



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

**POSGRADO EN CIENCIAS EN BIOLOGÍA MOLECULAR**

**“Caracterización de la respuesta al estrés oxidante  
por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en la levadura patógena oportunista  
*Candida glabrata*”**

Tesis que presenta  
**Israel Cañas Villamar**

Para obtener el grado de  
**Maestro en Ciencias en Biología Molecular**

**Director de la Tesis:**  
**Dr. Alejandro De Las Peñas Nava**

San Luis Potosí, S.L.P., Diciembre de 2007



## Constancia de aprobación de la tesis

La tesis "**Caracterización de la respuesta al estrés oxidante por  $H_2O_2$  en la levadura patógena oportunista *Candida glabrata***" presentada para obtener el Grado de de Maestro en Ciencias en Biología Molecular fue elaborada por **Israel Cañas Villamar** y aprobada el **18 de diciembre de 2007** 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 la tesis)

Dra. Lina Raquel Riego Ruíz  
(Asesor de la tesis)

Dr. J. Sergio Casas Flores  
(Asesor de la tesis)



## **Créditos Institucionales**

Esta tesis fue elaborada en el Laboratorio de Biotecnología Médica y Pecuaria 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.

Este trabajo fue apoyado por el proyecto CONACYT-Fondos Ciencia Básica: SEP-CB-2005-01-48279Q, otorgado al Dr. Alejandro De Las Peñas Nava.

Durante la realización del trabajo el autor recibió una beca académica del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (No. 224300)



**IPICYT**

# Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C.

## Acta de Examen de Grado

El Secretario Académico del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C., certifica que en el Acta 045 del Libro Primero de Actas de Exámenes de Grado del Programa de Maestría en Ciencias en Biología Molecular está asentado lo siguiente:

En la ciudad de San Luis Potosí a los 18 días del mes de diciembre del año 2007, se reunió a las 09:00 horas en las instalaciones del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C., el Jurado integrado por:

<b>Dra. Lina Raquel Riego Ruiz</b>	<b>Presidenta</b>	<b>IPICYT</b>
<b>Dr. Alejandro De las Peñas Nava</b>	<b>Secretario</b>	<b>IPICYT</b>
<b>Dr. J. Sergio Casas Flores</b>	<b>Sinodal</b>	<b>IPICYT</b>

a fin de efectuar el examen, que para obtener el Grado de:

**MAESTRO EN CIENCIAS EN BIOLOGÍA MOLECULAR**

sustentó el C.

**Israel Cañas Villamar**

sobre la Tesis intitulada:

*Caracterización de la Respuesta al Estrés Oxidante por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en la Levadura Patógena Oportunista Candida glabrata*

que se desarrolló bajo la dirección de


**Dr. Alejandro De las Peñas Nava**

El Jurado, después de deliberar, determinó

**APROBARLO**

Dándose por terminado el acto a las 11:43 horas, procediendo a la firma del Acta los integrantes del Jurado. Dando fé el Secretario Académico del Instituto.

A petición del interesado y para los fines que al mismo convengan, se extiende el presente documento en la ciudad de San Luis Potosí, S.L.P., México, a los 18 días del mes de diciembre de 2007.

  
**Dr. Marcial Bonilla Marín**  
Secretario Académico

  
**L.C.C. Ivonne Lizette Cuevas Velez**  
Jefa del Departamento de Asuntos Escolares



Para Arnulfo,  
Lourdes,  
Kythzia  
D  
Luvia

## **Agradecimientos**

Agradezco al director de este trabajo de tesis, Dr. Alejandro De Las Peñas, por su excelente labor como mentor e infinita paciencia.

A la Dra. Irene Beatriz Castaño Navarro, a la Dra. Lina Raquel Riego Ruiz y al Dr. Sergio Casas Flores por su pertinente asesoría.

Al Dr. Brendan Cormack y su equipo de trabajo por sus valiosísimas aportaciones.

Al Dr. Rubén H. López Revilla y al Dr. Luis Salazar Olivo por el espacio de su laboratorio.

A los investigadores del IFC, IIB, IBT de la UNAM y del IIB de la UAEM por los reactivos y materiales donados. A la M. en C. Mayra Cuéllar Cruz y a la Q. F. B. Marcela C. Briones Martín del Campo por su conocimiento y apoyo, al igual que a mis demás compañeras de laboratorio.

A todos los profesores/investigadores de la División de Biología Molecular, por cuyas aportaciones directas e indirectas se involucraron en la acertada conclusión de la presente.

Especialmente agradezco toda la ayuda y soporte incondicional a la M. en C. Lluvia Leticia Rosas Hernández.

Sin la participación de los mencionados, los alcances de este trabajo no serían los mismos.

# Contenido

Constancia de aprobación de la tesis	i
Créditos institucionales	ii
Acta de examen	iii
Dedicatorias	iv
Agradecimientos	v
Lista de tablas	viii
Lista de figuras	ix
Lista de anexos	x
Abreviaturas	xi
Glosario	xii
Resumen	xiii
Abstract	xiv
I. Introducción	
<i>Candida glabrata</i> es una levadura patógena emergente	1
Factores de virulencia en <i>C. glabrata</i>	1
La respuesta inmune contra los hongos patógenos	2
Las especies reactivas de oxígeno	2
La respuesta al estrés oxidante en levadura	4
Efecto del estado metabólico en la resistencia al estrés oxidante en levadura	4
Factores de transcripción de la respuesta al estrés oxidante en levadura	5
Catalasas en levaduras	8
Genes de respuesta al estrés oxidante en <i>Candida glabrata</i>	8
La desacetilasa dependiente de NAD <sup>+</sup> Hst1p	9
II. Materiales y Métodos	
Medios de cultivo. Cepas. Plásmidos	11
Oligonucleótidos .Transformación de <i>C. glabrata</i> para generar mutantes	12
Construcción de cepas mutantes	13
Comprobación de las mutaciones por reemplazo génico	14
Protocolo para el análisis de la respuesta a estrés oxidante en levaduras	14
III. Resultados	
Construcción de mutantes	17
Análisis de secuencias de genes de la REO en <i>C. glabrata</i>	16
Análisis de la secuencia de catalasa en <i>C. glabrata</i>	18
<i>Candida glabrata</i> presenta una alta resistencia a H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	20
La alta resistencia y adaptación dependen del estado metabólico	21

La única catalasa de <i>Candida glabrata</i> resulta esencial para la respuesta al estrés oxidante	23
No hay factores en el medio que compensen la ausencia de Cta1p en fase estacionaria	24
<i>C.g.</i> Yap1p y <i>C.g.</i> Skn7p son necesarios para la adaptación a especies reactivas de oxígeno	25
La función de Msn2p y Msn4p en <i>C. glabrata</i> depende del estado metabólico	27
Efecto de la desacetilasa Hst1p en la resistencia al estrés oxidante	28
Regulación epigenética de genes subteloméricos ante el estrés oxidante	30
IV. Discusión	32
V. Referencias	38
VI. Anexos	42



## Lista de tablas

1. Porcentajes de identidad/similitud entre Msn2p y Msn4p con y sin el dominio de dedos de cinc entre <i>C. glabrata</i> y <i>S. cerevisiae</i>	17
2. Cepas usadas en este trabajo	43
3. Plásmidos usados en este trabajo	45
4. Oligonucleótidos usados en este trabajo	47

## Lista de figuras

1. Corregulación por Msn2/4p, Yap1p y Skn7p en <i>S. cerevisiae</i> de algunos genes de respuesta al estrés	7
2. Mutación por reemplazo y ubicación de oligonucleótidos para comprobar mutación	14
3. Protocolo para el análisis de la respuesta a estrés oxidante	15
4. Alineamiento tipo ClustalW de secuencias de aminoácidos de las catalasas de <i>C. glabrata</i> y <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	18
5. Esquema de la sintenia de <i>C.g.CTA1</i> con respecto a <i>S.c.CTA1</i> y <i>S.c.CTT1</i>	19
6. Resistencia y adaptación a estrés oxidante por H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> de cepa silvestre	20
7. La resistencia y adaptación depende del estado metabólico	21
8. Alta resistencia en fase de quiescencia de la cepa silvestre	22
9. La resistencia y adaptación a H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> depende totalmente de catalasa Cta1p	23
10. No hay moléculas en el medio usado por células en fase estacionaria que confiera alta resistencia al estrés oxidante por H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> a <i>cta1Δ</i>	24
11. Los factores de transcripción Skn7p y Yap1p son necesarios para la adaptación al estrés oxidante	25
12. <i>SKN7</i> y <i>YAP1</i> no son necesarios en la fase estacionaria para mediar la resistencia a altas concentraciones de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	26
13. Los factores de transcripción de estrés general Msn2p y Msn4p no confieren resistencia a estrés por H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> durante fase logarítmica	27
14. <i>MSN2</i> y <i>MSN4</i> son necesarios durante fase estacionaria para resistir altas concentraciones de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	28
15. La resistencia aumenta por factores regulados negativamente por Hst1p en fase logarítmica	29
16. La falta de la catalasa no se compensa por genes regulados negativamente por Hst1p en fase estacionaria	29
17. Bajas concentraciones de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> no alteran la estructura represiva de la cromatina	31
18. Plásmido pAP599	48
19. Resistencia al estrés oxidante por H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> de <i>S. cerevisiae</i> .	49

## Lista de anexos

1. Cuadro 1. Determinación de OD <sub>600nm</sub> para obtener células con un número determinado de duplicaciones	42
2. Gráficas	
Gráfica 1. Curva de crecimiento de cepas de <i>C. glabrata</i> : silvestre, <i>cta1Δ</i> y <i>hst1Δ</i> .	42
Gráfica 2. Fase log de las curvas de crecimiento de cepas de <i>C. glabrata</i> : silvestre, <i>cta1Δ</i> y <i>hst1Δ</i> .	43
3. Tablas	
Tabla 2. Cepas usadas en este trabajo	43
Tabla 3. Plásmidos usados en este trabajo	45
Tabla 4. Oligonucleótidos usados en este trabajo	47
4. Figura 18. Plásmido pAP599	48
5. Figura 19. Resistencia al estrés oxidante por H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> de <i>S. cerevisiae</i> .	49

## Abreviaturas

<b>C.g.</b>	<i>Candida glabrata</i>
<b>S.c.</b>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
<b>ERO</b>	Especies reactivas de oxígeno
<b>REO</b>	Respuesta al estrés oxidante
<b>OD<sub>600nm</sub></b>	Medición de densidad óptica (del inglés <i>Optical Density</i> ) tomada a una longitud de onda de 600nm, equivalente a la absorbancia medida a 600nm o $A_{600}$ .
<b>PCR</b>	Reacción en cadena de la polimerasa (del inglés <i>Polymerase Chain Reaction</i> )

## Glosario

**Absorbancia.** La absorbancia es la medición de la atenuación de una radiación al atravesar una sustancia, que se expresa como el logaritmo de la relación entre la intensidad saliente y la entrante.

**Adaptación a especies reactivas de oxígeno.** Es proceso de acondicionamiento y aclimatación como respuesta de las células al medio ambiente [A. De Las Peñas, datos del laboratorio], No se refiere a la selección natural o un proceso evolutivo, empero del término.

**Casete de resistencia a higromicina.** Marcador que confiere resistencia a higromicina, por el producto del gen *hph* de *Klebsiella pneumoniae*. Se utiliza para la generación de mutantes nulas.

**Fase abierta de lectura.** Porción de un gen transcrito a ARNm y posteriormente traducido. Codifica para una proteína.

**H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.** Peróxido de hidrógeno.

**ORF.** Del inglés *Open Reading Frame*. Ver *Fase abierta de lectura*.

**Región intergénica.** Secuencia de ADN localizada entre fases abiertas de lectura.

**Scavengers.** Moléculas antioxidantes limpiadoras que desintoxican de especies reactivas de oxígeno a la célula, como el glutatión (ver texto). Voz inglesa.

**Sintenia.** Propiedad de dos o más genes de conservar localización entre especies diferentes con el mismo ancestro. El orden conservado en los mismos cromosomas puede ser indicativo de genes ortólogos y función conservada de los mismos. Conservación del orden génico.

## Resumen

Caracterización de la respuesta al estrés oxidante por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en la levadura patógena oportunista *Candida glabrata*

*Candida glabrata* es un hongo patógeno oportunista capaz de causar infecciones sistémicas graves en pacientes inmunocomprometidos. Una ventaja de este microorganismo es su capacidad de proliferación dentro de macrófagos, probablemente por su habilidad natural para desintoxicar las especies reactivas de oxígeno, como H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, generadas por el fagocito. Para entender parte de la virulencia de *C. glabrata* estudiamos su respuesta al estrés oxidante causado por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Presentamos el análisis de cepas mutantes en genes que codifican proteínas involucradas en la respuesta al estrés oxidante identificadas en el genoma de *C. glabrata* como ortólogos en *S. cerevisiae*: Skn7p y Yap1p, factores de transcripción de estrés oxidante; Msn2p y Msn4p, factores de transcripción de estrés general; y la única catalasa encontrada en *C. glabrata* Cta1p.

Demostramos que *C. glabrata* crece a más altas concentraciones de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> que *Saccharomyces cerevisiae*. Esta alta resistencia mostrada *in vitro* tanto en fase logarítmica como en fase estacionaria es completamente dependiente de la catalasa. También encontramos que ambos factores de transcripción Yap1p y Skn7p son necesarios para la adaptación y resistencia durante fase logarítmica, pero son prescindibles para la respuesta durante fase estacionaria. Las mutantes sencillas *msn2Δ* o *msn4Δ* no mostraron fenotipo en fase logarítmica, pero la doble *msn2Δ msn4Δ* mostró resistencia atenuada durante fase estacionaria.

Asimismo, obtuvimos evidencia de que la desacetilasa dependiente de NAD<sup>+</sup> Hst1p es un regulador de genes involucrados en la respuesta al estrés oxidante al mostrarse más resistente la mutante *hst1Δ* al estrés oxidante que la cepa silvestre.

**PALABRAS CLAVE:** estrés oxidante, especies reactivas de oxígeno, peróxido de hidrógeno, catalasa, factores de transcripción para estrés, fase estacionaria.

## Abstract

The oxidative stress response generated by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in the opportunistic fungal pathogen *Candida glabrata*

*Candida glabrata* is an opportunistic fungal pathogen capable of invasive infections in immunocompromised individuals. This microorganism upon infection is capable to proliferate inside macrophage cells, probably due to a natural ability to detoxify reactive oxygen species (like H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). In order to understand the virulence of *C. glabrata*, we are studying its oxidative stress response. Here we present the analysis of mutants in several genes identified in the *C. glabrata* genome as orthologs of *S. cerevisiae*: the oxidative stress transcription factors Skn7p and Yap1p, the general stress transcription factors Msn2p and Msn4p and the single catalase Cta1p.

Here we show that resistance of *C. glabrata* to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> is significantly higher when compared to *S. cerevisiae*. We also show that this *in vitro* high resistance in both growing and stationary phase cells is completely dependent on the single catalase. Furthermore, we found that either transcription factors Yap1p or Skn7p are needed for adaptation and resistance during exponential growth, but they are dispensable for the response in stationary phase. Mutations in *MSN2* or *MSN4* showed no phenotype in growing cells, in contrast, the double mutant *msn2Δ msn4Δ* showed a reduced resistance in stationary phase.

In addition, we show that Hst1p NAD<sup>+</sup>-dependant deacetylase is an oxidative stress response genes regulator, as the *hst1Δ* mutant is more resistant than the wild-type strain.

**KEYWORDS:** oxidative stress, reactive oxygen species, hydrogen peroxide, catalase, stress transcription factors, stationary phase.

## I. Introducción

### ***Candida glabrata* es una levadura patógena emergente**

*Candida glabrata* es un comensal que forma parte de la microflora de las mucosas humanas [2]. Cuando las condiciones son oportunas, causa infecciones en los tractos urogenital y orofaríngeo. Recientemente en un estudio en el Hospital Juárez de la Ciudad de México se reportó el aislamiento de *C. glabrata* en 40.33% de los casos de vaginitis causadas por *Candida* [52].

*C. glabrata* también es capaz de producir infecciones sistémicas graves en pacientes inmunocomprometidos, con tasas de mortalidad de 50% para pacientes con cáncer y hasta del 100% en pacientes de trasplante de médula [revisado en 39]. Se le considera un patógeno emergente ya que en las candidosis se aísla cada vez con mayor frecuencia. En la década de los 80's *C. glabrata* se aislaba sólo en un 2%. En la actualidad se llega a aislar hasta en un 26% [51].

Debido a su creciente importancia como patógeno, los trabajos sobre *C. glabrata* han aumentado en las últimas dos décadas.

### **Factores de virulencia en *C. glabrata***

No obstante la creciente importancia como patógeno, se conoce poco sobre los factores de virulencia en *C. glabrata*. En los últimos diez años se han identificado los siguientes factores de virulencia:

- 1) el factor de transcripción Ace2p: La supresión de este gen<sup>1</sup> tiene un efecto de hipervirulencia [31];
- 2) adhesinas: las proteínas Epa1p, Epa6p y Epa7p son requeridas para colonización de riñón y de bazo en un modelo murino de infección por tracto urinario o sistémico [10, 13], Epa6p también es requerida para la formación de biopelículas [28] además de inducirse específicamente en vejiga y riñón de ratón [14];
- 3) proteasas: las yapsinas son aspartil proteasas con ancla glicosilfosfatidilinositol (glycosylphosphatidylinositol – GPI) y se requieren para la

---

<sup>1</sup> El ortólogo *ACE1* en *Saccharomyces cerevisiae* es un activador de genes específicos de fase G1 temprana



integridad de la pared celular, la supervivencia al interior de macrófagos y la adherencia a las células de mamífero [33].

### **La respuesta inmune contra los hongos patógenos**

Como parte del sistema inmune innato los leucocitos son la primera línea de defensa celular frente a los hongos patógenos. Los macrófagos y neutrófilos son estimulados cuando fagocitan microorganismos patógenos y liberan especies reactivas de oxígeno (ERO) a través de un sistema enzimático complejo [47].

Durante el estallido respiratorio (también llamado estallido oxidante) el consumo de oxígeno por la célula fagocítica se incrementa y la oxidasa dependiente de NADPH (NoxA) reduce el oxígeno molecular a superóxido, el cuál es secretado hacia el fagosoma, desencadenando la producción de ERO que pueden matar al agente infeccioso. La ausencia de este proceso por una mutación en NoxA causa 'desorden crónico granulomatoso' y es la causa de infecciones bacterianas y fúngicas recurrentes [43].

Una característica de *C. glabrata* es que los macrófagos no sólo no la eliminan, sino que *C. glabrata* es capaz de dividirse al interior de éstas células blancas [33]. En cambio *Candida albicans* necesita realizar un cambio fenotípico morfológico de levadura a micelio para lograr sobrevivir en las mismas condiciones [33]. Esto indica que *C. glabrata* debe tener una alta resistencia a las ERO generadas por ésta célula del sistema inmune.

### **Las especies reactivas de oxígeno**

Las especies reactivas de oxígeno como el peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), el superóxido (O<sub>2</sub><sup>•-</sup>), el oxígeno en singulete (<sup>1</sup>O<sub>2</sub>) y el radical hidroxilo (HO<sup>•</sup>), son generadas por: 1) la reducción incompleta del O<sub>2</sub> durante la respiración aeróbica; 2) la exposición a radiaciones ionizantes<sup>2</sup> o diferentes químicos<sup>3</sup> y metales<sup>4</sup>; 3) fagocitos estimulados o 4) *scavengers* del proceso de homeostasis redox. El estrés oxidante es causado por los efectos de la acumulación en las células de

---

<sup>2</sup> UV, energías de alta intensidad

<sup>3</sup> Menadiona, paraquat, hidroperóxido de cumeno

<sup>4</sup> Metales oxidados como Cu<sup>2+</sup> o Fe<sup>3+</sup>

éstas ERO, capaces de oxidar todas la biomoléculas. Las ERO, particularmente HO<sup>•</sup>, generan un daño celular importante al reaccionar súbitamente con: 1) ácidos nucleicos, causando entrecruzamientos e intracruzamientos cromosomales que resultan en mutaciones; 2) con proteínas, que crean hidroperóxidos protéicos, desdoblamiento y desactivación de sitios activos y grupos prostéticos; y 3) con lípidos, que se fragmentan al oxidarse, y generan especies reactivas secundarias como radicales e hidroperóxidos lipídicos [62].

El daño celular por ERO se ha relacionado a una gran variedad de procesos biológicos y enfermedades, incluyendo el cáncer, el envejecimiento y el acortamiento de los telómeros, la artritis, y la muerte celular programada [revisado en 30]. Esto muestra que es crucial una regulación precisa de las especies reactivas de oxígeno en la célula [56] para evitar daños a componentes celulares clave para la sobrevivencia del organismo.

Los organismos aerobios e incluso algunos anaerobios han desarrollado sistemas de control para mantener la homeostasis rédox de la célula. Sorprendentemente, los patógenos también utilizan precisamente estos sistemas de control para defenderse del ataque por especies reactivas de oxígeno. Éstos activan genes que codifican para enzimas desintoxicantes y moléculas antioxidantes como catalasas, superóxido dismutasas, peroxidasas, reductasas, glutatión o ascorbato [revisado en 56, 62]. Este sistema de control es lo que se conoce como respuesta al estrés oxidante (REO). Además, existen evidencias en células de mamífero, plantas, levaduras y bacterias de que las especies reactivas de oxígeno no son únicamente nocivas para las células, sino que son utilizadas en varios procesos celulares, principalmente en señalización [37, 61].

### **La respuesta al estrés oxidante en levadura**

La respuesta al estrés oxidante es un proceso conservado evolutivamente en todos los organismos, ligado a los procesos de defensa a choque térmico y a moléculas que los protegen de diferentes tipos de estrés. En *Saccharomyces cerevisiae*, las vías implicadas en esta respuesta involucran la expresión de *scavengers* de ERO, como ascorbato, tocoferol y glutatión, y de enzimas desintoxicantes como catalasas, superóxido dismutasas (SOD) y peroxidasas [63]. Como parte de la respuesta al daño por peróxido de hidrógeno, *S. cerevisiae* arresta su ciclo celular en G<sub>2</sub>, por la vía de control de daño a ADN dependiente de Rad9 [16] y aumenta la síntesis de glutatión y catalasas [21]. Esto permite neutralizar las ERO y reparar el daño al ADN.

La adaptación a la presencia de ERO es un proceso que forma parte de la respuesta al estrés oxidante. La adaptación inicia cuando el organismo detecta y responde a niveles bajos no letales del oxidante e incrementa la expresión de genes de la respuesta al estrés oxidante (REO). Esto protege al organismo de niveles subsecuentes mayores de oxidante. La mayor resistencia ganada por la adaptación se acompaña del mantenimiento de la capacidad de proliferación de las células [30].

A pesar del término, la adaptación a ERO no se refiere a una selección natural o proceso evolutivo, sino a un proceso no heredable de acondicionamiento y aclimatación como respuesta de las células al medio ambiente [A. De Las Peñas, datos del laboratorio].

### **Efecto del estado metabólico en la respuesta al estrés oxidante en levadura**

Las células de levadura en fase exponencial de crecimiento están en división activa y pasan a un estado no proliferante al entrar a la fase estacionaria. La entrada a esta fase parece estar controlada por factores específicos de crecimiento y por la detección de la falta de nutrientes. La falta de nutrientes causa la desactivación de la vía de señalización TOR, la cual aparentemente regula de manera negativa los eventos que llevan a y suceden durante fase estacionaria. En *Saccharomyces cerevisiae*, los factores de transcripción para estrés general

Msn2p y Msn4p están regulados negativamente por la vía TOR. Esto coincide con el incremento en la resistencia a una diversidad de estreses durante fase estacionaria [revisado en 22]. Se ha visto que durante la fase estacionaria la resistencia a ERO es superior comparada con la resistencia durante la fase exponencial [29]. Por tanto, para el estudio completo de la REO en *C. glabrata*, es necesario incluir la respuesta en la fase estacionaria.

### **Factores de transcripción de la respuesta al estrés oxidante en levadura**

Para describir la patogénesis fúngica desde el punto de vista molecular, es fundamental entender los mecanismos de control transcripcional para la inducción de los genes de la respuesta al estrés oxidante. Debido a que *C. glabrata* es filogenéticamente muy cercana a *Saccharomyces cerevisiae* [19, 32] los reguladores, las enzimas y posiblemente las vías regulatorias de la respuesta al estrés oxidante esten conservadas entre ellas.

En *S. cerevisiae*, la REO está controlada por varios factores de transcripción, entre ellos Msn2p, Msn4p, Yap1p y Skn7p. Cepas de *S. cerevisiae* mutantes en estos factores son sensibles a estrés oxidante [revisado en 4, 17, 18].

Los genes *MSN2* y *MSN4* de *S. cerevisiae* codifican para los factores de estrés general **Msn2p** y **Msn4p**, proteínas con dominios tipo dedos de cinc [42]. Están implicados en varios tipos de estreses y participan de manera importante en la respuesta al estrés causado por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al activar genes con promotores dependientes de elementos de respuesta al estrés (stress-response element – STRE: AGGGG/CCCCT) como *CTT1* que codifica para la catalasa citosólica, y *HSP12* que codifica para una proteína membranal que protege a las membranas de desecación [17]. Estos factores de transcripción parecen ser más importantes en la resistencia al estrés oxidante durante la fase estacionaria que durante la fase logarítmica [42].

**Yap1p** de *S. cerevisiae* es una proteína con un dominio de unión a ADN tipo cierre básico de leucina (bZip) en el N-terminal. Fue el primer miembro identificado de las yAPs (yeast AP-1) por su homología con la familia *c-jun* del complejo AP-1 de mamífero [45]. Yap1p tiene la capacidad de activar la

transcripción de genes reporteros con la secuencia ARE (AP-1 recognition element) de SV40: TGACTAA; sin embargo, la secuencia a la que se une con mayor afinidad es YRE (Yap1p response element: TTACTION) que difiere en dos posiciones de la secuencia ideal del AP-1 de mamífero y de Gcn4p (otro miembro de familia *c-jun*) de levadura: TGACTCA [27]. Aún así, para YRE se han definido las secuencias consenso TKASTAA y TKACAAA para algunos genes como *CTT1* [26].

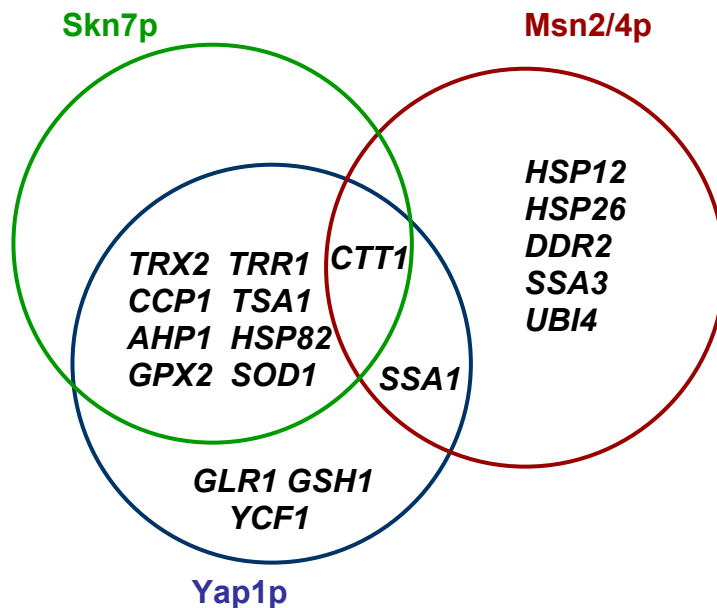
La localización nuclear de Yap1p en *S. cerevisiae* está determinada por una secuencia de localización nuclear en el N-terminal. Crm1p es una exportina evolutivamente conservada [36, 65] que reconoce una secuencia de exportación nuclear en el C-terminal de Yap1p y regresa a la proteína al citoplasma. Al oxidarse por efecto de estrés oxidante, dos dominios ricos en cisteínas en el N- y C-terminales de Yap1p cubren la secuencia de exportación, de manera que Yap1p permanece en el interior del núcleo para activar los genes que están bajo su control [1, 35, 53]. El gen *CRM1* tiene sintenia con el ortólogo correspondiente de *C. glabrata* (*CAGLOB02189g*), lo que sugiere una función equivalente [7].

Yap1p afecta la expresión de al menos 70 genes involucrados en la respuesta al estrés oxidante por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, entre los cuales se encuentran: *CTT1* (catalasa citosólica), *SOD1* (superóxido dismutasa citosólica), *CCP1* (citocromo-c peroxidasa), *TRX2* (tioredoxina), *TRR1* (tioredoxina reductasa), y *YCF1* (transportador vacuolar de glutatión S-conjugado tipo casete de unión a ATP), *GSH1* ( $\gamma$ -glutamilcisteína sintetasa), *GTT1* (glutatión transferasa), *GLR1* (glutatión reductasa) y *GPX2* (glutatión peroxidasa) involucrados en la síntesis y metabolismo del glutatión [62].

**Skn7p** de *S. cerevisiae* es una proteína perteneciente a la familia del receptor del sistema de transducción de señales de dos componentes, descrita originalmente en bacterias [6]. Este sistema está compuesto por un detector y un receptor de la señal. Skn7p presenta un dominio receptor de señal del sistema de dos componentes; además un dominio de unión a ADN [50]. Se han definido al menos cuatro secuencias motivo para este dominio de unión a ADN, GGCNGGC, GGCNAGA, GGCNNGGC y GGCNNAGA, denominadas en conjunto OSRE

(oxidative stress response element) [26]. En bacterias, el sistema de dos componentes es un sistema común para la detección y la respuesta a señales del medio ambiente. El primer componente homodimérico es un cinasa de histidina membranal que detecta la señal y fosforila un ácido aspártico en el receptor, activándolo. En eucariontes, el segundo componente ya activado transmite la señal al interior del núcleo [60]. Skn7p induce genes que están bajo su control, relacionados a la respuesta al estrés oxidante, como *TRX2*, que codifica a una tiorredoxina [5, 44].

Se ha demostrado que los factores de transcripción de *S. cerevisiae* Msn2p, Msn4p, Yap1p y Skn7p participan en la respuesta al estrés oxidante, e inclusive en los regulones de Msn2/4p y Yap1p hay genes corregulados por estos factores de transcripción [25]. La corregulación de genes es evidente entre Yap1p y Skn7p, principalmente en la respuesta al estrés oxidante por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Fig. 1).



**Figura 1.** Corregulación por Msn2/4p, Yap1p y Skn7p en *S. cerevisiae* de algunos genes de respuesta al estrés [26, 64].

Genes no mencionados en el texto: *HSP26* (chaperona de choque térmico), *DDR2* (respuesta a multiestrés), *SSA3* (ATPasa de la familia HSP70), *UBI4* (ubiquitina), *SSA1* (ATPasa de la familia HSP70), *TSA1* (tiorredoxina peroxidasa), *AHP1* (peroxiredoxina), *HSP82* (chaperona de choque térmico de la familia HSP90) [57].

Si bien existe correulación de los genes de la REO por Msn2/4p, Yap1p y Skn7p, el grado de control de cada uno depende de la fase de crecimiento de la levadura y del tipo de oxidante al que están respondiendo [4, 18, 38].

### **Catalasas en levaduras**

La catalasa es una enzima muy conservada presente en procariontes y eucariontes. Cataliza la conversión del peróxido de hidrógeno a agua y dióxígeno. Esta reacción no se satura fácilmente y sucede rápidamente con constantes de velocidad de segundo orden en el rango de  $10^7 M^{-1}s^{-1}$  [61]. Por tanto, esta enzima se vuelve indispensable para un patógeno en el ambiente altamente oxidante del fagosoma.

La mayoría de las catalasas existen como tetrámeros de subunidades de 65KD, cada uno con un grupo prostético hierro-protoporfirina IX (hemo) en la parte más interna de la estructura [56]. La localización celular se determina por la presencia o ausencia de secuencias conservadas de importación al peroxisoma o a la mitocondria.

*Saccharomyces cerevisiae* tiene dos catalasas, Ctt1p codificada por *CTT1* y Cta1p codificada por *CTA1*. Ctt1p es citosólica y Cta1p se localiza en el peroxisoma y la mitocondria, pues su secuencia presenta motivos internos de exportación a estos organelos [34, 48, 49]. Ambas catalasas son importantes para la defensa al estrés oxidante por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en *S. cerevisiae* [21, 29].

### **Genes de respuesta al estrés oxidante en *Candida glabrata***

*Candida glabrata* posee genes ortólogos a los genes *YAP1*, *SKN7*, *MSN2*, *MSN4* y *CTA1*, implicados en los mecanismos de respuesta al estrés oxidante por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

Los genes *CAGL0F05995g*, *CAGL0M13189g* y *CAGL0F09097g* codifican para las proteínas Msn2p, Msn4p y Skn7p, respectivamente, y tienen sintenia con sus ortólogos en *S. cerevisiae*, pero no existen reportes indexados sobre éstos. Sólo se encuentran en las bases de datos Yeast Gene Order Browser y Génolevures [7, 19] por sintenia y similitud con sus ortólogos en *S. cerevisiae*.

*CAGL0H04631g* codifica para Yap1p en *C. glabrata* y está reportado como *CgAP1*. Codifica para un homólogo funcional de su ortólogo en *S.cerevisiae* *YAP1* [12].

El genoma de *C. glabrata* contiene sólo una secuencia, *CAGL0K10868g*, que codifica para una proteína funcional homóloga a la estructura de las catalasas. La secuencia se reportó como *CgCTA1* por el mayor porcentaje de similitud con *CTA1* de *S. cerevisiae* [46].

### **La desacetilasa dependiente de NAD<sup>+</sup> Hst1p**

En *Saccharomyces cerevisiae*, la proteína Hst1p es homóloga a la desacetilasa de histonas dependiente de NAD<sup>+</sup> Sir2p. Forma parte del grupo de proteínas homólogas a Sir2, las sirtuínas, nombradas a partir de la voz inglesa “*Sir-two*”. Hst1p se ha propuesto como un regulador negativo de la transcripción en *S. cerevisiae* y otros organismos eucariontes superiores en diversas funciones [3, 55, 59]. Existe un ortólogo de *HST1* en *C. glabrata* [19], que podría incorporarse en las vías de regulación de la respuesta a estrés oxidante de *C. glabrata* en la regulación de genes subteloméricos.



Los datos aquí presentados muestran que las vías de regulación de resistencia al estrés oxidante causado por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en *C. glabrata* son análogas a las ya reportadas en *Saccharomyces cerevisiae*.

Durante la fase estacionaria se manifiesta una resistencia innata al H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> mayor en todas las cepas, mutantes inclusive, al compararla con la correspondiente resistencia durante fase exponencial. Demostramos que *C. glabrata* resiste niveles más altos de peróxido de hidrógeno que *S. cerevisiae*, y que esta resistencia depende en gran medida de la única catalasa.

Mostramos también como *C. glabrata* muestra un fenotipo de adaptación durante fase exponencial que se pierde al mutar cualquiera de los factores de transcripción Yap1p o Skn7p, pero que se mantiene en mutantes de los factores de estrés general Msn2p y/o Msn4p. De manera inversa, encontramos que los factores Msn2/4p son importantes para la resistencia en fase estacionaria y no así los factores Yap1p o Skn7p. Los experimentos realizados en células con la mutación *hst1Δ* sugieren que Hst1p podría estar controlando parcialmente la REO. Durante fase exponencial *hst1Δ* presenta un incremento en la resistencia a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Los datos también advierten sobre factores celulares indeterminados presentes en el medio de cultivo de células en fase estacionaria que pueden protegerlas y que forman parte importante de la alta resistencia durante esta fase.

Hallamos que el grado de resistencia mostrada en las células en crecimiento depende de la proporción de células/oxidante. Además observamos que la ganancia de la resistencia depende también del paso por la fase estacionaria, efecto que se pierde de manera progresiva al paso de generaciones desde la fase estacionaria al proseguir el crecimiento hacia la fase exponencial.

## II. Materiales y métodos

### Medios de cultivo

Para obtener cultivos de las cepas de *Escherichia coli* JM109 o DH10B (Tabla 2, anexos) utilizadas para aislar plásmidos se utilizó medio Luria-Bertani (LB). El medio LB contiene 5 g/L de extracto de levadura, 10 g/L de triptona y 5 g/L de NaCl. Cuando se requirió, se suplementó con carbenicilina a una concentración final de 100 µg/mL a partir de una solución *stock* de carbenicilina 100 mg/mL (1000x).

*Candida glabrata* se cultivó en medio estándar para levadura como se describe en [58]. El medio rico YPD contiene 10 g/L de extracto de levadura, 20 g/L de peptona y 20 g/L glucosa, adicionado con 25 mg/L de uracilo. Cuando se requirió, se suplementó con higromicina a una concentración final de 400 µg/mL. El medio YPG se prepara como el medio YPD excepto que no contiene glucosa como fuente de carbono, sino glicerol a una concentración final de 3%. El medio CAA (casaminoácidos) contiene 1.7 g/L de base nitrogenada de levadura sin amonio, 5 g/L de sulfato de amonio [(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>], 6 g/L de casaminoácidos y 20 g/L de glucosa. Cuando se requirió, al medio CAA se adicionó 0.9 g/L de ácido 5-fluoroótico (5-FOA) y 50 mg/L de uracilo; para cajas de medio sólido se añadió 2% de agar bacteriológico.

### Cepas de *Candida glabrata*

Todas las cepas utilizadas en este estudio están descritas en la Tabla 2 de los anexos. Las cepas de *C. glabrata* se conservan en glicerol al 15% a -80°C. Todo cultivo líquido o sólido se crece a 30°C.

### Plásmidos

Los plásmidos utilizados en este estudio están descritos en la Tabla 3 de los anexos.

## Oligonucleótidos

Los oligonucleótidos utilizados para la construcción de plásmidos y para comprobar las mutaciones por supresión/inserción con la técnica de PCR, están descritos en la Tabla 4 de los anexos.

## Transformación de *C. glabrata* para generar mutantes

Para la transformación genética de *C. glabrata* utilicé una modificación del método de transformación con acetato de litio (LiAc) [20]. Brevemente, las células se crecieron en YPD a una OD<sub>600nm</sub> de 0.6-1.0, se cosecharon por centrifugación a 3500 RPM y se lavaron con agua estéril. Posteriormente, las células se concentraron 100 veces en LiAc 100 mM y se usaron alícuotas de 50 µL para cada transformación. A cada alícuota de 50 µL de células en suspensión se le adicionó 240 µL de polietilenglicol al 50% (PM 4000) (concentración final ~30%), 36 µL de LiAc 1 M (concentración final ~100 mM), 25 µL de ADN de esperma de salmón 2mg/mL desnaturalizado por calor (50 µg ADN, concentración final ~125ng/µL), y el ADN plasmídico necesario para cada transformación (concentración final ~0.1ng/µL) disuelto previamente en TE 10/0.1 a un volumen de 50 µL (TE es una mezcla estéril de Tris 10 mM y EDTA 0.1 mM utilizada para conservar el ADN). Ésta mezcla se incubó a 30°C por 45', después se le agregó 43 µL de DMSO, se mezcló e inmediatamente se le dio un choque de calor a 42°C por 15 min. Por último, las células se centrifugaron, se resuspendieron en 1 mL de YPD y se incubaron a 30°C por 4 hrs (en caso de transformar con el pánsmido pMZ21, se procedió inmediatamente a platear 300 µL en cajas de CAA, ver abajo). Alícuotas de 300 µL de la suspensión de células se platearon en cajas con medio YPD-Hyg. Colonias resistentes a higromicina se estriaron para obtener colonias aisladas y se crecieron en cajas con YPG para eliminar aquellas que contienen mutaciones que afectan la función mitocondrial, ya no pueden utilizar como fuente de carbono al glicerol.

### Construcción de cepas mutantes

Para realizar mutaciones por reemplazo construí plásmidos que contienen fragmentos 5' UTR y 3' UTR (~800pb) del gen que se va a reemplazar. Estos fragmentos flanquean un casete que confiere resistencia a higromicina, con el fin de poder seleccionar las clonas transformantes que surgen como resultado de la recombinación homóloga.

El contenido del casete *hph*, de 2092 pb, está estructurado de la siguiente manera: *FRT::P<sub>PGK1</sub>::hph::3'UTR<sub>HIS3</sub>::FRT*. El gen *hph* se encuentra bajo el promotor del gen *PGK1* de *S. cerevisiae*, y contiene una región para terminación de la transcripción, 3' UTR del gen *HIS3* de *C. glabrata*. El gen *hph* proviene de la bacteria *Klebsiella pneumoniae* y codifica una cinasa (higromicina fosfotransferasa) que inactiva al antibiótico higromicina B a través de su fosforilación, y confiere resistencia a higromicina [23].

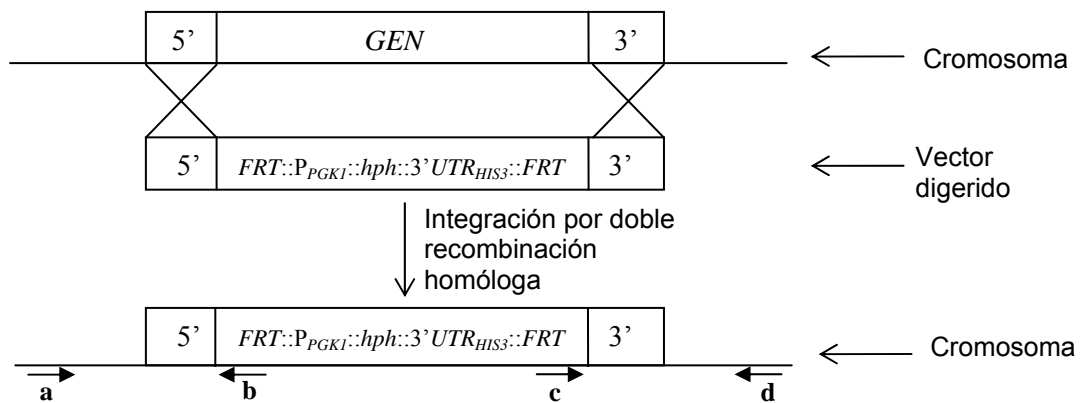
El fragmento digerido (5' UTR-casete *hph*-3' UTR), se utilizó para transformar las cepas de *C. glabrata* y obtener cepas mutantes en los genes cuyos productos intervienen en la respuesta al estrés oxidante (ver Tabla 3, anexos). Si el fragmento que contiene el casete de resistencia a higromicina se inserta en el lugar adecuado, el gen original silvestre es reemplazado por doble recombinación homóloga por el casete de resistencia (Fig. 4).

Para la construcción de dobles mutantes, transformé las cepas mutantes de *C. glabrata* con el plásmido pMZ21 (Tabla 3), que expresa constitutivamente la recombinasa Flp1p de *Saccharomyces cerevisiae*. Flp1p escinde el casete de resistencia a partir de las secuencias repetidas directas *FRT* (Fig. 17). Después de sembrar en cajas de YPD para obtener colonias aisladas y comprobar la pérdida tanto del casete de resistencia por PCR como del plásmido pMZ21, fue posible realizar una segunda selección de mutantes con higromicina al transformar las mutantes sencillas con otro plásmido para mutagenizar otro gen (Ver tabla 2, anexos).

### Comprobación de las mutaciones por reemplazo génico

Para comprobar las mutaciones por reemplazo en las diferentes cepas, se analizó la estructura genómica de las cepas mutantes por medio de la técnica de PCR con oligonucleótidos específicos.

La inserción del casete *FRT::P<sub>PGK1</sub>::hph::3'UTR<sub>HIS3</sub>::FRT* se comprobó por amplificación de los extremos 5' y 3' con oligonucleótidos específicos que hibridan dentro del casete *hph* (Fig. 2, oligonucleótidos **b** y **c**) y en regiones endógenas de *C. glabrata* que flanquean cada inserción, fuera del fragmento que se utilizó para construir el reemplazo (Fig. 2, oligonucleótidos **a** y **d**).

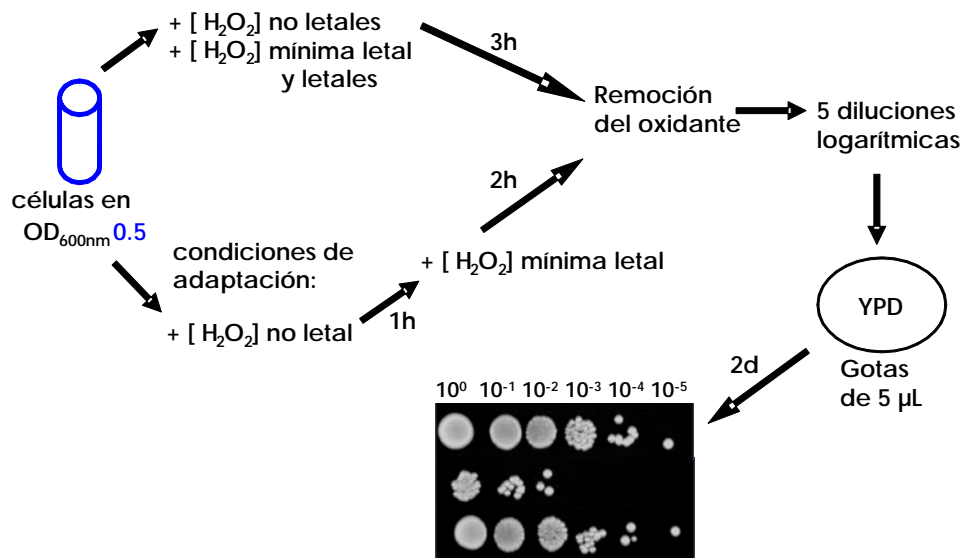


**Figura 2.** Mutación por reemplazo y ubicación de oligonucleótidos para comprobar la estructura del *locus* mutado. El ADN plasmídico, que contiene la secuencia *FRT::P<sub>PGK1</sub>::hph::3'UTR<sub>HIS3</sub>::FRT* flanqueada por regiones homólogas 5' *UTR* y 3' *UTR* del gen que se va a reemplazar, se inserta por doble recombinación homóloga en el gen endógeno. Como resultado se pierde el gen endógeno y, en este caso, se gana resistencia a higomicina. Se muestra la ubicación de las parejas de oligonucleótidos para comprobar la mutación. Los oligonucleótidos **a** y **b** para comprobar la inserción en el extremo 5'; y los oligonucleótidos **c** y **d** para comprobar la inserción en el extremo 3'.

### Protocolo para el análisis de la respuesta a estrés oxidante en levaduras

Los cultivos líquidos de trabajo se obtienen a partir de siembra de células en glicerol en preinóculos líquidos en agitación. Para obtener cultivos con células en fase estacionaria, se diluyó 100 veces el preinóculo de 12 horas en medio líquido fresco y se creció por 36 h. Para obtener cultivos en fase logarítmica con un determinado número de duplicaciones (generaciones) a una OD<sub>600nm</sub> determinada, se diluyó la cantidad necesaria de preinóculo de 36 h en medio líquido fresco (Cuadro 1, anexos)

Los cultivos en YPD líquido de *C. glabrata* en fase logarítmica a OD<sub>600nm</sub> de 0.5, son retados con diferentes concentraciones de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Después de tres horas de la adición de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y agitación a 250 RPM a 30° C, se colecta la cantidad de células equivalentes a una OD<sub>600nm</sub> de 0.5 en un mL, se resuspenden en un mL de H<sub>2</sub>O para remover el oxidante y se gotean 5µL de seis diluciones logarítmicas en cajas de medio YPD-agar. Después de 2-3 días de crecimiento a 30° C se registra el crecimiento en placa de las diluciones (Fig. 3).



**Figura 3.** Protocolo para el análisis de la respuesta a estrés oxidante.

Para los experimentos de fase estacionaria, al momento de añadir H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> se utilizan cultivos saturados diluidos en su propio medio a OD<sub>600nm</sub> de 0.5. Para los experimentos de adaptación al estrés, se añadió H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (30% v/v, Sigma-Aldrich) a concentración no letal (10 mM) y después de una hora en agitación a 250 RPM a 30° C, se añade H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> una concentración letal (200 mM), se agita por dos horas adicionales y se continúa con plateo de células en YPD como se describe anteriormente.

Para alineamientos y búsqueda de secuencias consenso se utilizó el software Vector NTI Advance<sup>®</sup> 10 para PC de la compañía Invitrogen Corporation (Carlsbad, California, EE.UU.).

### III. Resultados

#### Construcción de mutantes

A partir de la cepa silvestre BG14 de *Candida glabrata* obtuve mutantes de *Candida glabrata* a partir de la cepa silvestre BG14 en los factores de transcripción Yap1p y Skn7p. Además construí la doble mutante *yap1Δ skn7Δ*, la mutante *cta1Δ* en catalasa y la doble mutante *hst1Δ cta1Δ*. Realizé curvas de crecimiento de las cepas silvestre, *cta1Δ* y *hst1Δ* (Gráficas 1 y 2 en anexos) para obtener los tiempos de duplicación a 30° C en medio YPD líquido.

#### Análisis de las secuencias de genes de la REO en *C. glabrata*

En las bases de datos Yeast Gene Order Browser y Génolevures [7, 19] situamos a los genes de *C. glabrata* ortólogos a genes de *S. cerevisiae* *YAP1*, *SKN7*, *MSN2*, *MSN4* y *CTA1*, implicados en los mecanismos de respuesta al estrés oxidante por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

*C.g.YAP1*, que codifica para Yap1p, es sinténico [7] a su ortólogo *YAP1* en *S. cerevisiae*. Sus productos presentan 33.5% de identidad y 41.8% de similitud entre ellos.

*CAGL0F09097g* codifica para Skn7p putativo con una identidad del 51% y similitud de 65% al ortólogo correspondiente en *S. cerevisiae* [19]. Conserva un dominio receptor de señal del sistema de dos componentes y un dominio de unión a ADN de factor de respuesta a choque por calor según una búsqueda en NCBI Conserved Domains [41]. Convenientemente le llamamos *C.g.SK7*.

En *C. glabrata*, Msn2p y Msn4p son codificados por los genes *CAGL0F05995g* y *CAGL0M13189g*, respectivamente y tienen sintenia con sus ortólogos en *S. cerevisiae* [7, 19]. *C.g.Msn2p* y *S.c.Msn2p* son 24.6% idénticas y 36.3% similares; mientras *C.g.Msn4p* y *S.c.Msn4p* tienen 23.0% de identidad y 32.2% de similitud. Estas proteínas tienen dos dominios de unión a ADN conservados en el C-terminal. Los dominios de unión a ADN son dominios tipo dedo de cinc, que al alinear entre ellos sin el resto de la secuencia de la proteína a la que pertenecen, resulta una similitud cercana al 90%. Pero al realizar

alineamientos entre ortólogos de toda la secuencia sin estos dominios, los porcentajes disminuyen: identidad 19.8% y similitud 30.8% para Msn2p, e identidad 15.7% y similitud 25.5% para Msn4p (Tabla 1). El porcentaje de similitud entre los dominios tipo dedo de cinc sugiere que estas proteínas ortólogas podrían estar respondiendo de forma similar entre *C. glabrata* y *S. cerevisiae*, a pesar de la dramática diferencia en los porcentajes de similitud entre los ortólogos con y sin el dominio.

**Tabla 1.** Porcentajes de identidad/similitud entre Msn2p y Msn4p con y sin el dominio de dedos de cinc en *C. glabrata* y *S. cerevisiae*. Resultados de alineamientos entre **A)** secuencias completas y **B)** sin el dominio ZnFNG. Los alineamientos entre **ortólogos** se resaltan en negrita. **C)** Alineamiento entre secuencias de *Cg* y *Sc* de los dominios ZnFNG de Msn2 y Msn4p.

<b>A)</b>	Con ZnFNG	CgMsn2p	CgMsn4p	ScMsn2p	ScMsn4p
	CgMsn2p		21/29.3	<b>24.6/36.3</b>	22.4/34.5
	CgMsn4p			21.9/29.3	<b>23.0/32.2</b>
	ScMsn2p				28.1/38.7
	ScMsn4p				

<b>B)</b>	Sin ZnFNG	CgMsn2p	CgMsn4p	ScMsn2p	ScMsn4p
	CgMsn2p		14.8/23.5	<b>19.8/30.8</b>	17.1/29.2
	CgMsn4p			17.1/24.9	<b>15.7/25.5</b>
	ScMsn2p				23.7/34.3
	ScMsn4p				

**C)**

	1																			68																																															
CgMsn2p ZnFNG	D	I	K	P	F	G	C	H	L	C	S	K	A	F	K	R	S	E	H	L	K	R	H	V	R	S	V	H	S	T	D	R	P	F	S	C	H	L	C	E	K	K	F	S	R	S	D	N	L	S	Q	H	I	K	T	H	K	I	S	G	S	T	S	T	T	K	E
ScMsn2p ZnFNG	L	E	K	P	F	H	C	H	I	C	P	K	S	F	K	R	S	E	H	L	K	R	H	V	R	S	V	H	S	N	E	R	P	F	A	C	H	I	C	D	K	K	F	S	R	S	D	N	L	S	Q	H	I	K	T	H	K	I	G	D	I	-----					
CgMsn4p ZnFNG	D	G	A	K	P	F	Q	A	D	C	K	A	F	R	S	E	H	L	K	R	H	V	R	S	V	H	S	T	E	R	P	F	P	C	M	F	C	E	K	K	F	S	R	S	D	N	L	S	Q	H	L	K	T	H	K	I	G	D	F	-----							
ScMsn4p ZnFNG	D	K	N	K	P	F	K	C	K	D	C	K	A	F	R	S	E	H	L	K	R	H	I	R	S	V	H	S	T	E	R	P	F	A	C	M	F	C	E	K	K	F	S	R	S	D	N	L	S	Q	H	L	K	T	H	K	I	G	D	F	-----						
Consensus	D	D	K	P	F		C	H	D	C	K	A	F	R	S	E	H	L	K	R	H	V	R	S	V	H	S	T	E	R	P	F	A	C	M	F	C	E	K	K	F	S	R	S	D	N	L	S	Q	H	I	K	T	H	K	I	G	D	F								
Identidad:																							61.8%				Similitud:				89.7%																																				

*Cg:* *Candida glabrata*

*Sc:* *Saccharomyces cerevisiae*

ZnFNG: Dedos de cinc

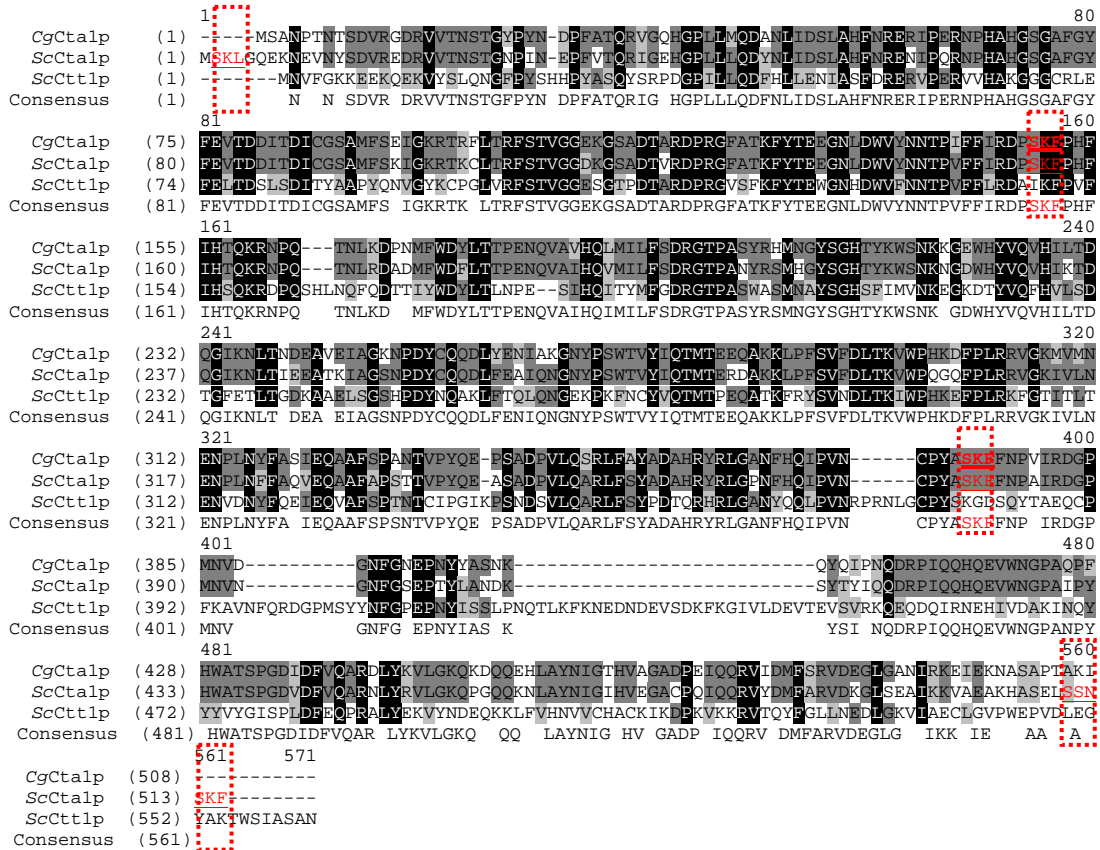
También encontramos que la exportina Crm1p codificada por *S.c.CRM1* se encuentra en *C. glabrata*. Las secuencias *S.c.CRM1* y *C.g.CRM1* codifican para proteínas con 87.8% de identidad, lo que sugiere una función equivalente<sup>5</sup>.

<sup>5</sup> En general, valores superiores al 30% de similitud o de identidad en secuencias proteínicas indicarán estructuras homólogas.



## Análisis de la secuencia de catalasa en *C. glabrata*

El genoma de *Candida glabrata* contiene sólo una catalasa. La secuencia CgCTA1 codifica para C.g.Cta1p, la cual presenta mayor porcentaje de similitud con S.c.Cta1p que con S.c.Ctt1p (83.9% contra 51.4%) [46 y Figura 4].



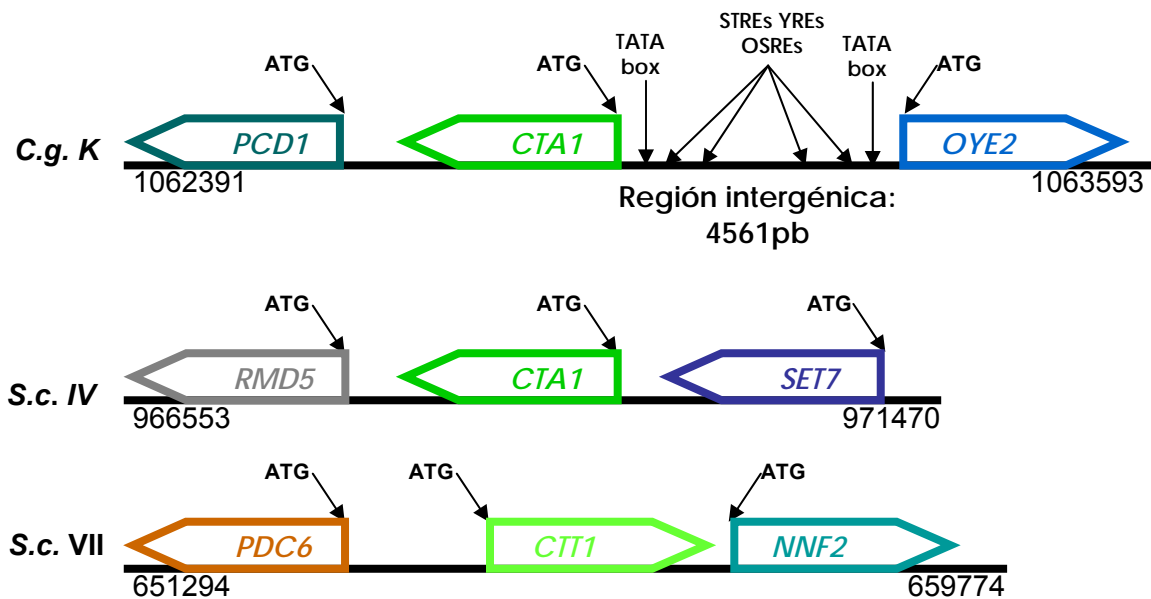
**Figura 4.** Alineamiento tipo ClustalW de secuencias de aminoácidos de las catalasas de *C. glabrata* y *S. cerevisiae*. Las secuencias de exportación a peroxisoma-mitocondria SKL, SKF y SSNSKF se indican con recuadros y subrayadas sobre secuencia [34, 48, 49].

Porcentajes de identidad/similitud entre CgCta1p y ScCta1p: 78.1/83.9; CgCta1p y ScCtt1p: 38.0/51.4; y ScCtt1p y ScCta1p: 35.4/47.6.

En el alineamiento de la figura 4, se pone en evidencia la conservación de dominios entre las catalasas comparadas, lo que habla de una misma función enzimática. Los motivos de las secuencias de importación SKL, SKF y SSNSKF no existen en la catalasa citosólica de *S. cerevisiae*, pero sí en la catalasa peroxisomal/mitocondrial. Sólo los motivos internos SKF (no terminales) se encuentran en la catalasa de *C. glabrata*.

A pesar de que los porcentajes de similitud entre las secuencias ortólogas de las catalasas son bastante altos, es de notarse la falta total de sintenia de

*C.g.CTA1* con los genes de catalasas de *S. cerevisiae*. La región intergénica donde se encuentra el promotor de *CTA1* entre *OYE2* y *CTA1* es particular en cuanto a su longitud de 4561pb, ya que la longitud promedio en *C. glabrata* de regiones intergénicas de secuencias codificantes es de 1000-1500pb. La secuencia 5' UTR de *CTA1* contiene varios motivos de reconocimiento por los factores de transcripción: al menos cuatro STREs para Msn2/4p, doce YREs para Yap1p y cinco OSRE para Skn7p putativos repartidos a lo largo de la región (Fig. 5).



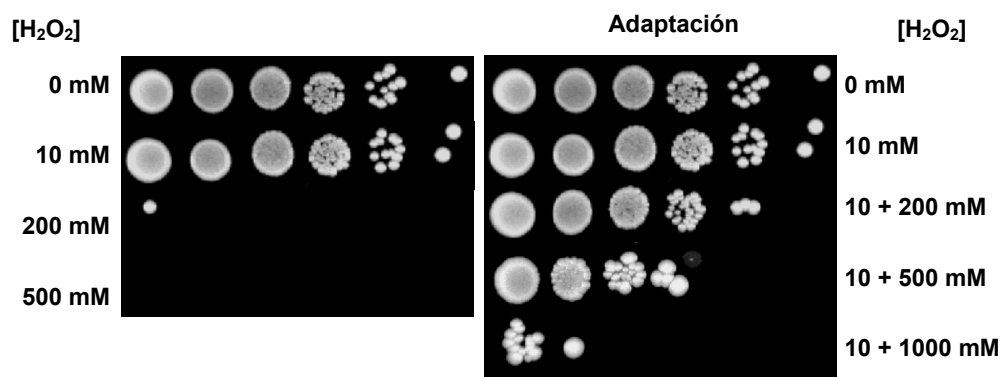
**Figura 5.** Esquema de orden en cromosoma del gen para la catalasa *C.g.CTA1* respecto a los genes para catalasas de *Saccharomyces cerevisiae* *CTA1* y *CTT1*. No hay sintenia entre *C.g.CTA1* y *S.c.CTA1* o *S.c.CTT1*. El análisis de la secuencia del promotor de gran tamaño revela algunas de las cajas de secuencias específicas de reconocimiento de factores de transcripción relacionados en respuesta a diferentes tipos de estrés [7, 19, 26, 53]. Los números debajo de las líneas son el número absoluto de pb en el cromosoma indicado. Se indican el inicio y sentido de la transcripción.

Genes no mencionados en el texto: *PCD1* (coenzima A difosfatasa), *OYE2* (NADPH oxidoreductasa), *RMD5* (proteína citosólica requerida para esporulación y ubiquitinación), *SET7* (proteína nuclear con dominio SET que media actividad metiltransferasa de otras proteínas), *PDC6* (piruvato descarboxilasa) y *NNF2* (proteína de función desconocida con participación en la segregación de cromosomas) [27, 38, 42, 57].

### ***Candida glabrata* presenta una alta resistencia a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>**

En este experimento las células se encuentran fase logarítmica. El número de generaciones se refiere a cuántas duplicaciones sucedieron desde la inoculación del cultivo con células en fase estacionaria (ver Material y Métodos). Para determinar la resistencia de *Candida glabrata* a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, expuse a células en crecimiento a varias concentraciones de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Las concentraciones se definieron de la siguiente manera: al observar un crecimiento de las células igual al control hasta la concentración de 10 mM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, esta concentración se fijó como la máxima no letal; y al observar crecimiento casi nulo desde 200 mM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, se fijó ésta como la concentración máxima letal (Fig. 6).

La adaptación de la cepa silvestre en las mismas condiciones se realizó con 10 mM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> por una hora, para posteriormente añadir concentraciones letales de 200, 500 y 1000 mM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. En el panel derecho de la figura 6 se observa el notable crecimiento comparado con el panel izquierdo en las concentraciones de 200 y 500 mM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> después de la adaptación. Incluso en la primera dilución de las células a las que se añadió una concentración de 1 M de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> después de la adaptación, hay algunas pocas células viables en crecimiento. La resistencia innata al estrés oxidante es considerable y aún más la mostrada por las células adaptadas.



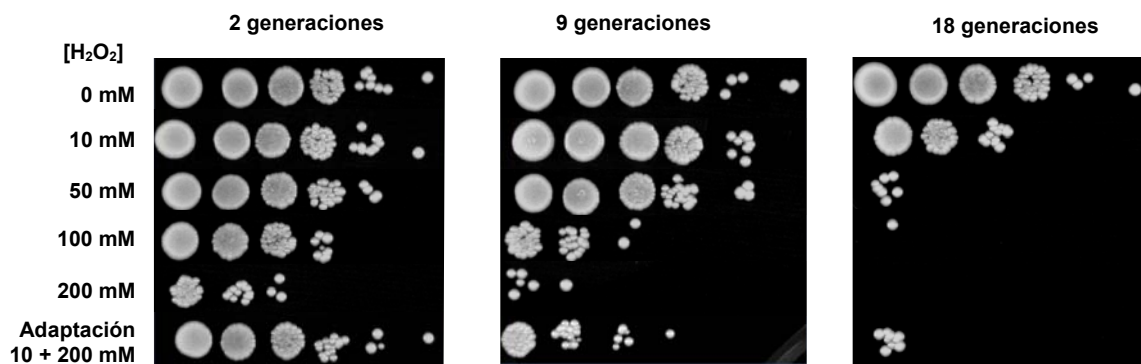
**Figura 6.** Resistencia y adaptación de *Candida glabrata* a estrés oxidante por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Células de cepa la silvestre en fase logarítmica cosechadas a 7 generaciones en OD<sub>600nm</sub> de 0.5. Se muestra el experimento de adaptación a la derecha

Cabe mencionar que esta resistencia es muy alta al comparar con la mostrada por *S. cerevisiae* durante experimentos realizados como control (Figura 19, anexos).

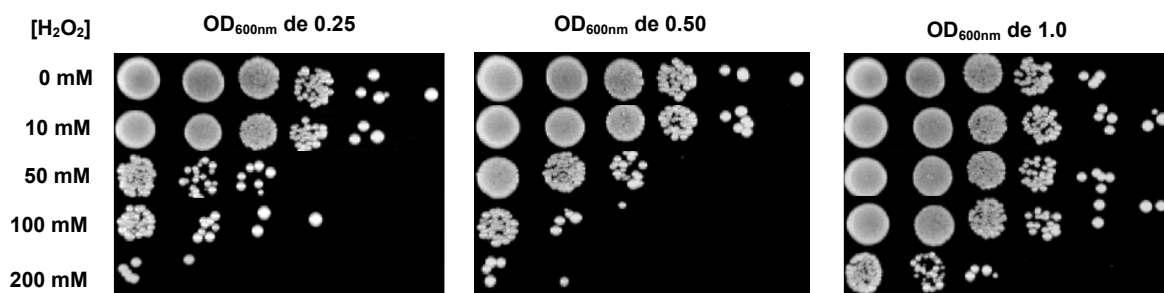
### La alta resistencia y adaptación a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> dependen del estado metabólico

Encontramos que la resistencia a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> depende del número de duplicaciones. Al igual que la adaptación, la resistencia disminuye a mayor dilución del cultivo en fase estacionaria (Fig. 7A). Al comparar las filas con la misma concentración de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, al llegar a 18 generaciones, se ve que cada vez hay menos células viables en las diluciones respecto a 2 ó 9 generaciones. Igualmente en el experimento de adaptación (último renglón figura 7A) se observa que la células viables disminuyen considerablemente en 18 generaciones, a pesar de ser células acondicionadas previamente al H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

A)



B)



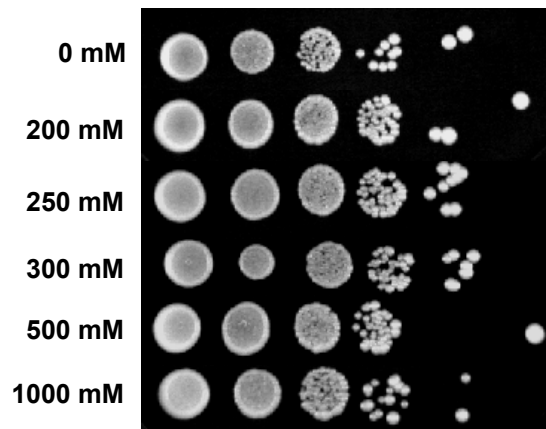
**Figura 7.** La resistencia y adaptación depende del estado metabólico. Panel A) a mayor factor de dilución a partir de fase estacionaria en OD<sub>600nm</sub> de 30, la resistencia disminuye, las células están en O.D.<sub>600nm</sub> de 0.5 pero con diferente número de generaciones. Panel B) células cosechadas en 8 generaciones en fase logarítmica con O.D.<sub>600nm</sub> de 0.25, 0.5, 1; O.D.<sub>600nm</sub>, y todas son diluidas a O.D.<sub>600nm</sub> de 0.25 para tener un comparativo con el mismo número de células.

También la resistencia al H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> es diferente según de la densidad óptica de las células. Los cultivos mostrados en la figura 7B tienen el mismo número de células con el mismo número de duplicaciones desde que salieron de fase estacionaria

para fines comparativos del experimento. Las densidades celulares al momento de la adición de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> son 0.25, 0.5 y 1.

Se puede ver que a la misma concentración de oxidante, el número de células viables aumenta al aumentar la densidad de células. Conforme con el experimento mostrado en la figura 6, puede resultar predecible que la resistencia disminuya entre más oxidante se añade al medio. Sin embargo, la resistencia de las células en fase logarítmica varía respecto a la proporción células/oxidante, así como del número de generaciones que han pasado desde que las células de fase estacionaria empiezan a duplicarse.

Al utilizar células en fase estacionaria llegamos a observar una resistencia al peróxido de hidrógeno sorprendentemente alta comparada con la de células en fase logarítmica, con crecimiento visible incluso en la concentración de 1 M de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Fig. 8).



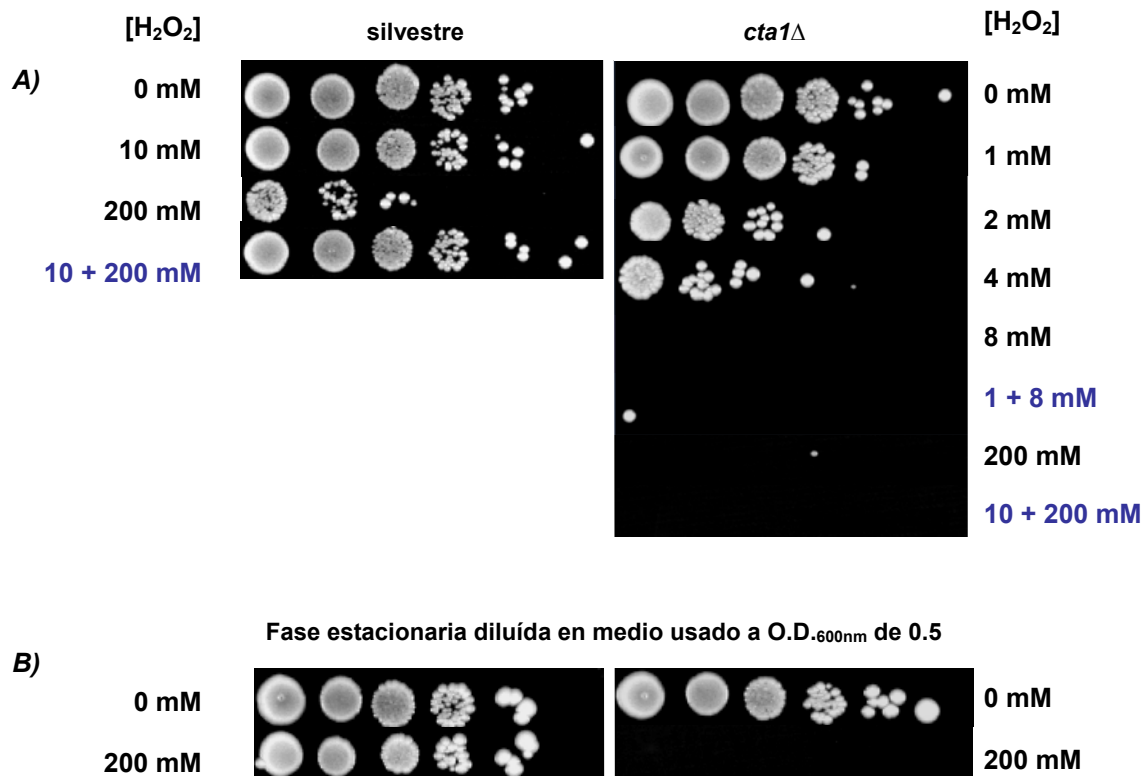
**Figura 8.** Células en fase estacionaria de la cepa silvestre de *C. glabrata* muestran resistencia muy alta hasta 1 M de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Células diluídas a O.D.<sub>600nm</sub> de 0.5

Durante la fase estacionaria las células adquieren una alta resistencia innata a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> que baja y se va perdiendo al entrar a fase logarítmica, como ya se mostró en la figura 7. Es conveniente recordar que propiamente las células en fase estacionaria en cultivo líquido se encuentran en O.D.<sub>600nm</sub> mayores a 15, pero son diluídas en su propio medio cuando se añade el peróxido de hidrógeno a 0.5 de densidad óptica, de manera que esta alta resistencia al oxidante observada

proviene del estado metabólico celular, y no de la cantidad de células en el cultivo y su proporción con la cantidad del oxidante.

### La única catalasa de *Candida glabrata* resulta esencial para la REO

Una vez determinada la resistencia de la cepa silvestre a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en fases logarítmica y estacionaria, probé la resistencia de la cepa *cta1*Δ en las mismas condiciones (Fig. 9). Al encontrar en esta cepa una gran sensibilidad a 10 mM del oxidante, probé concentraciones menores de 1 a 8 mM.



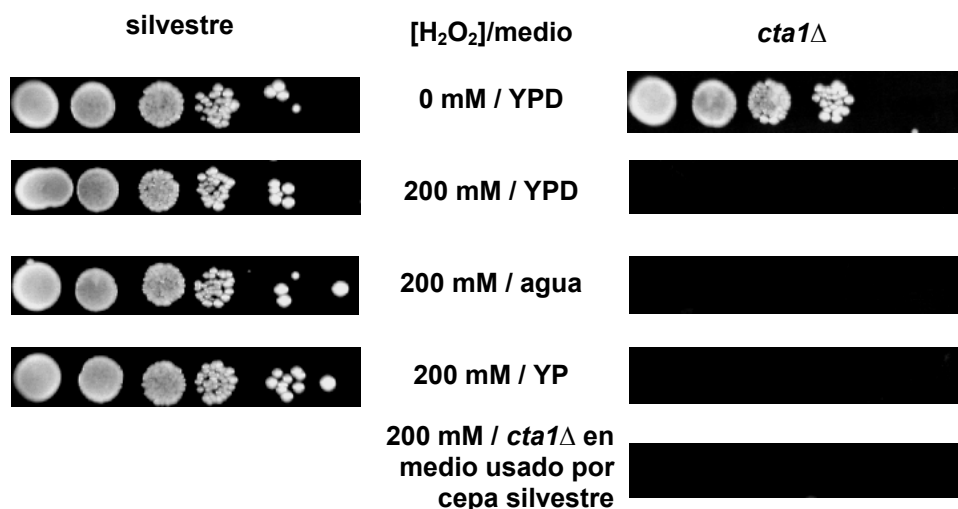
**Figura 9.** La resistencia y adaptación a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> depende totalmente de catalasa Cta1p, tanto en A) fase logarítmica, como en B) fase estacionaria. Los experimentos de adaptación son 1 + 8 mM y 10 + 200 mM y se muestran en azul. Células en fase logarítmica cosechadas a 4 generaciones en O.D.<sub>600nm</sub> de 0.5.

La adaptación en el caso de la cepa mutante de catalasa no se pudo lograr con el mismo método utilizado con la silvestre, agregando 8 mM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> como concentración mínima letal a células acondicionadas por una hora con 1 mM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> como concentración mínima no letal. Esto sugiere que la catalasa se requiere inclusive para la sobrevivencia y adaptación a mayores concentraciones

de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (condiciones de adaptación resaltadas en azul, figura 9A). Durante este mismo experimento se observó que durante fase estacionaria la alta resistencia a 200 mM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> mostrada por la cepa silvestre depende de la única catalasa (Fig. 9B).

### No hay factores en el medio que compensen la ausencia de Cta1p en fase estacionaria

Al encontrar que Cta1p es necesaria para la resistencia al estrés oxidante en *C. glabrata*, recurrimos a la cepa mutante *cta1Δ* para probar la existencia de otros factores importantes de la cepa silvestre en fase estacionaria como glutatión, presentes o no en el medio usado. Se tomaron células en fase estacionaria de las cepas silvestre y *cta1Δ* y se resuspendieron en YPD fresco, agua, YP sin fuente de carbono y medio usado de fase estacionaria de la cepa silvestre. Este experimento lo realizamos para comprobar si la falta de una fuente de carbono sería responsable de inducir genes para la resistencia durante fase estacionaria, y además para retirar cualquier tipo de molécula presente en el medio que pudiese generar mecanismos de resistencia. Los resultados mostraron que la alta resistencia depende de Cta1p y que el medio en que se resuspenden las células no suprime la falta de catalasa (Fig. 10).

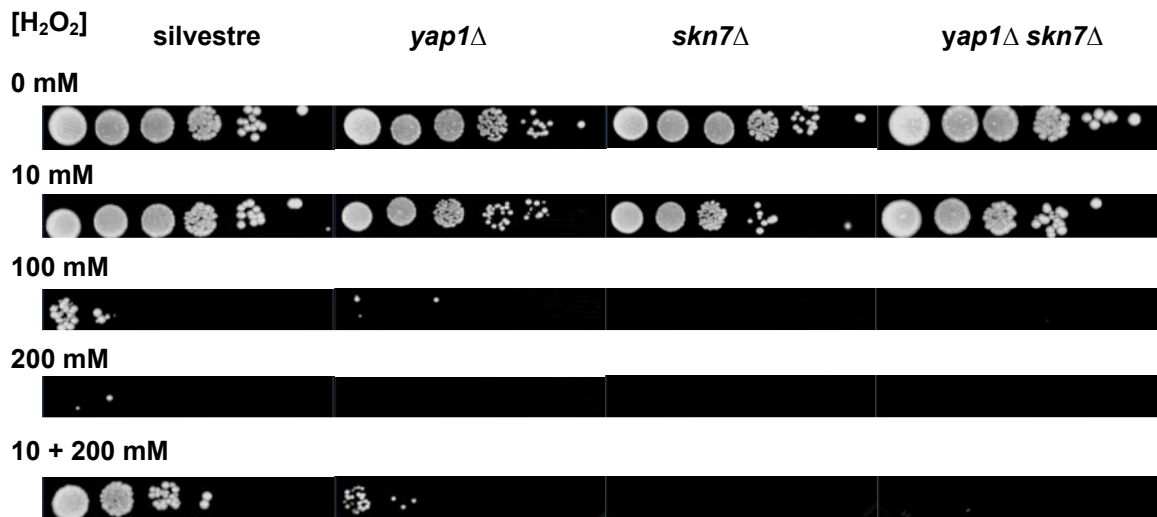


**Figura 10.** No hay moléculas en el medio usado en fase estacionaria que compensen la falta de Cta1p. Células en fase estacionaria diluidas a O.D.<sub>600nm</sub> de 0.5

En la figura 10 se puede ver que la sensibilidad de la cepa mutante es la misma en todos los medios probados, lo que sugiere que en el medio usado no hay señales extracelulares que compensen la falta de Cta1p a una concentración de 200 mM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

### **C.g.Yap1p y C.g.Skn7p son necesarios para la adaptación a especies reactivas de oxígeno**

Para el análisis de los factores de estrés Yap1p y Skn7p, utilicé las cepas silvestre, las mutantes *yap1Δ* y *skn7Δ*, y la doble *yap1Δ skn7Δ*. Las células de fase logarítmica de estas mutantes y de la cepa silvestre las expuse a los rangos de concentración de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ya determinados con la cepa silvestre. Por el crecimiento de las células mínimo o nulo en los experimentos de adaptación con las cepas mutantes en los factores Yap1p y Skn7p, observamos que estos factores son necesarios para la adaptación (Fig. 11).

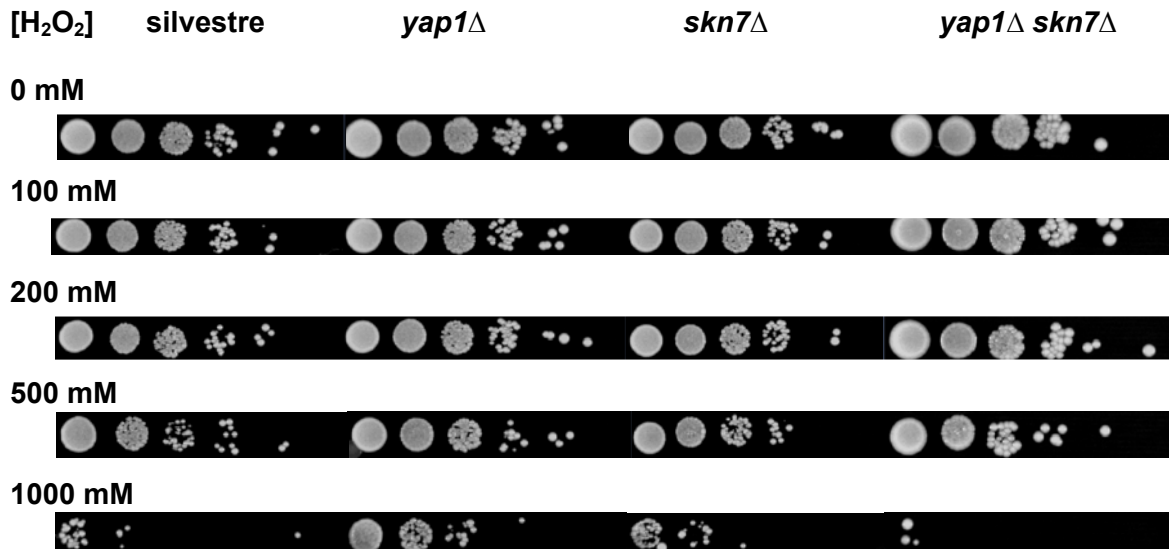


**Figura 11.** Los factores de transcripción Yap1p y Skn7p son necesarios durante la adaptación al estrés oxidante por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Células en fase logarítmica cosechadas en 7 generaciones en O.D.<sub>600nm</sub> de 0.5

Para las células en fase estacionaria, la resistencia mostrada durante los experimentos por todas las cepas fue muy similar, excepto en donde se añade



H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a una concentración de 500 mM, en la que Skn7p parece ser necesario para conservar esta resistencia (Fig. 12).



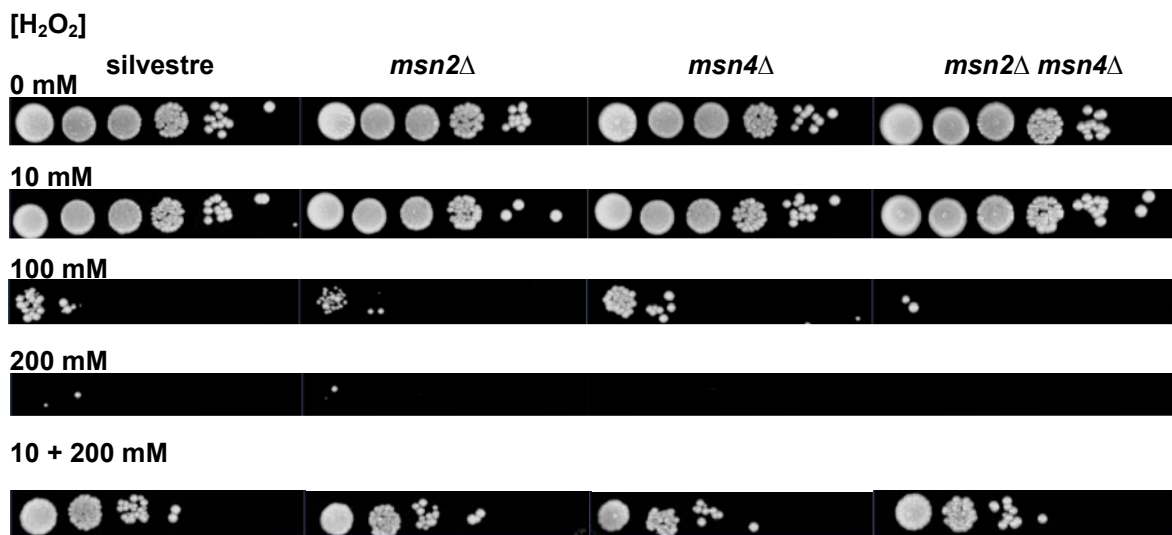
**Figura 12.** *SKN7* y *YAP1* no son necesarios en la fase estacionaria para mediar la resistencia a altas concentraciones de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Células en fase estacionaria diluídas a O.D.<sub>600nm</sub> de 0.5

Tanto en células de fase de crecimiento logarítmica como de fase estacionaria, la cepa *skn7*Δ presenta constantemente mayor sensibilidad que la cepa *yap1*Δ, siendo por tanto Skn7p es epistático sobre Yap1p.

### La función de Msn2p y Msn4p en *C. glabrata* depende del estado metabólico

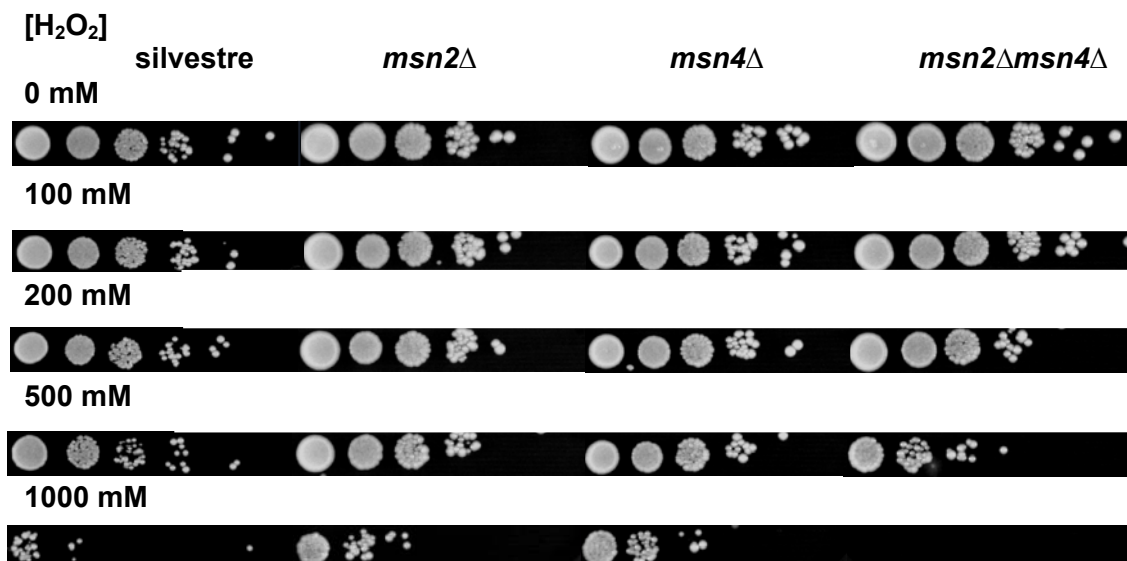
Las *msn2*Δ, *msn4*Δ y *msn2*Δ *msn4*Δ, se sometieron a las mismas condiciones en que anteriormente se utilizaron en las cepas *yap1*Δ, *skn7*Δ y *yap1*Δ *skn7*Δ, al mismo tiempo que a la cepa silvestre,

Las mutantes *msn2*Δ, *msn4*Δ y *msn2*Δ *msn4*Δ que se encuentran en la fase logarítmica del crecimiento muestran una sobrevivencia similar a la cepa silvestre en todos los tratamientos, excepto por una disminución del crecimiento en la doble mutante a la concentración de 100 mM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Esto indica que los factores de transcripción de estrés general Msn2p y Msn4p no son necesarios en estas condiciones para la resistencia o adaptación a estrés oxidante durante fase logarítmica (Fig. 13).



**Figura 13.** Los factores de transcripción de estrés general Msn2p y Msn4p no participan en la regulación de la resistencia a estrés por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> durante fase logarítmica. Células en fase logarítmica cosechadas en 7 generaciones en O.D.<sub>600nm</sub> de 0.5

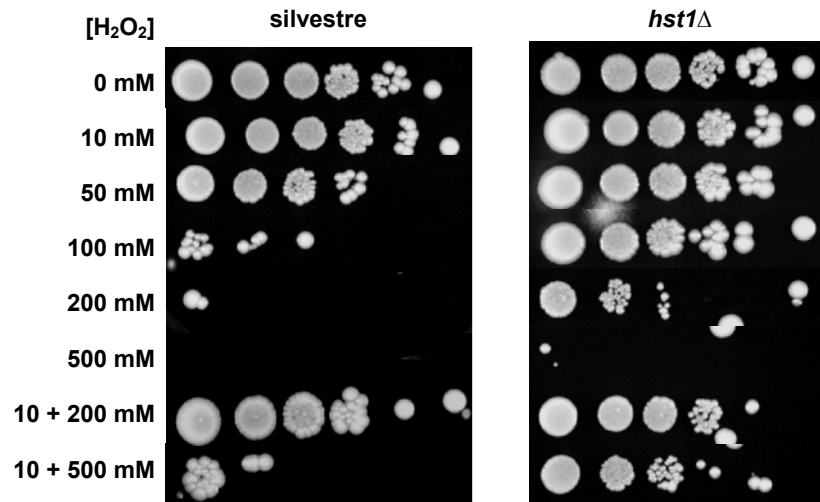
Sin embargo, el análisis en fase estacionaria de estas mutantes indica que en *C. glabrata* los factores Msn2p y Msn4p se requieren en esta condición metabólica de manera independiente, pero la resistencia baja al faltar ambos (Fig. 14).



**Figura 14.** *MSN2* y *MSN4* no son necesarios en la fase estacionaria para mediar la resistencia a altas concentraciones de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Células en fase estacionaria diluidas a O.D.<sub>600nm</sub> de 0.5

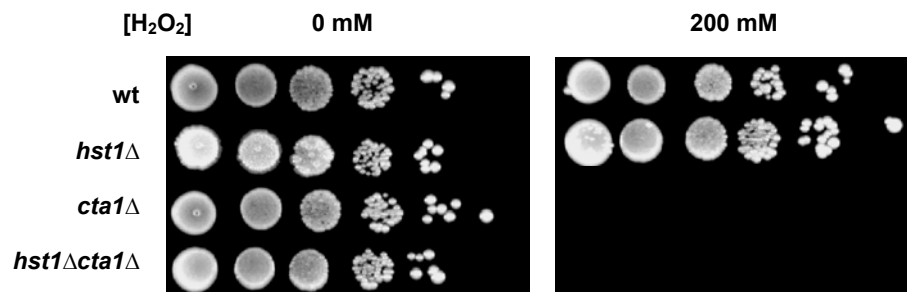
### Efecto de la desacetilasa Hst1p en la REO

También analicé la resistencia a estrés oxidante por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> de la cepa mutante en el gen *HST1*, que codifica para Hst1p. Al crecer la mutante *hst1*Δ hasta fase logarítmica y añadir H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, ésta mostró un ligero pero distinguible aumento en la resistencia a concentraciones tan altas como 200 mM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Igualmente, las células *hst1*Δ inducidas previamente con 10 mM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, mostraron una mayor resistencia en la adaptación, observando más crecimiento en la concentración de 500 mM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (renglones inferiores en figura 15).



**Figura 15.** La resistencia aumenta por factores regulados negativamente por Hst1p en fase logarítmica. Células en fase logarítmica cosechadas en 4 generaciones en O.D.<sub>600nm</sub> de 1.

Para comprobar si la falta de la desacetilasa de histonas dependiente de NAD<sup>+</sup> Hst1p regula negativamente genes de resistencia a estrés oxidante por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> capaces de sustituir la alta resistencia que confiere Cta1p, obtuve la doble mutante *hst1*Δ *cta1*Δ a partir de la mutante *hst1*Δ (Tabla 2, anexos). El análisis de la mutante *hst1*Δ *cta1*Δ mostró fenotipos semejantes a los fenotipos ya vistos en la mutante *cta1*Δ, tanto en células en fase logarítmica como en fase estacionaria (Fig. 16). Esto muestra que Hst1p no controla genes que compensen la falta de catalasa.

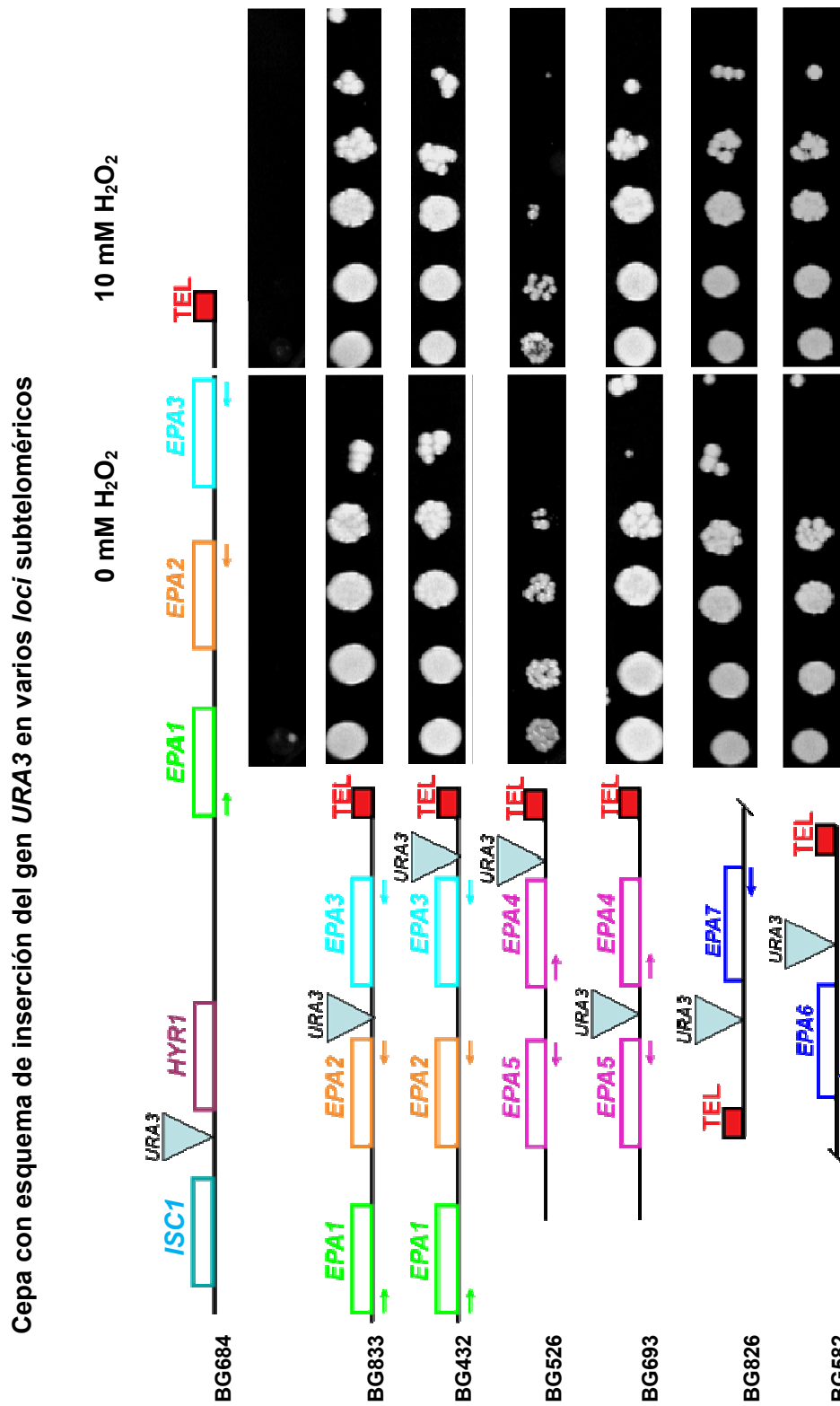


**Figura 16.** La falta de la catalasa no se compensa por genes regulados negativamente por Hst1p en fase estacionaria. Células en fase estacionaria diluídas a O.D.<sub>600nm</sub> de 1

### **Regulación epigenética de genes subteloméricos ante el estrés oxidante**

Por datos previos del laboratorio sabemos que el gen *EPA2* se encuentra en una región sujeta al silenciamiento subtelomérico, además de inducirse solamente en presencia de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> *in vitro* (De Las Peñas, sin publicar). Dado que la estructura de la cromatina desacetilada es represiva para la transcripción, realicé un experimento para demostrar si la respuesta al estrés oxidante relaja la cromatina en el *locus* de *EPA2* y otras regiones subteloméricas. Usé cepas que tienen una inserción del gen *URA3* en una en región subtelomérica. La inserción incluye un promotor constitutivo para el gen *URA3*, de manera que funciona como reportero del estado transcripcional de la cromatina al sembrar las cepas en medio CAA y 5-FOA (Material y métodos).

Utilicé siete cepas con inserciones del gen *URA3* en cuatro regiones subteloméricas diferentes (ver Tabla 2). El gen *URA3* en la cepa BG684 se expresa manera constitutiva, por lo que la cepa es sensible al 5-FOA; el resto de estas cepas con inserciones *URA3* son resistentes al 5-FOA. Añadí 10 mM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a los cultivos de estas cepas en YPD líquido y posteriormente plateé diluciones logarítmicas en YPD, CAA y 5-FOA. No se obtuvo expresión diferencial entre cada cepa y su correspondiente control sin oxidante, excepto por un ligero cambio en el crecimiento en las diluciones de la cepa BG526. Así que en las regiones subteloméricas probadas no se detectó cambio fenotípico que indique una diferencia en el estado de la cromatina, producto de la presencia de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a esta concentración (Fig. 17).



**Figura 17.** Bajas concentraciones de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> no alteran la estructura represiva de la cromatina. Células en fase logarítmica a O.D.<sub>600nm</sub> de 1 plateadas en medio 5-FOA

## IV. DISCUSIÓN

*Candida glabrata* es un hongo patógeno emergente, aislado con mayor frecuencia en casos de candidosis nosocomial por su capacidad de formación de biopelículas al interior de catéteres y la alta resistencia hacia azoles que le permite prevalecer en pacientes tratados contra especies fúngicas y provocar candidemias. A pesar de esta creciente importancia poco se sabe sobre sus factores de virulencia. Creemos que su capacidad de sobrevivir al estallido respiratorio de los macrófagos podría definirse posteriormente como un factor de virulencia importante. Este estudio pretende iniciar el entendimiento de los mecanismos que confieren a *C. glabrata* alta resistencia a especies reactivas de oxígeno (ERO), como el peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>).

Los datos obtenidos muestran como *C. glabrata* es capaz de mantener viable un porcentaje alto de células en fase logarítmica después de exponerse a altas concentraciones de peróxido de hidrógeno (~50 mM). Además las células logran adaptarse a concentraciones mayores a partir de una exposición 'preparatoria' o 'condicionante' de oxidante previa no letal (10 mM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) que estimula la expresión de genes diversos de la respuesta al estrés oxidante. Esto permite mantener viables a más células y sobrevivir a concentraciones mayores del oxidante (~500 mM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>).

Los resultados apuntan a una alta resistencia innata de *C. glabrata* al H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> incluso al compararlo con otras especies fúngicas, como la levadura también patógena *Candida albicans* o la levadura no patógena *Saccharomyces cerevisiae* a la que es muy cercana filogenéticamente [57]. Durante fase estacionaria es excepcional la resistencia de *C. glabrata* al H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, pudiendo llegar a crecer en presencia de 1 M de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

Datos adicionales del laboratorio sobre la resistencia a estrés oxidante de estas levaduras ubican a *C. glabrata* siempre con una resistencia superior durante fase logarítmica a una concentración de peróxido de hidrógeno de 50 mM contra 10 mM de *C. albicans* y 6 mM de *S. cerevisiae*. De manera similar, durante fase estacionaria *C. glabrata* es tres veces más resistente a este tipo de estrés que *C.*

*albicans* y diez veces más que *S. cerevisiae* (Datos del laboratorio, sin publicar). Claramente esto indica una ventaja como patógeno hacia una infección exitosa.

Los datos que presentamos susciben a que en *C. glabrata* los mecanismos de la resistencia al estrés oxidante por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> son regulados en parte por los factores de transcripción Yap1p, Skn7p, Msn2p y Msn4p. Estos factores tienen ortólogos bien estudiados en *S. cerevisiae* y parecen conservar sus funciones en *C. glabrata*. Los altos porcentajes de similitud en secuencia de aminoácidos entre ortólogos de estos dos organismos también indican la conservación de su función (Yap1p, 41.8%; Skn7p, 65%; Msn2p, 36.3%; y Msn4p, 32.2%).

En *C. glabrata*, a diferencia de *S. cerevisiae*, Msn2p y Msn4p parecen funcionar independientemente. Esta diferencia se puede explicar parcialmente al tomar en cuenta que la similitud entre ortólogos de Msn2p y Msn4p baja alrededor de 20% si no se considera el dominio de dedos de cinc en el alineamiento de secuencias. Ya que el dominio de dedo de cinc es común en los factores que se unen al ADN, esta manera de comparar las secuencias ortólogas de los factores Msn2p y Msn4p, da una mejor idea de lo conservada de su función.

Particularmente para el fenómeno de adaptación, los factores Yap1p y Skn7p, y en menor medida Msn2/4p, son importantes. La adaptación a altas concentraciones de especies reactivas de oxígeno es un mecanismo que se refiere a la inducción de genes de resistencia a estrés oxidante a partir del desbalance óxido-reducción de la célula. Así se incrementa la expresión de genes cuyos promotores son blancos de factores de transcripción de estrés general, como Msn2/4p; o específicos, como Yap1 y Skn7p.

Cuál o cuáles factores son los principales encargados de la transcripción depende del estado metabólico de las células.

Durante el crecimiento en fase logarítmica, las células mutantes *yap1Δ*, *skn7Δ* y *yap1Δ skn7Δ* incluso pierden la capacidad de adaptación a concentraciones mayores de oxidante después de inducir con concentraciones no letales; mientras que mutantes en Msn2p y/o Msn4p conservan esta facultad. En fase estacionaria observamos que Msn2p y Msn4p no son necesarios independientemente; pero si ambos no están presentes, la resistencia disminuye,



aunque escasamente. Yap1p y Skn7p no parecen tener efecto durante fase estacionaria más que al faltar ambos.

Datos posteriores a este trabajo, realizados por Marcela Briones, Mayra Cuéllar y Verónica Gallegos del mismo laboratorio, amplían en gran medida las conclusiones. Han encontrado que para la REO durante fase logarítmica Msn4p se requiere junto con Skn7p y Yap1p; y durante fase estacionaria se requieren Msn2p y Msn4p junto con Skn7p.

Sin embargo, la resistencia se pierde gradualmente entre más veces se duplican las células (Fig. 7). Este hallazgo muestra la importancia del paso por fase estacionaria, durante la cual la respuesta al estrés oxidante es máxima en *C. glabrata*. Proponemos que los elementos que elevan la resistencia al estrés oxidante por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al elevar o desreprimir su expresión durante la fase estacionaria, enzimáticos (como la catalasa u otras peroxidasas, dismutasas o reductasas) o no (como el glutatión o el engrosamiento de la pared celular), se ven reducidos al tiempo que la célula se prepara para entrar en división activa; diluyéndose con el pasar de las generaciones al crecer el número de células en un medio rico en nutrientes. Nuestro grupo de trabajo se interesa en encontrar la regulación de los genes que controlan la resistencia y adaptación al estrés oxidante durante los cambios de la fase estacionaria hacia la fase logarítmica y viceversa.

Una parte importante de la regulación de los genes de respuesta a estrés oxidante en *S. cerevisiae* es la exportina Crm1p, encargada de exportar del núcleo al factor Yap1p en condiciones normales. Cuando Yap1p se oxida al alterarse el balance redox por peróxido de hidrógeno u otra sustancia oxidante, Crm1p exportar a Yap1p, permitiendo a este último activar a sus genes objetivo con mayor frecuencia. Hallamos una secuencia con identidad del 87.8% con Crm1p de *S. cerevisiae* está presente en *C. glabrata*. Adicionalmente la secuencia de Yap1p de *C. glabrata* conserva el motivo de exportación nuclear y las cisteínas responsables del mecanismo que lo 'esconden' de Crm1p [12]. Por estos datos es factible que tanto Yap1p como Crm1p de *C. glabrata* conserven la función de sus ortólogos en *S. cerevisiae*.

Las catalasas son ubicuas entre los seres vivos por su eficiencia para desintoxicar H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y otros intermediarios reactivos oxidantes. Cta1p es la única catalasa de *C. glabrata*. En *S. cerevisiae* hay dos catalasas, Ctt1p citoplásmica y Cta1 peroxisomal cuya falta es compensada por glutatión [29]. En *C. albicans* solo hay una catalasa, pero este patógeno es varias veces más resistente que *S. cerevisiae* a ERO. Igualmente, *C. glabrata* tiene una sola catalasa que confiere una respuesta al estrés oxidante por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> mucho mayor que la de *C. albicans* o *S. cerevisiae* (Datos del laboratorio, sin publicar).

El fenotipo tan notorio de la cepa mutante en catalasa de *C. glabrata* (Fig. 9) sugiere que la disminución de resistencia a peróxido de hidrógeno es completamente dependiente de la catalasa. La catalasa es por tanto, una de las proteínas más importantes en *C. glabrata* para la REO por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

La elevada resistencia de *C. glabrata* nos hace considerar la localización celular y nivel de regulación de la expresión de esta proteína, ya que mostramos que es esencial en la resistencia al estrés oxidante causado por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

La efectividad de la catalasa Cta1p de *C. glabrata* es multifactorial. La localización celular de esta enzima parecería ser uno de estos factores. La catalasa de *C. glabrata* y la catalasa peroxisomal de *S. cerevisiae* (78.1% idénticas, 83% similares en secuencia de aminoácidos) comparten las dos secuencias internas de exportación a peroxisoma/mitocondria (Fig. 4). Sin embargo, se ha visto en *S. cerevisiae* que dependiendo de las condiciones, las secuencias internas son suficientes para la exportación si faltan las secuencias de exportación a peroxisoma y mitocondria terminales consideradas canónicas [34, 48]. Así que la falta de las secuencias en los extremos N- y C- terminales en la catalasa de *C. glabrata* habla de una probable regulación post-traducciona para su localización tanto en citoplasma como en peroxisoma y mitocondria.

Otro importante factor a considerar es la regulación transcripcional de la catalasa. La secuencia río arriba del gen *CTA1* de *C. glabrata* tiene muchos elementos de respuesta a estrés putativos, por lo que varios factores de transcripción de respuesta a estrés podrían ser los responsables de una expresión alta y constante de este gen (Fig. 5). Esta región podría compartir los elementos

de respuesta entre los genes divergentes *CTA1* y *OYE2*, pues igualmente el gen *OYE2* (que codifica para una NADPH oxidoreductasa) está involucrado en la REO [24]. Entonces la expresión de la catalasa en *C. glabrata* estaría controlada en buena medida por los factores Yap1p, Skn7p, Msn2p y Msn4p. La cantidad y variedad de estos elementos de respuesta en el promotor de la catalasa y una oxidoreductasa puede ser una primera explicación de la alta resistencia de este organismo.

Asimismo, la mutantes *cta1Δ* y *cta1Δ ura3Δ::URA3* (Tabla 2, anexos) no muestra fenotipos diferentes de crecimiento *in vitro* a 30° C y a 37° C, por lo que la catalasa es dispensable durante el metabolismo normal.

No obstante lo anterior y considerando la aparente amplia regulación transcripcional y post-traducciona, los fenotipos de virulencia *in vivo* de la mutante *cta1Δ* y de la cepa silvestre son estadísticamente iguales (Pan, S. J., laboratorio de Brendan Cormack, sin publicar) de manera que la catalasa no es un factor determinante en la sobrevivencia al ataque por ERO durante un proceso de infección *in vivo*. Por supuesto, otros factores de transcripción y/o enzimas de la REO podrían no expresarse *in vitro*, explicando la falta de fenotipo *in vivo*.

Separadamente determinamos que el estrés oxidante no afecta el silenciamiento subtelomérico en *C. glabrata*. La gran mayoría de genes para adhesinas están ubicados en regiones subteloméricas y no se expresan *in vitro*, aunque se pueden expresar de manera específica *in vivo* [10, 14]. Por datos del Dr. Alejandro De Las Peñas previos a este trabajo (sin publicar) sabemos que el gen *EPA2* de *C. glabrata* que codifica para una adhesina subtelomérica, se expresa *in vitro* al exponer a las células a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Esto es notable, pues de los genes para adhesinas de *C. glabrata* solo *EPA1* se expresa *in vitro* en la cepa silvestre. Células con inserción del gen *URA3* en regiones subteloméricas reportan el estado transcripcional de la cromatina. Al estar ubicado *EPA2* en una región sujeta a silenciamiento subtelomérico, esperábamos que la adición de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a estas células mostrara relajación de la cromatina, pero no fue así (Fig. 17). Seguramente la expresión del gen *EPA2* está regulada por otros factores que pudieran o no ser los mismos durante la respuesta *in vivo*.

Definitivamente la desacetilasa de histonas dependiente de NAD<sup>+</sup> Hst1p participa negativamente en la regulación de la respuesta al estrés oxidante en *Candida glabrata*. La respuesta al estrés oxidante por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> de la cepa mutante *hst1Δ* (Fig. 15) es mayor que la de la cepa silvestre. Encontramos con esta mutante que probablemente hay otros genes que no solamente pueden aumentar la resistencia innata de *C. glabrata* a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, sino también mejoran la adaptación a mayores concentraciones de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Aún así, a pesar de existir otros genes reprimidos por Hst1p que amplían la REO, la importancia de la catalasa se reafirma en la doble mutante *hst1Δ cta1Δ*, ya que al no estar presente, estos genes no son suficientes para recuperar el fenotipo de resistencia (Fig. 16).

## V. REFERENCIAS

1. Azevedo, D., Tacnet, F., Delaunay, A., Rodrigues-Pousada, C., Toledano, M. B., Two redox centers within Yap1 for H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and thiol-reactive chemicals signaling. *Free Radic Biol Med*, 2003. **35**(8): p. 889-900.
2. Bialkova, A. & Subik, J., Biology of the pathogenic yeast *Candida glabrata*. *Folia Microbiol (Praha)*, 2006. **51**(1): p. 3-20.
3. Brachmann, C. B., Sherman, J. M., Devine, S. E., Cameron, E. E., Pillus, L., Boeke, J. D., The *SIR2* gene family, conserved from bacteria to humans, functions in silencing, cell cycle progression, and chromosome stability. *Genes Dev*, 1995. **9**(23): p. 2888-902.
4. Brombacher, K., Fischer, B. B., Rufenacht, K., Eggen, R. I., The role of Yap1p and Skn7p-mediated oxidative stress response in the defence of *Saccharomyces cerevisiae* against singlet oxygen. *Yeast*, 2006. **23**(10): p. 741-50.
5. Brown, J. L., Bussey, H., Stewart, R. C., Yeast Skn7p functions in a eukaryotic two-component regulatory pathway. *Embo J*, 1994. **13**(21): p. 5186-94.
6. Brown, J. L., 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*, 1993. **175**(21): p. 6908-15.
7. Byrne, K. P. & Wolfe, K. H., The Yeast Gene Order Browser: combining curated homology and syntenic context reveals gene fate in polyploid species. *Genome Res*, 2005. **15**(10): p. 1456-61.
8. Calvin, N. M. & Hanawalt, P. C., High-efficiency transformation of bacterial cells by electroporation. *J Bacteriol*, 1988. **170**(6): p. 2796-801.
9. Castaño, I., Kaur, R., Pan, S., Cregg, R., Peñas Ade, L., Guo, N., Biery, M. C., Craig, N. L., Cormack, B. P., Tn7-based genome-wide random insertional mutagenesis of *Candida glabrata*. *Genome Res*, 2003. **13**(5): p. 905-15.
10. Castaño, I., Pan, S. J., Zupancic, M., Hennequin, C., Dujon, B., Cormack, B. P., Telomere length control and transcriptional regulation of subtelomeric adhesins in *Candida glabrata*. *Mol Microbiol*, 2005. **55**(4): p. 1246-58.
11. Cormack, B. P. & Falkow, S., Efficient homologous and illegitimate recombination in the opportunistic yeast pathogen *Candida glabrata*. *Genetics*, 1999. **151**(3): p. 979-87.
12. Chen, K. H., Miyazaki, T., Tsai, H. F., Bennett, J. E., The bZip transcription factor Cgap1p is involved in multidrug resistance and required for activation of multidrug transporter gene *CgFLR1* in *Candida glabrata*. *Gene*, 2007. **386**(1-2): p. 63-72.
13. De Las Peñas, A., Pan, S. J., Castaño, I., Alder, J., Cregg, R., Cormack, B. P., Virulence-related surface glycoproteins in the yeast pathogen *Candida glabrata* are encoded in subtelomeric clusters and subject to *RAP1*- and *SIR*-dependent transcriptional silencing. *Genes Dev*, 2003. **17**(18): p. 2245-58.
14. Domergue, R., Castaño, I., De Las Peñas, A., Zupancic, M., Lockett, V., Hebel, J. R., Johnson, D., Cormack, B. P., Nicotinic acid limitation regulates silencing of *Candida* adhesins during UTI. *Science*, 2005. **308**(5723): p. 866-70.
15. Fidel, P. L., Jr., Cutright, J. L., Tait, L., Sobel, J. D., A murine model of *Candida glabrata* vaginitis. *J Infect Dis*, 1996. **173**(2): p. 425-31.
16. Flattery-O'Brien, J. A. & Dawes, I. W., 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*, 1998. **273**(15): p. 8564-71.
17. Folch-Mallol, J. L., Garay-Arroyo, A., Lledias, F., Covarrubias Robles, A. A., [The stress response in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*]. *Rev Latinoam Microbiol*, 2004. **46**(1-2): p. 24-46.
18. Gasch, A. P., Spellman, P. T., Kao, C. M., Carmel-Harel, O., Eisen, M. B., Storz, G., Botstein, D., Brown, P. O., Genomic expression programs in the response of yeast cells to environmental changes. *Mol Biol Cell*, 2000. **11**(12): p. 4241-57.

19. Génolevures. *The Consortium Génolevures*, "Génolevures: Genomic Exploration of the Hemiascomycete Yeasts", *Génolevures 3* <http://cbi.labri.fr/Genolevures/> Agosto 2007
20. Gietz, D., St Jean, A., Woods, R. A.Schiestl, R. H., Improved method for high efficiency transformation of intact yeast cells. *Nucleic Acids Res*, 1992. **20**(6): p. 1425.
21. Grant, C. M., Perrone, G.Dawes, I. W., Glutathione and catalase provide overlapping defenses for protection against hydrogen peroxide in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochem Biophys Res Commun*, 1998. **253**(3): p. 893-8.
22. Gray, J. V., Petsko, G. A., Johnston, G. C., Ringe, D., Singer, R. A.Werner-Washburne, M., "Sleeping beauty": quiescence in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol Mol Biol Rev*, 2004. **68**(2): p. 187-206.
23. Gritz, L. & Davies, J., Plasmid-encoded hygromycin B resistance: the sequence of hygromycin B phosphotransferase gene and its expression in *Escherichia coli* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Gene*, 1983. **25**(2-3): p. 179-88.
24. Haarer, B. K. & Amberg, D. C., Old Yellow Enzyme Protects the Actin Cytoskeleton from Oxidative Stress. *Mol. Biol. Cell*, 2004. **15**(10): p. 4522-4531.
25. Hasan, R., Leroy, C., Isnard, A. D., Labarre, J., Boy-Marcotte, E.Toledano, M. B., The control of the yeast H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> response by the Msn2/4 transcription factors. *Mol Microbiol*, 2002. **45**(1): p. 233-41.
26. He, X. J. & Fassler, J. S., Identification of novel Yap1p and Skn7p binding sites involved in the oxidative stress response of *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Microbiol*, 2005. **58**(5): p. 1454-67.
27. Ikner, A. & Shiozaki, K., Yeast signaling pathways in the oxidative stress response. *Mutat Res*, 2005. **569**(1-2): p. 13-27.
28. Iraqui, I., Garcia-Sanchez, S., Aubert, S., Dromer, F., Ghigo, J. M., d'Enfert, C.Janbon, G., The Yak1p kinase controls expression of adhesins and biofilm formation in *Candida glabrata* in a Sir4p-dependent pathway. *Mol Microbiol*, 2005. **55**(4): p. 1259-71.
29. Izawa, S., Inoue, Y.Kimura, A., Importance of catalase in the adaptive response to hydrogen peroxide: analysis of acatalasaemic *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochem J*, 1996. **320** ( Pt 1): p. 61-7.
30. Jamieson, D. J., *Saccharomyces cerevisiae* has distinct adaptive responses to both hydrogen peroxide and menadione. *J Bacteriol*, 1992. **174**(20): p. 6678-81.
31. Kamran, M., Calcagno, A. M., Findon, H., Bignell, E., Jones, M. D., Warn, P., Hopkins, P., Denning, D. W., Butler, G., Rogers, T., Muhlschlegel, F. A.Haynes, K., Inactivation of transcription factor gene ACE2 in the fungal pathogen *Candida glabrata* results in hypervirulence. *Eukaryot Cell*, 2004. **3**(2): p. 546-52.
32. Kato, M., Ozeki, M., Kikuchi, A.Kambe, T., Phylogenetic relationship and mode of evolution of yeast DNA topoisomerase II gene in the pathogenic *Candida* species. *Gene*, 2001. **272**(1-2): p. 275-81.
33. Kaur, R., Ma, B.Cormack, B. P., A family of glycosylphosphatidylinositol-linked aspartyl proteases is required for virulence of *Candida glabrata*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2007. **104**(18): p. 7628-33.
34. Kragler, F., Langeder, A., Raupachova, J., Binder, M.Hartig, A., Two independent peroxisomal targeting signals in catalase A of *Saccharomyces cerevisiae*. *J Cell Biol*, 1993. **120**(3): p. 665-73.
35. Kuge, S., Arita, M., Murayama, A., Maeta, K., Izawa, S., Inoue, Y.Nomoto, A., Regulation of the yeast Yap1p nuclear export signal is mediated by redox signal-induced reversible disulfide bond formation. *Mol Cell Biol*, 2001. **21**(18): p. 6139-50.
36. Kuge, S., Toda, T., Iizuka, N.Nomoto, A., Crm1 (Xpol) dependent nuclear export of the budding yeast transcription factor yAP-1 is sensitive to oxidative stress. *Genes Cells*, 1998. **3**(8): p. 521-32.
37. Lara-Ortiz, T., Riveros-Rosas, H.Aguirre, J., Reactive oxygen species generated by microbial NADPH oxidase NoxA regulate sexual development in *Aspergillus nidulans*. *Mol Microbiol*, 2003. **50**(4): p. 1241-55.
38. Lee, J., Godon, C., Lagniel, G., Spector, D., Garin, J., Labarre, J.Toledano, M. B., Yap1 and Skn7 control two specialized oxidative stress response regulons in yeast. *J Biol Chem*, 1999. **274**(23): p. 16040-6.

39. Li, L., Redding, S., Dongari-Bagtzoglou, A., *Candida glabrata*: an emerging oral opportunistic pathogen. *J Dent Res*, 2007. **86**(3): p. 204-15.
40. Lopilato, J., Bortner, S., Beckwith, J., Mutations in a new chromosomal gene of *Escherichia coli* K-12, *pcnB*, reduce plasmid copy number of pBR322 and its derivatives. *Mol Gen Genet*, 1986. **205**(2): p. 285-90.
41. Marchler-Bauer, A., Anderson, J. B., Cherukuri, P. F., DeWeese-Scott, C., Geer, L. Y., Gwadz, M., He, S., Hurwitz, D. I., Jackson, J. D., Ke, Z., Lanczycki, C. J., Liebert, C. A., Liu, C., Lu, F., Marchler, G. H., Mullokandov, M., Shoemaker, B. A., Simonyan, V., Song, J. S., Thiessen, P. A., Yamashita, R. A., Yin, J. J., Zhang, D., Bryant, S. H., CDD: a Conserved Domain Database for protein classification. *Nucleic Acids Res*, 2005. **33**(Database issue): p. D192-6.
42. Martinez-Pastor, M. T., Marchler, G., Schuller, C., Marchler-Bauer, A., Ruis, H., Estruch, F., The *Saccharomyces cerevisiae* zinc finger proteins Msn2p and Msn4p are required for transcriptional induction through the stress response element (STRE). *Embo J*, 1996. **15**(9): p. 2227-35.
43. Missall, T. A., Lodge, J. K., McEwen, J. E., Mechanisms of resistance to oxidative and nitrosative stress: implications for fungal survival in mammalian hosts. *Eukaryot Cell*, 2004. **3**(4): p. 835-46.
44. Morgan, B. A., Banks, G. R., Toone, W. M., Raitt, D., Kuge, S., Johnston, L. H., The Skn7 response regulator controls gene expression in the oxidative stress response of the budding yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Embo J*, 1997. **16**(5): p. 1035-44.
45. Moye-Rowley, W. S., Harshman, K. D., Parker, C. S., Yeast YAP1 encodes a novel form of the jun family of transcriptional activator proteins. *Genes Dev*, 1989. **3**(3): p. 283-92.
46. Nakagawa, Y. & Mizuguchi, I., The nucleotide sequence determination of catalases of three medically important yeasts using newly designed degenerated primers. *Nippon Ishinkin Gakkai Zasshi*, 2005. **46**(1): p. 35-42.
47. Nathan, C. & Shiloh, M. U., Reactive oxygen and nitrogen intermediates in the relationship between mammalian hosts and microbial pathogens. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2000. **97**(16): p. 8841-8.
48. Petrova, V. Y., Drescher, D., Kujumdzieva, A. V., Schmitt, M. J., Dual targeting of yeast catalase A to peroxisomes and mitochondria. *Biochem J*, 2004. **380**(Pt 2): p. 393-400.
49. Purdue, P. E. & Lazarow, P. B., Peroxisome biogenesis. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 2001. **17**: p. 701-52.
50. Raitt, D. C., Johnson, A. L., Erkine, A. M., Makino, K., Morgan, B., Gross, D. S., Johnston, L. H., The Skn7 response regulator of *Saccharomyces cerevisiae* interacts with Hsf1 in vivo and is required for the induction of heat shock genes by oxidative stress. *Mol Biol Cell*, 2000. **11**(7): p. 2335-47.
51. Richardson, M. D., Changing patterns and trends in systemic fungal infections. *J Antimicrob Chemother*, 2005. **56 Suppl 1**: p. i5-i11.
52. Rivera-Sanchez, R., Flores-Paz, R., Arriaga-Alba, M., [Identification of *Candida* species causing vaginitis in Mexican patients]. *Enferm Infecc Microbiol Clin*, 2006. **24**(10): p. 634-6.
53. Rodrigues-Pousada, C. A., Nevitt, T., Menezes, R., Azevedo, D., Pereira, J., Amaral, C., Yeast activator proteins and stress response: an overview. *FEBS Lett*, 2004. **567**(1): p. 80-5.
54. Rothstein, R. J., One-step gene disruption in yeast. *Methods Enzymol*, 1983. **101**: p. 202-11.
55. Rusche, L. N. & Rine, J., Conversion of a gene-specific repressor to a regional silencer. *Genes Dev*, 2001. **15**(8): p. 955-67.
56. Scandalios, J. G., Oxidative stress: molecular perception and transduction of signals triggering antioxidant gene defenses. *Braz J Med Biol Res*, 2005. **38**(7): p. 995-1014.
57. SGD project. "Saccharomyces Genome Database" <http://www.yeastgenome.org/> Agosto 2007
58. Sherman, F., Fink, G. R., Hicks, J. B., Methods in yeast genetics. 1986 ed. 1986, Cold Spring Harbor, N.Y.: Cold Spring Harbor Laboratory.
59. Sherman, J. M., Stone, E. M., Freeman-Cook, L. L., Brachmann, C. B., Boeke, J. D., Pillus, L., The conserved core of a human SIR2 homologue functions in yeast silencing. *Mol Biol Cell*, 1999. **10**(9): p. 3045-59.
60. Stock, A. M., Robinson, V. L., Goudreau, P. N., Two-component signal transduction. *Annu Rev Biochem*, 2000. **69**: p. 183-215.

61. Stone, J. R. & Yang, S., Hydrogen peroxide: a signaling messenger. *Antioxid Redox Signal*, 2006. **8**(3-4): p. 243-70.
62. Temple, M. D., Perrone, G. G. Dawes, I. W., Complex cellular responses to reactive oxygen species. *Trends Cell Biol*, 2005. **15**(6): p. 319-26.
63. Thorpe, G. W., Fong, C. S., Alic, N., Higgins, V. J. Dawes, I. W., Cells have distinct mechanisms to maintain protection against different reactive oxygen species: oxidative-stress-response genes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2004. **101**(17): p. 6564-9.
64. Tsuzi, D., Maeta, K., Takatsume, Y., Izawa, S. Inoue, Y., Regulation of the yeast phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase GPX2 by oxidative stress is mediated by Yap1 and Skn7. *FEBS Lett*, 2004. **565**(1-3): p. 148-54.
65. Yan, C., Lee, L. H. Davis, L. I., Crm1p mediates regulated nuclear export of a yeast AP-1-like transcription factor. *Embo J*, 1998. **17**(24): p. 7416-29.
66. Yanisch-Perron, C., Vieira, J. Messing, J., Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of the M13mp18 and pUC19 vectors. *Gene*, 1985. **33**(1): p. 103-19.



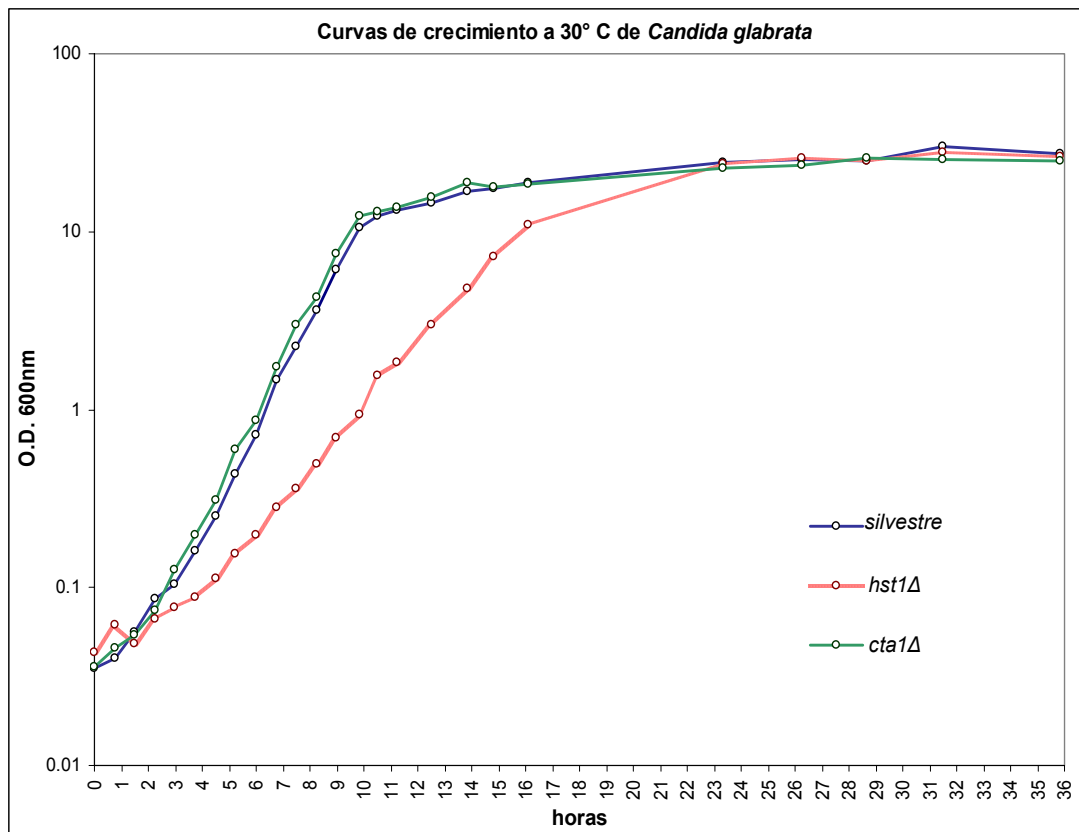
## VI. ANEXOS

### 1. Cuadros.

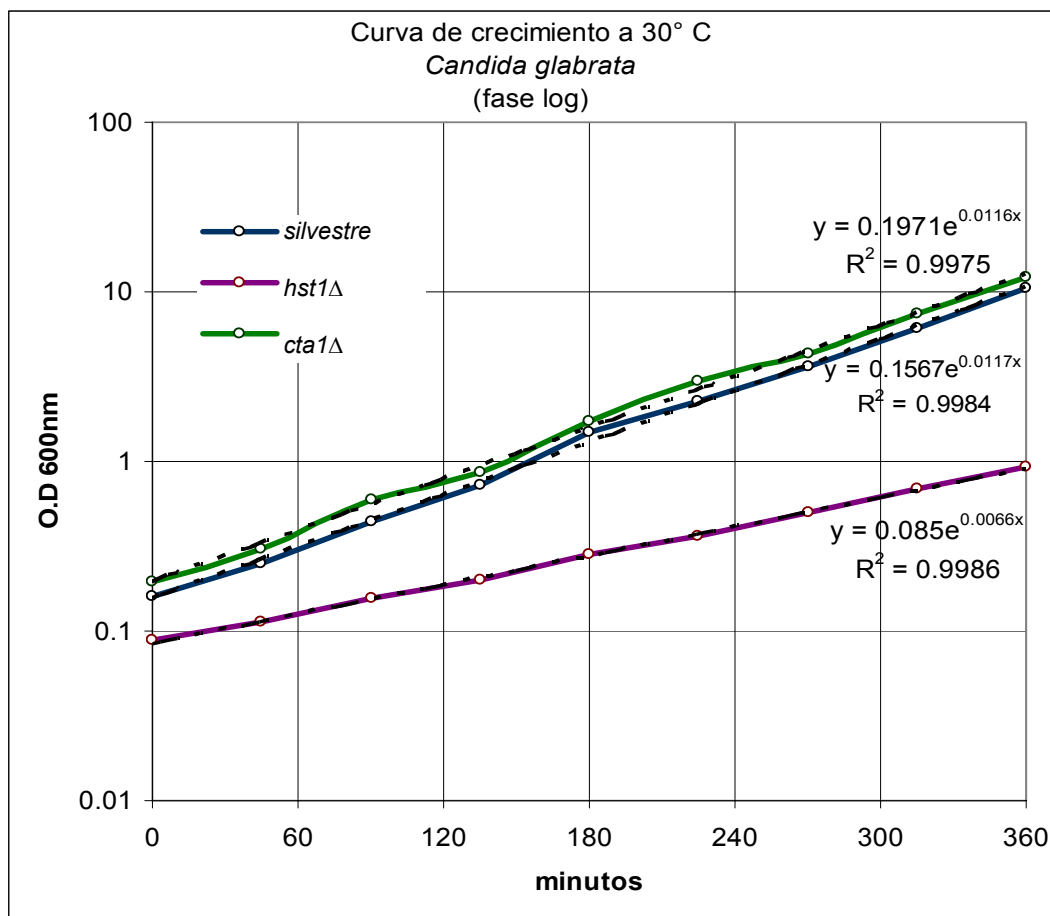
**Cuadro 1.** Determinación de OD<sub>600nm</sub> para obtener células con un número determinado de duplicaciones. La fórmula indica la OD<sub>600nm</sub> ( $C_0$ ) a la que se diluyen las células de un cultivo en fase estacionaria para obtener células en fase logarítmica a una OD<sub>600nm</sub> determinada con número  $n$  de duplicaciones ( $C_f$ ).

$$C_0 = \frac{C_f}{2^n}$$

### 2. Gráficas de curvas de crecimiento



**Gráfica 1.** Curva de crecimiento de cepas de *C. glabrata*: silvestre, *cta1Δ* y *hst1Δ*. La cepa *cta1Δ* no presenta un fenotipo diferente a la silvestre durante el crecimiento en medio rico YPD. La cepa *hst1Δ* tiene un crecimiento más lento.



**Gráfica 2.** Fase log de las curvas de crecimiento de cepas de *C. glabrata*: *silvestre*, *cta1Δ* y *hst1Δ*. Con las ecuaciones de las rectas de cada cepa, se calcularon los tiempos de duplicación de cada cepa; ***silvestre*: 59.2'**, ***cta1Δ*: 59.8'** y ***hst1Δ*: 105'**.

### 3. Tablas

**Tabla 2.** Cepas usadas en este trabajo

Cepas de <i>E. coli</i>	Genotipo	Referencia
DH10B	$F^- mcrA \Delta(mrr-hsdRMS-mcrBC) \phi 80dlacZ\Delta M15 \Delta lacX74 deoR recA1 endA1 araD139 \Delta(ara, leu)7697 galU galK \lambda^- rpsL nupG$	[8]
DH10 <i>pcnB</i>	DH10B <i>pcnB</i> . Cepa para clonar productos con efectos aberrantes cuando están presentes en alto número de copias.	[40]
JM109	$recA1 endA1 gyrA96 thi hsdR17 (r_K^-, m_K^+) relA1 supE44 \Delta(lac-proAB), [F' traD36 proAB] lacI^q \Delta(lacZ)M15$	[66]
Transposón	Genotipo	Referencia
Tn7	Tn7 R6Kγ ori <i>URA3 npt</i> (Km <sup>R</sup> )	[9]
Tn903	Tn903 <i>npt</i> (Neo <sup>R</sup> G418 <sup>R</sup> )	[11]

<b>Cepa de <i>Saccharomyces cerevisiae</i></b>			
<b>Cepa</b>	<b>Parental</b>	<b>Genotipo</b>	<b>Referencia</b>
L41	W303	(W303) <i>MATa</i> , <i>ura3-1</i> , <i>leu2-3,112</i> <i>his3-11,15</i> <i>trp1 ade2-1 ade3::hisG</i>	[54]
<b>Cepas de <i>Candida glabrata</i></b>			
<b>Cepa</b>	<b>Parental</b>	<b>Genotipo</b>	<b>Referencia</b>
BG2	- - -	Aislado clínico (cepa B)	[15]
BG14	BG2	<i>ura3Δ::Tn903</i> G418 <sup>R</sup> <i>Ura</i> <sup>-</sup> Hyg <sup>S</sup>	[11]
CGM57	BG14	<i>ura3Δ::Tn903</i> G418 <sup>R</sup> <i>sir3Δ</i> 3' UTR de <i>EPA7::Tn7</i> <i>Ura</i> <sup>+</sup>	Colección del laboratorio
CGM76 <i>hst1Δ</i>	BG14	<i>ura3Δ::Tn903</i> G418 <sup>R</sup> <i>hst1Δ::hph</i> Hyg <sup>R</sup> <i>Ura</i> <sup>-</sup>	Colección del laboratorio
CGM84	BG14	<i>ura3Δ::Tn903</i> G418 <sup>R</sup> <i>hst1Δ</i> Hyg <sup>S</sup>	Colección del laboratorio
CGM102	BG14	<i>ura3Δ::Tn903</i> G418 <sup>R</sup> <i>rif1Δ (epa1-7)Δ</i> <i>Ura</i> <sup>-</sup>	Colección del laboratorio
CGM104	CGM102	<i>ura3Δ::Tn903</i> G418 <sup>R</sup> ( <i>epa1-7)Δ RIF1</i> <sup>+</sup> restaurado <i>Ura</i> <sup>-</sup>	Colección del laboratorio
BG582	BG14	<i>ura3Δ::Tn903</i> G418 <sup>R</sup> <i>EPA6::Tn7</i> Inserción a 98pb río arriba del TAA <i>Ura</i> <sup>+</sup>	Colección del laboratorio
BG826	BG14	<i>ura3Δ::Tn903</i> G418 <sup>R</sup> <i>EPA7::Tn7</i> Inserción a 268pb río abajo de TAA <i>Ura</i> <sup>+</sup>	Colección del laboratorio
BG462	BG14	<i>ura3Δ::URA3</i> pBC34.1/ <i>Pst</i> I, <i>Ura</i> <sup>+</sup> G418 <sup>S</sup>	[13]
BG684	BG14	<i>ura3Δ::Tn903</i> G418 <sup>R</sup> Tn7 en la región intergénica entre <i>ISC1</i> y <i>HYR1</i>	[13]
BG833	BG14	<i>ura3Δ::Tn903</i> G418 <sup>R</sup> Tn7 en la región intergénica entre <i>EPA2</i> y <i>EPA3</i>	[13]
BG432	BG14	<i>ura3Δ::Tn903</i> G418 <sup>R</sup> Tn7 en la región intergénica entre <i>EPA3</i> y el telómero	[13]
BG693	BG14	<i>ura3Δ::Tn903</i> G418 <sup>R</sup> Tn7 en región intergénica única entre <i>EPA5</i> y <i>EPA4</i>	[13]
BG526	BG14	<i>ura3Δ::Tn903</i> G418 <sup>R</sup> Tn7 en la región intergénica entre <i>EPA4</i> y el telómero	[13]
BG440	BG14	<i>ura3Δ::Tn903</i> G418 <sup>R</sup> <i>epa2Δ</i>	Laboratorio Cormack
BG1739 <i>mns2Δ</i>	BG14	<i>ura3Δ::Tn903</i> G418 <sup>R</sup> <i>mns2Δ::hph</i> Hyg <sup>R</sup> <i>Ura</i> <sup>-</sup> pRD96/ <i>Bcg</i> I	Laboratorio Cormack
BG1740 <i>mns4Δ</i>	BG14	<i>ura3Δ::Tn903</i> G418 <sup>R</sup> <i>mns4Δ::hph</i> Hyg <sup>R</sup> <i>Ura</i> <sup>-</sup> pRD97/ <i>Bcg</i> I	Laboratorio Cormack
BG1742 <i>mns2Δ mns4Δ</i>		<i>ura3Δ::Tn903</i> G418 <sup>R</sup> <i>mns2Δ mns4Δ::hph</i> Hyg <sup>R</sup> <i>Ura</i> <sup>-</sup>	Laboratorio Cormack

CGM295 y CGM296 <b>cta1Δ</b>	BG14	<i>ura3Δ::Tn903 G418<sup>R</sup> cta1Δ::hph Hyg<sup>R</sup></i> pCV15/Bsg I	Este trabajo
CGM297 y CGM305 <b>yap1Δ</b>	BG14	<i>ura3Δ::Tn903 G418<sup>R</sup> yap1Δ::hph Hyg<sup>R</sup></i> pCV17/Bsg I	Este trabajo
CGM306 y CGM307 <b>skn7Δ</b>	BG14	<i>ura3Δ::Tn903 G418<sup>R</sup> skn7Δ::hph Hyg<sup>R</sup></i> pCV21/Bsg I	Este trabajo
CGM308 y CGM309	CGM297	<i>ura3Δ::Tn903 G418<sup>R</sup> yap1Δ Hyg<sup>S</sup> Ura<sup>-</sup></i>	Este trabajo
CGM310 y CGM311 <b>yap1Δ skn7Δ</b>	CGM308	<i>ura3Δ::Tn903 G418<sup>R</sup> yap1Δ skn7Δ::hph Hyg<sup>R</sup></i> pCV21/Bsg I	Este trabajo
CGM323 y CGM324 <b>hst1Δ cta1Δ</b>	CGM84	<i>ura3Δ::Tn903 G418<sup>R</sup> hst1Δ cta1Δ::hph Hyg<sup>R</sup></i> pCV15/Bsg I	Este trabajo
CGM351 y CGM352	CGM295	<i>cta1Δ::hph Hyg<sup>R</sup> ura3Δ::URA3 pBC34.1/Pst I,</i> Ura <sup>+</sup> G418 <sup>S</sup>	Este trabajo
CGM353 y CGM354	CGM297	<i>ura3Δ::Tn903 G418<sup>R</sup> yap1Δ Hyg<sup>S</sup> Ura<sup>-</sup></i>	Este trabajo
CGM355 y CGM356	CGM306	<i>ura3Δ::Tn903 G418<sup>R</sup> skn7Δ Hyg<sup>S</sup> Ura<sup>-</sup></i>	Este trabajo
CGM357 y CGM358	CGM310	<i>ura3Δ::Tn903 G418<sup>R</sup> yap1Δ skn7Δ Hyg<sup>S</sup> Ura<sup>-</sup></i>	Este trabajo

**Tabla 3.** Plásmidos usados en este trabajo

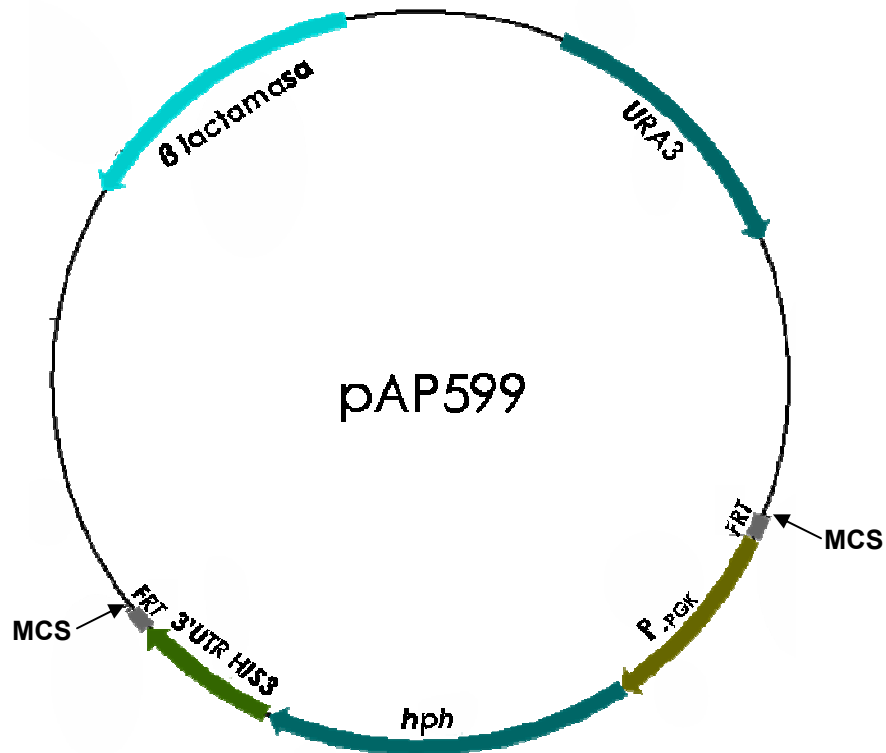
Plásmido	Genotipo relevante	Referencia
<b>Vectores de clonación</b>		
pGEM <sup>®</sup> -T	Vector de clonación. Amp <sup>R</sup>	Promega # cat: A3600
pAP599	Vector de clonación con 2 secuencias repetidas directas <i>FRT</i> para quitar el marcador de selección, flanqueando <i>P<sub>PGKI</sub>::hph::3'UTR<sub>HIS3</sub></i> (casete de higromicina) para la construcción mutantes múltiples. <i>URA3 Hyg<sup>R</sup> Amp<sup>R</sup></i>	[14]
<b>Vectores</b>		
pBC34.1	Vector no replicativo. Un fragmento de 2.2 Kpb con el gen <i>C.g.URA3</i> , flanqueado por sitios <i>Pst I</i> . Amp <sup>R</sup>	[11]
pGRB2.0	Vector de clonación, replicativo <i>C.g. CEN ARS URA3</i> Amp <sup>R</sup>	[13]
pMZ21	Vector no replicativo que expresa <i>S.c.FLP1</i> (recombinasa Flp1p) <i>P<sub>PGKI</sub>::FLP1::3'UTR<sub>HIS3</sub>. URA3</i> Amp <sup>R</sup>	Laboratorio Cormack
<b>Plásmidos para supresión/inserción</b>		<b>Referencia</b>

pAP628 <i>hst1Δ</i>	Vector para supresión de <i>HST1</i> Producto de PCR <i>Kpn I/Xho I</i> (Oligos #2274/#2275) con la región promotora de <i>HST1</i> y un producto de PCR <i>BamH I/Sac I</i> (Oligos #2277/#2276) con la región 3'UTR de <i>HST1</i> clonados en pAP599 Amp <sup>R</sup>	[14]
pCV1	Producto de PCR (Oligos #1/#2) de 0.929 Kpb de la región 3' UTR de <i>SKN7</i> clonado en pGEM-T. Amp <sup>R</sup>	Este trabajo
pCV3	Producto de PCR (Oligos #3/#4) de 0.875 Kpb de la región promotora de <i>SKN7</i> clonado en pGEM-T. Amp <sup>R</sup>	Este trabajo
pCV4	Producto de PCR (Oligos #7/#8) de 0.846 Kpb de la región promotora de <i>YAP1</i> clonado en pGEM-T. Amp <sup>R</sup>	Este trabajo
pCV6	Producto de PCR (Oligos #11/#12) de 0.652 Kpb de la región 3' UTR de <i>YAP1</i> clonado en pGEM-T. Amp <sup>R</sup>	Este trabajo
pCV8	Producto de PCR (Oligos #60/#61) de 0.682 Kpb de la región 3' UTR de <i>CTA1</i> clonado en pGEM-T. Amp <sup>R</sup>	Este trabajo
pCV10	Producto de PCR (Oligos #57/#58) de 0.906 Kpb de la región promotora de <i>CTA1</i> clonado en pGEM-T. Amp <sup>R</sup>	Este trabajo
pCV12	Un fragmento <i>Hind III/Xho I</i> de 0.846 Kpb de pCV4 clonado en pAP599 digerido con <i>Hind III/Xho I</i> .	Este trabajo
pCV14	Un fragmento <i>Hind III/Kpn I</i> de 0.682 Kpb de pCV8 clonado en pAP599 digerido con <i>Hind III/Kpn I</i> .	Este trabajo
pCV15 <i>cta1Δ</i>	Vector para supresión de <i>CTA1</i> Un fragmento <i>BamH I/Sac I</i> de 0.944 Kpb de pCV10 clonado en pCV14 digerido con <i>BamH I/Sac I</i> .	Este trabajo
pCV17 <i>yap1Δ</i>	Vector para supresión de <i>YAP1</i> Un fragmento <i>Sac I/BamH I</i> de 0.652 Kpb de pCV6 clonado en pCV12 digerido con <i>Sac I/BamH I</i> .	Este trabajo
pCV19	Un fragmento <i>Sac I/BamH I</i> de 0.929 Kpb de pCV1 clonado en pAP599 digerido con <i>Sac I/BamH I</i> .	Este trabajo
pCV21 <i>skn7Δ</i>	Vector para supresión de <i>SKN7</i> Un fragmento <i>Kpn I/Xho I</i> de 0.875 Kpb de pCV3 clonado en pCV19 digerido con <i>Kpn I/Xho I</i> . Hyg <sup>R</sup>	Este trabajo
pRD96 <i>msn2Δ</i>	Vector para supresión de <i>MSN2</i> Producto de PCR <i>Kpn I/Xho I</i> de 0.691 Kpb (Oligos #2984/#2985) con la región promotora de <i>MSN2</i> y un producto de PCR <i>BamH I/Sac I</i> de 0.520 Kpb (Oligos #2986/#2987) con la región 3'UTR de <i>MSN2</i> clonados en pAP599 Amp <sup>R</sup>	Laboratorio Cormack
pRD97 <i>msn4Δ</i>	Vector para supresión de <i>MSN4</i> Producto de PCR <i>Kpn I/Xho I</i> de 0.564 Kpb (Oligos #2990/#2991) con la región promotora de <i>MSN4</i> y un producto de PCR <i>BamH I/Sac I</i> de 0.535 Kpb (Oligos #2992/#2993) con la región 3'UTR de <i>MSN4</i> clonados en pAP599 Amp <sup>R</sup>	Laboratorio Cormack

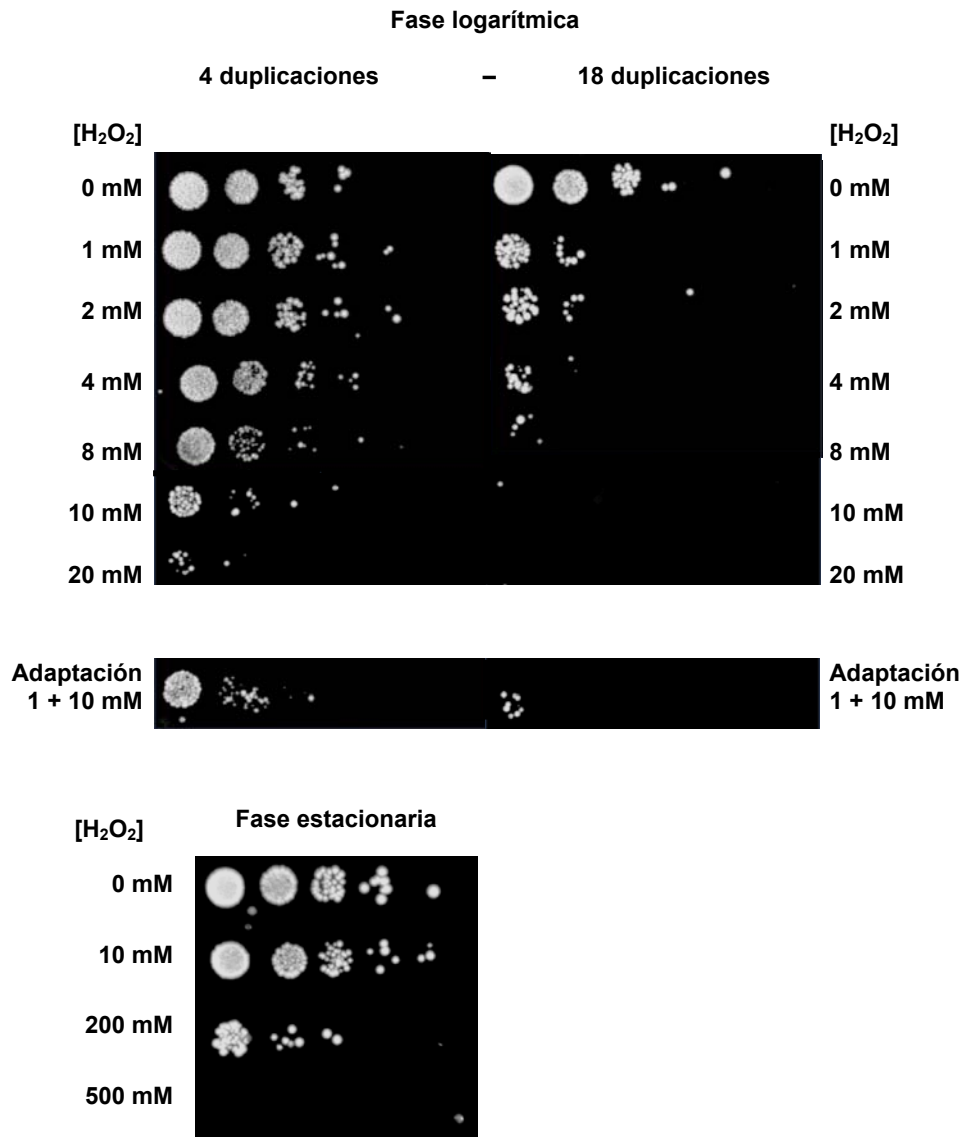
**Tabla 4.** *Oligonucleótidos usados en este estudio.* En Notas se indica la posición desde la que el oligonucleótido hibrida en relación al gen indicado; para los segmentos 5' es desde el inicio del ORF (ATG) y para segmentos 3' desde la

posición del codón de paro (TAA). Fw y Rv indican el sentido de los oligonucleótidos: sentido y anti-sentido, respectivamente.

# Oligo	Secuencia 5'→3'	Notas	Sitos
#1	CGCGGATCCAAGTATACTGCTATGAGCTAC	SKN7 @ +47 Fw	BamHI
#2	CAAGGAGCTCTTGTGCAGCGTGAAGATATGAATCAAGTGAT	SKN7 @ +976 Rv	SacI / BsgI
#3	TTGCGGCATACTCTATTGGTG	SKN7 @ +1066 Rv	
#4	TCAGATCTCGAGTTGACCGTGACCGAAAC	SKN7 @ -50 Rv	XhoI
#5	CCGGGTACCTTGTGCAGTCGAAGTTAGAGTGCCCTATTC	SKN7 @ -915 Fw	KpnI / BsgI
#6	GTGGAGAAGATAGCACACTCATG	SKN7 @ -962 Fw	
#7	AATCTCGAGTTGTGCAGTGCGGGTAAACAATTCTCGGCG	YAP1 @ -840 Fw	XhoI / BsgI
#8	CCCAAGCTTTTACTTCTAGTTCTTGTCTC	YAP1 @ -1 Rv	HindIII
#9	GAATACTGGCAATAGCAGCAGAG	YAP1 @ -933 Fw	
#10	TGGCTAAGCTTGAACITTTTCG	YAP1 @ +973 Rv	
#11	CGCGGATCCTGTCTATATTATCTCGGTAGATC	YAP1 @ +1 Fw	BamHI
#12	CAAGGAGCTCTTGTGCAGTCAACTCATAGATCACAACATTAACAC	YAP1 @ +652 Rv	SacI / BsgI
#13	GCGGATTAAGTTGGGTAACGCCAGGG	pUC Forward	
#15	CGATAAGAGGCCACGTGCTTTATG	P <sub>PGK1</sub> Rv-out	
#16	AGAAATACGCACGAACACGATATAGAGG	3' UTR HIS3 Fw-out	
#17	GGAAACAGCTATGACCATGA	pUC Reverse	
#57	CGCGGATCCTCAATTGTGGGAGTTATCTAATAAGCC	CTA1 @ -9 Rv	BamHI
#58	CACTACTAGTTAAACACTTGTAGGAG	CTA1 @ -913 Fw	SpeI
#59	CTGAGAAAGTCCAGCTTCTAAGC	CTA1 @ -985 Fw	
#60	CCCAAGCTTTTGAACCAGTAAAGTGCTGT	CTA1 @ +1 Fw	HindIII
#61	CCGGGTACCTTGTGCAGCCTGTAAGGACTTCTAAACC	CTA1 @ +688 Rv	KpnI / BsgI
#62	CTTGGTCAATAGAACTCTTAACTCACC	CTA1 @ +778 Rv	
#2274	CGGGGTACCGCTAGCGAAGGAGACAGGCACAATCG	HST1 5' Fw	KpnI
#2275	GTTGCTCGAGCTGTCATCTCACCTACAGATATCCGTGG	HST1 5' Rev	XhoI
#2276	CAAGGAGCTCTCCTTGTTCGAAGGTTGAAGACTTCG	HST1 3' Fw	SacI
#2277	CGCGGATCCACCGCTCATTGTTTTATAATAGATATTG	HST1 3' Rv	BamHI
#2984	GGTACCCGAGGGAGTTGCCCTCACTATGTGCGTTGAG	MSN2 5' @ -520 Fw	KpnI / BcgI
#2985	CTCGAGCTGTTCTTGTGATCTGTGTTTGGT	MSN2 5' @ +6 Rv	XhoI
#2986	GGATTCTGACAGTGTTCCCTATTTTATCTAG	MSN2 3' @ -6 Fw	BamHI
#2987	GAGTCCGACCGGTGCATCTGTACCAGGTTAGCC	MSN2 3' @ +538 Rv	SacI / BcgI
#2988	CTACGCAGAATTCTCTACAG	MSN2 5' @ -560 Fw	
#2989	GAAAGGTACTCTTTTTAG	MSN2 3' @ +568 Rv	
#2990	GGTACCCGACTCCTGTGCCTGTGCGTACCAGAGAAAC	MSN4 5' @ -647 Fw	KpnI / BcgI
#2991	CTCGAGGAACAGGAATGGACACTAATATATA	MSN4 5' @ -87 Rev	XhoI
#2992	GGATCCCATTCTTTATTTTCTGCTA	MSN4 3' @ +9 Fw	BamHI
#2993	GAGCTCCGAGGCATCTGCTAATAATTTCCGTTTCAA	MSN4 3' @ +543 Rv	SacI / BcgI
#2994	GAAAAAGAAGCACCCACAGA	MSN4 5' @ -680 Fw	
#2995	TGCTAACATAAATCTATGAG	MSN4 3' @ +573 Rv	



**Figura 18.** Plásmido pAP599. Los productos de PCR con las regiones promotora y 3' UTR del gen que se quiere reemplazar por el casete de higromicina se clonan utilizando los sitios de clonación múltiple (multiple cloning site - MCS) y en la misma orientación. Los MCSs se encuentran inmediatamente fuera del casete de higromicina. Una vez reemplazado el gen de interés, el casete de higromicina se puede eliminar por acción de Flp1p (pMZ21 – ver Tabla 3) ya que el casete de higromicina está flanqueado por las secuencias repetidas directas FRT. Esto permite lograr mutantes múltiples reemplazando otros genes con el mismo método.



**Figura 19.** Resistencia al estrés oxidante por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> de *S. cerevisiae*. Efectivamente, *S. cerevisiae* al igual que *C. glabrata* pierde resistencia y capacidad de adaptación al H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al incrementar el número de duplicaciones desde una resistencia mayor durante fase estacionaria; sin embargo, la resistencia es menor en ambas fases al comparar con *C. glabrata* (ver texto).