

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

**POSGRADO EN CIENCIAS EN BIOLOGIA MOLECULAR**

**Regulación de la Expresión por Estrés Oxidante  
de *EPA2* que codifica para una proteína de pared  
en *Candida glabrata***

Tesis que presenta

**Jacqueline Juárez Cepeda**

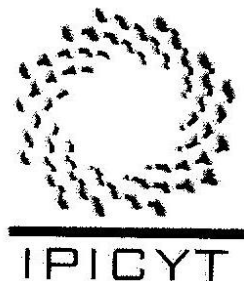
Para obtener el grado de

**Doctora en Ciencias en Biología Molecular**

Director de la Tesis:

Dr. Alejandro De Las Peñas Nava

**San Luis Potosí, S.L.P., Abril de 2015**



## Constancia de aprobación de la tesis

La tesis "Regulación de la Expresión por Estrés Oxidante de EPA2 que codifica para una proteína de pared en *Candida glabrata*" presentada para obtener el Grado de Doctora en Ciencias en Biología Molecular fue elaborada por **Jacqueline Juárez Cepeda** y aprobada el **17 de Marzo de 2015** 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. Martha Leticia Santos Martínez

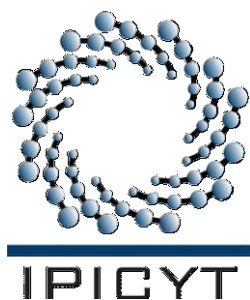
(Miembro del Comité Tutoral)

Dr. Christian Alberto García Sepúlveda

(Miembro del Comité Tutoral)

Dr. Wilhelm Hansberg Torres

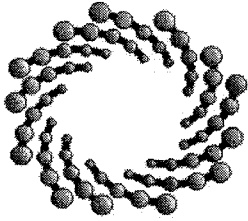
(Miembro del Comité Tutoral)



## **Créditos Institucionales**

Esta tesis fue elaborada en el Laboratorio de Microbiología Molecular de la División de Biología Molecular del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C., bajo la dirección del Dr. Alejandro De Las Peñas Nava, apoyado por el proyecto CB-2010-153929

Durante la realización del trabajo el autor recibió una beca académica del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología con No. de registro 48549 y del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A. C.



**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 076 del Libro Primero de Actas de Exámenes de Grado del Programa de Doctorado en Ciencias en Biología Molecular está asentado lo siguiente:

En la ciudad de San Luis Potosí a los 10 días del mes de abril del año 2015, se reunió a las 12:00 horas en las instalaciones del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C., el Jurado integrado por:

<b>Dr. Wilhelm Hansberg Torres</b>	<b>Presidente</b>	<b>UNAM</b>
<b>Dra. Irene Beatriz Castaño Navarro</b>	<b>Secretaria</b>	<b>IPICYT</b>
<b>Dr. Alejandro De Las Peñas Nava</b>	<b>Sinodal</b>	<b>IPICYT</b>
<b>Dra. Ma. Guadalupe Gutiérrez Escobedo</b>	<b>Sinodal</b>	<b>IPICYT</b>

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

**DOCTORA EN CIENCIAS EN BIOLOGÍA MOLECULAR**

sustentó la C.

**Jacqueline Juárez Cepeda**

sobre la Tesis intitulada:

*Regulación de la Expresión por Estrés Oxidante de EPA2 que codifica para una proteína de pared en Candida glabrata*

que se desarrolló bajo la dirección de

**Dr. Alejandro De Las Peñas Nava**

El Jurado, después de deliberar, determinó

**APROBARLA**

Dándose por terminado el acto a las 13:00 horas, procediendo a la firma del Acta los integrantes del Jurado. Dando fe el Secretario Académico del Instituto.

A petición de la interesada y para los fines que a la misma convengan, se extiende el presente documento en la ciudad de San Luis Potosí, S.L.P., México, a los 10 días del mes de abril de 2015.

  
**Dr. Marcial Bonilla Morán**  
Secretario Académico

  
**Mtra. Ivonne Lizette Cuevas Vélez**  
Jefa del Departamento del Posgrado



*La vida no es fácil, para ninguno de nosotros. Pero... ¡Qué importa!  
Hay que perseverar y, sobretodo, tener confianza en uno mismo. Hay  
que sentirse dotado para realizar alguna cosa y que esa cosa hay que  
alcanzarla, cueste lo que cueste...*

*Marie Curie*

## Agradecimientos

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por la beca otorgada.

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

Al Dr. Alejandro De Las Peñas Nava que contribuyo a mi formación académica, por cada una de sus enseñanzas y consejos.

A la Dra. Irene Castaño Navarro por sus enriquecedores y acertados comentarios.

Al Dr. Wilhem Hansberg Torres y al Dr. Christian Alberto García Sepúlveda por los valiosos comentarios que enriquecieron este trabajo.

Al Dr. Jorge Arreola Gómez, Dra. Gloria Patricia Pérez Cornejo y a la QFB Carmen Yudith Hernández Carballo por su apoyo teórico y técnico para realizar los ensayos en macrófagos, gracias por todas sus enseñanzas y tiempo brindado.

A la Ing. María Isabel Isordia Jasso por su asesoría en la estandarización de la técnica de la Reacción en Cadena de la Polimerasa en tiempo real (qPCR).

A la Dra. Edith Elena Urestí Rivera por su asesoría en el aprendizaje de la técnica Coinmunoprecipitación de la Cromatina (ChIP).

A la Dra. Ma. Guadalupe Gutiérrez Escobedo por su apoyo técnico.

A Gloria López por toda la ayuda que nos brinda con el material del laboratorio.

Al Dr. Emmanuel Orta Zavalza por todo su apoyo técnico, sus enseñanzas y tiempo, Gracias Amigo.

A todos mis compañeros que han formado parte y a los que continúan en laboratorio 6 de Microbiología Molecular por compartir conmigo sus conocimientos, trabajo, tiempo y amistad.

A mis amigos por su apoyo, consejos, compañía, amistad y por todos los momentos que hemos vivido juntos.

A todas las personas que contribuyeron en mi paso por el IPICYT, de todas aprendí algo.

A mi familia por su apoyo, paciencia y comprensión.

A José Ángel Huerta Ocampo por su apoyo, comprensión y fuerza, gracias por acompañarme en este camino e impulsarme a seguir adelante.

# Contenido

Constancia de aprobación de la tesis	ii
Créditos institucionales	iii
Acta de examen	iv
Dedicatorias	v
Agradecimientos	vi
LISTA DE TABLAS	xiv
LISTA DE FIGURAS	xv
RESUMEN	xvi
ABSTRACT	xvii
INTRODUCCIÓN	1
1. <i>Candida glabrata</i> , un patógeno oportunista	2
2. Características generales	2
3. Relación filogenética entre <i>Candida glabrata</i> y <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	3
4. Auxotrofías	5
5. Factores de virulencia de <i>Candida glabrata</i>	5
5.1. Ace2	5
5.2. Aspartil proteasas	5
5.3. Resistencia a Fluconazol	6
5.4. Rearreglos cromosómicos	6
5.5. Resistencia a especies reactivas de oxígeno	7
5.6. Adherencia	8
5.7. Formación de biopelículas	12
5.8. Regulación subtelomérica de los genes <i>EPA</i>	12

**PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA** 15

**RESULTADOS** 17

**CAPITULO 1** 18

**The *EPA2* adhesin encoding gene is responsive to oxidative stress in the opportunistic fungal pathogen *Candida glabrata*.** Jacqueline Juárez-Cepeda, Emmanuel Orta-Zavalza, Israel Canas-Villamar, Jorge Arreola-Gómez, Gloria Patricia Pérez-Cornejo, Carmen Yudith Hernández-Carballo, Guadalupe Gutiérrez-Escobedo, Irene Castaño and Alejandro De Las Penas. **Current genetics 2015. In press**  
DOI 10.1007/s00294-015-0473-2

**Abstract**

**CAPITULO 2** 20

**The superoxide dismutases of *Candida glabrata* protect against oxidative damage and are required for lysine biosynthesis, DNA integrity and chronological life survival.** Marcela Briones-Martin-del-Campo; Emmanuel Orta-Zavalza; Israel Cañas-Villamar; Guadalupe Gutiérrez-Escobedo; Jacqueline Juárez-Cepeda; Karina Robledo-Márquez; Omar Arroyo-Helguera; Irene Castaño; Alejandro De Las Peñas. **Microbiology mic.0.000006; published ahead of print December 5, 2014. In press**  
DOI 10.1099/mic.0.000006

**Abstract**

**CAPITULO 3** 22

**The oxidative stress response of the opportunistic fungal pathogen *Candida glabrata*.** Marcela Briones-Martin-Del-Campo, Emmanuel Orta-Zavalza, Jacqueline Juarez-Cepeda, Guadalupe Gutierrez-Escobedo, Israel Cañas-Villamar, Irene Castaño, Alejandro De Las Peñas. **Rev Iberoam Micol. 2014 Jan-Mar; 31(1):67-71.**  
DOI 10.1016/j.riam.2013.09.012

**Abstract**

**CAPITULO 4** 24

**Local silencing controls the oxidative stress response and the multidrug resistance in *Candida glabrata*.** Emmanuel Orta-Zavalza, Gehenna Lobo Guerrero-Serrano, Guadalupe Gutiérrez-Escobedo, Israel Cañas-Villamar, Jacqueline Juárez-Cepeda, Irene Castaño and Alejandro De Las Peñas. **Mol Microbiol. 2013 Jun; 88(6)1135-48.**



Summary

**CAPITULO 5**

26

**A novel downstream regulatory element cooperates with the silencing machinery to repress *EPA1* expression in *Candida glabrata*.** Verónica Gallegos-García V, Shih-Jung Pan SJ, Jacqueline Juárez-Cepeda, Candy Y. Ramírez-Zavaleta, Marcela Briones Martin-del-Campo, Verónica Martínez-Jiménez, Irene Castaño, Brendan Cormack and Alejandro De Las Peñas. **Genetics. 2012 Apr; 190 (4):1285-97.**

DOI 10.1534/genetics.111.138099

Abstract

**CAPITULO 6**

28

**The superoxide dismutases in fungi.** Briones-Martin-del-Campo M, Juárez-Cepeda J, Montalvo-Arredondo J, Gutiérrez-Escobedo J, Orta-Zavalza J, Riego L, Castaño I, De Las Peñas A., **FEMSYR. Review en preparación.**

Introduction

Structure, evolution relationship and distribution of SOD families

Cu/Zn-SODs

Fe or Mn-SODs

Ni-SODs

Regulation of the SOD expression and activity in fungi

SODs activation through the metal incorporation

The fungi SODs are important in:

Oxidative and general stress response

Cellular growth, aminoacids metabolism, and respiration

DNA protection

Aging

Virulence

Conclusions

References

Fig. 1 SODs in fungi.

Table 1. SOD playing roles in fungi

**CAPITULO 7**

59

**The transcription factors *Skn7* and *Yap1* regulate *EPA2* gene expression in *Candida glabrata*.** Jacqueline Juárez-Cepeda, Emmanuel Orta-Zavalza, Javier Montalvo-Arredondo, Irene Castaño and Alejandro De Las Peñas. **Artículo original en preparación.**

<b>Abstract</b>	
<b>Introduction</b>	
<b>Material and Methods</b>	
<b>Results</b>	
<b>Discussion</b>	
<b>Acknowledgments</b>	
<b>References</b>	
<b>Figure Legends</b>	
<b>Tables</b>	
<b>Figures</b>	

<b>DISCUSIÓN</b>	<b>100</b>
1. Regulación de <i>EPA2</i> y silenciamiento subtelomérico	101
2. Regulación de <i>EPA2</i> por los factores de transcripción de respuesta a estrés Yap1 y Skn7	102
3. Los factores de transcripción Yap1 y Skn7 de <i>C. glabrata</i> no interaccionan físicamente	103
4. El papel de <i>EPA2</i> in vitro e in vivo	106
<b>CONCLUSION FINAL</b>	<b>109</b>
<b>PERSPECTIVAS</b>	<b>110</b>
<b>REFERENCIAS</b>	<b>111</b>
<b>ANEXOS</b>	<b>119</b>
<b>ANEXO 1</b>	<b>120</b>
<b>MATERIALES Y METODOS</b>	
1. Medios de cultivo y cepas	120
1.1. Medios de cultivos para bacterias	120
1.2. Cepas de bacterias	120
1.3. Medios de cultivos para levaduras	120
1.4. Cepas de <i>C. glabrata</i>	121

2. Plásmidos	128
3. Oligonucleótidos	133
4. Kits comerciales	136
5. Transformación de <i>E. coli</i> por electroporación	137
6. Purificación de ADN con fenol:cloroformo:alcohol isoamilico y precipitación con etanol	137
7. Transformación genética de <i>C. glabrata</i>	138
8. Extracción de ADN genómico de <i>C. glabrata</i>	139
9. Ensayos de sensibilidad	139
9.1. Exposición crónica	139
9.2. Exposición aguda (Ensayo de adaptación a H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> )	140
10. Ensayos de crecimiento en medio 5FOA para analizar el silenciamiento	140
11. Ensayo de viabilidad	141
12. Reconstitución del gen <i>URA3</i> en las cepas mutantes	141
13. Medición de la fluorescencia de la proteína verde fluorescente (GFP) por citometría de flujo	142
14. Cuantificación de ADN y ARN	143
15. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	143
16. RT-PCR (PCR punto final)	143
17. RT-qPCR (PCR cuantitativa)	144
18. Cultivo de macrófagos	145
19. Ensayo de infección con macrófagos	145
20. IVET (Tecnología de Expresión In Vivo)	146
21. Clonación de productos de PCR y construcción de fusiones traduccionales de <i>MSN2</i> , <i>MSN4</i> , <i>SKN7</i> y <i>YAP1</i> con <i>FLAG</i> o <i>c-Myc13</i>	148

<b>22. Preparación de extractos de levadura y ensayos de Western blot</b>	<b>150</b>
22.1. Cuantificación de proteínas de <i>C. glabrata</i>	150
22.2. Ensayos de Western blot	151
<b>23. Inmunoprecipitado</b>	<b>154</b>
23.1. Preparación del lisado celular	154
23.2. Limpieza del lisado	155
23.1.1. Preparación de la Sefarosa acoplada a proteína G (Sigma® P3296)	155
<b>24. Ensayo de coinmunoprecipitación</b>	<b>155</b>
24.1. Agarosa anti- <i>c-Myc13</i> (Sigma® A7470)	155
24.2. Agarosa anti- <i>FLAG</i> (Sigma® A2220)	156
<b>25. Ensayo de Coinmunoprecipitación de la Cromatina (ChIP)</b>	<b>157</b>
<b>26. Análisis bioinformáticos</b>	<b>160</b>
<b>27. Análisis estadísticos</b>	<b>160</b>
<b>ANEXO 2</b>	<b>161</b>
<b>RESULTADOS ADICIONALES</b>	
1. Expresión de <i>EPA2</i> en presencia de diferentes agentes oxidantes	161
2. Expresión de los genes <i>EPA</i> en presencia de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	162
3. Estado transcripcional del gen reportero <i>URA3</i> insertado en diferentes regiones intergénicas en presencia de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> e hidroxiperóxido de cumeno	164
4. Evaluación de la funcionalidad de las fusiones traducionales	
4.1. Ensayo de adaptación a H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	169
5. Efecto de los factores de transcripción de respuesta a estrés oxidante Msn2, Msn4, Skn7 y Yap1 en la virulencia de <i>C. glabrata</i>	170

<b>6. Análisis fenotípico de la mutante <i>epa2Δ::FLP1</i></b>	<b>172</b>
<b>7. Evaluación de la expresión de la mutante <i>epa2Δ::FLP1</i></b>	<b>173</b>

## LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Expresión de adhesinas de <i>C. glabrata</i> bajo diferentes condiciones	11
Tabla 2. Cepas de <i>Escherichia coli</i> y de <i>Candida glabrata</i>	121
Tabla 3. Plásmidos	128
Tabla 4. Oligonucleótidos	133

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Árbol filogenético de las especies de los clados de <i>Candida</i> , <i>Nakaseomyces</i> y <i>Saccharomyces</i>	4
Figura 2. Modelo de la regulación de <i>EPA2</i> de <i>Candida glabrata</i>	109
Figura 3. Tecnología de Expresión In Vivo en <i>C. glabrata</i> (IVET)	147
Figura 4. Diagrama esquemático de los vectores para fusiones traduccionales	149
Figura 5. Expresión de <i>EPA2</i> con diferentes agentes oxidantes	161
Figura 6. Expresión de <i>EPA1</i> , <i>EPA3</i> , <i>EPA4/5</i> , <i>EPA6</i> , <i>EPA7</i> , <i>EPA8</i> , <i>EPA11</i> , <i>EPA12</i> , <i>EPA13</i> y <i>EPA15</i> en presencia de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	163
Figura 7. Efecto del silenciamiento subtelomérico en la expresión del gen reportero <i>URA3</i> en diferentes regiones intergénicas en presencia de estrés oxidante	165
Figura 8. Ensayo de adaptación de las fusiones traduccionales <i>Skn7-c::myc13</i> y <i>Yap1::FLAG</i>	169
Figura 9. Colonización de la cepa parental y de las mutantes <i>skn7Δ</i> , <i>yap1Δskn7Δ</i> , <i>msn2Δmsn4Δ</i> y <i>yap1Δskn7Δmsn2Δmsn4Δ</i> de <i>C. glabrata</i>	171
Figura 10. Análisis de crecimiento en diferentes fuentes de carbono de la mutante <i>epa2Δ::FLP1</i>	172
Figura 11. Análisis de expresión de la mutante <i>epa2Δ::FLP1</i>	173

## RESUMEN

### Regulación de la Expresión por Estrés Oxidante de *EPA2* que codifica para una proteína de pared en *Candida glabrata*

*Candida glabrata* ha emergido como un importante patógeno oportunista capaz de colonizar mucosas y provocar infecciones sistémicas. Tiene la capacidad para resistir niveles elevados de especies reactivas de oxígeno y es capaz de adherirse con avidéz a células epiteliales in vitro. Los genes *EPA* son una familia de genes que codifican para proteínas de pared celular (adhesinas) que median adherencia a células epiteliales. La mayoría de éstos genes se localizan en regiones subteloméricas y la expresión de estos genes está sujeta a silenciamiento subtelomérico. La región donde se encuentran los genes *EPA1 EPA2 EPA3* telómero en el cromosoma E<sub>D</sub>, se encuentra silenciada. *EPA1* es el único que se expresa in vitro en la cepa BG14. En ausencia de silenciamiento subtelomérico, aún así *EPA2* y *EPA3* no se expresan. En este trabajo encontramos que *EPA2* se induce en presencia de estrés oxidante. Mostramos que la regulación de la expresión de *EPA2* en presencia del silenciamiento subtelomérico y de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> requiere de por lo menos 3 factores de transcripción: Yap1 y Skn7, y de Msn2 o Msn4; Yap1 y Skn7 no interaccionan físicamente. Yap1, Skn7, Msn2 y Msn4 son factores de transcripción que participan en la regulación general de la respuesta a estrés oxidante en *C. glabrata*. Encontramos también que *EPA2* no se induce durante la fagocitosis, y no tiene efecto sobre la virulencia de *C. glabrata*, sin embargo su expresión se pueden encontrar en hígado en un sistema murino de infección sistémica. Nuestros datos apuntan a una relación interesante entre la regulación de adhesinas por silenciamiento y la respuesta al estrés oxidante.

Palabras claves: *EPA2*, respuesta a estrés oxidante, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> silenciamiento subtelomérico, Yap1, Skn7, IVET.



## ABSTRACT

### **The *EPA2* adhesin encoding gene is responsive to oxidative stress in the opportunistic fungal pathogen *Candida glabrata***

*Candida glabrata* has emerged as an important opportunistic fungal pathogen in humans in both mucosal and bloodstream infections. *C. glabrata* has a high resistance to oxidative stress and is able to adhere to epithelial cells in vitro. The *EPA* gene family encode for cell wall proteins (adhesins). Most of the *EPA* genes are localized in subtelomeric regions and subject to chromatin-based subtelomeric silencing. The *loci EPA1 EPA2 EPA3* telomere (Chr E<sub>R</sub>) is silenced and only *EPA1* is expressed in vitro in the BG14 strain background. Even in the absence of subtelomeric silencing, still *EPA2* and *EPA3* are not expressed. Interestingly, we found that *EPA2* is induced in presence of oxidative stress generated by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. This induction is dependent on the transcription factors Yap1 and Skn7, and Msn2 or Msn4, however we show that there is no physical interaction between Yap1 and Skn7. Surprisingly, we did not detect induction of *EPA2* inside macrophages. *EPA2* is dispensable for *C. glabrata* virulence, however *EPA2* is induced specifically in the liver during host colonization. These data suggest an interesting relation between the regulation by silencing of the adhesins and the response to oxidative stress.

Keywords: *EPA2*, Oxidative Stress Response, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, Silencing, Yap1, Skn7, IVET.

# **INTRODUCCIÓN**

## 1. *Candida glabrata*, un patógeno oportunista

Las infecciones provocadas por algunas especies de *Candida* son un problema de importancia clínica ya que su incidencia ha aumentado en las últimas décadas. Las candidiasis representan del 10 al 15% del total de las infecciones en sangre y están asociadas a una elevada morbilidad y mortalidad. *Candida albicans* es la especie que se aísla con mayor frecuencia, sin embargo, otras especies de *Candida*, como *Candida parapsilosis*, *Candida tropicalis* y *Candida glabrata* han incrementado su frecuencia (BUIRON GARCIA *et al.* 2007).

*C. glabrata* es un hongo patógeno oportunista que normalmente se encuentra como comensal en las mucosas de individuos sanos, pero puede invadir tejidos más profundos y causar infecciones graves cuando el sistema inmunológico del hospedero se encuentra comprometido. *C. glabrata* es responsable del 22% de todas las candidiasis (FIDEL *et al.* 1999; PFALLER and DIEKEMA 2010). En México también se reporta que el 15-20% de las vulvovaginitis (BUIRON GARCIA *et al.* 2007) y el 8% de las infecciones sistémicas se deben a esta levadura (GONZALEZ *et al.* 2008).

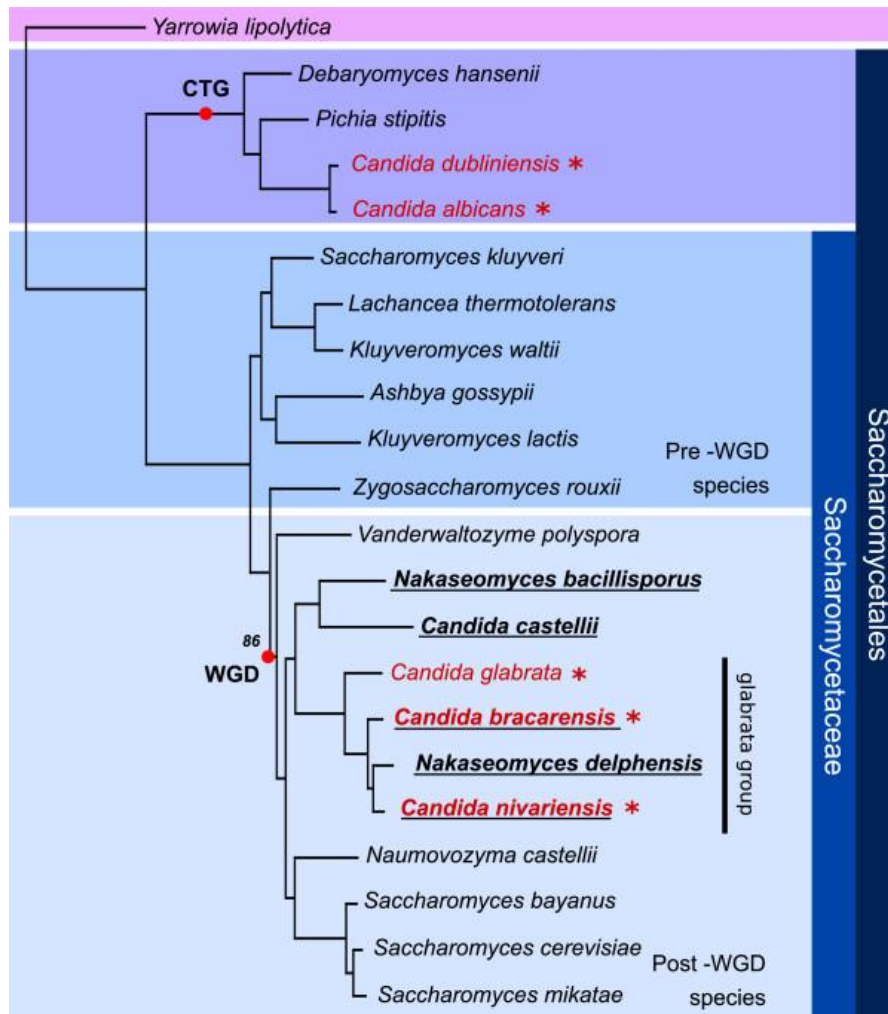
## 2. Características generales

*C. glabrata* es una levadura haploide no dimórfica, con forma de blastoconidia tanto como comensal como en su forma patógena. No forma pseudohifas, aunque puede formarlas escasamente en respuesta a limitación de nitrógeno, en una condición nutricional extrema (CSANK and HAYNES 2000). El tamaño de las blastoconidias de *C. glabrata* es de 1 a 4  $\mu\text{m}$ , es relativamente mas pequeña que *C. albicans* (4 a 6  $\mu\text{m}$ ) y que *S. cerevisiae* (5 a 10  $\mu\text{m}$ ). *C. glabrata* forma colonias circulares de aspecto liso, brillante y de coloración crema. (FIDEL *et al.* 1999).

### 3. Relación filogenética entre *Candida glabrata* y *Saccharomyces cerevisiae*

*C. glabrata* es filogenéticamente más cercana a *Saccharomyces cerevisiae* que a *C. albicans* (WONG *et al.* 2003). Esto ha permitido el uso en *C. glabrata* de técnicas de biología molecular desarrolladas para *S. cerevisiae*. Además, es posible hacer estudios genéticos con facilidad ya que es haploide. Otra gran ventaja es que su genoma está secuenciado totalmente y disponible para su consulta (<http://www.genolevures.org> y <http://www.candidagenome.org>). El genoma de *Candida glabrata* es de 12.3 Mb y contiene 13 cromosomas, con un contenido G+C de 38.8%. Presenta aproximadamente 5283 regiones codificantes y 207 genes que codifican para los tRNAs (DUJON *et al.* 2004). Los genomas de *C. glabrata* y *S. cerevisiae* tienen un alto grado de sintenia con un promedio de identidad de aminoácidos del 65% entre proteínas ortólogas.

*C. glabrata* pertenece al grupo de levaduras post-WGD (post-duplicación de todo el genoma), denominado clado *Nakaseomyces* (KURTZMAN and ROBNETT 2003). Este clado está formado por las levaduras no patógenas: *Candida castellii*, *Nakaseomyces (Kluyveromyces) delphensis* y *Nakaseomyces (Kluyveromyces) bacillisporus* y las levaduras patógenas: *Candida nivariensis* y *Candida bracarensis* (ALCOBA-FLOREZ *et al.* 2005; CORREIA *et al.* 2006). El género *Nakaseomyces* se caracteriza por poseer un genoma nuclear pequeño, libre de transposones y contiene significativamente menos genes que *S. cerevisiae*. Entre otra característica compartida de las especies del género, se encuentra la pérdida o amplificación de algunas familias de genes, como los genes *DAL*, que participan en el catabolismo de alantoína (WONG and WOLFE 2005) y los genes *TOP1* (DNA topoisomerasas), respectivamente (GABALDON *et al.* 2013) (Figura1).



**Figura 1. Árbol filogenético de las especies de los clados de *Candida*, *Nakaseomyces* y *Saccharomyces*.** El análisis está basado en el alineamiento concatenado de 603 genes de *S. cerevisiae* y los ortólogos de cada una de las 22 especies. Las especies en color rojo y con asterisco son patógenas para el humano. Las especies subrayadas corresponden a las nuevas especies del clado *Nakaseomyces*. También se indica el evento de duplicación genómica ancestral (WGD) y la leyenda “CTG” hace referencia a que todas las especies del clado de *Candida* utilizan este codón para traducir serina en vez de leucina. Tomada de (GABALDON *et al.* 2013).

#### **4. Auxotrofías**

En contraste con otras especies de *Candida* que fermentan y asimilan varios azúcares, *C. glabrata* solo fermenta y asimila glucosa y trehalosa (FIDEL *et al.* 1999). Aunque la mayoría de los genes de *C. glabrata* tienen ortólogos en *S. cerevisiae*, *C. glabrata* redujo su capacidad metabólica, posiblemente debido a su asociación íntima con su hospedero. *C. glabrata* ha perdido genes para la asimilación de galactosa y sacarosa, para el metabolismo de fosfato, nitrógeno y azufre, y para la biosíntesis de tiamina, piridoxina y ácido nicotínico (KAUR *et al.* 2005).

#### **5. Factores de virulencia de *Candida glabrata***

En los últimos 10 años se han descrito factores importantes implicados en la virulencia de *C. glabrata*. Estos estudios se han basado principalmente en la cepa BG14 que proviene de un aislado clínico (CORMACK *et al.* 1999) y en la cepa de referencia CBS138 (ATCC2001) que fue la que se utilizó para la secuenciación del genoma de *C. glabrata* (DUJON *et al.* 2004).

##### **5.1. Ace2**

El gen *ACE2* codifica para el factor transcripcional Ace2 cuya ausencia genera defectos en la separación de las células hijas. La cepa mutante es hipervirulenta, posiblemente debido a su tamaño, mas que a una participación directa en virulencia (KAMRAN *et al.* 2004; STEAD *et al.* 2010).

##### **5.2. Aspartil proteasas**

*C. glabrata* codifica para varias aspartil proteasas unidas a la pared celular a través del grupo glicosil-fosfatidilinositol (GPI). Estas aspartil proteasas forman una familia de proteínas llamadas Yps que se requieren para mantener la integridad y el remodelamiento de la pared celular y liberan al medio proteínas de la pared celular con ancla GPI. Además regulan la adherencia a células epiteliales y son importantes para la sobrevivencia dentro de los macrófagos (KAUR *et al.* 2007).

### 5.3. Resistencia a Fluconazol

Los azoles son los antifúngicos más usados para tratar infecciones en las mucosas o infecciones invasivas. *C. glabrata* presenta resistencia innata a los azoles y es más resistente a fluconazol que *C. albicans*. El mecanismo de acción de los azoles es a través de la inhibición de la síntesis del ergosterol. Los azoles inactivan a la enzima P-450 lanosterol 14- $\alpha$  desmetilasa codificada por el gen *ERG11* y se inhibe el crecimiento por la acumulación de esteroides metilados (PARKINSON *et al.* 1995). La resistencia a este antifúngico se debe principalmente a la incapacidad de introducir azoles, a la sobreexpresión, amplificación o mutaciones puntuales en el gen *ERG11* que disminuyan la afinidad del fármaco por Erg11 (VERMITSKY and EDLIND 2004), y al incremento en la salida del xenobiótico. Este último mecanismo está mediado por los transportadores de la familia ABC (ATP-Binding Cassette) Cdr1, Cdr2, Snq2, así como el transportador Mdr1 de la familia MFS (Major Facilitator Superfamily) (PARKINSON *et al.* 1995; MIYAZAKI *et al.* 1998; SANGLARD *et al.* 2001; BENNETT *et al.* 2004; VERMITSKY and EDLIND 2004). Otro mecanismo de resistencia son las mutaciones de ganancia de función en el gen *PDR1* que codifica para el factor de transcripción pleiotrópico de resistencia a fármacos que induce la expresión de los genes *CDR1* y *CDR2* (FERRARI *et al.* 2009; CAUDLE *et al.* 2010; MORSCHHAUSER 2010). Otro mecanismo de resistencia a azoles es cuando hay defectos en la función mitocondrial que incrementa la expresión de *CDR1*, *CDR2* y *SNQ2* (SANGLARD *et al.* 2001). Esto sucede como un mecanismo de protección a la mitocondria cuando la levadura se expone a xenobióticos.

### 5.4. Rearreglos cromosómicos

Se ha observado que en algunos aislados clínicos de *Candida glabrata* se presentan alteraciones cromosomales, entre ellas pérdida de cromosomas, translocaciones y aneuploidia. Es interesante notar que estos rearreglos cromosómicos ocurren a menudo en los mismos *loci*, por ejemplo en genes asociados con resistencia a fármacos (*CDR1*, *CDR2*) o en genes que participan en

la sobrevivencia en macrófagos (*YPS*). Esta plasticidad del genoma de *C. glabrata* puede servir como un mecanismo de compensación que permite una rápida adaptación a los cambios en el hospedero y tal vez compensar la ausencia de un ciclo sexual (POLAKOVA *et al.* 2009).

### **5.5. Resistencia a especies reactivas de oxígeno**

La primera línea de defensa contra infecciones por hongos son las células fagocíticas que a través del estallido respiratorio generan altos niveles de especies reactivas de oxígeno (ERO) para eliminar al patógeno (KAUR *et al.* 2007). *Candida glabrata* tiene una resistencia natural a niveles elevados de ERO, e inclusive puede adaptarse a niveles letales de ERO (CUELLAR-CRUZ *et al.* 2008; CUELLAR-CRUZ *et al.* 2009). La resistencia a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> depende de los factores de transcripción Yap1, Skn7 y Msn4, mientras que la adaptación a altas concentraciones de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> depende de Yap1, Skn7 y parcialmente de Msn2 y Msn4 (CUELLAR-CRUZ *et al.* 2008; ROETZER *et al.* 2008; ROETZER *et al.* 2010). Además, una cepa de *C. glabrata* mutante en el gen que codifica para Skn7 tiene una virulencia comprometida en un modelo murino de de infección sistémica (SAIJO *et al.* 2010a). La catalasa, Cta1, se requiere para la resistencia a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in vitro, y se induce durante la fagocitosis, sin embargo es dispensable en un modelo murino de infección sistémica (CUELLAR-CRUZ *et al.* 2008). Esto indica que la Cta1 no se requiere in vivo o que in vivo hay otros sistemas que pueden compensar la ausencia de la Cta1, como podrían ser el glutatión o la tiorredoxina.

Cuando *C. glabrata* es fagocitada reprograma sus vías metabólicas: induce genes que codifican para enzimas involucradas en  $\beta$ -oxidación, el ciclo del glioxilato y gluconeogénesis (KAUR *et al.* 2007); induce la catalasa que se concentra en los peroxisomas, los cuales se incrementa su número al principio de la fagocitosis y, posteriormente, hay pexofagia para reciclar los componentes internos (ROETZER *et al.* 2010). *C. glabrata* tiene la capacidad de suprimir las ERO (WELLINGTON *et al.* 2009) y produce de un pigmento rojizo a marrón oscuro que puede contrarrestar el estallido respiratorio de los macrófagos (BRUNKE *et al.* 2010). La obtención de



hierro es también importante para aumentar la sobrevivencia dentro de los macrófagos y resistir la muerte celular (NEVITT and THIELE 2011). Además *C. glabrata* es capaz de impedir la maduración del fagosoma, es decir, bloquea la formación del fagolisosoma y acidificación del mismo. Esto le permite a *C. glabrata* sobrevivir y replicarse dentro del macrófago por un considerable período de tiempo sin dañar a la célula hospedera (KAUR *et al.* 2007; ROETZER *et al.* 2010) ni provocar una respuesta inmune proinflamatoria (JACOBSEN *et al.* 2010; SEIDER *et al.* 2011). Todos estas evidencias se han encontrado en diferentes tipos de estudios que incluyen cultivos de líneas celulares del sistema inmune, experimentos in vivo con modelos murinos mediante diferentes vías de infección (oral, vaginal, gastrointestinal e infección sistémica). Sin embargo, estos resultados hay que tomarlos con reserva ya que hay que considerar que existe una gran diferencia entre el sistema inmune de los modelos usados y el sistema inmune del ser humano (BOLOTIN-FUKUHARA and FAIRHEAD 2014).

### 5.6. Adherencia

*C. glabrata* tiene la habilidad de adherirse a células epiteliales, endoteliales y de formar biopelículas. Se ha propuesto que la adherencia a tejidos es un primer paso importante para la infección por patógenos. Estudios in silico, mostraron que el genoma de *C. glabrata* contiene 67 genes que codifican para adhesinas putativas de tipo CWPs (cell wall proteins) (DE GROOT *et al.* 2008). Estas adhesinas se clasifican en 7 subgrupos y la mayoría se encuentran localizadas en regiones subteloméricas (44 de 67) (DE GROOT *et al.* 2008; KRANEVELD *et al.* 2011a). El grupo con mayor número de genes que codifican para adhesinas es la familia de los genes *EPA* (**E**pithelial **A**dhesins). Estos 7 subgrupos de adhesinas, los *Epa*, los 7 miembros del grupo *Pwp* (PA14-containing domain wall protein), el grupo *Awp* (Adhesin-like wall proteins) y los otros 4 grupos restantes, comparten el dominio PA-14 (*anthrax* protective antigen) en el N-terminal (DE GROOT *et al.* 2008).

*C. glabrata* regula la expresión de estas adhesinas en respuesta al medio ambiente y así permitir su adaptación a las condiciones del medio ambiente (KRANEVELD *et al.* 2011a). La expresión de estas proteínas depende de las condiciones particulares del medio de crecimiento, de la fase de crecimiento del cultivo, así como la cepa en particular. Por ejemplo, el patrón de expresión de los genes *EPA* es distinto entre los diferentes aislados clínicos que se han caracterizado. En particular el patrón de expresión de estas adhesinas es diferente entre la cepa de referencia CBS138 (aislado de heces) y la BG14 (aislado vaginal) la cual se utilizó en el transcurso de esta tesis.

La cepa BG14 de *C. glabrata* tiene la habilidad de adherirse a células epiteliales HEp2 *in vitro*, a través de la proteína de pared celular Epa1, codificada por el gen *EPA1* (CORMACK *et al.* 1999). Epa1 es la única adhesina que se expresa en esta cepa. Epa1 es una lectina cuya función es dependiente de  $\text{Ca}^{2+}$  y reconoce en el hospedero glicoconjugados que contienen N-acetil-lactosamina (CORMACK *et al.* 1999). La estructura de la proteína cuenta con tres regiones: 1) una secuencia N-terminal expuesta al ambiente extracelular y media las interacciones específicas proteína-ligando, 2) una región central que consta de tres repeticiones de una secuencia de 40 aminoácidos rica en serinas y treoninas que se glicosilan en las posiciones N y O en residuos de asparagina (N-glicosilación) y en residuos de serinas y treoninas (O-glicosilación) (CORMACK *et al.* 1999; FRIEMAN *et al.* 2002) y 3) una secuencia hidrofóbica C-terminal donde se adiciona el grupo de unión a GPI.

Hay 17 genes paralogos de *EPA1* en la cepa CBS138 y 23 para la cepa BG14. Algunos de estos genes *EPA* codifican adhesinas funcionales y la mayoría se localiza en regiones subteloméricas, y su expresión está sujeta a una regulación negativa denominada “silenciamiento subtelomérico” (DE LAS PENAS *et al.* 2003; CASTANO *et al.* 2005). Epa1, Epa6 y Epa7 son importantes para la colonización del riñón y la vejiga en el modelo murino de infección del tracto urinario (DE LAS PENAS *et al.* 2003; CASTANO *et al.* 2005; DOMERGUE *et al.* 2005), además *EPA6* es

importante para la formación de biopelículas en superficies de plástico (IRAQUI *et al.* 2005a). *EPA6* también se induce en condiciones de estrés a parabeno o ácido sórbico. (MUNDY and CORMACK 2009). En cambio, *EPA3* se induce por estrés osmótico y limitación de glucosa. (ROETZER *et al.* 2008). Recientemente se mostró que la expresión de los genes *EPA* también depende de las condiciones de cultivo: del tipo de medio o de la fase de cultivo. *EPA1*, *EPA3*, *EPA7* y *EPA22* se expresan en la formación de biopelículas en medio semidefinido (SdmYg), mientras que en medio rico (YPD) solo se expresa *EPA3* (KRANEVELD *et al.* 2011a). Por su parte, en cultivos en fase logarítmica de la cepa CBS138 se identificaron 18 diferentes proteínas de las cuales 13 son proteínas GPI, 4 proteínas Pir y la proteína Scw4 (DE GROOT *et al.* 2008), mientras que en fase estacionaria se identificó la proteína Awp1 (DE GROOT *et al.* 2008). Se identificaron también en cultivos en fase estacionaria, en dos distintos medios, 6 adhesinas distintas: Epa3, Epa6, Awp2, Awp3 y Awp4 en medio rico (YPD) y Epa3, Epa6, Awp2, Awp4 y Awp5 en medio semidefinido (SdmYg) (DE GROOT *et al.* 2008; KRANEVELD *et al.* 2011a). Las adhesinas Pwp7 y Aed1 (cepa BG14) se requieren para la adherencia a células endoteliales *in vitro*. Además, no son reguladas por silenciamiento transcripcional y parecen estar expresadas más en fase estacionaria que en fase logarítmica (DESAI *et al.* 2011) (Tabla 1).

**Tabla 1. Expresión de adhesinas de *C. glabrata* bajo diferentes condiciones**  
(DE LAS PENAS *et al.* 2003; CASTANO *et al.* 2005; DOMERGUE *et al.* 2005; DE GROOT *et al.* 2008; KRANEVELD *et al.* 2011b).

ADHESINAS DE <i>Candida glabrata</i>							
ADHESINA	INDUCCION	FACTOR DE TRANSCRIPCIÓN	FASE ESTACIONARIA	ADHERENCIA	BIOPELICULAS	IN VIVO	CEPA POSICION
EPA1	Primera división celular			Células epiteliales HEp2	Superficies de plástico Medio semidefinido (SdmYg)	Coloniza riñón y vejiga	BG14 CBS138 Subtelomérico
EPA2	Estrés generado por H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Skn7, Yap1 y Msn2 o Msn4					BG14 Subtelomérico
EPA3	Estrés osmótico y limitación de glucosa	Parcialmente por Msn2	Medio semidefinido (SdmYg) Medio rico (YPD)		Medio semidefinido (SdmYg) Medio rico (YPD)		CBS138 Subtelomérico
EPA6	Estrés a parabeno o ácido sorbico	Flo8 Mss11	Medio semidefinido (SdmYg) Medio rico (YPD)		Medio semidefinido (SdmYg)	Coloniza riñón y vejiga	BGA14, CBS138 Subtelomérico
EPA7					Medio semidefinido (SdmYg)	Coloniza riñón y vejiga	BGA14, CBS138 Subtelomérico
EPA22	Estrés osmótico y limitación de glucosa	Parcialmente por Msn2	Medio rico (YPD)		Medio semidefinido (SdmYg)		CBS138 Subtelomérico
AWP1			Expresada				CBS138 Interno
AWP2			Medio rico (YPD) Medio semidefinido (SdmYg)		Medio semidefinido (SdmYg)		CBS138 Subtelomérico
AWP3			Medio rico (YPD)				CBS138 Interno
AWP4			Medio rico (YPD) Medio semidefinido (SdmYg)		Medio semidefinido (SdmYg) Medio rico (YPD)		CBS138
AWP5 (AED1)			Expresadas más en esta fase Medio semidefinido (SdmYg)	Células endoteliales			CBS138 Interno
AWP6					Medio semidefinido (SdmYg) Medio rico (YPD)		CBS138 Interno
PWP7			Expresadas más en esta fase	Células endoteliales			CBS138 Interno

*C. glabrata* contiene un tipo inusual de minisatelites con repeticiones entremezcladas y megasatelites que contienen motivos repetidos a lo largo de algunos genes, como es el caso de los genes *EPA*. Esto puede diversificar la expresión y la función de estos genes de adhesión que se consideran importantes para la patogenicidad (THIERRY *et al.* 2008). La cepa CBS138 presenta tres genes *EPA* que contienen megasatelites (*EPA2*, *EPA11*, y *EPA13*), otros tres genes contienen minisatelites (*EPA1*, *EPA3*, y *EPA15*), pero no hay repeticiones en tándem en *EPA6*, *EPA7* y *EPA8* (THIERRY *et al.* 2008). La formación de nuevos cromosomas originados por duplicación o traslocación a través de la presencia de

minisatélites y megasatélites, puede asistir a la levadura a mejorar su adaptación cuando se expone a nuevas condiciones ambientales (AHMAD *et al.* 2013).

### **5.7. Formación de biopelículas**

*Candida glabrata* tiene una alta capacidad para formar biopelículas en superficies de plástico debido a la expresión de los genes *EPA*. Se ha mostrado que la adhesina *Epa6*, es crucial para la formación de biopelículas, ya que la ausencia del gen *EPA6*, pero no de los genes *EPA1-5*, disminuye la formación de biopelículas *in vitro*. Además, mutantes en el gen *SIR4*, que codifica para una de las proteínas que controla el silenciamiento subtelo mérico, aumenta la expresión de los genes *EPA6* y *EPA7* y hay un incremento en la formación de biopelículas *in vitro* (IRAQUI *et al.* 2005a). También se ha mostrado que durante la formación de biopelículas, se expresan dos proteínas de respuesta a estrés *Trx1* y *Hsp12* (SENEVIRATNE *et al.* 2008; SENEVIRATNE *et al.* 2010), mientras que disminuye la expresión de varias enzimas glicolíticas, *Fba1*, *Tdh3*, *Gpm1* y *Eno1* (SENEVIRATNE *et al.* 2010).

### **5.8. Regulación subtelo mérica de los genes *EPA***

La mayoría de los genes *EPA* se localiza en regiones subtelo méricas, y su expresión está sujeta a silenciamiento subtelo mérico. En *C. glabrata*, el silenciamiento subtelo mérico depende de *Rap1*, del complejo *Sir* (*Sir2*, *Sir3* y *Sir4*), *Ku* (70/80) y de *Rif1* (DE LAS PENAS *et al.* 2003; CASTANO *et al.* 2005; ROSAS-HERNANDEZ *et al.* 2008). *Sir2* es una desacetilasa de histonas dependiente de  $\text{NAD}^+$ . Las histonas al ser desacetiladas por *Sir2*, adquieren una estructura que es represiva para la transcripción ya que los factores de transcripción no pueden acceder a sus sitios de reconocimiento en el DNA. Mutantes en los genes *SIR2*, *SIR3*, *SIR4*, *RAP1*, *HDF1* y *RIF1* eliminan el silenciamiento subtelo mérico, y permiten la expresión de sólo *EPA1*, *EPA6* y *EPA7* (DE LAS PENAS *et al.* 2003; CASTANO *et al.* 2005). Las células se vuelven hiperadherentes e incrementan la colonización de riñón en un modelo murino de infección sistémica (CASTANO *et al.* 2005; ROSAS-HERNANDEZ *et al.* 2008).

*C. glabrata* es auxótrofa de ácido nicotínico, precursor de NAD<sup>+</sup>, es decir, la actividad de Sir2 depende de la disponibilidad ambiental del precursor del cofactor. La disminución de los niveles de ácido nicotínico en el ambiente, hace que Sir2 pierda su actividad de desacetilasa y los genes *EPA* sujetos a silenciamiento subtelomérico se expresan por efecto de la de la acetilación de las histonas que produce una cromatina relajada. Por ejemplo, en orina y vejiga, los niveles de NAD son limitantes y las células de *C. glabrata* inducen la expresión de *EPA6* específicamente en estos órganos en un sistema múrido de infección (DOMERGUE *et al.* 2005).

En general, esta regulación mediante silenciamiento subtelomérico tiene la ventaja de ser un sistema global de regulación que permite el control de varios genes relacionados a través del mismo sistema (DE LAS PENAS *et al.* 2003; CASTANO *et al.* 2005). Sin embargo, no todos los genes *EPA* subteloméricos se expresan en ausencia de silenciamiento. Esto indica que hay otros niveles de regulación específicos para estos genes *EPA*.

El silenciamiento subtelomérico en *C. glabrata* se puede establecer de manera eficiente hasta una distancia de 24Kb del telómero (ROSAS-HERNANDEZ *et al.* 2008). Estudios sistemáticos con mutantes nulas de genes de la maquinaria de silenciamiento subtelomérico, muestran que Rap1 y el complejo Sir son esenciales para el silenciamiento de las regiones subteloméricas de los cromosomas E<sub>-R</sub>, I<sub>-R</sub>, C<sub>-L</sub> y C<sub>-R</sub>, sin embargo, el requerimiento de las proteínas Ku70, Ku80 y Rif1 varía en estas regiones (DE LAS PENAS *et al.* 2003; CASTANO *et al.* 2005; ROSAS-HERNANDEZ *et al.* 2008). El patrón de expresión de los genes *EPA1-7* en mutantes nulas para las proteínas Ku (*hdf1Δ* y *hdf2Δ*), muestra que hay una desrepresión de los genes *EPA4/EPA5*, *EPA6* y *EPA7*, pero no así de *EPA1*, *EPA2* y *EPA3*. Esto indica que las proteínas Ku no se requieren para establecer el silenciamiento en el telómero E<sub>-R</sub>, donde se encuentran *EPA1*, *EPA2* y *EPA3* (ROSAS-HERNANDEZ *et al.* 2008; JUAREZ-REYES *et al.* 2012). Además, es importante notar que al eliminar el silenciamiento subtelomérico, no todos los genes *EPA* se expresan. Esta

expresión diferencial indica que hay factores de transcripción adicionales que controlarían la expresión de estos genes *EPA* en condiciones específicas.

Existe una elevada heterogeneidad en la expresión de *EPA1* entre diferentes cepas de *C. glabrata*. Incluso en una misma población de células de *C. glabrata* existen dos subpoblaciones, una que expresa una mayor cantidad de Epa1 y otra que expresa poca. El principal mecanismo de regulación de la expresión de *EPA1* en la cepa BG14 es el silenciamiento mediado por las proteínas Sir, sin embargo esto no sucede en la cepa CBS138. En esta última hay un silenciamiento ineficiente, el cual no se debe a diferencias en el gen *EPA1* o en la longitud de los telómeros, sino probablemente a la presencia de un alelo de *SIR3* menos eficiente o que se expresa a bajos niveles, ya que se observa que la expresión ectópica en la cepa CBS138 de su propio *SIR3* incrementa el silenciamiento en esas células y disminuye casi en su totalidad la expresión de *EPA1* en esas células (HALLIWELL *et al.* 2012). Recientemente, se ha mostrado que algunos aislados clínicos de *C. glabrata* son más adherentes a las células epiteliales, por sobreexpresión del gen *EPA1* y estas cepas tienen polimorfismos en el gen *SIR3*, lo que podría causar un silenciamiento reducido (MARTINEZ-JIMENEZ *et al.* 2013). Una observación interesante es que *EPA1*, cuya expresión depende del complejo Sir, esta a una distancia muy grande del telómero y no debería de estar sujeto a silenciamiento subtelomérico mediado por Sir2-4. Esta aparente contradicción se resolvió al determinar que *EPA1* requiere para su regulación de un elemento en *cis* localizado a 300 pb del codon de término llamado elemento negativo (EN). Este EN funcionaría ya que los telómeros pueden formar loops, y acercaría al complejo Sir al EN y/o al promotor de *EPA1* (GALLEGOS-GARCIA *et al.* 2012b).

## PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El silenciamiento epigénético de adhesinas puede servir para múltiples metas. Primero, el silenciamiento de genes de adhesión permite en una población la presencia de células que pueden adherirse y colonizar y células no adherentes que pueden diseminarse y encontrar nuevos sitios de colonización. El cambio epigénético también puede ayudar a las células a activarse anticipadamente a nuevas condiciones en ambientes fluctuantes (KUSSELL and LEIBLER 2005). Además, la expresión de un grupo de adhesinas puede variar entre fenotipos con capacidad de adherencia a determinadas superficies. En hongos patógenos, la variación estocástica en la expresión de diferentes adhesinas puede permitir la evasión del sistema inmune. Además, la remodelación de la cromatina también es un proceso esencial para la sobrevivencia de la levadura internalizada en el macrófago (RAI *et al.* 2012), que junto con otros factores como la presencia de yapsinas (KAUR *et al.* 2007), la capacidad de resistir a las ERO, la limitación de glucosa (ROETZER *et al.* 2010) y la supresión de la producción de citocinas por el macrófago (SEIDER *et al.* 2011) contribuyen a la evasión del sistema inmune y su subsecuente diseminación.

El *locus EPA2* se encuentra en la región subtelomérica del Cromosoma E Derecho (E-D) junto con otros tres genes que codifican para proteínas de pared celular, (*HYR1*, *EPA1*, *EPA2*, *EPA3* y telómero) (DE LAS PENAS *et al.* 2003). La delección del cluster *EPA1-3* conduce parcialmente a la atenuación en la virulencia de *C. glabrata* (DE LAS PENAS *et al.* 2003). Una observación interesante fue que la región subtelomérica de *EPA1*, *EPA2* y *EPA3* está sujeta a silenciamiento subtelomérico, sin embargo en ausencia silenciamiento subtelomérico, sólo los niveles de expresión de *EPA1* aumentan notablemente. En cambio, *EPA2* y *EPA3* muestran niveles de transcripción muy bajos. Esto indica la presencia de reguladores adicionales para la expresión de estos genes.

Hemos observado que *EPA2* se induce considerablemente en presencia de estrés oxidante (15mM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). La inducción por estrés oxidante es específica para



*EPA2*, ya que *EPA3*, *EPA4* y *EPA5* no se inducen bajo estas condiciones. Estos datos nos indican una relación interesante entre la regulación por silenciamiento de las adhesinas y la respuesta a estrés oxidante.

En este trabajo determinamos que la expresión de *EPA2* se induce en presencia de estrés oxidante y los factores de transcripción Yap1 y Skn7 regulan su expresión. Un aspecto interesante sobre el mecanismo de regulación es si la maquinaria del silenciamiento subtelomérico requiere de inactivarse (oxidarse) primero para relajar la cromatina y así permitir la expresión de *EPA2* o si la acumulación en el núcleo de los factores de transcripción que regulan la expresión de *EPA2* en presencia de estrés oxidante contrarresta el efecto del silenciamiento subtelomérico. Además determinamos que *EPA2* se expresa en el hígado en un sistema murino de infección sistémica.

Es importante continuar con la caracterización de de las adhesinas en *Candida glabrata* para comprender mejor el papel biológico en virulencia, formación de biopelículas, adhesión a células hospederas o evasión del sistema inmune, así como su sistema de regulación y expresión.

## **RESULTADOS**

## **CAPITULO 1**

**The *EPA2* adhesin encoding gene is responsive to oxidative stress in the opportunistic fungal pathogen *Candida glabrata***

Este artículo puede ser consultado en la siguiente liga:  
<http://link.springer.com/article/10.1007%2Fs00294-015-0473-2>

## The *EPA2* adhesin encoding gene is responsive to oxidative stress in the opportunistic fungal pathogen *Candida glabrata*

Jacqueline Juárez-Cepeda · Emmanuel Orta-Zavalza · Israel Cañas-Villamar · Jorge Arreola-Gómez · Gloria Patricia Pérez-Cornejo · Carmen Yudith Hernández-Carballo · Guadalupe Gutiérrez-Escobedo · Irene Castaño · Alejandro De Las Peñas

Received: 30 June 2014 / Revised: 19 December 2014 / Accepted: 5 January 2015  
© Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2015

**Abstract** *Candida glabrata* has emerged as an important opportunistic pathogen in both mucosal and bloodstream infections. *C. glabrata* contains 67 adhesin-like glycosylphosphatidylinositol-cell-wall proteins (GPI-CWPs), which are classified into seven groups and the largest is the Epa family. Epa proteins are very diverse and their expression is differentially regulated. Like many of the *EPA* genes, *EPA2* is localized in a subtelomeric region where it is subject to chromatin-based transcriptional silencing and its role remains largely unexplored. In this study, we show that *EPA2* gene is induced specifically in vitro in the presence of oxidative stress generated by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. This induction is dependent on both Yap1 and Skn7, whereas Msn4 represses *EPA2* expression. Interestingly, *EPA2* is not induced during phagocytosis, but its expression can be identified in the liver in a murine model of systemic infection. Epa2 has no effect on the virulence of *C. glabrata*.

The work presented herein provides a foundation for future studies to dissect the molecular mechanism(s) by which *EPA2* of *C. glabrata* can be induced in the presence of oxidative stress in a region subject to subtelomeric silencing.

**Keywords** *EPA2* · Oxidative stress response · IVET · H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> · Silencing

### Introduction

*Candida glabrata* has emerged as the second most frequent species of *Candida* isolated from blood stream infections in the United States, second only to *Candida albicans* (Pfaller et al. 2011). Several virulence factors of *C. glabrata* have been described and include: intrinsic resistance to fluconazole (Bennett et al. 2004; Pfaller et al. 2009), adherence to epithelial cells (Castano et al. 2005; Cormack et al. 1999), and high resistance to oxidative stress (Cuellar-Cruz et al. 2008; Roetzer et al. 2008).

During the interaction of the pathogen with the host, cell-wall proteins mediate tissue adhesion and invasion, biofilm formation, evasion of the host immune system, and resistance to antifungal drugs (Verstrepen et al. 2005). The cell wall of *C. glabrata* contains 67 adhesin-like glycosylphosphatidylinositol-cell-wall proteins (GPI-CWPs) (de Groot et al. 2008). Adherence to epithelial cells is mediated primarily by members of the Epa family of adhesins, encoded by the *EPA* genes. The *EPA* gene family consists of 17–23 members depending on the strain. Many of the *EPA* genes are localized near telomeres, and their expression is regulated by chromatin-based subtelomeric silencing which is composed of the Sir Complex (Sir2, Sir3, and Sir4), Rap1, Rif1, yKu70, and yKu80 (Castano et al. 2005; De Las Penas et al. 2003). Epa1 is the predominant adhesin


Communicated by M. Kupiec.

J. Juárez-Cepeda · E. Orta-Zavalza · I. Cañas-Villamar · G. Gutiérrez-Escobedo · I. Castaño · A. De Las Peñas (✉)  
División de Biología Molecular, Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, IPICYT, Camino a la Presa San José, #2055, Col. Lomas 4ª sección., 78216 San Luis Potosí, San Luis Potosí, Mexico  
e-mail: cano@ipicyt.edu.mx

J. Arreola-Gómez · C. Y. Hernández-Carballo  
Laboratorio de Biofísica, Instituto de Física, Universidad Autónoma de San Luis Potosí, Av. Manuel Nava # 6, Zona Universitaria, 78290 San Luis Potosí, San Luis Potosí, Mexico

G. P. Pérez-Cornejo  
Departamento de Fisiología, Escuela de Medicina, Universidad Autónoma de San Luis Potosí, Avenida Venustiano Carranza #2405, Zona Universitaria, 78210 San Luis Potosí, San Luis Potosí, Mexico

Published online: 14 January 2015

 Springer

## **CAPITULO 2**

**The superoxide dismutases of *Candida glabrata* protect against oxidative damage and are required for lysine biosynthesis, DNA integrity and chronological life survival.**

Este artículo puede ser consultado en la siguiente liga:  
<http://mic.sgmjournals.org/content/early/2014/12/08/mic.0.000006>

## The superoxide dismutases of *Candida glabrata* protect against oxidative damage and are required for lysine biosynthesis, DNA integrity and chronological life survival

Marcela Briones-Martin-del-Campo, Emmanuel Orta-Zavalza, Israel Cañas-Villamar, Guadalupe Gutiérrez-Escobedo, Jacqueline Juárez-Cepeda, Karina Robledo-Márquez, Omar Arroyo-Helguera,† Irene Castaño and Alejandro De Las Peñas

Correspondence  
Alejandro De Las Peñas  
cano@ipicyt.edu.mx

IPICYT, División de Biología Molecular, Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, Camino a la Presa San José, no. 2055, Col. Lomas 4<sup>a</sup> Sección, San Luis Potosí, San Luis Potosí 78216, Mexico

Received 2 October 2014  
Accepted 17 November 2014

The fungal pathogen *Candida glabrata* has a well-defined oxidative stress response, is extremely resistant to oxidative stress and can survive inside phagocytic cells. In order to further our understanding of the oxidative stress response in *C. glabrata*, we characterized the superoxide dismutases (SODs) Cu,ZnSOD (Sod1) and MnSOD (Sod2). We found that Sod1 is the major contributor to total SOD activity and is present in cytoplasm, whereas Sod2 is a mitochondrial protein. Both SODs played a central role in the oxidative stress response but Sod1 was more important during fermentative growth and Sod2 during respiration and growth in non-fermentable carbon sources. Interestingly, *C. glabrata* cells lacking both SODs showed auxotrophy for lysine, a high rate of spontaneous mutation and reduced chronological lifespan. Thus, our study reveals that SODs play an important role in metabolism, lysine biosynthesis, DNA protection and aging in *C. glabrata*.

**CAPITULO 3**

**The oxidative stress response of the opportunistic fungal pathogen *Candida glabrata*.**

Este artículo puede ser consultado en la siguiente liga:  
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1130140613001083>



## Mycologic Forum

 The oxidative stress response of the opportunistic fungal pathogen  
*Candida glabrata*

 Marcela Briones-Martin-Del-Campo, Emmanuel Orta-Zavalza, Jacqueline Juarez-Cepeda,  
Guadalupe Gutierrez-Escobedo, Israel Cañas-Villamar, Irene Castaño, Alejandro De Las Peñas\*

División de Biología Molecular, IPICYT, Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, San Luis Potosí, San Luis Potosí, México

## ARTICLE INFO

## Article history:

Received 26 August 2013

Accepted 27 September 2013

Available online 19 November 2013

## Keywords:

*Candida glabrata*

Yap1

Cta1

Skn7

Glutathione

Reactive oxygen species

## ABSTRACT

Organisms have evolved different strategies to respond to oxidative stress generated as a by-product of aerobic respiration and thus maintain the redox homeostasis within the cell. In particular, fungal pathogens are exposed to reactive oxygen species (ROS) when they interact with the phagocytic cells of the host which are the first line of defense against fungal infections. These pathogens have co-opted the enzymatic (catalases, superoxide dismutases (SODs), and peroxidases) and non-enzymatic (glutathione) mechanisms used to maintain the redox homeostasis within the cell, to resist oxidative stress and ensure survival within the host. Several virulence factors have been related to the response to oxidative stress in pathogenic fungi. The opportunistic fungal pathogen *Candida glabrata* (*C. glabrata*) is the second most common cause of candidiasis after *Candida albicans* (*C. albicans*). *C. glabrata* has a well defined oxidative stress response (OSR), which include both enzymatic and non-enzymatic mechanisms. *C. glabrata* OSR is controlled by the well-conserved transcription factors Yap1, Skn7, Msn2 and Msn4. In this review, we describe the OSR of *C. glabrata*, what is known about its core elements, its regulation and how *C. glabrata* interacts with the host.

This manuscript is part of the series of works presented at the "V International Workshop: Molecular genetic approaches to the study of human pathogenic fungi" (Oaxaca, Mexico, 2012).

© 2013 Revista Iberoamericana de Micología. Published by Elsevier España, S.L. All rights reserved.

 Respuesta al estrés oxidante en el hongo patógeno oportunista *Candida glabrata*

## RESUMEN

Los microorganismos han establecido diferentes estrategias para controlar el estrés oxidante generado durante la respiración aeróbica y, por consiguiente, mantener la homeostasia redox en la célula. En particular, los hongos patógenos se exponen a especies reactivas del oxígeno cuando interactúan con las células fagocíticas del huésped que son la primera línea de defensa contra estos agentes infecciosos. Estos patógenos han reclutado sistemas enzimáticos (catalasas, superóxido dismutasas y peroxidasas) y no enzimáticos (glutathión) que normalmente utilizan para mantener la homeostasis redox en la célula, para resistir frente al estrés oxidante y garantizar la supervivencia dentro del huésped. Varios factores de virulencia se han relacionado con la respuesta al estrés oxidante de los hongos patógenos. El hongo patógeno oportunista *Candida glabrata* (*C. glabrata*) es la segunda causa más frecuente de candidiasis después de *Candida albicans* (*C. albicans*). *C. glabrata* tiene una respuesta bien definida al estrés oxidante, que incluye sistemas enzimáticos y no enzimáticos y está regulada por los factores de transcripción Yap1, Skn7, Msn2 y Msn4. En esta revisión, describimos los elementos de la respuesta de *C. glabrata* a dicho estrés, cómo se regula y cómo *C. glabrata* interacciona con el huésped.

Este artículo forma parte de una serie de estudios presentados en el «V International Workshop: Molecular genetic approaches to the study of human pathogenic fungi» (Oaxaca, México, 2012).

© 2013 Revista Iberoamericana de Micología. Publicado por Elsevier España, S.L. Todos los derechos reservados.

## Palabras clave:

*Candida glabrata*

Yap1

Cta1

Skn7

Glutathión

Especies reactivas del oxígeno

\* Corresponding author.

E-mail address: [cano@ipicyt.edu.mx](mailto:cano@ipicyt.edu.mx) (A. De Las Peñas).



#### **CAPITULO 4**

#### **Local silencing controls the oxidative stress response and the multidrug resistance in *Candida glabrata*.**

Este artículo se encuentra en la modalidad de acceso abierto (gratuito) en:  
<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/mmi.12247/full>

## Local silencing controls the oxidative stress response and the multidrug resistance in *Candida glabrata*

Emmanuel Orta-Zavalza, Gehenna Guerrero-Serrano, Guadalupe Gutiérrez-Escobedo, Israel Cañas-Villamar, Jacqueline Juárez-Cepeda, Irene Castaño and Alejandro De Las Peñas\*  
IPICYT, División de Biología Molecular, Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, Camino a la Presa San José 2055, Lomas 4<sup>a</sup> sección, San Luis Potosí 78216, México.

### Summary

In *Candida glabrata*, the sirtuins Sir2 and Hst1 control the expression of a wide number of genes including adhesins required for host colonization and niacin transporters needed for growth. Given that these sirtuins can be inactivated during infection, we asked if their inhibition could modify the response of *C. glabrata* to other stressful conditions. Here, we found that deletion of *HST1* decreases susceptibility of *C. glabrata* to fluconazole and hydrogen peroxide. The transcription factor Pdr1 and the ABC transporter Cdr1 mediated the fluconazole resistance phenotype of the *hst1*Δ cells, whereas the transcriptional activator Msn4 and the catalase Cta1 are necessary to provide oxidative stress resistance. We show that the transcription factor Sum1 interacts with Hst1 and participate in the regulation of these genes. Interestingly, even though *C. glabrata* and *Saccharomyces cerevisiae* are closely related phylogenetically, deletion of *HST1* decreased susceptibility to fluconazole and hydrogen peroxide only in *C. glabrata* but not in *S. cerevisiae*, indicating a different transcriptional control by two similar sirtuins. Our findings suggest that Hst1 acts as a regulator of stress resistance associated-genes.

## **CAPITULO 5**

### **A novel downstream regulatory element cooperates with the silencing machinery to repress *EPA1* expression in *Candida glabrata*.**

Este artículo se encuentra en la modalidad de acceso abierto (gratuito) en:  
<http://www.genetics.org/content/190/4/1285.full>

## A Novel Downstream Regulatory Element Cooperates with the Silencing Machinery to Repress *EPA1* Expression in *Candida glabrata*

Verónica Gallegos-García,<sup>\*1,2</sup> Shih-Jung Pan,<sup>†1</sup> Jacqueline Juárez-Cepeda,<sup>\*</sup> Candy Y. Ramírez-Zavaleta,<sup>\*</sup> Marcela Briones Martín-del-Campo,<sup>\*</sup> Verónica Martínez-Jiménez,<sup>\*</sup> Irene Castaño,<sup>\*</sup> Brendan Cormack,<sup>†</sup> and Alejandro De Las Peñas<sup>\*,3</sup>

<sup>\*</sup>IPICYT, División de Biología Molecular, Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, San Luis Potosí, San Luis Potosí, 78216, México and <sup>†</sup>Department of Molecular Biology and Genetics, Johns Hopkins University School of Medicine, Baltimore, Maryland 21205

---

**ABSTRACT** *Candida glabrata*, an opportunistic fungal pathogen, adheres to mammalian epithelial cells; adherence is mediated primarily by the Epa1 adhesin. *EPA1* is a member of a large gene family of ~23 paralogues, which encode putative adhesins. In this study, we address how *EPA1* transcription is regulated. Our data show that *EPA1* expression is subject to two distinct negative regulatory mechanisms. *EPA1* transcription is repressed by subtelomeric silencing: the Sir complex (Sir2–Sir4), Rap1, Rif1, yKu70, and yKu80 are required for full repression. Activation of *EPA1* occurs immediately after dilution of stationary phase (SP) cells into fresh media; however, transcription is rapidly repressed again, limiting expression to lag phase, just as the cells exit stationary phase. This repression following lag phase requires a *cis*-acting regulatory negative element (NE) located in the *EPA1* 3'-intergenic region and is independent of telomere proximity. Bioinformatic analysis shows that there are 10 copies of the NE-like sequence in the *C. glabrata* genome associated with other *EPA* genes as well as non-*EPA* genes.

**CAPITULO 6**  
**The superoxide dismutases in fungi**

## **The superoxide dismutases in fungi**

Marcela Briones-Martin-del-Campo, Jacqueline Juárez-Cepeda, Javier Montalvo-Arredondo, Guadalupe Gutiérrez-Escobedo, Emmanuel Orta-Zavalza, Lina Riego, Irene Castaño and Alejandro De Las Peñas\*

IPICYT, División de Biología Molecular, Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, Camino a la Presa San José, #2055, Col. Lomas 4ª Sección. San Luis Potosí, San Luis Potosí 78216, México.

\* Corresponding Author. E-mail: [cano@ipicyt.edu.mx](mailto:cano@ipicyt.edu.mx)

+(52) 444 834 2038. Fax: +(52) 444 834 2010.

Keywords: SOD; superoxide dismutase; aging; fungi; pathogens; OSR; expression; DNA damage.

## Introduction

To disseminate the infection opportunistic pathogenic fungi require a robust stress response to survive the changing host environment. Moreover, they need to respond to the oxidative attack by phagocytes. Phagocytic cells are the first line of defense against fungal infections (MANSOUR and LEVITZ 2002). These cells generate reactive oxygen species (ROS), which include superoxide ( $O_2^{\bullet -}$ ), hydrogen peroxide ( $H_2O_2$ ), hypochlorite ( $OCl^-$ ) and hydroxyl radical ( $HO\bullet$ ). These ROS can damage all biomolecules and destroy phagocytosed pathogens (GONZALEZ-PARRAGA *et al.* 2003).

Fungi antioxidant defense is fundamental in the fungal resistance and adaptation to the host environment. Fungal pathogens eliminate ROS by enzymatic, (e.g., catalase, superoxide dismutase (SOD) and glutathione peroxidase), and non-enzymatic systems (e.g., glutathione) and these systems have been implicated in virulence.

One of the most important antioxidant systems are the SODs. SODs are metalloenzymes that catalyze the dismutation of  $O_2^{\bullet -}$  to  $H_2O_2$ .  $O_2^{\bullet -}$  has a prominent role in oxidative stress and impacts the production of other ROS (IMLAY and FRIDOVICH 1991). Due to its high attraction,  $O_2^{\bullet -}$  oxidizes iron–sulphur ([Fe–S]) clusters and releases iron (FLINT *et al.* 1993; CASTEILLA *et al.* 2001). Thus, the free iron is available to react with  $H_2O_2$  and generate  $HO\bullet$  by the Fenton reaction (MENEHINI 1997). These ROS react and damage all biomolecules of the cell. ROS oxidation can lead to inactivation of enzymes, altered membrane composition, genetic mutations, and ultimately to cell death. To counteract the effect of  $O_2^{\bullet -}$ , SODs regulate the cellular concentration of  $O_2^{\bullet -}$  and protect cells against oxidative damage, and mutations in the genes that encode for the *SODs* can lead to severe biological disorders. The physiological role of SODs of fungi is discussed here.

## Structure, evolution relationship and distribution of SOD families

SODs have been identified and characterized from a wide variety of organisms. Four families of SOD have been classified according to its protein structure and the metal used at the active site: the copper/zinc SODs (Cu/Zn-SOD), the manganese SODs (Mn-

SOD), the iron SODs (Fe-SOD), and the nickel SODs (Ni-SOD).

### **Cu/Zn-SODs**

The Cu/Zn-SODs are found as a homo-dimeric enzyme of 32 kDa containing one Cu and one Zn ion per subunit. The overall fold in each subunit is described as an eight-stranded antiparallel beta-barrel connected by three external loops. The ligands of the metals are one aspartate and six histidines (TAINER *et al.* 1982). The two subunits are tightly joined by hydrophobic and electrostatic interactions. The active Cu/Zn-SOD requires the binding of the metals to form an intramolecular disulfide bond between two conserved cysteine residues (BORDO *et al.* 1994). The zinc ion and the disulfide bond are not directly involved in the catalytic reaction, but they are required for proper stability of the active site (GETZOFF *et al.* 1983; TAINER *et al.* 1983; LAMB *et al.* 1999). The electrostatic loop is proposed to provide long- and short-range guidance for the superoxide substrate, thereby facilitating the remarkable kinetics of the SOD reaction (GETZOFF *et al.* 1992).

The Cu/Zn-SODs have a wide distribution among all organisms and seems to have evolved separately from the other SODs since they do not share sequence similarity (SMITH and DOOLITTLE 1992). SODs are found in proteobacteria and eukaryotes. Many Gram-negative pathogenic bacteria have Cu/Zn-SODs in the periplasm (LYNCH and KURAMITSU 2000). In eukaryotes, Cu/Zn-SODs are present in animals, plants and fungi and apparently they are not present in the protists (WILKINSON *et al.* 2006). The Cu/Zn-SODs have been studied from many different fungi like *Saccharomyces cerevisiae*, *Schizosaccharomyces pombe*, *Candida albicans*, *Candida glabrata*, *Cryptococcus neoformans var. gattii*, *Histoplasma capsulatum*, *Neurospora crassa*, *Aspergillus fumigatus*, *Penicillium chrysogenum*, and others (CHARY *et al.* 1994; DIEZ *et al.* 1998; HOLDOM *et al.* 2000; NARASIPURA *et al.* 2003; FROHNER *et al.* 2009; HOLBROOK *et al.* 2011; ROETZER *et al.* 2011).

Like most of the eukaryotic cells (FRIDOVICH 1995), fungi have Cu/Zn-SOD (product of the *SOD1* gene) mainly localized in the cytosol, and a small percentage in the intermembrane mitochondrial space (IMS) (MCCORD and FRIDOVICH 1969; STURTZ *et al.*



2001; NEDEVA *et al.* 2004). Recently, Sod1 of non-pathogenic fungus *S. cerevisiae* (ScSod1) was found in the nucleus in response to oxidative stress (TSANG *et al.* 2014). In general yeast like *S. cerevisiae*, *C. neoformans*, and *S. pombe* (non-pathogenic fungus) and *C. glabrata* contain one Cu/Zn-SOD mainly localized in cytoplasm (Fig. 1) (NARASIPURA *et al.* 2005; MATSUYAMA *et al.* 2006; BRIONES-MARTIN-DEL-CAMPO *et al.* 2014). Others like *C. albicans* has six SODs, of which four are Cu/Zn-SOD: the cytoplasmic CaSod1 and three additional extracellular Cu/Zn-SODs, CaSod4–6 (Fig. 1) (HWANG *et al.* 2002; MARTCHENKO *et al.* 2004; O'BRIEN *et al.* 2004). Interestingly, it has been recently reported that CaSod5 is a monomeric copper protein that lacks the zinc-binding site and the electrostatic loop element. Despite these structural deviations, CaSod5 still has the capacity to disproportionate  $O_2^{\bullet -}$  (GLEASON *et al.* 2014a).

Two of four SODs in *H. capsulatum* are Cu/Zn-SOD, the intracellular HcSod1 and one extracellular HcSod3 (Fig. 1) (HOLBROOK *et al.* 2011). *Coccidioides immitis* has a Cu/Zn-SOD (CIMG\_06994, 5.88) highly related to HcSod3 of *H. capsulatum* yeast phase (HOLBROOK *et al.* 2011), and has a predicted signal sequence suggesting that it is a secreted protein too (VIRIYAKOSOL *et al.* 2013). The *A. fumigatus* genome contain a cytoplasmic Cu/Zn-SOD (AfSod1), a mitochondrial Mn-SOD (AfSod2), a cytoplasmic Mn-SOD (AfSod3) and AfSod4 displaying a Mn-SOD C-terminal domain (LAMBOU *et al.* 2010). Furthermore, SODs were found in the supernatant of cell cultures, indicating that there is secretion of SODs in *Aspergillus* cells. It has been suggested that the extracellular Cu/Zn-SOD of *A. fumigatus*, *C. albicans* (CaSod4 and CaSod5), and *H. capsulatum* (HcSod3) have a protective role from externally generated free radicals (HAMILTON *et al.* 1996; HOLBROOK *et al.* 2011; GLEASON *et al.* 2014a).

### **Fe or Mn-SODs**

Iron and manganese SODs exhibit a high degree of sequence and structure similarity, suggesting that these enzymes originate from a common ancestor (WINTJENS *et al.* 2004), and are unrelated to Cu/Zn-SODs (SMITH and DOOLITTLE 1992). The Fe or Mn-SODs are present in all kingdoms including eubacteria and archeas. Obligate anaerobes contain Fe-SOD exclusively, cyanobacteria contain Fe-SOD and Mn-SOD, and facultative

aerobes contain either Fe-SOD or Mn-SOD or both. Moreover, in eukaryotes, Mn-SOD and Fe-SOD are found in the mitochondria and in the chloroplast, and they show strong homology to the prokaryotic enzymes. These facts support the idea that they arise from prokaryotic endosymbionts (GRACE 1990). The Fe or the Mn-SOD monomer (of 45kDa approximately) can oligomerise to form a dimeric or tetrameric structure (WINTJENS *et al.* 2004). In eukaryotes, Mn-SODs are usually homo-tetrameric (BORGSTAHL *et al.* 1992). Several residues are conserved for oligomerisation, metal specificity (Fe or Mn), and metal binding (PARKER and BLAKE 1988). Fungi contain Fe and/or Mn-SODs either in the cytoplasm or in the mitochondrial matrix. In *S. cerevisiae*, *C. neoformans*, *S. pombe* (non-pathogenic fungus) and *C. glabrata*, the Mn-SOD (product of *SOD2* gene) is a mitochondrial protein (Fig. 1) (NARASIPURA *et al.* 2005; MATSUYAMA *et al.* 2006; BRIONES-MARTIN-DEL-CAMPO *et al.* 2014). In *S. cerevisiae*, ScSod2 is synthesized in the cytosol and translocated to the matrix of the mitochondria, where it incorporates the Mn to form the active holo-Sod2 enzyme (LUK *et al.* 2005).

In *C. albicans*, two Mn-SODs are localized to the mitochondrial (CaSod2 which is homo-tetrameric) and in the cytosol (CaSod3 which is homo-dimeric) (Fig. 1) (RHIE *et al.* 1999; LAMARRE *et al.* 2001; FREALLE *et al.* 2005).

Some fungi have two Mn-SODs such as *A. fumigatus*, *Aspergillus nidulans*, *Candida famata*, *C. albicans*, *Candida lipolytica*, *Fusarium graminearum*, *Magnaporthe grisea*, *N. crassa*, and *Phaffia rhodozyma*, one SOD predicted to be localized to the mitochondria, and the other SOD predicted to be in the cytosol (LAMARRE *et al.* 2001; FREALLE *et al.* 2006).

## Ni-SODs

This family was first discovered in *Streptomyces* (YOUN *et al.* 1996) and orthologue genes have been identified in cyanobacteria (EITINGER 2004). However, there is no evidence of Ni-SODs in fungi. These Ni-SODs are homo-hexamers of four-helix bundles of total molecular weight 80 kDa (BARONDEAU *et al.* 2004). Each four-helix bundle binds a Ni ion.

## Regulation of the SOD expression and activity in fungi

In the presence of ROS, there is a reprogramming of gene expression to respond and eliminate the oxidative stress. This mechanism is known as **Oxidative Stress Response (OSR)**. The SODs expression and the activity of these enzymes are regulated at the transcription level, as well as post-transcriptional, translational, and post-translational levels.

The transcription regulation of the SODs has been shown to depend on the growth phase, the presence of oxidants, oxygen and nutrients. SOD regulation has been extensively studied in *S. cerevisiae*, where their activity increase during the diauxic shift and in the post diauxic phase under normal growth conditions (COSTA *et al.* 1997). However, during the post-diauxic phase the ScSOD1 expression decrease indicating a post-transcriptional or post-translational regulation (COSTA *et al.* 1997). Moreover, the transcription of the ScSOD2 also increases as cells enter to stationary phase (SP) in rich medium with glucose. This happens because of the switch to a non-fermentable carbon source, nutrient limitation plus the effects of heme activator protein (Hap) 2-3-4-5 complex and stress-responsive elements (STRE) (FLATTERY-O'BRIEN *et al.* 1997; PINKHAM *et al.* 1997). Thus, ScSOD2 regulation involves oxidative stress sensing and presence of oxygen during SP. In addition, both SODs (ScSOD1 and ScSOD2) are induced upon exposure to menadione (MD) and paraquat (PQ) in SP cultures (CYRNE *et al.* 2003). Moreover, ScSOD1 is also induced by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and ScSOD2 is induced upon exposure to ionizing radiation (GALIAZZO and LABBE-BOIS 1993; LEE *et al.* 2001). Recently, it has been shown that the ROS regulates ScSod1 nuclear localization and acts as a nuclear transcription factor to regulate oxidative stress resistance (TSANG *et al.* 2014).

Similar to *S. cerevisiae*, the *S. pombe* SOD1 (SpSOD1) expression is reduced in SP, consistent with the decrease in enzyme activity (LEE *et al.* 2002). However, SpSOD1 expression is induced in SP by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and MD and this induction is regulated by the transcription factors Pap1, Wis1, and Spc1 (LEE *et al.* 2002). In addition, the expression of the SpSOD1 gene is induced in the presence of metal ions including zinc (TARHAN *et al.* 2007). *S. pombe* SOD2 (SpSOD2) is induced in the presence of MD, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, heat, high

osmolarity, aluminum chloride, cadmium chloride, and manganese chloride. It is also induced by S-nitroso-N-acetylpenicillamine (SNAP) a NO-generating element. These suggest that oxidative stress, metals, and nitric oxide regulate the SpSOD2 gene (JEONG *et al.* 2001; JUNG *et al.* 2002).

The well-conserved Yap1 and Skn7 transcription factors have been shown to control the OSR in fungi like *S. cerevisiae*, *S. pombe*, and *C. glabrata* (CUELLAR-CRUZ *et al.* 2008; NIKOLAOU *et al.* 2009). Yap1 is a bZip transcription factor that contains cysteine rich domains in its N-and C-terminal portions, this factor controls the OSR and accumulates transiently in the nucleus in OSR, whereas Skn7 is an oxidative and cell wall stress-response transcription factor. In *S. cerevisiae*, both Yap1 and Skn7 control the expression of *SOD1* and *SOD2* (LEE *et al.* 1999). In *S. pombe* and *C. albicans*, *SOD1* expression is regulated by Yap1 (Pap1 in *S. pombe* and Cap1 in *C. albicans*) (LEE *et al.* 1999; LEE *et al.* 2002; ZNAIDI *et al.* 2009).

*C. glabrata* could withstand high concentrations of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and MD during SP (CUELLAR-CRUZ *et al.* 2008; CUÉLLAR-CRUZ *et al.* 2009). The peroxide resistance is dependent on Yap1, Skn7, and Msn4. The Msn4 together with Msn2, are Zn<sup>2+</sup> finger transcription factors involved in the general stress response, including the OSR (reviewed in (ESTRUCH 2000)). *C. glabrata* has a single catalase gene and two SOD genes (CgCTA1, CgSOD1, and CgSOD2), which are required for resistance to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and MD in vitro (CUELLAR-CRUZ *et al.* 2008; ROETZER *et al.* 2011; BRIONES-MARTIN-DEL-CAMPO *et al.* 2014). The CgSOD1 and CgSOD2 are constitutively expressed even in the presence of oxidative stress, and their expression is independent of CgYap1 and CgSkn7. Moreover, the expression of CgSODs is highly induced under glucose starvation (ROETZER *et al.* 2011). These data agree with our lab findings that indicate SODs are no regulated by CgYap1 and CgSkn7. However, our data suggest that CgMsn2 and CgMsn4 could participate on *SOD1* regulation during SP growth (our unpublished data).

In *C. albicans*, CaSOD1 is induced in LP but repressed in SP, whereas the expression of CaSOD3 is strongly induced upon the entry and during SP (LAMARRE *et al.* 2001). This shows that *C. albicans* regulates in the opposite direction the expression of the *SOD1* and *SOD3* genes. Furthermore, CaSOD1 expression can be induced by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, MD, PQ, cholic acid, procaine and tocopherol (GUNASEKARAN *et al.* 1998; LAMARRE *et al.*

2001). In addition, CaSOD1 and CaSOD5 expression is increased during the switch from yeast to hyphal form (LAMARRE *et al.* 2001; MARTCHENKO *et al.* 2004), but the CaSOD3 transcript is not found either in the transition from the yeast to the mycelial form or by drug-induced oxidative stress. In addition, CaSOD5 transcription (Cu-only SOD) is up-regulated in several different conditions such as, osmotic or oxidative stress, switch to alkaline pH, nonfermentable or absence of carbon sources, in response to neutrophils, and during an in vivo infection in mice (MARTCHENKO *et al.* 2004; FRADIN *et al.* 2005; FANNING *et al.* 2012; MIRAMON *et al.* 2012). Furthermore, CaSod5 was exclusively identified in the supernatants of hyphal cells whereas the CaSod4 enzyme was identified exclusively in the supernatants of yeast-form cultures (ROHM *et al.* 2013).

The SOD activity of *C. neoformans var. neoformans* and *var. gattii* increases in culture supernatants during SP (HAMILTON and HOLDOM 1997). CnSOD1 and CnSOD2 expression is induced upon temperature shift from 30°C to 37°C (NARASIPURA *et al.* 2005). However, no differences in CnSOD1 expression were found in *C. neoformans* yeasts growing with pure oxygen, copper, *tert*-butyl hydroperoxide or PQ (COX *et al.* 2003).

The transcription of the extracellular SOD3 gene of *H. capsulatum* is higher in the pathogenic yeast form than in the non-pathogenic mycelia. HcSOD3 is expressed during in vivo infection consistent with a role in virulence (HOLBROOK *et al.* 2011).

In the fungal pathogen *C. immitis*, the Cu/Zn-SOD (CIMG\_06994) is the orthologue of SOD3 of *H. capsulatum* and is upregulated at day 2 and 8 in spherules phase. Presumably its upregulation could protect the spherule against oxidative stress in the host. *C. immitis* also contains genes highly related to *A. fumigatus* AfSOD2 and AfSOD4 but neither of those is up- or downregulated (VIRIYAKOSOL *et al.* 2013).

The SOD activity in *A. flavus* and *A. niger* is increased with time of growth (HOLDOM *et al.* 1996). In *A. fumigatus*, the AfSOD1 and AfSOD2 were highly expressed in the conidia whereas AfSOD3 was only strongly expressed in mycelium. The AfSOD4 was weakly expressed compared with other SODs (LAMBOU *et al.* 2010). In *A. niger*, heat shock treatment significantly increased the levels of O<sub>2</sub><sup>•-</sup>, and concomitantly there is an increase in the levels of SODs and catalase (ABRASHEV *et al.* 2005; ABRASHEV *et al.* 2008).

SOD2 (Mn-SOD) in *Penicillium chrysogenum* has an increased expression after exposure to MD (EMRI *et al.* 1999). Furthermore, the SOD activity is increased by PQ

treatment in fungi cultures of: *Mucor racemosus*, *Humicola lutea*, *Fusarium oxysporum*, *Alternaria solani*, *Cladosporium elatum*, *Penicillium chrysogenum*, *P. brevicompactum*, *P. claviforme*, *P. roquefortii*, *Aspergillus niger*, *A. argilaceum*, and *A. oryzae* (ANGELOVA *et al.* 2005).

### **SODs activation through the metal incorporation**

The post-translation control of SODs involves the rapid conversion of an apo-inactive polypeptide to the enzymatically active SOD enzymes through the insertion of the metal ion cofactor. The Cu/Zn-SODs are activated through the controlled insertion of copper and the formation of the disulfide bond. Most eukaryotic Cu/Zn SODs can acquire copper by two different pathways, one dependent on the copper chaperone for SOD (Ccs1), and the other independent of Ccs1 (RAE *et al.* 1999; CARROLL *et al.* 2004). To date, the Cu/Zn SODs known to be fully dependent on CCS are those from fungi such as *S. cerevisiae*. When the Ccs1 dependent pathway is used, copper is transported by the action of the copper transporters and Ccs1 (PORTNOY *et al.* 2001). The Ccs1 insert copper into a new or pre-existing ScSod1 apoenzyme (SCHMIDT *et al.* 2000; BARTNIKAS and GITLIN 2003). The distribution of Ccs1 and Sod1 between the cytosol and the mitochondrial IMS depends on the Mia40/Erv1 disulfide relay system (REDDEHASE *et al.* 2009). Mia40 introduces a structural disulfide bond in Ccs1, which then shuttles disulfide bonds to Sod1 for full activation (GROSS *et al.* 2011; KLOPPEL *et al.* 2011).

*S. pombe* and *C. albicans* also have a metallochaperone-like protein that is necessary to deliver copper in Sod1 (LALIBERTE *et al.* 2004; GLEASON *et al.* 2014b). Loss of Ccs1 in *C. albicans* resulted in loss of CaSOD1 activity. In contrast, CaSod5 activity is independent on the Ccs1. The CaSod5 is secreted as a disulfide-oxidized apoprotein and is activated by the capture of extracellular copper (GLEASON *et al.* 2014a; GLEASON *et al.* 2014b).

In the case ScMn-SODs, their maturation comprises the import to the mitochondria and the manganese insertion. During ScSod2 synthesis, the ribosomes are juxtaposed to the outer mitochondrial membrane allowing the coupling of ScSod2 synthesis and mitochondrial import (GINSBERG *et al.* 2003). Once imported into mitochondrial matrix, the

polypeptide is fold into a stable quaternary tetramer and acquires the manganese through the metal transporter Smf2 (COHEN *et al.* 2000; PORTNOY *et al.* 2000). A second transporter that affects the ScSod2 activation is Mtm1, a member of the mitochondrial carrier family of proteins located in the inner membrane of the mitochondria. The Mtm1 role could involve direct insertion of the manganese cofactor or maintaining ScSod2 in a conformation that is competent for metal activation (LUK *et al.* 2005). Interestingly, the SpSod2 requires as well posttranslational modifications. SpSod2 is acetylated after import into mitochondria. Mitochondrial localization of SpSod2 is not essential for the enzyme activity, but is crucial for OSR and growth under respiratory conditions (TAKAHASHI *et al.* 2011).

### **The fungi SODs are important in:**

#### **Oxidative and general stress response**

SODs are essential components of the antioxidant defense system of fungi, providing protection against oxidative stress as a result of endogenous and exogenous ROS. The OSR of pathogenic fungi is extremely important because they are exposed not only to their own ROS (byproducts of aerobic respiration) but also to those produced by the respiratory burst of the host (HAMPTON *et al.* 1998). The SODs play an important role in the OSR.

SOD null mutants exhibit increased sensitivity to MD, PQ and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in *S. cerevisiae*, *C. glabrata*, *S. pombe*, *C. neoformans*, *C. albicans*, *H. capsulatum*, *N. crassa*, and *Aspergillus fumigatus* (BILINSKI *et al.* 1985; GRALLA and VALENTINE 1991; LONGO *et al.* 1999; JEONG *et al.* 2001; CYRNE *et al.* 2003; HWANG *et al.* 2003; MANFREDINI *et al.* 2004; GILES *et al.* 2005; NARASIPURA *et al.* 2005; MUTOH and KITAJIMA 2007; LAMBOU *et al.* 2010; BRIONES-MARTIN-DEL-CAMPO *et al.* 2014) (See Table I). These data underscore the key role of the SODs in the antioxidant defense against drug-induced oxidative stress. For example, the response to oxidative stress generated by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and MD is largely dependent on Sod1 and also by the glutathione reductase in *S. pombe* (LEE *et al.* 2002). In *S. cerevisiae*, the absence of SODs induces the glutathione peroxidase and glutathione

levels in the defense against H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> during SP (MANFREDINI *et al.* 2004). In *C. glabrata*, *SOD1* is required to protect against MD during LP and both SODs are necessary in protecting cells against to MD-induced stress during SP (ROETZER *et al.* 2011; BRIONES-MARTIN-DEL-CAMPO *et al.* 2014).

Fungal pathogens are subjected to many others environment stresses such as nutrient limitations, osmotic changes, heat shock, drugs and pH change, and particularly during the host immune response. Several evidences show that SODs have a role not only in OSR but also in response to the presence of others kind of stresses. In *S. cerevisiae*, the *sod1Δ* mutant is sensitive to cell wall-perturbing agents, such as calcofluor white and congo red (LIU *et al.* 2010). Moreover, the *sod1Δ* mutant is sensitive to osmotic stress showing increased oxidative damage, but in anaerobic conditions, the presence of ascorbate, or glutathione alleviate the growth inhibition of *Scsod1Δ* (KOZIOL *et al.* 2005). Unlike *Sod1*, which have the major role in OSR, *Sod2* acts as a general defense agent protecting cells against multiple stresses. Previous studies revealed that the *sod2Δ* mutants of *S. cerevisiae*, *S. pombe*, *C. neoformans var. gattii*, *C. neoformans var. grubii*, and *C. albicans* are more sensitive to heat stress, high osmolarity, ethanol, or metalloid stress than the wild-type strain (JEONG *et al.* 2001; PEREIRA *et al.* 2001; HWANG *et al.* 2002; HWANG *et al.* 2003; GILES *et al.* 2005; NARASIPURA *et al.* 2005; DZIADKOWIEC *et al.* 2007; STOICA *et al.* 2011). In *A. fumigatus*, both *sod1Δ* and *sod2Δ* mutants show growth inhibition at high temperature whereas the *sod3Δ* mutant had only a slight growth delay at high temperature (LAMBOU *et al.* 2010). These evidences confirmed the relationship between oxidative and other stress responses and the contribution of SODs to scavenge O<sub>2</sub><sup>•-</sup> generated by the mitochondrial respiration.

### **Cellular growth, aminoacids metabolism, and respiration**

Genetic analysis of SOD mutants have shown that the SODs are implicated in a variety of metabolic and growth defects related to oxidative damage even under non-stress conditions. Growth defects have been shown in SOD mutants under high oxygen environment, high temperatures, growth on non-fermentable carbon sources and in SP, and



nutritional stress. The role of SODs in metabolism has been well characterized in *S. cerevisiae*. The *sod1* $\Delta$  and *sod2* $\Delta$  mutants are highly sensitive to elevated oxygen concentrations (hyperoxia), but this phenotype disappears under anaerobic conditions, independent of the growth conditions (VAN LOON *et al.* 1986; GRALLA and VALENTINE 1991).

In *S. cerevisiae* and *S. pombe*, the *sod1* $\Delta$  mutant causes severe growth defects even in rich media (LONGO *et al.* 1996; LEE *et al.* 2002; SEHATI *et al.* 2011). In *C. glabrata*, the *sod2* $\Delta$  and *sod1* $\Delta$  *sod2* $\Delta$  mutants grows slow under aerobic conditions in rich medium but they can reach to the same cell density as the parental culture (BRIONES-MARTIN-DEL-CAMPO *et al.* 2014). In *C. albicans*, the *sod2* $\Delta$ /*sod2* $\Delta$  mutant (but not the *sod1* $\Delta$ /*sod1* $\Delta$  or *sod3* $\Delta$ /*sod3* $\Delta$  mutants) has a growth rate comparable to the wild-type in air. The same mutant shows normal growth under hyperoxic condition. Moreover, the *sod1* $\Delta$ /*sod1* $\Delta$  mutant showed retarded filamentation on Spider medium (HWANG *et al.* 2002). In contrast, the SODs do not appear to have any impact on the growth of *C. neoformans var. gattii* on YPD in aerobic conditions (NARASIPURA *et al.* 2003; NARASIPURA *et al.* 2005).

In SP, cells readjust their metabolism from fermentation to respiration, and they utilize ethanol for energy. The mitochondrial activity increase and consequently there are more production of ROS (HERKER *et al.* 2004). The SOD mutants are characterized by their defects during aerobic respiration. In *S. cerevisiae*, it has been demonstrated that both *sod1* $\Delta$  and *sod2* $\Delta$  mutants show growth defects when grown on non-fermentable carbon sources such as ethanol or lactate (GRALLA and KOSMAN 1992); although, the *sod1* $\Delta$  can grow better on lactate and pyruvate, than on ethanol or glycerol (LONGO *et al.* 1996). Indeed, the *sod1* $\Delta$  mutant is unable to utilize ethanol, and cannot switch from glucose-based to ethanol-based growth (SEHATI *et al.* 2011).

Glucose has long been known to repress respiration in LP cells. Recently, it has been shown that Sod1 play a role in the respiratory repression in oxygen and glucose presence. ScSod1 physically interact with the Yck1 casein kinase, which regulates glucose and amino acid sensing and respiration repression in *S. cerevisiae* (REDDI and CULOTTA 2013).

The *sod2* $\Delta$  mutants in the pathogenic fungi *C. neoformans*, *C. albicans*, and *C. glabrata* have similar growth defects when grown on ethanol, demonstrating the central

role of SODs during cellular respiration (HWANG *et al.* 2002; NARASIPURA *et al.* 2005; BRIONES-MARTIN-DEL-CAMPO *et al.* 2014). In addition, our data show that the *sod2Δ* mutant and the *sod1Δ sod2Δ* double mutant of *C. glabrata* have a marked growth defect in glycerol presence. Thus, these data indicate that CgSod2 is necessary to counteract the superoxide generated in the mitochondria when cells are under mitochondrial respiration (BRIONES-MARTIN-DEL-CAMPO *et al.* 2014).

Amino acid auxotrophies have been observed in yeast lacking *SOD1*, but not observed in a *sod2Δ* mutant. In *S. cerevisiae* and *S. pombe*, the *sod1Δ* mutant exhibits auxotrophy for lysine, methionine and cysteine. These auxotrophies were restored by the addition of these amino acids to the medium (GRALLA and KOSMAN 1992; LEE *et al.* 2002). In addition, the deletion of the copper chaperone of Sod1 (Ccs1) shows as well auxotrophy for methionine and lysine (CULOTTA 2000). In *C. albicans*, the *sod1Δ* mutant exhibits just a slow growth in minimal medium without lysine, indicating a 'leaky' lysine auxotrophy. However, this *sod1Δ* mutant does not show any kind of growth defects in absence of methionine or cysteine (HWANG *et al.* 2002). In contrast, *sod1Δ* single mutants of *C. neoformans var. gattii* and the filamentous fungi *N. crassa*, does not show auxotrophies for lysine or methionine (CHARY *et al.* 1994; NARASIPURA *et al.* 2003). On the other hand, our investigation in *C. glabrata* shows that the *sod1Δ* mutant grow slowly on lysine absence, meanwhile *sod2Δ* mutant grow normally as parental strain. Interestingly, and unlike *S. cerevisiae*, only the *Cgsod1Δ Cgsod2Δ* double mutant is lysine auxotroph indicating that CgSODs are functionally redundants (BRIONES-MARTIN-DEL-CAMPO *et al.* 2014). In summary, these data show that some fungi Sod1 enzymes are involved in the aminoacid metabolism.

Studies show that the auxotrophies in the *sod1Δ* mutant in *S. cerevisiae* arise due to disruption of the biosynthetic pathways of lysine, methionine or cysteine by an altered redox environment. The cysteine/methionine requirements in the absences of *SOD1* result from the decreased NADPH levels, and consequently block the first steps of methionine biosynthesis pathway (CHANG and KOSMAN 1990; SLEKAR *et al.* 1996). It has been shown that inactivation of coenzyme Q (Coq1) partially alleviates the lysine auxotrophy of a *sod1Δ* mutant in *S. cerevisiae*, suggesting that *SOD1* does play a role in protection from  $O_2^{\bullet -}$  produced by mitochondrial respiration (LONGO *et al.* 1996). The  $O_2^{\bullet -}$  oxidize 4Fe-4S

clusters of different enzymes such as aconitase (Aco1, a dehydratase of Krebs cycle) (FLINT *et al.* 1993); thus, enzymes in the mitochondrial matrix with 4Fe-4S clusters are subject to reversible inactivation by  $O_2^{\bullet -}$ , resulting in loss of the labile iron atom, leaving a 3Fe-4S cluster (FLINT *et al.* 1993; WALLACE *et al.* 2004). In fungi, lysine is synthesized *de novo* by the alfa-aminoadipate (AAA) pathway (ZABRISKIE and JACKSON 2000), which contains an 4Fe-4S cluster enzyme, homoaconitase (*LYS4*), a likely target for inactivation by  $O_2^{\bullet -}$ . Thus, the lysine auxotrophy in the *sod1Δ* mutant results from the oxidation of the 4Fe-4S cluster of Lys4 resulting in a blockage of AAA pathway in *S. cerevisiae* (WALLACE *et al.* 2004). In contrast in *S. pombe*, it was found that the homocitrate synthase (HCS, first enzyme in the AAA pathway) is the target enzyme causing lysine auxotrophy in the *sod1Δ* mutant. Their overproduction is sufficient to suppress the lysine auxotrophy (KWON *et al.* 2006). In *C. glabrata*, the overexpression of *LYS4*, *LYS12*, *LYS20* or *LYS21* not suppress the lysine auxotrophy in the *sod1Δ sod2Δ* double mutant. This suggests that a different gene or more than one gene of the AAA pathway in *C. glabrata* is responsible for lysine auxotrophy.

Several suppressors or multicopy suppressor overcome the lysine auxotrophy in a *sod1Δ* mutant in *S. cerevisiae*. They include the overexpression of *ATX1* (copper metallochaperone for ATPases), or *ATX2* (Golgi membrane protein involved in manganese homeostasis), or the mutation of *PMR1* ( $Ca^{2+}$  ATPase involved in manganese homeostasis) or *BSD2* (heavy metal ion homeostasis protein) (LIU and CULOTTA 1994; LAPINSKAS *et al.* 1995; LIN and CULOTTA 1995; LIN and CULOTTA 1996). They serve as metal-based mimics for SOD, where the oxidative damage in the *sod1Δ* mutant of *S. cerevisiae* can be prevented through alterations in manganese and copper homeostasis.

Other suppressors called *seo*, (suppressors of endogenous oxidation) have been mapped in *SSQ1*, *JAC1*, *NFS1*, and *ISU1* genes. These genes encode mitochondrial proteins involved in iron-sulfur cluster assembly (STRAIN *et al.* 1998). A recent study suggests that the *seo* mutants over accumulate mitochondrial iron, increasing the expression of genes in the AAA pathway, perhaps through sensing of mitochondrial damage by the retrograde response (JENSEN *et al.* 2004).

## DNA protection

The most consequential impact of SODs is DNA protection. This has been demonstrated through SOD mutant phenotypes on different fungi. In *S. cerevisiae*, the *sod1Δ* and *sod2Δ* mutants show high mutation frequency during SP and aerobic conditions (GRALLA and VALENTINE 1991; LONGO *et al.* 1999). Nevertheless, *sod2Δ* is less mutator than the *sod1Δ* mutant (HUANG *et al.* 2003). Sod1 and its chaperone Ccs1 were also identified as sensitive to DNA-damaging agents such as methyl methanesulfonate (MMS) and hydroxyurea (HU) (CHANG *et al.* 2002; CARTER *et al.* 2005). In *C. glabrata*, SOD mutants exhibited high mutation rate, the single mutants show a twofold elevated comparing to parental, and sevenfold more in the *sod1Δ sod2Δ* double mutant. Moreover, these mutants also show high levels of oxidative stress and sensitivity to the DNA damage agents MMS and HU (BRIONES-MARTIN-DEL-CAMPO *et al.* 2014). In the filamentous fungi *N. crassa*, the *sod1Δ* mutant exhibits an increased spontaneous mutation rate (CHARY *et al.* 1994). Thus, SODs prevent the accumulation of oxidative DNA damage.

Although DNA is an important target for ROS, it is likely that  $O_2^{\bullet-}$  cannot damage DNA directly (BIELSKI 1985). Instead,  $O_2^{\bullet-}$  release an iron atom from [4Fe-4S] clusters, which is now available to participate in the Fenton reaction and produce  $HO\bullet$  (KEYER and IMLAY 1996; LIOCHEV and FRIDOVICH 1999). The  $HO\bullet$  is a highly reactive oxidant which cannot diffuse far from its origin before it reacts. Thus DNA-bound iron is an especially favored target of damage via the Fenton reaction (KEYER *et al.* 1995). It has been shown that SOD mutants of *S. cerevisiae* and *E. coli* contain high levels of intracellular free iron, indicating the marked Fenton-dependent DNA damage (KEYER and IMLAY 1996; SRINIVASAN *et al.* 2000). Thus, SOD prevents the start of the Fenton reaction, thereby preventing mutations in the DNA.

The oxidative damage may occur at the sugars or DNA bases moieties, thereby producing a broad spectrum of lesions. The predominant consequence of sugar damage is an eventual strand breakage and base release (HENLE *et al.* 1995). Relative to the other DNA bases moieties, guanine is particularly vulnerable to oxidation mediated by ROS. The most thoroughly examined guanine oxidation product is 7,8-dihydro-8-oxoguanine (8-oxoG) (NEELEY and ESSIGMANN 2006). The 8-oxoG is prone to mispair with adenine residues, leading to an increased frequency of spontaneous GC to TA mutations. Although

oxidative damage could potentially increase all types of base pair mutations, in a *Scsod1Δ* mutant there are two main types of mutations: single-base substitutions (GC to AT, GC to CG, and GC to TA), and single-base frameshifts (HUANG *et al.* 2003; SHOCKLEY *et al.* 2013). In *C. glabrata*, we found that the mutations that spontaneously arise in the *sod1Δ sod2Δ* mutator strain are mainly of the single-base substitution type (GC to TA and TA to CG) (BRIONES-MARTIN-DEL-CAMPO *et al.* 2014). The GC to TA transversion also is found as one of the most common base substitutions in the *sod1Δ* mutant of *S. cerevisiae* (HUANG *et al.* 2003).

In a global analysis of genetic relationships, genes involved in the OSR and DNA replication were identified as the major guardians against spontaneous DNA damage. Their efficient repair involves DNA-damage checkpoint signaling and multiple DNA-repair pathways (PAN *et al.* 2006). The base excision repair (BER) is the first line of defense against damaged bases by oxidation in the genome (DIZDAROGLU 2005). BER is composed of 8-oxoguanine DNA glycosylase 1 (Ogg1), which remove the 8-oxoG lesions (NASH *et al.* 1996; HUANG and KOLODNER 2005). Recently, a data mining network study showed that Sod2 of *S. cerevisiae* associates with Ogg1 (BONATTO 2007), and another report link SODs with DNA repair showing that the *sod1Δ* mutant downregulate the *MEC1*-mediated checkpoint response (CARTER *et al.* 2005). This pathway participate in DNA damage checkpoint control, by arresting the cell cycle and inducing the transcription of genes that facilitate DNA repair (ELLEDEGE 1996). Moreover, there is a direct association between Sod1 with Mec1 or Dun1 (BONATTO 2007), allowing the transcriptiona of gene involved in DNA synthesis and repair. The DNA damage agents (HU and MMS) activate the *MEC1*-dependent checkpoint response to oxidative damage (BRANZEI and FOIANI 2007). In addition to the *MEC1* pathway, BER also has been implicated in the response to MMS-induced damage (XIAO *et al.* 1996).

Recently, an important finding shows that ROS induces Sod1 nuclear localization, which is crucial to protect against DNA oxidative damage. The ROS signaling is mediated by Mec1 and Dun1, where Dun1 interacts with Sod1. Furthermore, the nuclear Sod1 regulates the expression of OSR and DNA repair genes in yeast and humans (TSANG *et al.* 2014). Collectively, these findings demonstrate that SODs have a critical role not only in protecting DNA integrity but also in regulating the expression of the repair pathways.

## Aging

In SP, cells obtain energy from mitochondrial respiration with subsequent generation of  $O_2^{\bullet-}$  (LONGO *et al.* 1999). The accumulation of oxidative damage caused by  $O_2^{\bullet-}$  is thought to be one the major contributor to aging (LONGO *et al.* 1999). All organisms are subject to a gradual deterioration of the physiological functions leading to the aging process. The deleterious effects of  $O_2^{\bullet-}$  highlights the importance of the enzymes required for detoxification of this ROS. Thus, the Sods are central enzymes in aging. The yeast cells accumulate DNA damage during the aging process and the SODs play a critical role in preserving the genomic integrity (MUID *et al.* 2014).

SODs mutations have been associated with a general pattern of premature aging in model organisms. In mice, the lack of MnSOD, causes dilated cardiomyopathy and neonatal death (LI *et al.* 1995). Moreover, a 50% reduction in MnSOD activity increases oxidative DNA damage in nuclear and mitochondrial DNA, leading to aging (VAN REMMEN *et al.* 2003). In contrast, mice lacking the CuZnSOD (*Sod1*<sup>-/-</sup>) showed no overt abnormalities during development, but showed a reduced lifespan and development liver tumors (ELCHURI *et al.* 2005). In invertebrates, the Cu/Zn SOD -null mutant of *Drosophila melanogaster* shows a reduced adult life span, hypersensitivity to oxidative stress, loss of aconitase activity, and increase spontaneous mutation rates (PHILLIPS *et al.* 1989; WOODRUFF *et al.* 2004). Moreover, Cu/Zn SOD overexpression extends the mean life span (FABRIZIO *et al.* 2003).

Yeast cells have been used as a model organism to study the role of the SODs in aging. Aging in *S. cerevisiae* is analyzed by their replicative life span (RLS) and their chronological life span (CLS). RLS is the total number of daughter cells that a single mother cell can generate. On the other hand, CLS is the longevity of a cell population that is not dividing (SP cells) but retains the ability to re-enter the cell cycle in the presence of nutrients (KAEBERLEIN *et al.* 2007). The SODs are required for both RLS and CLS survival (LONGO *et al.* 1996; UNLU and KOC 2007). ScSod2 is required under both low and normal oxygen conditions, whereas cytoplasmic ScSod1 is mainly required under normal aeration (LONGO *et al.* 1996). In addition, SODs overexpression in *S. cerevisiae* extends life span and delays the loss of aconitase activity (FABRIZIO *et al.* 2001; FABRIZIO *et al.* 2003). The

aconitase (Aco1) is the only protein in the mitochondrial matrix that shows age-associated carbonylation and consequently the loss of its activity (YAN *et al.* 1997). Furthermore, Aco1 is required for mitochondrial DNA (mtDNA) maintenance (CHEN *et al.* 2005). The activity of Aco1 is regulated by its redox reactive Fe-S center (BULTEAU *et al.* 2003). This disruption of Aco1 Fe-S center by ROS, indicate mitochondrial damage and this is signaled to the nucleus for reprogramming of gene expression leading to apoptosis.

In *C. glabrata*, the *sod2* $\Delta$  mutant lost 90% of viability after 9 days in minimal media, and the *sod1* $\Delta$  lost between 25% and 50% of viability under the same conditions (BRIONES-MARTIN-DEL-CAMPO *et al.* 2014). Interestingly, there is also a decrease in viability in SP when the synthesis of glutathione is compromised (GUTIERREZ-ESCOBEDO *et al.* 2013). In *S. pombe* the *sod1* $\Delta$  *gsh1* $\Delta$  double mutant (*GSH1* encode to  $\gamma$ -glutamyl-cysteine synthetase involved in glutathione biosynthesis) is more sensitive to MD and lost viability upon entry into SP, compared to the single mutants (MUTOH and KITAJIMA 2007). In contrast, the *SOD2* role in aging has not been reported for *S. pombe* (JEONG *et al.* 2001). In *C. neoformans var. gattii*, *SOD2* rather than *SOD1* was shown to be essential for survival during the stationary phase, specially in the presence of an increase of mitochondrial ROS (NARASIPURA *et al.* 2003; NARASIPURA *et al.* 2005). In filamentous fungi, there is evidence of the importance of Sods in aging. The *A. fumigatus* *sod1* $\Delta$  *sod2* $\Delta$  *sod3* $\Delta$  triple mutant shows a delay in conidial germination. Moreover, the viability of the conidia is affected during storage under aerobic conditions. This mutant lost all its viability after one year compared to only 3% of the parental strain under the same conditions (LAMBOU *et al.* 2010). In *N. crassa*, the activities of the SODs, the catalases, and the glutathione peroxidases are highly-correlated with conidial lifespan (MUNKRES *et al.* 1984). During the senescence of the filamentous fungus *Podospora anserina*, the activity of PaSOD2 decreases, whereas the activity of the cytoplasmic Cu, Zn-SOD1 (PaSOD1) increases (BORGHOUTS *et al.* 2001).

## Virulence

Several studies suggest that the OSR of diverse pathogens is directly related to pathogenicity and survival to the respiratory burst in phagocytes. SODs contribute to the virulence of many bacteria and fungal pathogens by counteracting deleterious effects of ROS and evading killing by phagocytes (MILLER and BRITIGAN 1997). Sod1 and Sod2 of *C. neoformans* var. *gattii*, *C. n* var. *neoformans*, and Sod1 and Sod5 of *C. albicans* are required for full virulence in a mouse model infection (NARASIPURA *et al.* 2003; MARTCHENKO *et al.* 2004; GILES *et al.* 2005; NARASIPURA *et al.* 2005). In *H. capsulatum*, HcSod3 protects cells from ROS-derived from phagocytes and deletion of its encoding gene reduces fungal virulence (YOUSEFF *et al.* 2012). The *sod1* $\Delta$  mutant of *C. neoformans* and *sod1* $\Delta$ , *sod4* $\Delta$ , and *sod5* $\Delta$  of *C. albicans* are significantly susceptible to killing by phagocytes (HWANG *et al.* 2002; NARASIPURA *et al.* 2003; FROHNER *et al.* 2009). In addition, the *sod1* $\Delta$  mutant of *C. neoformans* is defective in the production of several virulence factors, i.e. laccase, urease and phospholipase (NARASIPURA *et al.* 2003). In contrast, *CTA1*, *SOD1* and *SOD2* are dispensable for colonization in a murine model of *C. glabrata* infection (BRIONES-MARTIN-DEL-CAMPO *et al.* 2014); only the concomitant absence of *CgYAPI* and *CgSOD1* is detrimental to yeast survival in a primary mouse macrophage infection model (ROETZER *et al.* 2011).

In *A. fumigatus*, SODs are recognized by infected human sera, serving mainly as antigens for IgA (HOLDOM *et al.* 2000). Moreover, the triple *sod1* $\Delta$  *sod2* $\Delta$  *sod3* $\Delta$  mutant is sensitive to killing by alveolar macrophage in immunocompetent mice but show no defect in pathogenicity in murine aspergillosis models in immunocompromised animals (LAMBOU *et al.* 2010).

## **Conclusions**

It have been demonstrated that the role of SODs in cells is of critical importance. They are necessary to avoid the deleterious effect of superoxide and protect cells from oxidant damage. Because of this, SODs are involved in different parts of metabolism such as DNA integrity and repair, amino acid pathways, stress response, normal growth, metals regulation, protection of Fe-S cluster containing- enzymes, and microbial pathogenesis. The



role of SODs correlates with their cellular localization. Thus, the intracellular SODs are involved in detoxifying superoxide, and the extracellular SODs are important to avoid exogenous oxidative stress. Moreover, the mitochondrial SODs prevent the superoxide accumulation and the consequent respiration-related aging. Although the SODs have been deeply studied in model yeast like *S. cerevisiae*, more work is needed to characterize these enzymes in pathogenic yeasts and in particular in filamentous fungi.

## References

- Abrashev R, Dolashka P, Christova R, Stefanova L & Angelova M (2005) Role of antioxidant enzymes in survival of conidiospores of *Aspergillus niger* 26 under conditions of temperature stress. *J Appl Microbiol* **99**: 902-909.
- Abrashev RI, Pashova SB, Stefanova LN, Vassilev SV, Dolashka-Angelova PA & Angelova MB (2008) Heat-shock-induced oxidative stress and antioxidant response in *Aspergillus niger* 26. *Can J Microbiol* **54**: 977-983.
- Angelova MB, Pashova SB, Spasova BK, Vassilev SV & Slokoska LS (2005) Oxidative stress response of filamentous fungi induced by hydrogen peroxide and paraquat. *Mycol Res* **109**: 150-158.
- Barondeau DP, Kassmann CJ, Bruns CK, Tainer JA & Getzoff ED (2004) Nickel superoxide dismutase structure and mechanism. *Biochemistry* **43**: 8038-8047.
- Bartnikas TB & Gitlin JD (2003) Mechanisms of biosynthesis of mammalian copper/zinc superoxide dismutase. *J Biol Chem* **278**: 33602-33608.
- Bielski BH (1985) Fast kinetic studies of dioxygen-derived species and their metal complexes. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* **311**: 473-482.
- Bilinski T, Krawiec Z, Liczmanski A & Litwinska J (1985) Is hydroxyl radical generated by the Fenton reaction in vivo? *Biochem Biophys Res Commun* **130**: 533-539.
- Bonatto D (2007) A systems biology analysis of protein-protein interactions between yeast superoxide dismutases and DNA repair pathways. *Free Radic Biol Med* **43**: 557-567.
- Bordo D, Djinic K & Bolognesi M (1994) Conserved patterns in the Cu,Zn superoxide dismutase family. *J Mol Biol* **238**: 366-386.
- Borghouts C, Werner A, Elthon T & Osiewacz HD (2001) Copper-modulated gene expression and senescence in the filamentous fungus *Podospora anserina*. *Mol Cell Biol* **21**: 390-399.
- Borgstahl GE, Parge HE, Hickey MJ, Beyer WF, Jr., Hallewell RA & Tainer JA (1992) The structure of human mitochondrial manganese superoxide dismutase reveals a novel tetrameric interface of two 4-helix bundles. *Cell* **71**: 107-118.
- Branzei D & Foiani M (2007) Interplay of replication checkpoints and repair proteins at stalled replication forks. *DNA Repair (Amst)* **6**: 994-1003.
- Briones-Martin-Del-Campo M, Orta-Zavalza E, Canas-Villamar I, Gutierrez-Escobedo G, Juarez-Cepeda J, Robledo-Marquez K, Arroyo-Helguera O, Castano I & De Las Penas A (2014) The superoxide dismutases of *Candida glabrata* protect against oxidative damage and are required for lysine biosynthesis, DNA integrity and chronological life survival. *Microbiology*.

- Bulteau AL, Ikeda-Saito M & Szweda LI (2003) Redox-dependent modulation of aconitase activity in intact mitochondria. *Biochemistry* **42**: 14846-14855.
- Carroll MC, Girouard JB, Ulloa JL, Subramaniam JR, Wong PC, Valentine JS & Culotta VC (2004) Mechanisms for activating Cu- and Zn-containing superoxide dismutase in the absence of the CCS Cu chaperone. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**: 5964-5969.
- Carter CD, Kitchen LE, Au WC, Babic CM & Basrai MA (2005) Loss of SOD1 and LYS7 sensitizes *Saccharomyces cerevisiae* to hydroxyurea and DNA damage agents and downregulates MEC1 pathway effectors. *Mol Cell Biol* **25**: 10273-10285.
- Casteilla L, Rigoulet M & Penicaud L (2001) Mitochondrial ROS metabolism: modulation by uncoupling proteins. *IUBMB Life* **52**: 181-188.
- Cohen A, Nelson H & Nelson N (2000) The family of SMF metal ion transporters in yeast cells. *J Biol Chem* **275**: 33388-33394.
- Costa V, Amorim MA, Reis E, Quintanilha A & Moradas-Ferreira P (1997) Mitochondrial superoxide dismutase is essential for ethanol tolerance of *Saccharomyces cerevisiae* in the post-diauxic phase. *Microbiology* **143** ( Pt 5): 1649-1656.
- Cox GM, Harrison TS, McDade HC, Taborda CP, Heinrich G, Casadevall A & Perfect JR (2003) Superoxide dismutase influences the virulence of *Cryptococcus neoformans* by affecting growth within macrophages. *Infect Immun* **71**: 173-180.
- Cuellar-Cruz M, Briones-Martin-del-Campo M, Canas-Villamar I, Montalvo-Arredondo J, Riego-Ruiz L, Castano I & De Las Penas A (2008) High resistance to oxidative stress in the fungal pathogen *Candida glabrata* is mediated by a single catalase, Cta1p, and is controlled by the transcription factors Yap1p, Skn7p, Msn2p, and Msn4p. *Eukaryot Cell* **7**: 814-825.
- Cuéllar-Cruz M, Castaño I, Arroyo-Helguera O & De Las Peñas A (2009) Oxidative stress response to menadione and cumene hydroperoxide in the opportunistic fungal pathogen *Candida glabrata*. *Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro* **104**: 649-654.
- Culotta VC (2000) Superoxide dismutase, oxidative stress, and cell metabolism. *Curr Top Cell Regul* **36**: 117-132.
- Cyrne L, Martins L, Fernandes L & Marinho HS (2003) Regulation of antioxidant enzymes gene expression in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* during stationary phase. *Free Radic Biol Med* **34**: 385-393.
- Chang EC & Kosman DJ (1990) O<sub>2</sub>-dependent methionine auxotrophy in Cu,Zn superoxide dismutase-deficient mutants of *Saccharomyces cerevisiae*. *J Bacteriol* **172**: 1840-1845.
- Chang M, Bellaoui M, Boone C & Brown GW (2002) A genome-wide screen for methyl methanesulfonate-sensitive mutants reveals genes required for S phase progression in the presence of DNA damage. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**: 16934-16939.
- Chary P, Dillon D, Schroeder AL & Natvig DO (1994) Superoxide dismutase (sod-1) null mutants of *Neurospora crassa*: oxidative stress sensitivity, spontaneous mutation rate and response to mutagens. *Genetics* **137**: 723-730.
- Chen XJ, Wang X, Kaufman BA & Butow RA (2005) Aconitase couples metabolic regulation to mitochondrial DNA maintenance. *Science* **307**: 714-717.
- Diez B, Schleissner C, Moreno MA, Rodriguez M, Collados A & Barredo JL (1998) The manganese superoxide dismutase from the penicillin producer *Penicillium chrysogenum*. *Curr Genet* **33**: 387-394.
- Dizdaroglu M (2005) Base-excision repair of oxidative DNA damage by DNA

- glycosylases. *Mutat Res* **591**: 45-59.
- Dziadkowiec D, Krasowska A, Liebner A & Sigler K (2007) Protective role of mitochondrial superoxide dismutase against high osmolarity, heat and metalloid stress in *Saccharomyces cerevisiae*. *Folia Microbiol (Praha)* **52**: 120-126.
- Eitinger T (2004) In vivo production of active nickel superoxide dismutase from *Prochlorococcus marinus* MIT9313 is dependent on its cognate peptidase. *J Bacteriol* **186**: 7821-7825.
- Elchuri S, Oberley TD, Qi W, Eisenstein RS, Jackson Roberts L, Van Remmen H, Epstein CJ & Huang TT (2005) CuZnSOD deficiency leads to persistent and widespread oxidative damage and hepatocarcinogenesis later in life. *Oncogene* **24**: 367-380.
- Elledge SJ (1996) Cell cycle checkpoints: preventing an identity crisis. *Science* **274**: 1664-1672.
- Emri T, Pocsi I & Szentirmai A (1999) Analysis of the oxidative stress response of *Penicillium chrysogenum* to menadione. *Free Radic Res* **30**: 125-132.
- Estruch F (2000) Stress-controlled transcription factors, stress-induced genes and stress tolerance in budding yeast. *FEMS Microbiol Rev* **24**: 469-486.
- Fabrizio P, Pozza F, Pletcher SD, Gendron CM & Longo VD (2001) Regulation of longevity and stress resistance by Sch9 in yeast. *Science* **292**: 288-290.
- Fabrizio P, Liou LL, Moy VN, Diaspro A, Valentine JS, Gralla EB & Longo VD (2003) SOD2 functions downstream of Sch9 to extend longevity in yeast. *Genetics* **163**: 35-46.
- Fanning S, Xu W, Solis N, Woolford CA, Filler SG & Mitchell AP (2012) Divergent targets of *Candida albicans* biofilm regulator Bcr1 in vitro and in vivo. *Eukaryot Cell* **11**: 896-904.
- Flattery-O'Brien JA, Grant CM & Dawes IW (1997) Stationary-phase regulation of the *Saccharomyces cerevisiae* SOD2 gene is dependent on additive effects of HAP2/3/4/5- and STRE-binding elements. *Mol Microbiol* **23**: 303-312.
- Flint DH, Tuminello JF & Emptage MH (1993) The inactivation of Fe-S cluster containing hydro-lyases by superoxide. *J Biol Chem* **268**: 22369-22376.
- Fradin C, De Groot P, MacCallum D, Schaller M, Klis F, Odds FC & Hube B (2005) Granulocytes govern the transcriptional response, morphology and proliferation of *Candida albicans* in human blood. *Mol Microbiol* **56**: 397-415.
- Frealle E, Noel C, Viscogliosi E, Camus D, Dei-Cas E & Delhaes L (2005) Manganese superoxide dismutase in pathogenic fungi: an issue with pathophysiological and phylogenetic involvements. *FEMS Immunol Med Microbiol* **45**: 411-422.
- Frealle E, Noel C, Nolard N, Symoens F, Felipe MS, Dei-Cas E, Camus D, Viscogliosi E & Delhaes L (2006) Manganese superoxide dismutase based phylogeny of pathogenic fungi. *Mol Phylogenet Evol* **41**: 28-39.
- Fridovich I (1995) Superoxide radical and superoxide dismutases. *Annu Rev Biochem* **64**: 97-112.
- Frohner IE, Bourgeois C, Yatsyk K, Majer O & Kuchler K (2009) *Candida albicans* cell surface superoxide dismutases degrade host-derived reactive oxygen species to escape innate immune surveillance. *Mol Microbiol* **71**: 240-252.
- Galiazzo F & Labbe-Bois R (1993) Regulation of Cu,Zn- and Mn-superoxide dismutase transcription in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett* **315**: 197-200.
- Getzoff ED, Tainer JA, Weiner PK, Kollman PA, Richardson JS & Richardson DC (1983) Electrostatic recognition between superoxide and copper, zinc superoxide dismutase.

- Nature* **306**: 287-290.
- Getzoff ED, Cabelli DE, Fisher CL, Parge HE, Viezzoli MS, Banci L & Hallewell RA (1992) Faster superoxide dismutase mutants designed by enhancing electrostatic guidance. *Nature* **358**: 347-351.
- Giles SS, Batinic-Haberle I, Perfect JR & Cox GM (2005) Cryptococcus neoformans mitochondrial superoxide dismutase: an essential link between antioxidant function and high-temperature growth. *Eukaryot Cell* **4**: 46-54.
- Ginsberg MD, Feliciello A, Jones JK, Avvedimento EV & Gottesman ME (2003) PKA-dependent binding of mRNA to the mitochondrial AKAP121 protein. *J Mol Biol* **327**: 885-897.
- Gleason JE, Li CX, Odeh HM & Culotta VC (2014) Species-specific activation of Cu/Zn SOD by its CCS copper chaperone in the pathogenic yeast *Candida albicans*. *J Biol Inorg Chem* **19**: 595-603.
- Gleason JE, Galaldeen A, Peterson RL, Taylor AB, Holloway SP, Waninger-Saroni J, Cormack BP, Cabelli DE, Hart PJ & Culotta VC (2014) *Candida albicans* SOD5 represents the prototype of an unprecedented class of Cu-only superoxide dismutases required for pathogen defense. *Proc Natl Acad Sci U S A* **111**: 5866-5871.
- Gonzalez-Parraga P, Hernandez JA & Arguelles JC (2003) Role of antioxidant enzymatic defences against oxidative stress H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and the acquisition of oxidative tolerance in *Candida albicans*. *Yeast* **20**: 1161-1169.
- Grace SC (1990) Phylogenetic distribution of superoxide dismutase supports an endosymbiotic origin for chloroplasts and mitochondria. *Life Sci* **47**: 1875-1886.
- Gralla EB & Valentine JS (1991) Null mutants of *Saccharomyces cerevisiae* Cu,Zn superoxide dismutase: characterization and spontaneous mutation rates. *J Bacteriol* **173**: 5918-5920.
- Gralla EB & Kosman DJ (1992) Molecular genetics of superoxide dismutases in yeasts and related fungi. *Adv Genet* **30**: 251-319.
- Gross DP, Burgard CA, Reddehase S, Leitch JM, Culotta VC & Hell K (2011) Mitochondrial Ccs1 contains a structural disulfide bond crucial for the import of this unconventional substrate by the disulfide relay system. *Mol Biol Cell* **22**: 3758-3767.
- Gunasekaran U, Yang R & Gunasekaran M (1998) Regulation of superoxide dismutase synthesis in *Candida albicans*. *Mycopathologia* **141**: 59-63.
- Gutierrez-Escobedo G, Orta-Zavalza E, Castano I & De Las Penas A (2013) Role of glutathione in the oxidative stress response in the fungal pathogen *Candida glabrata*. *Curr Genet* **59**: 91-106.
- Hamilton AJ & Holdom MD (1997) Biochemical comparison of the Cu,Zn superoxide dismutases of *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans* and *Cryptococcus neoformans* var. *gattii*. *Infect Immun* **65**: 488-494.
- Hamilton AJ, Holdom MD & Jeavons L (1996) Expression of the Cu,Zn superoxide dismutase of *Aspergillus fumigatus* as determined by immunochemistry and immunoelectron microscopy. *FEMS Immunol Med Microbiol* **14**: 95-102.
- Hampton MB, Kettle AJ & Winterbourn CC (1998) Inside the neutrophil phagosome: oxidants, myeloperoxidase, and bacterial killing. *Blood* **92**: 3007-3017.
- Henle ES, Roots R, Holley WR & Chatterjee A (1995) DNA strand breakage is correlated with unaltered base release after gamma irradiation. *Radiat Res* **143**: 144-150.
- Herker E, Jungwirth H, Lehmann KA, Maldener C, Frohlich KU, Wissing S, Buttner S,

- Fehr M, Sigrist S & Madeo F (2004) Chronological aging leads to apoptosis in yeast. *J Cell Biol* **164**: 501-507.
- Holbrook ED, Edwards JA, Youseff BH & Rappleye CA (2011) Definition of the extracellular proteome of pathogenic-phase *Histoplasma capsulatum*. *J Proteome Res* **10**: 1929-1943.
- Holdom MD, Hay RJ & Hamilton AJ (1996) The Cu,Zn superoxide dismutases of *Aspergillus flavus*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus nidulans*, and *Aspergillus terreus*: purification and biochemical comparison with the *Aspergillus fumigatus* Cu,Zn superoxide dismutase. *Infect Immun* **64**: 3326-3332.
- Holdom MD, Lechenne B, Hay RJ, Hamilton AJ & Monod M (2000) Production and characterization of recombinant *Aspergillus fumigatus* Cu,Zn superoxide dismutase and its recognition by immune human sera. *J Clin Microbiol* **38**: 558-562.
- Huang ME & Kolodner RD (2005) A biological network in *Saccharomyces cerevisiae* prevents the deleterious effects of endogenous oxidative DNA damage. *Mol Cell* **17**: 709-720.
- Huang ME, Rio AG, Nicolas A & Kolodner RD (2003) A genomewide screen in *Saccharomyces cerevisiae* for genes that suppress the accumulation of mutations. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**: 11529-11534.
- Hwang CS, Baek YU, Yim HS & Kang SO (2003) Protective roles of mitochondrial manganese-containing superoxide dismutase against various stresses in *Candida albicans*. *Yeast* **20**: 929-941.
- Hwang CS, Rhie GE, Oh JH, Huh WK, Yim HS & Kang SO (2002) Copper- and zinc-containing superoxide dismutase (Cu/ZnSOD) is required for the protection of *Candida albicans* against oxidative stresses and the expression of its full virulence. *Microbiology* **148**: 3705-3713.
- Imlay JA & Fridovich I (1991) Superoxide production by respiring membranes of *Escherichia coli*. *Free Radic Res Commun* **12-13 Pt 1**: 59-66.
- Jensen LT, Sanchez RJ, Srinivasan C, Valentine JS & Culotta VC (2004) Mutations in *Saccharomyces cerevisiae* iron-sulfur cluster assembly genes and oxidative stress relevant to Cu,Zn superoxide dismutase. *J Biol Chem* **279**: 29938-29943.
- Jeong JH, Kwon ES & Roe JH (2001) Characterization of the manganese-containing superoxide dismutase and its gene regulation in stress response of *Schizosaccharomyces pombe*. *Biochem Biophys Res Commun* **283**: 908-914.
- Jung HI, Lee YY, Lim HW, Ahn KS, Park EH & Lim CJ (2002) Regulation of the manganese-containing superoxide dismutase gene from fission yeast. *Mol Cells* **14**: 300-304.
- Kaeberlein M, Burtner CR & Kennedy BK (2007) Recent developments in yeast aging. *PLoS Genet* **3**: e84.
- Keyer K & Imlay JA (1996) Superoxide accelerates DNA damage by elevating free-iron levels. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**: 13635-13640.
- Keyer K, Gort AS & Imlay JA (1995) Superoxide and the production of oxidative DNA damage. *J Bacteriol* **177**: 6782-6790.
- Kloppel C, Suzuki Y, Kojer K, Petrunaro C, Longen S, Fiedler S, Keller S & Riemer J (2011) Mia40-dependent oxidation of cysteines in domain I of Ccs1 controls its distribution between mitochondria and the cytosol. *Mol Biol Cell* **22**: 3749-3757.
- Koziol S, Zagulski M, Bilinski T & Bartosz G (2005) Antioxidants protect the yeast

- Saccharomyces cerevisiae* against hypertonic stress. *Free Radic Res* **39**: 365-371.
- Kwon ES, Jeong JH & Roe JH (2006) Inactivation of homocitrate synthase causes lysine auxotrophy in copper/zinc-containing superoxide dismutase-deficient yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *J Biol Chem* **281**: 1345-1351.
- Laliberte J, Whitson LJ, Beaudoin J, Holloway SP, Hart PJ & Labbe S (2004) The *Schizosaccharomyces pombe* Pccs protein functions in both copper trafficking and metal detoxification pathways. *J Biol Chem* **279**: 28744-28755.
- Lamarre C, LeMay JD, Deslauriers N & Bourbonnais Y (2001) *Candida albicans* expresses an unusual cytoplasmic manganese-containing superoxide dismutase (SOD3 gene product) upon the entry and during the stationary phase. *J Biol Chem* **276**: 43784-43791.
- Lamb AL, Wernimont AK, Pufahl RA, Culotta VC, O'Halloran TV & Rosenzweig AC (1999) Crystal structure of the copper chaperone for superoxide dismutase. *Nat Struct Biol* **6**: 724-729.
- Lambou K, Lamarre C, Beau R, Dufour N & Latge JP (2010) Functional analysis of the superoxide dismutase family in *Aspergillus fumigatus*. *Mol Microbiol* **75**: 910-923.
- Lapinskas PJ, Cunningham KW, Liu XF, Fink GR & Culotta VC (1995) Mutations in PMR1 suppress oxidative damage in yeast cells lacking superoxide dismutase. *Mol Cell Biol* **15**: 1382-1388.
- Lee J, Kwon ES, Kim DW, Cha J & Roe JH (2002) Regulation and the role of Cu,Zn-containing superoxide dismutase in cell cycle progression of *Schizosaccharomyces pombe*. *Biochem Biophys Res Commun* **297**: 854-862.
- Lee J, Godon C, Lagniel G, Spector D, Garin J, Labarre J & Toledano MB (1999) Yap1 and Skn7 control two specialized oxidative stress response regulons in yeast. *J Biol Chem* **274**: 16040-16046.
- Lee JH, Choi IY, Kil IS, Kim SY, Yang ES & Park JW (2001) Protective role of superoxide dismutases against ionizing radiation in yeast. *Biochim Biophys Acta* **1526**: 191-198.
- Li Y, Huang TT, Carlson EJ, *et al.* (1995) Dilated cardiomyopathy and neonatal lethality in mutant mice lacking manganese superoxide dismutase. *Nat Genet* **11**: 376-381.
- Lin SJ & Culotta VC (1995) The ATX1 gene of *Saccharomyces cerevisiae* encodes a small metal homeostasis factor that protects cells against reactive oxygen toxicity. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**: 3784-3788.
- Lin SJ & Culotta VC (1996) Suppression of oxidative damage by *Saccharomyces cerevisiae* ATX2, which encodes a manganese-trafficking protein that localizes to Golgi-like vesicles. *Mol Cell Biol* **16**: 6303-6312.
- Liochev SI & Fridovich I (1999) Superoxide and iron: partners in crime. *IUBMB Life* **48**: 157-161.
- Liu X, Zhang X & Zhang Z (2010) Cu,Zn-superoxide dismutase is required for cell wall structure and for tolerance to cell wall-perturbing agents in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett* **584**: 1245-1250.
- Liu XF & Culotta VC (1994) The requirement for yeast superoxide dismutase is bypassed through mutations in BSD2, a novel metal homeostasis gene. *Mol Cell Biol* **14**: 7037-7045.
- Longo VD, Gralla EB & Valentine JS (1996) Superoxide dismutase activity is essential for stationary phase survival in *Saccharomyces cerevisiae*. Mitochondrial production of toxic oxygen species in vivo. *J Biol Chem* **271**: 12275-12280.

- Longo VD, Liou LL, Valentine JS & Gralla EB (1999) Mitochondrial superoxide decreases yeast survival in stationary phase. *Arch Biochem Biophys* **365**: 131-142.
- Luk E, Yang M, Jensen LT, Bourbonnais Y & Culotta VC (2005) Manganese activation of superoxide dismutase 2 in the mitochondria of *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* **280**: 22715-22720.
- Lynch M & Kuramitsu H (2000) Expression and role of superoxide dismutases (SOD) in pathogenic bacteria. *Microbes Infect* **2**: 1245-1255.
- Manfredini V, Roehrs R, Peralba MC, Henriques JA, Saffi J, Ramos AL & Benfato MS (2004) Glutathione peroxidase induction protects *Saccharomyces cerevisiae* sod1 $\Delta$ sod2 $\Delta$  double mutants against oxidative damage. *Braz J Med Biol Res* **37**: 159-165.
- Mansour MK & Levitz SM (2002) Interactions of fungi with phagocytes. *Curr Opin Microbiol* **5**: 359-365.
- Martchenko M, Alarco AM, Harcus D & Whiteway M (2004) Superoxide dismutases in *Candida albicans*: transcriptional regulation and functional characterization of the hyphal-induced SOD5 gene. *Mol Biol Cell* **15**: 456-467.
- Matsuyama A, Arai R, Yashiroda Y, *et al.* (2006) ORFeome cloning and global analysis of protein localization in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Nat Biotechnol* **24**: 841-847.
- McCord JM & Fridovich I (1969) Superoxide dismutase. An enzymic function for erythrocyte hemoglobin (hemocuprein). *J Biol Chem* **244**: 6049-6055.
- Meneghini R (1997) Iron homeostasis, oxidative stress, and DNA damage. *Free Radic Biol Med* **23**: 783-792.
- Miller RA & Britigan BE (1997) Role of oxidants in microbial pathophysiology. *Clin Microbiol Rev* **10**: 1-18.
- Miramon P, Dunker C, Windecker H, Bohovych IM, Brown AJ, Kurzai O & Hube B (2012) Cellular responses of *Candida albicans* to phagocytosis and the extracellular activities of neutrophils are critical to counteract carbohydrate starvation, oxidative and nitrosative stress. *PLoS One* **7**: e52850.
- Muid KA, Karakaya HC & Koc A (2014) Absence of superoxide dismutase activity causes nuclear DNA fragmentation during the aging process. *Biochem Biophys Res Commun* **444**: 260-263.
- Munkres KD, Rana RS & Goldstein E (1984) Genetically determined conidial longevity is positively correlated with superoxide dismutase, catalase, glutathione peroxidase, cytochrome c peroxidase, and ascorbate free radical reductase activities in *Neurospora crassa*. *Mech Ageing Dev* **24**: 83-100.
- Mutoh N & Kitajima S (2007) Accelerated chronological aging of a mutant fission yeast deficient in both glutathione and superoxide dismutase having Cu and Zn as cofactors and its enhancement by sir2 deficiency. *Biosci Biotechnol Biochem* **71**: 2841-2844.
- Narasipura SD, Chaturvedi V & Chaturvedi S (2005) Characterization of *Cryptococcus neoformans* variety *gattii* SOD2 reveals distinct roles of the two superoxide dismutases in fungal biology and virulence. *Mol Microbiol* **55**: 1782-1800.
- Narasipura SD, Ault JG, Behr MJ, Chaturvedi V & Chaturvedi S (2003) Characterization of Cu,Zn superoxide dismutase (SOD1) gene knock-out mutant of *Cryptococcus neoformans* var. *gattii*: role in biology and virulence. *Mol Microbiol* **47**: 1681-1694.
- Nash HM, Bruner SD, Scharer OD, Kawate T, Addona TA, Spooner E, Lane WS &

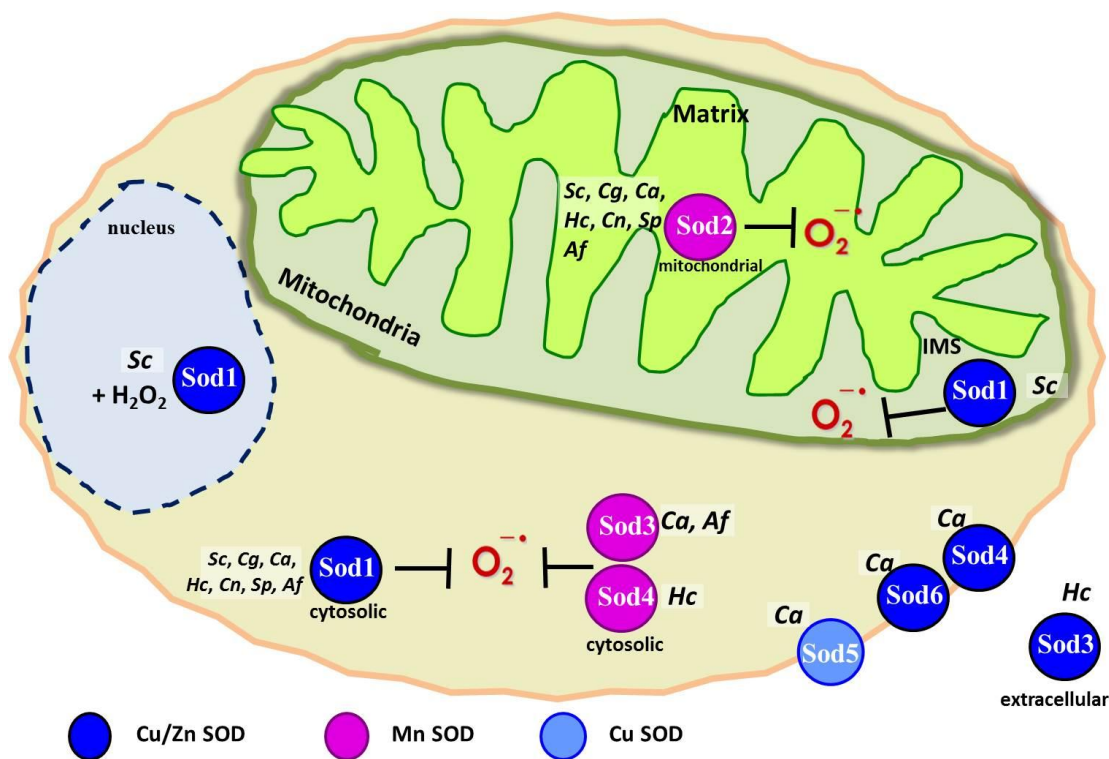
- Verdine GL (1996) Cloning of a yeast 8-oxoguanine DNA glycosylase reveals the existence of a base-excision DNA-repair protein superfamily. *Curr Biol* **6**: 968-980.
- Nedeva TS, Petrova VY, Zamfirova DR, Stephanova EV & Kujumdzieva AV (2004) Cu/Zn superoxide dismutase in yeast mitochondria - a general phenomenon. *FEMS Microbiol Lett* **230**: 19-25.
- Neeley WL & Essigmann JM (2006) Mechanisms of formation, genotoxicity, and mutation of guanine oxidation products. *Chem Res Toxicol* **19**: 491-505.
- Nikolaou E, Agrafioti I, Stumpf M, Quinn J, Stansfield I & Brown AJ (2009) Phylogenetic diversity of stress signalling pathways in fungi. *BMC Evol Biol* **9**: 44.
- O'Brien KM, Dirmeier R, Engle M & Poyton RO (2004) Mitochondrial protein oxidation in yeast mutants lacking manganese-(MnSOD) or copper- and zinc-containing superoxide dismutase (CuZnSOD): evidence that MnSOD and CuZnSOD have both unique and overlapping functions in protecting mitochondrial proteins from oxidative damage. *J Biol Chem* **279**: 51817-51827.
- Pan X, Ye P, Yuan DS, Wang X, Bader JS & Boeke JD (2006) A DNA integrity network in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Cell* **124**: 1069-1081.
- Parker MW & Blake CC (1988) Iron- and manganese-containing superoxide dismutases can be distinguished by analysis of their primary structures. *FEBS Lett* **229**: 377-382.
- Pereira MD, Eleutherio EC & Panek AD (2001) Acquisition of tolerance against oxidative damage in *Saccharomyces cerevisiae*. *BMC Microbiol* **1**: 11.
- Phillips JP, Campbell SD, Michaud D, Charbonneau M & Hilliker AJ (1989) Null mutation of copper/zinc superoxide dismutase in *Drosophila* confers hypersensitivity to paraquat and reduced longevity. *Proc Natl Acad Sci U S A* **86**: 2761-2765.
- Pinkham JL, Wang Z & Alsina J (1997) Heme regulates SOD2 transcription by activation and repression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Curr Genet* **31**: 281-291.
- Portnoy ME, Liu XF & Culotta VC (2000) *Saccharomyces cerevisiae* expresses three functionally distinct homologues of the nramp family of metal transporters. *Mol Cell Biol* **20**: 7893-7902.
- Portnoy ME, Schmidt PJ, Rogers RS & Culotta VC (2001) Metal transporters that contribute copper to metallochaperones in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Genet Genomics* **265**: 873-882.
- Rae TD, Schmidt PJ, Pufahl RA, Culotta VC & O'Halloran TV (1999) Undetectable intracellular free copper: the requirement of a copper chaperone for superoxide dismutase. *Science* **284**: 805-808.
- Reddehase S, Grumbt B, Neupert W & Hell K (2009) The disulfide relay system of mitochondria is required for the biogenesis of mitochondrial Ccs1 and Sod1. *J Mol Biol* **385**: 331-338.
- Reddi AR & Culotta VC (2013) SOD1 integrates signals from oxygen and glucose to repress respiration. *Cell* **152**: 224-235.
- Rhie GE, Hwang CS, Brady MJ, Kim ST, Kim YR, Huh WK, Baek YU, Lee BH, Lee JS & Kang SO (1999) Manganese-containing superoxide dismutase and its gene from *Candida albicans*. *Biochim Biophys Acta* **1426**: 409-419.
- Roetzer A, Klopff E, Gratz N, Marcet-Houben M, Hiller E, Rupp S, Gabaldon T, Kovarik P & Schuller C (2011) Regulation of *Candida glabrata* oxidative stress resistance is adapted to host environment. *FEBS Lett* **585**: 319-327.
- Rohm M, Lindemann E, Hiller E, *et al.* (2013) A family of secreted pathogenesis-related



- proteins in *Candida albicans*. *Mol Microbiol* **87**: 132-151.
- Schmidt PJ, Kunst C & Culotta VC (2000) Copper activation of superoxide dismutase 1 (SOD1) in vivo. Role for protein-protein interactions with the copper chaperone for SOD1. *J Biol Chem* **275**: 33771-33776.
- Sehati S, Clement MH, Martins J, Xu L, Longo VD, Valentine JS & Gralla EB (2011) Metabolic alterations in yeast lacking copper-zinc superoxide dismutase. *Free Radic Biol Med* **50**: 1591-1598.
- Shockley AH, Doo DW, Rodriguez GP & Crouse GF (2013) Oxidative damage and mutagenesis in *Saccharomyces cerevisiae*: genetic studies of pathways affecting replication fidelity of 8-oxoguanine. *Genetics* **195**: 359-367.
- Slekar KH, Kosman DJ & Culotta VC (1996) The yeast copper/zinc superoxide dismutase and the pentose phosphate pathway play overlapping roles in oxidative stress protection. *J Biol Chem* **271**: 28831-28836.
- Smith MW & Doolittle RF (1992) A comparison of evolutionary rates of the two major kinds of superoxide dismutase. *J Mol Evol* **34**: 175-184.
- Srinivasan C, Liba A, Imlay JA, Valentine JS & Gralla EB (2000) Yeast lacking superoxide dismutase(s) show elevated levels of "free iron" as measured by whole cell electron paramagnetic resonance. *J Biol Chem* **275**: 29187-29192.
- Stoica BA, Rusu M, Petreus T & Nechifor M (2011) Manganese SOD mimics are effective against heat stress in a mutant fission yeast deficient in mitochondrial superoxide dismutase. *Biol Trace Elem Res* **144**: 1344-1350.
- Strain J, Lorenz CR, Bode J, Garland S, Smolen GA, Ta DT, Vickery LE & Culotta VC (1998) Suppressors of superoxide dismutase (SOD1) deficiency in *Saccharomyces cerevisiae*. Identification of proteins predicted to mediate iron-sulfur cluster assembly. *J Biol Chem* **273**: 31138-31144.
- Sturtz LA, Diekert K, Jensen LT, Lill R & Culotta VC (2001) A fraction of yeast Cu,Zn-superoxide dismutase and its metallochaperone, CCS, localize to the intermembrane space of mitochondria. A physiological role for SOD1 in guarding against mitochondrial oxidative damage. *J Biol Chem* **276**: 38084-38089.
- Tainer JA, Getzoff ED, Richardson JS & Richardson DC (1983) Structure and mechanism of copper, zinc superoxide dismutase. *Nature* **306**: 284-287.
- Tainer JA, Getzoff ED, Beem KM, Richardson JS & Richardson DC (1982) Determination and analysis of the 2 A-structure of copper, zinc superoxide dismutase. *J Mol Biol* **160**: 181-217.
- Takahashi H, Suzuki T, Shirai A, Matsuyama A, Dohmae N & Yoshida M (2011) Mitochondrial localization of fission yeast manganese superoxide dismutase is required for its lysine acetylation and for cellular stress resistance and respiratory growth. *Biochem Biophys Res Commun* **406**: 42-46.
- Tarhan C, Pekmez M, Karaer S, Arda N & Sarikaya AT (2007) The effect of superoxide dismutase deficiency on zinc toxicity in *Schizosaccharomyces pombe*. *J Basic Microbiol* **47**: 506-512.
- Tsang CK, Liu Y, Thomas J, Zhang Y & Zheng XF (2014) Superoxide dismutase 1 acts as a nuclear transcription factor to regulate oxidative stress resistance. *Nat Commun* **5**: 3446.
- Unlu ES & Koc A (2007) Effects of deleting mitochondrial antioxidant genes on life span. *Ann N Y Acad Sci* **1100**: 505-509.

- van Loon AP, Pesold-Hurt B & Schatz G (1986) A yeast mutant lacking mitochondrial manganese-superoxide dismutase is hypersensitive to oxygen. *Proc Natl Acad Sci U S A* **83**: 3820-3824.
- Van Remmen H, Ikeno Y, Hamilton M, *et al.* (2003) Life-long reduction in MnSOD activity results in increased DNA damage and higher incidence of cancer but does not accelerate aging. *Physiol Genomics* **16**: 29-37.
- Viriyakosol S, Singhanian A, Fierer J, Goldberg J, Kirkland TN & Woelk CH (2013) Gene expression in human fungal pathogen *Coccidioides immitis* changes as arthroconidia differentiate into spherules and mature. *BMC Microbiol* **13**: 121.
- Wallace MA, Liou LL, Martins J, Clement MH, Bailey S, Longo VD, Valentine JS & Gralla EB (2004) Superoxide inhibits 4Fe-4S cluster enzymes involved in amino acid biosynthesis. Cross-compartment protection by CuZn-superoxide dismutase. *J Biol Chem* **279**: 32055-32062.
- Wilkinson SR, Prathalingam SR, Taylor MC, Ahmed A, Horn D & Kelly JM (2006) Functional characterisation of the iron superoxide dismutase gene repertoire in *Trypanosoma brucei*. *Free Radic Biol Med* **40**: 198-209.
- Wintjens R, Noel C, May AC, Gerbod D, Dufernez F, Capron M, Viscogliosi E & Rومان M (2004) Specificity and phenetic relationships of iron- and manganese-containing superoxide dismutases on the basis of structure and sequence comparisons. *J Biol Chem* **279**: 9248-9254.
- Woodruff RC, Phillips JP & Hilliker AJ (2004) Increased spontaneous DNA damage in Cu/Zn superoxide dismutase (SOD1) deficient *Drosophila*. *Genome* **47**: 1029-1035.
- Xiao W, Chow BL & Rathgeber L (1996) The repair of DNA methylation damage in *Saccharomyces cerevisiae*. *Curr Genet* **30**: 461-468.
- Yan LJ, Levine RL & Sohal RS (1997) Oxidative damage during aging targets mitochondrial aconitase. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**: 11168-11172.
- Youn HD, Kim EJ, Roe JH, Hah YC & Kang SO (1996) A novel nickel-containing superoxide dismutase from *Streptomyces* spp. *Biochem J* **318** ( Pt 3): 889-896.
- Youseff BH, Holbrook ED, Smolnycki KA & Rapple CA (2012) Extracellular superoxide dismutase protects *Histoplasma* yeast cells from host-derived oxidative stress. *PLoS Pathog* **8**: e1002713.
- Zabriskie TM & Jackson MD (2000) Lysine biosynthesis and metabolism in fungi. *Nat Prod Rep* **17**: 85-97.
- Znaldi S, Barker KS, Weber S, Alarco AM, Liu TT, Boucher G, Rogers PD & Raymond M (2009) Identification of the *Candida albicans* Cap1p regulon. *Eukaryot Cell* **8**: 806-820.

## Figures



**Fig. 1 SODs in fungi.** Cellular localization and family type of the most studied SODs enzymes in fungi. Mn-superoxide dismutases (pink circle), Cu/Zn superoxide dismutases (dark blue circle), and Cu superoxide dismutases (light blue). Species abbreviations used are: *Sc* (*Saccharomyces cerevisiae*), *Cg* (*Candida glabrata*), *Ca* (*Candida albicans*), *Cn* (*Cryptococcus neoformans*), *Sp* (*Schizosaccharomyces pombe*), *Hc* (*Histoplasma capsulatum*), *Af* (*Aspergillus fumigatus*).

**Table 1. SOD playing roles in fungi**

Fungus / Stress	MD	PQ	$H_2O_2$	Ethanol	Salt	Heat	Virulence	MQ/PMN	Aging
<i>S. cerevisiae</i>	Sod1 Sod2	Sod2	Sod2	Sod1 Sod2	Sod2	Sod2	NA	NA	Sod1 Sod2
<i>S. pombe</i>	Sod1		Sod1	Sod2	Sod2	Sod2	NA	NA	Sod1 + Gsh1
<i>C. albicans</i>	Sod1 Sod2	Sod1 Sod2	Sod5	Sod2	Sod2	Sod2	Sod1 Sod5	Sod4 Sod5	
<i>C. glabrata</i>	Sod1 Sod2	ND		Sod2	ND	ND	No	Sod1 + Yap1	Sod2
<i>C. neoformans</i> var. <i>gattii</i>	Sod1 Sod2	Sod1 Sod2		Sod2	Sod1 Sod2	Sod2	Sod1 Sod2	Sod1	Sod2
<i>H. capsulatum</i>		Sod1					Sod3	Sod3	ND

## **CAPITULO 7**

**The transcription factors Skn7 and Yap1 regulate *EPA2* gene expression in *Candida glabrata*.**

## **The transcription factors Skn7 and Yap1 regulate *EPA2* gene expression in *Candida glabrata*.**

Jacqueline Juárez-Cepeda<sup>a</sup>, Emmanuel Orta-Zavalza<sup>a</sup>, Javier Montalvo-Arredondo<sup>a</sup>, Irene Castaño<sup>a</sup> and Alejandro De Las Peñas<sup>a\*</sup>

<sup>a</sup>IPICYT, División de Biología Molecular, Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, Camino a la Presa San José, #2055, Col. Lomas 4<sup>a</sup> sección. San Luis Potosí, San Luis Potosí 78216, México.

\* Corresponding Author. E-mail: [cano@ipicyt.edu.mx](mailto:cano@ipicyt.edu.mx)

(52) 444 834 2038. Fax: (52) 444 834 2010.

**Abstract**

*Candida glabrata* is the second most important human fungal pathogen. *EPA2* encoded an epithelial adhesin and is localized close to the telomere of chromosome E where it is repressed by subtelomeric silencing. This adhesin is uncharacterized and is not known anything about the regulation of its expression. In this study, we found *EPA2* gene is induced *in vitro* in presence of oxidative stress generated by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and the silencing subtelomeric is not eliminate. Furthermore, we suggest that *EPA2* expression by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> is regulated by transcriptions factors of oxidative stress response Yap1 and Skn7, these have no physical interaction, even in presence of oxidative stress.

**Keywords:** *Candida glabrata*, *EPA2*, Oxidative Stress, Silencing, Yap1, Skn7.

## Introduction

*C. glabrata* is an opportunistic fungal pathogen that causes severe invasive infections in immunocompromised patients. In order to survive, *C. glabrata* needs to adapt to the changing environment within the host. Host-pathogen interaction demands several crucial functions fulfilled by proteins of the cell wall, such as tissue adhesion and invasion, protection from host defense mechanisms, biofilm formation, activation of the host immune system and resistance to antifungal drugs (VERSTREPEN *et al.* 2005). In case of the cell wall, this is accomplished by the ability to differentially express proteins at its cell surface that allow the adherence of the pathogen to different host tissues. The *C. glabrata* genome encodes 67 adhesin-like CWPs (Cell Wall Proteins), many of which have been shown to mediate adhesion to epithelial and endothelial cells as well as abiotic surfaces (CORMACK *et al.* 1999; IRAQUI *et al.* 2005b; DE GROOT *et al.* 2008; DESAI *et al.* 2011).

In *C. glabrata*, a major group of adhesins is encoded by the *EPA* (**E**pithelial **a**dhesin) gene family (DE LAS PENAS *et al.* 2003). These paralogous *EPA* genes are localized close to the telomeres, similar to the majority of the adhesion-like genes (DE LAS PENAS *et al.* 2003; DE GROOT *et al.* 2008). There are strain-dependent variations in the number of *EPA* genes; from 17 in the ATCC2001 strain to at least 23 in strain BG14 (KAUR *et al.* 2005), but despite this, adherence to epithelial cells *in vitro* is primarily mediated by Epa1. For example, disruption of *EPAl* in the BG14 strain decreases adherence to background levels, even in presence of other genes encoding adhesion-like proteins (CORMACK *et al.* 1999; DE LAS PENAS *et al.* 2003; CASTANO *et al.* 2005; DE GROOT *et al.* 2008). This is explained by the fact that *EPAl* is the only *EPA* gene expressed under these conditions and several regulators participate in its activation and repression (DOMERGUE *et al.* 2005; GALLEGOS-GARCIA *et al.* 2012a; JUAREZ-REYES *et al.* 2012). However, other *EPAs* are expressed *in vivo* and also participate in tissue colonization. Similar to Epa1, it has been shown that Epa6 and Epa7 mediate adherence to epithelial cells whereas Epa1 with Epa7 are important for adherence to endothelium (ZUPANCIC *et al.* 2008; DESAI *et al.* 2011). Furthermore, Epa6, but not Epa7, is a major contributor to biofilm formation, although both *EPA6* and *EPA7* are induced in biofilms from strain BG2 grown in rich medium (IRAQUI *et al.* 2005b).

Lastly, other studies have shown that *EPA3* and *EPA22* are induced during biofilm formation in the ATCC2001 strain (KRANEVELD *et al.* 2011b).

One of the important features of the *EPA* genes is that most of them (including *EPA1*) are subject to subtelomeric silencing. This regional repression is mediated by the silencing proteins Sir2, Sir3, Sir4, Ku70, Ku80 (encoded by the *HDF1* and *HDF2* genes, respectively), Rap1, and Rif1 (DE LAS PENAS *et al.* 2003; CASTANO *et al.* 2005). It has been proposed that epigenetic regulation of *EPA* gene expression is advantageous to *C. glabrata*, because allows variability in the expression of *EPA* genes within a genetically identical population. This could result in the generation of individual cells that could be better adapted to a given environmental condition.

Purposely, there are other conditions and environmental cues that can induce expression of some *EPA* genes. For example, nicotinic acid (NA) limitation has been shown to induce *EPA1*, *EPA6* and *EPA7* in strain BG2 (DOMERGUE *et al.* 2005). This effect is due to the inactivation of Sir2, a nicotinamide adenine dinucleotide (NAD<sup>+</sup>) dependent histone deacetylase. Since *C. glabrata* is auxotroph for NAD<sup>+</sup>, and the NA is its growth in NA limited medium decreases Sir2 activity and causes the induction of several *EPA* genes in strain BG2 (DOMERGUE *et al.* 2005). Besides, *EPA6* and *EPA7* are also induced during biofilm formation and this induction is dependent on the Yak1 protein kinase in a mechanism that bypass the silencing machinery (IRAQUI *et al.* 2005b). In addition, osmotic stress and glucose starvation induce *EPA3* and *EPA22* (ROETZER *et al.* 2008) and whereas stress conditions produced by weak-acid related compounds, also induce *EPA6* and *EPA1* (MUNDY and CORMACK 2009). Mundy *et al* concluded that induction of these *EPA* genes was not due to a relief of silencing since this stimulus did not induce all subtelomeric genes and furthermore, addition of NA (nicotinic acid) did not affect induction by parabens (MUNDY and CORMACK 2009). Moreover, it was shown that induction of *EPA6* by these compounds does not require the weak acid response transcription factor, but instead depends on the transcription factors Flo8 and Mss11 that control the transcription of some *FLO* genes in *S. cerevisiae* (MUNDY and CORMACK 2009). These regulatory mechanisms



probably allow for rapid adaptation to changing environmental conditions (DOMERGUE *et al.* 2005; IRAQUI *et al.* 2005b; KRANEVELD *et al.* 2011b).

As a successful fungal pathogen, *C. glabrata* quickly detects and adapts to the changing environment within the host. In order to survive the attack of phagocytic cells, *C. glabrata* modifies its metabolism and counteract the oxidative stress through the induction of protective antioxidant enzymes (catalase and SODs) (ROETZER *et al.* 2010; ROETZER *et al.* 2011) and non-enzymatic defense systems (GSH) (GUTIERREZ-ESCOBEDO *et al.* 2013). In *S. cerevisiae* several genes with relevant participation in the oxidative stress response have binding sites in their promoter regions for the transcription factors Yap1 and Skn7 and both are needed for cooperative promoter recognition (MORGAN *et al.* 1997; HE and FASSLER 2005). Moreover the interaction between Skn7 and Yap1 is required for induction of a conserved set of oxidative stress genes (MULFORD and FASSLER 2011). In *C. glabrata* the transcription factors Msn2, Msn4, Skn7 and Yap1, play a central role in the regulation of the oxidative stress response (OSR) (CUELLAR-CRUZ *et al.* 2008; ROETZER *et al.* 2008). In a genome wide analysis of *C. glabrata*, one set of genes (*CTA1*, *TRR1/2*, *TSA1/2*, *TRX2*, *GPX2* and *CCP1*) were dependent on Skn7 and Yap1 and were defined as the core of the OSR. Nevertheless, the fact that these transcriptional factors are dispensable for virulence (except for Skn7) (SAIJO *et al.* 2010b) suggests that *C. glabrata* depends on redundant pathways that can compensate each other.

*EPA2* is localized between *EPA1* and *EPA3* in the right arm of chromosome E and is subject to subtelomeric silencing. In contrast with *EPA2*, *EPA1* and *EPA3* can be induced under different and specific conditions (CORMACK *et al.* 1999; ROETZER *et al.* 2008; GALLEGOS-GARCIA *et al.* 2012a; KUHN and VYAS 2012). Since the *EPA2* induction and its regulation remain largely unexplored, the purpose of this study was to investigate the conditions and factors that participate in activation of *EPA2*. We found that *EPA2* is induced in presence of oxidative stress even in conditions that allow subtelomeric silencing. Additionally, we show that at least three oxidative stress transcription factors (Yap1, Skn7 and Msn2 or Msn4) are required to induce *EPA2* in this condition. In other context, *EPA2* expression is increased when subtelomeric silencing is eliminated and accompanied with

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> treatment. We suggest that Yap1 and Skn7 regulate *EPA2* expression. Finally even when both Yap1 and Skn7 cooperate for activation of *EPA2*, we found that these transcription factors have no physical interaction, even in presence of oxidative stress. This result contrasts with *S. cerevisiae* and suggests that in *C. glabrata* both factors act independently each other.

## **Material and Methods**

### **Strains**

All strains used in the study are described in Table 1.

### **Plasmids**

All plasmids used in this study are described in Table 2.

### **Primers**

All primers used in this study are summarized in Table 3.

### **Media**

Yeast media were prepared as described previously (SHERMAN 1986), and 2% agar was added to plates. Yeast extract-Peptone-Dextrose (YPD) medium contained yeast extract 10 g/l, peptone 20 g/l and was supplemented with 2% glucose. When needed YPD plates were supplemented with 460 µg/ml of hygromycin (A.G. Scientific<sup>®</sup>). Synthetic complete medium (SC) contained Yeast Nitrogen Base (YNB) without (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> at 1.7 g/l and (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> at 5 g/l, supplemented with 0.6% of Casamino Acids, 2% glucose and when needed, supplemented with 25 mg/l uracil (Sigma Aldrich<sup>®</sup>) and 0.9 g/l 5-Fluoroorotic acid (5-FOA, Toronto Research Chemicals) for 5-FOA plates.

Bacterial medium was prepared as described (AUSUBEL 1992), and 1.5% agar was used for plates. Luria-Bertani (LB) medium contained yeast extract at 5 g/l, Bacto peptone at 10 g/l, and NaCl at 10 g/l. When needed LB plates were supplemented with 50 µg/ml of carbenicillin (Invitrogen<sup>®</sup>) or 20 µg/ml chloramphenicol plus 5% saccharose.

## **Growth Conditions**

All plasmid constructs were introduced into *Escherichia coli* strain DH10B (Gibco® BRL) by electroporation and all bacteria strains were stored in 10% glycerol. Plasmids were purified with the Qiagen® Plasmid Kit QIAprep.

All cell cultures were grown for 48 hr at 30 °C to obtain stationary phase (SP) cells. Logarithmic phase (LP) cells were obtained from growing cultures. All mutant *C. glabrata* strains were generated in the BG14 strain background and here referred to as parental strain (CORMACK *et al.* 1999). All yeast strains were stored in 15% glycerol stocks at -80 °C.

## **Yeast Transformation**

Yeast transformations with linear or supercoiled plasmid DNA were performed using the lithium acetate protocol as described previously (CASTANO *et al.* 2003).

## **Sequence Analysis**

The amino acid sequence homology analysis was done by ClustalW alignment (HIGGINS *et al.* 1996) with the MacVector program (Accelrys).

## **In silico Promoter Analysis: Motif finding**

We analyzed 2000bp upstream region starting from putative translation start of *EPA* genes of *Candida glabrata* (*EPA19*: CAGL0A00110g, *EPA1*: CAGL0E06644g, *EPA2*: CAGL0E06666g and *EPA3*: CAGL0E06688g).

In order to scan Yap1 *cis*-regulatory elements on promoter sequence of *EPA* genes, we used the motif matrices derived from the shared motifs found on promoter sequence of genes regulated only by Yap1 and these genes regulated by both, Yap1 and Skn7 (Table 4) (ROETZER *et al.* 2011).

The analysis was done with “matrix-scan (full options)” program from RSA tools (<http://rsat.ulb.ac.be/>) software package (VAN HELDEN 2003; THOMAS-CHOLLIER *et al.* 2008; THOMAS-CHOLLIER *et al.* 2011), as it follows: we set background model as organism specific selecting *Candida glabrata* CBS138 model; and we set p-value upper threshold as  $2 \times 10^{-4}$ . Input files contain the promoter sequences in Fasta format, and the motif matrices in tab-delimited format. The other parameters were set as default.

### **Generation of *sir3*Δ Null Mutants**

To generate derivatives with the deletion of *sir3*Δ gene in strains with deletions in *MSN2*, *MSN4*, *SKN7* and *YAPI*, we followed the one-step gene replacement procedure using disruption plasmids for gene to be deleted. Disruption plasmid pIC120 contains a hygromycin resistance cassette flanked by 5'- and 3'-flanking regions of *SIR3* gene. The disruption plasmid was digested with enzymes that cut at both ends, within the 5' and 3' cloned flanking regions, generating ends homologous to specific gene *SIR3* to be deleted in the *C. glabrata* genome. The released fragment was used to transform *C. glabrata* and transformants were selected on plates supplemented with 460 μg/ml hygromycin (A.G. Scientific®). Homologous recombination at each locus was verified by PCR using primers that anneals in the sequences external to the cloned 5' and 3' fragments and a primer annealing within the hygromycin cassette. We also verified the absence of each gene deleted by the inability to PCR amplify a small internal fragment from deleted gene. For each strain, two independent transformants were obtained. Each of these derivatives was used to assess expression of *EPA2* by qPCR.

### **Construction of Strains with *FLAG* and *c-Myc* tags**

To construct strains that carry one type of TAG, we first constructed plasmids for each gene to be tagged, *SKN7* and *YAPI*. Briefly, the C-terminal segment of the gene without stop codon (*SKN7* or *YAPI*) and 3'UTR of the gene each gene to be tagged were PCR amplified and cloned into pGEM-T (Promega®) and/or pMB11 (lab collection). Each pair of fragments were subcloned into pOZ18 or pEG40 (conserving the relative orientation of the chromosomal locus to be tagged) flanking the hygromycin expression cassette. Finally, the C-terminal segment of the gene without stop codon (*SKN7* or *YAPI*) was placed in phase with the epitope sequence (*c-Myc* or *FLAG*). This translational fusion is followed by the 3' UTR of the catalase gene (3'UTR *CTAI*) and a hygromycin resistance cassette for selection of the transformants. The 3'UTR *CTAI* and the hygromycin cassette are flanked by two *FRT* direct repeats. Downstream the hygromycin cassette, the constructs contain a fragment of the 3'UTR of the gene. The plasmids generated in this way were used to generate allele

replacements of each gene to be tagged by homologous recombination in a one-step gene replacement procedure. Briefly, each plasmid was digested with enzymes that cut at both ends of the cloned C-terminal and 3'UTR flanking fragments, generating ends homologous to each specific gene to be tagged in the *C. glabrata* genome. The released fragment was used to transform *C. glabrata* selecting on plates supplemented with 460 µg of hygromycin/ml (A.G. Scientific®). Homologous recombination and allele replacement of each locus was verified by PCR analysis using a primer that anneals in the sequences external to the cloned fragments and a primer annealing within the hygromycin cassette and 3'UTR *CTAI*. For each target gene, two independent transformants were obtained. To place the translational fusion with their native 3'UTR the hygromycin cassette used to generate the first tag was excised by expressing *ScFLP1* product from plasmid pMZ21. *ScFLP1* encodes a site-specific recombinase that recognizes two direct repeats, the Flp1 recognition target (*FRT*) sites that flank the hygromycin cassette of the plasmids. The Flp1 recombinase then induces recombination between *FRT* sites and the hygromycin marker is excised from the chromosome, resulting in a marked gene and leaving one copy of the *FRT* site. Transformants were purified on SC-Ura plates. Single colonies were then grown on non-selective medium (YPD agar) and screened for Hyg<sup>S</sup> and for Ura<sup>-</sup> indicating loss of pMZ21. The resulting Hyg<sup>S</sup> strains then are used as recipients for double tag using the same hygromycin resistance cassette and selecting Hyg<sup>R</sup> colonies.

### **Quantitative PCR (qPCR)**

Total RNA was isolated from stationary phase cells (48 hr in SC media). Cultures were diluted in spent medium to OD<sub>600nm</sub> of 1.0 and treated with or without 10 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> [35% (wt/wt) solution (Sigma-Aldrich®)] during 30 min/30 °C. RNA was extracted using TRIzol reagent (Invitrogen®, Carlsbad, CA) according to the manufacturer's instructions. Treatment with DNase I (Roche®) of the RNA samples was performed to ensure removal of contaminating genomic DNA. Synthesis of cDNA was carried out using SuperScript® II reverse transcriptase and the reverse oligonucleotides for each gene (Table 3) and the reaction was carried out at 42 °C for 50 min. Quantitative PCR (qPCR) was performed using the Fast SYBR® Green Master Mix (Invitrogen®) in the ABI 7500 Fast Real-Time

PCR System (Applied Biosystems). The reverse and forward primers used for the qPCR were designed using the primer express 3.0 software (Table 3, *ACT1* #219 and 977, *EPA2* #1268 and 1269). *ACT1* was used as an internal control for normalization and the threshold cycle ( $2^{-\Delta\Delta C_t}$ ) method was used to calculate the differences in gene expression. qPCR experiments were performed in technical triplicates and from three independent RNA extractions. Statistical analysis was performed by one-way ANOVA. The *p* value was calculated by Newman-Keuls multiple comparisons tests. A *p* value  $\leq 0.05$  was considered significant.

### **Reporter *URA3* Gene Expression Assays (5-FOA sensitivity assays)**

The level of silencing of the *URA3* gene inserted at different positions throughout the telomere E was assessed using a plate growth assay as described previously (CASTANO *et al.* 2003; DE LAS PENAS *et al.* 2003). Briefly strains containing the different *URA3* insertions were grown in YPD for 36 hr to stationary phase. The cultures were adjusted to an optical density at 600nm of 0.5 with sterile water, and 10-fold serial dilutions were made in 96-well plates. Then, 5  $\mu$ l of each dilution was spotted onto YPD, SC lacking uracil (SC-Ura), SC+5-FOA and SC+5-FOA+5 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> [35% (wt/wt) (Sigma-Aldrich<sup>®</sup>)] plates, followed by incubation 48 hr at 30 °C, and photographed. Experiments were repeated at least three times.

### **Co-Immunoprecipitation of *Skn7-c-Myc* and *Yap1-FLAG***

The CoIP protocol was performed as described (MCCORD *et al.* 2003; ORTA-ZAVALZA *et al.* 2013). Strains were grown in stationary phase and logarithmic phase at 30 °C for seven duplications in YPD broth until cultures reached an OD<sub>600nm</sub> of 1.0. The cultures in SP with spent medium were exposed without and with 200 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> [35% (wt/wt)] solution (Sigma-Aldrich<sup>®</sup>) during 30 min/30 °C. The cultures in LP were exposed without and with 25 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> [35% (wt/wt)] solution (Sigma-Aldrich<sup>®</sup>) during 30 min/30 °C. Cells were collected by centrifugation and suspended in 300  $\mu$ l of lysis buffer (45 mM HEPES-KOH [Promega<sup>®</sup>, pH 7.5], 400 mM potassium acetate, 1 mM EDTA, 0.5% Nonidet P-40 substitute [Fluka Biochemica<sup>®</sup>], 1 mM DTT, 10% glycerol, 1 mM PMSF and 1  $\times$  Complete

protease inhibitors [ROCHE<sup>®</sup>]). A volume of 300 µl of zirconia beads (BioSpec<sup>®</sup>) was added and cells were lysed by vortexing at 4 °C for 1 min and placed on ice for another minute (repeated 20 times). The lysate was centrifuged at 25 000 g for 30 min at 4 °C to remove cell debris and zirconia beads. The supernatant of each sample was transferred to a new tube and protein content was determined by Bradford assay (Sigma-Aldrich<sup>®</sup>). For each sample, 100 µg of protein were incubated at 4 °C for 1 hr with 30 µl of sepharose beads containing cross-linked protein G (Sigma-Aldrich<sup>®</sup>). The samples were centrifuged at 25 000 g for 5 min at 4 °C and the clarified lysate was transferred to a clean tube. For immunoprecipitation, the lysate was combined with 50 µl of anti-*c-Myc* or anti-*FLAG* agarose (Sigma-Aldrich<sup>®</sup>) and incubated at 4 °C for two hours with constant inversion. The supernatant was recovered and IPs were collected by centrifugation, washed three times with Lysis buffer, suspended in 40 µl of 2× sodium dodecyl sulphate (SDS) loading buffer and heated at 95 °C for 5 min. The input (20 µg of protein), supernatant (one twentieth of the immunoprecipitated extract) and the IPs were loaded onto a 10% SDS-polyacrylamide gel. After electrophoresis, the proteins were blotted onto PVDF membranes (BIO-RAD<sup>®</sup>) and probed with either mouse anti-cMyc (Millipore<sup>®</sup>) or mouse anti-*FLAG* (Sigma-Aldrich<sup>®</sup>) for two hours at room temperature. After washing, the membranes were probed with a goat anti-mouse horseradish peroxidase-conjugated secondary antibody (Amersham<sup>®</sup>). Signal detection was achieved using the ECL chemiluminescence reagents (Amersham<sup>®</sup>) and X-OMAT (Kodak<sup>®</sup>) films.

### **Chromatin immunoprecipitation (ChIP) assays**

ChIP assay were performed as previously described (KNUTSON and HAHN 2011; REGOT *et al.* 2013) with some modifications. Strains were grown in stationary phase at 30 °C in YPD broth for 48 h. The cultures in SP with spent medium (OD<sub>600nm</sub> of 1.0) were exposed without and with 15 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> [35% (wt/wt)] solution (Sigma-Aldrich<sup>®</sup>) during 30 min/30 °C. Cells were collected by centrifugation, suspended and crosslinked for 15min in 10ml de cross-linking buffer (50mM Hepes pH 7.4, 137 mM KCl, 1mM EDTA) containing 1% formaldehyde and then neutralized with Glycine 0.125 M for 5 min, at room temperature. After cross-linking, cells were harvested and washed three times with cold PBS1x buffer. Cells were resuspended in 1.5ml of lysis buffer (1% SDS, 10mM EDTA pH 8.0, 50mM

Tris-HCl pH 8.1) supplemented with 0.5 mM PMSF, and EDTA-free complete protease inhibitor cocktail (Roche®). Cells were lysed for 5 times during 1 min with 1 min pauses using FastPrep®System at speed 6.5m/s, until greater than 95% cell breakage was achieved. The chromatin samples were sonicated 15 times for 1 min each using sonicator to reduce DNA length to 200–500 base pairs. The lysates were cleared by centrifugation and precleared with 50 µl protein G-agarose beads (Sigma-Aldrich®) for 2 hrs at 4°C with rotation. Cross-linked chromatin-proteins complexes were immunoprecipitated with 4 µg/µl antibodies anti-cMyc (Millipore®) or mouse anti-FLAG (Sigma-Aldrich®) overnight at 4°C with rotation. To minimize nonspecific binding, single-stranded DNA/protein G-agarose beads (Sigma-Aldrich®) were incubated with Blocking solution (0.5g bovine serum albumin 100ml PBS) and 500 µg/ml salmon sperma overnight at 4°C. 25µl of treated beads was then added to the chromatin samples and incubated at 4 °C for 2 h. The beads were then washed five times, three times with Paro Buffer I (0.1% SDS, 1% Triton x-100, 2mM EDTA, 20mM Tris-HCl pH 8.1, 150mM NaCl), Paro Buffer II (0.1% SDS, 1% Triton x-100, 2mM EDTA, 20mM Tris-HCl pH 8.1, 500mM NaCl) and Paro buffer III (0.25M LiCl, 1% NP40, 1% Deoxicolato de sodio, 1mM EDTA, 10mM Tris-HCl pH 8.1), and twice with TE (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8.0). Immunoprecipitates were then eluted with Elution Buffer (1%SDS, 0.1M NaHCO<sub>3</sub>), cross-links were reversed with 1 µl RNase (10µg/µl) at 37°C/1 h and 2 µl proteinase K (20 µg/µl) treatment at 65°C/2 h. DNA was recovered by phenol/chloroform extraction and co-precipitation with glycogen. DNA was dissolved in 50µl of 10 mM Tris pH 8.0. Immunoprecipitated chromatin samples were analyzed by PCR with primers specific for *EPA2* intergenic region. We used the following positive control primer pairs: TRR2 (-639/-511) for *CgTRR2* (CAGL0I01166g) and GPX2 (-787/-617) for *CgGPX2* (CAGL0C01705g) A centromeric region of chromosome B was used as negative control (Table 3) (ROETZER *et al.* 2011). Experiments were performed in biological triplicate.

## RESULTS



**The transcription factors of oxidative stress (Yap1, Skn7 and Msn2 or Msn4) are required to regulate *EPA2* expression in presence of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in stationary phase.**

To investigate the role of the transcription factors Skn7, Yap1, Msn2 and Msn4 in the *EPA2* expression by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. We evaluated *EPA2* expression in mutant strains containing single double, triple and quadruple deletions of transcription factors of oxidative stress (Yap1, Skn7 and Msn2 or Msn4) without and with H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> solution by qPCR. RNA was extracted from stationary phase grown cells (36 h in SC media), overnight cultures were diluted in spent medium OD<sub>600nm</sub> of 1.0 and the cultures were exposed without and with 10 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> solution. Synthesis of cDNA and qPCR were carried out for *EPA2* gene and *ACT1* gene control. *EPA2* expression *wild type* strain was normalized to 1.0 in presence of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. None of the strains investigated in this study was transcriptionally induced without H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> treatment only with H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> treatment. In the single mutants (*skn7Δ*, *yap1Δ*) or double mutant (*skn7Δ yap1Δ*) *EPA2* expression is not transcriptionally induced. In contrast, in single mutant (*msn2Δ* or *msn4Δ*) *EPA2* expression is induced, in the double mutant (*msn2Δmsn4Δ*) *EPA2* expression is lesser than *EPA2* expression compared with the single mutant *msn4Δ*. *EPA2* expression in the single mutant (*msn4Δ*) is similar to *wild type* strain. In the triple (*yap1Δskn7Δmsn2Δ* or *yap1Δskn7Δmsn4Δ*) and quadruple (*yap1Δskn7Δmsn2Δmsn4Δ*) mutants *EPA2* is not induced (Figure 1). These experiments indicate that *EPA2* expression requires both transcription factors (Yap1 and Skn7) for its expression in presence of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Also, it requires at least one of these factors Msn2 or Msn4 for induction of *EPA2* in presence of Yap1 and Skn7. We conclude that the regulation of *EPA2* expression in presence of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in stationary phase requires at least three transcription factors Yap1, Skn7 and Msn2 or Msn4.

***EPA2* expression is increased in absence subtelomeric silencing and in presence of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.**

We decided to evaluate *EPA2* expression in absence subtelomeric silencing and in presence of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Parental strain (BG14) and *sir3Δ* (CGM24) mutant strain were grown for 48 h at 30°C in SC media. Cultures were diluted in spent medium to OD<sub>600nm</sub> of 1.0 and treated with or without 10 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> solution. RNA samples were isolated and used for qPCR (See

Material and Methods). The values represent the increase in gene expression relative to the treated parental strain with H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (normalized to 1.0). *EPA2* expression was normalized by *ACT1* expression levels. *EPA2* induction in the *wt* strain in the absence of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> is null, while in the mutant *sir3Δ* in absence of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> is twice that in the *wt* strain in presence of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. However, in the *sir3Δ* mutant strain in presence of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> the induction is over 10 fold compared to *wt* strain in presence of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Figure 2). In absence of subtelomeric silencing was exhibited a basal transcription *EPA2* which is increased in presence of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. This basal transcription was greater than that generated in presence of silencing and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

### **In absence of subtelomeric silencing Yap1 and Skn7 regulated the *EPA2* expression by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.**

We evaluated *EPA2* expression in absence subtelomeric silencing for known the role of transcription factors of oxidative stress. We generate derivatives with the deletion of *sir3Δ* gene in strains with deletions in *MSN2*, *MSN4*, *SKN7* and *YAP1*. Each of these derivatives was used to assess expression of *EPA2* by qPCR. RNA was isolated from stationary phase cells (48 h in SC media). Cultures were diluted in spent medium to OD<sub>600nm</sub> of 1.0 and treated with or without 10 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> solution. Synthesis of cDNA was carried out and used for qPCR. All the strains evaluated to show a basal *EPA2* expression without H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> treatment, only with H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> treatment has different responses. *EPA2* expression is increased in the double mutants (*msn2Δsir3Δ* or *msn2Δsir3Δ*) with H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> compared *sir3Δ* without H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, but reduced *EPA2* expression in the same strain with H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. *EPA2* expression in the triple mutant (*msn2Δmsn4Δsir3Δ*) in presence of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> is the same of *sir3Δ* mutant strain under the same conditions (Figure 3). These data indicate that in absence of subtelomeric silencing Yap1 and Skn7 regulate *EPA2* expression in presence of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

### **Subtelomeric silencing is not eliminate in presence of oxidative stress**

In order to analyze whether subtelomeric silencing is eliminate in presence of oxidative stress in right end of chromosome E (Chr E-R) in *C. glabrata* where the *EPA1*, *EPA2*, and *EPA3* are localized, we chose to use a *URA3* reporter assay. Briefly, *URA3* expression can be scored both positively by growth on medium lacking uracil (SC-Ura plates) and

negatively by growth on medium containing uracil and 5-FOA (5-FOA plates). 5-FOA is converted into a toxic product by orotidine-5-phosphate decarboxylase, encoded by the *URA3* gene; consequently, cells expressing *URA3* are unable to grow on plates containing 5-FOA, and growth on 5-FOA plates is a measure of the extent of transcriptional silencing. If subtelomeric silencing is eliminated by oxidative stress ( $H_2O_2$ ) cells expressing *URA3* are unable to grow on plates 5-FOA+ $H_2O_2$ . We use strains containing the different *URA3* insertions (Figure 4), these were grown in YPD for 36 h to stationary phase. The cultures were spotted onto YPD, SC lacking uracil (SC-Ura), SC+5-FOA, SC+5-FOA + 5mM  $H_2O_2$  plates, followed by incubation 48 h at 30°C, and photographed. As shown in Figure 4, on Chr E-R, *URA3* inserted at a position 20.8 kb from the telomeric repeats (insertion A) is partial transcriptionally active, as measured by the failure completely to grow on 5-FOA plates. As the distance between the *URA3* reporter and the telomere repeats decreased, the level of gene silencing increased. Low levels of silencing are seen for insertion A (20.8 kb from the telomere repeats), whereas insertions B and C (13.39 and 1.32 kb, respectively, from the telomere) are strongly silenced. The same phenotype is observed in presence of 5mM  $H_2O_2$ , these data indicate that oxidative stress generated by  $H_2O_2$  is not eliminate subtelomeric silencing. As control the absence of subtelomeric silencing used *sir3Δ* strains mutants with the same insertions A, B, C with and without  $H_2O_2$ .

### **Yap1 not interacts with Skn7 under conditions basal and oxidants**

Transcription factors Skn7 and Yap1 control the oxidative stress response in both *C. glabrata* and *S. cerevisiae* (MULFORD and FASSLER 2011; ROETZER *et al.* 2011). Furthermore, both factors are important for the regulation of oxidative stress response genes as the thioredoxin system, glutathione peroxidases and catalase (MORGAN *et al.* 1997; LEE *et al.* 1999; HE and FASSLER 2005). In *S. cerevisiae*, Yap1 interacts with Skn7, this interaction is important for efficient oxidative stress response, for co-immunoprecipitation experiments were identified some amino acid residues important to perform this interaction (MULFORD and FASSLER 2011) (Figure 5). In *C. glabrata*, Yap1 and Skn7 cooperate to induction gene as *TRR2* and *GPX2* (ROETZER *et al.* 2011). However, although the presence of both factors is required for full activation of these genes, these

data does not necessarily demonstrate that these proteins interaction. Therefore, we decided to use co-immunoprecipitation assays for analyze if Yap1 and Skn7 physically interact in *C. glabrata*, because we suggest that theses transcription factors of oxidative stress regulated *EPA2* expression in presence of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. In order to demonstrate this association, we performed a coimmunoprecipitation experiment using cMyc-tagged Skn7 and Flag-tagged Yap1 proteins. First, to determine if the tagged proteins were functional, we analysed the sensitivity to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, Skn7::cMyc (CGM1482), Yap1::FLAG (CGM1763), Skn7::cMyc Yap1::FLAG (CGM1548) strains. We found that the strain carrying the epitope tagged alleles had the same H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> sensitivity phenotype as the parental strain, indicating that both proteins are functional (Supplementary Figure). We then performed the Co-IP using strain CGM1548 (Skn7::cMyc *Yap1*::FLAG) unexposed and exposed with H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in stationary phase as described in the legend to Figure 6 and in Material and Methods. We found that Yap1-Flag not co-immunoprecipitated with Skn7-Myc (Figure 6, lane 4) in both, basal and oxidant conditions. Furthermore, we performed the Co-IP in logarithmic phase and obtained the same results. In *C. glabrata* Yap1 not interacts physically with Skn7.

## DISCUSSION

This study focused on analysis of the *C. glabrata EPA2*, there are few studies concerning *EPA* genes and none about *EPA2*. We found *EPA2* is induced in presence of oxidative stress generated by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, three transcription factors of oxidative stress (Yap1, Skn7 and Msn2 or Msn4) are required to regulate *EPA2* expression in presence of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in stationary phase. In addition subtelomeric silencing is not eliminate in presence of oxidative stress. In absence subtelomeric silencing and in presence of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> *EPA2* expression is increased and is regulated by Yap1 and Skn7, these factors under conditions no oxidants and oxidants not have a physical interaction.

*EPA2* gene forms a cluster with *EPA1* and *EPA3* near the right telomere of chromosome E. *EPA3* is closest to the telomere repeats, followed by *EPA2* on the centromere proximal side and then by *EPA1*, which is more than 20 kb away from the telomere (DE LAS PENAS *et al.* 2003). The regulatory regions flanking each of these three *EPA* genes are large and

complex. The intergenic region between *EPA2* and *EPA3* is over 5 kb long and the *EPA1* promoter spans at least 2.5 kb and responds to various stimuli (CORMACK *et al.* 1999; GALLEGOS-GARCIA *et al.* 2012a; KUHN and VYAS 2012). The *EPA1*, *EPA2* and *EPA3* cluster, has interesting characteristics that result in tight regulation of expression of these genes. We found *EPA2* is induced in presence of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in stationary phase, however *EPA1* is induced in the first cellular division upon dilution into fresh media through an unknown mechanism (GALLEGOS-GARCIA *et al.* 2012a) and is also observed during biofilm formation and nicotinic acid (NA) limitation through inactivation of the silencing machinery (DOMERGUE *et al.* 2005). Meanwhile, *EPA3* are also induced in biofilms and under osmotic stress and glucose starvation (ROETZER *et al.* 2008; KRANEVELD *et al.* 2011b). *EPA6* and *EPA7* are both also repressed by subtelomeric silencing. Weak acid-related compounds present in a variety of commercial antifungal products induce *EPA6*. This induction requires Flo8 and Mss11 transcription factors (MUNDY and CORMACK 2009). Both, *EPA6* and *EPA7* are also induced during biofilm formation, through inactivating the silencing machinery (IRAQUI *et al.* 2005b).

In this study, we found transcription factors Yap1, Skn7, Msn2 and Msn4 control the oxidative stress response, interestingly control *EPA2* expression, requires both transcription factors Yap1 and Skn7 for its expression in presence of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and also it requires at least one of these factors Msn2 or Msn4, these factors participated in presence of subtelomeric silencing. We suggest that in presence of oxidative stress generated by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, the transcription factors are gathered in the nucleus and counteract the effect of chromatin and induced *EPA2* expression. For example, in *S. cerevisiae* more than 10% of DNA-binding transcription factors concentrate at the subtelomeric regions near to chromosome ends. For many factors, the subtelomeric binding pattern is dynamic and undergoes flux toward or away from the telomere as physiological conditions shift. The subtelomeric binding is dependent on environmental conditions and correlates with the induction of gene expression in response to stress (MAK *et al.* 2009).

In absence of subtelomeric silencing, *sir3* $\Delta$  mutation derepressed transcription of *EPA2*, *EPA3*, and *EPA4/EPA5* (DE LAS PENAS *et al.* 2003). We quantified this expression and we observed that *EPA2* expression increased more in presence of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and involved the transcription factors Yap1 and Skn7, these transcriptions factors regulated *EPA2* expression in absence of subtelomeric silencing and in presence of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. This is the first report where an adhesin of *C. glabrata* is induced in presence of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Previous reports showed that two genes *EPA3* and *EPA22* are highly induced by osmotic stress and glucose starvation; with a minor role for Msn2 (ROETZER *et al.* 2008). Furthermore, weak acids induce expression of the *C. glabrata* adhesion Epa6 via an Msn2/4 and War1 independent mechanism leading to enhance adherence (MUNDY and CORMACK 2009).

The oxidative stress response of *C. glabrata* is controlled by the transcription factors Yap1, Skn7, Msn2, and Msn4 (ROETZER *et al.* 2008; CUELLAR-CRUZ *et al.* 2009), which mediate resistance of *C. glabrata* to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and other oxidants. The core response to oxidative stress of Yap1 and Skn7 includes thioredoxin peroxidases (*Tsa1* and *Tsa2*), thioredoxin reductases (*Trr1* and *Trr2*), thioredoxin cofactor Trx2, glutathione peroxidase Gpx2, and catalase Cta1. Skn7 has been shown to be important for peroxide stress protection and for the induction of *TRX2*, *TRR1*, *TSA1* and *CTA1* (ROETZER *et al.* 2011). The oxidative stress response regulation is highly conserved between *C. glabrata* and *S. cerevisiae*. We showed to induce *EPA2* expression requires at least both transcription factors Skn7 and Yap1. In *S. cerevisiae* interaction between the Skn7 and Yap1 proteins that involves the receiver domain of Skn7 and the cysteine rich domains of Yap1. The interaction with Yap1 may help partition the Skn7 protein to oxidative stress response promoters when the Yap1 protein accumulates in the nucleus (MULFORD and FASSLER 2011). In *C. glabrata*, we found that Yap1 not interacts with Skn7 under conditions no oxidants and oxidants. When we analyzed the protein sequence of *C. glabrata* Yap1 found both the cysteines for disulfide bond formation and interaction of Yap1-Skn7 and the receiver domain of Skn7 are conserved (Figure 5). We suggest that interaction is not necessary, the transcriptions factor could be bind temporally and promoted the *EPA2* expression , for example in *S. cerevisiae* the analysis of Yap4 and Sko1 binding to their target genes revealed multiple temporal

classes of binding patterns: constant binding, rapid induction, slow induction, and transient induction. These results demonstrate that individual transcription factors could have multiple binding patterns and help define the different types of temporal binding patterns used in eukaryotic gene regulation (Ni *et al.* 2009).

Our data suggests therefore, that there are two distinct mechanisms of regulation that induce the *EPA2* expression 1) In presence of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and subtelomeric silencing, required transcription factors of oxidative stress Yap1, Skn7 and Msn2 or Msn4 and subtelomeric silencing is not eliminate in presence of oxidative stress; 2) In presence of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and in absence of subtelomeric silencing the *EPA2* expression increase and required transcription factors of oxidative stress Yap1 and Skn7. In addition, Yap1 not showed physical interaction with Skn7 under conditions not oxidants and oxidants. We suggest that the transcriptions factor could be bind temporally and promoted the *EPA2* expression only from the stimulus (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) (Figure 9).

## REFERENCES

- Ausubel, F. M., 1992 *Short protocols in molecular biology : a compendium of methods from Current protocols in molecular biology*. Greene Pub. Associates ; New York, NY : Wiley, Brooklyn, NY.
- Calvin, N. M., and P. C. Hanawalt, 1988 High-efficiency transformation of bacterial cells by electroporation. *J Bacteriol* 170: 2796-2801.
- Castano, I., R. Kaur, S. Pan, R. Cregg, L. Penas Ade *et al.*, 2003 Tn7-based genome-wide random insertional mutagenesis of *Candida glabrata*. *Genome Res* 13: 905-915.
- Castano, I., S. J. Pan, M. Zupancic, C. Hennequin, B. Dujon *et al.*, 2005 Telomere length control and transcriptional regulation of subtelomeric adhesins in *Candida glabrata*. *Mol Microbiol* 55: 1246-1258.
- Cormack, B. P., and S. Falkow, 1999 Efficient homologous and illegitimate recombination in the opportunistic yeast pathogen *Candida glabrata*. *Genetics* 151: 979-987.
- Cormack, B. P., N. Ghori and S. Falkow, 1999 An adhesin of the yeast pathogen *Candida glabrata* mediating adherence to human epithelial cells. *Science* 285: 578-582.
- Cuellar-Cruz, M., M. Briones-Martin-del-Campo, I. Canas-Villamar, J. Montalvo-Arredondo, L. Riego-Ruiz *et al.*, 2008 High resistance to oxidative stress in the fungal pathogen *Candida glabrata* is mediated by a single catalase, Cta1p, and is controlled by the transcription factors Yap1p, Skn7p, Msn2p, and Msn4p. *Eukaryot Cell* 7: 814-825.
- Cuellar-Cruz, M., I. Castano, O. Arroyo-Helguera and A. De Las Penas, 2009 Oxidative stress response to menadione and cumene hydroperoxide in the opportunistic fungal pathogen *Candida glabrata*. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 104: 649-654.
- de Groot, P. W., E. A. Kraneveld, Q. Y. Yin, H. L. Dekker, U. Gross *et al.*, 2008 The cell wall of the human pathogen *Candida glabrata*: differential incorporation of novel adhesin-like wall proteins. *Eukaryot Cell* 7: 1951-1964.

- De Las Penas, A., S. J. Pan, I. Castano, J. Alder, R. Cregg *et al.*, 2003 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* 17: 2245-2258.
- Desai, C., J. Mavrianos and N. Chauhan, 2011 *Candida glabrata* Pwp7p and Aed1p are required for adherence to human endothelial cells. *FEMS Yeast Res* 11: 595-601.
- Domergue, R., I. Castano, A. De Las Penas, M. Zupancic, V. Locketell *et al.*, 2005 Nicotinic acid limitation regulates silencing of *Candida* adhesins during UTI. *Science* 308: 866-870.
- Fidel, P. L., Jr., and J. D. Sobel, 1996 Immunopathogenesis of recurrent vulvovaginal candidiasis. *Clin Microbiol Rev* 9: 335-348.
- Gallegos-Garcia, V., S. J. Pan, J. Juarez-Cepeda, C. Y. Ramirez-Zavaleta, M. Briones-Martin-Del-Campo *et al.*, 2012 A Novel Downstream Regulatory Element Cooperates With the Silencing Machinery to Repress EPA1 Expression in *Candida glabrata*. *Genetics*.
- Gutierrez-Escobedo, G., E. Orta-Zavalza, I. Castano and A. De Las Penas, 2013 Role of glutathione in the oxidative stress response in the fungal pathogen *Candida glabrata*. *Curr Genet* 59: 91-106.
- He, X. J., and J. S. Fassler, 2005 Identification of novel Yap1p and Skn7p binding sites involved in the oxidative stress response of *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Microbiol* 58: 1454-1467.
- Higgins, D. G., J. D. Thompson and T. J. Gibson, 1996 Using CLUSTAL for multiple sequence alignments. *Methods Enzymol* 266: 383-402.
- Iraqi, I., S. Garcia-Sanchez, S. Aubert, F. Dromer, J. M. Ghigo *et al.*, 2005 The Yak1p kinase controls expression of adhesins and biofilm formation in *Candida glabrata* in a Sir4p-dependent pathway. *Mol Microbiol*. 55: 1259-1271.
- Juarez-Reyes, A., C. Y. Ramirez-Zavaleta, L. Medina-Sanchez, A. De Las Penas and I. Castano, 2012 A protosilencer of subtelomeric gene expression in *Candida glabrata* with unique properties. *Genetics* 190: 101-111.
- Kaur, R., R. Domergue, M. L. Zupancic and B. P. Cormack, 2005 A yeast by any other name: *Candida glabrata* and its interaction with the host. *Curr Opin Microbiol* 8: 378-384.
- Knutson, B. A., and S. Hahn, 2011 Domains of Tra1 important for activator recruitment and transcription coactivator functions of SAGA and NuA4 complexes. *Mol Cell Biol* 31: 818-831.
- Kraneveld, E. A., J. J. de Soet, D. M. Deng, H. L. Dekker, C. G. de Koster *et al.*, 2011 Identification and differential gene expression of adhesin-like wall proteins in *Candida glabrata* biofilms. *Mycopathologia* 172: 415-427.
- Kuhn, D. M., and V. K. Vyas, 2012 The *Candida glabrata* adhesin Epa1p causes adhesion, phagocytosis, and cytokine secretion by innate immune cells. *FEMS Yeast Res*. 12: 398-414. doi: 310.1111/j.1567-1364.2011.00785.x. Epub 02012 Jan 00723.
- Lee, J., C. Godon, G. Lagniel, D. Spector, J. Garin *et al.*, 1999 Yap1 and Skn7 control two specialized oxidative stress response regulons in yeast. *J Biol Chem* 274: 16040-16046.
- Mak, H. C., L. Pillus and T. Ideker, 2009 Dynamic reprogramming of transcription factors to and from the subtelomere. *Genome Res* 19: 1014-1025.
- McCord, R., M. Pierce, J. Xie, S. Wonkatal, C. Mickel *et al.*, 2003 Rfm1, a novel tethering factor required to recruit the Hst1 histone deacetylase for repression of middle sporulation genes. *Mol Cell Biol* 23: 2009-2016.
- Morgan, B. A., G. R. Banks, W. M. Toone, D. Raitt, S. Kuge *et al.*, 1997 The Skn7 response regulator controls gene expression in the oxidative stress response of the budding yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO J* 16: 1035-1044.
- Mulford, K. E., and J. S. Fassler, 2011 Association of the Skn7 and Yap1 transcription factors in the *Saccharomyces cerevisiae* oxidative stress response. *Eukaryot Cell* 10: 761-769.



- Mundy, R. D., and B. Cormack, 2009 Expression of *Candida glabrata* adhesins after exposure to chemical preservatives. *J Infect Dis* 199: 1891-1898.
- Ni, L., C. Bruce, C. Hart, J. Leigh-Bell, D. Gelperin *et al.*, 2009 Dynamic and complex transcription factor binding during an inducible response in yeast. *Genes Dev* 23: 1351-1363.
- Orta-Zavalza, E., G. Guerrero-Serrano, G. Gutierrez-Escobedo, I. Canas-Villamar, J. Juarez-Cepeda *et al.*, 2013 Local silencing controls the oxidative stress response and the multidrug resistance in *Candida glabrata*. *Mol Microbiol* 88: 1135-1148.
- Regot, S., E. de Nadal, S. Rodriguez-Navarro, A. Gonzalez-Novo, J. Perez-Fernandez *et al.*, 2013 The Hog1 stress-activated protein kinase targets nucleoporins to control mRNA export upon stress. *J Biol Chem* 288: 17384-17398.
- Roetzer, A., N. Gratz, P. Kovarik and C. Schuller, 2010 Autophagy supports *Candida glabrata* survival during phagocytosis. *Cell Microbiol* 12: 199-216.
- Roetzer, A., C. Gregori, A. M. Jennings, J. Quintin, D. Ferrandon *et al.*, 2008 *Candida glabrata* environmental stress response involves *Saccharomyces cerevisiae* Msn2/4 orthologous transcription factors. *Mol Microbiol* 69: 603-620.
- Roetzer, A., E. Klopff, N. Gratz, M. Marcet-Houben, E. Hiller *et al.*, 2011 Regulation of *Candida glabrata* oxidative stress resistance is adapted to host environment. *FEBS Lett* 585: 319-327.
- Rosas-Hernandez, L. L., A. Juarez-Reyes, O. E. Arroyo-Helguera, A. De Las Penas, S. J. Pan *et al.*, 2008 yKu70/yKu80 and Rif1 regulate silencing differentially at telomeres in *Candida glabrata*. *Eukaryot Cell* 7: 2168-2178.
- Saijo, T., T. Miyazaki, K. Izumikawa, T. Mihara, T. Takazono *et al.*, 2010 Skn7p is involved in oxidative stress response and virulence of *Candida glabrata*. *Mycopathologia* 169: 81-90.
- Sherman, F., G. R. Fink, and J. B. Hicks. (Editor), 1986 *Methods in yeast genetics*. Cold Spring Harbor, New York.
- Thomas-Chollier, M., M. Defrance, A. Medina-Rivera, O. Sand, C. Herrmann *et al.*, 2011 RSAT 2011: regulatory sequence analysis tools. *Nucleic Acids Res.* 39: W86-91. doi: 10.1093/nar/gkr1377.
- Thomas-Chollier, M., O. Sand, J. V. Turatsinze, R. Janky, M. Defrance *et al.*, 2008 RSAT: regulatory sequence analysis tools. *Nucleic Acids Res.* 36: W119-127. doi: 110.1093/nar/gkn1304. Epub 2008 May 1021.
- van Helden, J., 2003 Regulatory sequence analysis tools. *Nucleic Acids Res.* 31: 3593-3596.
- Verstrepen, K. J., A. Jansen, F. Lewitter and G. R. Fink, 2005 Intragenic tandem repeats generate functional variability. *Nat Genet* 37: 986-990.
- Zupancic, M. L., M. Frieman, D. Smith, R. A. Alvarez, R. D. Cummings *et al.*, 2008 Glycan microarray analysis of *Candida glabrata* adhesin ligand specificity. *Mol Microbiol* 68: 547-559.

## Acknowledgments

This work was funded by a Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) fellowship to J.J.C. (48549) and E.O.Z. (233455). This work was funded by a CONACYT grant no. CB--2010-153929 to A.D.L.P and grant no. CB- 2010-151517 to I.C.N.

## Figure Legends

**Figure 1.** Influence of the transcription factors Yap1, Skn7, Msn2 and Msn4 on the expression of *EPA2* with H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. *C. glabrata* parental strain (BG14), *yap1*Δ (CGM297), *skn7*Δ (BG306), *msn2*Δ (CGM833), *msn4*Δ (CGM835), *yap1*Δ*skn7*Δ (CGM310), *msn2*Δ*msn4*Δ (CGM837), *yap1*Δ*skn7*Δ*msn2*Δ (CGM386), *yap1*Δ*skn7*Δ*msn4*Δ (CGM388) and *yap1*Δ*skn7*Δ*msn2*Δ*msn4*Δ (CGM537) mutant strains were grown for 48 hr at 30 °C with constant shaking in SC media. Cultures were diluted in spent medium to OD<sub>600nm</sub> of 1.0 and treated with or without 10 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. RNA samples were isolated as described in material and methods. The values, which are means (±SD) of three separate experiments, represent the increase in gene expression relative to the treated BG14 strain with H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (normalized to 1.0). *EPA2* expression was normalized by *ACT1* expression levels. Results are expressed as n-fold abundance relative to the induction with H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

**Figure 2.** *EPA2* expression in the absence of Sir3-mediated silencing. *C. glabrata* parental strain (BG14) and the *sir3*Δ mutant (CGM24) were grown for 48 hr at 30 °C with constant shaking in SC media. Cultures were diluted in spent medium to OD<sub>600nm</sub> of 1.0 and treated with or without 10 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. RNA samples were isolated and used for quantitative PCR (See Material and Methods). The values, which are means (± SD) of technical triplicates, represent the increase in gene expression relative to the treated parental strain with H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (normalized to 1.0). *EPA2* expression was normalized by *ACT1* expression levels. Three separate experiments were performed.

**Figure 3.** Influence of the oxidative stress transcription factors and the subtelomeric silencing on the expression of *EPA2* under oxidants conditions. Stationary phase cells of the *C. glabrata* *sir3*Δ strain mutant (CGM24) and the *yap1*Δ (CGM1168), *skn7*Δ (CGM1170), *msn2*Δ (CGM1172), *msn4*Δ (CGM1174), *yap1*Δ*skn7*Δ (CGM1176), *msn2*Δ*msn4*Δ (CGM1178), *yap1*Δ*skn7*Δ*msn2*Δ (CGM1180), *yap1*Δ*skn7*Δ*msn4*Δ (CGM1182) and *yap1*Δ*skn7*Δ*msn2*Δ*msn4*Δ (CGM1245) on *sir3*Δ background were grown for 48 hr at 30 °C with constant shaking in SC media. Cultures were diluted in spent medium to OD<sub>600nm</sub> of 1.0 and treated with or without 10 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Total RNA was extracted and used for

quantitative PCR (See Material and Methods). Results are expressed as *n*-fold abundance relative to the induction level in *sir3*Δ untreated. Technical triplicates and three separate experiments were carried out.

**Figure 4.** Effect of the subtelomeric silencing on the expression of *EPA2* in presence of oxidative stress. The level of silencing of the *URA3* gene inserted at different positions throughout the telomere E was assessed using a plate growth assay as described in material and methods. Schematic representation of the positions of three different insertions of Tn7 (containing the *URA3* reporter gene) throughout different *C. glabrata* strains (parental and *sir3*Δ). The cultures were grown in YPD for 36 hr to stationary phase. After growth, strains were diluted to OD<sub>600nm</sub> of 0.5 with sterile water, and 10-fold serial dilutions were spotted onto YPD, SC-Ura, SC+5-FOA and SC+5-FOA+5mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Plates were incubated at 30 °C for 48 hr. Ura<sup>+</sup> are unable to grow on SC +5-FOA plates. Only cells with the *URA3* gene transcriptionally repressed can grow on SC +5-FOA. Experiments were repeated at least three times. See Materials and Methods.

**Figure 5.** Alignment of the proteins sequences of Skn7 and Yap1 from *Candida glabrata* and *Saccharomyces cerevisiae*. Identical residues are shaded. A) Alignment of Skn7. The green residues are heat shock factor domain highly similar between the two species. At the bottom are shown the highlighted amino acids to promote interaction between Skn7 and Yap1 in *S. cerevisiae*. B) Alignment of Yap1. Yellow color residue determined the binding to response elements Yap (YRE). ScYap1 binds to YRE-O, while CgYap1 binds most to YRE-A. Blue color residues are required for interactions between Skn7 and Yap1 in *S. cerevisiae*.

**Figure 6.** Analysis of Yap1 and Skn7 physical interaction. Total extracts were obtained from stationary phase cells of the parental strain (BG14, untagged, lane 1), from the single tagged strains: CGM1792 (Yap1-Flag, lane 2) and CGM1505 (Skn7-cMyc, lane 3); and from the double tagged strains: CGM1548 (Skn7::cMyc/Yap1::Flag, lane 4). Proteins of the extracts were immunoprecipitated using sepharose beads coated with an anti-Flag antibody

(IP  $\alpha$ -Flag). The presence of the tagged proteins was detected by immunoblot analysis using anti-cMyc or anti-Flag, antibodies in the crude extracts (input), the remaining supernatant (SN) and the immunoprecipitated fraction (IP). IP, immunoprecipitation; WB, Western blot; SN, supernatant

**Figure 7.** Found motifs on *EPA*s promoter sequences of *Candida glabrata*. For this analysis we used a 2000bp upstream sequence starting from putative translation start of these genes. **A)** The motifs TKGGMAG, YTTKSMAAR and CTTKYRMAR are more overrepresented than the other ones, and these are present on the *EPA1*, *EPA2*, *EPA3* and *EPA19* promoter sequences analyzed. **B).** Motifs WGSAAATTACW, SWCAATTGWS, GCAMTTG are found only in *EPA1* and *EPA2*.

**Figure 8.** Chromatin immunoprecipitation assay.

**Figure 9:** The regulation of *EPA2* in *Candida glabrata*. Under normal conditions *EPA2* is not expressed due to the subtelomeric silencing. When *C. glabrata* is exposed to oxidative stress, *EPA2* is induced a fashion that depends on Skn7, Yap1 and Msn2 or Msn4 and that subverts the subtelomeric silencing. When the subtelomeric silencing machinery is inactive, *EPA2* has a basal expression. *EPA2* expression increases further with oxidative stress and requires mainly of Yap1 and Skn7. Yap1 and Skn7 participate in the regulation of *EPA2* independently because they do not physically interact.

**Table 1 Strains used in this study**

Strains	Parent	Genotype and/or Description	Reference or source
<b><i>Escherichia coli</i> strains</b>			
DH10		F- <i>mcrA</i> Δ ( <i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i> ) Φ80 <i>dlacZ</i> Δ <i>M15</i> Δ <i>lacX74 deoR recA1 endA1 araD139</i> Δ ( <i>ara, leu</i> )7697 <i>galU galK λ- rpsL nupG</i>	(CALVIN and HANAWALT 1988)
<b><i>Candida glabrata</i> strains</b>			
BG2		Clinical isolate	(FIDEL and SOBEL 1996)
BG14	BG2	<i>ura3</i> Δ::Tn903 G418 <sup>R</sup> , <i>wild type</i> , Ura <sup>-</sup> , Hyg <sup>S</sup>	(CORMACK and FALKOW 1999)
<b>Insertions</b>			
CGM147	CGM1	<i>ura3</i> Δ::Tn903 G418 <sup>R</sup> , Tn7 at intergenic region between <i>EPA1</i> and <i>EPA2</i> (pAP508/ <i>SpeI-BcgI</i> ); Ura <sup>-</sup>	(DE LAS PENAS <i>et al.</i> 2003)
CGM148	CGM1	<i>ura3</i> Δ::Tn903 G418 <sup>R</sup> , Tn7 at intergenic region between <i>EPA2</i> and <i>EPA3</i> (pAP559/ <i>BsrG-SphI</i> ); Ura <sup>-</sup>	(DE LAS PENAS <i>et al.</i> 2003)
CGM149	CGM1	<i>ura3</i> Δ::Tn903 G418 <sup>R</sup> , Tn7 at intergenic region between <i>EPA3</i> and telomere <i>EPA3</i> (pAP553/ <i>PstI-EcoRI</i> ); Ura <sup>-</sup>	(DE LAS PENAS <i>et al.</i> 2003)
CGM282	CGM147	<i>ura3</i> Δ::Tn903 G418 <sup>R</sup> , <i>sir3</i> Δ:: <i>hph</i> (pIC120/ <i>KpnI-HpaI</i> +T4 DNA polymerase). Tn7 at intergenic region between <i>EPA1</i> and <i>EPA2</i> (insertion 2); Hyg <sup>R</sup>	(ROSAS-HERNANDEZ <i>et al.</i> 2008)
CGM287	CGM148	<i>ura3</i> Δ::Tn903 G418 <sup>R</sup> , <i>sir3</i> Δ:: <i>hph</i> (pIC120/ <i>KpnI-HpaI</i> +T4 DNA polymerase). Tn7 en at intergenic region between <i>EPA2</i> and <i>EPA3</i> (insertion 3); Hyg <sup>R</sup>	(ROSAS-HERNANDEZ <i>et al.</i> 2008)
CGM289	CGM149	<i>ura3</i> Δ::Tn903 G418 <sup>R</sup> , <i>sir3</i> Δ:: <i>hph</i> (pIC120/ <i>KpnI-HpaI</i> +T4 DNA polymerase). Tn7 at intergenic region between <i>EPA3</i> and telomere (insertion 4); Hyg <sup>R</sup>	(ROSAS-HERNANDEZ <i>et al.</i> 2008)
<b>Transcription factors mutants</b>			
CGM297 <i>yap1</i> Δ	BG14	<i>ura3</i> Δ::Tn903 G418 <sup>R</sup> <i>yap1</i> Δ:: <i>hph</i> , Hyg <sup>R</sup> pCV17/ <i>BsgI</i>	(CUELLAR-CRUZ <i>et al.</i> 2008)
CGM306 <i>skn7</i> Δ	BG14	<i>ura3</i> Δ::Tn903 G418 <sup>R</sup> <i>skn7</i> Δ:: <i>hph</i> , Hyg <sup>R</sup> pCV21/ <i>BsgI</i>	(CUELLAR-CRUZ <i>et al.</i> 2008)

CGM310 <i>yap1Δskn7Δ</i>	CGM308	<i>ura3Δ::Tn903 G418<sup>R</sup> yap1Δskn7Δ::hph</i> , Hyg <sup>R</sup> pCV21/BsgI	(CUELLAR- CRUZ <i>et al.</i> 2008)
CGM386 <i>yap1Δskn7Δmsn2Δ</i>	CGM385	<i>ura3Δ::Tn903 G418<sup>R</sup></i> <i>yap1Δskn7Δmsn2Δ::hph</i> , Hyg <sup>R</sup>	(CUELLAR- CRUZ <i>et al.</i> 2008)
CGM388 <i>yap1Δskn7Δmsn4Δ</i>	CGM385	<i>ura3Δ::Tn903 G418<sup>R</sup></i> <i>yap1Δskn7Δmsn4Δ::hph</i> , Hyg <sup>R</sup>	(CUELLAR- CRUZ <i>et al.</i> 2008)
CGM518 <i>wt</i>	CGM1	pGRB2.0 <i>CEN/ARS URA3</i> , Ura <sup>+</sup>	Lab collection
CGM537 <i>yap1Δskn7Δmsn4Δmsn2Δ</i>	CGM480	<i>ura3Δ::Tn903 G418<sup>R</sup></i> <i>yap1Δskn7Δmsn4Δmsn2Δ::hph</i> , Hyg <sup>R</sup>	(CUELLAR- CRUZ <i>et al.</i> 2008)
CGM833 (BG1739) <i>msn2Δ</i>	BG14	<i>ura3Δ::Tn903 G418<sup>R</sup> msn2Δ</i> , Hyg <sup>S</sup> Ura <sup>-</sup> pRD96/BcgI	R. Domergue y B. Cormack
CGM835 (BG1740) <i>msn4Δ</i>	BG14	<i>ura3Δ::Tn903 G418<sup>R</sup> msn4Δ</i> , Hyg <sup>S</sup> Ura <sup>-</sup> pRD97/BcgI	R. Domergue y B. Cormack
CGM 837 (BG1742) <i>msn2Δmsn4Δ</i>	BG1739	<i>ura3Δ::Tn903 G418<sup>R</sup> msn2Δmsn4Δ::hph</i> , Hyg <sup>R</sup> pRD97/BcgI	R. Domergue y B. Cormack
<b>Transcription factors mutants with background <i>sir3Δ::hph</i></b>			
CGM24 <i>sir3Δ</i>	BG14	<i>ura3Δ::Tn903 G418<sup>R</sup> sir3Δ::hph</i> , Hyg <sup>R</sup>	Lab collection
CGM1168 <i>yap1Δsir3Δ</i>	CGM308	<i>ura3Δ::Tn903 G418<sup>R</sup> yap1Δsir3Δ::hph</i> , Hyg <sup>R</sup> (pIC120/KpnI-HpaI+T4 DNA polymerase)	This study
CGM1170 <i>skn7Δsir3Δ</i>	CGM355	<i>ura3Δ::Tn903 G418<sup>R</sup> skn7Δsir3Δ::hph</i> , Hyg <sup>R</sup> (pIC120/KpnI-HpaI+T4 DNA polymerase)	This study
CGM1172 <i>msn2Δsir3Δ</i>	CGM833	<i>ura3Δ::Tn903 G418<sup>R</sup> msn2Δsir3Δ::hph</i> , Hyg <sup>R</sup> (pIC120/KpnI-HpaI+T4 DNA polymerase)	This study
CGM1174 <i>msn4Δsir3Δ</i>	CGM835	<i>ura3Δ::Tn903 G418<sup>R</sup> msn4Δsir3Δ::hph</i> , Hyg <sup>R</sup> (pIC120/KpnI-HpaI+T4 DNA polymerase)	This study
CGM1176 <i>yap1Δskn7Δsir3Δ</i>	CGM385	<i>ura3Δ::Tn903 G418<sup>R</sup></i> <i>yap1Δskn7Δsir3Δ::hph</i> , Hyg <sup>R</sup> (pIC120/KpnI-HpaI+T4 DNA polymerase)	This study
CGM1178 <i>msn2Δmsn4Δsir3Δ</i>	CGM1025	<i>ura3Δ::Tn903 G418<sup>R</sup></i> <i>msn2Δmsn4Δsir3Δ::hph</i> , Hyg <sup>R</sup> (pIC120/KpnI-HpaI+T4 DNA polymerase)	This study

CGM1180 <i>skn7Δyap1Δmsn2Δsir3Δ</i>	CGM477	<i>ura3Δ::Tn903 G418<sup>R</sup></i> <i>yap1Δskn7Δmsn2Δsir3Δ::hph</i> , Hyg <sup>R</sup> (pIC120/ <i>KpnI-HpaI</i> +T4 DNA polymerase)	This study
CGM1182 <i>skn7Δyap1Δmsn4Δsir3Δ</i>	CGM480	<i>ura3Δ::Tn903 G418<sup>R</sup></i> <i>yap1Δskn7Δmsn4Δsir3Δ::hph</i> , Hyg <sup>R</sup> (pIC120/ <i>KpnI-HpaI</i> +T4 DNA polymerase)	This study
CGM1245 <i>skn7Δyap1Δmsn4Δmsn2Δsir3Δ</i>	CGM1238	<i>ura3Δ::Tn903 G418<sup>R</sup></i> <i>yap1Δskn7Δmsn4Δmsn2Δsir3Δ::hph</i> , Hyg <sup>R</sup> (pIC120/ <i>KpnI-HpaI</i> +T4 DNA polymerase)	This study
<b>Strains with Tag</b>			
CGM1236 <i>HST1::MYC</i> <i>SUM1::FLAG</i>	CGM983	<i>ura3Δ::Tn903 G418<sup>R</sup></i> ( <i>HST1::MYC</i> , <i>SUM1::FLAG</i> ) Transformed with pMZ21, Ura <sup>-</sup> Hyg <sup>S</sup>	(ORTA-ZAVALZA <i>et al.</i> 2013)
CGM1505 <i>SKN7::MYC</i>	CGM1482	<i>ura3Δ::Tn903 G418<sup>R</sup></i> pJC52/ <i>BamHI-BglII</i> ( <i>SKN7::MYC</i> ) Transformed with pMZ21, Ura <sup>-</sup> Hyg <sup>S</sup>	This study
CGM1548 <i>SKN7::MYC</i> , <i>YAP1::FLAG</i>	CGM1528	<i>ura3Δ::Tn903 G418<sup>R</sup></i> pJC50/ <i>MfeI-BsgI</i> ( <i>SKN7::MYC</i> , <i>YAP1::FLAG</i> ) Transformed with pMZ21, Ura <sup>-</sup> Hyg <sup>S</sup>	This study
CGM1763 <i>YAP1::FLAG</i>	CGM1747	<i>ura3Δ::Tn903 G418<sup>R</sup></i> pJC50/ <i>BsgI-BsgI</i> ( <i>YAP1::FLAG</i> ) Transformed with pMZ21, Ura <sup>-</sup> Hyg <sup>S</sup>	This study

**Table 2 Plasmids**

<b>Plasmids</b>	<b>Description and/or genotype</b>	<b>Reference</b>
	<b>Cloning vectors</b>	
pGEM®-T	Cloning vector. Ap <sup>R</sup>	Promega® No. Cat.: A3600
pMB11	Cloning vector, <i>sacB</i> counterselection Cm <sup>R</sup> <i>ori</i> p15A	Lab collection
pGRB2.0	Cloning vector, pRS406 <i>URA3 CgCEN ARS</i> Ap <sup>R</sup>	(DE LAS PENAS <i>et al.</i> 2003; DOMERGUE <i>et al.</i> 2005)
pOZ18	<i>cMyc13</i> -tagging vector. Contains a 0.563 kb fragment encoding thirteen repetitions of the <i>cMyc</i> epitope followed by a 0.289 kb fragment of the <i>CgCTAI</i> 3' UTR non coding sequence and an <i>hph</i> cassette. The <i>CgCTAI</i> 3' UTR and the <i>hph</i> cassette are flanked by two <i>FRT</i> direct repeats to remove the selection marker for generation of multiple tagged strains in <i>C. glabrata</i> . [ <i>cMyc-FRT-3'UTR<sub>CgCTAI</sub>-P<sub>ScPGK1</sub>::hph::3'UTR<sub>ScHIS3</sub>-FRT</i> ] <i>URA3 Hyg<sup>R</sup> Ap<sup>R</sup></i>	Lab collection
pEG40	<i>FLAG</i> -tagging vector. Contains a 0.103 kb fragment encoding three repetitions of the <i>FLAG</i> epitope followed by a 0.289 kb fragment of the <i>CgCTAI</i> 3' UTR non coding sequence and an <i>hph</i> cassette. The <i>CgCTAI</i> 3' UTR and the <i>hph</i> cassette are flanked by two <i>FRT</i> direct repeats to remove the selection marker for generation of multiple tagged strains in <i>C. glabrata</i> . [ <i>FLAG-FRT-3'UTR<sub>CgCTAI</sub>-P<sub>ScPGK1</sub>::hph::3'UTR<sub>ScHIS3</sub>-FRT</i> ] <i>URA3 Hyg<sup>R</sup> Ap<sup>R</sup></i>	Lab collection
	<b>For gene disruption</b>	
pIC120 (FRT- <i>sir3Δ::hph</i> -FRT, Hyg <sup>R</sup> )	A 0.551 kb PCR fragment carrying <i>SIR3</i> 5' and a 0.978 kb PCR fragment carrying <i>SIR3</i> 3' non coding regions cloned into pRS306. pIC39 cut with <i>Bam</i> HI blunt ended with (T4 polymerase) and ligated to a 2.0kb <i>Bam</i> HI/ <i>Hind</i> III blunt (T4 pol) ended hygromycin cassette from pAP599. Ap <sup>R</sup> <i>SIR3</i> deletion vector. A 2.1 kb <i>Hind</i> III- <i>Bam</i> HI fragment from pAP599 containing [FRT- <i>P<sub>PGK</sub>::hph::3'UTR<sub>HIS3</sub></i> -FRT] cloned into pIC39 between <i>SIR3</i> 5' and 3' non-coding regions.	(ROSAS- HERNANDEZ <i>et al.</i> 2008)
	<b>For marker removal</b>	
pMZ21	Contains <i>FLP1</i> driven by <i>C. glabrata</i> <i>EPA1</i> promoter. The	B. Cormack



	Flp recombinase expressed from this plasmid can recognize <i>FRT</i> sites and recycle the <i>hph</i> or <i>NatMX</i> cassettes. <i>URA3, Cg CEN ARS, Ap<sup>R</sup></i>	lab collection
	<b>For epitope tagging</b>	
pJC24 pGEM:: 3'UTR <i>SKN7</i>	A 0.686 Kb <i>HindIII/KpnI</i> PCR fragment (primers 420/421) carrying the 3'UTR of <i>SKN7</i> cloned into pGEM digested with <i>HindIII/KpnI</i> , <i>Ap<sup>R</sup></i>	This study
pJC25 pGEM::3'OR F <i>SKN7</i>	A 0.417 Kb <i>SacI/BglII</i> PCR fragment (primers 422/423) carrying the 3'ORF of <i>SKN7</i> cloned into pGEM digested with <i>SacI/BglII</i> , <i>Ap<sup>R</sup></i>	This study
pJC27 pGEM::3'UT R <i>YAP1</i>	A 0.963 Kb <i>HindIII/KpnI</i> PCR fragment (primers 424/425) carrying the 3'UTR of <i>YAP1</i> cloned into pGEM digested with <i>HindIII/KpnI</i> , <i>Ap<sup>R</sup></i>	This study
pJC29 pGEM::3'OR F <i>YAP1</i>	A 0.743 Kb <i>SacI/BamHI</i> PCR fragment (primers 426/427) carrying the 3'ORF of <i>YAP1</i> cloned into pGEM digested with <i>SacI/BamHI</i> , <i>Ap<sup>R</sup></i>	This study
pJC44 pEG40::3'UT R <i>YAP1</i>	A 0.963 Kb <i>HindIII/KpnI</i> PCR fragment (primers 424/425) carrying the 3'UTR of <i>YAP1</i> derived from pJC27, cloned into pEG40 digested with <i>HindIII/KpnI</i> , <i>URA3 Ap<sup>R</sup></i>	This study
pJC46 pOZ18::3'OR F <i>SKN7</i>	A 0.417 Kb <i>SacI/BglII</i> PCR fragment (primers 422/423) carrying the 3'ORF of <i>SKN7</i> derived from pJC25, cloned into pOZ18 digested with <i>SacI/BamHI</i> , <i>URA3 Ap<sup>R</sup></i>	This study
pJC50 pJC44::3'ORF <i>YAP1</i>	A 0.734 Kb <i>SacI/BamHI</i> PCR fragment (primers 426/427) carrying the 3'ORF of <i>YAP1</i> derived from pJC29, cloned into pJC44 digested with <i>SacI/BamHI</i> , <i>URA3 Ap<sup>R</sup></i>	This study
pJC52 pJC46::3'UTR <i>SKN7</i>	A 0.686 Kb <i>HindIII/KpnI</i> PCR fragment (primers 420/421) carrying the 3'UTR of <i>SKN7</i> derived from pJC24, cloned into pJC46 digested with <i>HindIII/KpnI</i> , <i>URA3 Ap<sup>R</sup></i>	This study

**Table 3 Primers used in this study**

Primers	Sequence (5'- 3') <sup>a</sup>	Description
	<b>Deletions in <i>sir3Δ</i></b>	
15	CGATAAGAGGCCACGTGCTTTATG	P-PGK Rv out
16	AGAAATACGCACGAACACGATATAGAGG	3'UTR HIS3 Fw out
54	GCAGCCACTGCACAAGAATC	SIR3@-943Fw
55	AGGCAGCTCGCCAGAATCCCATTC	SIR3@-968Rv
108	GACCTGGAAGGATGGCAGATAATC	SIR3 int@18Fw
109	GGGCTTGAACCTCCTTGTAGTAGTC	SIR3 int@323Rv
	<b>qPCR</b>	
219	CGCCGGTGACGATGCTCC	ACT1@70Fw RTqPCR
977	CGTTGTAGAAAGTGTGATGC	ACT1@258Rv RTqPCR
1268	GAATCTTGGTGCTGGAAATGC	EPA2@480Fw RTqPCR
1269	TGGACATTGCTCTTCATCAGA	EPA2@739Rv RTqPCR
	<b>Strains with TAG</b>	
3	TTGCGGCATACTCTATTGGTG	SKN7@+1066Rv
6	GTGGAGAAGATAGCACACTCATG	SKN7@-962Fw
9	GAATACTGGCAATAGCAGCAGAG	YAP1@-933Fw
10	TGGCTAAGCTTGAACCTTTTCG	YAP1@+973Rv
15	CGATAAGAGGCCACGTGCTTTATG	P-PGK Rv out
16	AGAAATACGCACGAACACGATATAGAGG	3'UTRHIS3 Fw out
351	GCG <u>AGATCT</u> CTATGAATTAAGACATAACATCA AGTCCC	CTA1@+290bpBglII Rv
420	GCC <u>AAGCTT</u> TTGCATCTCTAACTAGTATTTTAT TCC	SKN7@+1HindFw
421	GCGGGTACCTGAACTAAAAGTGTACGCAAGG	SKN7@+687KpnRv
422	GCGGAGCTCCACATACCTACAACACGGAATG	SKN7@1476SacFw
423	GCG <u>AGATCT</u> TCGTATGTTGCTTCTTAAATGCA G	SKN7@1893BglRv
424	GCG <u>AAGCTT</u> TCACCTGTCTATATTATCTCGGT AGA	YAP1@+1HindFw
425	GCGGGTACCGTGCAGGAACCTTTTCGATTACA GTTTCAATG	YAP1@+964KpnBsg Rv
426	GCGGAGCTCGTGCAGGGGATTCGGTGATAAC TTGT	YAP1@723SacBsgFw
427	GCGGGATCCTAGACATGTGCTTATTTAAAGCA AC	YAP1@1767BamHRv
	<b>ChIP</b>	
1726	AGCACTTGCGAGATGAGACTCC	GPX2 RI Fw-ChIP

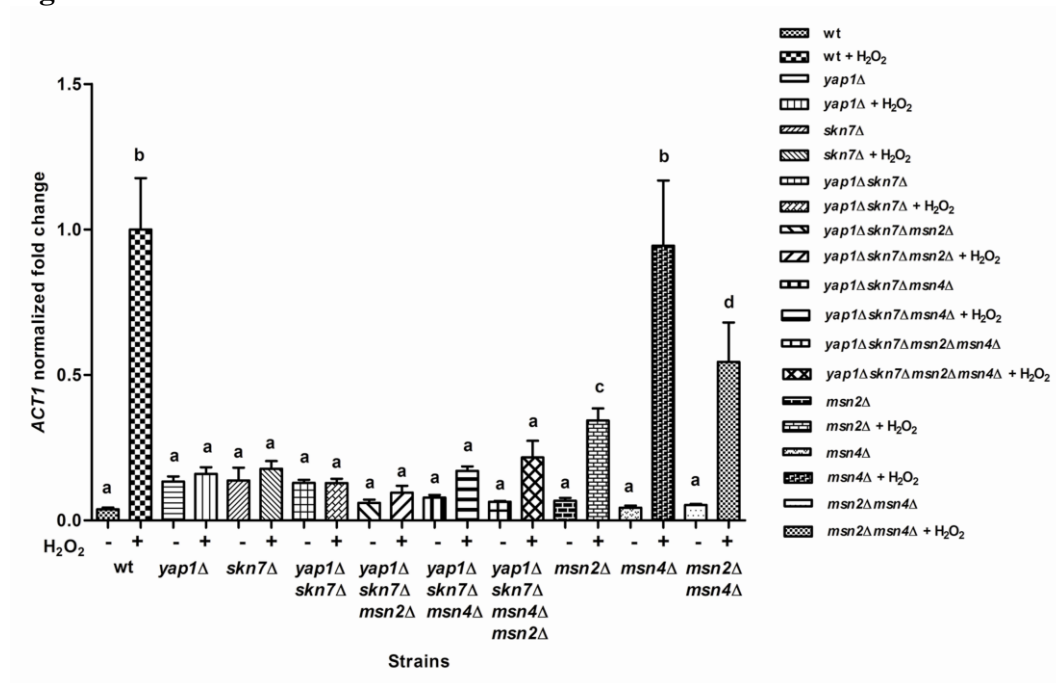
1727	GGAGTTAATAAAGCAGCCTCCG	GPX2 RI Rev-ChIP
1728	TGTAAC <sup>a</sup> TTTGCAC <sup>a</sup> TTTGCACCC	TRR2 RI Fw-ChIP
1729	CGAAAGATTGAAGTTCTCTTCG	TRR2 RI Rev-ChIP
1730	CGGAACTCATAACCAATAGCTCG	cgCEN B Fw-ChIP
1731	GGAATATACTTCCCAACGAATTC	cgCEN B Rev-ChIP
1732	GCAGAAGTGTAGGAATCCCAGC	ACT1-522Fw-ChIP
1733	GGCCAGGGCTTCTCAGTTAG	ACT1-343Rev-ChIP
1734	CTTGCCAAGAGAGAGGTTTCATTC	EPA2-996Fw-ChIP
1735	GTAGGTAAAGATTGACATGCGCA	EPA2-750Rev-ChIP
1736	ATTACCCATGGAGAGAAAGCACC	EPA2-1234Fw-ChIP
1737	TCGAAAGCTGTCTGCTCTATCCC	EPA2-1028Rev-ChIP
1738	GATTGGCAGTCTCGACCGTTTC	EPA2-2010Fw-ChIP
1739	CAAAGATTTGCATAATTGTACCA	EPA2-2104Fw-ChIP
1740	GGTGGAGCCGTCTTCTTGAA	EPA2-1740Rev-ChIP
1741	CAAAGTAAGGGTTAAACCATGATG	EPA2-2509Fw-ChIP
1742	CCTTGTCCATGGTAACGTATATTG	EPA2-2295Rev-ChIP
1743	CTATCTTCCC <sup>a</sup> ACTTTGTGCATGC	EPA2-2920Fw-ChIP
1744	CCC <sup>a</sup> ACTTAAAGCACAAATTATACAG	EPA2-2765Rev-ChIP
1745	CTGAAGACATTAGTACTCCATCCC	EPA2-3849Fw-ChIP
1746	GGGATGGATTATACAAACTGGGT	EPA2-3527Rev-ChIP
1747	GTAAACAGTCAATCCAATGCCG	EPA2-5352Fw-ChIP
1748	CAAGTACCAAATTTTCGAATGATT	EPA2-4934Rev-ChIP

<sup>a</sup>Underline indicates restriction site.

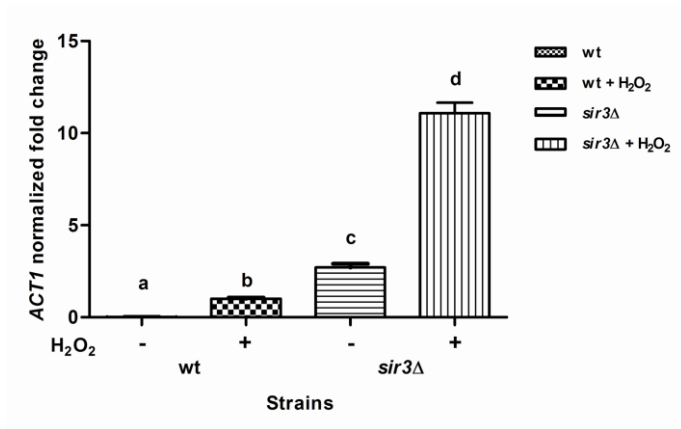
**Table 4 Genes used in promoter analysis**

<b>Gene dependent on</b>	<b>Systematic name</b>	<b>Gene name</b>
Yap1/Skn7	CAGL0A02530g	<i>TRR1</i>
Yap1/Skn7	CAGL0C01705g	<i>GPX2</i>
Yap1/Skn7	CAGL0F08767g	-----
Yap1/Skn7	CAGL0G04609g	<i>PKH2</i>
Yap1/Skn7	CAGL0G07271g	<i>TSA1</i>
Yap1/Skn7	CAGL0G09977g	<i>GDB1</i>
Yap1/Skn7	CAGL0I01166g	<i>TRR2</i>
Yap1/Skn7	CAGL0K00803g	<i>TRX2</i>
Yap1/Skn7	CAGL0K06259g	<i>TSA2</i>
Yap1/Skn7	CAGL0K08184g	<i>CCP1</i>
Yap1/Skn7	CAGL0K10868g	<i>CTA1</i>
Yap1/Skn7	CAGL0L04664g	<i>HEM15</i>
Yap1	CAGL0C00275g	<i>HSP31</i>
Yap1	CAGL0E05280g	<i>GRE2</i>
Yap1	CAGL0F03399g	<i>SCS7</i>
Yap1	CAGL0H02739g	<i>MAS1</i>
Yap1	CAGL0I02574g	<i>OYE2</i>
Yap1	CAGL0K12958g	<i>YML131w</i>
Yap1	CAGL0L07656g	<i>GLO1</i>
Yap1	CAGL0M14047g	<i>ADH6</i>

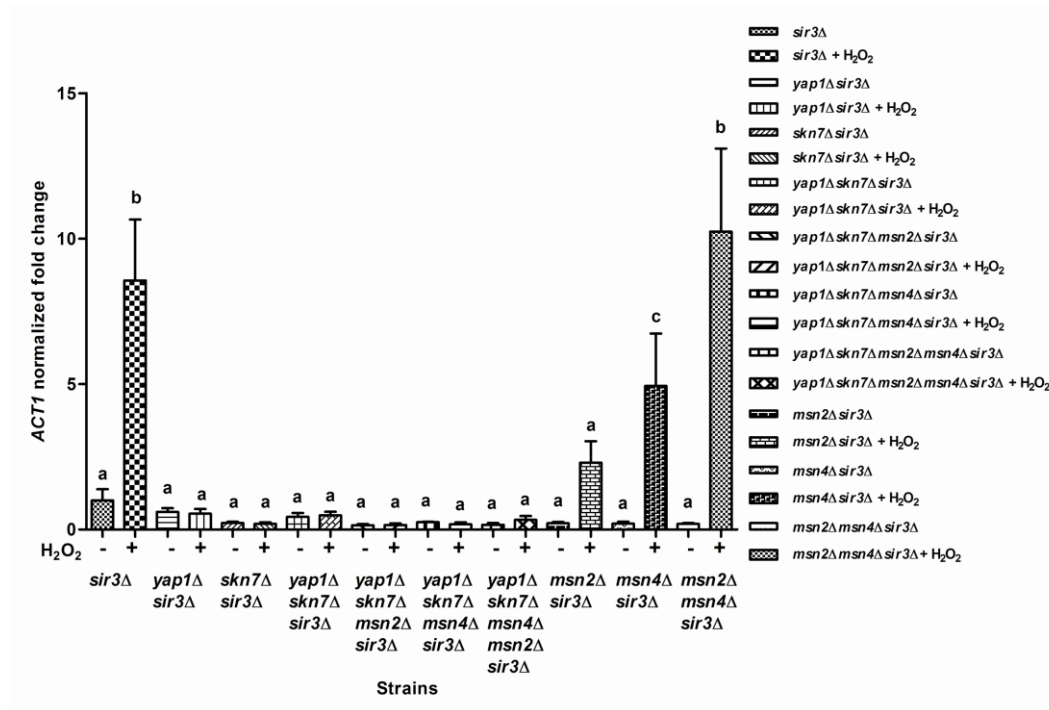
**Fig1**



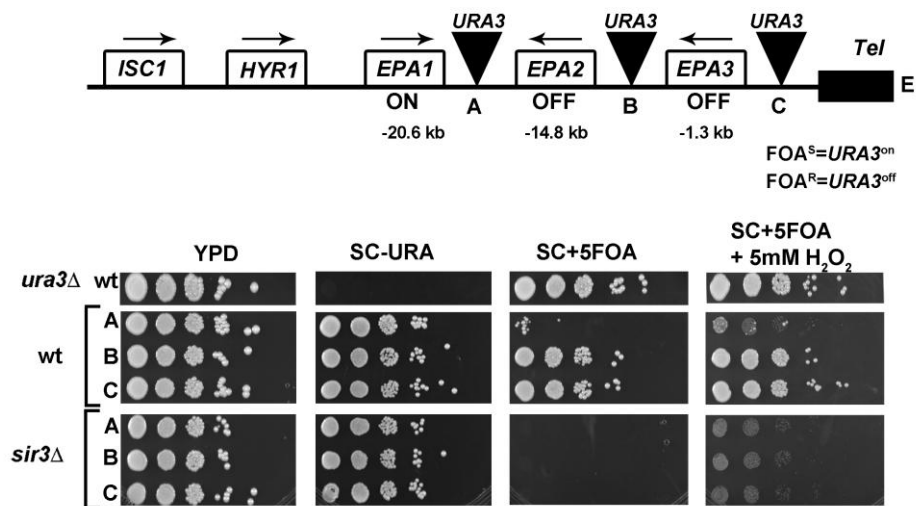
**Fig2**



**Fig3**

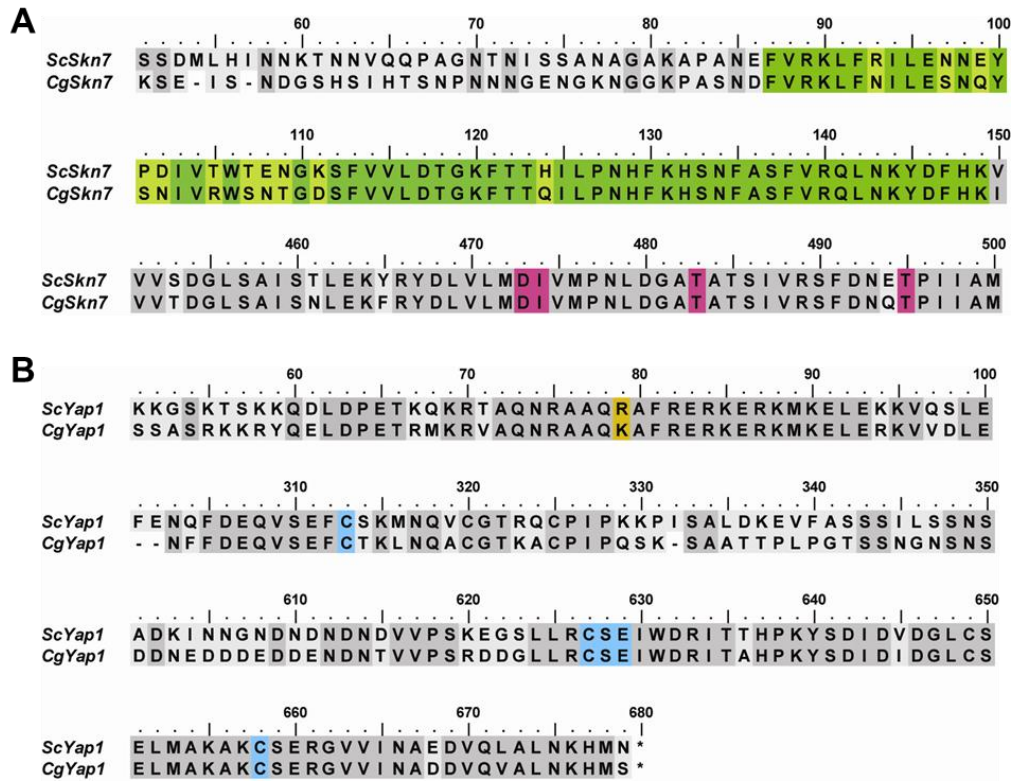


**Fig4**

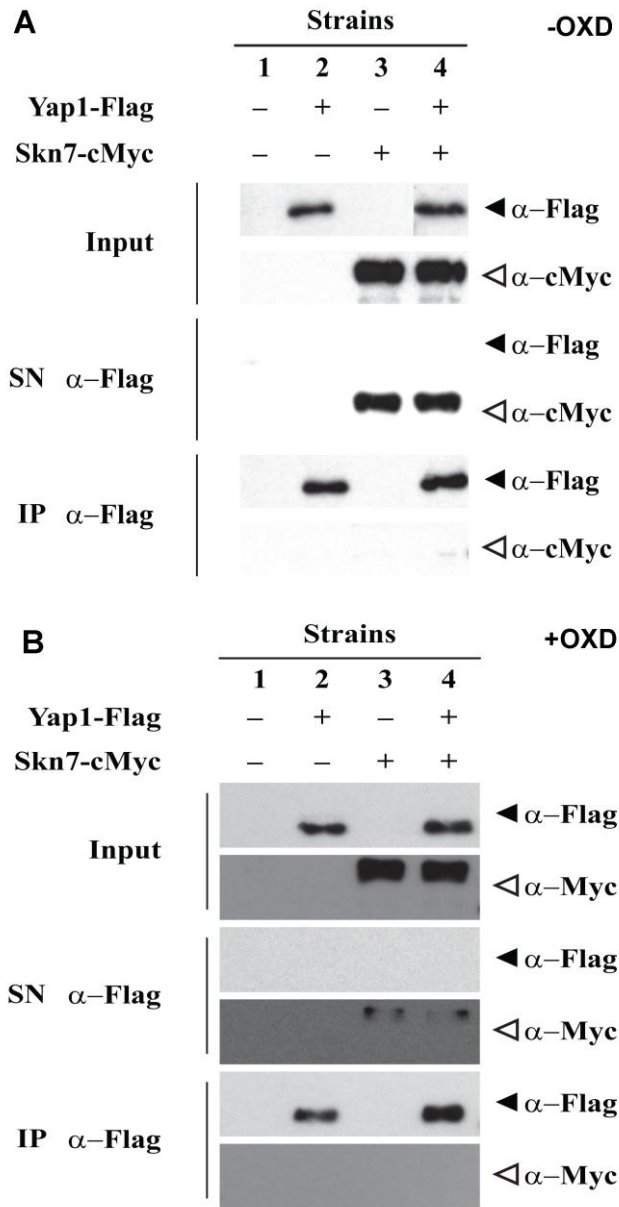




**Fig5**

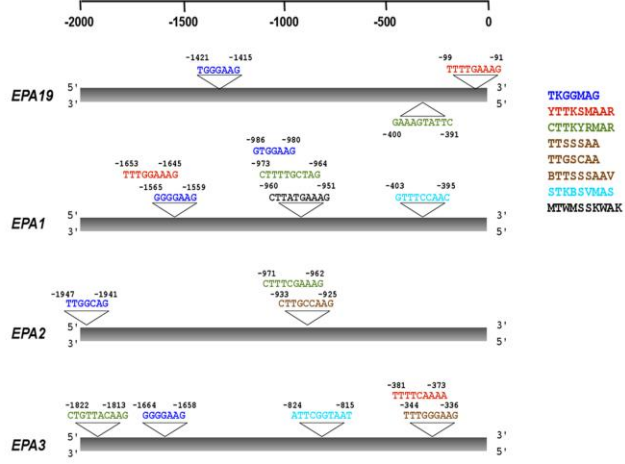


**Fig6**



**Fig7**

**A**



**B**

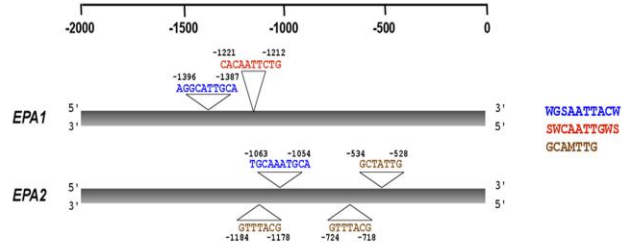
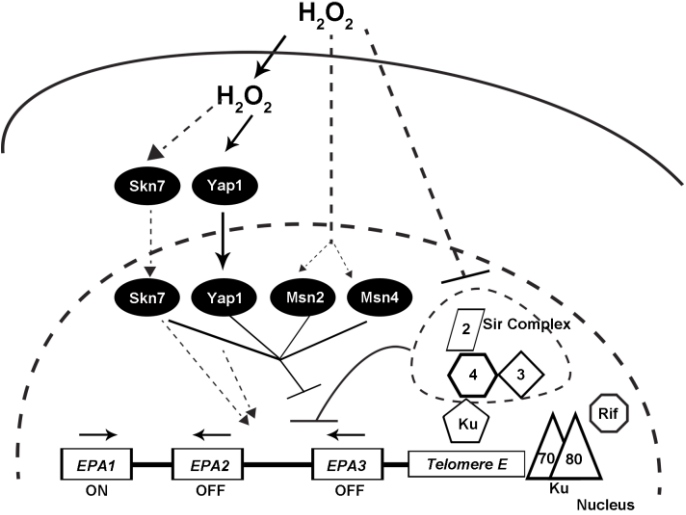


Fig9



## **DISCUSIÓN**

En este trabajo, investigamos el papel in vitro e in vivo de *EPA2* que codifica para una proteína de pared celular de *C. glabrata*. Evaluamos su regulación, su papel en virulencia y en la respuesta a estrés oxidante. Encontramos que *EPA2* se induce in vitro en condiciones de estrés oxidante. Esta inducción se lleva a cabo en presencia de silenciamiento subtelomérico y se requiere de los factores de transcripción Yap1 y Skn7 y de Msn2 o Msn4. En ausencia de silenciamiento subtelomérico solo son necesarios Yap1 y Skn7. Demostramos también que Yap1 y Skn7 no interactúan físicamente. Además encontramos que *EPA2* no se induce durante la fagocitosis, y no tiene efecto sobre la virulencia de *C. glabrata*, pero se induce en hígado.

### **1. Regulación de *EPA2* y silenciamiento subtelomérico**

Los genes *EPA* se regulan de forma diferencial. Este indica que además de estar globalmente regulados por un mismo mecanismo, por el silenciamiento subtelomérico, existe otro nivel de regulación que controla la expresión particular de los miembros de la familia *EPA*. Estos genes responderían de manera diferente a señales particulares en el ambiente.

Solo *EPA2* se induce en presencia de estrés oxidante. *EPA2* contiene megasatelites, (THIERRY *et al.* 2010) repetidos en tándem que en el caso de los genes *EPA* al traducirse generan secuencias ricas en serina importantes para la estructura de estas proteínas (DE LAS PENAS *et al.* 2003). Además su región intergénica tiene 5Kb de longitud, una de las más grandes descritas en *C. glabrata*. Al parecer la inducción de *EPA2* podría llevarse a través de dos mecanismos: 1) mediante la eliminación de la maquinaria del silenciamiento o 2) mediante la participación de los activadores, en presencia del silenciamiento.

La expresión génica y el silenciamiento subtelomérico pueden ser dinámicamente regulados por señales ambientales (AI *et al.* 2002). La cromatina subtelomérica está sujeta a modificaciones epigénéticas y está implicada en numerosos aspectos de la función celular, que incluye la formación de heterocromatina, regulación de

las vías de respuesta al estrés y el control del ciclo celular. El ADN subtelomérico se caracteriza por la presencia de segmentos repetidos específicos que sirven para propagar el silenciamiento o para proteger regiones cromosómicas de la difusión de control epigenético (SMITH *et al.* 2011).

Un reporte reciente muestra que en *S. cerevisiae* hay una relocalización de factores de transcripción de genes subteloméricos en respuesta a estrés y su expresión depende de la unión condicional de estos factores de transcripción y de la presencia de la desacetilasa de histonas, Hda1 (MAK *et al.* 2009). Otro estudio muestra un mecanismo novedoso para la regulación del silenciamiento subtelomérico en respuesta a estímulos ambientales. Se muestra que varios factores de transcripción de respuesta a señales del ambiente interactúan con elementos X subteloméricos y condicionalmente regulan su actividad proto- o anti-silenciadora en respuesta a los estímulos ambientales (SMITH *et al.* 2011). Esto señala la importancia de la regulación de la transcripción frente a diferentes estímulos en regiones sujetas a silenciamiento.

## **2. Regulación de *EPA2* por los factores de transcripción de respuesta a estrés Yap1 y Skn7**

Los factores de transcripción Yap1, Skn7, Msn2 y Msn4 controlan la respuesta a estrés oxidante, y la expresión de *EPA2* requiere también de estos factores. En presencia de estrés oxidante generado por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, la acumulación de estos factores de transcripción en el núcleo contrarrestan el efecto de la cromatina represiva e inducen la expresión de *EPA2*. En *Saccharomyces cerevisiae* más del 10% de sitios de unión a ADN reconocidos por factores de transcripción se concentran en regiones subteloméricas. Para muchos factores, el patrón de unión a regiones subteloméricas es dinámico y se somete a un flujo hacia o lejos de los telómeros dependiendo si las condiciones fisiológicas cambian. La unión subtelomérica es dependiente de las condiciones ambientales y se correlaciona con la inducción de la expresión génica en respuesta al estrés (MAK *et al.* 2009).

En ausencia de silenciamiento subtelomérico aumenta ligeramente la transcripción de los genes *EPA2* y *EPA3* (DE LAS PENAS *et al.* 2003). La expresión de *EPA2* en la mutante *sir3Δ* se incrementa aún más en presencia de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Esto indica que los factores de transcripción, Yap1, Skn7, Msn2 y Msn4, están en constante interacción con la cromatina represiva. Este es el primer reporte donde una proteína de pared celular de *C. glabrata* se induce por estrés oxidante generado por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Otros factores podrían estar participando en la regulación de *EPA2*. Estudios moleculares han mostrado que los nucleosomas también juegan un papel importante en la regulación genética. Para los genes *PHO5* o *ADH2* de *S. cerevisiae*, los nucleosomas tienen un efecto represivo y su remoción de las regiones promotoras es suficiente para activar la expresión génica aun en ausencia de factores transcripcionales adicionales (HAN and GRUNSTEIN 1988; ADKINS and TYLER 2006). Además se ha visto la relocalización de los nucleosomas de regiones promotoras cuando se presentan cambios en las condiciones de crecimiento. Esto permite el control de la expresión en respuesta a estímulos ambientales. Se ha descrito que los nucleosomas tienden a ser desalojados de los promotores de los genes cuyos niveles de expresión aumentan durante choque térmico, aunque esto también se observó entre los genes que se mantienen sin cambios (SHIVASWAMY *et al.* 2008). La arquitectura del nucleosoma también es importante para determinar el cambio entre los estados activado y desactivado de la transcripción, pero no el nivel de expresión de un gen. La combinación de los factores de transcripción, su unión al DNA, las enzimas de remodelación de la cromatina y la subyacente secuencia genómica ayudan a establecer la arquitectura del nucleosoma (ZAUGG and LUSCOMBE 2012).

### **3. Los factores de transcripción Yap1 y Skn7 de *C. glabrata* no interaccionan físicamente**

Skn7 es un factor de transcripción de respuesta a estrés oxidante y a estrés osmótico altamente conservado entre los hongos. De acuerdo a un análisis *in silico*, el dominio amino terminal (HSF) de unión a DNA (71% de identidad) y el



dominio carboxilo terminal receptor (92% de identidad) de Skn7 de *C. glabrata* son altamente similares a los de Skn7 de *Saccharomyces cerevisiae* (FASSLER and WEST 2011). El análisis de secuencia de CgSkn7 mostró que este factor contiene el residuo de treonina conservado (T473) que en *S. cerevisiae* es necesario para la interacción física con Yap1 (HE *et al.* 2009). Hay evidencia que sugiere que Yap1 y Skn7 son interdependientes para activar genes de respuesta a estrés oxidante (ROETZER *et al.* 2011). CgSkn7 induce la transcripción de algunos genes incluyendo *TRX2*, *TRR1*, *TSA1* y *CTA1* en respuesta al tratamiento con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (SAIJO *et al.* 2010a).

Yap1 es un factor de transcripción que contiene dominios ricos en cisteínas en el amino terminal y en el carboxilo terminal. En *S. cerevisiae* la peroxidasa Gpx3 oxida a Yap1 para formar una serie de enlaces disulfuro que conducen a la acumulación de Yap1 en el núcleo (DELAUNAY *et al.* 2002). En *C. glabrata* el ortólogo del factor de transcripción Yap1 es similar al de *S. cerevisiae* y también controla un grupo de genes de respuesta a estrés oxidante (CUELLAR-CRUZ *et al.* 2008; ROETZER *et al.* 2011). Yap1 se requiere para proteger contra peróxidos y peroxinitritos. En *C. glabrata* hay 20 genes que son dependientes de Yap1 como *CTA1*, *TRR1/2*, *TSA1/2*, *TRX2*, *GPX2* y *CCP1*. Varios de estos genes dependen también de la presencia de Skn7 (ROETZER *et al.* 2011). Dado que Yap1 se localiza en el núcleo durante la fagocitosis se sugiere también que estos genes se inducen en el fagocito (ROETZER *et al.* 2010). El grupo de genes de respuesta a estrés oxidante dependiente de Yap1 y Skn7 incluye las peroxidasa tioredoxinas (Tsa1 y Tsa2), tioredoxina reductasa (Trr1 y Trr2), el cofactor de tioredoxina Trx2, glutatión peroxidasa Gpx2 y catalasa Cta1. *EPA2* requiere también de al menos Skn7 y Yap1.

Skn7 y Yap1 de *S. cerevisiae* interactúan físicamente y esta interacción depende del dominio receptor de Skn7 y de los dominios ricos en cisteínas de Yap1. La interacción de Yap1 y Skn7 puede contribuir a activar a los promotores de los genes de respuesta a estrés oxidante cuando la proteína Yap1 se acumula en el

núcleo (MULFORD and FASSLER 2011). Al analizar el dominio receptor de Skn7 de *C. glabrata* y compararlo con el dominio receptor de Skn7 de *S. cerevisiae*, encontramos que se conserva el aminoácido D427, los residuos Ser/Thr T437, T439, T449, T455, T465, T480, el docking putativo tripartita de MAPK, el motivo Básico, "LXL" (leucina, cualquier aminoácido, leucina) y un residuo hidrofóbico, previamente ya reportados (HE *et al.* 2009), los cuales son importantes para la interacción de Skn7 con Yap1.

Para Yap1 de *S. cerevisiae* las cisteínas C303, C598 y C629 son importantes para su interacción con Skn7. La región de los aminoácido del 243 al 307, anterior a la región n-CDR que participa en la formación del enlace disulfuro y la región de los aminoácido del 322 al 469 también es importante. Esto indica que el espaciamiento entre el n-CDR y el c-CDR es relevante para la interacción entre Yap1 y Skn7 mediada por estrés oxidante. Al analizar la secuencia de la proteína Yap1 de *C. glabrata* encontramos que las cisteínas importantes para la formación del enlace disulfuro y la interacción de Yap1-Skn7 se conservan, más no así la región (243-469) anterior al n-CDR. La región de los aminoácidos del 322 al 469, el espaciamiento del n-CDR y c-CDR, solo algunos aminoácidos se conservan y existen algunos espacios que posiblemente sean importantes para la interacción con Skn7.

Aún cuando Yap1 y Skn7 conservan la mayoría de los residuos que han sido identificados como importantes en la interacción de estos factores en los ortólogos de *S. cerevisiae*, nuestros resultados indican que Yap1 y Skn7 no interactúan físicamente. Es posible entonces que la ausencia de ciertos aminoácidos en Yap1 no permitan el plegamiento correcto para que se de la interacción entre Yap1 y Skn7 en *C. glabrata*. Es posible también que no hemos identificado las condiciones ambientales que la propicien. Sería interesante analizar si Yap1 de *C. glabrata* esta lo suficientemente conservado como para interaccionar con Skn7 de *S. cerevisiae* y viceversa. Un análisis de este tipo nos permitirá evaluar si las diferencias contenidas en los factores transcripcionales de las dos especies son determinantes en su interacción.

La unión y/o asociación de los factores de transcripción en respuesta a cambios ambientales también es importante. En este caso es posible que haya una interacción cooperativa entre estos dos factores de transcripción: la unión de uno permite la unión del otro, más no se requiere de su asociación previa a la unión al ADN. En *S. cerevisiae* se analizó la unión temporal de varios factores de transcripción en genes que participan en respuesta a estrés salino. El análisis reveló que los factores de transcripción Yap4 y Sko1 presentan cuatro clases de uniones: unión constante, una unión donde se genera una inducción rápida, o una inducción lenta o una inducción transitoria. Así mismo, se encontró que varios factores pueden coasociarse con sus genes blanco. El tipo de unión de los factores de transcripción y su coasociación a distintos genes es importante para coordinar una respuesta biológica rápida (Ni *et al.* 2009).

Un argumento que podría proponerse es que la interacción entre Yap1 y Skn7 en *C. glabrata* está afectada por el epítipo FLAG. La proteína Yap1 de *C. glabrata* se marcó con este epítipo en el dominio C-terminal, región que participa en la formación del enlace disulfuro y en la interacción con Skn7. Es posible que el epítipo podría estar interfiriendo en su interacción con Skn7. La interacción de Yap1 con Skn7 en *S. cerevisiae*, se demostró al marcar la proteína Yap1 en el N-terminal y Skn7 en el C-terminal (MULFORD and FASSLER 2011). Sin embargo es importante señalar que las proteínas Yap1 y Skn7 de *C. glabrata* marcadas son funcionales, por lo que este aspecto técnico podría tener un mínimo efecto.

#### **4. El papel de EPA2 in vitro e in vivo**

La primera línea de defensa contra infecciones por hongos son las células fagocíticas que a través del estallido respiratorio generan altos niveles de especies reactivas de oxígeno (ERO) para eliminar al patógeno (KAUR *et al.* 2007). Aunque EPA2 se induce por estrés oxidante, no detectamos inducción de EPA2 en el co-cultivo con macrófagos, a pesar de la activación de los macrófagos con Bz-ATP que incrementa la producción de ERO. Solamente observamos inducción de EPA2

cuando *C. glabrata* se le adicionó concentraciones subletales de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (2-5 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), pero no durante la fagocitosis donde *C. glabrata* experimenta aproximadamente 0.4mM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (ROETZER *et al.* 2010). La ausencia de activación de *EPA2* en macrófagos puede deberse a la habilidad de *C. glabrata* de alterar la maduración del fagosoma, es decir, bloquear la formación del fagolisosoma y acidificación del mismo, por lo que sobrevive y se replica dentro de éste por un considerable período de tiempo sin dañar a la célula hospedera o provocar una respuesta inmune proinflamatoria (SEIDER *et al.* 2011). Además, se ha mostrado que *C. glabrata* tiene la capacidad de suprimir las ERO durante la interacción con macrófagos de ratón (WELLINGTON *et al.* 2009) y cultivos primarios de macrófagos derivados de humano (SEIDER *et al.* 2011) y a la depleción de fuentes de carbono que es suficiente para inducir a la catalasa (*CTA1*) (ROETZER *et al.* 2010). Nosotros proponemos que la inhibición de la acidificación y maduración del fagosoma, así como la disminución de las ERO es suficiente para no alcanzar una concentración suficiente de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> para inducir *EPA2*. No habría suficiente concentración de Yap1 y Skn7 en el núcleo de la célula para contrarrestar el efecto del silenciamiento subtelomérico y así inducir la expresión de *EPA2*.

Para determinar dónde se expresa y cuál es la participación de *EPA2* in vivo, utilizamos la Tecnología de Expresión In Vivo (IVET). Este sistema nos permite determinar in vivo, dónde se expresa *EPA2*. En nuestros experimentos in vivo, encontramos que la mutante de *EPA2* no afecta la virulencia de *C. glabrata*, pero encontramos una reducción en las UFC en hígado y un incremento en la expresión de *EPA2* en este órgano. Esto sugiere que en el hígado hay señales específicas que inducen la expresión de *EPA2*. La reducción en las UFC en el hígado se puede explicar por la alta capacidad que tiene el hígado de remover microorganismos (por ejemplo, bacterias) y compuestos tóxicos, tales como endotoxinas, oxidantes y pro-oxidantes. Para detoxificar estos compuestos dañinos, el hígado contiene altos niveles de antioxidantes de bajo peso molecular y enzimas que degradan las ERO, como glutatión reducido (GSH), vitamina C,

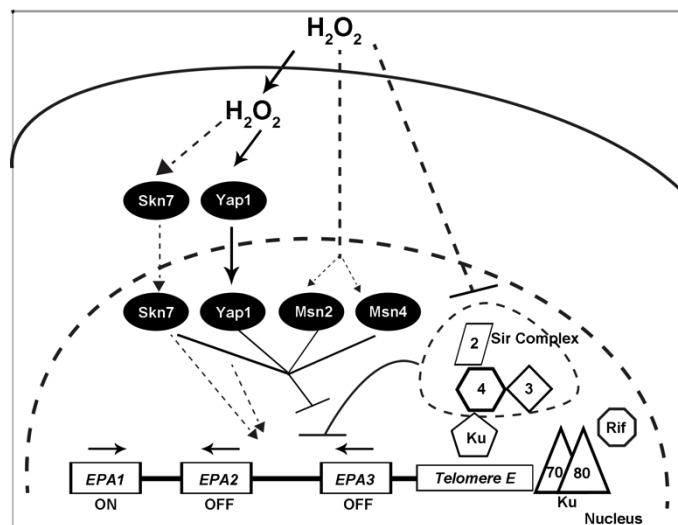
vitamina E, superóxido dismutasa (SOD), glutatión peroxidasa y catalasa (JAESCHKE 2011; JAESCHKE and RAMACHANDRAN 2011). Probablemente la concentración de ERO generadas en el hígado no son suficientes para una inducción total (100%) de *EPA2* pero si mayor que en las células fagocíticas.

La falta de fenotipo de virulencia relacionado a la cepa mutante *epa2Δ* podría ser debido a que *EPA2* es un miembro de una familia multigénica y otros genes *EPA* podrían estar compensando su ausencia. Un claro ejemplo de compensación se presenta con la adhesina Als3 de *C. albicans* la cual juega un papel importante en la patogénesis de la candidiasis sistémica, pero solo cuando se expresa de forma heteróloga en *C. glabrata* (FU *et al.* 2013). La cepa de *C. glabrata* que expresa *CaALS3* colonizó cerebro e indujo una fuerte respuesta inflamatoria. *EPA2* podría evaluarse mediante una expresión heteróloga en *C. albicans*.

Se han descrito otras proteínas de pared celular (Cell Wall Proteins, CWP) que se inducen cuando se exponen a diferentes tipos de estrés. Por ejemplo *ScSPI1* se induce bajo condiciones de estrés, durante el cambio a la fase diauxica y se requiere para la resistencia a ácidos débiles. Su expresión está regulada por Msn2 y Msn4 (PUIG and PEREZ-ORTIN 2000; KAPTEYN *et al.* 2001; SIMOES *et al.* 2006). En *C. albicans* la adhesina putativa ORF19.3988 se induce por Mnl1 bajo condiciones de estrés a ácidos débiles (RAMSDALE *et al.* 2008), así como en catéteres de rata y en medio Spider durante la formación de biopelículas (NETT *et al.* 2009; NOBILE *et al.* 2012).

## CONCLUSIÓN FINAL

*EPA2* se induce in vitro en presencia de estrés oxidante generado por  $H_2O_2$  y requiere de al menos tres factores de transcripción Yap1 y Skn7 y Msn2 o Msn4 en una región sujeta a silenciamiento subtelo mérico. La presencia de estrés oxidante no oxida los componentes de la maquinaria del silenciamiento, son los factores de transcripción que contrarrestan el efecto de la cromatina al acceder a sus sitios de reconocimiento en el promotor de *EPA2*. Cuando no hay silenciamiento subtelo mérico, solo Yap1 y Skn7 son necesarios para la inducción de *EPA2*, y los factores de transcripción Yap1 y Skn7 no interactúan físicamente (Figura 2). Aunque *EPA2* no se induce durante la fagocitosis, se detecta su expresión in vivo en hígado. Es claro que el silenciamiento subtelo mérico de los genes *EPA* es una capa de regulación global, pero también participan factores de transcripción adicionales que responden a estímulos ambientales que requieren de ser identificados.



**Figura 2. Modelo de la regulación de *EPA2* de *Candida glabrata*.** En condiciones de estrés oxidante, se induce la expresión de *EPA2* a través de los factores de transcripción de respuesta a estrés Skn7, Yap1 y Msn4 o Msn2, que contrarrestan las proteínas del silenciamiento. Cuando la maquinaria del silenciamiento subtelo mérico no es activa se presenta una inducción basal de

*EPA2*, que se incrementa en presencia de estrés oxidante y depende de los factores de transcripción de respuesta a estrés Skn7 y Yap1 principalmente, que no co-inmunoprecipitan juntos.

## **PERSPECTIVAS**

Corroborar la interacción de los factores de transcripción Yap1 y Skn7 con la región intergénica de *EPA2* mediante la técnica de Coinmunoprecipitación de la Cromatina (ChIP).

Expresión heteróloga de *EPA2* en *C. albicans*, con el fin de encontrar el fenotipo enmascarado en una infección sistémica en un modelo murino.

Evaluar si la proteína Epa2 se incorpora en pared celular y a qué tipo de residuos de carbohidratos se une.

Evaluar si Epa2 tiene la capacidad de mediar adherencia a algún tipo de célula endotelial.

## **REFERENCIAS**



- Adkins, M. W., and J. K. Tyler, 2006 Transcriptional activators are dispensable for transcription in the absence of Spt6-mediated chromatin reassembly of promoter regions. *Mol Cell* 21: 405-416.
- Ai, W., P. G. Bertram, C. K. Tsang, T. F. Chan and X. F. Zheng, 2002 Regulation of subtelomeric silencing during stress response. *Mol Cell* 10: 1295-1305.
- Alcoba-Florez, J., S. Mendez-Alvarez, J. Cano, J. Guarro, E. Perez-Roth *et al.*, 2005 Phenotypic and molecular characterization of *Candida nivariensis* sp. nov., a possible new opportunistic fungus. *J Clin Microbiol.* 43: 4107-4111.
- Bennett, J. E., K. Izumikawa and K. A. Marr, 2004 Mechanism of increased fluconazole resistance in *Candida glabrata* during prophylaxis. *Antimicrob Agents Chemother* 48: 1773-1777.
- Bolotin-Fukuhara, M., and C. Fairhead, 2014 *Candida glabrata*: a deadly companion? *Yeast* 26.
- Bradford, M. M., 1976 A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* 72: 248-254.
- Brunke, S., K. Seider, R. S. Almeida, A. Heyken, C. B. Fleck *et al.*, 2010 *Candida glabrata* tryptophan-based pigment production via the Ehrlich pathway. *Mol Microbiol.* 76: 25-47.
- Buitron Garcia, R., A. Bonifaz, O. Amancio Chassin, E. Basurto Kuba, J. Araiza *et al.*, 2007 [Correlation between clinical characteristics and mycological tests in the vulvovaginitis by *Candida*]. *Ginecol Obstet Mex* 75: 68-72.
- Calvin, N. M., and P. C. Hanawalt, 1988 High-efficiency transformation of bacterial cells by electroporation. *J Bacteriol* 170: 2796-2801.
- Castano, I., S. J. Pan, M. Zupancic, C. Hennequin, B. Dujon *et al.*, 2005 Telomere length control and transcriptional regulation of subtelomeric adhesins in *Candida glabrata*. *Mol Microbiol* 55: 1246-1258.
- Caudle, K. E., K. S. Barker, N. P. Wiederhold, L. Xu, R. Homayouni *et al.*, 2010 Genome-wide expression profile analysis of the *Candida glabrata* Pdr1 regulon. *Eukaryot Cell*.
- Cormack, B. P., and S. Falkow, 1999 Efficient homologous and illegitimate recombination in the opportunistic yeast pathogen *Candida glabrata*. *Genetics* 151: 979-987.
- Cormack, B. P., N. Ghori and S. Falkow, 1999 An adhesin of the yeast pathogen *Candida glabrata* mediating adherence to human epithelial cells. *Science* 285: 578-582.
- Correia, A., P. Sampaio, S. James and C. Pais, 2006 *Candida bracarensis* sp. nov., a novel anamorphic yeast species phenotypically similar to *Candida glabrata*. *Int J Syst Evol Microbiol.* 56: 313-317.
- Csank, C., and K. Haynes, 2000 *Candida glabrata* displays pseudohyphal growth. *FEMS Microbiol Lett* 189: 115-120.
- Cuellar-Cruz, M., M. Briones-Martin-del-Campo, I. Canas-Villamar, J. Montalvo-Arredondo, L. Riego-Ruiz *et al.*, 2008 High resistance to oxidative stress in the fungal pathogen *Candida glabrata* is mediated by a single catalase,

- Cta1p, and is controlled by the transcription factors Yap1p, Skn7p, Msn2p, and Msn4p. *Eukaryot Cell* 7: 814-825.
- Cuellar-Cruz, M., I. Castano, O. Arroyo-Helguera and A. De Las Penas, 2009 Oxidative stress response to menadione and cumene hydroperoxide in the opportunistic fungal pathogen *Candida glabrata*. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 104: 649-654.
- de Groot, P. W., E. A. Kraneveld, Q. Y. Yin, H. L. Dekker, U. Gross *et al.*, 2008 The cell wall of the human pathogen *Candida glabrata*: differential incorporation of novel adhesin-like wall proteins. *Eukaryot Cell* 7: 1951-1964.
- De Las Penas, A., S. J. Pan, I. Castano, J. Alder, R. Cregg *et al.*, 2003 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* 17: 2245-2258.
- Delaunay, A., D. Pflieger, M. B. Barrault, J. Vinh and M. B. Toledano, 2002 A thiol peroxidase is an H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> receptor and redox-transducer in gene activation. *Cell* 111: 471-481.
- Desai, C., J. Mavrianos and N. Chauhan, 2011 *Candida glabrata* Pwp7p and Aed1p are required for adherence to human endothelial cells. *FEMS Yeast Res* 11: 595-601.
- Domergue, R., I. Castano, A. De Las Penas, M. Zupancic, V. Lockett *et al.*, 2005 Nicotinic acid limitation regulates silencing of *Candida* adhesins during UTI. *Science* 308: 866-870.
- Dujon, B., D. Sherman, G. Fischer, P. Durrens, S. Casaregola *et al.*, 2004 Genome evolution in yeasts. *Nature* 430: 35-44.
- Fassler, J. S., and A. H. West, 2011 Fungal Skn7 stress responses and their relationship to virulence. *Eukaryot Cell* 10: 156-167.
- Ferrari, S., F. Ischer, D. Calabrese, B. Posteraro, M. Sanguinetti *et al.*, 2009 Gain of function mutations in CgPDR1 of *Candida glabrata* not only mediate antifungal resistance but also enhance virulence. *PLoS Pathog* 5: e1000268.
- Fidel, P. L., Jr., and J. D. Sobel, 1996 Immunopathogenesis of recurrent vulvovaginal candidiasis. *Clin Microbiol Rev* 9: 335-348.
- Fidel, P. L., Jr., J. A. Vazquez and J. D. Sobel, 1999 *Candida glabrata*: review of epidemiology, pathogenesis, and clinical disease with comparison to *C. albicans*. *Clin Microbiol Rev* 12: 80-96.
- Frieman, M. B., J. M. McCaffery and B. P. Cormack, 2002 Modular domain structure in the *Candida glabrata* adhesin Epa1p, a beta1,6 glucan-cross-linked cell wall protein. *Mol Microbiol* 46: 479-492.
- Fu, Y., Q. T. Phan, G. Luo, N. V. Solis, Y. Liu *et al.*, 2013 Investigation of the function of *Candida albicans* Als3 by heterologous expression in *Candida glabrata*. *Infect Immun.* 81: 2528-2535.
- Gabaldon, T., T. Martin, M. Marcet-Houben, P. Durrens, M. Bolotin-Fukuhara *et al.*, 2013 Comparative genomics of emerging pathogens in the *Candida glabrata* clade. *BMC Genomics.* 14:623.: 10.1186/1471-2164-1114-1623.
- Gallegos-Garcia, V., S. J. Pan, J. Juarez-Cepeda, C. Y. Ramirez-Zavaleta, M. Briones-Martin-Del-Campo *et al.*, 2012a A Novel Downstream Regulatory

- Element Cooperates With the Silencing Machinery to Repress EPA1 Expression in *Candida glabrata*. *Genetics*.
- Gonzalez, G. M., M. Elizondo and J. Ayala, 2008 Trends in species distribution and susceptibility of bloodstream isolates of *Candida* collected in Monterrey, México, to seven antifungal agents: results of a 3-year (2004 to 2007) surveillance study. *J Clin Microbiol* 46: 2902-2905.
- Halliwell, S. C., M. C. Smith, P. Muston, S. L. Holland and S. V. Avery, 2012 Heterogeneous expression of the virulence-related adhesin Epa1 between individual cells and strains of the pathogen *Candida glabrata*. *Eukaryot Cell*. 11: 141-150. doi: 110.1128/EC.05232-05211. Epub 02011 Dec 05232.
- Han, M., and M. Grunstein, 1988 Nucleosome loss activates yeast downstream promoters in vivo. *Cell* 55: 1137-1145.
- He, X. J., and J. S. Fassler, 2005 Identification of novel Yap1p and Skn7p binding sites involved in the oxidative stress response of *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Microbiol* 58: 1454-1467.
- He, X. J., K. E. Mulford and J. S. Fassler, 2009 Oxidative stress function of the *Saccharomyces cerevisiae* Skn7p receiver domain. *Eukaryot Cell* 8: 768-778.
- Higgins, D. G., J. D. Thompson and T. J. Gibson, 1996 Using CLUSTAL for multiple sequence alignments. *Methods Enzymol* 266: 383-402.
- Iraqi, I., S. Garcia-Sanchez, S. Aubert, F. Dromer, J. M. Ghigo *et al.*, 2005a The Yak1p kinase controls expression of adhesins and biofilm formation in *Candida glabrata* in a Sir4p-dependent pathway. *Mol Microbiol* 55: 1259-1271.
- Jacobsen, I. D., S. Brunke, K. Seider, T. Schwarzmuller, A. Firon *et al.*, 2010 *Candida glabrata* persistence in mice does not depend on host immunosuppression and is unaffected by fungal amino acid auxotrophy. *Infect Immun* 78: 1066-1077.
- Jaeschke, H., 2011 Reactive oxygen and mechanisms of inflammatory liver injury: Present concepts. *J Gastroenterol Hepatol*. 26: 173-179. .
- Jaeschke, H., and A. Ramachandran, 2011 Reactive oxygen species in the normal and acutely injured liver. *J Hepatol*. 55: 227-228. doi: 210.1016/j.jhep.2011.1001.1006. Epub 2011 Jan 1014.
- Juarez-Reyes, A., C. Y. Ramirez-Zavaleta, L. Medina-Sanchez, A. De Las Penas and I. Castano, 2012 A protosilencer of subtelomeric gene expression in *Candida glabrata* with unique properties. *Genetics* 190: 101-111.
- Kamran, M., A. M. Calcagno, H. Findon, E. Bignell, M. D. Jones *et al.*, 2004 Inactivation of transcription factor gene *ACE2* in the fungal pathogen *Candida glabrata* results in hypervirulence. *Eukaryot Cell* 3: 546-552.
- Kapteyn, J. C., B. ter Riet, E. Vink, S. Blad, H. De Nobel *et al.*, 2001 Low external pH induces HOG1-dependent changes in the organization of the *Saccharomyces cerevisiae* cell wall. *Mol Microbiol*. 39: 469-479.
- Kaur, R., R. Domergue, M. L. Zupancic and B. P. Cormack, 2005 A yeast by any other name: *Candida glabrata* and its interaction with the host. *Curr Opin Microbiol* 8: 378-384.

- Kaur, R., B. Ma and B. P. Cormack, 2007 A family of glycosylphosphatidylinositol-linked aspartyl proteases is required for virulence of *Candida glabrata*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104: 7628-7633.
- Kraneveld, E. A., J. J. de Soet, D. M. Deng, H. L. Dekker, C. G. de Koster *et al.*, 2011a Identification and Differential Gene Expression of Adhesin-Like Wall Proteins in *Candida glabrata* Biofilms. *Mycopathologia*.
- Kurtzman, C. P., and C. J. Robnett, 2003 Phylogenetic relationships among yeasts of the 'Saccharomyces complex' determined from multigene sequence analyses. *FEMS Yeast Res.* 3: 417-432.
- Kussell, E., and S. Leibler, 2005 Phenotypic diversity, population growth, and information in fluctuating environments. *Science* 309: 2075-2078.
- Mak, H. C., L. Pillus and T. Ideker, 2009 Dynamic reprogramming of transcription factors to and from the subtelomere. *Genome Res* 19: 1014-1025.
- Martinez-Jimenez, V., C. Y. Ramirez-Zavaleta, E. Orta-Zavalza, G. D. de Leon, G. Gutierrez-Escobedo *et al.*, 2013 Sir3 Polymorphisms in *Candida glabrata* clinical isolates. *Mycopathologia* 175: 207-219.
- Miyazaki, H., Y. Miyazaki, A. Geber, T. Parkinson, C. Hitchcock *et al.*, 1998 Fluconazole resistance associated with drug efflux and increased transcription of a drug transporter gene, PDH1, in *Candida glabrata*. *Antimicrob Agents Chemother* 42: 1695-1701.
- Morschhauser, J., 2010 Regulation of multidrug resistance in pathogenic fungi. *Fungal Genet Biol* 47: 94-106.
- Mulford, K. E., and J. S. Fassler, 2011 Association of the Skn7 and Yap1 transcription factors in the *Saccharomyces cerevisiae* oxidative stress response. *Eukaryot Cell* 10: 761-769.
- Mundy, R. D., and B. Cormack, 2009 Expression of *Candida glabrata* adhesins after exposure to chemical preservatives. *J Infect Dis* 199: 1891-1898.
- Murakami, C. J., C. R. Burtner, B. K. Kennedy and M. Kaeberlein, 2008 A method for high-throughput quantitative analysis of yeast chronological life span. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 63: 113-121.
- Nett, J. E., A. J. Lepak, K. Marchillo and D. R. Andes, 2009 Time course global gene expression analysis of an in vivo *Candida* biofilm. *J Infect Dis.* 200: 307-313. doi: 310.1086/599838.
- Nevitt, T., and D. J. Thiele, 2011 Host iron withholding demands siderophore utilization for *Candida glabrata* to survive macrophage killing. *PLoS Pathog* 7: e1001322.
- Ni, L., C. Bruce, C. Hart, J. Leigh-Bell, D. Gelperin *et al.*, 2009 Dynamic and complex transcription factor binding during an inducible response in yeast. *Genes Dev* 23: 1351-1363.
- Nobile, C. J., E. P. Fox, J. E. Nett, T. R. Sorrells, Q. M. Mitrovich *et al.*, 2012 A recently evolved transcriptional network controls biofilm development in *Candida albicans*. *Cell.* 148: 126-138. doi: 110.1016/j.cell.2011.1010.1048.
- Orta-Zavalza, E., G. Guerrero-Serrano, G. Gutierrez-Escobedo, I. Canas-Villamar, J. Juarez-Cepeda *et al.*, 2013 Local silencing controls the oxidative stress response and the multidrug resistance in *Candida glabrata*. *Mol Microbiol* 88: 1135-1148.

- Parkinson, T., D. J. Falconer and C. A. Hitchcock, 1995 Fluconazole resistance due to energy-dependent drug efflux in *Candida glabrata*. *Antimicrob Agents Chemother* 39: 1696-1699.
- Pfaller, M. A., and D. J. Diekema, 2010 Epidemiology of invasive mycoses in North America. *Crit Rev Microbiol* 36: 1-53.
- Polakova, S., C. Blume, J. A. Zarate, M. Mentel, D. Jorck-Ramberg *et al.*, 2009 Formation of new chromosomes as a virulence mechanism in yeast *Candida glabrata*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106: 2688-2693.
- Puig, S., and J. E. Perez-Ortin, 2000 Stress response and expression patterns in wine fermentations of yeast genes induced at the diauxic shift. *Yeast*. 16: 139-148.
- Rai, M. N., S. Balusu, N. Gorityala, L. Dandu and R. Kaur, 2012 Functional genomic analysis of *Candida glabrata*-macrophage interaction: role of chromatin remodeling in virulence. *PLoS Pathog* 8: e1002863.
- Ramsdale, M., L. Selway, D. Stead, J. Walker, Z. Yin *et al.*, 2008 MNL1 regulates weak acid-induced stress responses of the fungal pathogen *Candida albicans*. *Mol Biol Cell*. 19: 4393-4403. doi: 4310.1091/mbc.E4307-4309-0946. Epub 2008 Jul 4323.
- Roetzer, A., N. Gratz, P. Kovarik and C. Schuller, 2010 Autophagy supports *Candida glabrata* survival during phagocytosis. *Cell Microbiol* 12: 199-216.
- Roetzer, A., C. Gregori, A. M. Jennings, J. Quintin, D. Ferrandon *et al.*, 2008 *Candida glabrata* environmental stress response involves *Saccharomyces cerevisiae* Msn2/4 orthologous transcription factors. *Mol Microbiol* 69: 603-620.
- Roetzer, A., E. Klopff, N. Gratz, M. Marcet-Houben, E. Hiller *et al.*, 2011 Regulation of *Candida glabrata* oxidative stress resistance is adapted to host environment. *FEBS Lett* 585: 319-327.
- Rosas-Hernandez, L. L., A. Juarez-Reyes, O. E. Arroyo-Helguera, A. De Las Penas, S. J. Pan *et al.*, 2008 yKu70/yKu80 and Rif1 regulate silencing differentially at telomeres in *Candida glabrata*. *Eukaryot Cell* 7: 2168-2178.
- Saijo, T., T. Miyazaki, K. Izumikawa, T. Mihara, T. Takazono *et al.*, 2010a Skn7 is involved in oxidative stress response and virulence of *Candida glabrata*. *Mycopathologia* 169: 81-90.
- Sanglard, D., F. Ischer and J. Bille, 2001 Role of ATP-binding-cassette transporter genes in high-frequency acquisition of resistance to azole antifungals in *Candida glabrata*. *Antimicrob Agents Chemother* 45: 1174-1183.
- Scannell, D. R., O. A. Zill, A. Rokas, C. Payen, M. J. Dunham *et al.*, 2011 The Awesome Power of Yeast Evolutionary Genetics: New Genome Sequences and Strain Resources for the *Saccharomyces sensu stricto* Genus. *G3 (Bethesda)*. 1: 11-25. doi: 10.1534/g1533.1111.000273. Epub 002011 Jun 000271.
- Seider, K., S. Brunke, L. Schild, N. Jablonowski, D. Wilson *et al.*, 2011 The facultative intracellular pathogen *Candida glabrata* subverts macrophage cytokine production and phagolysosome maturation. *J Immunol* 187: 3072-3086.

- Seneviratne, C. J., Y. Wang, L. Jin, Y. Abiko and L. P. Samaranayake, 2008 *Candida albicans* biofilm formation is associated with increased anti-oxidative capacities. *Proteomics*. 8: 2936-2947. doi: 2910.1002/pmic.200701097.
- Seneviratne, C. J., Y. Wang, L. Jin, Y. Abiko and L. P. Samaranayake, 2010 Proteomics of drug resistance in *Candida glabrata* biofilms. *Proteomics*. 10: 1444-1454. doi: 1410.1002/pmic.200900611.
- Shivaswamy, S., A. Bhinge, Y. Zhao, S. Jones, M. Hirst *et al.*, 2008 Dynamic remodeling of individual nucleosomes across a eukaryotic genome in response to transcriptional perturbation. *PLoS Biol* 6: e65.
- Sikorski, R. S., and P. Hieter, 1989 A system of shuttle vectors and yeast host strains designed for efficient manipulation of DNA in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 122: 19-27.
- Simoës, T., N. P. Mira, A. R. Fernandes and I. Sa-Correia, 2006 The SPI1 gene, encoding a glycosylphosphatidylinositol-anchored cell wall protein, plays a prominent role in the development of yeast resistance to lipophilic weak-acid food preservatives. *Appl Environ Microbiol*. 72: 7168-7175. Epub 2006 Sep 7 115.
- Smith, J. J., L. R. Miller, R. Kreisberg, L. Vazquez, Y. Wan *et al.*, 2011 Environment-responsive transcription factors bind subtelomeric elements and regulate gene silencing. *Mol Syst Biol* 7: 455.
- Stead, D. A., J. Walker, L. Holcombe, S. R. Gibbs, Z. Yin *et al.*, 2010 Impact of the transcriptional regulator, Ace2, on the *Candida glabrata* secretome. *Proteomics*. 10: 212-223. doi: 210.1002/pmic.200800706.
- Thierry, A., C. Bouchier, B. Dujon and G. F. Richard, 2008 Megasatellites: a peculiar class of giant minisatellites in genes involved in cell adhesion and pathogenicity in *Candida glabrata*. *Nucleic Acids Res* 36: 5970-5982.
- Thierry, A., B. Dujon and G. F. Richard, 2010 Megasatellites: a new class of large tandem repeats discovered in the pathogenic yeast *Candida glabrata*. *Cell Mol Life Sci*. 67: 671-676. doi: 610.1007/s00018-00009-00216-y. Epub 02009 Nov 00028.
- Vermitsky, J. P., and T. D. Edlind, 2004 Azole resistance in *Candida glabrata*: coordinate upregulation of multidrug transporters and evidence for a Pdr1-like transcription factor. *Antimicrob Agents Chemother* 48: 3773-3781.
- Wellington, M., K. Dolan and D. J. Krysan, 2009 Live *Candida albicans* suppresses production of reactive oxygen species in phagocytes. *Infect Immun* 77: 405-413.
- Wickerham, L. J., M. H. Flickinger and K. A. Burton, 1946 A modification of Henrici's vegetable-juice sporulation medium for yeasts. *J Bacteriol*. 52: 611.
- Wong, S., M. A. Fares, W. Zimmermann, G. Butler and K. H. Wolfe, 2003 Evidence from comparative genomics for a complete sexual cycle in the 'asexual' pathogenic yeast *Candida glabrata*. *Genome Biol* 4: R10.
- Wong, S., and K. H. Wolfe, 2005 Birth of a metabolic gene cluster in yeast by adaptive gene relocation. *Nat Genet*. 37: 777-782. Epub 2005 Jun 2012.

Zaugg, J. B., and N. M. Luscombe, 2012 A genomic model of condition-specific nucleosome behavior explains transcriptional activity in yeast. *Genome Res* 22: 84-94.

## **ANEXOS**



## ANEXO1

### MATERIALES Y METODOS

#### 1. Medios de cultivo y cepas

##### 1.1. Medios de cultivos para bacterias

Para el aislamiento de plásmidos a partir de cultivos de las cepas de *E. coli* DH10B se utilizó medio Luria-Bertani (LB). El medio contiene extracto de levadura 5g/L, triptona 10g/L y NaCl 5g/L. En la mayoría de los casos se suplementó con carbenicilina (A. G. Scientific<sup>®</sup>) a una concentración final de 50µg/mL (LB-Cb50) o con cloranfenicol (IBI Scientific<sup>®</sup>) a una concentración final de 20µg/ml. Para el medio LB sólido, con o sin carbenicilina o cloranfenicol, se añadió agar bacteriológico a una concentración final de 2% (w/v). Para la recuperación de cepas bacterianas competentes, se utilizó medio SOC, este medio rico contiene extracto de levadura 5g/L, triptona 20g/L, NaCl 10mM, KCl 2,5mM, MgSO<sub>4</sub> 10mM, MgCl<sub>2</sub> 10mM y glucosa a una concentración final de 0.4% (w/v).

##### 1.2 Cepas de bacterias

Las cepas bacterianas utilizadas en este trabajo se describen en la Tabla 1.

##### 1.3 Medios de cultivos para levaduras

Las cepas de *C. glabrata* se cultivaron en medio YPD (del inglés *Yeast extract-Peptone-Dextrose*). El medio contiene extracto de levadura 10g/L, peptona 20g/L, glucosa 2%(p/v) y es complementado con 25mg/L de uracilo (Sigma Aldrich<sup>®</sup>). Cuando fue requerido, se suplementó con higromicina (A. G. Scientific<sup>®</sup>) a una concentración final de 460µg/mL. El medio YPG es parecido al YPD, pero contiene glicerol 3% (w/v) como fuente de carbono en lugar de glucosa. El medio YPE es parecido al YPD, pero contiene etanol absoluto 2% (v/v) como fuente de carbono. El medio casaminoácidos (CAA) o sintético completo (SC), se compone de base nitrogenada de levadura sin amonio 1,7g/L, sulfato de amonio [(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>] 5g/L,

casaminoácidos 6g/L y de glucosa 2% (w/v). Cuando fue necesario, se suplementó con uracilo 25mg/L y de ácido-5-fluorótico 0,9g/L (Toronto Research Chemicals®), para dar lugar al medio 5-FOA. El medio mínimo (YNB) (WICKERHAM *et al.* 1946), se compone de base nitrogenada de levadura sin amonio 1,7g/L, sulfato de amonio [(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>] 5g/L, uracilo 25mg/L y de glucosa 2% (w/v). Para los medios sólidos se añadió agar bacteriológico a una concentración final de 2% (w/v).

Para los ensayos de sensibilidad a agentes generadores de estrés oxidante el medio YPD o 5-FOA se suplemento con: H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 35% (wt/wt) (Sigma-Aldrich®) a una concentración de 5, 10, 15, 20 y 25 mM.

#### 1.4 Cepas de *C. glabrata*

Las cepas utilizadas en este trabajo se describen en la Tabla 1. De cada una se resguardan dos colonias independientes en glicerol al 15% a -80°C.

La cepa silvestre del laboratorio BG14, posee una mutación nula por inserción con el transposón Tn903 [Tn903 *npt* (Neo<sup>R</sup> G418<sup>R</sup>)] en el gen *URA3*, por lo que la mayoría de las cepas derivadas de ella son auxótrofas de uracilo (CORMACK and FALKOW 1999). Los cultivos líquidos se incubaron con agitación rotatoria y tanto medios sólidos y líquidos se incubaron a 30°C.

**Tabla 1. Cepas de *Escherichia coli* y de *Candida glabrata***

Cepa	Parental	Descripción y/o Genotipo	Referencia
<b><i>Escherichia coli</i></b>			
<b>DH10</b>		F- <i>mcrA</i> Δ( <i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i> ) Φ80 <i>dlacZ</i> Δ <i>M15</i> Δ <i>lacX74 deoR recA1</i> <i>endA1 araD139</i> Δ ( <i>ara, leu</i> )7697 <i>galU</i> <i>galK</i> λ- <i>rpsL nupG</i>	(CALVIN and HANAWALT 1988)
<b><i>Candida glabrata</i></b>			
<b>BG2</b>		Aislado clínico	(FIDEL and SOBEL 1996)
<b>BG14 Wt</b>	BG2	<i>ura3</i> Δ::Tn903 G418 <sup>R</sup> , <i>wild type</i> , Ura <sup>-</sup> , Hyg <sup>S</sup>	(CORMACK and FALKOW 1999)

<b>BG459</b>	BG14	<i>ura3Δ::Tn903 G418<sup>R</sup></i> <i>hyr1Δepa1Δepa2Δepa3Δ::hph</i> , Hyg <sup>R</sup> , Ura <sup>-</sup>	Colección del laboratorio
<b>Inserciones</b>			
<b>CGM147</b>	BG14	<i>ura3Δ::Tn903 G418<sup>R</sup></i> , Tn7 en la región intergénica entre <i>EPA1</i> y <i>EPA2</i> (pAP508/ <i>SpeI</i> - <i>Bcgl</i> ); Ura <sup>+</sup>	(DE LAS PENAS <i>et al.</i> 2003)
<b>CGM148</b>	BG14	<i>ura3Δ::Tn903 G418<sup>R</sup></i> , Tn7 en la región intergénica entre <i>EPA2</i> y <i>EPA3</i> (pAP559/ <i>BsrG</i> - <i>SphI</i> ); Ura <sup>-</sup>	(DE LAS PENAS <i>et al.</i> 2003)
<b>CGM149</b>	BG14	<i>ura3Δ::Tn903 G418<sup>R</sup></i> , Tn7 en la región intergénica entre <i>EPA3</i> y el telómero (pAP553/ <i>PstI</i> - <i>EcoRI</i> ); Ura <sup>-</sup>	(DE LAS PENAS <i>et al.</i> 2003)
<b>CGM160</b>	BG14	<i>ura3Δ::Tn903 G418<sup>R</sup></i> , Tn7 en la región intergénica entre <i>EPA4</i> y el telómero de <i>EPA3</i> (pAP471/ <i>ApaI</i> - <i>XbaI</i> ); Ura <sup>-</sup>	
<b>CGM282</b>	CGM147	<i>ura3Δ::Tn903 G418<sup>R</sup></i> , <i>sir3Δ::hph</i> (pIC120/ <i>KpnI</i> - <i>HpaI</i> +T4 DNA polimerasa). Tn7 en la región intergénica entre <i>EPA1</i> y <i>EPA2</i> (inserción 2); Hyg <sup>R</sup>	(ROSAS- HERNANDEZ <i>et al.</i> 2008)
<b>CGM287</b>	CGM148	<i>ura3Δ::Tn903 G418<sup>R</sup></i> , <i>sir3Δ::hph</i> (pIC120/ <i>KpnI</i> - <i>HpaI</i> +T4 DNA polimerasa). Tn7 en la región intergénica entre <i>EPA2</i> y <i>EPA3</i> (inserción 3); Hyg <sup>R</sup>	(ROSAS- HERNANDEZ <i>et al.</i> 2008)
<b>CGM289</b>	CGM149	<i>ura3Δ::Tn903 G418<sup>R</sup></i> , <i>sir3Δ::hph</i> (pIC120/ <i>KpnI</i> - <i>HpaI</i> +T4 DNA polimerasa). Tn7 en la región intergénica entre <i>EPA3</i> y telomero (inserción 4); Hyg <sup>R</sup>	(ROSAS- HERNANDEZ <i>et al.</i> 2008)
<b>CGM303</b>	CGM160	<i>ura3Δ::Tn903 G418<sup>R</sup></i> , <i>sir3Δ::hph</i> (pIC120/ <i>KpnI</i> - <i>HpaI</i> +T4 DNA polimerasa). Tn7 en la región intergénica entre <i>EPA4</i> y el telómero; Hyg <sup>R</sup>	
<b><i>epa2Δ::FLP1</i></b>			
<b>BG625</b>	BG14	<i>ura3Δ::Tn903 G418<sup>R</sup></i> <i>P<sub>PGK</sub>::FRT::TRP1::FRT::hph</i> (sitios <i>FRT</i> como en la Figura 2) Ura <sup>-</sup> , Trp <sup>+</sup>	(DOMERGUE <i>et al.</i> 2005)
<b>CGM1042</b>	BG625	<i>ura3Δ::Tn903 G418<sup>R</sup></i> <i>P<sub>PGK</sub>::FRT::TRP1::FRT::hph</i> Cointegrado pJC38-Hpal	Este trabajo

		Ura <sup>+</sup> , Trp <sup>+</sup> , Hyg <sup>S</sup>	
<b>CGM1079</b>	CGM1042	<i>ura3Δ::Tn903 G418<sup>R</sup></i> <i>P<sub>PGK</sub>::FRT::TRP1::FRT::hph</i> <i>epa2Δ::FLP1</i> (transformado con pJC38- <i>HpaI</i> ); Ura <sup>-</sup> , Trp <sup>+</sup> , Hyg <sup>S</sup>	Este trabajo
<b>CGM1135</b>	BG625	<i>URA3</i> <i>P<sub>PGK</sub>::FRT::TRP1::FRT::hph</i> (transformado con pBC34.1 <i>PstI</i> ) Ura <sup>+</sup> , Trp <sup>+</sup>	Este trabajo
<b>CGM1137</b>	CGM1079	<i>URA3</i> <i>P<sub>PGK</sub>::FRT::TRP1::FRT::hph</i> <i>epa2Δ::FLP1</i> (transformado con pBC34.1 <i>PstI</i> ) Ura <sup>+</sup> , Trp <sup>+</sup>	Este trabajo
<b>Mutantes en los factores de transcripción</b>			
<b>CGM297</b> <i>yap1Δ</i>	BG14	<i>ura3Δ::Tn903 G418<sup>R</sup></i> <i>yap1Δ::hph</i> , Hyg <sup>R</sup> pCV17/ <i>BsgI</i>	(CUELLAR-CRUZ <i>et al.</i> 2008)
<b>CGM306</b> <i>skn7Δ</i>	BG14	<i>ura3 Δ::Tn903 G418<sup>R</sup></i> <i>skn7Δ::hph</i> , Hyg <sup>R</sup> pCV21/ <i>BsgI</i>	(CUELLAR-CRUZ <i>et al.</i> 2008)
<b>CGM310</b> <i>yap1Δ skn7Δ</i>	CGM308	<i>ura3Δ::Tn903 G418<sup>R</sup></i> <i>yap1Δskn7Δ::hph</i> , Hyg <sup>R</sup> pCV21/ <i>BsgI</i>	(CUELLAR-CRUZ <i>et al.</i> 2008)
<b>CGM386</b> <i>yap1Δskn7Δmsn2Δ</i>	CGM385	<i>ura3Δ::Tn903 G418<sup>R</sup></i> <i>yap1Δskn7Δmsn2Δ::hph</i> , Hyg <sup>R</sup>	(CUELLAR-CRUZ <i>et al.</i> 2008)
<b>CGM388</b> <i>yap1Δskn7Δmsn4Δ</i>	CGM385	<i>ura3Δ::Tn903 G418<sup>R</sup></i> <i>yap1Δskn7Δmsn4Δ::hph</i> , Hyg <sup>R</sup>	(CUELLAR-CRUZ <i>et al.</i> 2008)
<b>CGM518</b> Wt	BG14	<i>ura3Δ::Tn903 G418<sup>R</sup></i> pGRB2.0, Ura <sup>+</sup>	Colección del Laboratorio
<b>CGM537</b> <i>yap1Δskn7Δmsn4Δmsn2Δ</i>	CGM480	<i>ura3Δ::Tn903 G418<sup>R</sup></i> <i>yap1Δskn7Δmsn4Δmsn2Δ::hph</i> , Hyg <sup>R</sup>	(CUELLAR-CRUZ <i>et al.</i> 2008)
<b>CGM833</b> (BG1739) <i>msn2Δ</i>	BG14	<i>ura3Δ::Tn903 G418<sup>R</sup></i> <i>msn2Δ</i> , Hyg <sup>S</sup> Ura <sup>-</sup> pRD96/ <i>Bcgl</i>	R. Domergue y B. Cormack
<b>CGM835</b> (BG1740) <i>msn4Δ</i>	BG14	<i>ura3Δ::Tn903 G418<sup>R</sup></i> <i>msn4Δ</i> , Hyg <sup>S</sup> Ura <sup>-</sup> pRD97/ <i>Bcgl</i>	R. Domergue y B. Cormack

<b>CGM837</b> (BG1742) <i>msn2Δmsn4Δ</i>	BG1739	<i>ura3Δ::Tn903 G418<sup>R</sup> msn2Δmsn4Δ::hph,</i> Hyg <sup>R</sup> pRD97/Bcgl	R. Domergue y B. Cormack
<b>Mutantes en los factores de transcripción en el fondo genético <i>sir3Δ::hph</i></b>			
<b>CGM24</b> <i>sir3Δ</i>	BG14	<i>ura3Δ::Tn903 G418<sup>R</sup> sir3Δ::hph,</i> Hyg <sup>R</sup>	Colección del Laboratorio
<b>CGM1168</b> <i>yap1Δsir3Δ</i>	CGM308	<i>ura3Δ::Tn903 G418<sup>R</sup> yap1Δsir3Δ::hph,</i> Hyg <sup>R</sup> (pIC120/ <i>KpnI</i> - <i>HpaI</i> +T4 DNA polimerasa)	Este trabajo
<b>CGM1170</b> <i>skn7Δsir3Δ</i>	CGM355	<i>ura3Δ::Tn903 G418<sup>R</sup> skn7Δsir3Δ::hph,</i> Hyg <sup>R</sup> (pIC120/ <i>KpnI</i> - <i>HpaI</i> +T4 DNA polimerasa)	Este trabajo
<b>CGM1172</b> <i>msn2Δsir3Δ</i>	CGM833	<i>ura3Δ::Tn903 G418<sup>R</sup> msn2Δsir3Δ::hph,</i> Hyg <sup>R</sup> (pIC120/ <i>KpnI</i> - <i>HpaI</i> +T4 DNA polimerasa)	Este trabajo
<b>CGM1174</b> <i>msn4Δsir3Δ</i>	CGM835	<i>ura3Δ::Tn903 G418<sup>R</sup> msn4Δsir3Δ::hph,</i> Hyg <sup>R</sup> (pIC120/ <i>KpnI</i> - <i>HpaI</i> +T4 DNA polimerasa)	Este trabajo
<b>CGM1176</b> <i>yapΔskn7Δsir3</i> Δ	CGM385	<i>ura3Δ::Tn903 G418<sup>R</sup> yap1Δskn7Δ</i> <i>sir3Δ::hph,</i> Hyg <sup>R</sup> (pIC120/ <i>KpnI</i> - <i>HpaI</i> +T4 DNA polimerasa)	Este trabajo
<b>CGM1178</b> <i>msn2Δmsn4Δ</i> <i>sir3Δ</i>	CGM1025	<i>ura3Δ::Tn903 G418<sup>R</sup></i> <i>msn2Δmsn4Δsir3Δ::hph,</i> Hyg <sup>R</sup> (pIC120/ <i>KpnI</i> - <i>HpaI</i> +T4 DNA polimerasa)	Este trabajo
<b>CGM1180</b> <i>skn7Δyap1Δms</i> <i>n2Δsir3Δ</i>	CGM477	<i>ura3Δ::Tn903 G418<sup>R</sup> yap1Δskn7Δmsn2Δ</i> <i>sir3Δ::hph,</i> Hyg <sup>R</sup> (pIC120/ <i>KpnI</i> - <i>HpaI</i> +T4 DNA polimerasa)	Este trabajo
<b>CGM1182</b> <i>skn7Δyap1Δms</i> <i>n4Δsir3Δ</i>	CGM480	<i>ura3Δ::Tn903 G418<sup>R</sup> yap1Δskn7Δmsn4Δ</i> <i>sir3Δ::hph,</i> Hyg <sup>R</sup> (pIC120/ <i>KpnI</i> - <i>HpaI</i> +T4 DNA polimerasa)	Este trabajo
<b>CGM1245</b> <i>skn7Δyap1Δms</i> <i>n4Δmsn2Δsir3</i> Δ	CGM527	<i>ura3Δ::Tn903 G418<sup>R</sup></i> <i>yap1Δskn7Δmsn4Δmsn2Δsir3Δ::hph,</i> Hyg <sup>R</sup> (pIC120/ <i>KpnI</i> - <i>HpaI</i> +T4 DNA polimerasa)	Este trabajo
<b>Mutantes en los factores de transcripción con pP<sub>EPA2</sub>::GFP (pAP417)</b>			
<b>BG435</b> pAP418	BG14	<i>ura3Δ::Tn903 G418<sup>R</sup></i> GFP bajo el control del promotor de <i>EPA3,</i> pAP418 (P <sub>EPA3</sub> ::GFP::3'UTR <sub>HIS3</sub> ), Ura <sup>+</sup>	Este trabajo
<b>BG681</b> pSP126	BG14	<i>ura3Δ::Tn903 G418<sup>R</sup></i> GFP bajo el control del promotor de <i>EPA4/5,</i> pSP126 (P <sub>EPA4/5</sub> ::GFP::3'UTR <sub>HIS3</sub> ), Ura <sup>+</sup>	Este trabajo

<b>CGM827</b> <b>wt/pAP417</b>	BG14	<i>ura3Δ::Tn903 G418<sup>R</sup></i> <i>GFP</i> bajo el control del promotor de <i>EPA2</i> , pAP417 ( <i>P<sub>EPA2</sub>::GFP::3'UTR<sub>HIS3</sub></i> ), <i>Ura<sup>+</sup></i>	Este trabajo
<b>CGM1453</b> <b>yap1Δ/pAP417</b>	CGM308	<i>ura3Δ::Tn903 G418<sup>R</sup> yap1Δ</i> <i>GFP</i> bajo el control del promotor de <i>EPA2</i> , pAP417 ( <i>P<sub>EPA2</sub>::GFP::3'UTR<sub>HIS3</sub></i> ), <i>Ura<sup>+</sup> Hyg<sup>S</sup></i>	Este trabajo
<b>CGM1455</b> <b>skn7Δ/pAP417</b>	CGM355	<i>ura3Δ::Tn903 G418<sup>R</sup> skn7Δ</i> <i>GFP</i> bajo el control del promotor de <i>EPA2</i> , pAP417 ( <i>P<sub>EPA2</sub>::GFP::3'UTR<sub>HIS3</sub></i> ), <i>Ura<sup>+</sup> Hyg<sup>S</sup></i>	Este trabajo
<b>CGM1457</b> <b>yap1Δskn7Δ</b> <b>/pAP417</b>	CGM385	<i>ura3Δ::Tn903 G418<sup>R</sup> yap1Δskn7Δ</i> <i>GFP</i> bajo el control del promotor de <i>EPA2</i> , pAP417 ( <i>P<sub>EPA2</sub>::GFP::3'UTR<sub>HIS3</sub></i> ), <i>Ura<sup>+</sup> Hyg<sup>S</sup></i>	Este trabajo
<b>CGM1459</b> <b>yap1Δskn7Δmsn2Δ/pAP417</b>	CGM477	<i>ura3Δ::Tn903 G418<sup>R</sup> yap1Δskn7Δmsn2Δ</i> <i>GFP</i> bajo el control del promotor de <i>EPA2</i> , pAP417 ( <i>P<sub>EPA2</sub>::GFP::3'UTR<sub>HIS3</sub></i> ) <i>Ura<sup>+</sup> Hyg<sup>S</sup></i>	Este trabajo
<b>CGM1461</b> <b>yap1Δskn7Δmsn4Δ/pAP417</b>	CGM480	<i>ura3Δ::Tn903 G418<sup>R</sup> yap1Δskn7Δmsn4Δ</i> <i>GFP</i> bajo el control del promotor de <i>EPA2</i> , pAP417 ( <i>P<sub>EPA2</sub>::GFP::3'UTR<sub>HIS3</sub></i> ), <i>Ura<sup>+</sup> Hyg<sup>S</sup></i>	Este trabajo
<b>CGM1463</b> <b>msn2Δ/pAP417</b>	CGM833	<i>ura3Δ::Tn903 G418<sup>R</sup> msn2Δ</i> <i>GFP</i> bajo el control del promotor de <i>EPA2</i> , pAP417 ( <i>P<sub>EPA2</sub>::GFP::3'UTR<sub>HIS3</sub></i> ), <i>Ura<sup>+</sup> Hyg<sup>S</sup></i>	Este trabajo
<b>CGM1465</b> <b>msn4Δ/pAP417</b>	CGM835	<i>ura3Δ::Tn903 G418<sup>R</sup> msn4Δ</i> <i>GFP</i> bajo el control del promotor de <i>EPA2</i> , pAP417 ( <i>P<sub>EPA2</sub>::GFP::3'UTR<sub>HIS3</sub></i> ), <i>Ura<sup>+</sup> Hyg<sup>S</sup></i>	Este trabajo
<b>CGM1467</b> <b>msn2Δmsn4Δ/pAP417</b>	CGM1025	<i>ura3Δ::Tn903 G418<sup>R</sup> msn2Δmsn4Δ</i> <i>GFP</i> bajo el control del promotor de <i>EPA2</i> , pAP417 ( <i>P<sub>EPA2</sub>::GFP::3'UTR<sub>HIS3</sub></i> ), <i>Ura<sup>+</sup> Hyg<sup>S</sup></i>	Este trabajo
<b>CGM1469</b> <b>yap1Δskn7Δmsn2Δmsn4Δ/pAP417</b>	CGM1245	<i>ura3Δ::Tn903 G418<sup>R</sup> yap1Δskn7Δmsn2Δmsn4Δ</i> <i>GFP</i> bajo el control del promotor de <i>EPA2</i> , pAP417 ( <i>P<sub>EPA2</sub>::GFP::3'UTR<sub>HIS3</sub></i> ), <i>Ura<sup>+</sup> Hyg<sup>S</sup></i>	Este trabajo
<b>CGM1769</b> <b>cta1Δ/pAP417</b>	CGM295	<i>ura3Δ::Tn903 G418<sup>R</sup> cta1Δ</i> , <i>GFP</i> bajo el control del promotor de <i>EPA2</i> pAP417 ( <i>P<sub>EPA2</sub>::GFP::3'UTR<sub>HIS3</sub></i> ), <i>Ura<sup>+</sup></i>	Este trabajo

Hyg <sup>S</sup>			
<b>Controles</b>			
<b>CGM473</b>	BG14	<i>ura3Δ::Tn903 G418<sup>R</sup></i> pMC18 (pP <sub>CTA1</sub> :: <i>CTA1::GFP::3'UTR<sub>CTA1</sub></i> ), Ura <sup>+</sup>	Colección del Laboratorio
<b>CGM514</b> <b>pGFP::3'UTR<sub>CT</sub></b> A1	CGM295	<i>ura3Δ::Tn903 G418<sup>R</sup> cta1Δ</i> pMC14 (pGFP::3'UTR <sub>CTA1</sub> ), Ura <sup>+</sup>	Colección del Laboratorio
<b>Marcadas con un epitope</b>			
<b>CGM1236</b> <b>HST1::MYC</b> <b>SUM1::FLAG</b>	CGM983	<i>ura3Δ::Tn903 G418<sup>R</sup></i> <i>HST1::c-myc13, SUM1::FLAG</i> Transformada con pMZ21, Ura <sup>-</sup> Hyg <sup>S</sup>	(ORTA-ZAVALZA <i>et al.</i> 2013)
<b>CGM1505</b> <b>SKN7::MYC</b>	CGM1482	<i>ura3Δ::Tn903 G418<sup>R</sup></i> <i>SKN7::c-myc13</i> (pJC52/ <i>BamHI-BglII</i> ) Transformada con pMZ21, Ura <sup>-</sup> Hyg <sup>S</sup>	Este trabajo
<b>CGM1548</b> <b>SKN7::MYC,</b> <b>YAP1::FLAG</b>	CGM1528	<i>ura3Δ::Tn903 G418<sup>R</sup></i> <i>SKN7::c-myc13, YAP1::FLAG</i> (pJC50/ <i>Mfel-BsgI</i> ) Transformada con pMZ21, Ura <sup>-</sup> Hyg <sup>S</sup>	Este trabajo
<b>CGM1763</b> <b>YAP1::FLAG</b>	CGM1747	<i>ura3Δ::Tn903 G418<sup>R</sup></i> <i>YAP1::FLAG</i> (pJC50/ <i>BsgI-BsgI</i> ) Transformada con pMZ21, Ura <sup>-</sup> Hyg <sup>S</sup>	Este trabajo
<b>CGM1479</b>	BG14	<i>ura3Δ::Tn903 G418<sup>R</sup></i> <i>MSN4::FLAG::hph</i> Hyg <sup>R</sup> (pJC48/ <i>B1pl-BglII</i> )	Este trabajo
<b>CGM1482</b>	BG14	<i>ura3Δ::Tn903 G418<sup>R</sup></i> <i>SKN7::c-myc13::hph</i> Hyg <sup>R</sup> (pJC52/ <i>BamHI-BglII</i> )	Este trabajo
<b>CGM1484</b>	BG14	<i>ura3Δ::Tn903 G418<sup>R</sup></i> <i>MSN2::c-myc13::hph</i> Hyg <sup>R</sup> (pJC56/ <i>BsgI-BglII</i> )	Este trabajo
<b>CGM1485</b>	BG14	<i>ura3Δ::Tn903 G418<sup>R</sup></i> <i>SKN7::FLAG::hph</i> Hyg <sup>R</sup> (pJC70/ <i>BamHI-BglII</i> )	Este trabajo
<b>CGM1486</b>	BG14	<i>ura3Δ::Tn903 G418<sup>R</sup></i> <i>MSN4::FLAG</i> cointegrado pJC48/ <i>B1pl</i> Ura <sup>+</sup>	Este trabajo
<b>CGM1487</b>	BG14	<i>ura3Δ::Tn903 G418<sup>R</sup></i> <i>YAP1::FLAG</i> cointegrado pJC50/ <i>Mfel</i> Ura <sup>+</sup>	Este trabajo
<b>CGM1489</b>	BG14	<i>ura3Δ::Tn903 G418<sup>R</sup></i> <i>SKN7::c-myc13</i> cointegrado pJC52/ <i>BglII</i> Ura <sup>+</sup>	Este trabajo

<b>CGM1491</b>	BG14	<i>ura3Δ::Tn903 G418<sup>R</sup></i> <i>SKN7::FLAG</i> cointegrado pJC70/ <i>BglII</i> Ura <sup>+</sup>	Este trabajo
<b>CGM1492</b>	BG14	<i>ura3Δ::Tn903 G418<sup>R</sup></i> <i>MSN4::FLAG</i> cointegrado pJC70/ <i>BglII</i> Ura <sup>+</sup>	Este trabajo
<b>CGM1493</b>	BG14	<i>ura3Δ::Tn903 G418<sup>R</sup></i> <i>YAP1::c-myc13</i> cointegrado pJC72/ <i>BlnI</i> Ura <sup>+</sup>	Este trabajo
<b>CGM1507</b>	CGM1484	<i>ura3Δ::Tn903 G418<sup>R</sup></i> <i>MSN2::c-myc13</i> (pJC56/ <i>BsgI-BglII</i> ) Transformada con pMZ21, Ura <sup>-</sup> Hyg <sup>S</sup>	Este trabajo
<b>CGM1526</b>	CGM1505	<i>ura3Δ::Tn903 G418<sup>R</sup></i> <i>SKN7::c-myc13</i> , <i>MSN4::FLAG::hph</i> Hyg <sup>R</sup> (pJC48/ <i>BlnI-BglII</i> )	Este trabajo
<b>CGM1528</b>	CGM1505	<i>ura3Δ::Tn903 G418<sup>R</sup></i> <i>SKN7::c-myc13</i> , <i>YAP1::FLAG::hph</i> Hyg <sup>R</sup> (pJC50/ <i>MfeI-BsgII</i> )	Este trabajo
<b>CGM1530</b>	CGM1507	<i>ura3Δ::Tn903 G418<sup>R</sup></i> <i>MSN2::c-myc13</i> , <i>MSN4::FLAG::hph</i> Hyg <sup>R</sup> (pJC48/ <i>BlnI-BglII</i> )	Este trabajo
<b>CGM1546</b>	CGM1526	<i>ura3Δ::Tn903 G418<sup>R</sup></i> <i>SKN7::c-myc13</i> , <i>MSN4::FLAG</i> (pJC48/ <i>BlnI-BglII</i> ) Transformada con pMZ21, Ura <sup>-</sup> Hyg <sup>S</sup>	Este trabajo
<b>CGM1550</b>	CGM1530	<i>ura3Δ::Tn903 G418<sup>R</sup></i> <i>MSN2::c-myc13</i> , <i>MSN4::FLAG::hph</i> Hyg <sup>R</sup> (pJC48/ <i>BlnI-BglII</i> ) Transformada con pMZ21, Ura <sup>-</sup> Hyg <sup>S</sup>	Este trabajo
<b>CGM1562</b>	CGM1507	<i>ura3Δ::Tn903 G418<sup>R</sup></i> <i>MSN2::c-myc13</i> , <i>SKN7::FLAG::hph</i> Hyg <sup>R</sup> (pJC70/ <i>BamHI-BglII</i> )	Este trabajo
<b>CGM1599</b>	CGM1562	<i>ura3Δ::Tn903 G418<sup>R</sup></i> <i>MSN2::c-myc13</i> , <i>SKN7::FLAG</i> (pJC70/ <i>BamHI-BglII</i> ) Transformada con pMZ21, Ura <sup>-</sup> Hyg <sup>S</sup>	Este trabajo
<b>CGM1747</b>	BG14	<i>ura3Δ::Tn903 G418<sup>R</sup></i> <i>YAP1::FLAG::hph</i> , Hyg <sup>R</sup> (pJC50/ <i>BsgI-BsgI</i> )	Este trabajo
<b>CGM1748</b>	BG14	<i>ura3Δ::Tn903 G418<sup>R</sup></i> <i>YAP1::FLAG::hph</i> , Hyg <sup>R</sup> (pJC50/ <i>MfeI-XmnI</i> )	Este trabajo
<b>CGM1764</b>	CGM1748	<i>ura3Δ::Tn903 G418<sup>R</sup></i>	Este trabajo



		<i>YAP1::FLAG::hph</i> , Hyg <sup>R</sup> (pJC50/ <i>Mfel-XmnI</i> ) Transformada con pMZ21, Ura <sup>-</sup> Hyg <sup>S</sup>	
<b>QUR1</b>			
<b>CGM52</b>	BG14	<i>ura3Δ::Tn903 G418<sup>R</sup> rif1Δ::hph</i> , Hyg <sup>R</sup>	(CASTANO <i>et al.</i> 2005)
<b>CGM740</b>	BG14	<i>ura3Δ::Tn903 G418<sup>R</sup> qur1Δ::hph</i> , Hyg <sup>R</sup> , Producto de la fusión por PCR 5'UTR <sub>QUR1</sub> :: <i>hph</i> ::3'UTR <sub>QUR1</sub>	Este trabajo
<b>CGM1436</b>	CGM24	<i>ura3Δ::Tn903 G418<sup>R</sup> sir3Δ::hph</i> , Hyg <sup>R</sup> pOC11 (5'UTR <sub>QUR1</sub> :: <i>GFP</i> ::3'UTR <sub>QUR1</sub> ), Ura <sup>+</sup>	Este trabajo
<b>CGM1438</b>	CGM52	<i>ura3Δ::Tn903 G418<sup>R</sup> rif1Δ::hph</i> , Hyg <sup>R</sup> pOC11 (5'UTR <sub>QUR1</sub> :: <i>GFP</i> ::3'UTR <sub>QUR1</sub> ), Ura <sup>+</sup>	Este trabajo
<b>CGM1451</b>	CGM740	<i>qur1Δ::hph</i> , Hyg <sup>R</sup> , (transformado con pBC34.1 <i>Pst</i> I), Ura <sup>+</sup>	Este trabajo
<b>Extras</b>			
<b>CGM759</b>	CGM537	<i>ura3Δ::Tn903 G418<sup>R</sup></i> <i>yap1Δskn7Δmsn4Δmsn2Δ::hph</i> , Hyg <sup>R</sup> <i>GFP</i> bajo el control del promotor de <i>EPA2</i> , pAP417 ( <i>P<sub>EPA2</sub>::GFP::3'UTR<sub>HIS3</sub></i> ), Ura <sup>+</sup>	Este trabajo
<b>CGM812</b>	CGM537	<i>ura3Δ::Tn903 G418<sup>R</sup></i> <i>yap1Δskn7Δmsn4Δmsn2Δ::hph</i> , Hyg <sup>R</sup> pAP353 ( <i>GFP::3'UTR<sub>HIS3</sub></i> )	Este trabajo
<b>CGM825</b>	BG14	<i>ura3Δ::Tn903 G418<sup>R</sup></i> , Ura <sup>-</sup> , Hyg <sup>S</sup> pAP353 ( <i>GFP::3'UTR<sub>HIS3</sub></i> )	Este trabajo

## 2. Plásmidos

Los plásmidos utilizados en este estudio se describen en la Tabla 2. Los plásmidos se introdujeron por electroporación. Todas las cepas que contienen a estos plásmidos se encuentran resguardadas por duplicado en glicerol al 10% a -80°C.

**Tabla 2. Plásmidos**

Plásmido	Descripción y/o genotipo	Referencia
<b>Vectores de clonación</b>		
<b>pGEM®-T</b>	Vector de clonación. Amp <sup>R</sup>	Promega®
<b>pGRB2.0</b>	Vector de clonación replicativo, pRS406.	(DE LAS

	<i>CgCEN/ARS URA3, Amp<sup>R</sup></i>	PENAS <i>et al.</i> 2003; DOMERGUE <i>et al.</i> 2005)
<b>pMB11</b>	Vector de clonación, fragmento <i>SacI/PstI</i> de pMB7 de 1.5 Kb clonado en pSU18, <i>Cm<sup>R</sup>, sacB<sup>+</sup>, Sac<sup>S</sup></i>	Colección del laboratorio
<b>pRS306</b>	Vector de clonación replicativo. <i>ScCEN/ARS URA3, Amp<sup>R</sup></i>	(SIKORSKI and HIETER 1989)
<b>pOZ18</b>	Vector para crear fusiones traduccionales con <i>c-Myc13</i> . Fragmento <i>BamHI/BglII</i> de 0.563Kb ( <i>c-Myc13</i> ) derivado de pAP760, clonado en pOZ14 digerido con <i>BamHI</i> . Se seleccionó la orientación con el <i>c-myc13</i> en dirección 5'→3'. [ <i>c-myc13::(FRT-3'UTR<sub>CTA1</sub>)P<sub>PGK</sub>::hph::(3'UTR<sub>HIS3</sub>)-FRT</i> ]; <i>URA3, Hyg<sup>R</sup>, Amp<sup>R</sup></i>	Colección del laboratorio
<b>pEG40</b>	Vector para crear fusiones traduccionales con <i>FLAG</i> . Fragmento <i>BamHI/BglII</i> de 0.103 Kb ( <i>FLAG</i> ) clonado en pOZ14 digerido con <i>BamHI</i> . Orientación verificada por secuenciación [ <i>FLAG::(FRT-3'UTR<sub>CTA1</sub>)P<sub>PGK</sub>::hph::(3'UTR<sub>HIS3</sub>)-FRT</i> ] <i>URA3, Hyg<sup>R</sup>, Amp<sup>R</sup></i>	Colección del laboratorio
<b>Vectores para mutaciones génicas</b>		
<b>pIC120 (FRT-<i>sir3</i>Δ::<i>hph-FRT, Hyg<sup>R</sup></i>)</b>	Fragmento con extremos <i>BamHI/HindIII</i> y tratado con T4pol, <i>P<sub>PGK</sub>::hph::3'UTR<sub>HIS3</sub></i> flanqueado por sitios FRT. Clonado en pIC39 digerido con <i>BamHI</i> y tratado con T4pol. <i>URA3, Hyg<sup>R</sup>, Amp<sup>R</sup>. KpnI-HpaI+T4DNA polimerasa.</i>	(ROSAS-HERNANDEZ <i>et al.</i> 2008)
<b>Vectores replicativos</b>		
<b>pMZ21</b>	Vector replicativo que expresa la recombinasa ScFlp1p para la remoción del casete de resistencia a higromicina; [ <i>P<sub>EPA1</sub>::FLP1::(3' UTR<sub>HIS3</sub>)</i> ] <i>URA3, Amp<sup>R</sup></i>	Colección del laboratorio B. Cormack
<b>pAP353</b>	Vector replicativo que lleva 0.738Kb de GFP ( <i>EcoRI/SalI</i> )(oligos 586/587), y 0.397Kb de 3' <i>UTR<sub>HIS3</sub></i> ( <i>XhoI/KpnI</i> ) clonado en pGRB2.0. Para fusiones con GFP. <i>URA3, Amp<sup>R</sup></i> ( <i>GFP::3' UTR<sub>HIS3</sub></i> )	(GALLEGOS-GARCIA <i>et al.</i> 2012b)
<b>pAP354</b>	Vector replicativo que lleva la región promotora de <i>EPA1</i> , fragmento de PCR (oligos 666/667) de 2.5 Kb clonado en pAP353, digerido con <i>BstXI</i> . <i>URA3,</i>	(GALLEGOS-GARCIA <i>et al.</i> 2012b)

	Amp <sup>R</sup> (P <sub>EPA1</sub> ::GFP::3'UTR <sub>HIS3</sub> )	
<b>pAP417</b> <b>P<sub>EPA2</sub>::GFP::</b> <b>3'UTR<sub>HIS3</sub></b>	Vector replicativo que lleva la región promotora de EPA2, fragmento de PCR (oligos 886/872) de 2.9 Kb clonado en pAP354, digerido con <i>Bst</i> XI. URA3, Amp <sup>R</sup> (P <sub>EPA2</sub> ::GFP::3'UTR <sub>HIS3</sub> )	Este trabajo
<b>pAP418</b>	Vector replicativo que lleva la región promotora de EPA3, fragmento de PCR (oligos 873/874) de 2.3 Kb clonado en pAP354, digerido con <i>Bst</i> XI. URA3, Amp <sup>R</sup> (P <sub>EPA3</sub> ::GFP::3'UTR <sub>HIS3</sub> )	Este trabajo
<b>pSP126</b>	Vector replicativo que lleva la región promotora de EPA4/5, fragmento de PCR (oligos 1591/1592) de 2.8 Kb clonado en pAP354, digerido con <i>Bst</i> XI. URA3, Amp <sup>R</sup> (P <sub>EPA4/5</sub> ::GFP::3'UTR <sub>HIS3</sub> )	Este trabajo
<b>pMC14</b>	Vector replicativo que lleva 0.717 Kb de <i>GFP</i> ( <i>Bam</i> HI- <i>Eco</i> RI) y 0.29 Kb del 3'UTR <i>CTA1</i> ( <i>Eco</i> RI- <i>Xho</i> I), clonado en pGRB2.0. URA3, Amp <sup>R</sup> ( <i>GFP</i> ::3'UTR <sub>CTA1</sub> )	Este trabajo
<b>pMC18</b>	Vector replicativo que lleva la región promotora de <i>CTA1</i> de 5.86 Kb clonado en pMC14, digerido con <i>Sac</i> I- <i>Bam</i> HI. URA3, Amp <sup>R</sup> . Fusión traduccional (P <sub>CTA1</sub> ::GFP::3'UTR <sub>CTA1</sub> )	Este trabajo
<b>pOC11</b>	Vector replicativo que lleva xxx Kb de la región promotora de <i>QUR1</i> y xxx Kb de 3'UTR <sub>QUR1</sub> clonado en pGRB2.0 URA3, Amp <sup>R</sup> (5'UTR <sub>QUR1</sub> ::GFP::3'UTR <sub>QUR1</sub> )	Colección del laboratorio
<b>pAP543</b>	Vector replicativo que lleva la región promotora de EPA2 y que expresa la recombinasa ScFlp1p. P <sub>EPA2</sub> ::FLP1, URA3	Colección del laboratorio
<b>Vectores para fusiones traduccionales con epítopes</b>		
<b>pJC15</b> <b>pGEM::</b> <b>3'UTR <i>MSN2</i></b>	Fragmento de PCR 0.696 Kb de 3'UTR de <i>MSN2</i> (oligos 412/413), clonado en pGEM, digerido con <i>Hind</i> III/ <i>Kpn</i> I, Amp <sup>R</sup>	Este trabajo
<b>pJC17</b> <b>pGEM::</b> <b>3'ORF <i>MSN2</i></b>	Fragmento de PCR 0.939 Kb de 3'ORF de <i>MSN2</i> (oligos 414/415), clonado en pGEM, digerido con <i>Sac</i> I/ <i>Bam</i> HI, Amp <sup>R</sup>	Este trabajo
<b>pJC19</b> <b>pGEM::</b> <b>3'UTR <i>MSN4</i></b>	Fragmento de PCR 0.883 Kb 3'UTR de <i>MSN4</i> (oligos 416/417), clonado en pGEM, digerido con <i>Hind</i> III/ <i>Kpn</i> I, Amp <sup>R</sup>	Este trabajo
<b>pJC21</b> <b>pGEM::</b> <b>3'ORF <i>MSN4</i></b>	Fragmento de PCR 0.883 Kb 3'ORF de <i>MSN4</i> (oligos 418/419), clonado en pGEM, digerido con <i>Spe</i> I/ <i>Bam</i> HI, Amp <sup>R</sup>	Este trabajo
<b>pJC24</b> <b>pGEM::</b> <b>3'UTR <i>SKN7</i></b>	Fragmento de PCR 0.686 Kb 3'UTR de <i>SKN7</i> (oligos 420/421) , clonado en pGEM, digerido con <i>Hind</i> III/ <i>Kpn</i> I, Amp <sup>R</sup>	Este trabajo

<b>pJC25</b> <b>pGEM::3'ORF</b> <b>F SKN7</b>	Fragmento de PCR 0.417 Kb 3'ORF de <i>SKN7</i> (oligos 422/423), clonado en pGEM, digerido con <i>SacI/BglII</i> , Amp <sup>R</sup>	Este trabajo
<b>pJC27</b> <b>pGEM::3'UTR</b> <b>R YAP1</b>	Fragmento de PCR 0.963Kb 3'UTR de <i>YAP1</i> (oligos 424/425), clonado en pGEM, digerido con <i>HindIII/KpnI</i> , Amp <sup>R</sup>	Este trabajo
<b>pJC29</b> <b>pGEM::3'ORF</b> <b>F YAP1</b>	Fragmento de PCR 0.734 Kb 3'ORF de <i>YAP1</i> (oligos 426/427), clonado en pGEM, digerido con <i>SacI/BamHI</i> , Amp <sup>R</sup>	Este trabajo
<b>pJC40</b> <b>pOZ18::3'ORF</b> <b>RF MSN2</b>	Fragmento <i>SacI/BamHI</i> de 0.939 Kb 3'ORF de <i>MSN2</i> derivado del pJC17, clonado en pOZ18 digerido con <i>SacI/BamHI</i> . <i>URA3</i> Amp <sup>R</sup>	Este trabajo
<b>pJC42</b> <b>pEG40::3'UTR</b> <b>R MSN4</b>	Fragmento <i>HindIII/KpnI</i> de 0.883 Kb 3'UTR de <i>MSN4</i> derivado del pJC19, clonado en pEG40 digerido con <i>HindIII/KpnI</i> . <i>URA3</i> Amp <sup>R</sup>	Este trabajo
<b>pJC48</b> <b>pJC42::3'ORF</b> <b>F MSN4</b>	Fragmento <i>SpeI/BamHI</i> de 0.883 Kb 3'ORF de <i>MSN4</i> derivado del pJC21, clonado en pJC42 digerido con <i>SpeI/BamHI</i> . <i>URA3</i> Amp <sup>R</sup>	Este trabajo
<b>pJC44</b> <b>pEG40::3'UTR</b> <b>R YAP1</b>	Fragmento <i>HindIII/KpnI</i> de 0.963 Kb 3'UTR de <i>YAP1</i> derivado del pJC27, clonado en pEG40 digerido con <i>HindIII/KpnI</i> . <i>URA3</i> Amp <sup>R</sup>	Este trabajo
<b>pJC46</b> <b>pOZ18::3'ORF</b> <b>RF SKN7</b>	Fragmento <i>SacI/BglII</i> de 0.417 Kb 3'ORF de <i>SKN7</i> derivado del pJC25, clonado en pOZ18 digerido con <i>SacI/BamHI</i> . <i>URA3</i> Amp <sup>R</sup>	Este trabajo
<b>pJC50</b> <b>pJC44::3'ORF</b> <b>F YAP1</b>	Fragmento <i>SacI/BamHI</i> de 0.734 Kb 3'ORF de <i>YAP1</i> derivado del pJC29, clonado en pJC44 digerido con <i>SacI/BamHI</i> . <i>URA3</i> Amp <sup>R</sup>	Este trabajo
<b>pJC52</b> <b>pJC46::3'UTR</b> <b>R SKN7</b>	Fragmento <i>HindIII/KpnI</i> de 0.686 Kb 3'UTR de <i>SKN7</i> derivado del pJC24, clonado en pJC46 digerido con <i>HindIII/KpnI</i> . <i>URA3</i> Amp <sup>R</sup>	Este trabajo
<b>pJC54</b> <b>pMB11::3'UTR</b> <b>MSN2</b>	Fragmento de PCR 0.696 Kb de 3'UTR de <i>MSN2</i> (oligos 412/413), clonado en pMB11, digerido con <i>StuI</i> , Cm <sup>R</sup> Sac <sup>S</sup>	Este trabajo
<b>pJC56</b> <b>pJC40::3'UTR</b> <b>R MSN2</b>	Fragmento <i>HindIII/KpnI</i> de 0.696 Kb 3'UTR de <i>MSN2</i> derivado del pJC15, clonado en pJC40 digerido con <i>HindIII/KpnI</i> . <i>URA3</i> Amp <sup>R</sup>	Este trabajo
<b>pJC58</b> <b>pEG40::3'UTR</b> <b>R MSN2</b>	Fragmento <i>HindIII/KpnI</i> de 0.696 Kb 3'UTR de <i>MSN2</i> derivado del pJC15, clonado en pEG40 digerido con <i>HindIII/KpnI</i> . <i>URA3</i> Amp <sup>R</sup>	Este trabajo
<b>pJC60</b> <b>pOZ18::3'UTR</b> <b>R MSN4</b>	Fragmento <i>HindIII/KpnI</i> de 0.883 Kb 3'UTR de <i>MSN4</i> derivado del pJC19, clonado en pOZ18 digerido con <i>HindIII/KpnI</i> . <i>URA3</i> Amp <sup>R</sup>	Este trabajo
<b>pJC62</b> <b>pEG40::3'UTR</b>	Fragmento <i>HindIII/KpnI</i> de 0.686 Kb 3'UTR de <i>SKN7</i> derivado del pJC24, clonado en pEG40	Este trabajo

<b>R SKN7</b>	digerido con <i>HindIII/KpnI</i> . <i>URA3 Amp<sup>R</sup></i>	
<b>pJC64</b> <b>pOZ18::3'UT</b> <b>R YAP1</b>	Fragmento <i>HindIII/KpnI</i> de 0.963 Kb 3'UTR de <i>YAP1</i> derivado del pJC27, clonado en pOZ18 digerido con <i>HindIII/KpnI</i> . <i>URA3 Amp<sup>R</sup></i>	Este trabajo
<b>pJC66</b> <b>pJC58::3'OR</b> <b>F MSN2</b>	Fragmento <i>SacI/BamHI</i> de 0.939 Kb 3'ORF de <i>MSN2</i> derivado del pJC17, clonado en pJC58 digerido con <i>SacI/BamHI</i> . <i>URA3 Amp<sup>R</sup></i>	Este trabajo
<b>pJC68</b> <b>pJC60::3'OR</b> <b>F MSN4</b>	Fragmento <i>SpeI/BamHI</i> de 0.883 Kb 3'ORF de <i>MSN4</i> derivado del pJC21, clonado en pJC60 digerido con <i>SpeI/BamHI</i> . <i>URA3 Amp<sup>R</sup></i>	Este trabajo
<b>pJC70</b> <b>pJC62::3'OR</b> <b>F SKN7</b>	Fragmento <i>SacI/BglII</i> de 0.417 Kb 3'ORF de <i>SKN7</i> derivado del pJC25, clonado en pJC62 digerido con <i>SacI/BamHI</i> . <i>URA3 Amp<sup>R</sup></i>	Este trabajo
<b>pJC72</b> <b>pJC64::3'OR</b> <b>F YAP1</b>	Fragmento <i>SacI/BamHI</i> de 0.734 Kb 3'ORF de <i>YAP1</i> derivado del pJC29, clonado en pJC64 digerido con <i>SacI/BamHI</i> . <i>URA3 Amp<sup>R</sup></i>	Este trabajo
<b><i>epa2Δ::FLP1</i></b>		
<b>pJC3</b> <b>pGEM::5'UT</b> <b>R EPA2</b>	Fragmento de PCR de 0.833 Kb de la región promotora de <i>EPA2</i> (oligos 303/3049), clonado en pGEM, digerido con <i>KpnI/XhoI</i> , <i>Amp<sup>R</sup></i>	Este trabajo
<b>pJC5</b> <b>pGEM::3'UT</b> <b>R EPA2</b>	Fragmento de PCR de 0.944 Kb de 3'UTR de <i>EPA2</i> (oligos 307-308), clonado en pGEM, digerido con <i>BamHI/SacI</i> , <i>Amp<sup>R</sup></i>	Este trabajo
<b>pJC31</b> <b>pRS306::5'U</b> <b>TR EPA2</b>	Fragmento <i>KpnI/XhoI</i> de 0.833 Kb de la región promotora de <i>EPA2</i> derivado del pJC3, clonado en pRS306 digerido con <i>KpnI/XhoI</i> , <i>URA3 Amp<sup>R</sup></i>	Este trabajo
<b>pJC33</b> <b>pMB11::FLP</b> <b>1</b>	Fragmento de PCR de 1.271 Kb de <i>FLP1</i> (oligos #309/17) derivado del pMZ18, clonado en pMB11, digerido con <i>XhoI/BamHI</i> , <i>Cm<sup>R</sup></i>	Este trabajo
<b>pJC34</b> <b>pMB11::FLP</b> <b>1</b>	Fragmento de PCR de 1.271 Kb de <i>FLP1</i> (oligos #309/17) derivado del pMZ21, clonado en pMB11, digerido con <i>XhoI/BamHI</i> , <i>Cm<sup>R</sup></i>	Este trabajo
<b>pJC35</b> <b>pJC31::3'UT</b> <b>REPA2</b>	Fragmento <i>BamHI/SacI</i> de 0.944 Kb de 3'UTR de <i>EPA2</i> derivado del pJC5, clonado en pJC31 digerido con <i>BamHI/SacI</i> , <i>URA3 Amp<sup>R</sup></i>	Este trabajo
<b>pJC38</b> <b>pJC35::FLP</b> <b>1</b>	Fragmento <i>XhoI/BamHI</i> de 1.271 Kb de <i>FLP1</i> derivado del pJC34, clonado en pJC35 digerido con <i>XhoI/BamHI</i> , <i>URA3 Amp<sup>R</sup></i>	Este trabajo
<b>pBC34.1</b>	Vector para restaurar el gen <i>CgURA3</i> , fragmento <i>PsfI</i> de 2.2 Kb, clonado en pUC19, <i>Amp<sup>R</sup></i>	(CORMACK <i>et al.</i> 1999)

### 3. Oligonucleótidos

Los oligonucleótidos (Elim Biopharmaceuticals, Inc) utilizados para la construcción de plásmidos, el diagnóstico de mutaciones o inserciones o cepas marcadas por PCR; así como para la evaluación de la expresión por la técnica de RT-PCR o RT-qPCR, se describen en la Tabla 3. Todos se utilizaron en concentraciones finales de 100 a 500nM en las reacciones de PCR.

**Tabla 3. Oligonucleótidos**

Primers	Secuencias de 5' a 3'	Descripción
<b>Mutantes en <i>sir3Δ</i></b>		
15	CGATAAGAGGCCACGTGCTTTATG	P-PGK Rv out
16	AGAAATACGCACGAACACGATATAGAGG	3'UTRHIS3 Fw out
54	GCAGCCACTGCACAAGAATC	SIR3@-943Fw
55	AGGCAGCTCGCCAGAATCCCATT	SIR3@-968Rv
108	GACCTGGAAGGATGGCAGATAATC	SIR3 int@18Fw
109	GGGCTTGAACCTCCTGTAGTAGTC	SIR3 int@323Rv
<b>RT-PCR</b>		
22	TAACAGTGTTTTCGTTTGAT	EPA1 RT-PCR REV
24	TAATTTGATCAGTAGCACCG	EPA3 REV
25	GTCAAATTCTGTAGTGAAAG	EPA4/5 REV
26	GTCATTGTCAATGGTGTACGATAG	EPA6R REV
27	TTCCTGGTCCGTCGCACCA	EPA8 REV
28	GGCCTAATGAGGCTGACCAA	EPA9 REV
29	TTAGTGGAGCCGGAGAATCG	EPA11REV
30	TTATGCGCTCTGATCCATGT	EPA12 REV
31	TTTGCCGAATAGGCGAGTCA	EPA13 REV
32	TGATACGTGTAGGCGCACCA	EPA14REV
33	TTATTATTGCATTTGAATGC	EPA15 REV
34	TAACAATTTCTTCACTAAAT	EPA16 REV
36	GGGCTCAAAAACAGCTAAAG	EPA1 FW
38	GCATGTTGATAGTTCCAAAA	EPA3 FW
39	GCTAACATTACTGTATTTCT	EPA4/5 FW
40	GGGTTCTCAAACAGCTAAGG	EPA6 FW
41	GGGCGGGTACCAGAAAAGAC	EPA8 FW
43	GGCCAATCAAGATAAGGAT	EPA11 FW
44	GGGAAGGCGAATAGTGC GTA	EPA12 FW
45	GGCCAGGCGTGAACAAAAC	EPA13 FW
46	GCATGTTGACCATTCCAAGA	EPA14 FW
47	GGGCAAAAAAAGCCTCAAAA	EPA15 FW

48	GGGGCTCAAAGAATGCAAAAA	EPA16 FW
51	GCTTGCCGGTAAATGATCT	EPA7 RT-PCR REV
64	TACGGAAGAATGGTTCGTAC	EPA7 RT-PCR FW
219	CGCCGGTGACGATGCTCC	ACT1@70Fw RT
220	CTTGGATTGAGCTTCGTC	ACT1@210Rv RT
553	GTGATGTATACCTTAATTCCG	EPA17 FW
554	TTCTGTTAGGTAGTTAACACCG	EPA17 REV
778	TGTTAAGTGGTAATCTTCCAAGC	EPA2@335Fw RT
779	AATAGCTGGTAAAGTCATGAATGA	EPA2@730Rv RT
<b>RT-qPCR</b>		
219	CGCCGGTGACGATGCTCC	ACT1@70Fw RTqPCR
977	CGTTGTAGAAAGTGTGATGC	ACT1@258Rv RTqPCR
1268	GAATCTTGGTGCTGGAAATGC	EPA2@480Fw RTqPCR
1269	TGGACATTGCTCTTCATCAGA	EPA2@739Rv RTqPCR
<b><i>epa2Δ::FLP1</i></b>		
13	GGCGATTAAGTTGGGTAACGCCAGGG	pUC Fw
17	GGAAACAGCTATGACCATGA	pUC Rv
299	GGGATCAGATTATGCAAAG	EPA2@ 567Fw
300	TGAATGATTTCTTTATTAATTCTG	EPA2@ 710Rv
303	CGG <b><u>CTCGAG</u></b> AAATAGTTTGTTTCTTTGTATG ATATTT	EPA2@-4bpXhoIRv
304	CGG <b><u>GGTACC</u></b> ATCAAACAGGTGCTTAAC	EPA2@- 837bpKpnIFw
305	AAGATGAGCACACATGTACAGG	EPA2@-957bpFw
306	CTGTAAATGATCACAAGAGAGTC	EPA2@-1000bpRv
307	CGC <b><u>GGATCC</u></b> ATCTCAATAATTTTCATGTATGA TGGC	EPA2@+1bpBamHI Fw
308	CAAG <b><u>GAGCTC</u></b> AAAGTTGAAAACCAAATTCTG TTGG	EPA2@+945bpSacI Rv
309	CGG <b><u>CTCGAG</u></b> AAAATGCCACAATTTGGTATAT TATG	FLP@1bpXhoIFw
310	CGC <b><u>GGATCC</u></b> TTATATGCGTCTATTTATGTAG GATG	FLP@1272bpBamHI IRv
<b>Marcaje con epitopes</b>		
3	TTGCGGCATACTCTATTGGTG	SKN7@+1066Rv
6	GTGGAGAAGATAGCACACTCATG	SKN7@-962Fw
9	GAATACTGGCAATAGCAGCAGAG	YAP1@-933Fw
10	TGGCTAAGCTTGAACTTTTTCG	YAP1@+973Rv
15	CGATAAGAGGCCACGTGCTTTATG	P-PGK Rv out

16	AGAAATACGCACGAACACGATATAGAGG	3'UTRHIS3 Fw out
277	TCATGGAAGTAGTGAAATACAGTCG	MSN2@+609Rev
282	TATCAGTCGCCATTGACACC	MSN2@18pbFw
284	ATCGGGAACCAACTCAACC	MSN4@158pbFw
351	GCG <u>AGATCT</u> CTATGAATTAAGACATAACATC AAGTCCC	CTA1@+290bpBglII Rv
412	GCCAAGCTTGACAGTGTTCCCTTATTTTATCT AGTTG	MSN2@+1HindFw
413	GCGGGTACCGTGCAGTGTCTGCAACAAAAT TATACAAGAA	MSN2@+697 KpnBsgRv
414	GCGGAGCTCTCTTCTCACAAAATAGACAAC G	MSN2@682SacFw
415	GCGGGATCCTTTCTTTAGTTGTGGAAGTACT TCCC	MSN2@1621BamH Rv
416	GCGAAGCTTTTAAAGTCTCGAGCCATTCTTT A	MSN4@+1HindFw
417	GCGGGTACCTTACAGCAGTTAATGATTGGG	MSN4@+884KpnRv
418	GCGACTAGTGGCAGCAGAAGAGTCAG	MSN4@686SpeFw
419	GCGGGATCCTAAAGTCTCCGTGTCTTTTATG TG	MSN4@1668BamH Rv
420	GCCAAGCTTTTGCATCTCTAACTAGTATTTT ATTCC	SKN7@+1HindFw
421	GCGGGTACCTGAACTAAAAGTGTACGCAAG G	SKN7@+687KpnRv
422	GCGGAGCTCCACATACCTACAACACGGAAT G	SKN7@1476SacFw
423	GCGAGATCTTCGTATGTTGCTTCTTAAATGC AG	SKN7@1893BglRv
424	GCGAAGCTTTCACCTGTCTATATTATCTCGG TAGA	YAP1@+1HindFw
425	GCGGGTACCGTGCAGGAACTTTTTCGATTAC AGTTTCAATG	YAP1@+964KpnBs gRv
426	GCGGAGCTCGTGCAGGGGATTCGGTGATAA CTTGT	YAP1@723SacBsg Fw
427	GCGGGATCCTAGACATGTGCTTATTTAAAGC AAC	YAP1@1767BamH Rv
805	CACCATGACACATTGCACTAC	MSN4@+782pbRv
<b>Pruebas de Funcionalidad RT-PCR</b>		
278	AGAGATATCAAATGACGGTAGCC	SKN7@131bp Fw
279	GTCACCGGTATTTGACCATC	SKN7@303bp Rev
280	AACAGGGCTGCGCAGAAGG	YAP1@103bp Fw
281	CGTCTCTGGTCTGTACTTCCGC	YAP1@276bp Rev
282	TATCAGTCGCCATTGACACC	MSN2@18bp Fw



<b>283</b>	GAGTTGGTCGTGGTCGTG	MSN2@192bp Rev
<b>284</b>	ATCGGAACCAACTCAACC	MSN4@158bp Fw
<b>285</b>	GCAGCTTAGGCAGCGTAGC	MSN4@345bp Rev
<b>Coinmunoprecipitación de la cromatina ChIP</b>		
<b>1726</b>	AGCACTTGCGAGATGAGACTCC	GPX2 RI Fw-ChIP
<b>1727</b>	GGAGTTAATAAAGCAGCCTCCG	GPX2 RI Rev-ChIP
<b>1728</b>	TGTAAC TTTGCACTTTGCACCC	TRR2 RI Fw-ChIP
<b>1729</b>	CGAAAGATTGAAGTTCTCTTCG	TRR2 RI Rev-ChIP
<b>1730</b>	CGGAACTCATAACCAATAGCTCG	cgCEN B Fw-ChIP
<b>1731</b>	GGAATATACTTCCAACGAATTC	cgCEN B Rev-ChIP
<b>1732</b>	GCAGAAGTGTAGGAATCCCAGC	ACT1-522Fw-ChIP
<b>1733</b>	GGCCAGGGCTTCTCAGTTAG	ACT1-343Rev-ChIP
<b>1734</b>	CTTGCCAAGAGAGAGGTTTCATTC	EPA2-996Fw-ChIP
<b>1735</b>	GTAGGTAAAGATTGACATGCGCA	EPA2-750Rev-ChIP
<b>1736</b>	ATTACCCATGGAGAGAAAGCACC	EPA2-1234Fw-ChIP
<b>1737</b>	TCGAAAGCTGTCTGCTCTATCCC	EPA2-1028Rev-ChIP
<b>1738</b>	GATTGGCAGTCTCGACCGTTTC	EPA2-2010Fw-ChIP
<b>1739</b>	CCAAAGATTTGCATAATTGTACCA	EPA2-2104Fw-ChIP
<b>1740</b>	GGTGGAGCCGTCTTCTTGAA	EPA2-1740Rev-ChIP
<b>1741</b>	CAAAAGTAAGGGTTAAACCATGATG	EPA2-2509Fw-ChIP
<b>1742</b>	CCTTGTCATGGTAACGTATATTG	EPA2-2295Rev-ChIP
<b>1743</b>	CTATCTTCCCCTTTGTGCATGC	EPA2-2920Fw-ChIP
<b>1744</b>	CCCCTTAAAGCACAAATTATACAG	EPA2-2765Rev-ChIP
<b>1745</b>	CTGAAGACATTAGTACTCCATCCC	EPA2-3849Fw-ChIP
<b>1746</b>	GGGATGGATTATACAACTGGGT	EPA2-3527Rev-ChIP
<b>1747</b>	GTAAACAGTCAATCCAATGCCG	EPA2-5352Fw-ChIP
<b>1748</b>	CAAGTACCAAATTTTCGAATGATT	EPA2-4934Rev-ChIP

#### 4. Kits comerciales

Para aislar el ADN plasmídico de cultivos bacterianos, se usó el kit QIAprep o Promega®. La extracción de ADN de geles de agarosa se realizó con el kit *Gel Extraction QIAquick* y el *PCR Purification QIAquick* para la purificación de productos de PCR. Todos ellos de la marca comercial QIAGEN® o Promega®. Se siguieron las indicaciones del proveedor.

## **5. Transformación de *E. coli***

### **Electroporación**

Se utilizaron cepas electrocompetentes DH10B (Tabla 1). La mezcla de una alícuota de células electrocompetentes con ~20-50ng del ADN a transformar, se transfirió a una celda de electroporación de 1mm (BIORAD®). Con un electroporador (Gene Pulser Xcell Electroporation System [BIORAD®]), se le aplicó un pulso eléctrico (1800V, 200mA, 50F) e inmediatamente después, las células se resuspendieron en 600µL de medio SOC frío y se incubó la transformación en hielo aproximadamente por 3 min. Se incubó después con agitación constante a 30°C por una hora. Al término de la recuperación, se sembraron alícuotas en cajas de LB-Cb50 o LB-Sac y se incubaron 24hrs a 30°C.

El diagnóstico de las construcciones se hizo por PCR de colonia. Una vez confirmadas se resguardaron dos colonias independientes en glicerol al 10% a -80°C. Los plásmidos se extrajeron mediante los kits comerciales *QIAprep* o Promega, y se analizó el patrón de restricción con endonucleasas para confirmar la presencia del inserto. Todas las enzimas de restricción utilizadas en este trabajo son de New England BioLaboratories®.

## **6. Purificación de ADN con fenol:cloroformo:alcohol isoamílico y precipitación con etanol**

Para eliminar proteínas y sales, la muestra de ADN a purificar se llevó a un volumen final de 100µL con agua miliQ y se le añadió acetato de amonio a una concentración final de 2.5 M. Se agregó un volumen equivalente de Fenol:Cloroformo:Alcohol Isoamílico (Fluka Biochemicals®) (24:24:1) y se agitó vigorosamente. Por centrifugación se separó la fase acuosa y se transfirió a un tubo limpio en donde se le adicionó 1µL de glicógeno (Roche®). Inmediatamente después se agregaron 2.5 volúmenes de etanol frío al 100% y se precipitó el ADN a -20°C por 20 min. Se concentró el ADN por centrifugación, se descartó el sobrenadante y se lavó con etanol al 70%. Se retiraron los remanentes de etanol y

se aplicó calor para secar la pastilla. Finalmente el ADN se resuspendió en 20-30 $\mu$ L de Tris 10mM.

## **7. Transformación genética de *C. glabrata***

Para transformar genéticamente a *C. glabrata* con ADN lineal o superenrollado se utilizó una modificación del método de transformación con acetato de litio (LiAcO) (Gietz *et al.*, 1992). Cada cepa a transformar se creció en medio YPD durante la noche. Al día siguiente, se transfirieron 0.3mL de este inóculo a 30mL de YPD fresco (dilución 1:100) y se incubó con agitación hasta alcanzar una OD<sub>600nm</sub> de 0.8-1.0. Las células se colectaron por centrifugación y se lavaron con un volumen equivalente de agua estéril (25-30mL). Posteriormente se concentraron 100 veces en LiAcO 100mM y se dividieron en alícuotas de 50 $\mu$ L c/u. Para cada transformación, a una alícuota de células se le añadieron 240 $\mu$ L de polietilenglicol 50% Fluka Biochemica<sup>®</sup> (PM 400) (concentración final ~30%), 36 $\mu$ L de LiAcO 1M (concentración final ~90mM), 25 $\mu$ L de ADN acarreador de cadena sencilla (Invitrogen<sup>®</sup> 2mg/mL) desnaturalizado por calor (concentración final ~125ng/ $\mu$ L) y el ADN a transformar (350-500ng), resuspendido en un volumen de 50  $\mu$ L de Tris 10mM. La mezcla se incubó a 30°C por 45min a 1 hora, después se le agregaron 43 $\mu$ L de DMSO y se sometió a choque térmico por 15min a 42°C. Por último, las células se centrifugaron para retirar el PEG y dependiendo del tipo de selección a realizar, se resuspendieron en agua o en medio YPD. Para la selección de transformantes que complementen la auxotrofia por uracilo, las células fueron resuspendidas en 600 $\mu$ L de agua y se sembraron en dos cajas con medio CAA; una con 50 $\mu$ L de la suspensión y otra con 100 $\mu$ L. Para la selección con higromicina se resuspendieron en 1mL de YPD y se incubaron al menos 4hrs a 30°C. Al término de este período, se sembraron 100, 200 y 300 $\mu$ L en cajas con medio YPD-Hyg. Todas las cajas se incubaron a 30°C, al menos durante 48 horas. Se eligieron en promedio 10 colonias de cada transformante y se purificaron dos veces en medio de selección adecuado (CAA o YPD-Hyg). Se estrilaron en medio YPG para analizar su capacidad de utilizar glicerol como fuente de carbono no fermentable y de este modo descartar que hayan presentado mutaciones que

alteraran su función mitocondrial (*petit*). Posteriormente se extrajo ADN genómico y se diagnosticó por PCR la modificación genética correspondiente. En el caso de la recombinación en dos pasos, las clonas confirmadas para la integración del DNA en el cromosoma, se resolvieron en YPD haciendo 4 o 5 pases, y se sembraron en cajas con YPD. Cuando aparecieron colonias se hizo replica a las cajas correspondientes en cajas de 5FOA donde las células Ura<sup>+</sup> no crecen en este medio. Las segregantes se diagnosticaron para la modificación genética correspondiente.

Las cepas se conservaron en glicerol al 15% a una temperatura de -80°C.

## **8. Extracción de ADN genómico de *C. glabrata***

Las cepas de interés se cultivaron de 12 a 24 horas en YPD o CAA. Las células se colectaron por centrifugación y se resuspendieron en 500µL de amortiguador A [Tris 0,05M, EDTA 0,01M, NaCl 0,15M, Triton 1% (Caledon Labs<sup>®</sup>) y SDS 1% (Fluka Biochemicals<sup>®</sup>)]. Se añadió un volumen equivalente de fenol:cloroformo:alcohol isoamílico de Fluka Biochemicals<sup>®</sup> [24:24:1] y se incubó a 44°C por 30min, con agitación ocasional y vigorosa. Se centrifugó y se recuperó la fase acuosa, a la cual se le agregó 50µL del amortiguador A sin detergente con 3 IU de RNasa (AMBION<sup>®</sup>), y se incubó por 30min a 44°C. Para precipitar el ADN se añadieron 15µL de NaCl 5M y un volumen de etanol frío al 100%. El ADN se lavó con etanol al 70% y una vez seco se resuspendió en 250µL de TER (Tris10mM con 3 IU de RNasa).

## **9. Ensayos de sensibilidad**

### **9.1. Exposición crónica**

Se crecieron preinoculos de las cepas de *C. glabrata* durante una noche (12 hrs) en medio YPD a 30°C con agitación constante. Se inocularon en medio fresco YPD y el cultivo se incubó a 30°C durante 48 hrs para llevar el cultivo en fase estacionaria. Las células se lavaron con agua estéril y se ajustó la densidad celular a  $1 \times 10^7$  células/mL ( $OD_{600nm}=0.5$ ). Se hicieron diluciones logarítmicas en

una placa de 96 pozos y 5 $\mu$ L de cada dilución se colocaron por medio del replicador en cajas con medio YPD con diferentes concentraciones de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Las cajas se incubaron a 30°C por 48 horas. Se tomaron fotografías a las 48 y 72 hrs posteriores.

### **9.2. Exposición aguda (Ensayo de adaptación a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)**

Las diferentes cepas de *C. glabrata* se crecieron en medio YPD a 30°C durante una noche (12hrs). Se inocularon en medio fresco YPD y el cultivo se incubó a 30°C durante 36 horas para utilizar el cultivo para inocular la fase logarítmica, después se diluyeron en medio YPD fresco y se crecieron por 7 duplicaciones hasta que alcanzaron una densidad celular de 1x10<sup>7</sup> células/mL (OD<sub>600nm</sub>=0.5). Otros se incubaron por 48 hrs para llevar el cultivo en fase estacionaria. Se centrifugo el total del cultivo, se midió el volumen del medio usado y se inoculo a una OD<sub>600nm</sub> de 0.5. Las células se expusieron a la concentración de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> indicada por 3 hrs. Para los experimentos de adaptación, las células se pretrataron con una dosis subletal de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> durante 1 hr, se añadieron diferentes dosis letales y se incubaron por 2 hrs más. El H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> se removió por centrifugación. Las células se lavaron con agua estéril y se ajustó a una densidad celular de 1x10<sup>7</sup> células/mL (OD<sub>600nm</sub>=0.5). Se hicieron diluciones logarítmicas en una placa de 96 pozos y 5 $\mu$ L de cada dilución se colocaron mediante el replicador en cajas con medio YPD. Las cajas se incubaron a 30°C por 48 horas. Se tomaron fotografías a las 48 y 72 hrs posteriores.

### **10. Ensayos de crecimiento en medio 5-FOA para analizar el silenciamiento**

Para medir el silenciamiento (expresión de *URA3*) se realizaron ensayos de crecimiento de las distintas cepas en medio 5-FOA. Las cepas transformadas fueron crecidas hasta fase estacionaria durante 48 horas a 30°C. Los cultivos se ajustaron a una densidad óptica a 600nm (OD<sub>600nm</sub>=1) con agua destilada y se hicieron diluciones logarítmicas seriadas en agua estéril (10<sup>-1</sup> a 10<sup>-5</sup>) en multiplacas de 96 pozos. Finalmente se gotearon por duplicado en tres diferentes

medio sólidos de crecimiento: YPD, CAA (sin uracilo), 5-FOA y 5-FOA+H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Cuando existe una alta expresión de URA3 en presencia del compuesto 5-FOA, se produce un compuesto tóxico para la célula, de modo que el crecimiento en este medio correlaciona directamente con el nivel de silenciamiento.

### **11. Ensayo de viabilidad**

Los experimentos de viabilidad se hicieron como se ha descrito previamente con algunas modificaciones mediante el equipo Bioscreen C (MURAKAMI *et al.* 2008). Las cepas de interés se crecieron durante 1 noche a 30°C en medio YNB y CAA, posteriormente se hizo una dilución 1:100 del cultivo en agua estéril y se ajustó la densidad celular a una OD<sub>600nm</sub> de 0.01 (1x10<sup>5</sup> células/mL) en medio YPD. A los 1, 2, 3, 4, 6, 8, 10 y 15 días, se tomaron 300µL de cada suspensión celular y se colocaron en microplacas colmena de 100 pozos por triplicado para analizar el crecimiento a 30°C en agitación constante a una OD<sub>600nm</sub> en el equipo BIOSCREEN C (Growth Curves Ab Ld) durante 24 horas. Se tomaron lecturas cada 15min. A cada valor se le resta la lectura blanco respectivo (el medio de cultivo sin levadura) y se determinó el tiempo de duplicación usando la pendiente de la curva semilogarítmica de la OD en función del tiempo. El tiempo 0 correspondió al día 1 de crecimiento. La sobrevivencia para cada cepa se calculó con la fórmula:

$$v_n = 1/2(\Delta t_n / \delta)$$

Donde  $v_n$  es la viabilidad en un punto  $n$ ,  $\Delta t_n$  es la diferencia en tiempo en las curvas de crecimiento al tiempo  $n$  con respecto al tiempo 0 (1 día) en una OD<sub>600nm</sub> de 0.5 y  $\delta$  es el promedio del tiempo de duplicación calculado para cada cepa en cada día del experimento. Los valores  $v_n$  se graficaron para cada cepa para cada día a lo largo del experimento (MURAKAMI *et al.* 2008).

### **12. Reconstitución del gen *URA3* en las cepas mutantes**

Para la reconstitución del gen *URA3* se utilizó el plásmido pBC34.1 que contiene el gen *URA3* silvestre con regiones de homología y se dirigió con *Pst1*; ya que se

tiene una delección del gen *URA3* e inserción del gen que confiere resistencia a Geneticina. Se seleccionó en cajas de CAA (sin uracilo), se purificó y se sembró en cajas de YPD-geneticina para asegurarse de la pérdida de la resistencia y reconstitución del gen *URA3*. Se realizó PCR para verificar la reconstitución.

### **13. Medición de la fluorescencia de la proteína verde fluorescente (GFP) por citometría de flujo**

Para el análisis de la expresión de *EPA2* por medio de GFP. Las cepas se incubaron en medio CAA sin uracilo a 30°C por 48 hrs. Posteriormente se diluyeron en medio fresco CAA sin uracilo (100µl del medio saturado en un volumen de 10 mL) y se trataron las células con 15mM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Cada 2 horas se colectó 1mL de células, se retiró el oxidante por centrifugación y la pastilla se resuspendió en 1ml de agua miliQ. La fluorescencia de los cultivos se midió cada 2 hrs en el citómetro de flujo Beckman COULTER c EPIC ALTRA con Cell Sorting (Coulter Corporation Inc, Miami, FL. USA) con filtros ópticos estándar de 525/540, 560 y 570 nm de longitud de onda, un láser de argón de 1.5mW que excita a 488nm. Las señales fueron captadas mediante un fotodiodo con un factor de amplificación de 10 en escala logarítmica en la gráfica PMT3, la GFP se detecta en un rango de 515nm a 545 nm. El rayo láser excita al fluoróforo FITC a una longitud de onda de 525 nm para detectar GFP. Los datos fueron procesados y analizados mediante el software Expo32 Multicomp (Coulter Corporation).

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

#### **14. Cuantificación de ADN y ARN**

El ADN y el ARN se cuantificaron por espectrometría utilizando el equipo NANODROP 2000 (ThermoScientific®).

#### **15. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)**

Para la amplificación de productos nucleotídicos destinados a clonación o secuenciación se utilizaron las enzimas ADN polimerasa *Taq* Platinum (Invitrogen®), Expand Long Template PCR System (Roche®) y iProof High-Fidelity ADN Polymerase (BioRad) (amplificación de fragmentos mayores a 4Kb) de acuerdo a las condiciones sugeridas por el fabricante.

Para las reacciones de diagnóstico de modificaciones genéticas, ya fueran a partir de ADN genómico o de una colonia bacteriana, se utilizó la enzima ADN polimerasa *Taq* Amplificasa® BIOGENICA de la UNAM y iProof High-Fidelity ADN Polymerase (BioRad) (amplificación de fragmentos mayores a 4Kb) de acuerdo a las condiciones sugeridas por el fabricante.

La amplificación de los productos de PCR se detectó por electroforesis en geles de agarosa (0.8, 1 o 2 %) teñidos con bromuro de etidio.

#### **16. RT-PCR punto final**

Las diferentes cepas de *C. glabrata* se crecieron en medio SC a 30°C durante una noche (12 hrs). Se inocularon en medio fresco SC y los cultivos se incubaron a 30°C durante 36 horas, posteriormente se utilizaron los cultivos para inocular la fase logarítmica, después se diluyeron en medio SC fresco y se crecieron por 7 duplicaciones hasta que alcanzaron una densidad celular de  $2 \times 10^7$  células/mL ( $OD_{600nm}=1.0$ ). Otros se incubaron por 48 hrs para llevar a los cultivos a fase estacionaria y después se diluyeron en medio usado a una densidad celular de  $2 \times 10^7$  células/mL ( $OD_{600nm}=1.0$ ). Los cultivos se expusieron sin y con diferentes concentraciones de una solución de  $H_2O_2$  [35% (wt/wt)] (Sigma-Aldrich®) y a diferentes tiempos de exposición.

El RNA de las células en fase logarítmica y estacionaria se extrajo con el reactivo Trizol de Invitrogen® de acuerdo con las instrucciones del fabricante y se trató con



DNAsa I de Sigma-Aldrich<sup>®</sup>. La síntesis de cDNA y la reacción de PCR se llevó a cabo con Access Quick reverse transcription-PCR (RT-PCR) system de Promega<sup>®</sup>. Los oligonucleótidos para la reacción de transcriptasa reversa (RT) se describen en la Tabla 3 [*EPA2* #779 (AATAGCTGGTAAAGTCATGAATGA); *ACT1*#220 (CTTGGATTGAGCTTCGTC)].

La síntesis de cDNA se llevó a cabo a 45°C durante 20 min. Para la reacción de PCR se utilizaron los oligos *EPA2* #778 (TGTTAAGTGGTAATCTTCCAAGC), *ACT1* #219 (CGCCGGTGACGATGCTCC) y se utilizó una temperatura de alineamiento de 50°C para *ACT1* y 55°C para *EPA2* durante 25 ciclos. Una mezcla de reacción sin transcriptasa reversa se incluyó como control negativo para descartar contaminación por DNA. Posteriormente se realizó un análisis semicuantitativo en el que se cuantificó los píxeles de las bandas en el programa Quantity One<sup>®</sup> y se normalizó con la expresión de la cepa silvestre (wt), determinando la expresión relativa de las demás cepas. Se realizaron tres experimentos independientes.

### **17. RT-qPCR (PCR cuantitativa)**

Las diferentes cepas de *C. glabrata* se crecieron en medio SC a 30°C durante una noche (12 hrs). Posteriormente se inocularon en medio fresco SC y los cultivos se incubaron a 30°C durante 48 hrs para llevarlos a fase estacionaria y después se diluyeron en medio usado a una densidad celular de  $2 \times 10^7$  células/mL ( $OD_{600nm}=1.0$ ). Los cultivos se expusieron sin y con 10mM de una solución de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> [35% (wt/wt)] (Sigma-Aldrich<sup>®</sup>) durante 30min a 30°C. El RNA de las células en fase estacionaria se extrajo con el reactivo Trizol de Invitrogen<sup>®</sup> de acuerdo con las instrucciones del fabricante y se trató con DNAsa I de Roche<sup>®</sup> para eliminar el DNA genómico. La síntesis de cDNA se llevó a cabo usando la enzima SuperScript<sup>®</sup> II transcriptasa reversa y se utilizó el oligonucleótido reverso para cada gen (Tabla 3) a 42°C por 50 min. El qPCR se realizó usando el Fast SYBR<sup>®</sup> Green Master Mix (Invitrogen<sup>®</sup>) en el equipo ABI 7500 Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems). Los oligonucleótidos reverso y forward usados para la RT-qPCR fueron diseñados por el software primer express 3.0 (Tabla 3, *ACT1*

#219 and 977, EPA2 #1268 and 1269). El gen *ACT1* se utilizó como control interno de normalización y el método threshold cycle ( $2^{-\Delta\Delta Ct}$ ) para calcular las diferencias en la expresión génica. Los experimentos fueron realizados por triplicado y se realizaron tres extracciones independientes de RNA. Se realizó el análisis estadístico de ANOVA de una vía con el programa GraphPad Prims v5.0a. Se usó la prueba de Dunnett's Multiple Comparison Test para comparar entre grupos de columnas. El valor de P fue calculado por la post-prueba Newman-Keuls multiple comparisons. Un valor de P value  $\leq 0.05$  fue considerado significativo.

### **18. Cultivo de macrófagos**

La línea celular de macrófagos M $\phi$ J774.A1 (American Type Culture Collection, Manassas, VA) fue cultivada, subcultivada y cosechada según las recomendaciones de la American Type Culture Collection. Se mantuvo en medio DMEM (Advanced DMEM, Gibco<sup>®</sup> BRL) suplementado con 0.1mg/ml de gentamicina, 2% L-glutamina and 5% de suero fetal bovino (FBS) (HyClone, Thermo Scientific<sup>®</sup>) a 37°C en una atmosfera de 5% CO<sub>2</sub>. Previo a los ensayos, las células fueron cosechadas y lavadas con solución de Hank's (HBSS) (Gibco<sup>®</sup> BRL), después fueron sembradas a  $2 \times 10^5$  células por caja y se les agrego medio fresco DMEM suplementado. Las células se mantuvieron hasta un 80% de confluencia. El crecimiento de las células fue monitoreado diariamente y el medio se cambió cada dos días. Las células se contaron usando el hematocitometro.

### **19. Ensayo de infección con macrófagos**

La línea celular de macrófagos M $\phi$ J774.A1 fue sembrada en placas de 24 pozos a una densidad celular de  $2 \times 10^5$  cels/pozo. Después de incubarse a 37°C por 24 hrs, se le adiciono medio fresco DMEM suplementado sin y con 10 ng/ml de IFN $\gamma$  (Sigma-Aldrich) y 1 $\mu$ g/ml de LPS 111:B4 y las células fueron incubadas por otras 48 hrs. Posteriormente las células fueron estimulada sin y con 100 $\mu$ g/ml de Bz-ATP por 10 min. Las cepas de *C. glabrata* se crecieron en medio SC hasta fase estacionaria (48 hr), después fueron lavados con agua estéril y se les adiciono

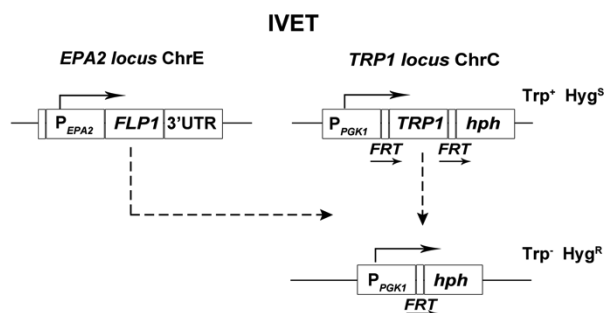
DMEM suplementado. Las levaduras de *C. glabrata* se agregaron en una proporción 5:1 con respecto a los macrófagos e incubadas a 37°C por 2 hr. Enseguida la fagocitosis fue visualizada usando un microscopio invertido de epifluorescencia con una longitud de onda 395/509 nm excitación/emisión (Nikon TE2000, Melville, NY, USA) con un objetivo de fluorescencia a 40X para una amplificación final de 400X. Las imágenes fueron capturadas con la cámara Hamamatsu usando el software Imaging Workbench (INDEC Biosystems, Santa Clara, CA, USA). Como controles de fluorescencia de levaduras, las cepas de *C. glabrata* fueron expuestas con 2 y 5 mM de una solución de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> [35% (wt/wt)] (Sigma-Aldrich®) durante 2 hr.

## 20.IVET (Tecnología de Expresión In Vivo)

Para determinar dónde se expresa y cuál es la participación de *EPA2* in vivo construimos una cepa donde reemplazamos el ORF de *EPA2* del cromosoma con el ORF de *FLP1* que codifica una recombinasa de sitio específico. La cepa mutante generada tiene el locus de *TRP1* modificado, río arriba el promotor *PGK1* y río abajo el gen *hph* (*Klebsiella pneumoniae*) que codifica para una fosfotransferasa que inactiva al antibiótico higromicina B a través de su fosforilación y confiere resistencia a higromicina, y sitios *FRT* (secuencias repetidas directas) que flanqueen en el gen *TRP1* (Figura 1). Esta cepa tiene el fenotipo Trp<sup>+</sup>/Hyg<sup>S</sup> y es la que se usó en un modelo murino. Si hay alguna señal que active el promotor de *EPA2*, se inducirá la transcripción de *FLP1* que reconocerá los sitios *FRT* que flanquean el locus *TRP1* y este locus se escindirá, quedando el gen *hph* bajo el promotor *PGK1* y la cepa será Trp<sup>-</sup>/Hyg<sup>R</sup>. La proporción de colonias resistentes a higromicina (antes sensibles) que se recuperen del ratón después de la infección reflejará la expresión del gen de interés.

Se utilizaron 8 ratones Balb/c hembras de 8 a 9 semanas por cada cepa de *Candida glabrata*, la cepa parental CGM1135 y la cepa CGM1137 *epa2Δ::FLP1* ambas modificadas en el locus de *TRP1*. Previamente a la inoculación se crecieron las

cepas a 30°C por 12 hr en medio SC, después se adicionó 50µl del preinoculo inicial en medio SC y se dejaron crecer a 30°C por 48 horas. Posteriormente se midió la OD<sub>600nm</sub>, se tomó la cantidad necesaria de cultivo para tener 2x10<sup>7</sup> células en 100µl de PBS estéril y se infectó a los ratones a través de la vena de la cola. Los ratones se expusieron previamente a una lámpara por 15 min, este proceso nos ayudó a dilatar las venas del ratón y minimizar el dolor de la inoculación. Ese mismo día se plaqueó el INPUT de células en YPD con triptófano, penicilina, y estreptomicina (mediante diluciones seriadas). Los ratones se monitorearon una vez al día durante seis días y al séptimo día todos los ratones se sacrificaron por dislocación cervical. Se obtuvo el hígado, bazo y riñones de cada ratón, se homogenizó cada órgano con 1ml de PBS, se realizaron diluciones seriadas y se plaquearon en cajas de YPD con triptófano, penicilina y estreptomicina, incubándose por 48 horas a 30°C. Después de ese tiempo se contara las unidades formadoras de colonias (UFC) y el resultado se expresó en UFC/ órgano. Para evaluar la resistencia de las colonias a higromicina, se realizaron dos replicas consecutivas de las colonias obtenidas de las placas de YPD con triptófano, penicilina y estreptomicina en placas que contienen YPD con higromicina y triptófano, se incubaron por 24 horas a 30°C y se contaron las unidades formadoras de colonias (UFC) para determinar la proporción de colonias Hyg<sup>R</sup>. Las diferencias entre los grupos de los ensayos in vivo fue determinada vía paramétrica y no paramétrica usando t-student test y Mann Whitney U test para los datos no pareados.



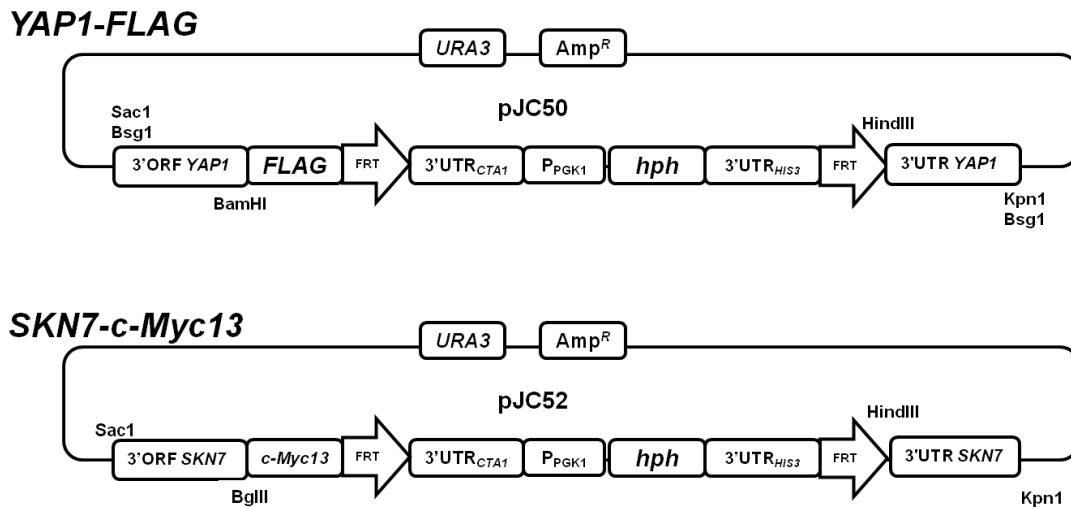
**Figura 3. Tecnología de Expresión In Vivo en *C. glabrata* (IVET).** La cepa mutante a evaluar presentara el fenotipo Trp<sup>+</sup>/Hyg<sup>S</sup> y se inoculara en ratones. Si in

vivo hay alguna señal que encienda el promotor de *EPA2*, se inducirá la transcripción de *FLP1* que reconocerá los sitios *FRT* que flanquean el locus *TRP1*, este locus se escindiría, quedando el gen *hph* bajo el promotor *PGK1* y la cepa mutante será  $\text{Trp}^-/\text{Hyg}^S$ . La proporción de colonias resistentes a higromicina (antes sensibles) que se recuperen de los órganos blancos después de la infección reflejarán la expresión del gen de interés en los órganos.

## **21. Clonación de productos de PCR y construcción de fusiones traduccionales *MSN2*, *MSN4*, *SKN7* y *YAP1* con FLAG o c-Myc13**

Se construyó una serie de vectores para realizar fusiones traduccionales con los genes *YAP1*, *SKN7*, *MSN2* y *MSN4* con los epítopes FLAG (epítipo hidrofílico dependiente de enterocinasa) y *c-myc13* (proteína nuclear asociada a tumores humanos).

Para construir estas proteínas etiquetadas, primero se clonaron en p-GEM o en pMB11 la región terminal del 3' del ORF de *MSN2*, *MSN4*, *SKN7* y *YAP1* y la región 3' no traducible (3'UTR) de cada uno de estos genes. Cada uno de estos fragmentos se subclonaron en sitios específicos, en los plásmidos con los epítopes FLAG (pGE40) y c-Myc13 (pOZ18). Los genes fusionados usan como terminador el 3' UTR de *CTA1*. Estos plásmidos llevan además el marcador de resistencia a higromicina ( $P_{PGK1}::hph::3'UTR_{HIS3}$ ) flanqueado por las secuencias repetidas directas *FRT* que reconoce la recombinasa Flp1 de *S. cerevisiae*. En la Figura 2 se muestra un ejemplo de las fusiones traduccionales.



**Figura 4. Diagrama esquemático de los vectores para fusiones traduccionales**

La transferencia de las diferentes fusiones en los plásmidos al cromosoma respectivo, se realizó por doble recombinación homóloga. Los vectores se cortan en los sitios diseñados para cada vector dejando extremos homólogos y se transforma la cepa de *C. glabrata*, seleccionando las colonias transformantes resistentes a higromicina. Una vez obtenidas las colonias transformantes, el reemplazo correcto se comprobó mediante PCR. Para este diagnóstico, se emplearon oligonucleótidos específicos, que alinean tanto dentro de la construcción, como en las regiones endógenas de *MSN2*, *MSN4*, *SKN7* y *YAP1* pero no presentes en el plásmido, integración en los extremos 5' y 3', así como la construcción completa en el cromosoma. Posteriormente se realizaron la eliminación del casete de resistencia a higromicina que permitió marcar otro gen en esta misma cepa, con la finalidad de tener cepas con dos genes marcados (por ejemplo, *MSN2::FLAG* con *MSN4::MYC*, *SKN7::FLAG* con *YAP1::MYC* y otras posibles combinaciones). Después se verificó la funcionalidad de las proteínas etiquetadas, mediante goteos y RT-PCR. Las cepas funcionales se utilizaron en ensayos de inmunodetección.

## **22. Preparación de extractos de levadura y ensayos de Western blot**

Las cepas de interés se crecieron hasta alcanzar una  $OD_{600nm}$  de 1.0. Posteriormente, las células se colectaron mediante centrifugación rápida en frío. El pellet se lavó y se resuspendió en buffer de lisis (Tris 50mM, EDTA 5mM, NaCl 250mM, 0.1% de NP-40 Fluka<sup>®</sup> Biochemika). Se le adicionó inhibidores de proteasas [C.b.p. volumen deseado, 1 tab/100ml (Sigma Fast<sup>®</sup>)], AEBSF 2mM, EDTA 1mM, Bestatin 130 $\mu$ M, E-64 14 $\mu$ M, Leupeptin 1 $\mu$ M, Aprotinin 0.3 $\mu$ M, ditiotritol 1.5 mM (PlusOne DTT, Amersham Biosciences<sup>®</sup>) y Complete R 1X. A la suspensión se le añadió un volumen igual de perlas de zirconio [0.5 mm Zirconia Silica Beads (BioSpec Products Inc<sup>®</sup>)] y las células se rompieron utilizando el vórtex por un minuto y después de coloca otro minuto en hielo. Este procedimiento se repite 20 veces. Las perlas y los restos celulares se removieron por centrifugación a 15000 rpm por 30 min a 4°C. El extracto de proteínas solubles se cuantifico por el método de Bradford (BRADFORD 1976). La concentración de las proteínas de los extractos celulares se midió a una  $OD_{280nm}$ . Posteriormente se divide en varias alícuotas de 30 – 50  $\mu$ L en tubos para PCR, se rotularon y se resguardaron a -80°C. La fracción insoluble que queda en el tubo, se lava con 400  $\mu$ L del Amortiguador Salino de Fosfatos, y se centrifuga a 15 000 rpm durante 15 minutos a 4°C.

Tanto la fracción soluble como la insoluble, se analizó en geles de poliacrilamida al 10% SDS-Page. De las concentraciones calculadas en cada uno de los extractos, primeramente se realizó un tamiz de concentración de proteína, para evaluar la cantidad a cargar en los geles de poliacrilamida, utilizando inicialmente las concentraciones de 1, 10, 25, 50 y 100  $\mu$ g/ $\mu$ L. Por calidad en los geles, se optó cargar 50  $\mu$ g de proteína/ $\mu$ L

### **22.1. Cuantificación de proteínas de *C. glabrata***

El ensayo de cuantificación de proteínas se realizó con el Método de Bradford (BRADFORD 1976) en placas de plástico de 96 pozos. El reactivo de Bradford (Fermentas<sup>®</sup>), se equilibra primero a temperatura ambiente y se mezcla por

inversión antes de usarse. Se preparan estándares frescos de BSA (Sigma Aldrich®) como se muestra en la siguiente tabla, y se colocan 5  $\mu\text{L}$  en cada uno de los pozos individuales por duplicado.

Estándar [BSA] (ng/ $\mu\text{L}$ )	Volumen del stock BSA (2000 ng/ $\mu\text{L}$ )	Volumen de amortiguador para obtener 200 $\mu\text{L}$
<b>100</b>	10	190
<b>200</b>	20	180
<b>400</b>	40	160
<b>600</b>	60	140
<b>800</b>	80	120
<b>1000</b>	100	100

A cada uno de los pozos se le añadieron 250  $\mu\text{L}$  del reactivo y se mezclaron por pipeteo. Se cargó generalmente 1  $\mu\text{L}$  de la muestra a cuantificar con 250  $\mu\text{L}$  del reactivo. Cuando la cantidad de proteína era excesiva, se hacía una dilución 1:50 o 1:100, y se cargaban 5  $\mu\text{L}$  de la muestra. Luego se dejaron incubando a temperatura ambiente durante 5 minutos, y no más de 60 min.

Posteriormente, se ajusta el lector de microplacas [Microplate Manager III Benchmark Plus (BioRad®)] a 595 nm, utilizando blancos [120  $\mu\text{L}$  del reactivo de Bradford + 5  $\mu\text{L}$  de PBS pH=7,4 (Amortiguador Salino de Fosfatos)] y se miden las concentraciones tanto de las muestras como de los estándares. El programa del lector, grafica la concentración de las proteínas en función de la absorbancia de los estándares, en unidades de ng/ $\mu\text{L}$ .

Finalmente, se determina la concentración de proteína en las muestras por interpolación en la gráfica obtenida del programa. Si se hizo una dilución y se toma en cuenta el factor que se utilizó para obtener la concentración de proteína.

## **22.2 Ensayos de Western blot**

Para realizar la separación de proteínas por peso molecular en geles de SDS (SDS-PAGE), se tomaron las alícuotas correspondientes resguardadas a  $-80^{\circ}\text{C}$  y



se sometieron a tratamiento con calor en el termociclador (100°C, 10 min). Posteriormente, se llevó a cabo la electroforesis de los extractos celulares en geles de poliacrilamida (10% SDS-PAGE), en un sistema de electroforesis (BioRad<sup>®</sup>); se cargaron 50 µg de proteína/ µL en cada uno de los carriles disueltos en buffer de carga que contiene [TRIS-HCl 125Mm pH=6.8 (IBI Scientific<sup>®</sup>), glicerol 20%, SDS 4% (Ultra invitrogen<sup>®</sup>), B-mercaptoetanol 0.2% (Fischer Scientific<sup>®</sup>), azul de bromofenol 0.001% (Fisher Biotech<sup>®</sup>) y agua mQ c.b.p. 100mL). La electroforesis se llevo a acabo a 20 mA para gel concentrador, aumentando a 40 mA en el gel separador durante 4-5 horas aproximadamente, para una óptima separación de las proteínas. Así mismo se utilizaron marcadores de peso molecular de proteínas en estos geles desnaturizantes (Page Ruler Plus, Fermentas<sup>®</sup>) para la estimación del tamaño molecular de la proteínas.

Al término de la electroforesis, el gel se equilibra con Buffer de Transferencia [TB, Tris-HCl 25 mM (IBI Scientific<sup>®</sup>) Glicina 192 mM (BioRad<sup>®</sup>), Metanol 20% (Fermont<sup>®</sup>), SDS 0,02% (Ultra Invitrogen<sup>®</sup>), agua destilada c.b.p. 1 L] y se agita moderadamente por 5 minutos. Se lava una vez más con TB por 10 minutos. La membrana de PVDF (PoliVinilDenediFloride, Sequi-blot PVDF 0,2 µm, BioRad<sup>®</sup>) se equilibra con Metanol al 100% por aproximadamente 10 segundos y después se equilibra en Buffer TB. El resto de los componentes para la transferencia (dos fibras y dos trozos de papel filtro) también se humedecen con este mismo Buffer. En un recipiente de dimensiones adecuadas, se vierte el Buffer TB y se ensamblan todos los componentes para efectuar la transferencia. Cabe mencionar que es importante que todos estos componentes permanezcan húmedos, en especial la membrana de PVDF y que no existan burbujas entre las membranas y el gel de acrilamida. Ya armados todos los componentes, se colocan en la cámara de electroforesis, junto con un recipiente refrigerante (lleno de hielo) y un agitador magnético y se procede a la transferencia de las proteínas a través de un sistema electroforético, durante 12 horas a 30V, 90 mA y 4°C.

Después de la transferencia, la membrana se lavó tres veces con Buffer Tris-Salino-Tween (TTBS 1X) [Tris-HCl 20mM (IBI Scientific<sup>®</sup>), NaCl 0.5 M, Tween 0.05% (USB<sup>®</sup>), Leche en polvo 0.1 % (Svelty Nestle<sup>®</sup>) y agua c.b.p. 400 mL, durante 5 minutos cada lavado. Las membranas transferidas fueron bloqueadas mediante incubación con la solución bloqueadora (TBS 1-X-leche 3%) [Tris-HCl 20mM (IBI Scientific<sup>®</sup>), NaCl 0.5 M, Leche en polvo 3% (Svelty Nestle<sup>®</sup>) Tween 0.2% (USB R) y Agua c.b.p. 25 mL] con agitación moderada y constante durante 1.5 hr a temperatura ambiente. Luego, se lavó la membrana varias veces con Buffer Tris-Salino-Tween-leche 0.1% (TTBS 1X-leche 0.1%) tres veces por 10 minutos cada lavado.

Para la incubación con el anticuerpo primario, se usaron anticuerpos monoclonales dirigidos al epítotope con el cual se etiquetó a las proteínas en este caso se emplearon las fusiones de Msn2, Msn4, Skn7 y Yap1. Se utilizaron los anticuerpos anti-FLAG [Monoclonal Antibody Anti-FLAG M2, mouse IgG1 isotype, Sigma<sup>®</sup>] a una concentración de 2.5 µg/mL y anti-c-Myc [Monoclonal antibody Anti-c-Myc M2, mouse IgG1 isotype, Millipore<sup>®</sup>] a 1 µg/mL. El anticuerpo se resuspende en TTBS 1X-Tween 0,2%-Leche 1%, y la membrana se incuba 1,5 horas a temperatura ambiente con la dilución respectiva del anticuerpo. La membrana fue lavada tres veces con TTBS 1X-leche 0.1% durante 5 minutos cada uno, al término de la incubación, y esta se incubó con el anticuerpo secundario, [Anticuerpo policlonal, NIF825 Peroxidase labelled Anti-mouse IgG-HRP, Amersham<sup>®</sup>] dilución 1:5000 durante 1.5 horas a temperatura ambiente con agitación moderada constante. Al final de la incubación, se repiten los tres lavados de 5 minutos cada uno, con la solución de TTBS 1X-leche 0,1%.

Para el revelado, la señal inmunoreactiva se obtuvo utilizando quimioluminiscencia. Primero se prepara la solución de trabajo, mezclando partes iguales (5 mL) del reactivo de detección No. 1 (Peróxido de hidrógeno) con el reactivo de detección No. 2 (Luminol) [Pierce<sup>®</sup> ECL Western Blotting substrate

(Thermo Scientific®)]. Se utilizan 125  $\mu$ L de la mezcla por cada cm de membrana. Se incuba la membrana con la solución a temperatura ambiente durante 1 minuto; posteriormente se remueve de la solución, y se seca el exceso de líquido; luego se coloca en la superficie de una película plástica en el casete metálico de revelado (Amersham Hypercassette®), presionando cuidadosamente a la membrana con un asa de vidrio para remover las burbujas. Se tiene especial cuidado, en colocar la membrana con la superficie que contiene a las proteínas, de tal manera que este en contacto directo con la película fotosensible de revelado [Kodak®, Sigma Aldrich® (BioMax Chemiluminescence, light film)]. Se cierra herméticamente el casete metálico, y el tiempo de exposición varió de 10 minutos a 1 hora. Finalmente, se toma la película de revelado, sumergiéndola primero en la solución reveladora por 4 minutos, seguida de un lavado con agua destilada; luego, se sumerge en la solución fijadora, por otros 4 minutos, se lava con agua destilada y se deja secando para obtener el resultado.

## **23. Inmunoprecipitado**

### **Todo el procedimiento se realiza en hielo**

#### **23.1. Preparación del lisado celular**

Se inoculo 5mL de medio YPD con la cepa a analizar y se dejó crecer toda la noche en agitación constante a 30°C. Al día siguiente se diluyó el preinóculo en medio fresco y se determinó su OD<sub>600</sub>. A partir del resultado, se calculó la cantidad de volumen necesario para obtener 30mL de medio con OD<sub>600</sub>=1 tras siete duplicaciones de la levadura. Los cultivos se expusieron sin y con 50mM de una solución de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> [35% (wt/wt)] (Sigma-Aldrich®) durante 30min a 30°C. En el caso donde se utilizaron cultivos en fase estacionaria, también se calculó la cantidad de volumen necesario para obtener 30 mL de medio usado con OD<sub>600</sub>=1, enseguida los cultivos se expusieron sin y con 200mM de una solución de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> [35% (wt/wt)] (Sigma-Aldrich®) durante 30min a 30°C. Después del tratamiento se colectaron las 30 OD's<sub>600nm</sub> de células en fase de exponencial o estacionaria mediante

centrifugación a 3500rpm, por 5 min y a 4°C y se descartó el sobrenadante. Las células se lavaron con 25mL de agua helada y se centrifugaron a 3500rpm, por 8min a 4°C y se descartó el sobrenadante, este paso se repitió una vez más. Enseguida se añadió tres volúmenes de Buffer Lítico helado y tres de perlas por cada volumen de pastilla celular. La naturaleza del buffer lítico depende del antígeno en estudio. Se agito la pastilla en vortex por un minuto y después se colocó un minuto en hielo. Este procedimiento se repitió 20 veces, después se removió el lisado celular y se transfirió a un tubo limpio de 1,5mL y se le adicionó cuatro volúmenes de Buffer Lítico a las perlas vítreas, se agitó en vortex por 5 segundos y se combinó el sobrenadante con el lisado del paso previo. Enseguida se centrifugó el lisado a 15000rpm, por 30 min a 4°C y se transfirió con precaución el sobrenadante a un tubo limpio de 1,5mL. Con la finalidad de no tocar la pastilla se dejó en el tubo entre 20 y 40µL. El lisado se alícuoto en tubos de PCR y se resguardo a -80°C para su uso posterior en la inmunoprecipitación.

### **23.2. Limpieza del lisado**

#### **Preparación de la Sefarosa acoplada a proteína G (Sigma® P3296)**

Se tomó un volumen adecuado de suspensión de perlas, tomando en cuenta que se utilizaron 30µL por muestra. Se centrifugó la resina 2s a 13500rpm a 4°C para que sedimente. Se descartó el sobrenadante y se lavó con 1mL de agua desionizada para remover el etanol, el exceso de sal y el estabilizador de lactosa. Nunca se dejó que se secase la resina. Después se resuspendió la resina en 30µL de PBS helado. En un tubo de 1,5mL, se combinó 1mL del lisado celular con 30µL de la suspensión de perlas de sefarosa acopladas a proteína G al 50% y se mezcló el tubo por inversión por 30 min a 4°C y se centrifugo 5 min a 15000rpm a 4°C.

### **24. Ensayo de Coinmunoprecipitación**

#### **24.1. Agarosa anti-c-myc13 (Sigma® A7470) [Lista para usar]**

Se transfirió el lisado previamente clarificado a un tubo limpio de 1,5mL. Para evitar traer el material aclarado por las perlas, se dejó alrededor de 20 o 40µL de

sobrenadante. Se añadió de 40-100µL de la suspensión 1:1 de agarosa anti-c-Myc en un tubo de 1,5mL y se centrifugo la resina 2s a 13500rpm a 4°C para que sedimentara. Se descartó el sobrenadante y se lavó la resina 5 veces con 1mL de PBS frío. Se centrifugo 2s a 13500rpm a 4°C entre cada paso y se descartó el sobrenadante. Se añadió el extracto proteico clarificado inicial a la resina sedimentada y se llevó el volumen al menos a 200µL con buffer PBS. Se incubó hora y media en un agitador orbital a 4°C. La agitación debe ser lo suficientemente fuerte para mezclar la resina. Enseguida se centrifugó 5 seg a 15000rpm a 4°C y se recuperó el sobrenadante (que contienen a las proteínas no unidas a las perlas cubiertas de anticuerpo). (Este sobrenadante puede almacenarse a -80°C hasta por un mes y puede ser utilizado para el análisis de otros antígenos o para el análisis de proteínas totales). Se añadió 1mL de Buffer de Lavado frío y se mezcló por inversión el tubo tres o cuatro veces. Se centrifugo 2 segundos a 15000rpm a 4°C y se removió el sobrenadante, dejando ~20µL por encima de las perlas, se lavaron las perlas tres veces más. Solo se dejó las muestras en hielo unos 5 min entre cada lavado y se lavaron las perlas nuevamente utilizando 1mL de PBS helado y se removió completamente el sobrenadante. Al final quedaron alrededor de 15µL de perlas que contienen el antígeno unido. Se añadió de 20-50µL de Buffer de Muestra de SDS 2X y se calentó a 95°C por 5 min, se agito en vortex y se centrifugue a 13500rpm por 5 seg. Se cargó el sobrenadante en un gel de acrilamida, procurando no tocar la resina, la detección del antígeno se lleva a cabo por Inmunotransferencia utilizando un anticuerpo monoclonal contra *c-Myc13*.

#### **24.2. Agarosa anti-FLAG (Sigma® A2220) [La resina debe limpiarse]**

Se transfirió el lisado previamente clarificado a un tubo limpio de 1,5mL. Para evitar traer el material aclarado por las perlas, se dejó alrededor de 20 o 40µL de sobrenadante. Se resuspendió perfectamente la resina e inmediatamente después se transfirieron 40µL a un tubo de 1,5mL, se centrifugo la resina 2s a 13500rpm a 4°C para que sedimentara y se descartó el sobrenadante. La resina se lavó 2 veces con 1mL de PBS frío, se centrifugo 2s a 13500rpm a 4°C entre cada paso y se descartó el sobrenadante. Para remover cualquier resto de anticuerpo anti-

FLAG que no está unido a la resina, se lavó con 500µL de Glicina HCl 0,5M de pH 3,5. Es importante no dejar la resina en contacto con esta solución por no más de 20 min. Se descartó todo el sobrenadante y se continuó con tres lavados de 500µL de PBS frío. Se añadió el extracto proteico clarificado inicial a la resina sedimentada y se llevó a un volumen final al menos de 1mL con Buffer Lítico. Se incubó dos horas en un agitador orbital a 4°C, se centrifugó 5 seg a 15000rpm a 4°C y se recuperó el sobrenadante (que contienen a las proteínas no unidas a las perlas cubiertas de anticuerpo). (Este sobrenadante puede almacenarse a -80°C hasta por un mes y puede ser utilizado para el análisis de otros antígenos o para el análisis de proteínas totales). Se añadió 1mL de Buffer de Lavado frío y se mezcló por inversión el tubo tres o cuatro veces, se centrifugo 2 segundos a 15000rpm a 4°C, se removió el sobrenadante, dejando ~20µL por encima de las perlas y se lavaron las perlas tres veces más. Se dejaron las muestras en hielo unos 5 min entre cada lavado. Se lavaron nuevamente las perlas utilizando 1mL de PBS helado y se removió completamente el sobrenadante. Al final quedaron alrededor de 15µL de perlas que contienen el antígeno unido. Se añadió de 20-50µL de Buffer de Muestra de SDS 2X y se calentó a 95°C por 5 min. (Este procedimiento debe realizarse a temperatura ambiente y el Buffer de muestra no debe contener DTT o βME). Se agitó en vortex y se centrifugo a 13500rpm por 5 seg, se cargó el sobrenadante en un gel de acrilamida, procurando no tocar la resina y la detección del antígeno se lleva a cabo por inmunotransferencia utilizando un anticuerpo monoclonal contra FLAG.

## **25. Ensayo de Coimmunoprecipitación de la cromatina (ChIP)**

Para realizar el crosslinking se resuspenden el pellet de los cultivos en 10 ml del buffer de crosslinking (Crosslinking buffer: 50mM Hepes pH 7.4, 137 mM KCl, 1 mM EDTA) con 1% de formaldehído y se incuba a temperatura ambiente durante 15 min en agitación. Pasado el tiempo del crosslinking se adiciona 1ml de glicina 2.5 M a una concentración final 125mM y se incuba a temperatura ambiente por 5 minutos en agitación para parar la reacción. Enseguida se centrifugan los cultivos a 3000 rpm por 5 minutos a 4°C. Se lavan las células tres veces con PBS 1X

previamente enfriado a 4°C y mantenido en hielo. En la realización de cada lavado asegurarse de que las células han sido resuspendidas en su totalidad. Centrifugar cada vez a 3000rpm por 5 min a 4°C. Se transfieren las células a tubos eppendorf con 1 mL de PBS 1X previamente enfriado y mantenido a 4°C, después centrifugar por 1 minuto a 13000 rpm a 4°C y remover el sobrenadante. En este paso se puede almacenar el pellet a -80°C (no deben ser almacenadas en congelación por mucho tiempo, máximo por una semana) o continuar con el protocolo (aproximadamente 9 horas más). Si se continua el protocolo (todo en hielo), el pellet se resuspende en 1.5 ml de Buffer de lisis (1% SDS, 5 mM EDTA, 50mM Tris-HCl pH 8.1) con tabletas de inhibidor de proteasas (Roche®) y PMSF (stock 100mM en etanol, concentración final 1mM y almacenar a -20°C). Lisar las células, usar FastPrep®System a una velocidad de 6.5m/s durante 1 minuto y mantenerlo en hielo por 1 min. Repetirlo 5 veces. Enseguida sonicar hasta obtener los fragmentos deseados. Para obtener fragmentos de 200 y 400 pb se sonica con 15 pulsos o ciclos de 30 segundos cada uno (amplitud de 7-8) con un periodo refractario en hielo de 30 segundos (siempre mantener la muestra fría pero evitar que se precipite el SDS). Evitar hacer burbujas y poner la punta del sonicador casi en el fondo del tubo. Antes de continuar con los siguientes pasos del protocolo, tomar 20µl del lisado y correr un gel de agarosa al 1.5% para corroborar la eficiencia de sonicación, con el fin de comprobar que se haya obtenido fragmentos de cromatina de los tamaños deseados, en este caso los fragmentos deben tener un tamaño de 200 a 400 pb. A la par tomar 30µl del lisado y llevarlo a 100µl con agua, dejar incubar a 65°C toda lo noche. Adicionar 1 µl de RNasa (10µg/µl) por muestra e incubar a 37°C por 1 h. Después adicionar 2 µl de proteinasa K (20 µg/µl) e incubar las muestras a 65°C por 2 h, con el fin de revertir el crosslinking. Enseguida purificar el DNA de preferencia con un kit, si no utilizar fenol: cloroformo: alcohol isoamilico 25:24:1 pH 8.0 y precipitar el DNA toda la noche a -20°C, resuspender el DNA en 30µl de TE (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8.0) y cuantificar la concentración de DNA. Generalmente 100 µl de cromatina contiene entre 25-30 µg de DNA, esto es importante para ajustar la concentración de

diferentes muestras. Continuando con el protocolo, después de sonicar, centrifugar las muestras a 4°C por 10 min a 13000rpm. Recuperar el sobrenadante y guarda una alícuota de 30µl como INPUT. Incubar la cromatina soluble por 2 h a 4°C en rotación constante con 50 µl de perlas de proteína G-agarosa sin bloquear. Centrifugar a 13000 rpm por 5 min a 4°C y recuperar sobrenadante, a la cromatina soluble adicionarle los anticuerpos específicos a una concentración 4 µg/µl, anti-cMyc (Millipore®) o anti-FLAG (Sigma-Aldrich®) e incubarlos toda la noche a 4°C en rotación constante, llevar a un volumen final de 1ml con Buffer de dilución (Dilution Buffer: 1% Triton X-100, 2mM EDTA pH 8.0, 150mM NaCl, 20mM Tris-HCl pH 8.1). A la par bloquear las perlas de proteína G-agarosa con solución de bloqueo (Blocking solution 0.5 g de BSA en 100 ml de PBS) y 500 µg/ml esperma de salmón, y se dejan rotar toda la noche a 4 °C. Centrifugar a 4°C por 2 min a 13000rpm y se enjuagan las perlas dos veces con buffer de dilución más inhibidor de proteasas y se resuspenden en 1 mL de este mismo buffer con inhibidor de proteasas. Continúa el CHIP, a cada inmunoprecipitación se le añaden 25 µl de perlas bloqueadas y se deja rotar de 2 a 4 hrs a 4 °C. Se recuperan las perlas y se lavan secuencialmente por 10 min con 1mL de los buffers: Buffer de paro I (0.1% SDS, 1% Triton x-100, 2mM EDTA, 20mM Tris-HCl pH 8.1, 150mM NaCl), Buffer de paro II (0.1% SDS, 1% Triton x-100, 2mM EDTA, 20mM Tris-HCl pH 8.1, 500mM NaCl) y Buffer de paro III (0.25M LiCl, 1% NP40, 1% Deoxicolato de sodio, 1mM EDTA, 10mM Tris-HCl pH 8.1) centrifugando cada vez un minuto a 13000 rpm a 4°C. Lavar dos veces con 1 mL Buffer TE (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8.0). Sacar INPUT y adicionarle a este y a los inmunocomplejos 150 µl del Buffer de elución (Elution Buffer: 1%SDS, 0.1M NaHCO<sub>3</sub>) con 1 µl de RNasa (10µg/µl) por muestra e incubar a 37°C por 1 h. Después adicionar 2 µl de proteinasa K (20 µg/µl) e incubar las muestras a 65°C por 2 h, con el fin de revertir el crosslinking. Purificar el DNA con fenol: cloroformo: alcohol isoamilico 25:24:1 pH 8.0. Centrifugar 15 min a 13000 rpm, transferir la fase acuosa a un tubo eppendorf nuevo y precipitar el DNA empleando NaCl 5M, etanol al 100% y glicógeno para ayudar a precipitar y hacer visible el pellet, dejar precipitar toda la noche.



Centrifugar por 10 min a 13000rpm y a 4 °C, retirar el sobrenadante y adicional 1 ml de etanol al 70%. Centrifugar por 10 min a 13000rpm y a 4°C, retirar el sobrenadante, centrifugar nuevamente y eliminar el sobrenadante restante. Incubar a 30°C en el termoblock, hasta que el etanol se haya evaporado. Adicionar 50 µl de Tris 10mM. El DNA está listo para el análisis por PCR. De preferencia cuantificar el DNA y utilizar de 50 a 100ng por muestra, si no emplear 3 µl de templado por cada muestra. No congelar el DNA mantenerlo a 4°C. Como controles negativos, se utilizan inmunoprecipitados de cromatina en ausencia de anticuerpo.

## **26. Análisis bioinformáticos**

Las secuencias génicas y proteicas de *C. glabrata* se extrajeron de la base de datos del proyecto Genolevures (<http://www.genolevures.org/cagl.html>); las de *S. cerevisiae* de SGD (<http://www.yeastgenome.org>). Los alineamientos se hicieron por el método ClustalW (HIGGINS *et al.* 1996) con el programa MacVector (Accelrys). La información sobre la sintenia se realizó utilizando el servidor de Yeast Order Browser (<http://wolfe.gen.tcd.ie/ygob/>) (SCANNELL *et al.* 2011).

## **27. Análisis estadísticos**

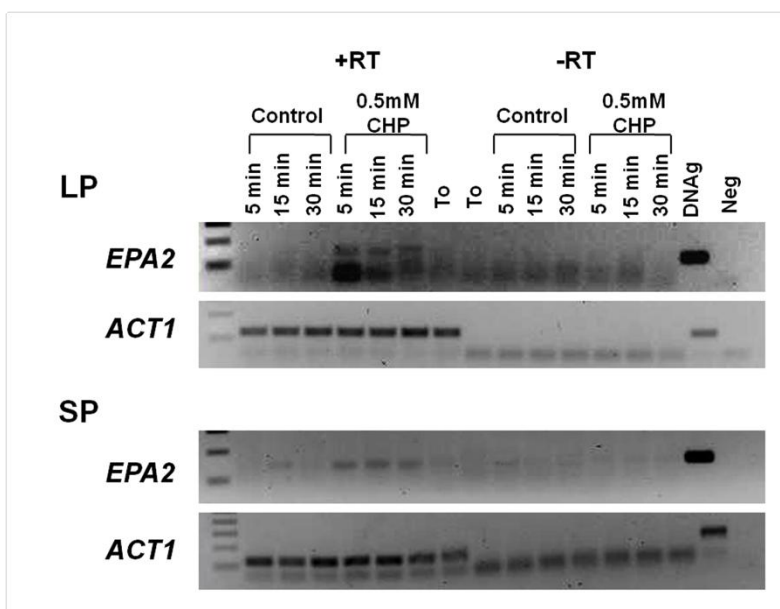
Todos los análisis estadísticos se realizaron con el programa GraphPad Prims v5.0a San Diego, CA, USA. Para el análisis estadístico de la RT-qPCR se utilizó la prueba de una vía ANOVA y como post-test se uso la prueba de Dunnett's Multiple Comparison Test para comparar entre grupos de columnas. Las diferencias entre los grupos de los ensayos in vivo fue determinada vía paramétrica y no paramétrica usando t-student test y Mann Whitney U test para los datos no pareados. Para los ensayos de viabilidad se utilizó la prueba de chi-squared test. Las diferencias entre la actividad del promotor *EPA2* en las distintas cepas y construcciones se evaluaron mediante la prueba de ANOVA de dos vías. El Nivel de  $p < 0.05$  se utilizó como criterio de significancia estadística.

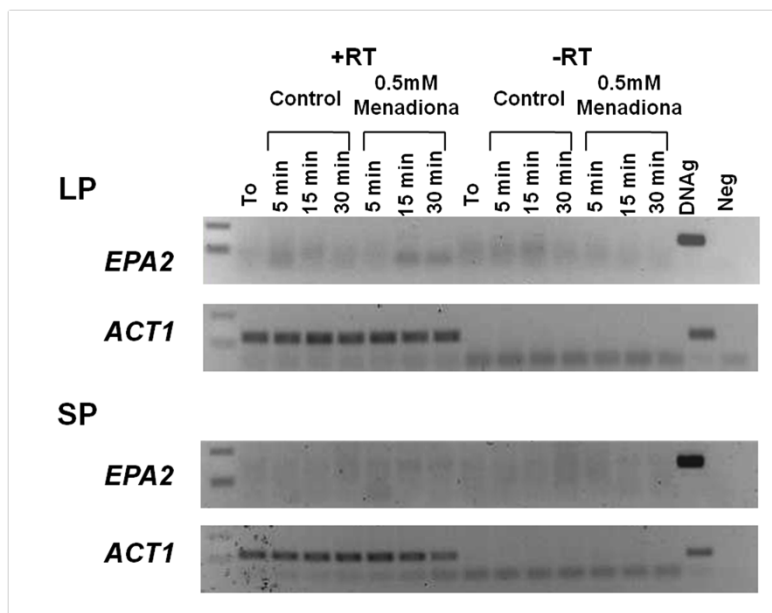
## ANEXO 2

### RESULTADOS ADICIONALES

#### 1. Expresión de *EPA2* en presencia de diferentes agentes oxidantes.

*EPA2* se induce en presencia de  $H_2O_2$ , para determinar si esta inducción es específica de  $H_2O_2$ , decidimos evaluar la expresión de *EPA2* en presencia de diferentes agentes oxidantes. Se realizaron ensayos de RT-PCR punto final para el gen *EPA2*, los cultivos se crecieron durante 48 horas y se diluyeron en medio usado o medio fresco respectivamente a una  $OD_{600nm}$  de 0.5, enseguida fueron tratados en presencia y ausencia de 0.5 mM de hidroxiperóxido de cumeno y menadiona. El análisis transcripcional muestra que *EPA2* sólo se induce en presencia de hidróxiperóxido de cumeno desde los 5 minutos de exposición hasta los 30 minutos de tratamiento. *EPA2* solo se induce en presencia de agentes oxidantes generadores de peróxidos ( $H_2O_2$ ) y no en generadores de superóxido ( $O_2^{\bullet-}$ ).



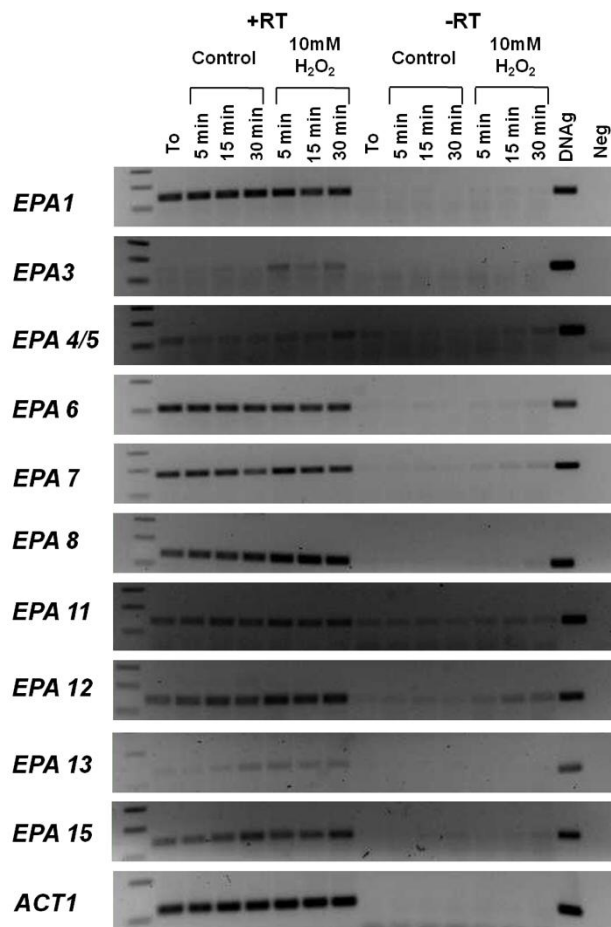


**Figura 5. Expresión de *EPA2* con diferentes agentes oxidantes.** La cepa parental (CGM518) se creció por 48 hrs a 30°C en medio SC y se diluyó en medio fresco (fase logarítmica) y en medio usado (fase estacionaria) a una  $OD_{600nm}$  de 0.5. Las células se expusieron a 0.5 mM de hidroxiperóxido de cumeno (A) o menadiona (B) por 5, 15 y 30 min. Se extrajo RNA total y se utilizó para realizar la RT-PCR punto final, como control positivo de la PCR se utilizó DNA genómico y como control interno de expresión el gen de *ACT1*.

## 2. Expresión de los genes *EPA* en presencia de $H_2O_2$ .

Para determinar si el estrés oxidante generado por  $H_2O_2$  induce la expresión de otros genes *EPA*, se realizaron ensayos de RT-PCR punto final, se evaluó la expresión de los genes *EPA1*, *EPA3*, *EPA4/5*, *EPA6*, *EPA7*, *EPA8*, *EPA11*, *EPA12*, *EPA13* y *EPA15*. El análisis transcripcional se realizó en cultivos en fase estacionaria y se evaluó su expresión a los 5, 15 y 30 min de exposición con el agente oxidante. El análisis mostró que los genes *EPA1*, *EPA4/5*, *EPA6*, *EPA7*, *EPA8*, *EPA11*, *EPA12*, *EPA13* y *EPA15* no se inducen tanto en ausencia como en presencia de  $H_2O_2$  solo se observa una inducción basal, por su parte el gen *EPA3*

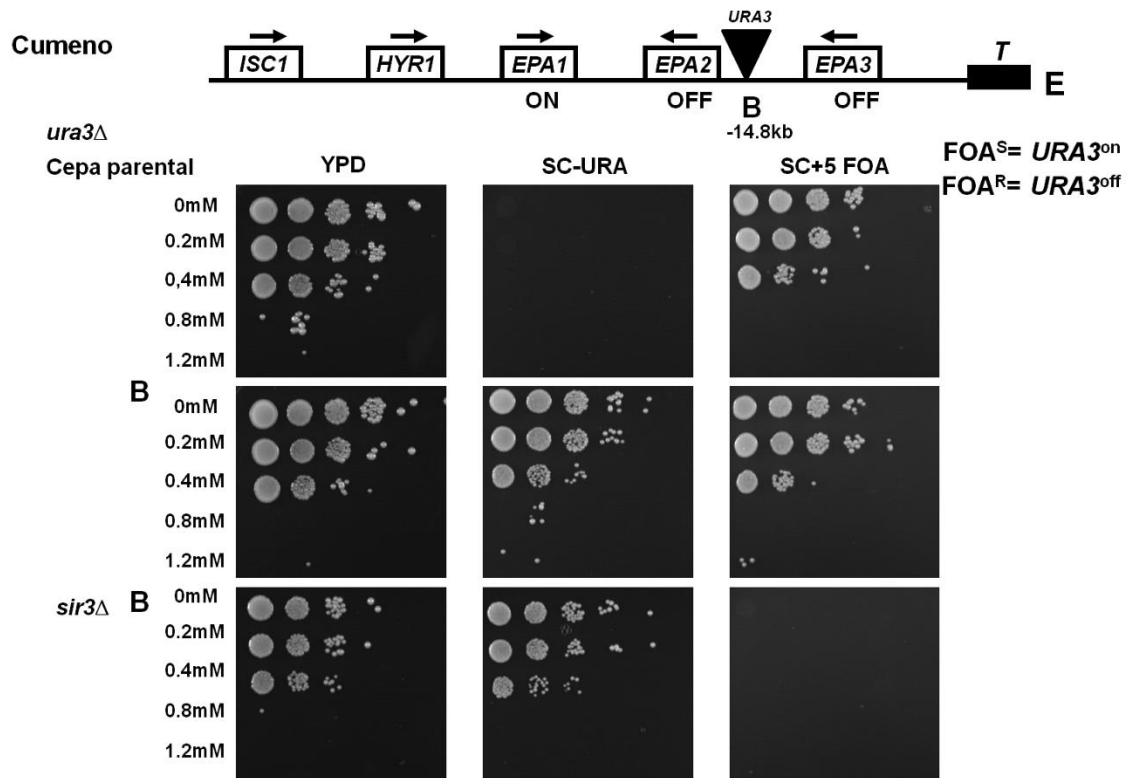
muestra una ligera inducción en presencia de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. En el resto de los genes evaluados no se observa inducción considerable.

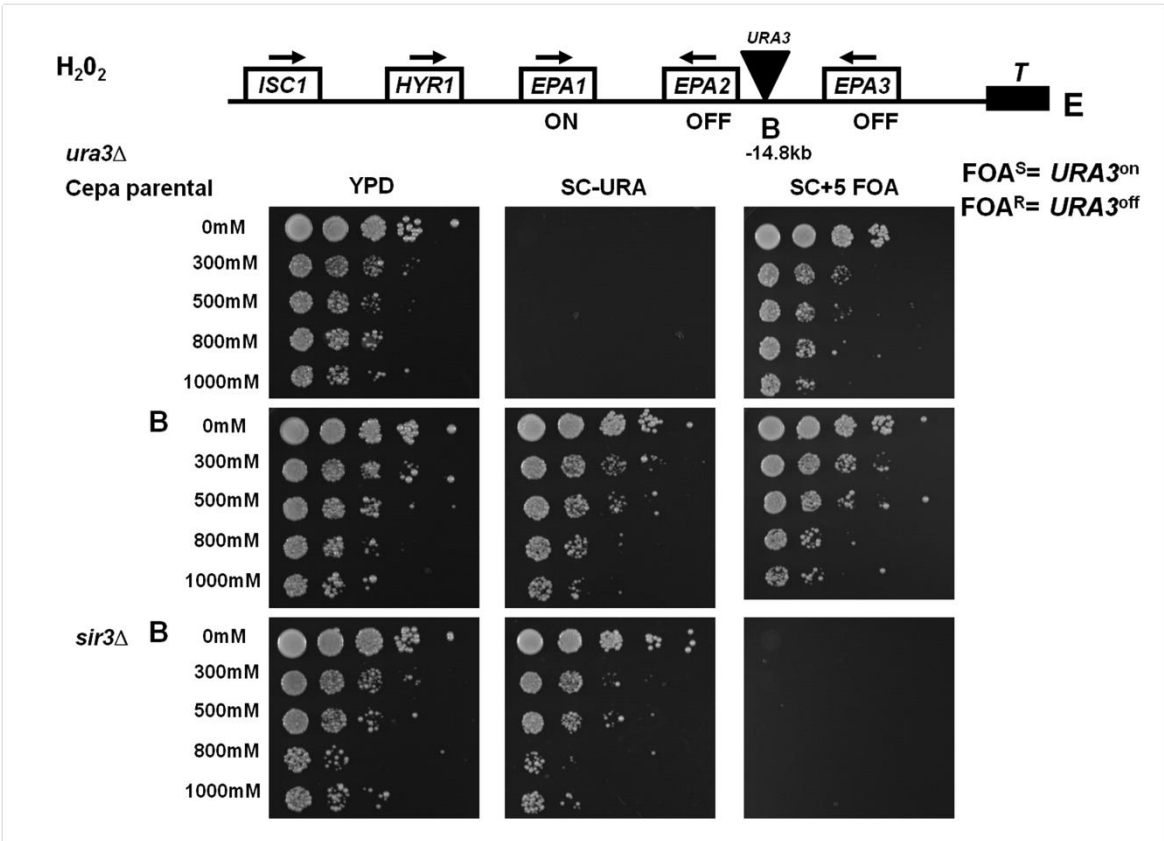


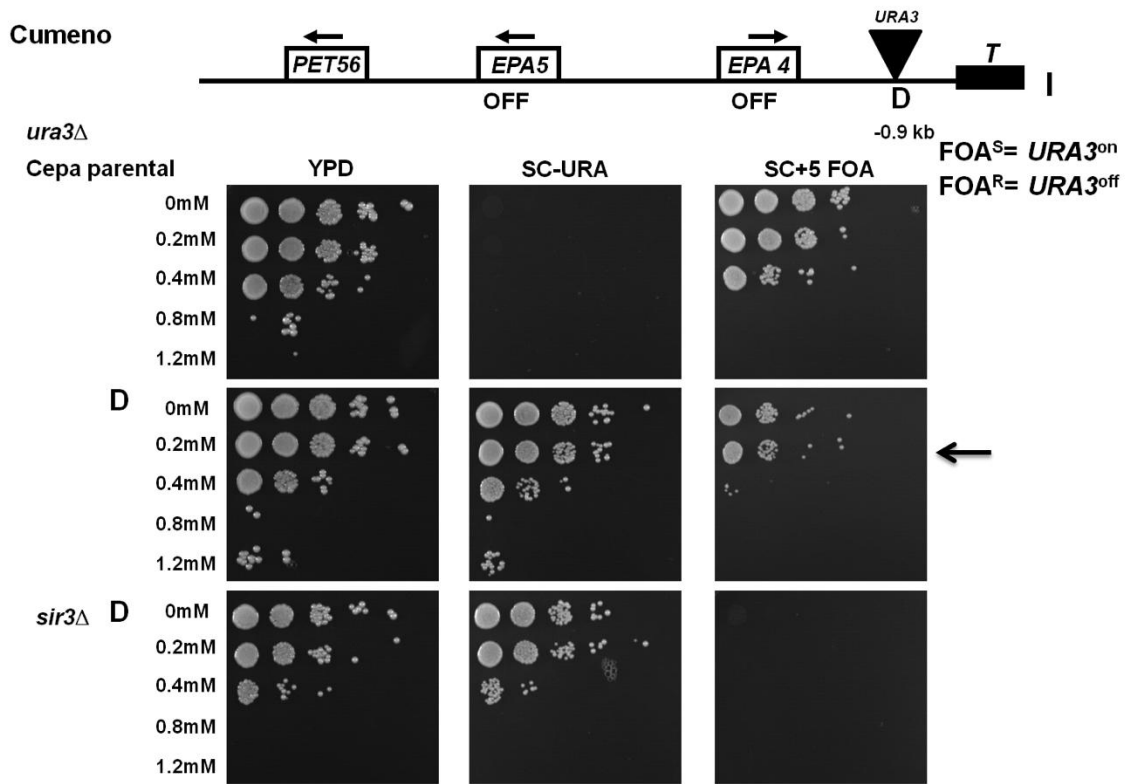
**Figura 6. Expresión de EPA1, EPA3, EPA4/5, EPA6, EPA7, EPA8, EPA11, EPA12, EPA13 y EPA15 en presencia de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.** La cepa parental (CGM518) se creció por 48 hrs a 30°C en medio SC y se diluyo en medio usado (fase estacionaria) a una OD<sub>600nm</sub> de 0.5. Las células se expusieron a 0.5 mM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> por 5, 15 y 30 min. Se extrajo RNA total y se utilizó para realizar la RT-PCR punto final, como control positivo de la PCR se utilizó DNA genómico y como control interno de expresión el gen de ACT1.

### **3. Estado transcripcional del gen reportero *URA3* insertado en diferentes regiones intergénicas en presencia de $H_2O_2$ e hidroxiperóxido de cumeno.**

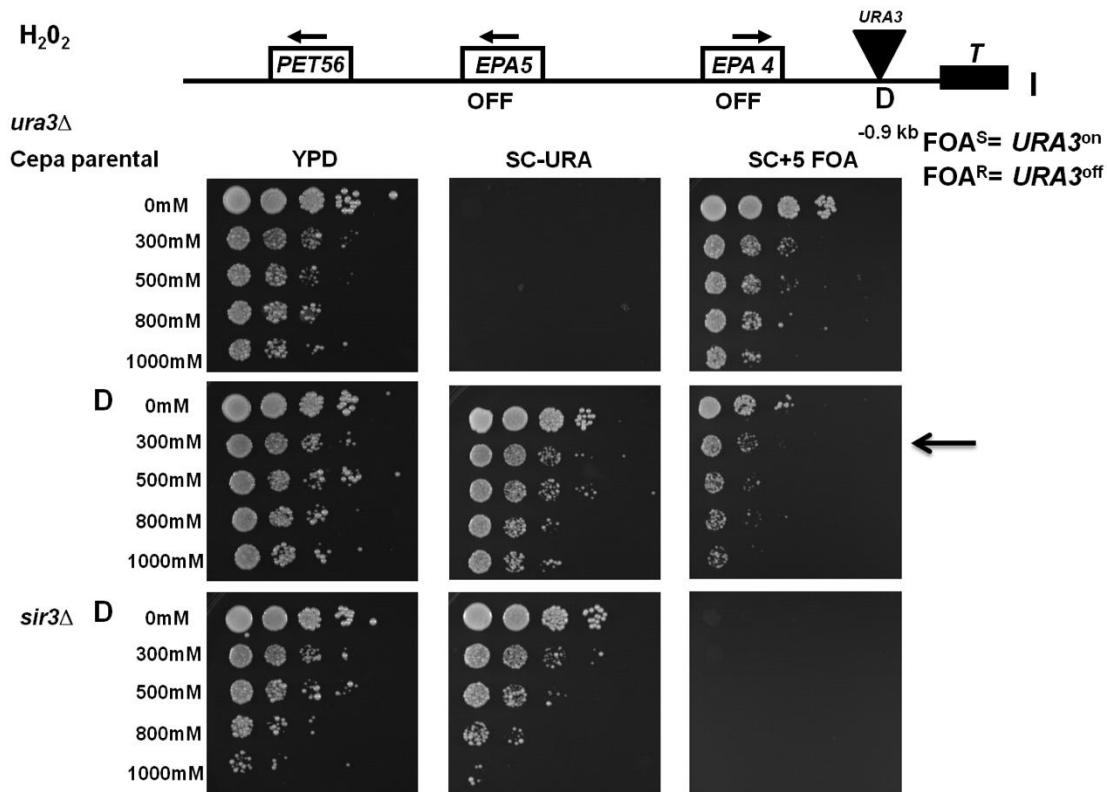
Previamente determinamos el estado transcripcional del gen reportero *URA3* insertado en la región intergénica del gen *EPA2*, y encontramos que el estrés oxidante generado por  $H_2O_2$  no elimina el silenciamiento subtelomérico durante una exposición crónica. Por lo que decidimos evaluar el estado transcripcional del gen reportero *URA3* insertado en la región intergénica del gen *EPA2* en el cromosoma E y en la región intergénica entre *EPA4* y el telómero en el cromosoma I, en presencia de  $H_2O_2$  e hidroxiperóxido de cumeno durante una exposición aguda. Realizamos un ensayo de crecimiento en 5FOA, las cepas que contienen las inserciones de *URA3* se crecieron en YPD por 36 hrs hasta fase estacionaria. Los cultivos fueron goteados en YPD, medio SC sin uracilo (SC-Ura) y SC+5FOA, después de estar expuestos a diferentes concentraciones de  $H_2O_2$  e hidroxiperóxido de cumeno por 2 hrs. Las cajas se incubaron a 30°C en un lapso de 48 horas. La inserción (B) del gen *URA3* entre *EPA2* y *EPA3* en la cepa silvestre tratada con  $H_2O_2$  o hidroxiperóxido de cumeno esta silenciada ya que se observa crecimiento en la caja de 5FOA, esta región es transcripcionalmente inactiva. Por su parte, en la cepa que contiene la inserción (D) entre del gen *EPA4* y el telómero en la cepa silvestre tratado con  $H_2O_2$  o hidroxiperóxido de cumeno se observa una ligera inhibición del crecimiento en la caja de 5FOA comparada con la cepa silvestre sin inserciones, lo que nos indica que en una proporción de células se está expresando el gen reportero *URA3*. Como control de ausencia de silenciamiento se analizó la cepa *sir3Δ*, las inserciones B y D no crece en cajas de 5FOA ya que el gen *URA3* se está expresando a diferencia de la cepa silvestre. Estos datos indican que el estrés oxidante generado por  $H_2O_2$  e hidroxiperóxido de cumeno solo tiene un ligero efecto en el estado transcripcional del gen reportero *URA3* de la región intergénica entre *EPA4* y el telómero del cromosoma I después de una exposición aguda a los agentes oxidantes mencionados y no se observa ningún efecto en el estado transcripcional del gen reportero *URA3* insertado en la región intergénica del gen *EPA2* en el cromosoma E bajo las mismas condiciones.









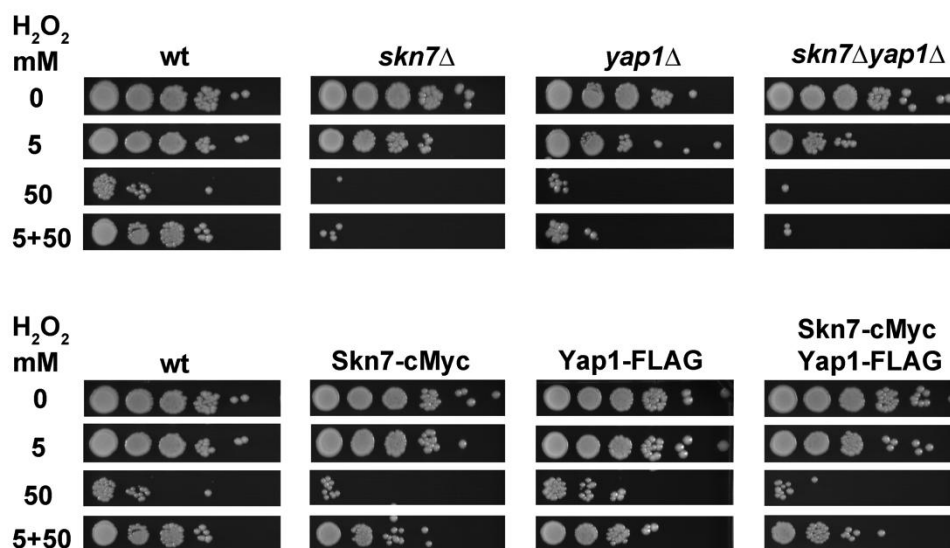


**Figura 7. Efecto del silenciamiento subtelomérico en la expresión del gen reportero *URA3* en diferentes regiones intergénicas en presencia de estrés oxidante.** El nivel de silenciamiento subtelomérico del gen reportero *URA3* insertado en diferentes posiciones a través del telómero E e I se evaluó usando un ensayo de crecimiento en 5FOA. Se muestra una representación esquemática de las posiciones de las inserciones de Tn7 (que contiene el gen reportero *URA3*) a través de las cepas de *C. glabrata* (parental y *sir3* $\Delta$ ). Las cepas CGM148, CGM160, CGM287 y CGM303 se crecieron en YPD por 36 hrs hasta fase estacionaria, enseguida fueron expuestas a diferentes concentraciones de  $H_2O_2$  e hidropéroxido de cumeno por 2 hrs y se gotearon en placas de YPD, medio SC sin uracilo (SC-Ura) y SC+5FOA. Las cajas se incubaron a 30°C en un lapso de 48 hrs. Las colonias  $URA^+$  son incapaces de crecer en las placas de SC +5-FOA, solamente las células con el gen *URA3* reprimido transcripcionalmente pueden crecer.

#### 4. Evaluación de la funcionalidad de las fusiones traduccionales

##### 4.1. Ensayo de adaptación a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

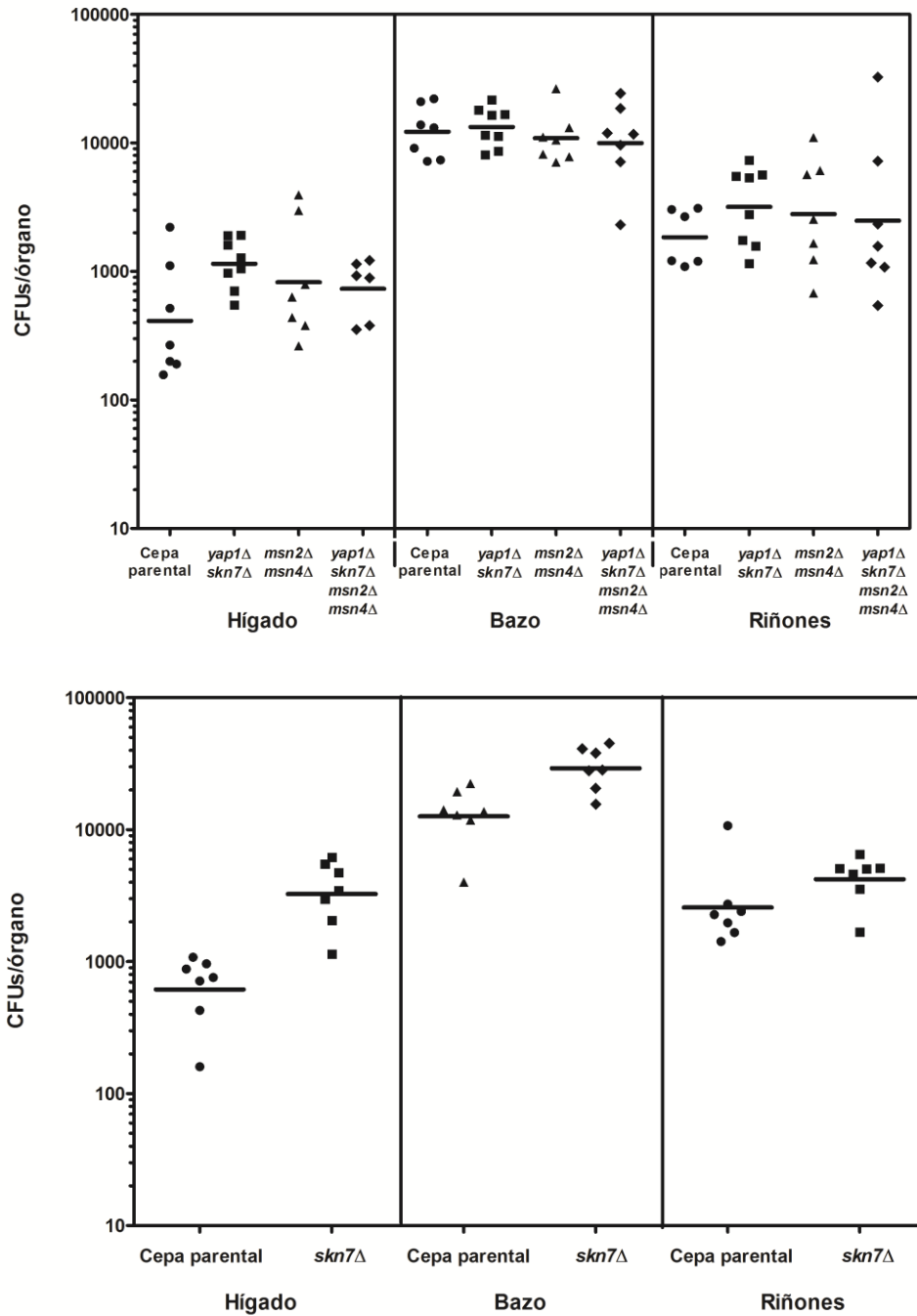
Realizamos este análisis para evaluar la funcionalidad de las proteínas Skn7 y Yap1 etiquetadas con los diferentes epítopes, se insertaron las fusiones traduccionales de c-Myc13 y FLAG por doble recombinación homóloga en la cepa BG14. Las diferentes cepas de *C. glabrata* se crecieron en medio YPD a 30°C durante una noche. Se diluyeron en medio fresco y se crecieron durante 7 duplicaciones hasta que alcanzaron una OD<sub>600nm</sub> de 0.5 las células se expusieron a la concentración de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> indicada por 3 hrs. Para los experimentos de adaptación, las cepas se pretrataron con una dosis subletal de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> durante 1 hr, se añadieron diferentes dosis letales y se incubaron por 2 hrs más. Posteriormente se hicieron diluciones logarítmicas y 5 µl de cada dilución se colocaron en placas con medio YPD. Las placas se incubaron a 30°C. Encontramos que las cepas con sus respectivos epítopes son funcionales.



**Figura 8. Ensayo de adaptación de las fusiones traduccionales Skn7-c::Myc13 y Yap1::FLAG.** Las cepas de las fusiones traduccionales *Skn7::c-Myc13* (CGM1505), *Skn7::c-Myc13 YAP1::FLAG* (CGM1548) y *YAP1::FLAG* (CGM1763) se crecieron en YPD durante 48 hrs a 30°C. Se diluyeron en medio fresco y se crecieron durante 7 duplicaciones hasta alcanzar una OD<sub>600nm</sub> de 0.5. Enseguida se expusieron a la concentración de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> indicada por 3 hrs; para los experimentos de adaptación las cepas se pretrataron con una dosis subletal de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> por 1 hr y enseguida se añadió una dosis letal de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> por 2 hrs más. Posteriormente se realizaron diluciones logarítmicas y se gotearon en placas de YPD. Las placas se incubaron a 30°C por 48 hrs.

#### **5. Efecto de los factores de transcripción de respuesta a estrés oxidante Msn2, Msn4, Skn7 y Yap1 en la virulencia de *C. glabrata*.**

Nuestros experimentos demostraron que *EPA2* es dispensable para la virulencia, pero los factores de transcripción Yap1 y Skn7 controlan su expresión in vitro. Yap1, Skn7, Msn2 y Msn4 son los principales reguladores de la respuesta a estrés oxidante, su participación en virulencia no ha sido evaluada. Por lo tanto, nosotros evaluamos la participación de Msn2, Msn4, Skn7 y Yap1 en la virulencia en un modelo de infección sistémica. Varios grupos de 6 ratones hembra se inocularon con  $2 \times 10^7$  células en 100µl de PBS de la cepa silvestre y de las cepas mutantes *skn7Δ*, *yap1Δskn7Δ*, *msn2Δmsn4Δ* y *msn2Δmsn4Δyap1Δskn7Δ* respectivamente como se describe en materiales y métodos. Las cepas mutantes *yap1Δskn7Δ*, *msn2Δmsn4Δ* y *msn2Δmsn4Δyap1Δskn7Δ* no mostraron diferencia significativa en colonización comparada con la cepa parental en los tres órganos recuperados. En contraste, la mutante *skn7Δ* mostro un incremento en la colonización en hígado y bazo comparado con la cepa parental, diferente a lo reportados por Saijo *et al* en 2010. Estos datos sugieren que los factores de transcripción de respuesta a estrés son dispensables para la virulencia de *C. glabrata*.

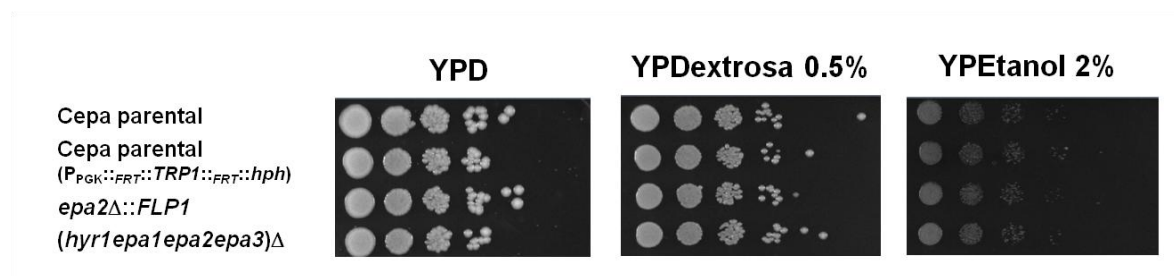


**Figura 9. Colonización de la cepa parental y de las mutantes *skn7Δ*, *yap1Δskn7Δ*, *msn2Δmsn4Δ* y *yap1Δskn7Δmsn2Δmsn4Δ* de *C. glabrata*.** Grupos de 6 ratones se infectaron con la cepa parental (CGM139) y las mutantes *skn7Δ* (CGM355), *yap1Δskn7Δ* (CGM1841), *msn2Δmsn4Δ* (CGM1845) y

*yap1Δskn7Δmsn2Δmsn4Δ* (CGM1842) por la vena de la cola. Después de 7 días los ratones se sacrificaron, se obtuvo el hígado, bazo y riñones, se realizaron diluciones de los homogenados y se determinó el número de CFUs por órgano. La grafica muestra los resultados de las UFC/órgano de cada uno de los ratones en los diferentes tejidos. Las barras indican la media geométrica de cada grupo.

## 6. Análisis fenotípico de la mutante *epa2Δ::FLP1*

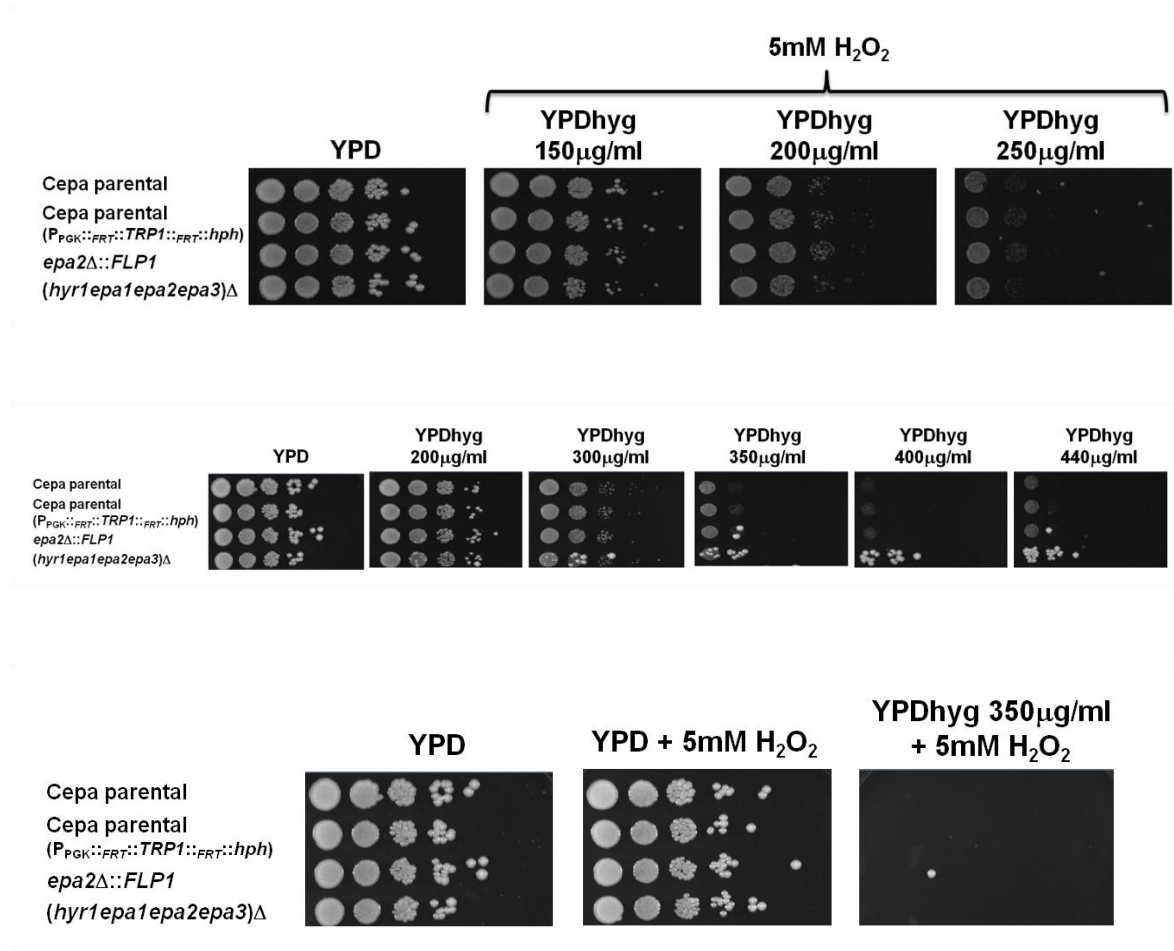
Para determinar la utilización de carbono de las mutante *epa2Δ::FLP1* evaluamos su crecimiento en diferentes fuentes de carbono, glucosa 0.5% (YPD 0.5), glucosa 2% (YPD) y etanol (YPE). Se crecieron las cepas de *C. glabrata* hasta fase estacionaria, las células se lavaron con agua estéril y se ajustó la densidad celular a  $1 \times 10^7$  células/mL ( $OD_{600nm}=0.5$ ). Se hicieron diluciones logarítmicas y colocaron 5μL de cada dilución por medio del replicador en las diferentes fuentes de carbono. Se tomaron fotografías a las 48 hrs posteriores. Observamos que todas las cepas pueden utilizar estas fuentes de carbono de manera similar.



**Figura 10. Análisis de crecimiento en diferentes fuentes de carbono de la mutante *epa2Δ::FLP1*.** Cultivos de la cepas parental (BG14 y BG625) y de la mutantes *epa2Δ::FLP1* (CGM1079) y *(hyr1epa1epa2epa3)Δ* (BG459) se crecieron en medio YPD durante 48 hrs a 30 °C. Las células se lavaron y se diluyeron a una  $OD_{600nm}$  de 0.5. Se hicieron diluciones logarítmicas y 5μl de cada dilución se colocaron en placas de YPD 0.5 (glucosa 0.5%), YPD (glucosa 2%) y YPE (etanol 2%). Las placas se incubaron a 30°C durante 48 hrs.

## 7. Evaluación de la expresión de la mutante *epa2Δ::FLP1*

Dado que *EPA2* es inducido en presencia de estrés oxidante, nosotros decidimos evaluar si la mutante *epa2Δ::FLP1* se expresa a concentraciones subletales de  $H_2O_2$  bajo una exposición crónica y si se generan una mayor cantidad de colonias resistentes a higromicina. Se crecieron las cepas de *C. glabrata* hasta fase estacionaria, posteriormente se ajustó la densidad celular a una  $OD_{600nm}$  de 0.5. Se realizaron diluciones logarítmicas y se gotearon en cajas de YPD con diferentes concentraciones de higromicina y/o  $H_2O_2$ . Se tomaron fotografías después de 48 hrs. Observamos que no hay diferencia de las cepas mutantes con respecto a la cepa parental en todas las condiciones evaluadas.



**Figura 11. Análisis de expresión de la mutante *epa2Δ::FLP1*.** Cultivos de la cepas parentales (BG14 y BG625) y de las mutantes *epa2Δ::FLP1* (CGM1079) y

(*hyr1epa1epa2epa3*) $\Delta$  (BG459) de *C. glabrata* se crecieron en medio YPD por 48 hrs a 30°C. Las células se lavaron y se resuspendieron en agua a una OD<sub>600nm</sub> de 0.5. Posteriormente, se realizaron diluciones logarítmicas y se gotearon en medio YPD suplementado con diferentes concentraciones de higromicina y/o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Las placas se incubaron a 30°C por 48 hrs.