP$ con un promotor de 4.5 kb (descrita en el apartado 3.1 de resultados) hasta las 6 h de tratamiento (**Fig. 16A**), sin embargo, fue incapaz de inducirse al entrar a fase estacionaria a las 24 h (**Fig. 16A**), cabe señalar que la construcción $P_{CgCTA1}CgCTA::GFP$ es una fusión traduccional. Cuando estas construcciones se someten a estrés oxidativo de 10 mM de H_2O_2 se observó que la fusión transcripcional $P_{CgCTA1}::GFP$ (promotor de 1 kb) no induce su expresión en fase logarítmica ni estacionaria. Sin embargo, la fusión con la proteína quimérica $P_{CgCTA1}CgCTA::GFP$ que lleva la región intergénica completa de 4.5 kb se induce 4 veces (**Fig. 16B**).

Estos datos sugieren que los elementos regulatorios de inducción como cajas de reconocimiento de los factores de transcripción (Yap1p, Skn7p, Msn2 y Msn4 entre otros) se encuentran a partir de 1 kb al 5' del ATG de la *CgCTA1*. Sin embargo, hay que considerar que la proteína quimérica *CTA1-GFP* nos indica además una regulación a nivel traduccional.

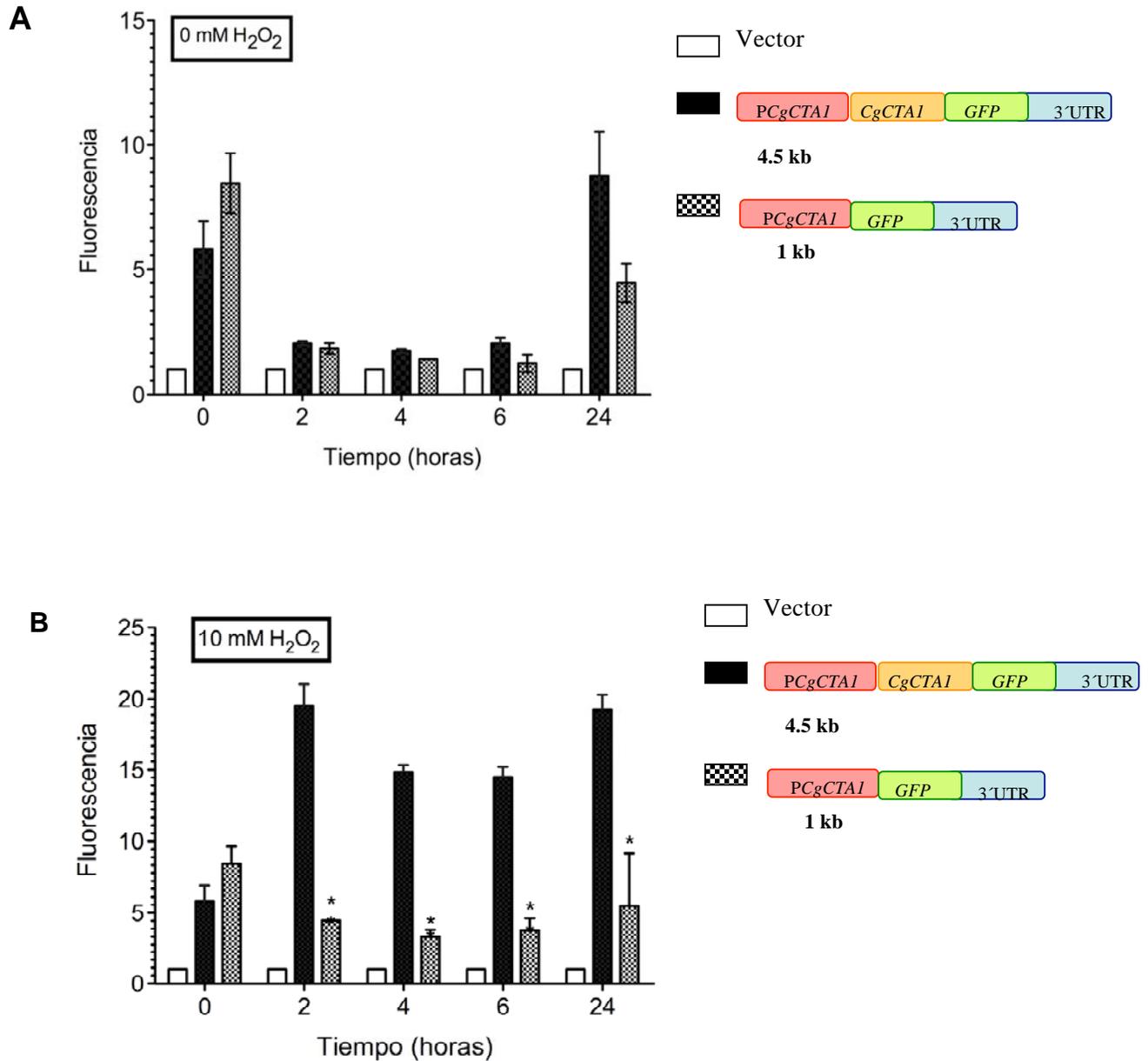


Figura 16. Inducción de la *CgCTA1* de la cepa silvestre con los plásmidos $P_{CgCTA1}::GFP$ (promotor de 1 kb) y $P_{CgCTA1}CgCTA1::GFP$ (promotor de 4.5 kb). La cepa silvestre lleva una fusión transcripcional que contiene 1 kb de la región promotora de *CgCTA1* fusionado con *GFP* y otra con una fusión traduccional con 4.5 kb del promotor *CgCTA1*. Se partió de un cultivo saturado y se diluyeron las células a una OD_{600nm} 0.2. Posteriormente se midió su fluorescencia cada dos horas. **A)** Las células sin tratamiento H₂O₂. **B)** Las células se trataron con 10 mM H₂O₂. Las barras de error representan las desviaciones estándar. *, $p < 0.05$.

3.5. Los motivos de importación al peroxisoma SKF149 y SKF373 pueden ser necesarios para la resistencia a H₂O₂ *in vitro*.

Para conocer si los dos motivos internos SKF son necesarios para la actividad de la catalasa I, realizamos mutaciones puntuales en estos sitios internos de importación al peroxisoma de la enzima, SKF149 y SKF373. Por complementación analizamos su funcionalidad (los aminoácidos SKF se cambiaron por alaninas).

En *S. cerevisiae* se sabe que la Cta1p tiene dos motivos independientes SKF, uno interno y otro en el extremo C-terminal. Se ha demostrado que la ausencia del motivo interno SKF, afecta la localización de la proteína al peroxisoma y que la ausencia de los últimos tres aminoácidos SKF en el C-terminal no altera la localización peroxisomal de la ScCta1p (Kragler *et al.*, 1993). En *C. glabrata*, la Cta1p tiene tres motivos putativos de importación al peroxisoma, dos internos SKF149 y SKF373 y uno en el C-Terminal AKI505. Sabemos por análisis de complementación de la mutante *cta1Δ* con la fusión *CgCTA1-GFP* (GFP está fusionado en el C-terminal de la *CTA1* y tiene un cambio en la lisina K506 por arginina R) que el cambio del aminoácido K506 no afectó la función de la proteína.

La cepa silvestre resiste hasta 500 mM de H₂O₂ (**Fig. 17A**). La mutante *cta1Δ* es sensible a 4 mM de H₂O₂ y complementada con *pCgCTA1::GFP* el fenotipo se restablece y crece hasta 300 mM (**Fig. 17B**). Las mutantes en SKF149AAA, SKF373AAA y la doble mutante SKF149AAA373AAA son sensibles a H₂O₂ (**Fig. 17C**). Estos datos sugieren que mutaciones en los motivos SKF149 y SKF373 afectan la actividad de la proteína o la proteína no se dirige donde su actividad se requiere. El motivo SKF149 pudiera tener un papel dual y estar involucrado con sitio activo ya que un análisis estructural realizado muestra que la fenilalanina F151 puede intervenir en con el grupo hemo por la cercanía de los átomos (**Fig. 29C, Anexos**) y el sitio SKF373 pudiera ser importante para el ensamblado del tetrámero (**Fig. 29B, Anexos**).

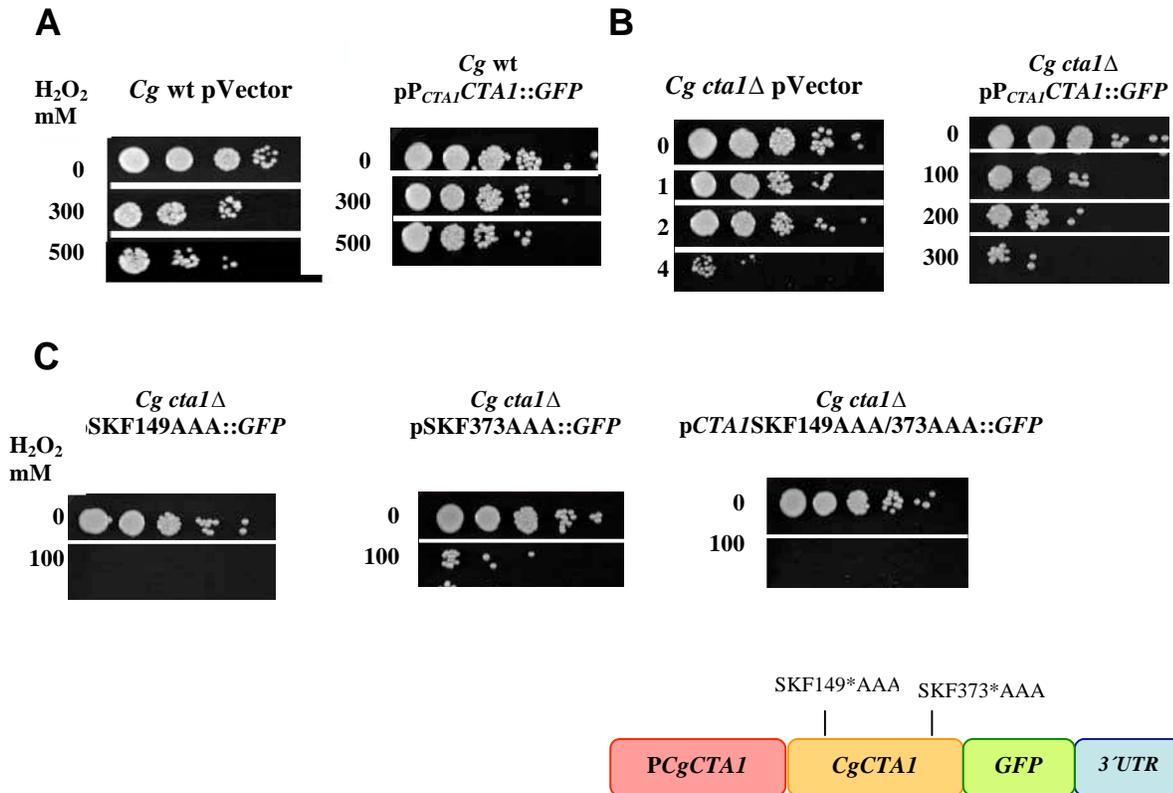


Figura 17. Ensayos de resistencia a H_2O_2 de las mutantes en los sitios de importación al peroxisoma SKF de la *CgCTA1*. Las cepas mutantes contienen el plásmido P_{CgCTA1}CgCTA1::GFP, se crecieron en medio CAA hasta fase estacionaria y se usó el mismo medio usado para llevar a una OD_{600nm} 0.5. Posteriormente se trataron con diferentes concentraciones de H_2O_2 . **A)** La cepa silvestre con el plásmido que contiene GFP sin promotor, izquierda. Con el plásmido P_{CgCTA1}CgCTA1::GFP, derecha. **B)** La mutante de la catalasa con el plásmido que contiene GFP sin promotor, izquierda. Con el plásmido P_{CgCTA1}CgCTA1::GFP, derecha. **C)** Las mutantes en *cta1Δ* con los plásmidos que contienen las mutaciones en los sitios SK149AAA::GFP, SK373AAA::GFP y la doble mutante SK149AAA/373AAA::GFP.

3.6. La *CgCTA1* le confiere a *S. cerevisiae* una mayor resistencia a H_2O_2 bajo el promotor fuerte *TEF1*

Para entender el grado de conservación funcional de la respuesta a estrés oxidativo entre *C. glabrata* y *S. cerevisiae*, complementamos las mutantes de *S. cerevisiae*: *cta1Δ*, *ctt1Δ* y la doble mutante *cta1Δctt1Δ* con un plásmido que contiene la catalasa I de *C. glabrata* bajo promotor fuerte *TEF1* de *S. cerevisiae* y realizamos ensayos de resistencia a distintas concentraciones de H_2O_2 en fase estacionaria.

La cepa silvestre y las mutantes *cta1Δ*, *ctt1Δ* y *cta1Δctt1Δ* de *S. cerevisiae* con el plásmido P_{TEF1} -*CgCTA1*-*GFP* resisten a 100 mM de H_2O_2 , una concentración a la cual no crece la cepa silvestre (Fig. 18A-D).

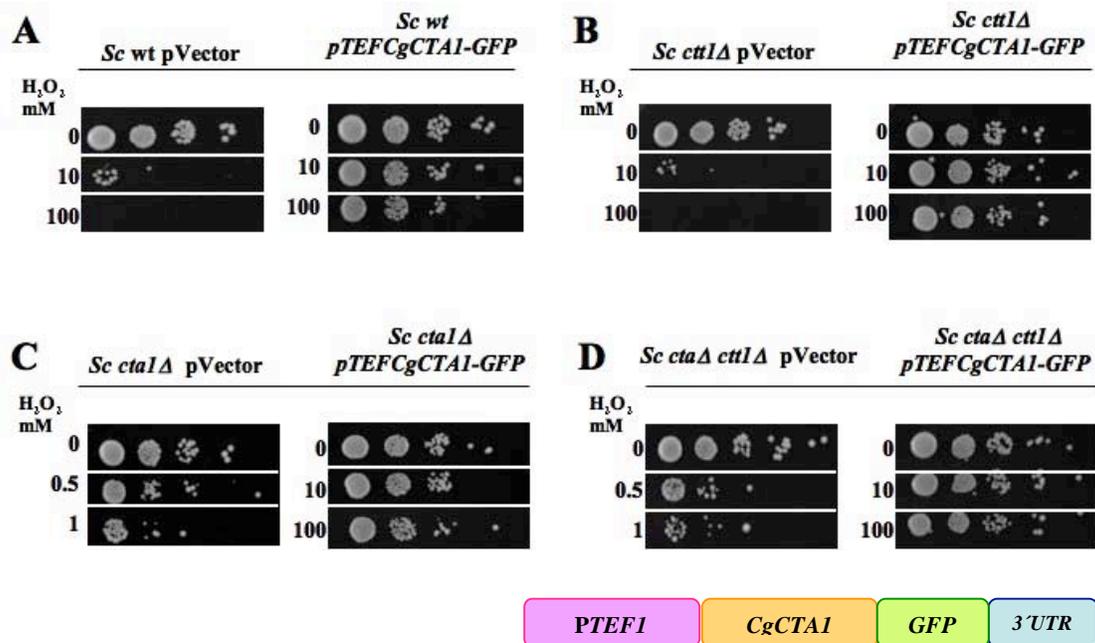


Figura 18. Ensayos de resistencia a H_2O_2 con las mutantes *cta1Δ*, *ctt1Δ* y *cta1Δctt1Δ* de *S. cerevisiae* con la construcción $P_{TEF1}CgCTA1-GFP$ en fase estacionaria. Las mutantes en las catalasas *cta1Δ*, *ctt1Δ* y *cta1Δ ctt1Δ* se complementaron con el plásmido $P_{TEF1}CgCTA1::GFP$. Las células se crecieron en medio CAA por 48 h y se trataron por 3 horas con diferentes concentraciones de H_2O_2 . El plásmido control pVector lleva GFP sin promotor. **A)** La cepa silvestre con el plásmido plásmido $P_{TEF1}CgCTA1::GFP$, derecha. **B)** La mutante de la catalasa citosólica *ctt1Δ* con el plásmido $P_{TEF1}CgCTA1::GFP$, derecha. **C)** La mutante de la catalasa peroxisomal *cta1Δ* con el plásmido $P_{TEF1}CgCTA1::GFP$ derecha. **D)** La doble mutante *cta1Δ ctt1Δ* plásmido $P_{TEF1}CgCTA1::GFP$ derecha.

La sobre-expresión de la *CgCTA1* aumenta la resistencia de *S.cerevisiae* aproximadamente 100 veces más a H_2O_2 . Sin embargo, no sabemos si el incremento a la resistencia se debe a la sobre-expresión de la *CgCTA1* o a las características propias de la enzima.

3.7. La expresión de la catalasa de *C. glabrata* bajo el promotor de la catalasa peroxisomal de *S. cerevisiae* confiere mayor resistencia a H_2O_2

Para determinar si el aumento en la resistencia a H_2O_2 en *S. cerevisiae* se debe a la sobre-expresión de la *CgCTA1* bajo el promotor *TEF-1* o se debe a la eficiencia de la enzima *CgCta1p*, clonamos la *CgCTA1* en un plásmido replicativo *CEN ARS* (pMC71, de una copia) bajo el promotor de la catalasa peroxisomal de *S. cerevisiae* y la región 3'UTR de la *ScCTA1*. Complementamos las mutantes de las catalasas de *S. cerevisiae* y realizamos ensayos de resistencia a H_2O_2 en fase estacionaria como en la Figura 18. La cepa silvestre y las mutantes *cta1Δ*, *ctt1Δ* y *cta1Δctt1Δ* con el plásmido $P_{sc}::CgCTA$ son aproximadamente diez veces más resistentes a H_2O_2 que la cepa silvestre de *S. cerevisiae* (**Fig. 19A**). La mutante de la catalasa citosólica *ctt1Δ* complementada con $P_{sc}::CgCTA1$ observamos un fenotipo de mayor resistencia a H_2O_2 que la cepa silvestre (**Fig. 19B**) consistentemente con los experimentos anteriores. Las cepas mutantes de *S. cerevisiae* complementadas con $P_{sc}::CgCTA1$ son capaces de crecer a concentraciones altas, a las cuales la cepa silvestre no llega a crecer. Esto indica que la catalasa de *C. glabrata* presenta mayor actividad y/o estabilidad y pueda degradar mayor cantidad de sustrato que la *ScCTA1*.

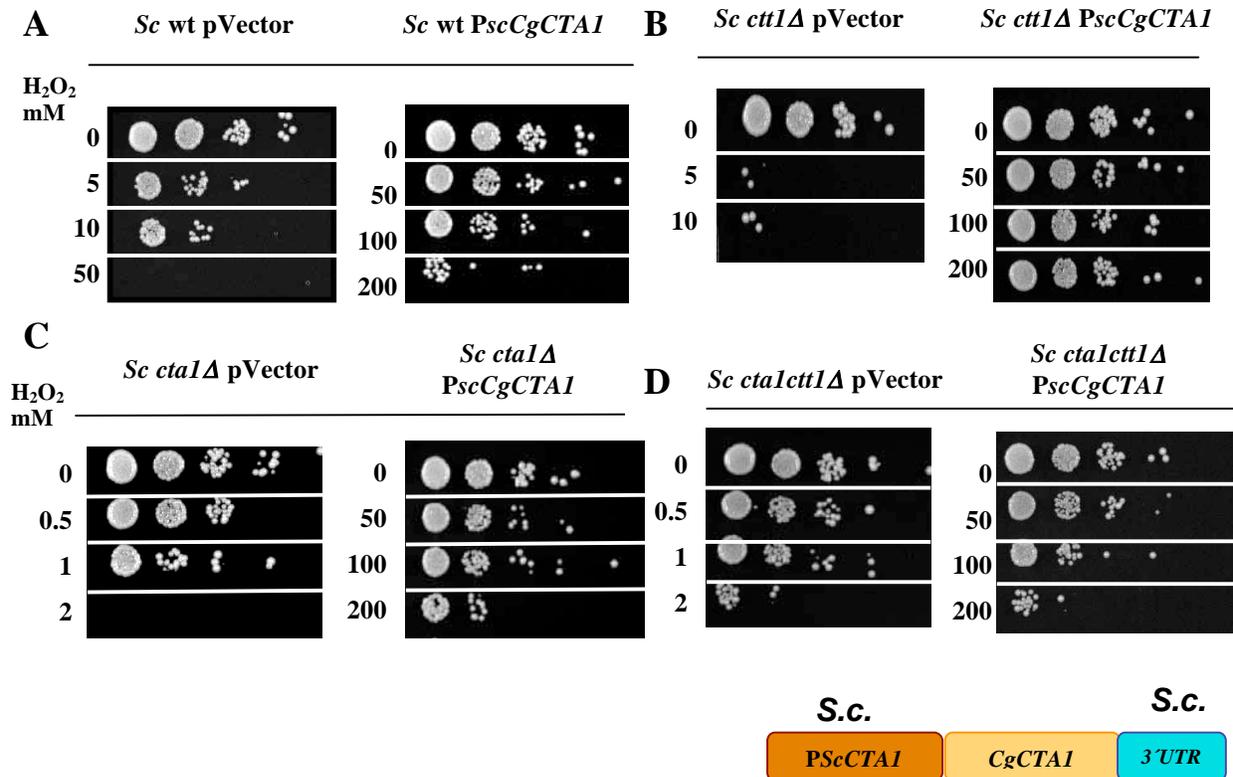


Figura 19. Ensayos de resistencia a H_2O_2 con las mutantes *cta1Δ*, *ctt1Δ* y la doble mutante *cta1Δ ctt1Δ* de *S. cerevisiae* en fase estacionaria con *PSc-CgCTA1*. Las mutantes en las catalasas *cta1Δ*, *ctt1Δ* y *cta1Δ ctt1Δ* se complementaron con el plásmido *PSc-CgCTA1*. Las células se crecieron en medio CAA por 48 hrs y se trataron por 3 horas con diferentes concentraciones de H_2O_2 . El plásmido control pVector lleva GFP sin promotor. **A)** La cepa silvestre *Sc* con el plásmido *PSc-CgCTA1*, derecha. **B)** La mutante de la catalasa citosólica *ctt1Δ* con el plásmido *PSc-CgCTA1*, derecha. **C)** La mutante de la catalasa peroxisomal *cta1Δ* con el plásmido *PSc-CgCTA1*, derecha. **D)** La doble mutante *cta1Δ ctt1Δ* plásmido *PSc-CgCTA1* derecha.

3.8. El promotor de *CTA1* de *C. glabrata* es parcialmente funcional en *S. cerevisiae*

Para saber si el promotor de *C. glabrata* es funcional en *S. cerevisiae* complementamos las mutantes de *S. cerevisiae*: *cta1Δ*, *ctt1Δ* y la doble mutante *cta1Δctt1Δ* con el plásmido $P_{CgCTA1}CgCTA::GFP$ (pMC18). La *CTA1* está bajo el promotor de la catalasa de *C. glabrata*. Los ensayos se realizaron de la misma manera como está descrito en la Figura 18.

Observamos que la cepa silvestre de *S. cerevisiae* es sensible a 10 mM de H_2O_2 y cuando tiene la *CgCTA1* aumenta ligeramente su resistencia (**Fig. 20A**). La mutante de la catalasa citosólica *ctt1Δ* presenta un fenotipo de resistencia similar que la cepa silvestre (**Fig. 20B**) y en presencia de la *CgCTA1* muestra un incremento significativo en su resistencia a 10 mM de H_2O_2 incluso más que la cepa silvestre con el plásmido (**Fig. 20A-B**). Esto indica que la *CgCta1p* y la *ScCta1p* son suficientes para incrementar la resistencia en la cepa *ctt1Δ* y además la presencia de *ScCtt1p* muestra un efecto negativo sobre la *CgCta1p* (ver más adelante). El aumento en la resistencia puede deberse a que la *ScCtt1p*, que se encuentra activa en el citoplasma, pudiera interferir con la función de la *CgCTA1*. Es posible que se formen heterotetrámeros y consecuentemente resulte una proteína no funcional.

La mutante de catalasa peroxisomal *cta1Δ* de *S. cerevisiae* es muy sensible a H_2O_2 (1 mM) y cuando tiene la *CgCTA1* no muestra fenotipo de resistencia y es igualmente sensible a 1 mM (**Fig. 20C**). Este dato indica tres cosas: a) que la *CgCTA1* presenta una expresión basal que no es suficiente para complementar la mutante *cta1Δ* (peroxisomal) a diferencia de la mutante *ctt1Δ* (citosólica) que si se observa un incremento en la resistencia a H_2O_2 b) la *ScCtt1p* ejerce un efecto negativo sobre la *CgCta1p* y c) que la catalasa peroxisomal *ScCta1p* es esencial para la resistencia a H_2O_2 .

La doble mutante *cta1Δctt1Δ* es sensible a 1 mM al igual que la cepa *cta1Δ* y cuando se complementa con *CgCTA1* presenta un ligero incremento en su resistencia a 1 mM comparada con la cepa *cta1Δ* (**Fig. 20C-D**). Esta pequeña diferencia puede deberse también a la ausencia de ScCtt1p que no interfiere con la *CgCta1p*. Sin embargo, esta ligera expresión de la *CgCta1* no es suficiente para complementar a la doble mutante *cta1Δctt1Δ*.

Estos datos indican que la región promotora de *CgCTA1* es parcialmente funcional en *S. cerevisiae*, de tal manera que solo la maquinaria básica de transcripción, el reconocimiento de la TATA “box”, conlleva a la expresión basal de *CgCTA1*. Además, las secuencias de elementos de inducción no sean reconocidas por los factores de transcripción ScYap1p y ScSkn7p en *S. cerevisiae*. También existe la posibilidad de que la localización de la *CgCta1p* juegue un papel fundamental en la resistencia a estrés oxidativo y que *S. cerevisiae* no transloque eficientemente a *CgCta1p* a peroxisoma o mitocondria. También puede haber factores adicionales en *C. glabrata*, para la expresión de *CTA1* que no existan en *S. cerevisiae*.

Para verificar si efectivamente el promotor de *CgCTA1* expresa a la *CgCTA1* en *S. cerevisiae* en un nivel insuficiente, evaluamos la fluorescencia de la proteína quimérica *CgCTA1::GFP* mediante microscopía de epifluorescencia. Observamos que la cepa silvestre de *S. cerevisiae* que contiene el plásmido con la fusión *CgCTA1::GFP* bajo el promotor de la catalasa de *C. glabrata* sin H_2O_2 no presenta fluorescencia (nivel basal) (**Fig. 21**). Este resultado es consistente con el resultado anterior, ya que la región promotora de *CgCTA1* posiblemente no sea reconocida por los factores de transcripción ScYap1p y ScSkn7p o se una al ADN débilmente, a pesar de que *in silico* la región promotora de *ScCTA1* presenta cajas para estos factores de transcripción. Esto indica que los dominios de unión al ADN de los factores Yap1p y Skn7p no están conservados en estas dos especies. Además es importante recalcar que la *CgCTA1* presenta una expresión basal en *S. cerevisiae* que no es suficiente para complementar las mutantes *cta1Δ* y la

doble *cta1Δctt1Δ* ni tampoco es capaz de emitir fluorescencia por esta misma razón.

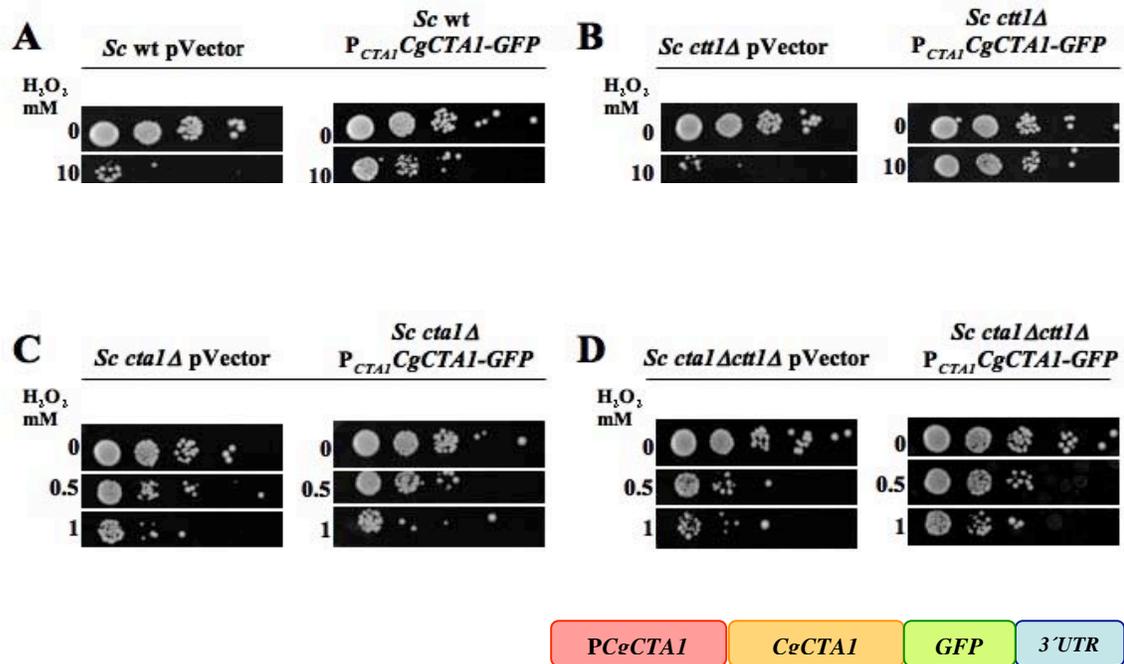


Figura 20. Ensayos de resistencia a H_2O_2 con las mutantes *cta1Δ*, *ctt1Δ* y la doble mutante *cta1Δ ctt1Δ* de *S. cerevisiae* en fase estacionaria. Las mutantes en las catalasas *cta1Δ*, *ctt1Δ* y *cta1Δ ctt1Δ* se complementaron con el plásmido $P_{CgCTA1}CgCTA1::GFP$. Las células se crecieron en medio CAA por 48 hrs y se trataron por 3 horas con diferentes concentraciones de H_2O_2 . El plásmido control pVector lleva GFP sin promotor. **A)** La cepa silvestre *Sc* con el plásmido $P_{CgCTA1}CgCTA1::GFP$, derecha. **B)** La mutante de la catalasa citosólica *ctt1Δ* con el plásmido $P_{CgCTA1}CgCTA1::GFP$, derecha. **C)** La mutante de la catalasa peroxisomal *cta1Δ* con el plásmido $P_{CgCTA1}CgCTA1::GFP$ derecha. **D)** La doble mutante *cta1Δ ctt1Δ* plásmido $P_{CgCTA1}CgCTA1::GFP$ derecha.

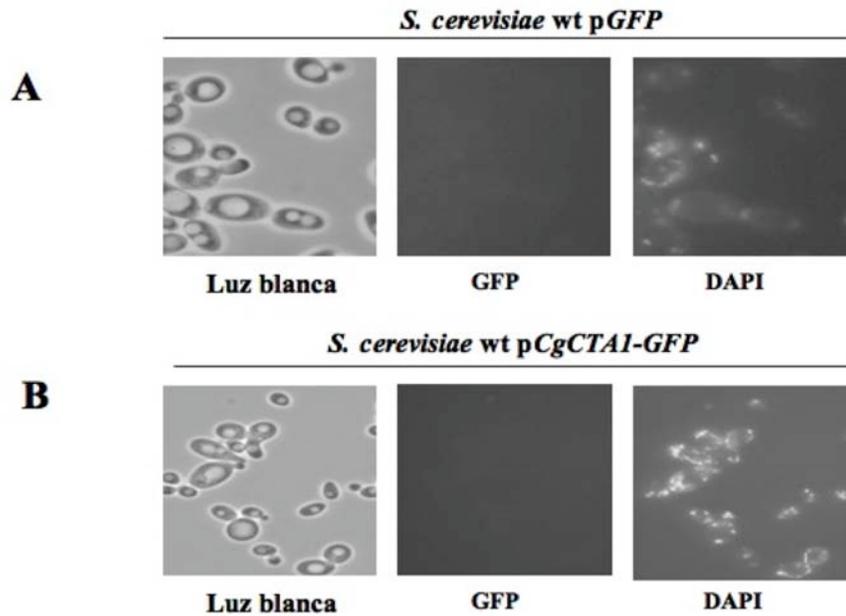


Figura 21. Localización celular de la catalasa de *C. glabrata* en *S. cerevisiae*.

La localización fue determinada por microscopía de fluorescencia. Las células se incubaron 2 horas en medio CAA sin H₂O₂, posteriormente fueron teñidas con DAPI (1 μg mL⁻¹) por 5 min. **A)** La cepa silvestre *Sc* fue transformada con el plásmido que contiene *GFP*. **B)** La cepa silvestre *Sc* fue transformada con el plásmido que contiene P_{CgCTA1}CgCTA1::*GFP*.

IV. DISCUSIÓN

Durante la coevolución de patógenos y hospederos, los patógenos han desarrollado mecanismos antioxidantes que les permitan sobrevivir y evadir las especies reactivas de oxígeno generadas por células fagocíticas. Las catalasas son enzimas ubicuas antioxidantes que tienen la capacidad de degradar el peróxido de hidrógeno y en algunos patógenos desempeñan un papel crucial en la virulencia. En el presente trabajo usamos una serie de herramientas moleculares que nos permitieron estudiar la regulación la catalasa I de *C. glabrata*. Nuestros resultados indican que la *CgCTA1* está regulada por los factores transcripcionales Yap1p y Skn7p en fase exponencial y por Msn2 / Msn4 en fase estacionaria y que además las cajas reguladoras en el promotor de *CgCTA1* se encuentran a 1 kb hacia el 5' del ATG. Mostramos que los sitios internos de importación al peroxisoma de *CgCTA1* son esenciales para la actividad de la enzima y apoyan la idea de que la catalasa peroxisomal desempeña un papel determinante en la resistencia a estrés oxidativo en *C. glabrata* y en *S. cerevisiae*. Además probamos que la *CgCTA1* es capaz de conferirle mayor resistencia a *S. cerevisiae*.

La catalasa I de *C. glabrata* está regulada por los factores transcripcionales Yap1p y Skn7p que reconocen secuencias específicas en la región intergénica de *CgCTA1*.

C. glabrata posee solo una catalasa monofuncional *CTA1* y se requiere para la resistencia a H₂O₂ *in vitro*. Se ha reportado que la respuesta transcripcional a estrés oxidativo está mediada en parte por los factores de transcripción Yap1p, Skn7p, Msn2 y Msn4p y que la sensibilidad de la mutante triple *yap1Δskn7Δmsn4Δ* y cuádruple *yap1Δskn7Δmsn4Δmsn2Δ* presenta una sensibilidad similar a la mutante *cta1Δ* (Cuellar-Cruz *et al.*, 2008). Los datos del presente trabajo muestran que la regulación de la *CgCTA1* depende principalmente de Yap1p y Skn7p en fase exponencial en presencia de H₂O₂ y de Msn2 / Msn4 en fase estacionaria (**Fig. 12**). Hay un reporte donde demuestran que *CgYap1p* fusionada

en el N-terminal con *GFP* bajo el promotor de *CgADH1* (Alcohol deshidrogenasa I) en un plásmido centromérico se localiza en el citoplasma en condiciones sin estrés y cuando es inducido con 0.4 mM de H₂O₂ se acumula rápidamente en el núcleo (Roetzer *et al.*, 2009). Estudios de investigaciones en otras levaduras han reportado que factores homólogos a Yap1p regulan directamente a la catalasa. En *S. pombe* se ha reportado la participación del factor Pap1 en la regulación de la catalasa (Kim *et al.*, 2008) y en *C. albicans* se ha demostrado que el factor Cap1p controla directamente la expresión de la catalasa (Znaidi *et al.*, 2009).

Además mostramos que las mutantes en *yap1Δ* y *skn7Δ* afectan la viabilidad celular aún a concentraciones bajas de H₂O₂ (**Fig. 16**). El factor de transcripción Skn7p en *S. cerevisiae* (Moye-Rowley, 2003) y en *C. albicans* (Sorger y Pelham, 1988) ha mostrado tener importancia en la respuesta a estrés oxidativo y la pérdida de viabilidad en las mutantes *yap1Δ* y *skn7Δ* puede deberse a que *SNK7* también está involucrado en la regulación del ciclo celular y en la biosíntesis de pared celular (Brown *et al.*, 1993). Además en *S. cerevisiae* *YAP1* y *SKN7* han mostrado una cooperación en la regulación de la respuesta a estrés oxidativo mediante la inducción de peroxiredoxinas, tioredoxinas y formación de puentes disulfuro a través de la Gpx3p en la respuesta a estrés oxidativo (Kuge y Jones, 1994, Okazaki *et al.*, 2007, Tachibana *et al.*, 2009). Estudios recientes reportan la importancia de la proteína Skn7p en la virulencia de algunos hongos patógenos como *C. glabrata* (Saijo *et al.*, 2010) y *C. neoformans* la mutante *skn7Δ* presenta virulencia atenuada (Wormley *et al.*, 2005).

Msn2p y Msn4 son factores de transcripción generales de estrés, en *S. cerevisiae* comparten funciones sobrelapadas (parálogos) por lo que se han considerado redundantes e intercambiables (Boy-Marcotte *et al.*, 2006). Nuestros datos sugieren que estas funciones pueden compartirse en *C. glabrata* ya que solo la falta de los dos factores de transcripción muestran un defecto en la inducción de la catalasa en fase estacionaria (**Fig. 13**).

La observación de que las mutantes de *C. glabrata msn2Δ* y *msn4Δ* presentan un mejor crecimiento que la cepa silvestre en presencia de oxidante sugiere que estos factores pudieran funcionar como represores de genes de respuesta a estrés oxidativo. Existe un reporte de genes regulados en respuesta a estrés en la levadura *S. cerevisiae* que muestra que la doble mutante *msn2Δ msn4Δ* presenta una ligera inducción de genes involucrados en la respuesta a estrés como *HSP104*, *HSP78*, *HSP42*, *SSA4* y *YNL077w* (proteínas de la familia HSP70 que están involucradas en la termotolerancia y respuesta a estrés) comparada con la cepa silvestre (Moskvina *et al.*, 1998). Estos datos pudieran relacionarse con los datos de Lee y cols. donde muestran que Skn7p puede actuar como represor de un conjunto de genes que son blanco de Yap1p como por ejemplo *GLR1* que codifica para una glutatión reductasa y *GHS1* para la glutatión sintetasa (Lee *et al.*, 1999).

La reprogramación en la expresión génica es de gran importancia en los procesos de adaptación por lo tanto es indispensable responder a estímulos exógenos del medio ambiente e inducir un conjunto de genes específicos dada una condición. La regulación transcripcional de la catalasa es importante para desencadenar la repuesta a estrés oxidativo y es particularmente interesante que la región intergénica de *CgCTA1* es de 4.5 kb, lo cual no es un tamaño usual para las regiones promotoras que se han estudiado y nos sugiere que puede ser regulado por varios factores de transcripción en distintas condiciones. En contraste con el tamaño de la región intergénica de la *ScCTA1* que es de 300 pb sugiere una regulación más específica. Sin embargo, hay que tomar en cuenta que puede haber elementos de regulación adyacentes al gen de interés en el contexto del cromosoma que afecten la expresión en ambos casos. Además la *CgCTA1* presenta no presenta sintenia con la de *ScCTA1* ni con la *ScCTT1* de *S.cerevisiae* lo que sugiere que *C. glabrata* pudo sufrir recombinación y pérdida de genes en el cromosoma 13 y 11 después de la duplicación de todo el genoma del ancestro

(**Fig. 27. Anexos**). Esto indicar que la regulación de la *CgCTA1* pudiera ser regulada de manera diferente.

Nuestros resultados demuestran que la expresión basal de *CgCTA1* bajo condiciones fisiológicas normales se encuentra regulada por factores de transcripción que reconocen secuencias en la región promotora dentro de 1 kb hacia el 5' del ATG. Sin embargo, los elementos regulatorios que inducen la expresión de *CgCTA1* en respuesta a estrés por H₂O₂ se encuentran río arriba de la región de 1kb, ya que esta región de 1 kb mostró no ser suficiente para inducir la expresión de la *CgCTA1* (**Fig. 17**). Nuestros resultados indican que secuencias reguladoras que deben ser reconocidas por Yap1p y Skn7p se deben encontrar en el promotor de *CTA1* a lo largo de toda la región intergénica río arriba a partir de 1 kb con respecto al ATG.

Mostramos que la región promotora de *CgCTA1* es parcialmente funcional en *S. cerevisiae*, ya que solo presenta expresión basal y no es suficiente para complementa las mutantes *cta1Δ* y *cta1Δctt1Δ* (**Figs. 20 y 21**) y esta expresión basal tampoco es capaz de emitir fluorescencia con la fusión P_{Cg}*CgCTA1-GFP* (**Fig. 21**). En *S. cerevisiae* Yap1 reconoce secuencias (YRE) y tiene dominio de unión a ADN de zipper de leucina, Snk7 se activa por la vía de dos componentes a través de una histidin-cinasa (Sln1) (Saijo *et al.*, 2010). A pesar de encontrar cajas de reconocimiento de Yap1 y Skn7 en la región promotora de *ScCTA1* en un análisis *in silico* (**Fig. 26, Anexos**) nuestros resultados indican que estos factores son incapaces de reconocer las secuencias regulatorias en el promotor de *CgCTA1*. La similitud de aminoácidos entre *ScSkn7* y *CgSkn7* es de 60.3 %, sin embargo *ScYap1* vs *CgYap1* presentan una similitud de 47.7 % lo cual indica que no son proteínas con alto grado de similitud. Analizamos también las secuencias de aminoácidos del dominio de unión a ADN de Yap1p y Skn7p de *S. cerevisiae* mediante un alineamiento y observamos que el dominio de unión a ADN de Yap1p no están conservadas entre *C. glabrata* y *S. cerevisiae*. El dominio de unión a

ADN de ScYap1p (Basic Leucine Zipper) es 24.2 % similar a *C. glabrata*, mientras que el dominio de unión a ADN de Skn7p es de 71.2 % (**Fig. 28 Anexos**). Es importante mencionar que para que un factor de transcripción se una al ADN de manera correcta necesita reconocer cada una de las bases contenidas en la molécula de ADN y por lo tanto cualquiera de estos reguladores de *S. cerevisiae* no podrían reconocer completamente el sitio de unión al ADN en la región promotora de *CgCTA1*.

Los motivos de importación al peroxisoma SKF149 y SKF373 pueden ser necesarios para la resistencia a H₂O₂ *in vitro*.

La localización de la *CgCTA1* se ha demostrado que depende de la fuente de carbono y condiciones de limitación de nutrientes como es el caso de micro ambientes hostiles durante la fagocitosis de la levadura por macrófagos. En fuentes de carbono no fermentables (etanol o ácido oléico) y en presencia de estrés oxidativo la catalasa se localiza predominantemente en los peroxisomas (Roetzer *et al.*, 2009). Resultados obtenidos anteriormente en el laboratorio confirman que la localización de la *CgCTA1* en ausencia del oxidante se encuentra distribuída en el citoplasma (**Fig. 6**).

Se ha reportado que proteínas peroxisomales contienen una secuencia señal (PTS1) mínima en el carboxilo terminal de la proteína formado por un tripéptido (Serina/Alanina/Cisteína-Lisina/Arginina/Histidina-Leucina) que pueden estar contribuyendo al correcto doblamiento de la enzima y un PTS2 , una secuencia que se localiza cerca del N-terminal o en secuencias internas de la proteína (Subramani *et al.*, 2000).

En *S. cerevisiae* el motivo interno de la catalasa peroxisomal SKF143 es esencial para su translocación al peroxisoma, pero no es esencial el motivo en el C-terminal (Kragler *et al.*, 1993). La *CgCTA1* contiene tres secuencias putativas de importación al peroxisoma: dos secuencias internas SKF y una en el C-terminal

AKI. Por resultados obtenidos anteriormente en el laboratorio podemos considerar la posibilidad de que el motivo AKI no puede ser esencial para la actividad de la enzima, ya que en la fusión traduccional con la GFP se modificó el codón de paro de la *CgCTA1* y se cambió la lisina (K506) del C-terminal por una arginina (R) que también es un aminoácido básico, sin embargo, se ha reportado que la sustitución del aminoácido Lisina (K) por aminoácidos básicos como la arginina no afecta la importación de la enzima y la sustitución con otros aminoácidos como leucina, glicina o glutamina afectan a la localización de la catalasa (Purdue y Lazarow, 1996). En *C. tropicalis* el tripéptido AKI es esencial para la translocación de la catalasa al peroxisoma (Aitchison *et al.*, 1991).

En el presente estudio se muestra evidencia que las secuencias internas de importación al peroxisoma SKF149 y SKF373 de la *CgCTA1* son necesarias para funcionalidad de la enzima y resistencia a estrés oxidativo (**Fig.16**). En un análisis estructural de la catalasa realizado se muestra que la fenilalanina del sitio SKF149 puede formar parte importante del sitio activo ya que la distancia aproximada que existe entre el benceno de la fenilalanina al carbono que une al hierro dentro del grupo hemo es de 4.5 Å (**Fig. 29C, Anexos**) lo cual es considerablemente cerca, en base a que la distancia para formar un puente de hidrógeno es aproximadamente de 3.5 Å, esta posible interacción de la fenilalanina podría ayudar en la formación o estabilidad de complejos en los procesos de oxidoreducción del átomo de hierro del grupo hemo. Las cadenas laterales de los residuos de serina y de lisina se encuentran hacia fuera del sitio activo por lo tanto pudieran no tener una interacción importante con el grupo hemo (**Fig. 29C Anexos**). El motivo SKF373 posiblemente no altere el sitio activo por la distancia que presenta por lo tanto podría especularse que este sitio puede cumplir la única función de PTS2 y ser importante para la actividad de la enzima en el peroxisoma. Se sabe que el defecto en el transporte de proteínas peroxisomales causado por el defecto del receptor Pex2 para reconocer la señal de importación en el N-terminal conlleva a la enfermedad llamada síndrome de Zellgewer (Krause *et al.*,

2009). Se ha demostrado que los sistemas de reciclamiento, control de calidad de los peroxisomas (pexofagia) y la biogénesis de los mismos son de vital importancia ya que están involucrados en la viabilidad de la célula y el envejecimiento celular (Terlecky *et al.*, 2006).

La catalasa de *C. glabrata* le confirió mayor resistencia a H₂O₂ a la cepa silvestre de *S. cerevisiae* y ScCtt1p podría formar heterotetrámeros con CgCta1p.

A diferencia de las células de mamífero que expresan solo un tipo de catalasa en los peroxisomas, *S. cerevisiae* posee dos isoenzimas de catalasa, una atípica, catalasa A peroxisomal Cta1p y una típica catalasa T citosólica Ctt1p. Los tipos de isoenzimas son monofuncionales y se regulan de manera distinta (Cohen *et al.*, 1985, Marchler *et al.*, 1993). Los resultados revelan que la catalasa peroxisomal ScCta1p es indispensable para la resistencia a H₂O₂ ya que la mutante *cta1Δ* es extremadamente sensible a H₂O₂ en comparación de la mutante *ctt1Δ* que no presenta una sensibilidad tan drástica a H₂O₂ (**Fig. 18B-C**). Hay reportes que indican que la pérdida de la catalasa peroxisomal Cta1p disminuye 15 veces la viabilidad de las células respecto a la cepa silvestre en presencia de estrés oxidativo, mientras que la falta de la catalasa citosólica Ctt1p presenta un ligero efecto en la vida media de las células (Longo *et al.*, 1996, Petriv y Rachubinski, 2004). En contraste con el trabajo de Izawa y cols 1996, muestra que las mutantes sencillas de las catalasas *cta1Δ* y *ctt1Δ* de *S. cerevisiae* son igualmente sensibles a H₂O₂. Esta diferencia puede deberse a los distintos linajes genéticos de las cepas utilizadas de *S. cerevisiae* (Kim *et al.*, 2006).

En *S. cerevisiae* se ha mostrado que la ambas catalasas (*ScCTT1* y *ScCTA1*) no son esenciales bajo condiciones normales, pero la *ScCTT1* juega un papel crucial en condiciones de estrés osmótico, estrés por calor, estrés oxidativo y tolerancia a pérdida de agua (Schuller *et al.*, 1994, Franca *et al.*, 2005, Kim *et al.*, 2006).

Durante la división celular la Ctt1p desempeña un papel importante en las células hijas para eliminar las especies reactivas de oxígeno (Erjavec y Nystrom, 2007).

Los resultados de la tesis demuestran que la ScCta1p es necesaria para eliminar el estrés oxidativo a diferencia de la ScCtt1p. De igual modo, en el nemátodo *Caenorhabditis elegans* la falta de la catalasa peroxisomal, pero no de la catalasa citosólica aceleran el envejecimiento y resulta en una disminución en la vida media del organismo (Petriv y Rachubinski, 2004). Claramente la importancia de la catalasa peroxisomal es necesaria para incrementar la viabilidad celular y juega un papel determinante en la eliminación de ERO que causan el envejecimiento celular.

La catalasa de *C. glabrata* le confirió 10 veces más resistencia a H_2O_2 a la cepa silvestre de *S. cerevisiae*. Esto puede deberse a que CgCta1p tenga mayor actividad y degrade más μM de H_2O_2 y/o mayor estabilidad que le permitiría regenerarse rápidamente (alto número de recambio) y ser menos susceptible a la inactivación por su sustrato o por otras especies reactivas de oxígeno, o que la CgCta1p posea una eficiente translocación a los peroxisomas. Se ha reportado que bajo estrés oxidativo existe un aumento en la proporción de peroxisomas en *C. glabrata* (Roetzer *et al.*, 2009). La similitud de las enzimas, CgCta1p y ScCta1p es de 85 % de similitud (Cuellar-Cruz *et al.*, 2008), esto nos lleva a pensar que la localización de la catalasa en los peroxisomas es importante durante estrés oxidativo y esta involucrada directamente con el cambio metabólico de fuentes de carbono utilizados estratégicamente para la sobrevivencia celular.

La regulación de *CgCTA1* puede contener elementos regulatorios de distintos tipos de estrés: oxidativo y de limitación de glucosa. En contraste, la regulación de ambas catalasas de *S. cerevisiae* está especializada en uno o varios tipos de estrés particulares de cada catalasa con distinta localización. La respuesta transcripcional al estrés oxidativo de *C. glabrata*, como patógeno oportunista, pudo haberse seleccionado dentro de los fagocitos, ya que datos de microarreglos

indican la inducción de un grupo de 30 genes por estrés oxidativo y algunos de estos genes también se inducen en respuesta a limitación de la fuente de carbono (Roetzer *et al.*, 2008).

La similitud en la secuencia de aminoácidos *CgCta1p* vs *ScCta1p* presentan 85 %, *CgCta1p* vs *ScCtt1p* presentan 57 %, sin embargo, la falta sintenia de la *CgCTA1* con *ScCTA1* (**Fig. 27** Anexos) y con la de otras catalasas de hongos (Gordon *et al.*, 2009) indica eventos de recombinación importantes.

Es interesante que los resultados reflejan la posibilidad que la catalasa citosólica, *ScCtt1p*, puede estar formando heterotetrámeros con la catalasa de *C. glabrata* y provocar alteraciones en la actividad de la enzima *CgCta1p*, ya que la mutante *ctt1Δ* presenta mayor resistencia a H_2O_2 con la *CgCTA1* comparada con la cepa silvestre con *CgCTA1*, que posee ambas catalasas (*ScCtt1p* y *ScCta1p*) en su genoma (**Fig. 18B, 20B y 21B**). Una explicación a esto puede deberse a que durante el ensamblado de las proteínas *CgCta1p* y *ScCtt1p* que se lleva a cabo en el citosol se formen heterotetrámeros y produzca un dímero no funcional. Una característica de importación de las proteínas de la matriz peroxisomal es que el translocón tiene la capacidad de acomodar y plegar a proteínas oligoméricas, lo que implica la presencia de una gran poro en la membrana peroxisomal. En *Yarrowia lipolytica* se ha demostrado que proteínas peroxisomales como la Acyl-CoA oxidasa y la tiolasa peroxisomal se pliegan y se oligomerizan antes de su importación a los peroxisomas (Titorenko *et al.*, 2002) y en *S. cerevisiae* la 3-cetoacyl-CoA tiolasa peroxisomal se importa como dímero (Glover *et al.*, 1994).

Los resultados en conjunto los representamos en el siguiente modelo:

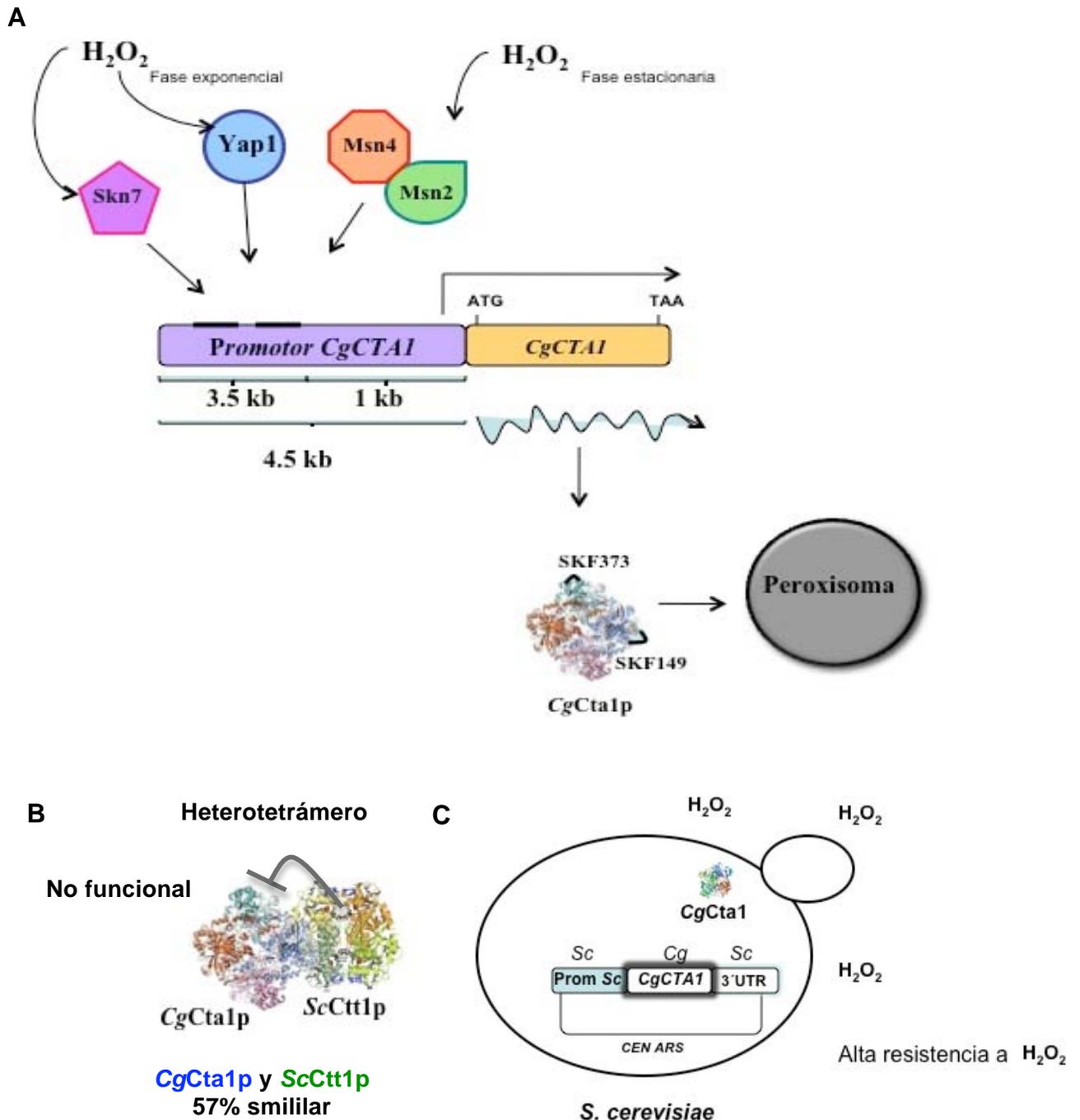


Figura 22. Modelo de la regulación de la catalasa de *C. glabrata*. A) La expresión de la catalasa en respuesta a oxidante está mediada por los factores transcripcionales Yap1p y Skn7p en fase exponencial. En fase estacionaria los factores Msn2p y Msn4p regulan la expresión de la catalasa. Los elementos de inducción de la catalasa en respuesta a H_2O_2 se encuentran dentro de las 3.5 kb de la región promotora. Los motivos SKF149 y SKF373 son esenciales para el funcionamiento de la enzima y para su importación al peroxisoma. B) La ScCtt1p puede formar heterotetrámeros con CgCta1p y generar una enzima no funcional. C) La CgCTA1 episomal es capaz de conferirle mayor resistencia a H_2O_2 en *S. cerevisiae*.

V. CONCLUSIONES

- La *CgCTA1* está regulada principalmente por los factores transcripcionales Yap1p y Skn7p en fase exponencial durante estrés oxidativo.
- En fase estacionaria es importante la participación de Skn7p, Msn2p y Msn4p, las mutantes sencillas *msn2Δ* y *msn4Δ* no parecen ser importantes para la expresión de *CTA1*.
- Msn2p y Msn4p pueden estar funcionando como represores de genes de la respuesta a estrés oxidativo en fase exponencial.
- Los motivos de importación al peroxisoma SKF^{149AAA} y SKF^{373AAA} pueden ser necesarios para resistencia a estrés oxidativo.
- Los elementos de la expresión basal de la *CgCTA1* se encuentren dentro de 1 kb de la región promotora (-1000 bp apartir del ATG). Los elementos necesarios para la inducción posiblemente se encuentren 1kb río arriba con respecto al ATG.
- En *S. cerevisiae* la catalasa citosólica, ScCtt1p expresada episomalmente, puede formar heterotetrámeros con la catalasa de *C. glabrata* y provocar alteraciones en la actividad de la enzima.
- El promotor de la *CgCTA1* es parcialmente funcional en *S. cerevisiae*.
- La cepa de *S. cerevisiae* que expresa la catalasa de *C. glabrata* proporciona mayor resistencia al H₂O₂ en comparación a la cepa silvestre de *S. cerevisiae*.

VI. PERSPECTIVAS

- a)** En base a la importancia de la catalasa en la respuesta al estrés oxidativo en *C. glabrata* y *S. cerevisiae* es importante medir la actividad enzimática de CgCta1p en las mutantes sencillas y dobles de las catalasas de *S. cerevisiae* para determinar si es la eficiencia enzimática la propiedad a la que se le atribuye el fenotipo de alta resistencia a H₂O₂. Hasta el momento tenemos la construcción que lleva *CgCTA1* bajo el promotor de *S. cerevisiae* en un vector integrativo y poder analizar la actividad y regulación de la *CgCTA1* integrado en el genoma de *S. cerevisiae*.
- b)** En base al resultado obtenido de que la ScCtt1p puede estar interfiriendo con la función de la CgCta1p sería conveniente comprobar una interacción física de las catalasas a través de ensayos de Co-Inmunoprecipitación y actividad enzimática.
- c)** Para poder concluir con mayor certeza sobre la participación del dominio SKF en la importación al peroxisoma SKF, se tiene que secuenciar la construcción para verificar que no exista alguna mutación en algún otro sitio y realizar ensayos de resistencia a H₂O₂ con un rango menor de concentraciones en las mutantes de los sitios SKF.
- d)** Tenemos planeado mapear la región intergénica de *CgCTA1* (4.5 kb) ya que en el presente trabajo observamos que 1 kb de la región intergénica se encuentran los elementos para la expresión basal de *CgCTA1*.
- e)** Por último sería interesante realizar ensayos de cuantificación de proteínas carboniladas, especies reactivas de oxígeno intracelular y medir la proporción de glutatión oxidado y reducido en las mutantes de los factores de transcripción que regulan a la *CgCTA1*.

Bibliografía

- Aitchison JD, Murray WW, Rachubinski RA (The carboxyl-terminal tripeptide Ala-Lys-Ile is essential for targeting *Candida tropicalis* trifunctional enzyme to yeast peroxisomes. *J Biol Chem* 266:23197-23203.1991).
- Allen LA, Beecher BR, Lynch JT, Rohner OV, Wittine LM (*Helicobacter pylori* disrupts NADPH oxidase targeting in human neutrophils to induce extracellular superoxide release. *J Immunol* 174:3658-3667.2005).
- Almirante B, Rodriguez D, Park BJ, Cuenca-Estrella M, Planes AM, Almela M, Mensa J, Sanchez F, Ayats J, Gimenez M, Saballs P, Fridkin SK, Morgan J, Rodriguez-Tudela JL, Warnock DW, Pahissa A (Epidemiology and predictors of mortality in cases of *Candida* bloodstream infection: results from population-based surveillance, Barcelona, Spain, from 2002 to 2003. *J Clin Microbiol* 43:1829-1835.2005).
- Arendrup MC, Fursted K, Gahrn-Hansen B, Schonheyder HC, Knudsen JD, Jensen IM, Bruun B, Christensen JJ, Johansen HK (Semi-national surveillance of fungaemia in Denmark 2004-2006: increasing incidence of fungaemia and numbers of isolates with reduced azole susceptibility. *Clin Microbiol Infect* 14:487-494.2008).
- Ausubel F, R. Brent, R.E. Kingston, D.D. Moore, J.G. Seidman, J.A. Smith, and K. Struhl. (1994) *Current Protocols in Molecular Biology*. New York: John Wiley & Sons, Inc.
- Baddley JW, Patel M, Bhavnani SM, Moser SA, Andes DR (Association of fluconazole pharmacodynamics with mortality in patients with candidemia. *Antimicrob Agents Chemother* 52:3022-3028.2008).
- Baddley JW, Smith AM, Moser SA, Pappas PG (Trends in frequency and susceptibilities of *Candida glabrata* bloodstream isolates at a university hospital. *Diagn Microbiol Infect Dis* 39:199-201.2001).
- Balaban RS, Nemoto S, Finkel T (Mitochondria, oxidants, and aging. *Cell* 120:483-495.2005).
- Berman J, Sudbery PE (*Candida albicans*: a molecular revolution built on lessons from budding yeast. *Nat Rev Genet* 3:918-930.2002).
- Bernroitner M, Zamocky M, Furtmuller PG, Peschek GA, Obinger C (Occurrence, phylogeny, structure, and function of catalases and peroxidases in cyanobacteria. *J Exp Bot* 60:423-440.2009).
- Boy-Marcotte E, Garmendia C, Garreau H, Lallet S, Mallet L, Jacquet M (The transcriptional activation region of *Msn2p*, in *Saccharomyces cerevisiae*, is regulated by stress but is insensitive to the cAMP signalling pathway. *Mol Genet Genomics* 275:277-287.2006).
- Brown JL, North S, Bussey H (*SKN7*, a yeast multicopy suppressor of a mutation affecting cell wall beta-glucan assembly, encodes a product with domains homologous to prokaryotic two-component regulators and to heat shock transcription factors. *J Bacteriol* 175:6908-6915.1993).
- Buckova M, Godocikova J, Zamocky M, Polek B (Screening of bacterial isolates from polluted soils exhibiting catalase and peroxidase activity and diversity of their responses to oxidative stress. *Curr Microbiol*.2010).

- Butler G, Rasmussen MD, Lin MF, Santos MA, Sakthikumar S, Munro CA, Rheinbay E, Grabherr M, Forche A, Reedy JL, Agrafioti I, Arnaud MB, Bates S, Brown AJ, Brunke S, Costanzo MC, Fitzpatrick DA, de Groot PW, Harris D, Hoyer LL, Hube B, Klis FM, Kodira C, Lennard N, Logue ME, Martin R, Neiman AM, Nikolaou E, Quail MA, Quinn J, Santos MC, Schmitzberger FF, Sherlock G, Shah P, Silverstein KA, Skrzypek MS, Soll D, Staggs R, Stansfield I, Stumpf MP, Sudbery PE, Srikantha T, Zeng Q, Berman J, Berriman M, Heitman J, Gow NA, Lorenz MC, Birren BW, Kellis M, Cuomo CA (Evolution of pathogenicity and sexual reproduction in eight *Candida* genomes. *Nature* 459:657-662.2009).
- Calvin NM, Hanawalt PC (High-efficiency transformation of bacterial cells by electroporation. *J Bacteriol* 170:2796-2801.1988).
- Chagas RF, Bailao AM, Pereira M, Winters MS, Smullian AG, Deepe GS, Jr., de Almeida Soares CM (The catalases of *Paracoccidioides brasiliensis* are differentially regulated: protein activity and transcript analysis. *Fungal Genet Biol* 45:1470-1478.2008).
- Chauhan N, Latge JP, Calderone R (Signalling and oxidant adaptation in *Candida albicans* and *Aspergillus fumigatus*. *Nat Rev Microbiol* 4:435-444.2006).
- Chaves GM, Bates S, Maccallum DM, Odds FC (*Candida albicans* GRX2, encoding a putative glutaredoxin, is required for virulence in a murine model. *Genet Mol Res* 6:1051-1063.2007).
- Chelikani P, Fita I, Loewen PC (Diversity of structures and properties among catalases. *Cell Mol Life Sci* 61:192-208.2004).
- Chen S, Slavin M, Nguyen Q, Marriott D, Playford EG, Ellis D, Sorrell T (Active surveillance for candidemia, Australia. *Emerg Infect Dis* 12:1508-1516.2006).
- Choi H, Kim S, Mukhopadhyay P, Cho S, Woo J, Storz G, Ryu SE (Structural basis of the redox switch in the OxyR transcription factor. *Cell* 105:103-113.2001).
- Cohen G, Fessl F, Traczyk A, Rytka J, Ruis H (Isolation of the catalase A gene of *Saccharomyces cerevisiae* by complementation of the *cta1* mutation. *Mol Gen Genet* 200:74-79.1985).
- Csank C, Haynes K (*Candida glabrata* displays pseudohyphal growth. *FEMS Microbiol Lett* 189:115-120.2000).
- Cuellar-Cruz M, Briones-Martin-del-Campo M, Canas-Villamar I, Montalvo-Arredondo J, Riego-Ruiz L, Castano I, De Las Penas A (High resistance to oxidative stress in the fungal pathogen *Candida glabrata* is mediated by a single catalase, Cta1p, and is controlled by the transcription factors Yap1p, Skn7p, Msn2p, and Msn4p. *Eukaryot Cell* 7:814-825.2008).
- Cuellar-Cruz M, Castano I, Arroyo-Helguera O, De Las Penas A (Oxidative stress response to menadione and cumene hydroperoxide in the opportunistic fungal pathogen *Candida glabrata*. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 104:649-654.2009).
- Cyrne L, Martins L, Fernandes L, Marinho HS (Regulation of antioxidant enzymes gene expression in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* during stationary phase. *Free Radic Biol Med* 34:385-393.2003).
- Dujon B, Sherman D, Fischer G, Durrens P, Casaregola S, Lafontaine I, De Montigny J, Marck C, Neuveglise C, Talla E, Goffard N, Frangeul L, Aigle M, Anthouard V,

- Babour A, Barbe V, Barnay S, Blanchin S, Beckerich JM, Beyne E, Bleykasten C, Boisrame A, Boyer J, Cattolico L, Confanioleri F, De Daruvar A, Despons L, Fabre E, Fairhead C, Ferry-Dumazet H, Groppi A, Hantraye F, Hennequin C, Jauniaux N, Joyet P, Kachouri R, Kerrest A, Koszul R, Lemaire M, Lesur I, Ma L, Muller H, Nicaud JM, Nikolski M, Oztas S, Ozier-Kalogeropoulos O, Pellenz S, Potier S, Richard GF, Straub ML, Suleau A, Swennen D, Tekaiia F, Wesolowski-Louvel M, Westhof E, Wirth B, Zeniou-Meyer M, Zivanovic I, Bolotin-Fukuhara M, Thierry A, Bouchier C, Caudron B, Scarpelli C, Gaillardin C, Weissenbach J, Wincker P, Souciet JL (Genome evolution in yeasts. *Nature* 430:35-44.2004).
- Erjavec N, Nystrom T (Sir2p-dependent protein segregation gives rise to a superior reactive oxygen species management in the progeny of *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104:10877-10881.2007).
- Fidel PL, Jr., Vazquez JA, Sobel JD (*Candida glabrata*: review of epidemiology, pathogenesis, and clinical disease with comparison to *C. albicans*. *Clin Microbiol Rev* 12:80-96.1999).
- Flattery-O'Brien JA, Dawes IW (Hydrogen peroxide causes RAD9-dependent cell cycle arrest in G2 in *Saccharomyces cerevisiae* whereas menadione causes G1 arrest independent of RAD9 function. *J Biol Chem* 273:8564-8571.1998).
- Franca MB, Panek AD, Eleutherio EC (The role of cytoplasmic catalase in dehydration tolerance of *Saccharomyces cerevisiae*. *Cell Stress Chaperones* 10:167-170.2005).
- Frohner IE, Bourgeois C, Yatsyk K, Majer O, Kuchler K (*Candida albicans* cell surface superoxide dismutases degrade host-derived reactive oxygen species to escape innate immune surveillance. *Mol Microbiol* 71:240-252.2009).
- Gessler NN, Aver'yanov AA, Belozerskaya TA (Reactive oxygen species in regulation of fungal development. *Biochemistry (Mosc)* 72:1091-1109.2007).
- Gietz D, St Jean A, Woods RA, Schiestl RH (Improved method for high efficiency transformation of intact yeast cells. *Nucleic Acids Res* 20:1425.1992).
- Giles SS, Batinic-Haberle I, Perfect JR, Cox GM (*Cryptococcus neoformans* mitochondrial superoxide dismutase: an essential link between antioxidant function and high-temperature growth. *Eukaryot Cell* 4:46-54.2005).
- Giorgio M, Trinei M, Migliaccio E, Pelicci PG (Hydrogen peroxide: a metabolic by-product or a common mediator of ageing signals? *Nat Rev Mol Cell Biol* 8:722-728.2007).
- Glover JR, Andrews DW, Rachubinski RA (*Saccharomyces cerevisiae* peroxisomal thiolase is imported as a dimer. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91:10541-10545.1994).
- Gonzalez GM, Elizondo M, Ayala J (Trends in species distribution and susceptibility of bloodstream isolates of *Candida* collected in Monterrey, Mexico, to seven antifungal agents: results of a 3-year (2004 to 2007) surveillance study. *J Clin Microbiol* 46:2902-2905.2008).
- Gordon JL, Byrne KP, Wolfe KH (Additions, losses, and rearrangements on the evolutionary route from a reconstructed ancestor to the modern *Saccharomyces cerevisiae* genome. *PLoS Genet* 5:e1000485.2009).

- Gorner W, Durchschlag E, Martinez-Pastor MT, Estruch F, Ammerer G, Hamilton B, Ruis H, Schuller C (Nuclear localization of the C2H2 zinc finger protein Msn2p is regulated by stress and protein kinase A activity. *Genes Dev* 12:586-597.1998).
- Gorner W, Durchschlag E, Wolf J, Brown EL, Ammerer G, Ruis H, Schuller C (Acute glucose starvation activates the nuclear localization signal of a stress-specific yeast transcription factor. *EMBO J* 21:135-144.2002).
- Gould SJ, Keller GA, Hosken N, Wilkinson J, Subramani S (A conserved tripeptide sorts proteins to peroxisomes. *J Cell Biol* 108:1657-1664.1989).
- Harman D (Aging: phenomena and theories. *Ann N Y Acad Sci* 854:1-7.1998).
- Hobert O (PCR fusion-based approach to create reporter gene constructs for expression analysis in transgenic *C. elegans*. *Biotechniques* 32:728-730.2002).
- Horiguchi H, Yurimoto H, Goh T, Nakagawa T, Kato N, Sakai Y (Peroxisomal catalase in the methylotrophic yeast *Candida boidinii*: transport efficiency and metabolic significance. *J Bacteriol* 183:6372-6383.2001).
- Horn DL, Neofytos D, Anaissie EJ, Fishman JA, Steinbach WJ, Olyaei AJ, Marr KA, Pfaller MA, Chang CH, Webster KM (Epidemiology and outcomes of candidemia in 2019 patients: data from the prospective antifungal therapy alliance registry. *Clin Infect Dis* 48:1695-1703.2009).
- Hwang CS, Rhie GE, Oh JH, Huh WK, Yim HS, Kang SO (Copper- and zinc-containing superoxide dismutase (Cu/ZnSOD) is required for the protection of *Candida albicans* against oxidative stresses and the expression of its full virulence. *Microbiology* 148:3705-3713.2002).
- Izawa S, Inoue Y, Kimura A (Importance of catalase in the adaptive response to hydrogen peroxide: analysis of acatalasaemic *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochem J* 320 (Pt 1):61-67.1996).
- Jakubowski W, Bilinski T, Bartosz G (Oxidative stress during aging of stationary cultures of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Free Radic Biol Med* 28:659-664.2000).
- Kaur R, Domergue R, Zupancic ML, Cormack BP (A yeast by any other name: *Candida glabrata* and its interaction with the host. *Curr Opin Microbiol* 8:378-384.2005).
- Kim HJ, Jung HY, Lim CJ (The *pap1(+)* gene of fission yeast is transcriptionally regulated by nitrosative and nutritional stress. *FEMS Microbiol Lett* 280:176-181.2008).
- Kim IS, Moon HY, Yun HS, Jin I (Heat shock causes oxidative stress and induces a variety of cell rescue proteins in *Saccharomyces cerevisiae* KNU5377. *J Microbiol* 44:492-501.2006).
- Kragler F, Langeder A, Raupachova J, Binder M, Hartig A (Two independent peroxisomal targeting signals in catalase A of *Saccharomyces cerevisiae*. *J Cell Biol* 120:665-673.1993).
- Krause C, Rosewich H, Gartner J (Rational diagnostic strategy for Zellweger syndrome spectrum patients. *Eur J Hum Genet* 17:741-748.2009).
- Kuge S, Jones N (YAP1 dependent activation of TRX2 is essential for the response of *Saccharomyces cerevisiae* to oxidative stress by hydroperoxides. *EMBO J* 13:655-664.1994).

- Lee J, Godon C, Lagniel G, Spector D, Garin J, Labarre J, Toledano MB (Yap1 and Skn7 control two specialized oxidative stress response regulons in yeast. *J Biol Chem* 274:16040-16046.1999).
- Lee JS, Heo YJ, Lee JK, Cho YH (KatA, the major catalase, is critical for osmoprotection and virulence in *Pseudomonas aeruginosa* PA14. *Infect Immun* 73:4399-4403.2005).
- Longo VD, Gralla EB, Valentine JS (Superoxide dismutase activity is essential for stationary phase survival in *Saccharomyces cerevisiae*. Mitochondrial production of toxic oxygen species in vivo. *J Biol Chem* 271:12275-12280.1996).
- Makkar RS, Contreras MA, Paintlia AS, Smith BT, Haq E, Singh I (Molecular organization of peroxisomal enzymes: protein-protein interactions in the membrane and in the matrix. *Arch Biochem Biophys* 451:128-140.2006).
- Manca C, Tsenova L, Barry CE, 3rd, Bergtold A, Freeman S, Haslett PA, Musser JM, Freedman VH, Kaplan G (*Mycobacterium tuberculosis* CDC1551 induces a more vigorous host response in vivo and in vitro, but is not more virulent than other clinical isolates. *J Immunol* 162:6740-6746.1999).
- Mansour MK, Levitz SM (Interactions of fungi with phagocytes. *Curr Opin Microbiol* 5:359-365.2002).
- Marchler G, Schuller C, Adam G, Ruis H (A *Saccharomyces cerevisiae* UAS element controlled by protein kinase A activates transcription in response to a variety of stress conditions. *EMBO J* 12:1997-2003.1993).
- Martinez-Pulgarin S, Dominguez-Bernal G, Orden JA, de la Fuente R (Simultaneous lack of catalase and beta-toxin in *Staphylococcus aureus* leads to increased intracellular survival in macrophages and epithelial cells and to attenuated virulence in murine and ovine models. *Microbiology* 155:1505-1515.2009).
- McCammon MT, McNew JA, Willy PJ, Goodman JM (An internal region of the peroxisomal membrane protein PMP47 is essential for sorting to peroxisomes. *J Cell Biol* 124:915-925.1994).
- Missall TA, Lodge JK (Function of the thioredoxin proteins in *Cryptococcus neoformans* during stress or virulence and regulation by putative transcriptional modulators. *Mol Microbiol* 57:847-858.2005).
- Morgan J (Global trends in candidemia: review of reports from 1995-2005. *Curr Infect Dis Rep* 7:429-439.2005).
- Moskvina E, Schuller C, Maurer CT, Mager WH, Ruis H (A search in the genome of *Saccharomyces cerevisiae* for genes regulated via stress response elements. *Yeast* 14:1041-1050.1998).
- Moye-Rowley WS (Regulation of the transcriptional response to oxidative stress in fungi: similarities and differences. *Eukaryot Cell* 2:381-389.2003).
- Moye-Rowley WS, Harshman KD, Parker CS (Yeast YAP1 encodes a novel form of the jun family of transcriptional activator proteins. *Genes Dev* 3:283-292.1989).
- Nace HL, Horn D, Neofytos D (Epidemiology and outcome of multiple-species candidemia at a tertiary care center between 2004 and 2007. *Diagn Microbiol Infect Dis* 64:289-294.2009).

- Nakagawa Y (Catalase gene disruptant of the human pathogenic yeast *Candida albicans* is defective in hyphal growth, and a catalase-specific inhibitor can suppress hyphal growth of wild-type cells. *Microbiol Immunol* 52:16-24.2008).
- Nakagawa Y, Kanbe T, Mizuguchi I (Disruption of the human pathogenic yeast *Candida albicans* catalase gene decreases survival in mouse-model infection and elevates susceptibility to higher temperature and to detergents. *Microbiol Immunol* 47:395-403.2003).
- Narasipura SD, Chaturvedi V, Chaturvedi S (Characterization of *Cryptococcus neoformans* variety *gattii* SOD2 reveals distinct roles of the two superoxide dismutases in fungal biology and virulence. *Mol Microbiol* 55:1782-1800.2005).
- Nicholls S, Straffon M, Enjalbert B, Nantel A, Macaskill S, Whiteway M, Brown AJ (Msn2- and Msn4-like transcription factors play no obvious roles in the stress responses of the fungal pathogen *Candida albicans*. *Eukaryot Cell* 3:1111-1123.2004).
- Nikolaou E, Agrafioti I, Stumpf M, Quinn J, Stansfield I, Brown AJ (Phylogenetic diversity of stress signalling pathways in fungi. *BMC Evol Biol* 9:44.2009).
- Okazaki S, Tachibana T, Naganuma A, Mano N, Kuge S (Multistep disulfide bond formation in Yap1 is required for sensing and transduction of H₂O₂ stress signal. *Mol Cell* 27:675-688.2007).
- Pappas PG, Rex JH, Lee J, Hamill RJ, Larsen RA, Powderly W, Kauffman CA, Hyslop N, Mangino JE, Chapman S, Horowitz HW, Edwards JE, Dismukes WE (A prospective observational study of candidemia: epidemiology, therapy, and influences on mortality in hospitalized adult and pediatric patients. *Clin Infect Dis* 37:634-643.2003).
- Paris S, Wysong D, Debeaupuis JP, Shibuya K, Philippe B, Diamond RD, Latge JP (Catalases of *Aspergillus fumigatus*. *Infect Immun* 71:3551-3562.2003).
- Petriv OI, Rachubinski RA (Lack of peroxisomal catalase causes a progeric phenotype in *Caenorhabditis elegans*. *J Biol Chem* 279:19996-20001.2004).
- Pfaller MA, Diekema DJ (Epidemiology of invasive candidiasis: a persistent public health problem. *Clin Microbiol Rev* 20:133-163.2007).
- Pfaller MA, Messer SA, Hollis RJ, Boyken L, Tendolkar S, Kroeger J, Diekema DJ (Variation in susceptibility of bloodstream isolates of *Candida glabrata* to fluconazole according to patient age and geographic location in the United States in 2001 to 2007. *J Clin Microbiol* 47:3185-3190.2009).
- Purdue PE, Lazarow PB (Targeting of human catalase to peroxisomes is dependent upon a novel COOH-terminal peroxisomal targeting sequence. *J Cell Biol* 134:849-862.1996).
- Purdue PE, Lazarow PB (Peroxisome biogenesis. *Annu Rev Cell Dev Biol* 17:701-752.2001).
- Rocha ER, Smith CJ (Biochemical and genetic analyses of a catalase from the anaerobic bacterium *Bacteroides fragilis*. *J Bacteriol* 177:3111-3119.1995).
- Roetzer A, Gratz N, Kovarik P, Schuller C (Autophagy supports *Candida glabrata* survival during phagocytosis. *Cell Microbiol*.2009).

- Roetzer A, Gregori C, Jennings AM, Quintin J, Ferrandon D, Butler G, Kuchler K, Ammerer G, Schuller C (Candida glabrata environmental stress response involves Saccharomyces cerevisiae Msn2/4 orthologous transcription factors. Mol Microbiol 69:603-620.2008).
- Saijo T, Miyazaki T, Izumikawa K, Mihara T, Takazono T, Kosai K, Imamura Y, Seki M, Kakeya H, Yamamoto Y, Yanagihara K, Kohno S (Skn7p is involved in oxidative stress response and virulence of Candida glabrata. Mycopathologia 169:81-90.2010).
- Schliebs W, Wurtz C, Kunau WH, Veenhuis M, Rottensteiner H (A eukaryote without catalase-containing microbodies: Neurospora crassa exhibits a unique cellular distribution of its four catalases. Eukaryot Cell 5:1490-1502.2006).
- Schuller C, Brewster JL, Alexander MR, Gustin MC, Ruis H (The HOG pathway controls osmotic regulation of transcription via the stress response element (STRE) of the Saccharomyces cerevisiae CTT1 gene. EMBO J 13:4382-4389.1994).
- Seaver LC, Imlay JA (Hydrogen peroxide fluxes and compartmentalization inside growing Escherichia coli. J Bacteriol 183:7182-7189.2001).
- Singh P, Chauhan N, Ghosh A, Dixon F, Calderone R (SKN7 of Candida albicans: mutant construction and phenotype analysis. Infect Immun 72:2390-2394.2004).
- Singh R, Wiseman B, Deemagarn T, Jha V, Switala J, Loewen PC (Comparative study of catalase-peroxidases (KatGs). Arch Biochem Biophys 471:207-214.2008).
- Sorger PK, Pelham HR (Yeast heat shock factor is an essential DNA-binding protein that exhibits temperature-dependent phosphorylation. Cell 54:855-864.1988).
- Srinivasa Rao PS, Yamada Y, Leung KY (A major catalase (KatB) that is required for resistance to H₂O₂ and phagocyte-mediated killing in Edwardsiella tarda. Microbiology 149:2635-2644.2003).
- Subramani S, Koller A, Snyder WB (Import of peroxisomal matrix and membrane proteins. Annu Rev Biochem 69:399-418.2000).
- Suh SO, Blackwell M, Kurtzman CP, Lachance MA (Phylogenetics of Saccharomycetales, the ascomycete yeasts. Mycologia 98:1006-1017.2006).
- Tachibana T, Okazaki S, Murayama A, Naganuma A, Nomoto A, Kuge S (A major peroxiredoxin-induced activation of Yap1 transcription factor is mediated by reduction-sensitive disulfide bonds and reveals a low level of transcriptional activation. J Biol Chem 284:4464-4472.2009).
- Terlecky SR, Koepke JI, Walton PA (Peroxisomes and aging. Biochim Biophys Acta 1763:1749-1754.2006).
- Thorpe GW, Fong CS, Alic N, Higgins VJ, Dawes IW (Cells have distinct mechanisms to maintain protection against different reactive oxygen species: oxidative-stress-response genes. Proc Natl Acad Sci U S A 101:6564-6569.2004).
- Titorenko VI, Nicaud JM, Wang H, Chan H, Rachubinski RA (Acyl-CoA oxidase is imported as a heteropentameric, cofactor-containing complex into peroxisomes of Yarrowia lipolytica. J Cell Biol 156:481-494.2002).
- Toone WM, Jones N (AP-1 transcription factors in yeast. Curr Opin Genet Dev 9:55-61.1999).

- Trick WE, Fridkin SK, Edwards JR, Hajjeh RA, Gaynes RP (Secular trend of hospital-acquired candidemia among intensive care unit patients in the United States during 1989-1999. *Clin Infect Dis* 35:627-630.2002).
- Tsunawaki S, Yoshida LS, Nishida S, Kobayashi T, Shimoyama T (Fungal metabolite gliotoxin inhibits assembly of the human respiratory burst NADPH oxidase. *Infect Immun* 72:3373-3382.2004).
- Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MT, Mazur M, Telser J (Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int J Biochem Cell Biol* 39:44-84.2007).
- van der Walt JP, Johannsen E, Yarrow D (*Torulopsis geochares* and *Torulopsis azyma*, two new, haploid species of ascomycetous affinity. *Antonie Van Leeuwenhoek* 44:97-104.1978).
- Viudes A, Peman J, Canton E, Ubeda P, Lopez-Ribot JL, Gobernado M (Candidemia at a tertiary-care hospital: epidemiology, treatment, clinical outcome and risk factors for death. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 21:767-774.2002).
- Vivancos AP, Castillo EA, Jones N, Ayte J, Hidalgo E (Activation of the redox sensor Pap1 by hydrogen peroxide requires modulation of the intracellular oxidant concentration. *Mol Microbiol* 52:1427-1435.2004).
- Wellington M, Dolan K, Krysan DJ (Live *Candida albicans* suppresses production of reactive oxygen species in phagocytes. *Infect Immun* 77:405-413.2009).
- Wisplinghoff H, Bischoff T, Tallent SM, Seifert H, Wenzel RP, Edmond MB (Nosocomial bloodstream infections in US hospitals: analysis of 24,179 cases from a prospective nationwide surveillance study. *Clin Infect Dis* 39:309-317.2004).
- Wong S, Fares MA, Zimmermann W, Butler G, Wolfe KH (Evidence from comparative genomics for a complete sexual cycle in the 'asexual' pathogenic yeast *Candida glabrata*. *Genome Biol* 4:R10.2003).
- Wormley FL, Jr., Heinrich G, Miller JL, Perfect JR, Cox GM (Identification and characterization of an SKN7 homologue in *Cryptococcus neoformans*. *Infect Immun* 73:5022-5030.2005).
- Wysong DR, Christin L, Sugar AM, Robbins PW, Diamond RD (Cloning and sequencing of a *Candida albicans* catalase gene and effects of disruption of this gene. *Infect Immun* 66:1953-1961.1998).
- Xie Q, Kawakami K, Kudeken N, Zhang T, Qureshi MH, Saito A (Different susceptibility of three clinically isolated strains of *Cryptococcus neoformans* to the fungicidal effects of reactive nitrogen and oxygen intermediates: possible relationships with virulence. *Microbiol Immunol* 41:725-731.1997).
- Zamocky M, Furtmuller PG, Obinger C (Two distinct groups of fungal catalase/oxidases. *Biochem Soc Trans* 37:772-777.2009).
- Zancope-Oliveira RM, Reiss E, Lott TJ, Mayer LW, Deepe GS, Jr. (Molecular cloning, characterization, and expression of the M antigen of *Histoplasma capsulatum*. *Infect Immun* 67:1947-1953.1999).
- Znaidi S, Barker KS, Weber S, Alarco AM, Liu TT, Boucher G, Rogers PD, Raymond M (Identification of the *Candida albicans* Cap1p regulon. *Eukaryot Cell* 8:806-820.2009).

ANEXOS

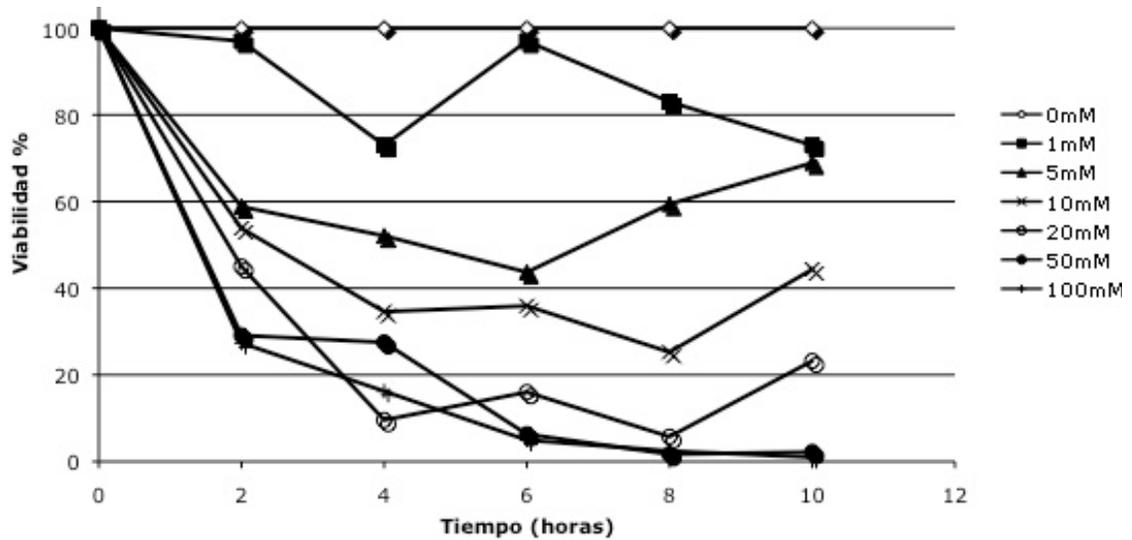


Figura 23. Viabilidad celular de la cepa silvestre.

Las células se crecieron en medio YPD por 48 h, se sometieron a tratamiento con diferentes concentraciones de H_2O_2 , se incubaron a $30^\circ C$ y cada 2 h se plaquearon en cajas con medio YPD. Posteriormente se realizó cuenta viable de colonias de cada tratamiento.

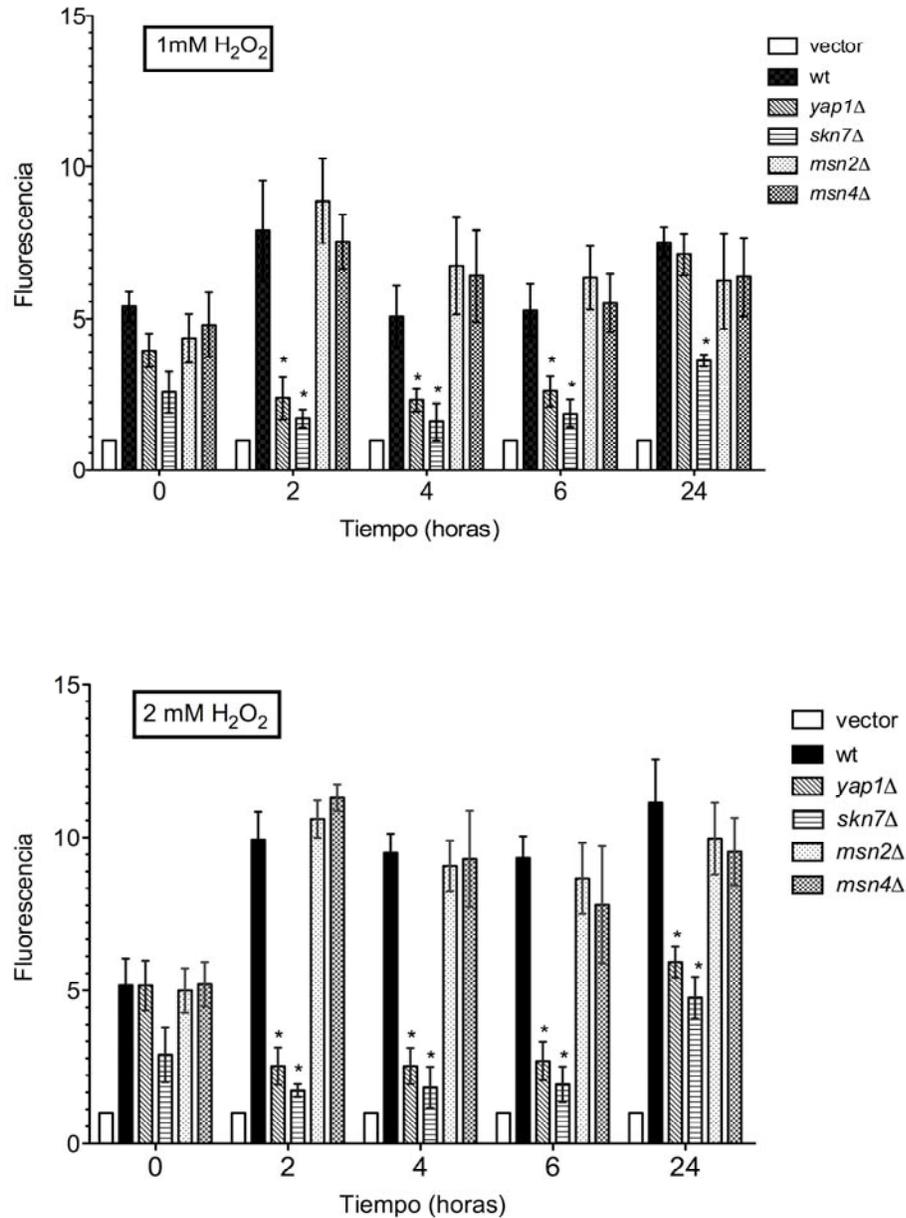


Figura 24. Inducción de la *CgCTA1* en las mutantes sencillas de los factores de transcripción *yap1Δ*, *skn7Δ*, *msn2Δ* y *msn4Δ*.

Las cepas mutantes y la silvestre contienen el plásmido $P_{CgCTA1}::CgCTA1::GFP$. Se partió de un cultivo saturado de 48 horas y se diluyeron a una OD_{600nm} 0.2, las células se trataron con 1 y 2 Mm de H_2O_2 , posteriormente se midió su fluorescencia cada dos horas. Las barras de error representan las desviaciones estándar. *, $p < 0.05$.

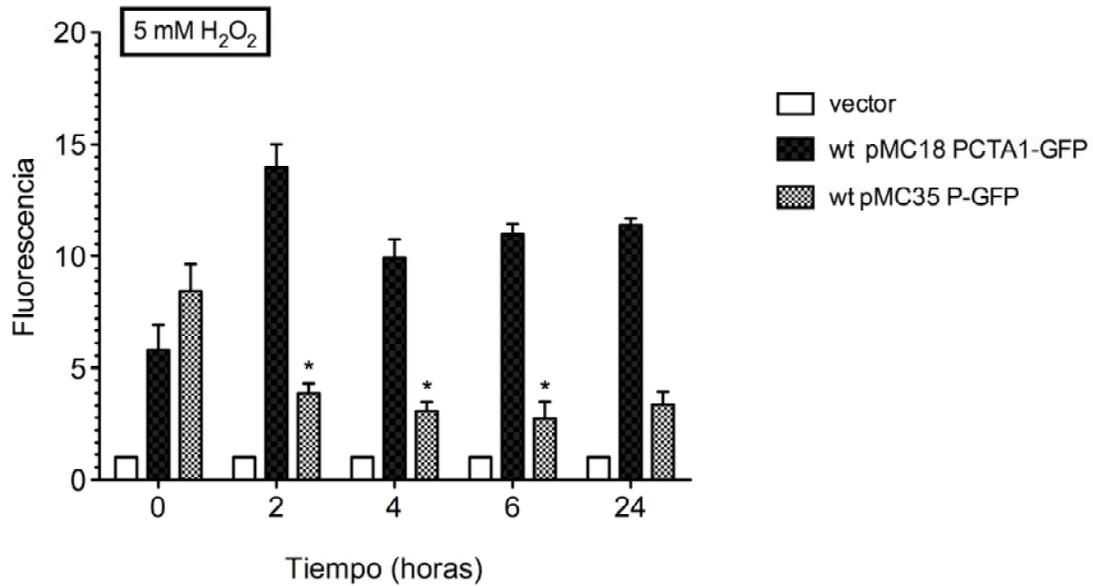


Figura 25. Inducción de la *CgCTA1* de la cepa wt $P_{CgCTA1}::GFP$.

La cepa silvestre lleva un plásmido que contiene 1 kb de la región promotora de *CgCTA1* fusionado con *GFP*. Se partió de un cultivo saturado y se diluyeron las células a una OD_{600nm} 0.2. Posteriormente se midió su fluorescencia cada dos horas. Las células se trataron con 5 mM H_2O_2 . Las barras de error representan las desviaciones estándar. *, $p < 0.05$.

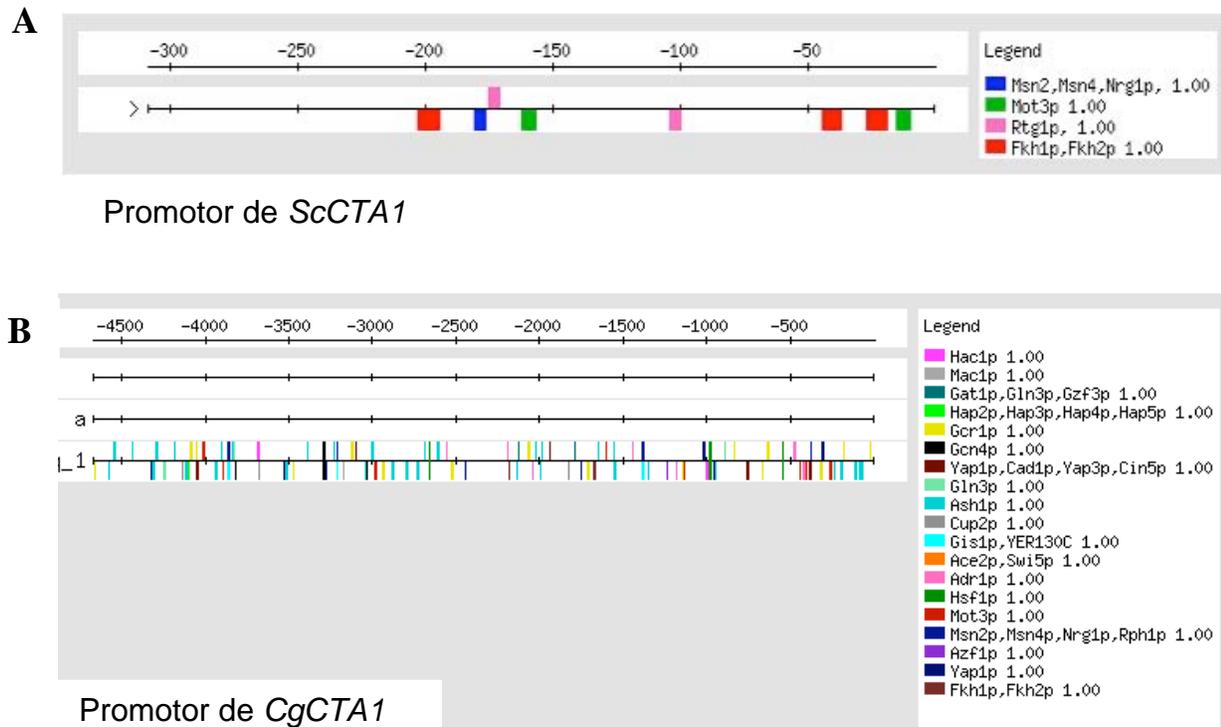


Figura 26. Secuencias consenso de reguladores transcripcionales encontrados en la región intergénica de *CTA1* de *C.glabrata* y *S. cerevisiae*. La búsqueda de secuencias consenso se obtuvo de la página web YEASTRACK (Yeast Search for Transcriptional Regulators And Consenso Trancking) <http://www.yeasttract.com/>. **A)** Región intergénica de la catalasa de *S. cerevisiae*. **B)** Región intergénica de la catalasa de *C. glabrata*.

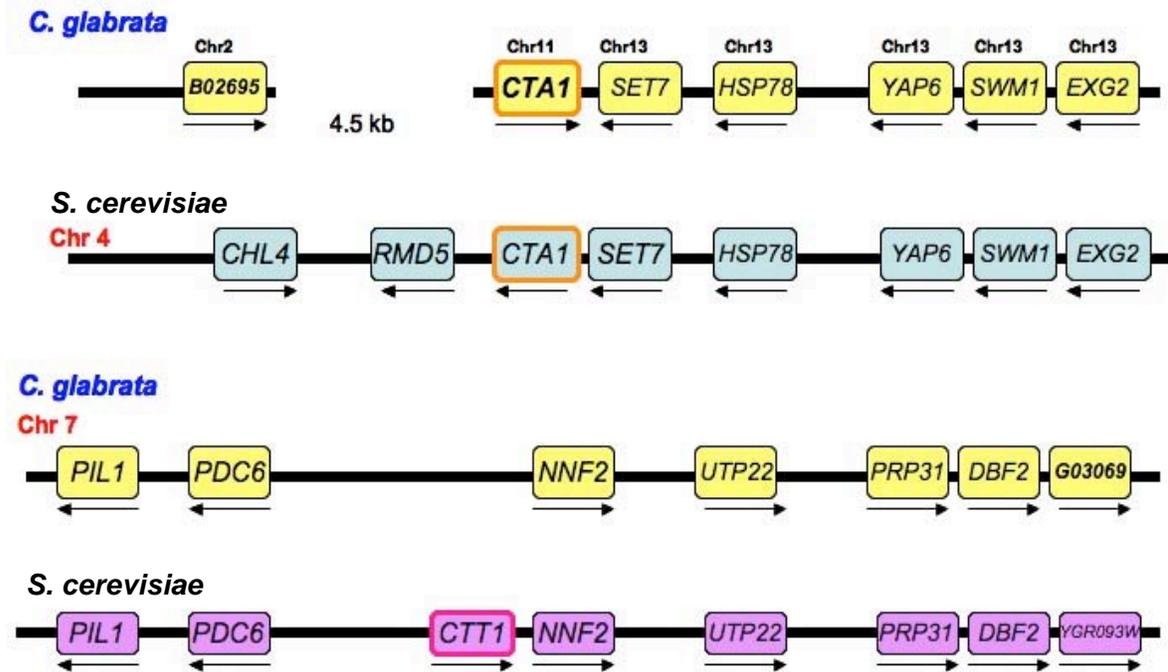
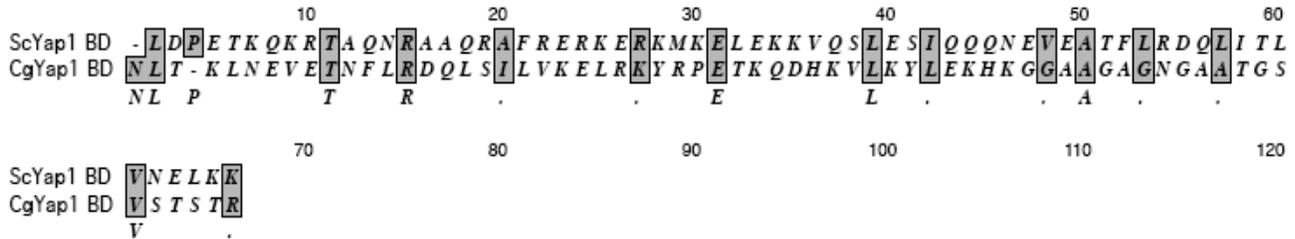


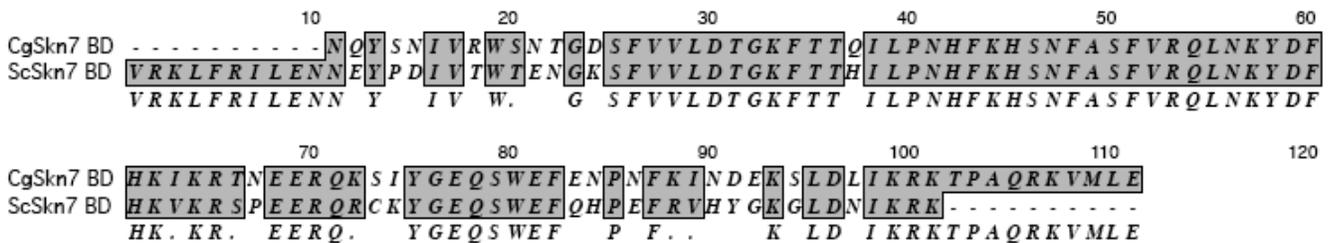
Figura 27. Sintenia de la catalasa de *C. glabrata* con las catalasas de *S. cerevisiae*. La sintenia de las catalasas fue obtenida a través de la página web: Yeast Gene Order Browser <http://wolfe.gen.tcd.ie/ygob/>.

A



Similitud 24.2%

B



Similitud 71.2%

Figura 28. Alineamiento de aminoácidos de la región de dominio de unión a ADN de Yap1 y Skn7p. Se usó el programa de Mac Vector 11.1.1 y mediante el análisis ClustalW Alignment se realizó el alineamiento de las secuencias de aminoácidos. **A)** Alineamiento del dominio de unión a ADN (62 a.a – 126 a.a) de ScYap1 vs CgYap1. **B)** Alineamiento del dominio de unión a ADN (88 a.a – 188 a.a) de ScSkn7 vs CgSkn7.

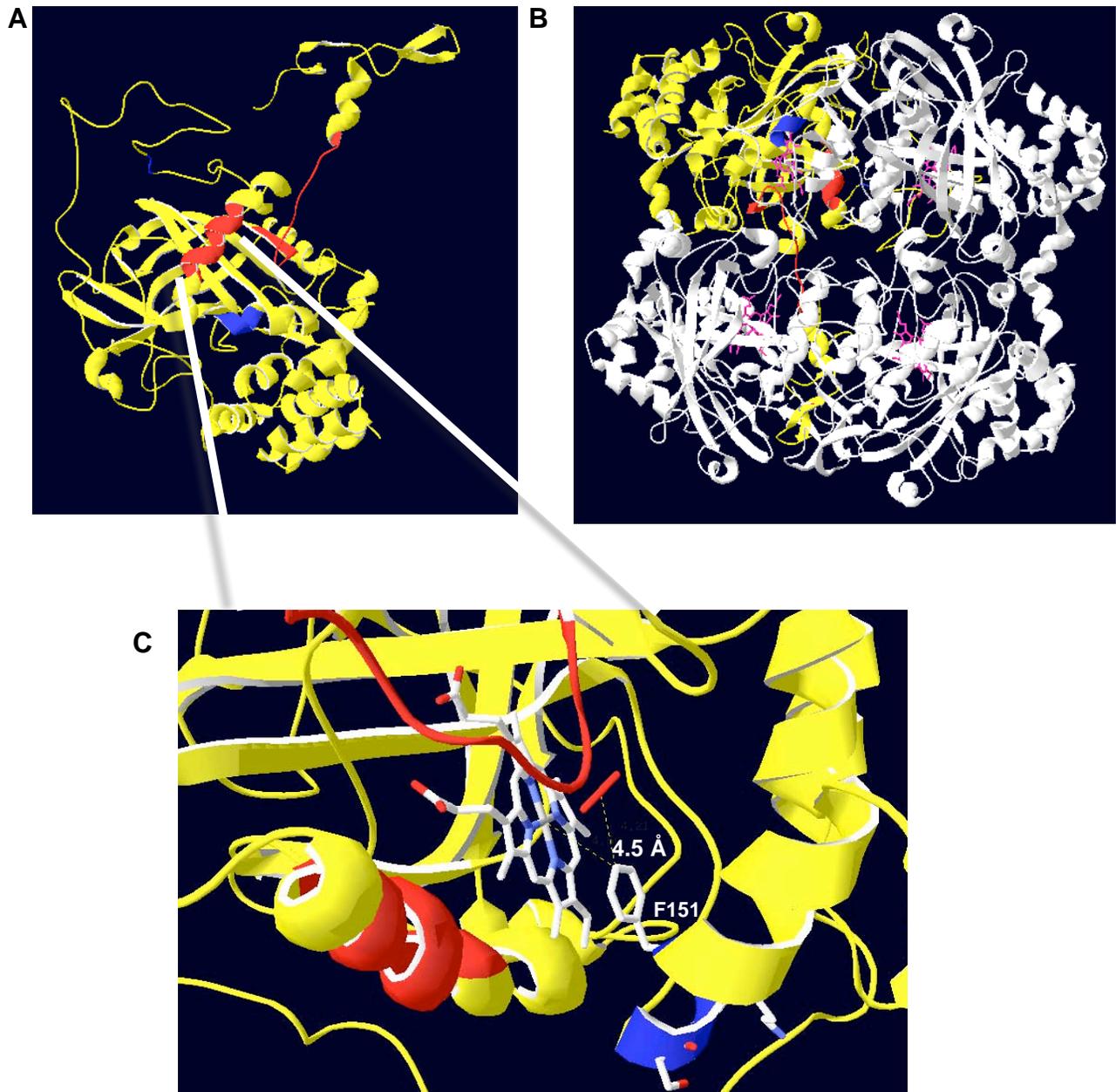


Figura 29. Estructura 3D de la catalasa de *C. glabrata* y de *S. cerevisiae*.

El modelamiento de las estructuras se realizó con el programa en línea Swiss model <http://swissmodel.expasy.org/>. La homología de las estructuras 3D de CgCta1p con la catalasa peroxisomal de *S. cerevisiae* es de 81%. **A)** Monómero de CgCta1p, en azul se marcan los aminoácidos SKF y en rojo los residuos que conforman el sitio activo. **B)** Tetrámero de ScCta1p con el monómero de CgCta1p, los sitios del grupo hemo se marcan en color rosa en cada monómero. **C)** Sitio activo con el grupo hemo de CgCta1p y los residuos SKF149, se muestra la distancia entre el anillo de benceno de la fenilalanina 151 y el grupo hemo.

