

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

**POSGRADO EN CIENCIAS EN BIOLOGIA MOLECULAR**

**Estrés oxidativo y adherencia de la levadura  
patógena oportunista *Candida glabrata***

Tesis que presenta

**M. en C. Mayra Cuéllar Cruz**

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., Junio de 2009



## Constancia de aprobación de la tesis

La tesis “**Estrés oxidativo y adherencia de la levadura patógena oportunista *Candida glabrata***” presentada para obtener el Grado de Doctora en Ciencias en Biología Molecular fue elaborada por **Mayra Cuéllar Cruz** y aprobada el **26 de junio de 2009** 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

---

Dr. Everardo López Romero  
Asesor de la tesis

---

Dra. Martha Leticia Santos Martínez  
Asesor de la tesis

---

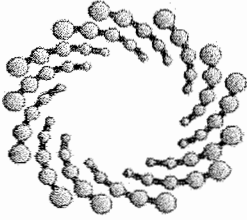
Dr. Luis Salazar Olivo  
Asesor de la tesis

## **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.

Durante la realización del trabajo la autora recibió una beca académica del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología con No. de Registro 163140.

El presente trabajo fue financiado parcialmente con recursos de los donativos CB-2005-48279 y Salud-2005-01-13927 otorgados al Dr. Alejandro De Las Peñas Nava.



**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 022 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 26 días del mes de junio del año 2009, 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. Everardo López Romero</b>	<b>Presidente</b>	<b>UGTO</b>
<b>Dr. Luis Antonio Salazar Olivo</b>	<b>Secretario</b>	<b>IPICYT</b>
<b>Dr. Alejandro De Las Peñas Nava</b>	<b>Sinodal</b>	<b>IPICYT</b>
<b>Dra. Martha Leticia Santos Martínez</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.

**Mayra Cuéllar Cruz**

sobre la Tesis intitulada:

*Estrés oxidativo y adherencia de la levadura patógena oportunista Candida glabrata*

que se desarrolló bajo la dirección de

**Dr. Alejandro De Las Peñas Nava**

El Jurado, después de deliberar, determinó

**APROBARLA**

Dándose por terminado el acto a las 15:00 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 26 días del mes de junio de 2009.

**Mtra. Ivonne Lizette Cuevas Vélez**  
Jefa del Departamento de Asuntos Escolares

**Dr. Marcial Bonilla Marín**  
Secretario Académico



Dedicada con mucho amor y cariño a mis padres:

Herlinda Cruz y Roberto Cuéllar

y a mis hermanos Julio César, Roberto y Ulises

Imagination is more important than knowledge  
Albert Einstein

## Agradecimientos

A mi asesor Dr. Alejandro De Las Peñas Nava, por su apoyo académico y moral, pero sobre todo gracias a sus valiosas críticas y comentarios que me hicieron aprender, fue posible la realización de este trabajo que de manera optimista llega a buen término.

A la Dra. Irene Castaño Navarro, por todo el apoyo académico que me brindo durante mi estancia en el laboratorio.

A mis asesores Dra. Leticia Santos, Dr. Luis Salazar y Dr. Everardo López por su tiempo y valiosos comentarios que invirtieron al presente trabajo.

Al Dr. Rubén López Revilla y Dr. Luis Salazar Olivo por permitirme ocupar un espacio en su laboratorio.

A la Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo y al rector de la UAEH C.D. Luis Gil Borja, por apoyarme y ayudarme a realizar esta meta en mi vida.

A todos mis profesores, que a lo largo de mis estudios me ayudaron a ignorar menos.

A Luis Arturo, por ser alguien muy especial en mi vida y porque se logren todas nuestras ilusiones.

A Chelito Velazco por ser una persona excepcional y porque gracias a sus consejos, apoyo, comprensión y enseñanzas de vida, llego al final de este maravilloso sueño.

A Martha Angélica por ser mi amiga de siempre y sobre todo por escucharme y apoyarme durante estos años.

A una gran compañera y amiga Verónica Gallegos, por todo lo que hemos compartido dentro y fuera del laboratorio.

A mis sobrinos Julio César y Héctor y a mi cuñada Lucero, por formar parte de mi maravillosa familia.

A mis compañeros del laboratorio de Microbiología Molecular.

Finalmente a Dios por lo que me ha permitido lograr.

# Contenido

Constancia de aprobación de la tesis .....	ii
Créditos Institucionales .....	iii
Dedicatorias .....	v
Agradecimientos .....	vi
Contenido .....	vii
Lista de figuras .....	ix
Anexos .....	x
Abreviaturas .....	xi
Glosario .....	xii
Resumen .....	xiii
Abstract .....	xiv
<b>Capítulo 1</b> .....	1
<b>Introducción</b> .....	1
<b>1.1 <i>Candida glabrata</i></b> .....	2
<b>1.2 La respuesta a estrés oxidativo en levaduras</b> .....	5
1.2.1 Principales fuentes generadoras de especies reactivas de oxígeno .....	5
1.2.2 Efectos de las especies reactivas de oxígeno sobre las macromoléculas celulares .....	8
1.2.3 Sistemas antioxidantes enzimáticos y no enzimáticos .....	9
1.2.3.1 Antioxidantes enzimáticos .....	10
1.2.3.1.1 Superóxido dismutasa .....	11
1.2.3.1.2 Catalasa .....	12
1.2.3.1.3 Glutación peroxidasas .....	14
1.2.3.1.4 Tioredoxina .....	15
1.2.3.1.5 Glutaredoxina .....	17
1.2.3.2 Antioxidantes no enzimáticos .....	19
1.2.3.2.1 Glutación .....	19
1.2.3.2.2 Vitamina E .....	20
1.2.3.2.3 Vitamina C .....	21
1.2.3.2.4 Poliaminas .....	21
1.2.3.2.5 Ácido Eritroascórbico .....	22
1.2.4 Factores transcripcionales .....	22
1.2.4.1 Yap1p .....	22
1.2.4.2 Skn7p .....	25
1.2.4.3 Msn2p/Mns4p .....	26
<b>1.3 Desarrollo de un método de diagnóstico para <i>Candida glabrata</i></b> .....	28
<b>1.4 Objetivos</b> .....	30
<b>Capítulo 2</b> .....	31
High Resistance to Oxidative Stress in the Fungal Pathogen <i>Candida glabrata</i> Is Mediated by a Single Catalase, Cta1p, and Is Controlled by the Transcription Factors Yap1p, Skn7p, Msn2p and Msn4p .....	31
<b>Capítulo 3</b> .....	44
Oxidative stress response to menadione and cumene hydroperoxide in the opportunistic fungal pathogen <i>Candida glabrata</i> .....	44

<b>Capítulo 4</b> .....	66
<i>Candida glabrata</i> clinical isolates adhered to HeLa cells expresses different adhesins.....	66
<b>Capítulo 5</b> .....	91
Método <i>in vitro</i> para la detección de <i>Candida glabrata</i> , kit de diagnóstico y usos de los mismos .....	91
<b>Capítulo 6</b> .....	95
<b>Discusión</b> .....	95
<b>6.1 <i>Candida glabrata</i> responde diferente a estrés oxidativo que <i>Candida albicans</i> y <i>Saccharomyces cerevisiae</i></b> .....	96
6.1.2 Sistemas antioxidantes de <i>Candida glabrata</i> .....	98
6.1.3 Regulación de la respuesta transcripcional a estrés oxidativo en <i>Candida glabrata</i> : similaridades y diferencias con <i>S. cerevisiae</i> y <i>C. albicans</i> .....	102
<b>6.2 Adhesión de <i>Candida glabrata</i> a células epiteliales</b> .....	106
6.2.1 Sir3p no regula las adhesinas de <i>Candida glabrata</i> que median adherencia a las células epiteliales HeLa .....	106
6.2.2 Los aislados clínicos de <i>C. glabrata</i> hiper-adherentes a células epiteliales expresan adhesinas diferencialmente .....	108
<b>Capítulo 7</b> .....	110
Referencias introducción y discusión .....	110
<b>Anexo</b> .....	132



## Lista de figuras

	<b>Página</b>
<b>Figura 1.</b> Formación de las distintas especies reactivas de oxígeno a partir de oxígeno molecular.	6
<b>Figura 2.</b> Las principales fuentes en donde se genera el radical superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ) y el peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) son la cadena respiratoria y los peroxisomas (Modificado de Chance y cols., 1979).	7
<b>Figura 3.</b> Daño de las especies reactivas de oxígeno a las biomoléculas celulares (Modificado de Klauning y cols., 1998).	8
<b>Figura 4.</b> Antioxidantes enzimáticos presentes en levaduras.	10
<b>Figura 5.</b> Mecanismo del sistema tioredoxina.	15
<b>Figura 6.</b> Sistema antioxidante glutaredoxina.	17
<b>Figura 7.</b> Ciclo de formación y degradación del glutatión (ciclo del $\gamma$ -glutamil) (Modificado de Meister, 1973; Meister y Anderson, 1983).	20

## Anexos

	<b>Página</b>
<b>Figura 8.</b> Cepa silvestre de <i>Candida glabrata</i> tratada con diferentes concentraciones de Hidroperóxido de Cumeno (CHP).	138
<b>Figura 9.</b> Yap1p, Skn7p, Msn2p y Msn4 activan genes en respuesta a estrés oxidativo en diferentes fases de crecimiento.	139
<b>Figura 10.</b> Cepa silvestre de <i>Candida glabrata</i> tratada con diferentes concentraciones de Menadiona.	140
<b>Figura 11.</b> Skn7p tiene una actividad dual en respuesta al estrés oxidativo generada por menadiona.	141
<b>Figura 12.</b> Fenotipos de algunos aislados clínicos en respuesta a H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> durante fase estacionaria.	142
<b>Figura 13.</b> Aislados clínicos con gran capacidad para formar biopelículas.	143
<b>Figura 14.</b> Aislados clínicos sin capacidad para formar biopelículas	144

## Abreviaturas

<b><i>C. glabrata</i></b>	<i>Candida glabrata</i>
<b><i>S. cerevisiae</i></b>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
<b><i>C. albicans</i></b>	<i>Candida albicans</i>
<b><i>S. pombe</i></b>	<i>Schizosaccharomyces pombe</i>
<b>ERO</b>	Especies Reactivas de Oxígeno
<b>REO</b>	Respuesta a Estrés Oxidativo
<b>CHP</b>	Hidroperóxido de cumeno
<b>Men</b>	Menadiona

## Glosario

**H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>** Peróxido de Hidrógeno

**SO<sub>2</sub><sup>•-</sup>** Radical superóxido

**HO<sup>•</sup>** Radical hidróxilo

## Resumen

En las últimas dos décadas *Candida glabrata* ha emergido como la segunda causa de candidiasis invasiva en pacientes inmunocomprometidos, neonatos y pacientes intervenidos quirúrgicamente. Para colonizar a su hospedero, este microorganismo requiere expresar adhesinas que le permiten adherirse, así como neutralizar las especies reactivas de oxígeno producidas por las células fagocíticas durante el estallido respiratorio. Sin embargo, se conoce poco acerca de los factores de virulencia de *C. glabrata*. Para dilucidar como responde *C. glabrata* al estrés oxidativo se construyeron mutantes en factores transcripcionales implicados en respuesta a estrés (*YAP1*, *SKN7*, *MSN2* y *MSN4*) y en su única catalasa (*CTA1*). Encontramos que la Cta1p es indispensable para la detoxificación de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. En respuesta a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, *C. glabrata* requiere de Yap1p, Skn7p y Msn4p. Mostramos que *C. glabrata* es más resistente que *C. albicans* y *S. cerevisiae* a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e Hidroperóxido de cumeno. También encontramos que aislados clínicos de *C. glabrata* con alto grado de adherencia a células epiteliales sobreexpresan varias adhesinas. Por último, desarrollamos un método de diagnóstico que permite identificar específicamente a *C. glabrata* de una manera más eficiente que las técnicas de identificación que existen actualmente.

**PALABRAS CLAVE:** *Candida glabrata*, estrés oxidativo, adhesinas, métodos de diagnóstico.

## Abstract

In the past two decades, *Candida glabrata* has emerged as the second cause of invasive candidiasis in immunocompromised patients, newborns and surgically-treated patients. In order to colonize its host, this microorganism needs to adhere, as well as to neutralize the reactive species of oxygen produced by the phagocytic cells during the respiratory burst. We characterized the oxidative stress response of *C. glabrata* and found that the catalase (Cta1p) is indispensable for H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> detoxification. In response to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, *C. glabrata* requires the transcriptional factors Yap1p, Skn7p and Msn4p. Furthermore, *C. glabrata* is more resistant than *C. albicans* and *S. cerevisiae* to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and to Cumene hydroperoxide. We also found that several clinical isolates of *C. glabrata* are hyper-adherents to epithelial cells and over-express several adhesins. Lastly, we developed a diagnostic method for the specific identification of *C. glabrata* and this new technique is more effective than the currently commercial available.

KEY WORDS: *Candida glabrata*, oxidative stress, adhesins, diagnostic methods.

# **Capítulo 1**

## **Introducción**

## 1.0 Introducción

### 1.1 *Candida glabrata*

*Candida glabrata* se consideraba un hongo no patógeno que formaba parte de la flora normal en individuos sanos y rara vez causaba infecciones en humanos (Fidel y cols., 1999). Debido al desarrollo de terapias inmunosupresoras combinadas con el uso de antimicóticos de amplio espectro, en las últimas dos décadas, *C. glabrata* ha emergido como la segunda especie más común de candidiasis invasiva en pacientes inmunocomprometidos, diabéticos, neonatos, intervenidos quirúrgicamente y adultos mayores (Trick y cols., 2002; Pfaller y Diekema, 2007). Las infecciones causadas por este hongo son difíciles de tratar, ya que *C. glabrata* presenta una resistencia innata a los azoles (fluconazol) (Hitchcock y cols., 1993). El fluconazol es un bitriazol recientemente desarrollado para el tratamiento de candidiasis. Además, el 15% de todas las candidiasis son causadas por *C. glabrata* (Trick y colss., 2002). En México también se ha reportado que el 12% de las vulvovaginitis y el 13% de las infecciones sistémicas por *Candida* se deben a *C. glabrata* (Manzano-Gayosso y cols., 2000).

Aún cuando *C. glabrata* es considerado un importante patógeno nosocomial se conoce poco sobre su virulencia. Se considera que un paso importante en el establecimiento de una infección por *Candida* es la adherencia de la levadura a las células del hospedero (Akalin y cols., 2004), una función mediada por proteínas de la pared celular llamadas adhesinas. El genoma de *C. glabrata* contiene una familia de al menos 23 genes homólogos *EPA* (epitelial adhesins), que codifican para proteínas de pared celular (Kaur y cols., 2005; De Las Peñas y cols., 2003).



De todos los genes *EPA* presentes en esta levadura, solo *EPA1* se expresa *in vitro* y media la adherencia a células epiteliales de mamífero (Cormack y cols., 1999). La ausencia de expresión del resto de los genes *EPA* se debe en parte a que la mayoría de ellos están sujetos a silenciamiento subtelomérico; es decir, no se expresan debido a la estructura represiva de la cromatina (Castaño y cols., 2005; De Las Peñas y cols., 2003). Las proteínas que participan en el silenciamiento subtelomérico en *C. glabrata* son Rap1, Sir2, Sir3, Sir4, yKu70, yKu80 y Rif1 (Rosas-Hernández y cols., 2008; Castaño y cols., 2005; De Las Peñas y cols., 2003). Mutantes de *C. glabrata* en cualquiera de estos genes relajan la cromatina y esto permite que varios genes *EPA* bajo silenciamiento subtelomérico, se expresen. Estas mutantes son hiperadherentes. Epa1p, Epa6p y Epa7p son importantes para la colonización de vejiga y riñón en un modelo de infección de vías urinarias de ratón (Domergue y cols., 2005; Castaño y cols., 2005). Estos datos muestran la importancia de las adhesinas en la virulencia de *C. glabrata*. Interesantemente, se determinó que *EPA6* de *C. glabrata* se induce en riñón y vejiga durante una infección de vías urinarias de ratón. En este caso, la señal importante para la relajación de la cromatina y desrepresión de *EPA6*, es la deficiencia de niacina o ácido nicotínico en orina. El ácido nicotínico (NA) es un precursor de nicotinamida adenina dinucleótido (NAD), que a su vez es necesario para la actividad de Sir2, una desacetilasa de histonas. Cuando en orina, los niveles de NA son bajos, la actividad de Sir2p es menor y *EPA6* se expresa (Domergue y cols., 2005). También se demostró que Epa6 es la principal adhesina involucrada en la formación de bio-películas (Iraqi y cols., 2005).

Además de la adherencia, se ha considerado que la producción de proteinasas es importante para la virulencia. Sin embargo, algunos autores han reportado que estas enzimas no parecen tener un papel importante en la virulencia ya que se ha detectado una baja actividad extracelular en aislados clínicos de *Candida spp.* (Oksuz y cols., 2007). Sin embargo, la familia de yapsinas (aspartil proteasas con ancla glicosil-fosfatidil inositol) se requieren para la integridad de la pared celular, la supervivencia al interior de macrófagos y la adherencia a células de mamífero (Kaur y cols., 2007).

El cambio de morfología es una característica importante de *C. albicans*. El cambio de levadura a micelio concomitantemente con la expresión de aspartil proteasas y adhesinas, es importante para la virulencia de *C. albicans*. *C. glabrata* forma pseudohifas sólo en ausencia de nitrógeno (Csank y Haynes, 2000) y se desconoce si esto es importante para su virulencia.

Otro factor importante de virulencia en hongos patógenos es la respuesta a estrés oxidativo (REO). Por ejemplo, la catalasa Cta1p y la superóxido dismutasa Sod5p son necesarias para la virulencia de *C. albicans* en un modelo de infección en ratón (Martchenko y cols., 2004; Wysong y cols., 1998). *C. glabrata* tiene la capacidad no sólo de sobrevivir sino de dividirse en el interior de macrófagos (Kaur y cols., 2007). Se propone que esta característica depende primero de la inactivación de las especies reactivas de oxígeno generadas por las células fagocíticas. La REO de *C. glabrata* aún no se ha descrito.

## 1.2 La respuesta a estrés oxidativo en levaduras

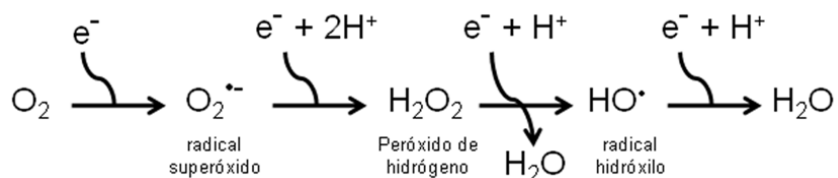
Todas las células han desarrollado mecanismos para responder rápidamente al medio ambiente que les rodea, fenómeno que se conoce como respuesta general al estrés (Mager y Ferreira, 1993; Mager y Kruijff, 1995; Ruis y Schüller, 1995; Gasch y cols., 2000). Organismos unicelulares como las levaduras responden y adaptan su metabolismo y crecimiento a las condiciones del medio: cantidad de nutrientes disponibles, temperatura, osmolaridad y pH, presencia de sustancias químicas y especies reactivas de oxígeno (ERO) (Gasch, 2007).

Los hongos patógenos para poder infectar y permanecer en el hospedero humano deben de responder y adaptarse a altas concentraciones de ERO producidas por las células fagocíticas durante el estallido respiratorio (Moye-Rowley, 2003). La eliminación de células fúngicas por las células fagocíticas, es la primera línea de defensa.

### 1.2.1 Principales fuentes generadoras de ERO

En la célula, se producen las ERO como parte del metabolismo normal aerobio o cuando es expuesta a compuestos químicos generadores de radicales libres como menadiona, paraquato, hidroperóxido de cumeno, diamida (Castro y cols., 2008; Castro y cols., 2007; Lee y cols., 1995; Hassan, 1979) ó a radiaciones X,  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ , UV ó luz visible (Gessler y cols., 2007). Las ERO pueden reaccionar y dañar lípidos, DNA, proteínas, carbohidratos y componentes de la matriz extracelular (Grant, 2008; Drakulic y cols., 2005; Thorpe y cols., 2004; Jamieson, 1998).

En los sistemas biológicos las ERO se forman principalmente en la cadena de transporte electrónico mitocondrial por la reducción parcial del  $O_2$ , por transferencia de uno, dos o tres electrones, generando superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ), peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) y radical hidroxilo ( $HO^{\cdot}$ ) (Fig. 1).

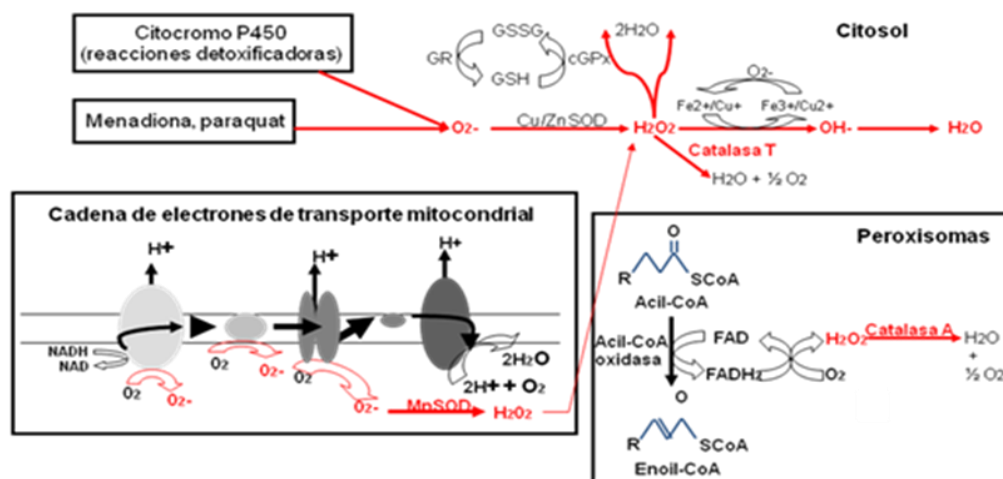


**Figura 1. Formación de las distintas especies reactivas de oxígeno a partir de oxígeno.**

El anión superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ) se forma por la transferencia de un electrón al  $O_2$ . En levaduras esta molécula se genera principalmente en la cadena respiratoria en los complejos I (NADH deshidrogenasa), II (succinato deshidrogenasa) y III (ubiquinona-citocromo c reductasa) (Murphy, 2009; Dröse y cols., 2008; Kussmaul y cols., 2006; Mulkidjanian, 2005; Galkin y cols., 2005). Una proporción menor de superóxido se genera en los sistemas de transporte electrónico del retículo endoplásmico y de la membrana nuclear, específicamente en los citocromos P450 y b5 que pueden oxidar ácidos grasos insaturados (Capdevila y cols., 1981). El anión superóxido actúa como oxidante o como reductor y es capaz de oxidar DNA, proteínas, carbohidratos y lípidos. Aunque, el  $O_2^{\cdot-}$  no es la especie más tóxica si es la fuente principal para generar peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ).

El peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) es el resultado de la ganancia de dos electrones por parte del  $O_2$ . La mayoría del peróxido de hidrógeno presente en la

célula proviene de la dismutación del  $O_2^{\cdot -}$  por mecanismos enzimáticos. El  $H_2O_2$  también se genera en los peroxisomas como consecuencia de la  $\beta$ -oxidación de los ácidos grasos (Fig. 2).



**Figura 2. Generación de radical superóxido ( $O_2^{\cdot -}$ ) y peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) en la cadena respiratoria y los peroxisomas.**

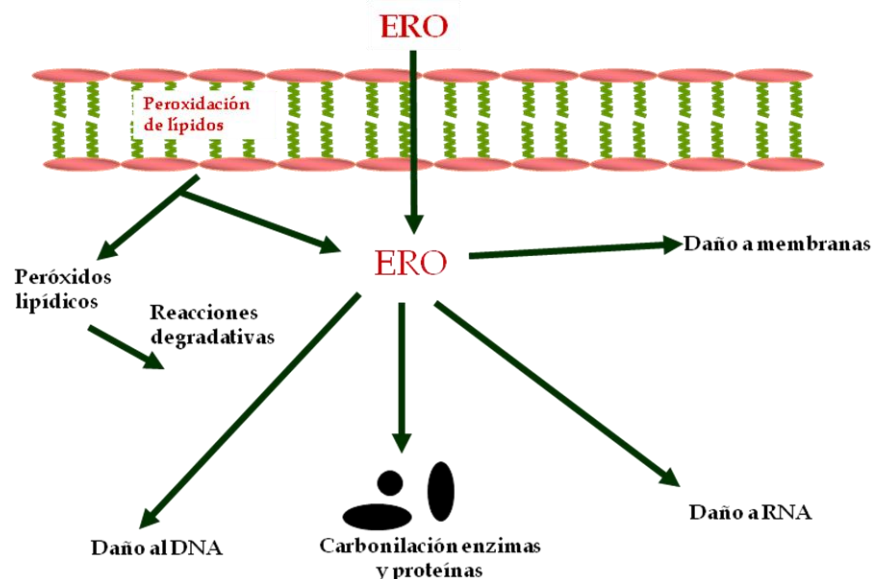
GSH: Glutatión reducido. GSSG: Glutatión oxidado. GR: Glutatión reductasa. GPx: Glutatión peroxidasa. Cu/Zn SOD y MnSOD: Superóxido dismutasa. FAD: Flavín adenín dinucleótido oxidado. FADH: Flavín adenín dinucleótido reducido. (Modificado de Chance y cols., 1979).

Debido a la ausencia de carga eléctrica en su molécula, el  $H_2O_2$  difunde libremente por la capa de lípidos de las membranas celulares. El  $H_2O_2$  puede oxidar directamente metales de transición como el  $Fe^{2+}$  a través de la reacción de Fenton para producir el radical  $HO^{\cdot}$ . Los iones Cu, Co y Ni también pueden participar en una reacción similar. El radical hidróxilo ( $HO^{\cdot}$ ) se genera cuando el  $H_2O_2$  gana un electrón ( $e^-$ ). Otra reacción que da lugar a la formación del radical  $HO^{\cdot}$  es la reacción de Haber-Weiss en la que el  $O_2^{\cdot -}$  con el  $H_2O_2$  en presencia de  $Fe^{2+}$  da lugar al radical hidróxilo. El  $HO^{\cdot}$  es la ERO más reactiva y debido a su

inestabilidad reacciona con las biomoléculas en el lugar o lugares cercanos a su formación.

## 1.2.2 Efectos de las especies reactivas de oxígeno sobre las macromoléculas celulares

Una célula se encuentra bajo estrés oxidativo cuando la concentración de especies reactivas generadas exceden su capacidad antioxidante. En estas condiciones las ERO pueden dañar cualquier tipo de biomolécula, como ácidos nucleicos (DNA), lípidos y proteínas (Fig. 3) (Klauning y cols., 1998).



**Figura 3. Las especies reactivas de oxígeno dañan a todas las biomoléculas celulares.**

ERO: Especies Reactivas de Oxígeno. (Modificado de Klauning y cols., 1998).

Los ácidos grasos son susceptibles a oxidación por las especies reactivas de oxígeno. Se generan hidropéroxidos lipídicos y radicales peróxido lipídicos, que pueden posteriormente generar malondialdehído (MDA), que puede difundir a través de las membranas, modificando la estructura y función de la membrana. El

resultado es una pérdida de la integridad de la membrana y posteriormente la muerte celular.

Las proteínas son blanco de las ERO de manera directa ó indirecta mediante peroxidación lipídica (Klauning y cols., 1998). Las ERO oxidan a los aminoácidos metionina, cisteína, histidina, triptófano, fenilalanina, tirosina, arginina, lisina, prolina, treonina y ácido glutámico. Esta oxidación produce un aumento en su hidrofobicidad y mayor sensibilidad a proteólisis (Shacter, 2000; Berlett y Stadtman, 1997; Martínez-Cayuela, 1998). Dependiendo de la naturaleza del oxidante y de la proteína, los cambios pueden variar. El efecto de las ERO en ciertos aminoácidos pueden provocar la carbonilación de la proteína que la hace más susceptible a degradación (Cabiscols y cols., 2000; Webster y Nunn, 1988). Los centros hierro-azufre de las proteínas, pueden ser oxidados por el radical súperoxido (Flint y cols., 1993; Liochev y Fridovich, 1999). El peróxido de hidrógeno es capaz de oxidar residuos de cisteína y metionina (Imlay 2003; Vogt, 1995; Stadtman y cols., 2003), así como las cadenas laterales de los aminoácidos y favorecer la formación de grupos carbonilo (Stadtman y Levine, 2003).

Las ERO atacan a las purinas, pirimidinas y azúcares del DNA y provocan rompimiento o entrecruzamiento de las dos cadenas (Sies y Menck, 1992; Sies, 1993; Rai y cols., 2001). El DNA mitocondrial es mayoritariamente atacado por las ERO generadas en la mitocondria.

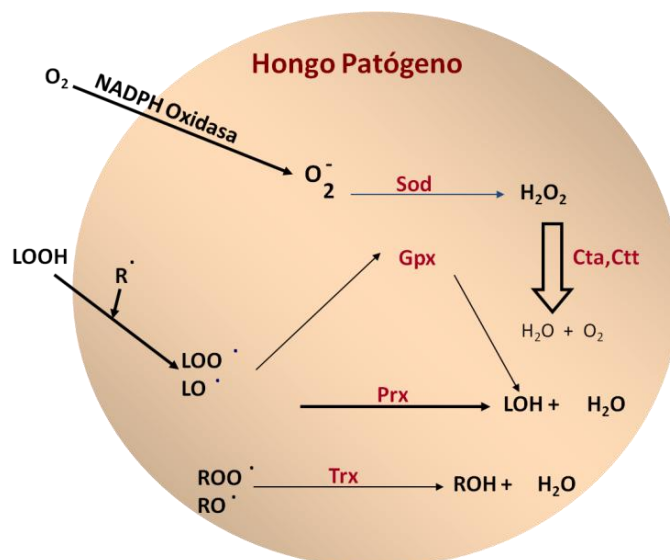
### **1.2.3 Sistemas antioxidantes enzimáticos y no enzimáticos**

Para contrarestar el efecto de las ERO los organismos cuentan con mecanismos muy efectivos que incluyen enzimas antioxidantes y sistemas no

enzimáticos. Una molécula antioxidante se define como aquella que a concentraciones bajas con respecto a un sustrato oxidable, retrasa o inhibe la oxidación de dicho sustrato (Halliwell y Gutteridge, 1995).

### 1.2.3.1 Antioxidantes enzimáticos

Los sistemas antioxidantes enzimáticos se dividen en aquellos que detoxifican directamente las especies reactivas de oxígeno y aquellos que actúan regulando el estado redox de las proteínas. Las enzimas antioxidantes que eliminan directamente los radicales  $O_2^{\cdot-}$  y  $H_2O_2$  son la superóxido dismutasa (Sod), la catalasa (Cat,Ctt) y las peroxidasa (Gpx) (Fig. 4).



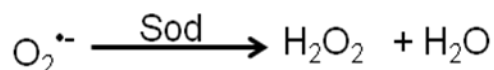
**Figura 4. Antioxidantes enzimáticos presentes en levaduras.**

Sod: Superóxido dismutasa. Cta, Ctt: Catalasas. Gpx: Glutatión peroxidasa. Prx: Peroxiredoxinas. Trx: Tioeredoxinas. LOOH: Lípidos de membrana.  $LOO^{\cdot}$ ,  $LO^{\cdot}$ : Radicales lípidicos. LOH, ROH: Alcohol.  $ROO^{\cdot}$ ,  $RO^{\cdot}$ : Peróxidos orgánicos.  $R^{\cdot}$ : Radical libre.



### 1.2.3.1.1 Superóxido dismutasa

La superóxido dismutasa (Sod) fue descrita en 1969 por primera vez por McCord y Fridovich. Las superóxido dismutasas son una familia de metaloenzimas que convierten el  $O_2^{\bullet-}$  a  $H_2O_2$  y  $H_2O$ .



Las Sod se clasifican de acuerdo a su cofactor metálico: Cu-Sod, Cu-Zn-Sod, Mn-Sod, Fe-Sod y NiSod. El metal de transición (Cu, Mn, Ni ó Fe) reacciona con el  $O_2^{\bullet-}$  quitándole su electrón para generar  $H_2O_2$ .

El número de Sod presentes en cada organismo varía dependiendo probablemente de su nicho natural. Típicamente, los eucariotes expresan la CuZnSod citosólica y la MnSod mitocondrial (Fridovich, 1995). Por ejemplo, *C. albicans* posee seis superóxido dismutasas con potencial para reducir el superóxido a agua y oxígeno (Martchenko, y cols., 2004; Chaves y cols., 2007). Se ha reportado que CaSod1 y CaSod2 protegen a *C. albicans* en fase de crecimiento logarítmica y en fase estacionaria, aunque, existen diferencias entre ellas. CaSod1p, es importante para la virulencia en un modelo murino y protege a las células del radical superóxido producido por macrófagos. CaSod2p no tiene efecto en virulencia pero protege a la célula contra el superóxido producido intracelularmente (Hwang y cols., 2003). CaSod3p, es una superóxido dismutasa atípica involucrada únicamente en fase estacionaria (Lamarre y cols., 2001). Para CaSod4p y CaSod6p aún no se ha descrito su función. CaSod5p está involucrada

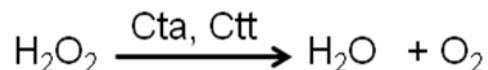
en la virulencia de *C. albicans* pero no participa en la defensa de *C. albicans* contra la actividad fungicida de macrófagos (Martchenko y cols., 2004).

*S. cerevisiae*, posee dos Sod. La Sod1 (CuZnSod) se encuentra en citoplasma, núcleo y en el espacio intermembranal de la mitocondria (Sturz y cols., 2001) y la Sod2 (MnSod) se localiza en mitocondria. La actividad superóxido dismutasa es esencial para la supervivencia durante la fase estacionaria, pero no así durante el crecimiento exponencial (Longo, y cols., 1996). Células *sod1Δ* presentan un pobre crecimiento aeróbico, auxotrofia para lisina, metionina ó cisteína (Gralla y Kosman, 1992). ScMnSod es esencial para la tolerancia a etanol durante la fase post-diauxica (Costa y cols., 1997). Se sabe que ambas ScSod, contribuyen a evitar la carboxilación de proteínas durante la fase estacionaria y protegen a las levaduras del radical  $O_2^{\cdot-}$  durante hiperoxia (O'Brien y cols., 2004; Outten y cols., 2005).

Por análisis de secuencia ([www.genolevures.org](http://www.genolevures.org)) se encontró que el genoma de *C. glabrata* tiene dos genes para superóxido dismutasa, la CuZnSOD (CAGL0C04741g) y la FeMnSOD (CAGL0E04356g) codificadas por los genes *SOD1* y *SOD2* respectivamente. La CgSod1 posee un 83% de identidad con ScSod1, mientras que la CgSod2 tiene una identidad de 72% con respecto a ScSod2, esta homología sugiere que CgSod1 se localiza en citosol, mientras CgSod2 en la matriz mitocondrial.

### 1.2.3.1.2 Catalasa

La catalasa (Cta1, Ctt1) es la enzima encargada de hidrolizar el  $H_2O_2$  a oxígeno y agua.



Son proteínas homotetraméricas en las que cada monómero contiene un grupo hemo en su sitio catalítico, y NADPH o un dominio tipo flavodoxina (Kirkman y cols., 1987). Poseen una baja afinidad por el sustrato, pero, son  $10^4$  veces más rápidas que las peroxidasas. Esta gran eficiencia catalítica las hace que sean excelentes detoxificadoras del peróxido de hidrógeno.

*C. albicans* posee una catalasa que le confiere resistencia a  $\text{H}_2\text{O}_2$  (Wysong y cols., 1998). La ausencia de CaCta1p no altera el fenotipo o morfología de la cepa pero atenúa dramáticamente la habilidad de *C. albicans* para resistir el daño por leucocitos humanos *in vitro* (Wysong y cols., 1998).

*S. cerevisiae* tiene dos catalasas ScCta1p y ScCtt1p (Cohen *et al.*, 1988; Hartig y Ruis 1986). ScCtt1p se localiza en el citoplasma y su expresión está regulada por estrés osmótico, choque térmico, estrés oxidativo, limitación de nutrientes, etanol y ácidos débiles (Marchler y cols., 1993; Davidson y cols., 1996). ScCta1p se localiza tanto en la mitocondria como en el peroxisoma (Lapinskas y cols., 1995). Su función en la mitocondria es eliminar el  $\text{H}_2\text{O}_2$  generado durante la respiración mitocondrial y en el peroxisoma elimina el  $\text{H}_2\text{O}_2$  formado por la  $\beta$ -oxidación de ácidos grasos (Petrova y cols., 2004). Las catalasas ScCta1p y ScCtt1p tienen un papel importante en la adquisición de tolerancia a estrés oxidativo en la respuesta adaptiva (Izawa y cols., 1996; Lushchak y Gospodaryov, 2005).

*C. glabrata* posee una catalasa Cta1p y su caracterización fue parte de esta tesis (Capítulo 2).

### 1.2.3.1.3 Glutación peroxidadas

Las glutatión peroxidadas (Gpx's) son enzimas encargadas de detoxificar el  $H_2O_2$  y los hidroperóxidos orgánicos a agua y el alcohol correspondiente. Se localizan en la membrana celular, la mitocondria y el citosol. Las Gpx's son capaces de proteger a la célula contra oxidación de proteínas, lípidos de membrana y ácidos nucleicos. Son enzimas que utilizan el glutatión reducido (GSH) como reductor, y lo convierten a glutatión oxidado (GSSG). Las células para mantener los niveles de glutatión reducido, reducen al GSSG por medio de la glutatión reductasa, la cual utiliza NADPH (Collinson y Dawes, 1995).

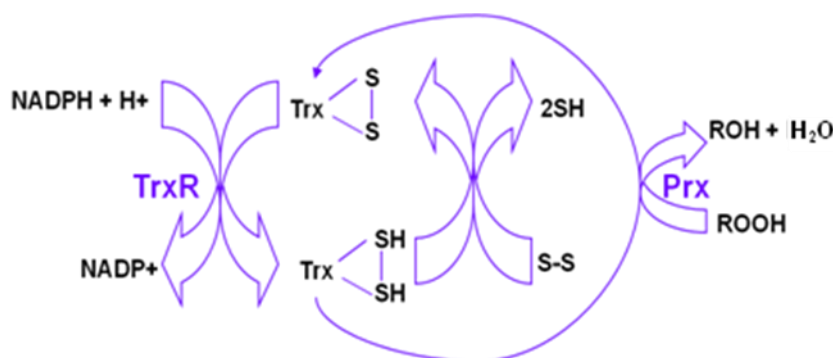
Basados en análisis de secuencia del genoma de *S. cerevisiae*, se describieron tres glutatión peroxidadas, Gpx1, Gpx2 y Gpx3 (Inoue y cols., 1999). Sin embargo, alineamientos de estas secuencias con secuencias de eucariotes superiores, se encontró que no son GPxs, sino glutatión peroxidadas de hidroperóxidos de fosfolípidos (PHGPxs). Al realizar ensayos *in vivo* se comprobó que tenían actividad de PHGPxs, ya que estas enzimas protegen a la levadura de hidroperóxidos lipídicos durante estrés oxidativo (Avery y Avery, 2001).

*C. albicans* posee una glutatión peroxidasa (Gpx1) y dos glutatión peroxidadas putativas (codificadas por orf19.85 y orf19.87) con alta homología a Gpx1p. Sorprendentemente, en presencia de diamida ó  $H_2O_2$  solo se expresa Gpx1p (Kusch y cols., 2007).

Interesantemente, *C. glabrata* no tiene Gpx1p ni Gpx3p. Sin embargo por análisis de secuencia, se encontró que posee CgGpx2p la cual tiene una identidad del 74% con ScGpx2p.

#### 1.2.3.1.4 Tioredoxina

La tioredoxina (Trx) es una pequeña proteína de 25 KDa que contiene un sitio activo con un puente disulfuro redox activo (Holgrem, 1989). Su función es de oxidoreductasa que cataliza la reducción de puentes disulfuro. Tiene un papel importante en el mantenimiento del estado redox de los grupos tioles de las proteínas (Sen, 1998). La Trx dona electrones de su sitio activo a los puentes disulfuro de las proteínas [Proteína-(SH)<sub>2</sub>], como resultado queda la Trx oxidada en el puente disulfuro, la cual es reducida directamente por la tioredoxina reductasa con electrones donados por el NADPH (Holgrem, 1989).



**Figura 5. Mecanismo del sistema tioredoxina.**

Trx: Tioredoxina. Prx: Peroxiredoxina. Trx: Tioredoxina. NADPH: Nicotinamida-Adenina Dinucleótido Fosfato reducido. NADP: Nicotinamida-Adenina Dinucleótido Fosfato oxidado. ROOH: Peróxido orgánico reducido. ROH: Alcohol.

*S. cerevisiae* contiene un sistema citoplasmático que comprende las tioredoxinas Trx1p, Trx2p y a la tioredoxina reductasa Trr1p. Además posee un sistema de tioredoxinas en la mitocondria que esta formado por la tioredoxina Trx3 y la tioredoxina reductasa Trr2p (Trotter y Grant, 2005). Existen evidencias que sugieren que el sistema citoplásmico de Trx tiene funciones sobrelapadas con el sistema de glutaredoxina (Muller y cols., 1996, Draculic y cols., 2000), pero el sistema mitocondrial no es capaz de sustituir al sistema citoplásmico ó al sistema de glutaredoxina (Draculic y cols., 2000). Las tioredoxinas mitocondriales están implicadas en la defensa contra el estrés oxidativo generado durante el metabolismo respiratorio (Pedrajas y cols., 1999).

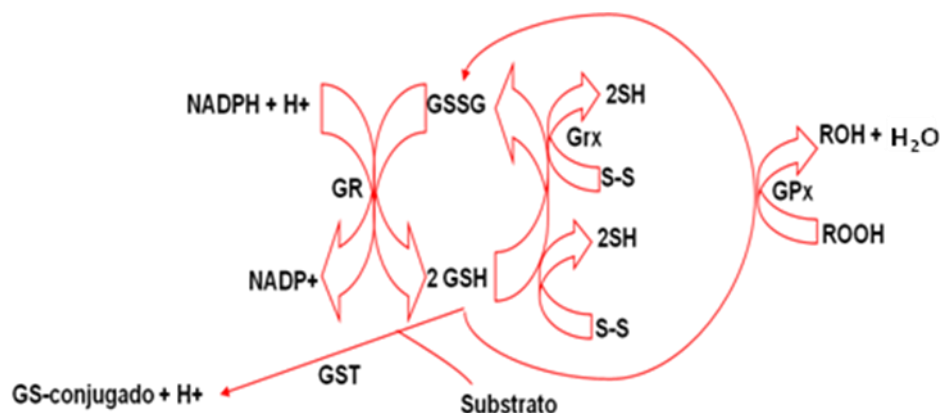
En *C. albicans* la localización de la tioredoxina Tsa1p depende de las condiciones de crecimiento. Una fusión Tsa1p-GFP reveló que en células levaduriformes la proteína se localiza en núcleo y citoplasma, mientras en las células en forma de hifa se encuentra únicamente en la superficie celular (Urban y cols., 2003; Shin y cols., 2005). Interesantemente, análisis de espectrometría de masas mostraron que Trxs también se sobreexpresan en células que forman bio-películas (Seneviratne y cols., 2008).

En *C. glabrata* la tioredoxina CgTsa1p se sobre-expresa en células que cambian fenotípicamente de color blanco a café oscuro, en presencia de  $\text{CuSO}_4$  (Srikanta y cols., 2005), este cambio fenotípico en *C. albicans* se considera un factor de virulencia. Lo que sugiere que CgTsa1p podría estar implicada en funciones no obvias de colonización y virulencia. También se ha observado que CgTsa1p puede contribuir a la resistencia a los azoles y podría incrementar la

expresión de *ERG11* (gen que codifica para la 14- $\alpha$ -dimetilasa, proteína central en la biosíntesis del ergosterol y blanco de antifúngicos) (Rogers y cols., 2006).

### 1.2.3.1.5 Glutaredoxina

La glutaredoxina (Grx) es una enzima oxidoreductasa cuya función es proteger y reparar los grupos tiol de las proteínas (Starke y cols., 1997; Holmgren, 1989). La glutaredoxina establece un ciclo redox con el glutatión y la glutatión reductasa (Fig. 6).



**Figura 6. Sistema antioxidante glutaredoxina.**

Grx: Glutaredoxina. GPx: Glutatión peroxidasa. GSH: Glutatión reducido. GSSG: Glutatión oxidado.

NADPH: Nicotinamida-Adenina Dinucleótido Fosfato reducido. NADP: Nicotinamida-Adenina Dinucleótido Fosfato oxidado. ROOH: Peróxido orgánico reducido. ROH: Alcohol.

Aunque parece que la glutaredoxina y la tioredoxina tienen la misma función, su afinidad por los sustratos es diferente, pero ambas son complementarias en la reparación de los grupos tiol (Yoshitake y cols., 1994). Las

Grxs oxidadas son reducidas por el tripeptido glutatión (GSH) que utiliza los electrones donados por el cofactor NADPH (Holgrem, 1989).

En *S. cerevisiae* Grx1 y Grx2 son glutaredoxinas ditiólicas citosólicas, mientras Grx3, Grx4 y Grx5 son monotiólicas. Grx5 se localiza en la matriz mitocondrial y su actividad es muy importante ya que en su ausencia enzimas con centros Fe/S son inactivas, no hay crecimiento en condiciones respiratorias, hay acumulación de hierro intracelular y se produce una oxidación constitutiva de las proteínas. Grx3 y Grx4 poseen un dominio de exporte nuclear (NES) homólogo al de la tioredoxina que les permite localizarse en núcleo. Se demostró que las Gpxs ditiólicas son funcionalmente divergentes de las monotiólicas, ya que las Gpxs ditiólicas de *S. cerevisiae* no son capaces de rescatar los defectos de la mutante *grx5Δ* (Gpx monotiólica), mientras que las monotiólicas si complementan cuando son dirigidas a la matriz mitocondrial (Molina y cols., 2004). Grx6 se localiza en el retículo endoplásmico y el aparato de Golgi, es considerada la primera glutaredoxina monotiólica que se une directamente al grupo hierro-sulfuro. El grupo hierro-sulfuro puede ser estabilizado por glutatión reducido y su pérdida resulta en la conversión de tetrámeros a dímeros. Grx7 se encuentra también en el Golgi y una característica importante es que no se une a iones metálicos, pero se modifica covalentemente mediante una inserción de los aminoácidos G(S/T)<sub>n</sub>, entre una lisina conservada y la cisteína del sitio activo. Las diferencias entre las glutaredoxinas probablemente reflejan las diversas funciones *in vivo* y explica porque en *S. cerevisiae* existen al menos siete glutaredoxinas (Izquierdo y cols., 2008; Mesecke y cols., 2008).



Como *S. cerevisiae*, *C. glabrata* posee tres Grx monotiólicas, dos CgGrx con un dominio de exporte nuclear (NES) homólogo al de la tioredoxina que les permite localizarse en núcleo mientras *C. albicans* solo tiene una Grx de este tipo (Trx-Grx) (Herrero, 2005). El hecho que glutaredoxinas con NES homóloga al de las tioredoxinas estén presentes en estas levaduras sugiere que este tipo de estructura apareció antes de la divergencia entre *C. glabrata* y *S. cerevisiae* (Herrero, 2005).

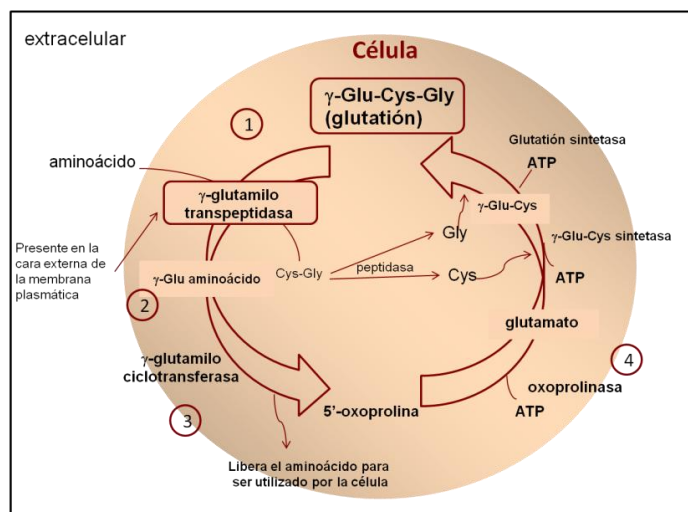
### 1.2.3.2 Antioxidantes no enzimáticos

Para protegerse de las ERO la célula tiene además de los sistemas enzimáticos, moléculas que no son enzimas, pero que tienen la capacidad de eliminar a los radicales libres. Estas moléculas son: el glutatión, las vitaminas E y C, los carotenos, los tioles, las poliaminas y el ácido eritroascórbico (Packer y cols., 1979; Gutteridge, 1994; Sies, 1997).

#### 1.2.3.2.1 Glutatión

El glutatión (GSH) es un tripéptido formado por glicina, cisteína y ácido glutámico (L- $\gamma$ -glutamil-L-cisteinilglicina). Es el tiol más abundante en la célula. Está implicado en la defensa celular contra xenobióticos, radicales libres e hidroperóxidos. El GSH se sintetiza por la reacción de dos enzimas, la glutatión sintetasa (*GSH1*) y la  $\gamma$ GCS ( $\gamma$ -L-glutamil-L-cisteína sintetasa, *GSH2*). El glutatión se exporta fuera de la célula por medio de un transportador específico. Se degrada en el ciclo del  $\gamma$ -glutamilo (Fig. 7) (Meister y Anderson, 1983).

El glutatión es un antioxidante, y algunas veces cofactor de diversas enzimas, proteínas y otras biomoléculas protegiéndolas de las ERO. Interviene en procesos metabólicos como la comunicación intramolecular, transporte de metales y en la regulación del estado redox de las proteínas durante los procesos de degradación y plegamiento (Meister, 1995; Anderson, 1997; Pastore y cols., 2003). El glutatión es un reservorio de cisteína para la célula (Elskens y cols., 1991).



**Figura 7. Ciclo de síntesis y degradación del glutatión (ciclo del  $\gamma$ -glutamilo) (Modificado de Meister, 1973; Meister y Anderson, 1983).**

1. El glutatión se sintetiza en la célula y se transporta a la superficie externa de la membrana plasmática.
2. La enzima  $\gamma$ -glutamilo transpeptidasa cataliza la transferencia de un grupo  $\gamma$ -glutamilo del glutatión al aminoácido. Esto facilita la captación del  $\gamma$ -glutamilo aminoácido por la célula.
3. La  $\gamma$ -glutamilo ciclotransferasa libera el aminoácido para que sea usado por la célula.
4. El glutatión es resíntetizado por la acción de la oxoprolinasa, la  $\gamma$ -glutamilo cisteinil sintetasa y la glutatión sintetasa, en tres reacciones ATP-dependientes.

### 1.2.3.2.2 Vitamina E

La vitamina E es el antioxidante liposoluble de membrana más importante. El término vitamina E agrupa al menos ocho isómeros estructurales de tocoferoles

y tocotrienoles. Los tocoferoles se localizan en la mitocondria y retículo endoplásmico y es el  $\alpha$ -tocoferol el que posee la mayor actividad antioxidante (Burton y Traber, 1990). La vitamina E es capaz de neutralizar los radicales hidroxilo, superóxido y radicales libres lipídicos (Burton e Ingold, 1981). La neutralización por la vitamina E de un radical provoca la formación de un complejo radical-vitamina E, que es reciclado a vitamina E por el glutatión o el ascorbato (Burton y Traber, 1990).

#### **1.2.3.2.3 Vitamina C**

La vitamina C (ácido ascórbico) es una molécula hidrosoluble, capaz de neutralizar los radicales hidroxilo, superóxido y lipohidroperóxido. Su función principal es regenerar otras moléculas pequeñas como el GSH,  $\beta$ -caroteno y urato. Cuando se recicla la vitamina C se consume el ascorbato pasando a radical ascorbato, el cual puede a su vez pasar reciclado por la NADH semiascorbil reductasa, o por tioles celulares como el glutatión o el ácido dihidrolipoico (Sevanian y cols., 1985).

#### **1.2.3.2.4 Poliaminas**

Son moléculas derivadas de aminoácidos que están cargadas positivamente, lo que les permite unirse a DNA, RNA y algunas proteínas. Son compuestos nitrogenados alifáticos implicados en la protección contra el estrés oxidativo. Las poliaminas detoxifican principalmente al radical superóxido. La espermidina y la espermina son esenciales para el crecimiento aeróbico de *S. cerevisiae* (Balansudaram y cols., 1991; Balansudaram y cols., 1993).

### 1.2.3.2.5 Ácido Eritroascórbico

El ácido eritroascórbico es un compuesto con propiedades similares al ácido ascórbico. Es un agente reductor que reacciona con los radicales hidroxilo, superóxido y peróxido de hidrógeno. También se ha reportado como cofactor de algunas enzimas (Peterkofsky, 1991). El ácido eritroascórbico a pesar de haber sido identificado en *S. cerevisiae*, su papel específico no ha sido todavía determinado (Nick y cols., 1986; Kim y cols., 1998; Spickett y cols., 2000).

### 1.2.4 Factores transcripcionales

En levaduras al igual que en otros organismos se han descrito varios factores transcripcionales que regulan la expresión de genes que codifican para enzimas con actividad antioxidante.

#### 1.2.4.1 Yap1p

El factor transcripcional Yap1p controla la activación de genes de respuesta a estrés oxidativo. Yap1p es un homólogo de c-jun, el producto de un oncogén de mamíferos que como heterodímero u homodímero con c-fos forma el activador transcripcional AP-1; Yap1p también es capaz de unirse a sitios AP-1 *in vitro* e *in vivo*. *S. cerevisiae* tiene ocho proteínas tipo AP-1: Yap1p-Yap8p, las cuales contienen un dominio básico con una cremallera de leucina (b-ZIP) y un dominio rico en cisteínas (CRD) en sus extremos amino y carboxilo terminal (n-CRD y c-CRD) (Fernandes y cols., 1997; Toone y cols., 2001). Yap1p fue la primera proteína descrita de esta familia y se identificó por su capacidad de unirse y activar el elemento ARE (AP-1 recognition element) en el promotor del virus SV-40, que

es similar al de la familia de transactivadores de mamíferos c-Jun (Harshman y cols., 1988). Yap1p reconoce la secuencia T(C/G)ACTAA (Kuge y Jones, 1994; Wu y Moye-Rowley, 1994). Una mutación en el gen *YAP1* resulta en hipersensibilidad a peróxido, diamida, ciertos electrófilos y cadmio (Toone y cols., 2001). En cambio, cepas con un alto número de copias del gen *YAP1* son hiperresistentes a compuestos tóxicos, como cicloheximida, cadmio, alquilantes y quelantes de  $Zn^{2+}$  y  $Fe^{2+}$  (Hussain y Lenard, 1991; Hertle y cols., 1991; Schnell y Entian, 1991). También se produce un incremento en la expresión de superóxido dismutasa, glucosa-6-fosfato deshidrogenasa, glutatión reductasa y glutatión. Yap1p también regula los siguientes genes *PDR5*, *YCF1* y *SNQ2* (transportadores ABC), *GSH1* (sintetasa de  $\gamma$ -glutamilcisteína), *GLR1* (glutatión oxidoreductasa), *TRX2* (tioredoxina), *TRR1* (tioredoxina reductasa), *TSP1* (trehalosa fosfato sintetasa) y *SSA1* (ATP-asa). Así mismo, en los promotores de *SOD1* (superóxido dismutasa) y *ZWF1* (deshidrogenasa de glucosa-6-fosfato) se han localizado posibles sitios de unión de Yap1p (Wu y Moye-Rowley, 1994; Kuge y Jones, 1994; Wemmie y cols., 1994; Morgan y cols., 1997; Gounalaki y Thireos, 1994; Stephen y cols., 1995).

Yap1p en condiciones normales de crecimiento se localiza en el citoplasma y núcleo, pero en respuesta a estrés oxidativo se acumula en núcleo (Kuge y cols., 1997). La traslocación de Yap1p al núcleo es regulada por sus extremos amino y carboxilo terminal, ya que la retención nuclear de Yap1p es mediada por los dos dominios ricos en cisteínas, uno formado por los residuos C598, C620 y C629 en el extremo C-terminal (c-CRD) en donde se sobrelapa con la señal de exportación

nuclear (NES) (Kuge y cols., 1997), y el otro, hacia el extremo N-terminal (n-CRD) conteniendo las cisteínas C303, C310 y C315 (Delaunay y cols., 2000). En condiciones oxidantes, la exportina Crm1 no se puede unir a la señal nuclear de exportación (NES) de Yap1 y de esta manera se impide su salida al citoplasma (Yan y cols., 1998). Yap1p también es regulado a nivel postraducciona, ya que diferentes oxidantes activan a Yap1p de forma distinta; la activación por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ocurre a través de la formación de un enlace disulfuro intramolecula entre las cisteínas C303 y C598 (Delaunay y cols., 2000), mientras en la activación por diamida participan las cisteínas C598, C620 y C629 (Kuge y cols., 2001). Se ha demostrado que la glutatión peroxidasa Gpx3p se requiere para oxidar Yap1p en presencia de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Delaunay y cols., 2002). Se propone también que la proteína Ybp1 (por Yap1 binding protein) actúa de manera paralela a Gpx3p, aunque el mecanismo no se ha caracterizado (Veal y cols., 2003).

Mientras Yap1p ha sido estudiada ampliamente, las funciones del resto de las proteínas AP-1 no han sido estudiadas a profundidad (Toone y Jones, 1999; Toone y cols., 2001). La sobreexpresión de Yap2p confiere tolerancia celular a cadmio y al fármaco citotóxico 1,10-fenantrolina (Bossier y cols., 1993; Wu y cols., 1993). Yap4p (Cin5p) y Yap6p (Hal7p) son proteínas nucleares que confieren resistencia al fármaco antitumoral cisplatino cuando se sobre-expresan (Furuchi y cols., 2001). Yap6p (Hal7p) y Yap7p (Hal6p) incrementan la tolerancia a sodio y litio (Mendizabal y cols., 1998). Yap8p (Acr1p/Arr1p) está involucrada en la tolerancia a arsénico, probablemente mediante la regulación de la expresión de *ACR2* y *ACR3* (Bobrowicz y cols., 1997; Bouganim y cols., 2001).

Se ha reportado que el gen ortólogo de *YAP1* en *C. glabrata* responde a estrés oxidativo y compuestos como benomil, diamida y menadiona (Chen y cols., 2007). El gen ortólogo *YAP1* de *C. albicans* también responde a estrés oxidativo (Alarco y Raymond, 1999; Zhang y cols., 2000).

#### 1.2.4.2 Skn7p

Skn7p es un factor transcripcional que forma parte del sistema de dos componentes. Estos sistemas de transducción de señales constan de una primera proteína, una cinasa de histidina en la membrana celular. Esta proteína detecta la señal y fosforila una histidina en la segunda proteína (el segundo componente) que es la que regula la respuesta. El grupo fosfato se transfiere a un ácido aspártico del dominio receptor de esta segunda proteína. En procariotes, este segundo componente es un factor transcripcional que induce directamente la expresión de ciertos genes tras recibir la señal. Skn7p es parte del sistema de dos componentes y se ha demostrado que Skn7p tiene una función de activación transcripcional. Inicialmente se encontró que Skn7p era un factor transcripcional implicado en la respuesta a estrés oxidativo en un ensayo de búsqueda de genes cuya mutación provocaba hipersensibilidad a  $H_2O_2$  (Krems et al., 1995). Skn7p se encuentra localizado mayoritariamente en núcleo (Raitt y cols., 2000) y la caja a la que se une en respuesta a estrés oxidativo es: GGC(C/T)GGC (Tsuzi y cols., 2004).

Skn7p coopera con Yap1p para activar a *TRX2* y *TRR1* en respuesta a estrés oxidativo. Sin embargo, aunque ambos factores transcripcionales son importantes para conferir resistencia a  $H_2O_2$ , solamente Yap1p es importante para

la resistencia a cadmio ya que Skn7p tiene un efecto negativo para este compuesto. Por medio de geles bidimensionales en respuesta a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> se encontró, que Yap1 controla al menos 32 proteínas, 15 de las cuales también se inducen por Skn7p. También se encontró un grupo de proteínas que son controladas únicamente por Skn7p. De esta manera se tienen tres grupos de genes: los regulados por ambos factores transcripcionales y los controlados por Yap1p ó Skn7p (Lee y cols., 1999). Skn7p no sólo está implicado en estrés oxidativo, también participa en respuesta a otros tipos de estrés: a) Skn7p se une a la GTPasa Rho1 implicada en la síntesis de pared celular (Alberts y cols., 1998), b) Skn7p permite la inducción de los genes regulados por Hsf1p en respuesta a estrés (Raitt y cols., 2000), c) Skn7p se asocia con el factor transcripcional de ciclo celular Mbp1 (Bouquin y cols., 1999) y d) Skn7p estabiliza el factor Crz1 de la vía de la calcineurina (ruta importante en la regulación de la tolerancia celular a iones).

Skn7 en *C. albicans* participa en la REO. La mutante *skn7Δ* en *C. albicans* fue sensible a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Singh y cols., 2004).

#### **1.2.4.3 Msn2p/Mns4p**

Msn2p y Msn4p son factores transcripcionales con dominios de dedos de zinc, que median la respuesta general al estrés en *S. cerevisiae* (Martínez-Pastor y cols., 1996). *MSN2* y *MSN4* fueron aislados como supresores en multicopia de mutantes termosensibles en la cinasa Snf1p (Estruch y Carlson, 1993), implicada en la desrepresión de los genes reprimidos por glucosa en *S. cerevisiae*. Msn2p y Msn4p poseen cada una dos dominios de dedos de zinc del tipo C<sub>2</sub>H<sub>2</sub>, con alta



homología entre sí, y también con los dedos de zinc de otras proteínas. Msn2p/Msn4p responden a muchos tipos de estrés como, estrés por calor, ausencia de nitrógeno y glucosa, estrés oxidativo, estrés por etanol y estrés osmótico (Estruch y Carlson, 1993; Marchler y cols., 1993; Schuller y cols., 1994). En *S. cerevisiae*, ScMsn2p y ScMsn4p tienen una identidad del 41% y un 60% de similitud. Esta baja homología entre ambos factores transcripcionales sugiere que pueden activar a grupos de genes distintos en respuesta a estrés y que no son funcionalmente redundantes. La cepa mutante *msn2* $\Delta$  muestra una sensibilidad moderada al estrés, mientras la cepa *msn4* $\Delta$  presenta el mismo fenotipo que la cepa silvestre. Estos datos apoyan la idea que ScMsn2p es el factor principal en respuesta a estrés, y ScMsn4p sería secundario (Martínez-Pastor y cols., 1996). Cuando hay sobreexpresión de Msn2p ó Msn4p las cepas muestran un incremento en la resistencia a estrés por calor o ausencia de glucosa (Martínez-Pastor y cols., 1996), aunque la sobre-expresión de *MSN2* parece tener un mayor efecto protector que la de *MSN4*. Tanto la ausencia como la sobre-expresión de *MSN2* tienen efectos más claros que con *MSN4* (Martínez-Pastor y cols., 1996). Msn2p/Msn4p reconocen la misma secuencia en el DNA, denominada STRE (stress response element) CCCCT ó en orientación inversa, AGGGG. Estas secuencias se han encontrado en una gran cantidad de genes que participan en distintas condiciones de estrés. La secuencia STRE se identificó por primera vez en los genes *CTT1* (catalasa T citoplásmica (Wieser y cols., 1991) y *DDR2* (proteína de respuesta a multiestrés) (Kobayashi y McEntee, 1993). Una copia de esta secuencia en el promotor es suficiente para activar la transcripción de los genes que la contienen, aunque más copias conceden un efecto mayor a dicha

expresión (Kobayashi y McEntee, 1993; Treger y cols., 1998). Ambos factores transcripcionales se localizan tanto en el citoplasma como en el núcleo de las células en condiciones normales de crecimiento. Durante estrés se acumulan de manera rápida y reversible en el núcleo (Gorner y cols., 1998). Son regulados negativamente por la vía PKA (Marchler y cols., 1993).

En contraste, en *C. albicans* Msn2p/Msn4p no contribuyen significativamente a la respuesta al estrés (Nicholls y cols., 2004).

### **1.3 Desarrollo de un método de diagnóstico para *Candida glabrata***

Las infecciones por *Candida* son una causa importante de morbilidad y mortalidad en pacientes inmunocomprometidos. Debido a que las infecciones fúngicas no suelen ofrecer manifestaciones clínicas definidas que permitan detectar oportunamente, la falta de un método diagnóstico rápido dificulta el tratamiento oportuno de candidiasis ocasionada por *C. glabrata*. Los métodos usados actualmente para su diagnóstico están basados en características morfológicas y bioquímicas, como son su incapacidad para formar pseudo-hifas o hifas, el color de las colonias, el tamaño de las células, la asimilación de fuentes de carbono, la fermentación de azúcares y en algunos casos la asimilación de nitratos. Estos métodos tienen una baja especificidad y requieren de al menos 48 horas para ofrecer un diagnóstico. En el caso de candidemias si el número de microorganismos es bajo, estos métodos no logran detectar a *C. glabrata*. Esto retrasa su diagnóstico y pone en peligro la vida del paciente. En los últimos años los métodos basados en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) muestran

una mayor sensibilidad y rapidez. Este método utiliza la secuencia de los genes ribosomales y sus espaciadores internos (ITS). Una desventaja de este método es que los productos amplificados deben ser manipulados posteriormente para la correcta identificación. Dentro de los métodos moleculares se describe un método para identificar siete especies de *Candida* por medio de DHPLC desnaturizante, el cual permite un análisis de alta resolución de productos de PCR a partir de cultivos de sangre, en donde las amplificaciones son de las regiones variables ITS2 con un análisis subsecuente con el sistema de análisis microbiano WAVE. El DHPLC desnaturizante separa los productos de PCR los cuales son teñidos con tinción intercalable y se visualizan con un detector de fluorescencia. Este método es de alto costo y requiere un día de trabajo (Goldenberg y cols., 2005).

Asimismo, se ha reportado el uso de hibridación por fluorescencia *in situ* (FISH) con sondas de PNA para *C. albicans*, en donde se reportan datos variables en cuanto a la especificidad y sensibilidad del método. En ciertos reportes hay inconsistencias con cepas clínicas que no dieron un resultado positivo, pero al hacer las pruebas bioquímicas detectaron especies diferentes de *Candida*. La fiabilidad de la prueba depende del diseño de las sondas de oligonucleótidos. (Rigby y cols., 2002; Wilson y cols., 2005; Forrest y cols., 2006; Reller y cols., 2007)

Se requiere de un método de diagnóstico molecular, rápido y específico para identificar a *C. glabrata* en muestras complejas. Desarrollamos un método que identifica correctamente *C. glabrata*. La rapidez y la especificidad de esta prueba permitirá la prescripción de un tratamiento antifúngico temprano, lo cual se traducirá en un mejor pronóstico en pacientes con infecciones fúngicas graves.

## 1.4 Objetivos

En el presente trabajo nos propusimos los siguientes objetivos:

- 1) Estudiar la respuesta a estrés oxidativo en *Candida glabrata*.
- 2) Evaluar si diferentes aislados de *Candida glabrata* eran capaces de adherirse *in vitro* a células epiteliales, así como, analizar si esta adhesión esta mediada por las mismas adhesinas (Epas) en los distintos aislados.
- 3) Desarrollar un método de diagnóstico rápido y específico para identificar a *Candida glabrata*.

## Capítulo 2

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

## 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<sup>∇</sup>

Mayra Cuéllar-Cruz,<sup>†</sup> Marcela Briones-Martin-del-Campo,<sup>†</sup> Israel Cañas-Villamar, Javier Montalvo-Arredondo, Lina Riego-Ruiz, Irene Castaño, and Alejandro De Las Peñas<sup>\*</sup>

*División de Biología Molecular, Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, San Luis Potosí, San Luis Potosí 78216, México*

Received 7 January 2008/Accepted 18 March 2008

**We characterized the oxidative stress response of *Candida glabrata* to better understand the virulence of this fungal pathogen. *C. glabrata* could withstand higher concentrations of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> than *Saccharomyces cerevisiae* and even *Candida albicans*. Stationary-phase cells were extremely resistant to oxidative stress, and this resistance was dependent on the concerted roles of stress-related transcription factors Yap1p, Skn7p, and Msn4p. We showed that growing cells of *C. glabrata* were able to adapt to high levels of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and that this adaptive response was dependent on Yap1p and Skn7p and partially on the general stress transcription factors Msn2p and Msn4p. *C. glabrata* has a single catalase gene, *CTA1*, which was absolutely required for resistance to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in vitro. However, in a mouse model of systemic infection, a strain lacking *CTA1* showed no effect on virulence.**

Recent surveys show that *Candida* species are responsible for about 8% of all hospital-acquired bloodstream infections, and among these species, the two most frequently isolated are *Candida albicans* and *Candida glabrata* (60, 73). *C. glabrata* is an opportunistic fungal pathogen that is a commensal in human gastrointestinal and genitourinary tracts but that also causes severe invasive infections. Phylogenetically, *C. glabrata* is quite distinct from *C. albicans* but is closely related to *Saccharomyces cerevisiae*. The virulence attributes that allow *C. glabrata* to colonize human tissues and cause disseminated infections have recently started to be identified (reviewed in reference 40).

Phagocytic cells are the first line of defense against fungal infections (49). These cells generate reactive oxygen species (ROS), including superoxide, hydrogen peroxide (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), and hydroxyl radicals, that can damage all biomolecules and destroy phagocytosed pathogens (27, 70). ROS are also by-products of normal aerobic metabolism, and all aerobic organisms possess mechanisms to maintain very low levels of these species. In particular, a variety of small antioxidant molecules, such as glutathione and thioredoxin, are synthesized to scavenge ROS, and even tyrosine has been proposed to have a protective role against oxidative stress (48). In addition, several well-characterized enzymes, such as the superoxide dismutases, catalases, peroxidases, and glutathione peroxidases, are produced to eliminate ROS. Pathogens have coopted these

well-conserved antioxidation mechanisms to evade phagocyte defenses (5, 27, 69, 70); thus, the production of these enzymes is directly related to virulence (35, 76).

When cells are under oxidative stress, transcriptional remodeling occurs to ensure the proper response. The enzymes and the regulation of the oxidative stress response (OSR) are well conserved among fungal species. Catalases are well-conserved detoxifying enzymes catalyzing the conversion of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> to H<sub>2</sub>O and molecular oxygen (reviewed in references 1 and 2). *S. cerevisiae* has two catalase genes, both of which are required for detoxifying H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (13, 30, 65, 66, 72). Both *C. albicans* and *C. glabrata* carry only one catalase gene, and *C. albicans* catalase has been shown to play an important role in the virulence of *C. albicans* (56, 74, 76). The OSR in *S. cerevisiae* is in part under the control of the well-studied transcription factors Yap1p, Skn7p, Msn2p, and Msn4p (21, 43, 44, 46, 53, 64). *S. cerevisiae* Yap1p (ScYap1p) belongs to the family of basic leucine zipper domain transcription factors and controls the expression of at least 32 proteins of the H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> stimulon (46). Strains lacking Yap1p are hypersensitive to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. The Yap1p orthologs in *C. albicans* (Cap1p) (3, 78), *Schizosaccharomyces pombe* (Pap1p) (71), and *Ustilago maydis* (Yap1p) (52) have been characterized previously, and they are involved in the OSR. The *C. glabrata* Yap1p ortholog is functionally involved not only in the OSR, but also in resistance to different drugs (11). ScSkn7p contains a receiver domain found in the family of two-component signal transduction systems of prokaryotes and a DNA-binding domain similar to that of heat shock factor Hsf1p (6, 54). The target genes of ScSkn7p overlap with those of ScYap1p, and a *skn7Δ* strain is hypersensitive to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (46, 53). The *C. albicans* Skn7p ortholog has been characterized previously, and cells lacking Skn7p are modestly attenuated in virulence (68). ScMsn2p and ScMsn4p are functionally nonre-

<sup>\*</sup> Corresponding author. Mailing address: Camino a la Presa San José 2055, División de Biología Molecular, Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, San Luis Potosí, San Luis Potosí 78216, México. Phone: (52) 444 8342000. Fax: (52) 444 8342010. E-mail: cano@ipicyt.edu.mx.

<sup>†</sup> These authors contributed equally.

<sup>∇</sup> Published ahead of print on 28 March 2008.

TABLE 1. Strains used in this study

Strain	Parent	Genotype and/or description	Reference or source
<i>E. coli</i> strains			
DH10B		F <sup>-</sup> <i>mcrA</i> Δ( <i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i> ) φ80 <i>dlacZ</i> Δ <i>M15</i> Δ <i>lacX74</i> <i>deoR recA1 endA1 araD139</i> Δ( <i>ara leu</i> )7697 <i>galU galK</i> λ <sup>-</sup> <i>rpsL nupG</i>	7
JM109		<i>recA1 endA1 gyrA96 thi hsdR17</i> (r <sub>K</sub> <sup>-</sup> m <sub>K</sub> <sup>+</sup> ) <i>relA1 supE44</i> Δ( <i>lac-proAB</i> ) [F' <i>traD36 proAB lacI</i> Δ <i>M15</i> ]	77
<i>S. cerevisiae</i> strains			
W303		<i>MATa ura3-1 leu2-3,112 his3-11,15 trp1-1 can1-100 ade2-1 ade3::hisG</i>	51
YJM128		Clinical isolate	12
YJM336		Clinical isolate	12
<i>C. albicans</i> strains			
CA14		<i>ura3Δ::imm434/ura3Δ::imm434</i>	25
CA5		Clinical isolate	Lab collection
CA7		Clinical isolate	Lab collection
<i>C. glabrata</i> strains			
MC7		Clinical isolate	Lab collection
MC22		Clinical isolate	Lab collection
BG2		Clinical isolate (strain B)	22
BG14	BG2	<i>ura3Δ::Tn903</i> G418 <sup>r</sup> ; wt Ura <sup>-</sup> strain used in this study	15
BG462	BG14	<i>URA3</i>	18
BG1739 ( <i>msn2Δ</i> mutant)	BG14	<i>ura3Δ::Tn903</i> G418 <sup>r</sup> <i>msn2Δ</i> Hyg <sup>r</sup> Ura <sup>-</sup> pRD96/BcgI	R. Domergue and B. Cormack
BG1740 ( <i>msn4Δ</i> mutant)	BG14	<i>ura3Δ::Tn903</i> G418 <sup>r</sup> <i>msn4Δ</i> Hyg <sup>r</sup> Ura <sup>-</sup> pRD97/BcgI	R. Domergue and B. Cormack
BG1742 ( <i>msn2Δ msn4Δ</i> mutant)	BG1739	<i>ura3Δ::Tn903</i> G418 <sup>r</sup> <i>msn2Δ msn4Δ::hph</i> Hyg <sup>r</sup>	R. Domergue and B. Cormack
CGM295 ( <i>cta1Δ</i> mutant)	BG14	<i>ura3Δ::Tn903</i> G418 <sup>r</sup> <i>cta1Δ::hph</i> Hyg <sup>r</sup> pCV15/BcgI	This work
CGM297 ( <i>yap1Δ</i> mutant)	BG14	<i>ura3Δ::Tn903</i> G418 <sup>r</sup> <i>yap1Δ::hph</i> Hyg <sup>r</sup> pCV17/BcgI	This work
CGM306 ( <i>skn7Δ</i> mutant)	BG14	<i>ura3Δ::Tn903</i> G418 <sup>r</sup> <i>skn7Δ::hph</i> Hyg <sup>r</sup> pCV21/BcgI	This work
CGM308 ( <i>yap1Δ</i> mutant)	CGM297	<i>ura3Δ::Tn903</i> G418 <sup>r</sup> <i>yap1Δ</i> Hyg <sup>r</sup> Ura <sup>-</sup>	This work
CGM310 ( <i>yap1Δ skn7Δ</i> mutant)	CGM308	<i>ura3Δ::Tn903</i> G418 <sup>r</sup> <i>yap1Δ skn7Δ::hph</i> Hyg <sup>r</sup>	This work
CGM351 ( <i>cta1Δ</i> mutant)	CGM295	<i>URA3 cta1Δ::hph</i> Hyg <sup>r</sup>	This work
CGM385 ( <i>yap1Δ skn7Δ</i> mutant)	CGM310	<i>ura3Δ::Tn903</i> G418 <sup>r</sup> <i>yap1Δ skn7Δ</i> Hyg <sup>r</sup> Ura <sup>-</sup>	This work
CGM386 ( <i>yap1Δ skn7Δ msn2Δ</i> mutant)	CGM385	<i>ura3Δ::Tn903</i> G418 <sup>r</sup> <i>yap1Δ skn7Δ msn2Δ::hph</i> Hyg <sup>r</sup>	This work
CGM388 ( <i>yap1Δ skn7Δ msn4Δ</i> mutant)	CGM385	<i>ura3Δ::Tn903</i> G418 <sup>r</sup> <i>yap1Δ skn7Δ msn4Δ::hph</i> Hyg <sup>r</sup>	This work
CGM480 ( <i>yap1Δ skn7Δ msn4Δ</i> mutant)	CGM388	<i>ura3Δ::Tn903</i> G418 <sup>r</sup> <i>yap1Δ skn7Δ msn4Δ</i> Hyg <sup>r</sup> Ura <sup>-</sup>	This work
CGM537 ( <i>yap1Δ skn7Δ msn4Δ msn2Δ</i> mutant)	CGM480	<i>ura3Δ::Tn903</i> G418 <sup>r</sup> <i>yap1Δ skn7Δ msn4Δ msn2Δ::hph</i> Hyg <sup>r</sup>	This work

dundant Zn<sup>2+</sup> finger transcription factors involved in the general stress response, including the response to oxidative stress (reviewed in references 20 and 55). They control the expression of about 27 gene products regulated in response to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (31). Msn2p and Msn4p play an important role in stationary-phase (SP) survival under oxidative stress. *S. cerevisiae* cells lacking Msn2p and Msn4p are sensitive to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (21, 31, 50, 55, 63). Interestingly, *C. albicans* Msn2p (CaMsn2p) and CaMsn4p play no obvious role in the stress response, including the response to oxidative stress (58).

The OSR of *C. glabrata* has not been analyzed previously. In this study, we showed that the growth of *C. glabrata* could withstand higher concentrations of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> than that of *S. cerevisiae* and even that of *C. albicans* (see below) (5, 9). This phenotype could be seen in both log-phase (LP) and SP cells, but the phenotype was more profound in the latter case. SP resistance was dependent on the concerted roles of Yap1p,

Skn7p, and Msn4p. We also showed that *C. glabrata* was able to adapt to high levels of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and that this adaptive response was dependent on the stress-related transcription factors Yap1p and Skn7p and partially on the general stress transcription factors Msn2p and Msn4p. Lastly, we showed that the *C. glabrata* catalase gene *CTA1* was absolutely required for resistance to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in vitro. However, a strain lacking *CTA1* had no obvious phenotype in vivo in a mouse model of systemic infection.

#### MATERIALS AND METHODS

**Strains.** All strains used in this study are summarized in Table 1.

**Plasmids.** All plasmids used in this study are summarized in Table 2.

**Primers.** All primers used for cloning are summarized in Table 3.

**Media.** Yeast media were prepared as described previously (67), and 2% agar was added for plates. Yeast extract-peptone-dextrose (YPD) medium contained yeast extract at 10 g/liter and peptone at 20 g/liter and was supplemented with 2%





the loss of the hygromycin cassette and for 5-FOA resistance on SC-5-FOA plates for the loss of the Ura<sup>+</sup> plasmid pMZ17. URA<sup>+</sup> cells die on SC-5-FOA. This protocol allows the construction of multiple mutants. Plasmids and primers used for this procedure are described in Tables 2 and 3. Strains constructed in this way are described in Table 1.

**Mouse infections.** Eight- to 9-week-old BALB/c mice (Taconic) were infected with  $2.2 \times 10^7$  cells in a volume of 100  $\mu$ l by tail vein injection. The strains BG462 (wild type [wt] strain expressing URA3) and CGM351 (*cta1Δ URA3*) were grown overnight in YPD, and the cells were washed with  $1 \times$  PBS and resuspended in  $1 \times$  PBS to a concentration of  $2.2 \times 10^6$  cells/ml. The concentration of cells was determined by reading the optical density at 600 nm ( $OD_{600}$ ) of the culture (the concentration of BG462 cells at an  $OD_{600}$  of 1 is  $4 \times 10^7$ /ml), counting the cells in a hemocytometer, and plating serial dilutions and confirming the number of cells the following day. Mice were kept in cages in groups of 10 until they were sacrificed at day 7 after infection. Kidneys, livers, and spleens were retrieved from the mice, and the organs were homogenized. Dilutions of the homogenates were plated onto YPD-penicillin-streptomycin plates. CFU were counted the following day; geometric means are reported.

**H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> sensitivity assays.** All the starting overnight cultures of *C. glabrata* were grown for 36 h in YPD to an  $OD_{600}$  of 30.0 at 30°C. A 30% (wt/wt) H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> solution was obtained from Sigma-Aldrich. All liquid cultures and plates were incubated at 30°C. For H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> sensitivity assays of LP cells, overnight cultures were diluted in fresh rich medium (YPD) in such a way that all strains went through seven doublings to reach an  $OD_{600}$  of 0.5. Once the cultures reached an  $OD_{600}$  of 0.5 after seven doublings, the cultures were divided, exposed to different H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> concentrations, and incubated with shaking for 3 h. For the adaptation experiments, cells were pretreated for 1 h with a nonlethal H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> concentration and then challenged with a lethal concentration of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> for 2 additional hours. After the treatment, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> was removed by centrifugation, the cultures were resuspended in distilled H<sub>2</sub>O, the OD was adjusted when needed to an  $OD_{600}$  of 0.5, and the cultures were then serially diluted in 96-well plates. Each dilution was spotted onto YPD plates, and the plates were incubated at 30°C. All dilutions had the same amount of cells.

For SP experiments, cell cultures at an  $OD_{600}$  of 30.0 were diluted to an  $OD_{600}$  of 0.5 with distilled water or spent medium from the same strain. Cell cultures were divided into aliquots and treated with H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> at different concentrations for 3 h. After the treatment, the cultures remained at the same  $OD_{600}$  of 0.5 and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> was removed by centrifugation. Cells were resuspended in distilled water to an  $OD_{600}$  of 0.5, and the suspensions were diluted in 96-well plates and spotted onto YPD plates.

All manipulations for these assays were performed in a 30°C temperature-controlled room to prevent abrupt changes in temperature. It has been reported previously that cold shock has an impact on H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> resistance in *S. cerevisiae*. Since there were small variations among the results of these experiments, experiments were repeated at least four times.

## RESULTS

### *C. glabrata* is resistant to high levels of hydrogen peroxide.

In order to characterize the OSR in *C. glabrata*, we investigated the resistance of *C. glabrata* LP cells to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. *C. glabrata* strains (BG14 [lab reference strain] and clinical isolates [CI] MC7 and MC22) were treated with H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> as described in the legend to Fig. 1 and Materials and Methods. As shown in Fig. 1A, *C. glabrata* BG14 was able to survive exposure to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> at concentrations up to 40 mM. There was a severe loss of viability at 100 mM and a complete loss at 200 mM (data not shown), while CI MC7 and MC22 showed reduced resistance at 40 mM. We also performed an adaptation experiment by pretreating the LP cells with 10 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> for 1 h and then treating them with 100 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> for 2 additional hours. As shown in Fig. 1A (lane 10+100), the survival rate of BG14 cells pretreated with a low dose of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> was much higher than that of cells without this treatment, and CI MC7 and MC22 showed reduced adaptation compared to that of BG14. Experiments similar to those described above were also performed with *C. albicans* strains (CAI4 [lab reference strain] and CI CA5 and CA7) and *S. cerevisiae* strains (W303 [lab reference strain] and

CI YJM128 and YJM336). *C. albicans* CAI4 was resistant to 40 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and showed complete sensitivity to 100 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, while *C. albicans* CI showed reduced resistance compared to that of CAI4 (Fig. 1B). As shown in Fig. 1C, *S. cerevisiae* was resistant only to 6 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and completely sensitive to 8 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Interestingly, CI YJM128 and YJM336 were more resistant than the W303 lab reference strain. These experiments indicate that LP *C. glabrata* cells are modestly more resistant to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> than LP *C. albicans* cells and significantly more resistant than LP *S. cerevisiae* cells. In addition, *C. glabrata* and *C. albicans* cells were able to adapt, though to different levels, suggesting that adaptation is a common trait for both pathogens (Fig. 1A and B). Similarly, *S. cerevisiae* has been shown previously to be able to adapt to higher concentrations of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> when pretreated with a lower dose (14, 17, 37, 38).

It has been reported previously that SP cells of various bacterial and fungal pathogens are more resistant to oxidants than LP cells (16, 29). To determine if this is true also for *C. glabrata*, we treated *C. glabrata* strain BG14 and CI MC7 and MC22 as described in the legend to Fig. 2 and Materials and Methods. As shown in Fig. 2A, *C. glabrata* SP cells exhibited resistance to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> at concentrations up to 1,000 mM, significantly higher than those to which LP cells showed resistance. The same experiments were performed with *C. albicans* strain CAI4 and CI CA5 and CA7 and *S. cerevisiae* strain W303 and CI YJM128 and YJM336. As shown in Fig. 2B, *C. albicans* CAI4 showed resistance to up to 300 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> while CI showed resistance to up to 100 mM. *S. cerevisiae* W303 SP cells showed an increase in resistance compared to that of LP cells, exhibiting resistance to up to 100 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and complete sensitivity to 200 mM. Interestingly, *S. cerevisiae* CI were more resistant than the lab reference strain W303 (Fig. 2C). Overall, the SP levels of resistance were much higher than those in LP. These data are in agreement with previous findings that SP cells are more resistant to oxidative stress than LP cells. Moreover, our data confirm that *C. glabrata* in SP is intrinsically more resistant to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> than *S. cerevisiae* and *C. albicans* in SP.

**Role of the transcription factors Skn7p, Yap1p, Msn2p, and Msn4p in the OSR.** The key regulators of the OSR in *S. cerevisiae*, such as Skn7p, Yap1p, Msn2p, and Msn4p, are well characterized. *C. glabrata* orthologs of *S. cerevisiae* genes encoding these transcription factors were identified in the *C. glabrata* genome database (<http://cbi.labri.fr/Genolevures/elt/CAGL>), and an analysis of the amino acid sequence homology of *C. glabrata* and *S. cerevisiae* transcription factors was done by ClusalW alignment, with the following results: *C. glabrata* Skn7p (CgSkn7p; CAGL0F09097g), 48% identical and 15% similar to ScSkn7p; CgMsn2p (CAGL0F05995g), 25% identical and 16% similar to ScMsn2p; CgMsn4p (CAGL0M13189g), 22% identical and 13% similar to ScMsn4p; and CgYap1p (CAGL0H04631g), 36% identical and 12% similar to ScYap1p (11). We simply asked whether these transcription factors participate in the OSR in *C. glabrata*. We constructed *C. glabrata* mutant strains containing single (*yap1Δ* or *skn7Δ*), double (*yap1Δ skn7Δ*), triple (*yap1Δ skn7Δ msn2Δ* or *yap1Δ skn7Δ msn4Δ*), and quadruple (*yap1Δ skn7Δ msn2Δ msn4Δ*) deletions. Additional null strains including *msn2Δ*, *msn4Δ*, and *msn2Δ msn4Δ* strains were provided by R. Domergue and B. Cormack. We first characterized the sensitivities to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> treatment of the LP cells of the various *C. glabrata* deletion strains

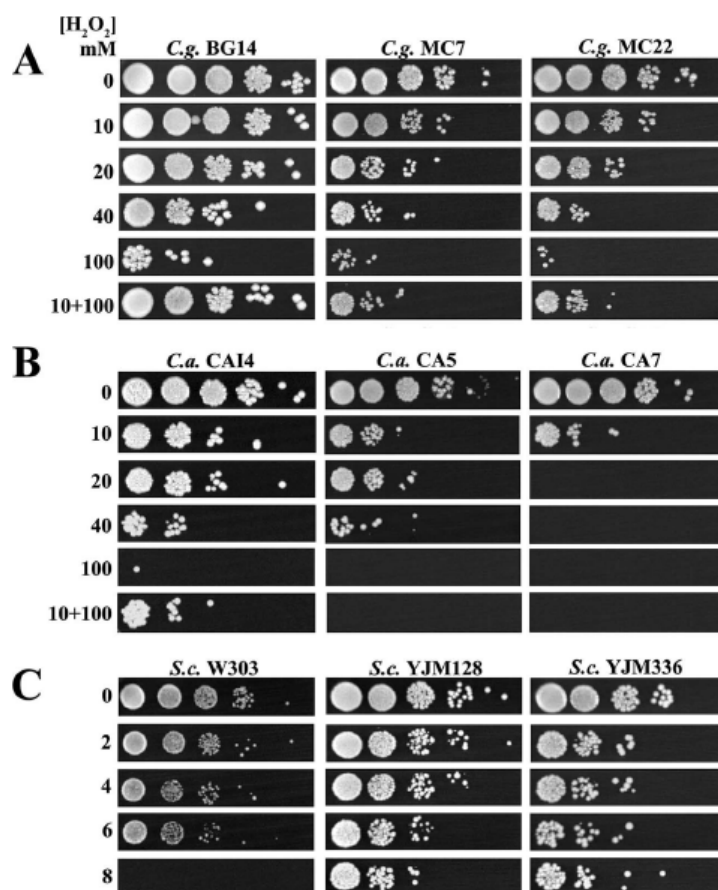


FIG. 1. *C. glabrata*, *C. albicans*, and *S. cerevisiae* LP resistance to  $H_2O_2$ . Saturated cultures of *C. glabrata* (*C.g.*) strain BG14 and CI MC7 and MC22 (A), *C. albicans* (*C.a.*) strain CA14 and CI CA5 and CA7 (B), and *S. cerevisiae* (*S.c.*) strain W303 and CI YJM128 and YJM336 (C) were diluted with fresh medium (YPD) so that all strains reached an  $OD_{600}$  of 0.5 after seven doublings at  $30^\circ C$ . *C. glabrata* and *C. albicans* strains were divided and exposed to 0, 10, 20, 30, 40, 50, and 100 mM  $H_2O_2$  and *S. cerevisiae* strains were exposed to 2, 4, 6, and 8 mM  $H_2O_2$  for 3 h. For adaptation experiments, *C. glabrata* and *C. albicans* cells were pretreated for 1 h with 10 mM  $H_2O_2$  and then with 100 mM  $H_2O_2$  for 2 additional hours. After the treatment,  $H_2O_2$  was removed by centrifugation. The cultures were resuspended in distilled water, and the  $OD_{600}$ s were adjusted when needed to 0.5. Cultures were serially diluted, and each dilution was spotted onto YPD plates, ensuring that the same amounts of cells were plated. Plates were incubated at  $30^\circ C$ . See Materials and Methods.

described above. As shown in Fig. 3A, the *yap1* $\Delta$  and *skn7* $\Delta$  strains showed reduced resistance to 10 mM  $H_2O_2$  compared to that of the parental wt strain. When treated with 100 mM  $H_2O_2$ , both the *yap1* $\Delta$  and *skn7* $\Delta$  strains lost viability, in contrast with the parental strain. The same phenotype was seen in the adaptation experiment. As shown in the bottom panel of Fig. 3A, when pretreated with a low dose of  $H_2O_2$  of 10 mM, the *yap1* $\Delta$  and *skn7* $\Delta$  strains could not adapt to the stress, in contrast with the parental strain. A *yap1* $\Delta$  *skn7* $\Delta$  strain showed the same phenotype as the strains carrying a single deletion of either gene, indicating that the corresponding transcription factors are needed for adaptation and resistance in LP and that they do not compensate for each other. Furthermore (Fig. 3A), since (i) the *yap1* $\Delta$  *skn7* $\Delta$  *msn2* $\Delta$  triple mutant had the same reduced resistance phenotype at 10 mM as the single and

double mutants (*yap1* $\Delta$ , *skn7* $\Delta$ , and *yap1* $\Delta$  *skn7* $\Delta$  strains), (ii) the *yap1* $\Delta$  *skn7* $\Delta$  *msn4* $\Delta$  triple mutant was more sensitive than the single and double mutants to 10 mM, and (iii) the quadruple mutant (*yap1* $\Delta$  *skn7* $\Delta$  *msn2* $\Delta$  *msn4* $\Delta$ ) behaved the same as the *yap1* $\Delta$  *skn7* $\Delta$  *msn4* $\Delta$  triple mutant (see Fig. 6A), Skn7p, Yap1p, and Msn4p together, but not Msn2p, coordinate the overall resistance in LP cells. Msn2p and Msn4p may play a role in adaptation since the *msn2* $\Delta$  *msn4* $\Delta$  double mutant but not the corresponding single mutants showed a subtle but reproducible defect in adaptation (Fig. 3B). These results indicate, first, not only that *C. glabrata* has conserved the adaptive response to oxidative stress in LP cells but also that this adaptation is dependent mainly on Skn7p and Yap1p and partially on both Msn2p and Msn4p and, second, that Skn7p, Yap1p, and Msn4p coordinate the control of the OSR since

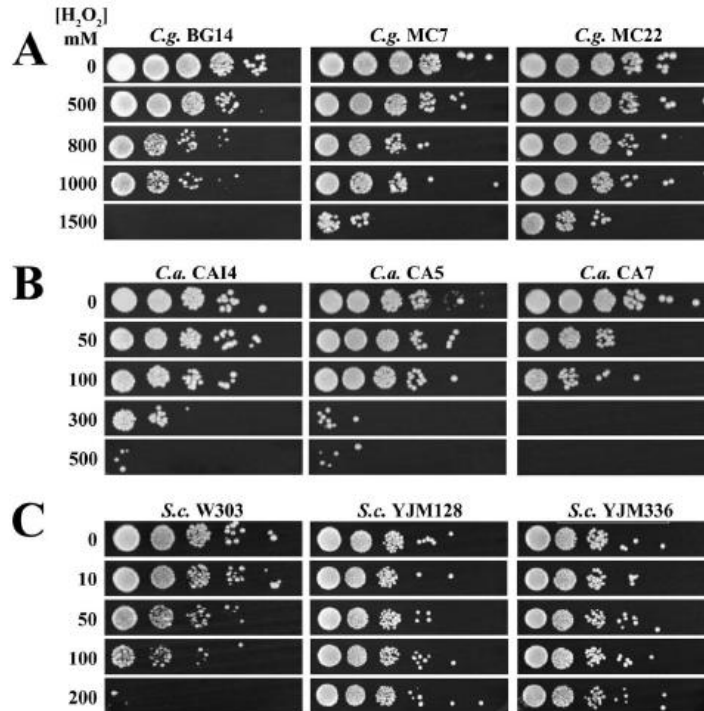


FIG. 2. *C. glabrata*, *C. albicans*, and *S. cerevisiae* SP resistance to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Saturated cultures of *C. glabrata* (C.g.) strain BG14 and CI MC7 and MC22 (A), *C. albicans* (C.a.) strain CA14 and CI CA5 and CA7 (B), and *S. cerevisiae* (S.c.) strain W303 and CI YJM128 and YJM336 (C) were diluted to an OD<sub>600</sub> of 0.5 with spent medium from the same cultures. The cells were divided into aliquots and treated for 3 h with H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> at different concentrations: for *C. glabrata*, 500, 800, 1,000, and 1,500 mM; for *C. albicans*, 0, 50, 100, 300, and 500 mM; and for *S. cerevisiae*, 0, 10, 50, 100, and 200 mM. After the treatment, the cultures remained at an OD<sub>600</sub> of 0.5, oxidant was removed by centrifugation, cells were resuspended in distilled water, and suspensions were diluted and spotted onto YPD plates. Plates were incubated at 30°C. See Materials and Methods.

the triple and quadruple mutants were almost as sensitive as the *cta1Δ* mutant in LP (see below and Fig. 6A).

We then tested the role of these transcription factors for resistance in SP. Saturated cultures (OD<sub>600</sub> 30.0) of the parental strain BG14 and single (*yap1Δ*, *skn7Δ*, *msn2Δ*, and

*msn4Δ*), double (*yap1Δ skn7Δ* and *msn2Δ msn4Δ*), triple (*yap1Δ skn7Δ msn2Δ* and *yap1Δ skn7Δ msn4Δ*), and quadruple (*yap1Δ skn7Δ msn2Δ msn4Δ*) mutants were treated as described in the legend to Fig. 2. Figure 4A shows that the *yap1Δ* mutant behaved as the parental strain, that the *skn7Δ* mutant

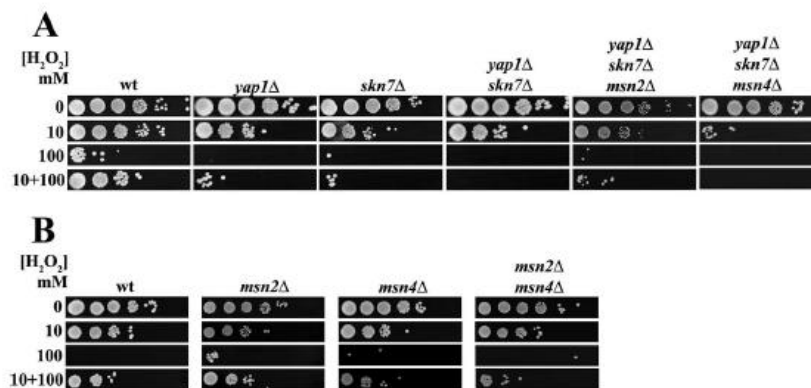


FIG. 3. Regulation of the OSR to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in LP. The wt (BG14) and single, double, and triple mutants with *yap1Δ*, *skn7Δ*, *msn2Δ*, and *msn4Δ* mutations were grown and treated with H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> as described in the legend to Fig. 1. See Materials and Methods.

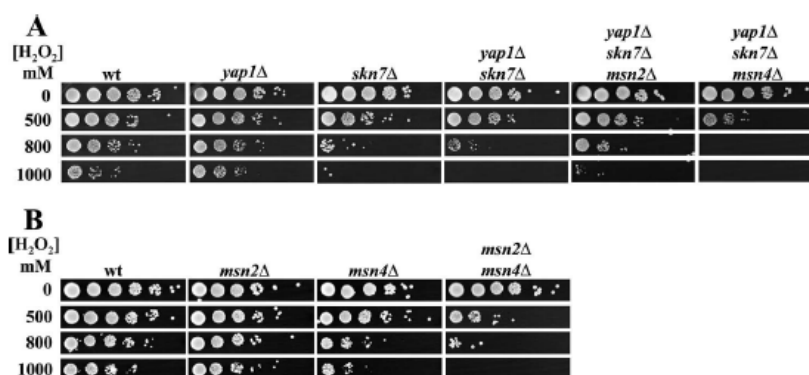


FIG. 4. Regulation of the OSR to  $H_2O_2$  in SP. The wt (BG14) and single, double, and triple mutants with *yap1Δ*, *skn7Δ*, *msn2Δ*, and *msn4Δ* mutations were grown and treated with  $H_2O_2$  as described in the legend to Fig. 2. See Materials and Methods.

was more sensitive to  $H_2O_2$  than the wt, and that the *skn7Δ* mutation is epistatic to *yap1Δ* (compare the data for the *yap1Δ skn7Δ* double mutant and the single *yap1Δ* and *skn7Δ* mutants). This finding indicates that, surprisingly, Skn7p but not Yap1p is required in SP. As in LP cells, Msn4p was required for resistance in SP cells: an *msn4Δ* single mutant and a triple mutant with *msn4Δ* in combination with *skn7Δ* showed reduced resistance to  $H_2O_2$  (Fig. 4). Interestingly, Msn2p has a role in SP since the *msn2Δ msn4Δ* double mutant was more sensitive than the *msn2Δ* and *msn4Δ* single mutants (Fig. 4B). These data suggest that Msn2p and Msn4p are both important and act independently of each other. The analysis of the triple and quadruple mutants (*skn7Δ yap1Δ msn2Δ*, *skn7Δ yap1Δ msn4Δ*, and *skn7Δ yap1Δ msn2Δ msn4Δ* strains) confirms the roles in SP of both Skn7p and Msn4p (Fig. 4A; also see Fig. 6B).

***CTA1* is absolutely required for resistance to  $H_2O_2$  in vitro.** Catalase plays a central role in the cell response against oxidative stress. We characterized the function of *C. glabrata* catalase Cta1p in the resistance to  $H_2O_2$  treatment. *S. cerevisiae* has two catalases, cytoplasmic (Ctt1p) and peroxisomal (Cta1p) (13, 30, 65, 66, 72), and *C. albicans* has only one catalase (Ctt1p) (76). Interestingly, the single *C. glabrata* catalase gene, *CTA1* (CAGL0K10868g), is the ortholog of *S. cerevisiae* *CTA1*, the gene for the peroxisomal catalase. CgCta1p and ScCta1p are 85% similar (78% identical and 7% similar) over the entire lengths of the proteins, and CgCta1p has two putative internal peroxisomal targeting signals (SKF) (59) (Fig. 5). It is not known whether CgCta1p is targeted to the peroxisome, the mitochondria, or the cytoplasm.

We tested whether *CTA1* is required in *C. glabrata* for the high-level resistance to  $H_2O_2$  displayed by both the LP and SP cells. A *CTA1* null strain (*cta1Δ*) was constructed. *cta1Δ* LP cells (Fig. 6A) and SP cells (Fig. 6B) behaved in the same way: *cta1Δ* cells completely lost their ability to survive at high concentrations of  $H_2O_2$  (>4 mM) (Fig. 6). Interestingly, *cta1Δ* LP cells were still able to adapt but only when exposed to low levels of  $H_2O_2$  (Fig. 6A, lane 1 + 4). This result may indicate the presence of a catalase-independent pathway to respond to  $H_2O_2$ . In SP, the *cta1Δ* mutant also became sensitive to  $H_2O_2$  (Fig. 6B). These results clearly indicate that this single Cta1p

plays a central role in the resistance of *C. glabrata* to  $H_2O_2$  either in LP or in SP cells. In addition, *CTA1* regulation in LP is likely controlled primarily by Skn7p, Yap1p, and Msn4p since the removal of these transcription factors rendered the cells almost as sensitive to  $H_2O_2$  as those of the *cta1Δ* strain (Fig. 6A). In SP, by contrast, the regulation was more complex since the triple and quadruple mutants lacking three or four of the transcription factors (*skn7Δ yap1Δ msn4Δ* and *skn7Δ yap1Δ msn2Δ msn4Δ* strains), while being less resistant than the wt, were still able to grow at 200 mM  $H_2O_2$ , displaying a level of resistance well above that of the *cta1Δ* strain (Fig. 6B). This result suggests the possibility of additional regulators of *CTA1* or an independent pathway to respond to  $H_2O_2$ .

**Cta1p is not necessary for virulence in *C. glabrata*.** Since Cta1p is entirely responsible for the extremely high level of resistance to  $H_2O_2$  in vitro (Fig. 6), *CTA1* is induced in macrophages (41), and CaCTA1 is required for virulence (56, 76), we investigated whether *C. glabrata* catalase plays a role during disseminated infection. Prior to the in vivo analysis, the parental and the mutant strains were made to express the Ura<sup>+</sup> phenotype by restoring *URA3* at the *URA3* locus to generate BG462 and CGM351 (see Materials and Methods). The two strains grew with identical doubling times in rich medium at 30 or 37°C (Fig. 7). To test for the virulence of the *cta1Δ* strain, we infected groups of 10 mice by tail vein injection using  $2 \times 10^7$  cells of strain BG462 (wt expressing *URA3*) or CGM351 (*cta1Δ URA3*). Mice were sacrificed on day 7 after infection, and CFUs in kidneys, spleens, and livers were enumerated (Materials and Methods). The average numbers of CFU of the mutant strain and the wt strain recovered from the three organ types showed no difference (Fig. 8). The results of these experiments indicate that Cta1p is required in vitro but is dispensable in the murine disseminated-infection model.

## DISCUSSION

Higher eukaryotes use ROS through the oxidative burst to eliminate invading pathogens (42, 57). During the coevolution of pathogens and their hosts, pathogens have coopted the antioxidant enzymes and molecules for normal ROS elimination to evade oxidative killing so that survival and persistence

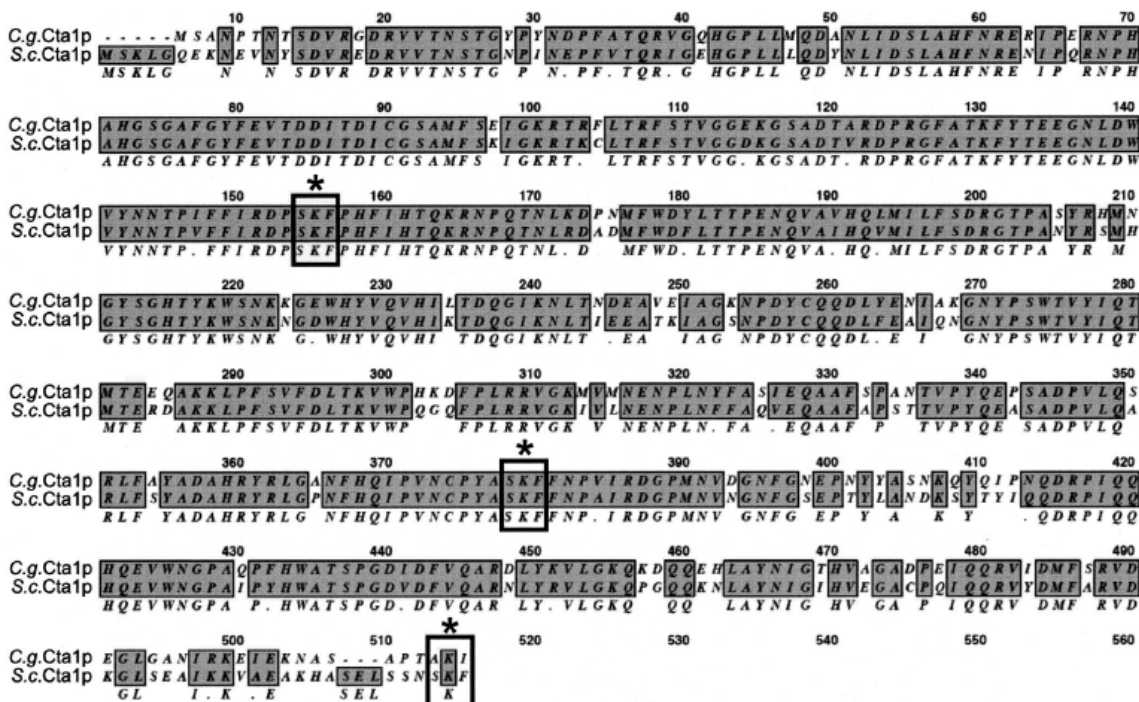


FIG. 5. ScCta1p and CgCta1p alignment. ScCta1p and CgCta1p are 85% similar across the entire lengths of the proteins. Identical residues are boxed and shaded. SKF (indicated by boxes and asterisks) is the peroxisomal targeting signal.

are ensured. *C. glabrata* is no exception; it possesses a defined genetic program to respond to oxidative killing by the host. *C. glabrata* adapts by reprogramming its gene expression, providing a clear advantage to this fungal pathogen upon infection. In this paper, we present evidence that the OSR in *C. glabrata* is controlled in part by the transcription factors Yap1p, Skn7p, Msn2p, and Msn4p. *C. glabrata* is resistant to extreme concen-

trations of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, and this resistance is mediated in vitro by the single catalase Cta1p. This single catalase is, however, dispensable in vivo.

**Resistance and adaptation to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.** Both the enzymes and the regulation of the OSR are well conserved among *S. cerevisiae*, *C. albicans*, and *C. glabrata*. Searching for genes involved in oxidative stress in the genome databases (<http://www>

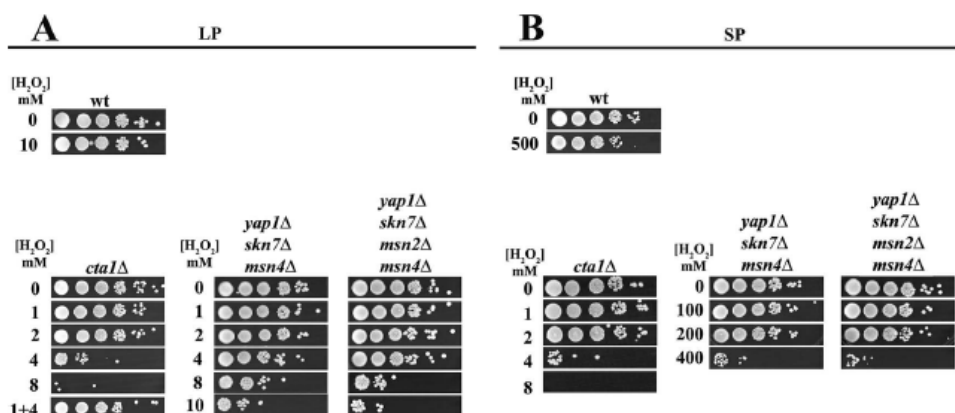


FIG. 6. Analysis of Cta1p in the OSR. Experiments with both LP and SP wt (BG14), *cta1Δ*, *yap1Δ skn7Δ msn4Δ*, and *yap1Δ skn7Δ msn2Δ msn4Δ* cells were performed as described in the legends to Fig. 1 and 2. See Materials and Methods.

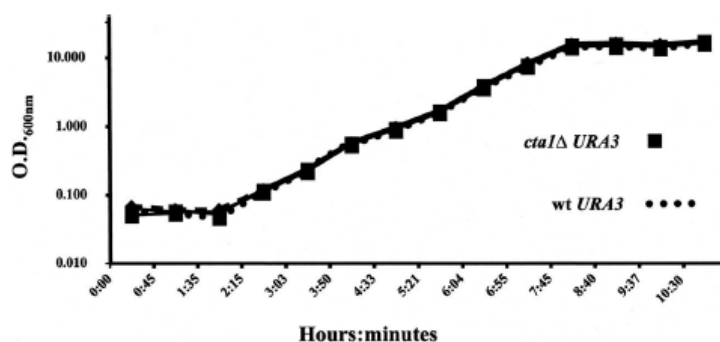


FIG. 7. Growth curves of the *cta1Δ* mutant versus the wt (BG14) at 37°C.

yeastgenome.org, <http://www.candidagenome.org>, and <http://cbl.labri.fr/Genolevures/elt/CAGL>, we found that of 96 oxidative stress-related genes in *S. cerevisiae*, 67 are present in *C. glabrata* and 49 are present in *C. albicans*. Additionally, six oxidative stress-related genes are present only in *C. albicans*. In *S. cerevisiae*, the OSR is partly under the control of the well-studied transcription factors Yap1p, Skn7p, Msn2p, and Msn4p. These transcription factors have orthologs in *C. glabrata*, as follows: Skn7p (63% similar), Msn2p (41% similar), Msn4p (35% similar), and Yap1p (48% similar). From the results of our study, the roles of these transcription factors seem to be conserved as well.

*C. glabrata* was naturally resistant to higher levels of  $H_2O_2$  than *C. albicans* and *S. cerevisiae* (Fig. 1 and 2). LP cells of *C. glabrata* were able to detect low levels of oxidant and induce a set of enzymes that would allow resistance to high levels and adaptation to the new environment. This response was mediated mainly by the transcription factors Skn7p and Yap1p but also by Msn2p and Msn4p (Fig. 3). This adaptation was present

among cells of both *C. albicans* (Fig. 1) and *S. cerevisiae*, in which both catalases and the transcription factors Yap1p and Skn7p are required for this response (14, 17, 23, 27, 37, 39). Furthermore, Yap1p, Skn7p, and Msn4p coordinated the response to oxidative stress in LP cells, which required at least the activation and induction of the catalase gene (Fig. 3). The roles of Msn2p and Msn4p are interesting in two ways: first, CaMsn2p and CaMsn4p have no obvious role in oxidative stress (58), and second, ScMsn2p and ScMsn4p perform non-redundant functions depending on the stress (reviewed in references 20 and 55). In *C. glabrata* upon oxidative stress, these two transcription factors appeared to work independently of each other. Both were needed for SP resistance (see below), and Msn4p was required for LP resistance, along with Skn7p and Yap1p (Fig. 3 and 4).

**SP is important for resistance.** It has been shown previously that not only yeast but other microorganisms in SP are more resistant to oxidants than the same organisms in LP (38, 61, 62), and *C. glabrata* is no exception. *C. glabrata* in SP was naturally resistant to high levels of  $H_2O_2$ , up to 1,000 mM, compared to about 100 mM  $H_2O_2$  for *S. cerevisiae* and 300 mM  $H_2O_2$  for *C. albicans* (Fig. 2) (5, 9). This resistance was controlled by Msn2p, Msn4p, and Skn7p (Fig. 4), whereas Yap1p did not appear to have a central role. This high-level resistance suggests that *C. glabrata* has an extremely efficient Cta1p and that it is probably able to repair efficiently the damage generated by the oxidant. It is possible that *C. glabrata* catalase activity may increase post-exponential phase. For example, *S. cerevisiae* catalase activity increases in SP (37), *C. albicans* shows growth phase-dependent resistance to  $H_2O_2$  (38, 75), and the *C. albicans* Mn-SOD3 superoxide dismutase is induced in SP and is needed for the OSR (45). This high-level natural resistance to  $H_2O_2$  may, in part, explain why *C. glabrata* is able to evade elimination by macrophages (41). Another clear advantage would be that *C. glabrata* can compete with  $H_2O_2$ -generating pathogens for specific niches inside the host. It has been shown previously that  $H_2O_2$ -producing bacteria inhibit the proliferation of *C. albicans* (75). Interestingly, CI of the nonpathogenic *S. cerevisiae* showed increased resistance to  $H_2O_2$  relative to that of the reference strain (Fig. 1C and 2C). This result is consistent with the idea that pathogens, in order to survive, require a proper response to oxidative stress.

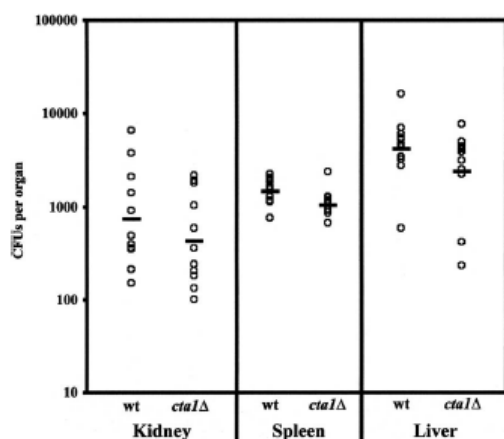


FIG. 8. Cta1p is dispensable in vivo. Numbers of CFU in kidney, spleen, and liver tissues 7 days postinfection with the wt (BG462) and the *cta1Δ* mutant (CGM351) are shown. Individual datum points represent results for individual mice in groups of 10 mice. The bars indicate the geometric mean for each group. See Materials and Methods.

**Catalase and virulence.** The *C. glabrata* single catalase (Cta1p) was absolutely required to confer resistance on LP and SP cells in vitro. *cta1Δ* cells were extremely sensitive (Fig. 6) to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. CgCta1p is the ortholog of the *S. cerevisiae* peroxisomal catalase (ScCta1p; 85% similar) (Fig. 5), which converts H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> formed by acyl coenzyme A oxidase (Pox1p) during fatty acid beta-oxidation (34) to H<sub>2</sub>O and O<sub>2</sub> in the peroxisomal matrix. CgCta1p is a monofunctional 57-kDa protein classified as a group III catalase (42). It is interesting that *S. cerevisiae* has two catalases, cytoplasmic (Ctt1p) and peroxisomal (Cta1p), and that *S. cerevisiae* was about 10 times less resistant than *C. glabrata* (Fig. 2). Surprisingly, it has been shown previously that both catalases in *S. cerevisiae* (Ctt1p and Cta1p) are dispensable in growing cells and that glutathione compensates for the lack of the catalases (37). The fungal pathogens *C. albicans* and *C. glabrata*, though distantly related phylogenetically, show increased resistance to oxidative stress relative to that of *S. cerevisiae*.

The results presented in Fig. 6 suggest that in LP cells *CTAI* may be controlled by the concerted actions of Yap1p, Skn7p, and Msn4p. The triple (*yap1Δ skn7Δ msn4Δ*) and quadruple (*yap1Δ skn7Δ msn2Δ msn4Δ*) mutants behaved exactly the same, rendering LP cells almost as sensitive as the *cta1Δ* strain (Fig. 6A). In fact, bioinformatic analyses of the CgCTAI promoter have previously revealed putative conserved *cis*-acting elements for each of these transcriptional regulators (reviewed in references 24, 32, and 36). In SP, however, both triple (*yap1Δ skn7Δ msn4Δ*) and quadruple (*yap1Δ skn7Δ msn2Δ msn4Δ*) mutants showed increased resistance to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> relative to that of the reference strain W303. (Fig. 6B). These mutants could still grow at elevated levels of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (up to 200 mM). This finding would indicate that in SP but not in LP, other transcriptional regulators of the *CTAI* gene besides Yap1p, Skn7p, Msn2p, and Msn4p are in play.

Is the catalase a virulence factor? (i) *cta1Δ* strains are extremely sensitive to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in vitro, (ii) CaCta1p is important for virulence (56, 76; reviewed in reference 10), and (iii) *CTAI* is induced after phagocytosis (26, 41, 47). We therefore assayed *cta1Δ* cells in a mouse model of systemic infection. The experiment showed no difference in the colonization of the kidney, spleen, and liver by the *cta1Δ* strain (Fig. 8). This finding is in strong contrast with the results of the in vitro experiments, in which *cta1Δ* cells were extremely sensitive to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Our results suggest either that the catalase is not important in the OSR in vivo or that there are additional factors that may compensate for the lack of Cta1p in vivo. One possibility is that glutathione may mediate H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> resistance in vivo, since it has been shown previously that both catalases and glutathione provide an overlapping antioxidant defense system in *S. cerevisiae* (28). The results also suggest that these additional factors are silent in vitro. In fact, the *cta1Δ* strain was still able to adapt to oxidative stress in vitro, though at low levels of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Fig. 6A). This finding indicates that there may be an additional catalase-independent pathway to respond to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Currently, we are working to identify these additional regulators/ effectors of the OSR.

#### ACKNOWLEDGMENTS

We thank B. Cormack and B. Ma for careful reading of the manuscript. We thank B. Cormack, A. Johnson, M. Christman, and C. Gross

for kindly providing strains. We are grateful to W. Hansberg, J. Aguirre, M. Soberón, A. Bravo, G. Soberón, P. León, M. Zurita, X. Soberón, A. González, J. Folch, E. Merino, B. Valderrama, and F. Sánchez for providing reagents and supplies. We thank B. Cormack, S. Pan, and M. Zupancic for helping with the in vivo experiments. We thank R. López-Revilla and L. Salazar for providing space and equipment.

This work was funded by CONACyT fellowships to M.C.-C. (163140), M.B.-M.-D.-C. (209276), I.C.-V. (224300), and J.M.-A. (209255) and by CONACyT grant no. CB-2005-48279 to A.D.L.P.

#### REFERENCES

- Aguirre, J., W. Hansberg, and R. Navarro. 2006. Fungal responses to reactive oxygen species. *Med. Mycol.* 44(Suppl.):101–107.
- Aguirre, J., M. Rios-Momberg, D. Hewitt, and W. Hansberg. 2005. Reactive oxygen species and development in microbial eukaryotes. *Trends Microbiol.* 13:111–118.
- Alarco, A. M., and M. Raymond. 1999. The bZip transcription factor Cap1p is involved in multidrug resistance and oxidative stress response in *Candida albicans*. *J. Bacteriol.* 181:700–708.
- Ausubel, F., R. Brent, R. E. Kingston, D. D. Moore, J. G. Seidman, J. A. Smith, and K. Struhl. 2001. Current protocols in molecular biology. John Wiley & Sons, Inc., New York, NY.
- Avery, A. M., and S. V. Avery. 2001. *Saccharomyces cerevisiae* expresses three phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidases. *J. Biol. Chem.* 276:33730–33735.
- Brown, J. L., H. Bussey, and R. C. Stewart. 1994. Yeast Skn7p functions in a eukaryotic two-component regulatory pathway. *EMBO J.* 13:5186–5194.
- 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, A. De Las Penas, N. Guo, M. C. Biery, N. L. Craig, and B. P. Cormack. 2003. Tn7-based genome-wide random insertional mutagenesis of *Candida glabrata*. *Genome Res.* 13:905–915.
- Chauhan, N., D. Inglis, E. Roman, J. Pla, D. Li, J. A. Calera, and R. Calderone. 2003. *Candida albicans* response regulator gene *SSK1* regulates a subset of genes whose functions are associated with cell wall biosynthesis and adaptation to oxidative stress. *Eukaryot. Cell* 2:1018–1024.
- Chauhan, N., J. P. Latge, and R. Calderone. 2006. Signalling and oxidant adaptation in *Candida albicans* and *Aspergillus fumigatus*. *Nat. Rev. Microbiol.* 4:435–444.
- Chen, K. H., T. Miyazaki, H. F. Tsai, and J. E. Bennett. 2007. The bZip transcription factor CgCap1p is involved in multidrug resistance and required for activation of multidrug transporter gene CgFLR1 in *Candida glabrata*. *Gene* 386:63–72.
- Clemons, K. V., J. H. McCusker, R. W. Davis, and D. A. Stevens. 1994. Comparative pathogenesis of clinical and nonclinical isolates of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Infect. Dis.* 169:859–867.
- Cohen, G., W. Rapatz, and H. Ruis. 1988. Sequence of the *Saccharomyces cerevisiae* CTA1 gene and amino acid sequence of catalase A derived from it. *Eur. J. Biochem.* 176:159–163.
- Collinson, L. P., and I. W. Dawes. 1992. Inducibility of the response of yeast cells to peroxide stress. *J. Gen. Microbiol.* 138:329–335.
- Cormack, B. P., and S. Falkow. 1999. Efficient homologous and illegitimate recombination in the opportunistic yeast pathogen *Candida glabrata*. *Genetics* 151:979–987.
- Cyrne, L., L. Martins, L. Fernandes, and H. S. Marinho. 2003. Regulation of antioxidant enzymes gene expression in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* during stationary phase. *Free Radic. Biol. Med.* 34:385–393.
- Davies, J. M., C. V. Lowry, and K. J. Davies. 1995. Transient adaptation to oxidative stress in yeast. *Arch. Biochem. Biophys.* 317:1–6.
- De Las Penas, A., S. J. Pan, I. Castano, J. Alder, R. Cregg, and B. P. Cormack. 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.
- Domergue, R., I. Castano, A. De Las Penas, M. Zupancic, V. Locketell, J. R. Hebel, D. Johnson, and B. P. Cormack. 2005. Nicotinic acid limitation regulates silencing of *Candida* adhesins during UTI. *Science* 308:866–870.
- Estruch, F. 2000. Stress-controlled transcription factors, stress-induced genes and stress tolerance in budding yeast. *FEMS Microbiol. Rev.* 24:469–486.
- Estruch, F., and M. Carlson. 1993. Two homologous zinc finger genes identified by multicopy suppression in a SNF1 protein kinase mutant of *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* 13:3872–3881.
- Fidel, P. L., Jr., J. L. Cutright, L. Tait, and J. D. Sobel. 1996. A murine model of *Candida glabrata* vaginitis. *J. Infect. Dis.* 173:425–431.
- Flattery-O'Brien, J., L. P. Collinson, and I. W. Dawes. 1993. *Saccharomyces cerevisiae* has an inducible response to menadione which differs from that to hydrogen peroxide. *J. Gen. Microbiol.* 139:501–507.

24. Folch-Mallol, J. L., A. Garay-Arroyo, F. Lledias, and A. A. Covarrubias Robles. 2004. The stress response in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. Rev. Latinoam. Microbiol. 46:24–46. (In Spanish.)
25. Fonzi, W. A., and M. Y. Irwin. 1993. Isogenic strain construction and gene mapping in *Candida albicans*. Genetics 134:717–728.
26. Fradin, C., P. De Groot, D. MacCallum, M. Schaller, F. Klis, F. C. Odds, and B. Hube. 2005. Granulocytes govern the transcriptional response, morphology and proliferation of *Candida albicans* in human blood. Mol. Microbiol. 56:397–415.
27. Gonzalez-Parraga, P., J. A. Hernandez, and J. C. Arguelles. 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.
28. Grant, C. M., G. Perrone, and I. W. Dawes. 1998. Glutathione and catalase provide overlapping defenses for protection against hydrogen peroxide in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. Biochem. Biophys. Res. Commun. 253:893–898.
29. Gray, J. V., G. A. Petsko, G. C. Johnston, D. Ringe, R. A. Singer, and M. Werner-Washburne. 2004. "Sleeping beauty": quiescence in *Saccharomyces cerevisiae*. Microbiol. Mol. Biol. Rev. 68:187–206.
30. Hartig, A., and H. Ruis. 1986. Nucleotide sequence of the *Saccharomyces cerevisiae* CTT1 gene and deduced amino-acid sequence of yeast catalase T. Eur. J. Biochem. 160:487–490.
31. Hasan, R., C. Leroy, A. D. Isnard, J. Labarre, E. Boy-Marcotte, and M. B. Toledano. 2002. The control of the yeast H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> response by the Msn2/4 transcription factors. Mol. Microbiol. 45:233–241.
32. 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.
33. Higgins, D. G., J. D. Thompson, and T. J. Gibson. 1996. Using CLUSTAL for multiple sequence alignments. Methods Enzymol. 266:383–402.
34. Hiltunen, J. K., A. M. Mursula, H. Rottensteiner, R. K. Wierenga, A. J. Kastaniotis, and A. Gurvitz. 2003. The biochemistry of peroxisomal beta-oxidation in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. FEMS Microbiol. Rev. 27:35–64.
35. Hwang, C. S., G. E. Rhie, J. H. Oh, W. K. Huh, H. S. Yim, and S. O. Kang. 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.
36. Ikner, A., and K. Shiozaki. 2005. Yeast signaling pathways in the oxidative stress response. Mutat. Res. 569:13–27.
37. Izawa, S., Y. Inoue, and A. Kimura. 1996. Importance of catalase in the adaptive response to hydrogen peroxide: analysis of acatalasemic *Saccharomyces cerevisiae*. Biochem. J. 320:61–67.
38. Jamieson, D. J. 1992. *Saccharomyces cerevisiae* has distinct adaptive responses to both hydrogen peroxide and menadione. J. Bacteriol. 174:6678–6681.
39. Jamieson, D. J., S. L. Rivers, and D. W. Stephen. 1994. Analysis of *Saccharomyces cerevisiae* proteins induced by peroxide and superoxide stress. Microbiology 140:3277–3283.
40. 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.
41. 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. USA 104:7628–7633.
42. Klotz, M. G., and P. C. Loewen. 2003. The molecular evolution of catalytic hydroperoxidases: evidence for multiple lateral transfer of genes between prokaryota and from bacteria into eukaryota. Mol. Biol. Evol. 20:1098–1112.
43. Krems, B., C. Charizanis, and K. D. Entian. 1996. The response regulator-like protein Pos9/Skn7 of *Saccharomyces cerevisiae* is involved in oxidative stress resistance. Curr. Genet. 29:327–334.
44. Kuge, S., and N. Jones. 1994. YAP1 dependent activation of TRX2 is essential for the response of *Saccharomyces cerevisiae* to oxidative stress by hydroperoxides. EMBO J. 13:655–664.
45. Lamarre, C., J. D. LeMay, N. Deslauriers, and Y. Bourbonnais. 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.
46. Lee, J., C. Godon, G. Lagniel, D. Spector, J. Garin, J. Labarre, and M. B. Toledano. 1999. Yap1 and Skn7 control two specialized oxidative stress response regulons in yeast. J. Biol. Chem. 274:16040–16046.
47. Lorenz, M. C., J. A. Bender, and G. R. Fink. 2004. Transcriptional response of *Candida albicans* upon internalization by macrophages. Eukaryot. Cell 3:1076–1087.
48. Lupo, S., C. Aranda, L. Miranda-Ham, H. Olivera, L. Riego, L. Servin, and A. Gonzalez. 1997. Tyrosine is involved in protection from oxidative stress in *Saccharomyces cerevisiae*. Can. J. Microbiol. 43:963–970.
49. Mansour, M. K., and S. M. Levitz. 2002. Interactions of fungi with phagocytes. Curr. Opin. Microbiol. 5:359–365.
50. Martinez-Pastor, M. T., G. Marchler, C. Schuller, A. Marchler-Bauer, H. Ruis, and F. Estruch. 1996. The *Saccharomyces cerevisiae* zinc finger proteins Msn2p and Msn4p are required for transcriptional induction through the stress response element (STRE). EMBO J. 15:2227–2235.
51. McDonald, J. P., A. S. Levine, and R. Woodgate. 1997. The *Saccharomyces cerevisiae* RAD30 gene, a homologue of *Escherichia coli* dinB and umuC, is DNA damage inducible and functions in a novel error-free postreplication repair mechanism. Genetics 147:1557–1568.
52. Molina, L., and R. Kahmann. 2007. An *Ustilago maydis* gene involved in H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> detoxification is required for virulence. Plant Cell 19:2293–2309.
53. Morgan, B. A., G. R. Banks, W. M. Toone, D. Raitt, S. Kuge, and L. H. Johnston. 1997. The Skn7 response regulator controls gene expression in the oxidative stress response of the budding yeast *Saccharomyces cerevisiae*. EMBO J. 16:1035–1044.
54. Morgan, B. A., N. Bouquin, G. F. Merrill, and L. H. Johnston. 1995. A yeast transcription factor bypassing the requirement for SBF and DSC1/MBF in budding yeast has homology to bacterial signal transduction proteins. EMBO J. 14:5679–5689.
55. Moye-Rowley, W. S. 2002. Transcription factors regulating the response to oxidative stress in yeast. Antioxid. Redox Signal. 4:123–140.
56. Nakagawa, Y., T. Kanbe, and I. Mizuguchi. 2003. Disruption of the human pathogenic yeast *Candida albicans* catalase gene decreases survival in mouse-model infection and elevates susceptibility to higher temperature and to detergents. Microbiol. Immunol. 47:395–403.
57. Nathan, C., and M. U. Shiloh. 2000. Reactive oxygen and nitrogen intermediates in the relationship between mammalian hosts and microbial pathogens. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 97:8841–8848.
58. Nicholls, S., M. Straffon, B. Enjalbert, A. Nantel, S. Macaskill, M. Whiteway, and A. J. Brown. 2004. Msn2- and Msn4-like transcription factors play no obvious roles in the stress responses of the fungal pathogen *Candida albicans*. Eukaryot. Cell 3:1111–1123.
59. Petrova, V. Y., D. Drescher, A. V. Kujumdzieva, and M. J. Schmitt. 2004. Dual targeting of yeast catalase A to peroxisomes and mitochondria. Biochem. J. 380:393–400.
60. Pfaller, M. A., and D. J. Diekema. 2007. Epidemiology of invasive candidiasis: a persistent public health problem. Clin. Microbiol. Rev. 20:133–163.
61. Schenberg-Frascino, A. 1972. Lethal and mutagenic effects of elevated temperature on haploid yeast. II. Recovery from thermolesions. Mol. Gen. Genet. 117:239–253.
62. Schenberg-Frascino, A., and E. Moustacchi. 1972. Lethal and mutagenic effects of elevated temperature on haploid yeast. I. Variations in sensitivity during the cell cycle. Mol. Gen. Genet. 115:243–257.
63. Schmitt, A. P., and K. McEntee. 1996. Msn2p, a zinc finger DNA-binding protein, is the transcriptional activator of the multistress response in *Saccharomyces cerevisiae*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93:5777–5782.
64. Schnell, N., B. Krems, and K. D. Entian. 1992. The PAR1 (YAP1/SNO3) gene of *Saccharomyces cerevisiae*, a c-jun homologue, is involved in oxygen metabolism. Curr. Genet. 21:269–273.
65. Seah, T. C., A. R. Bhatti, and J. G. Kaplan. 1973. Novel catalytic proteins of bakers' yeast. I. An atypical catalase. Can. J. Biochem. 51:1551–1555.
66. Seah, T. C., and J. G. Kaplan. 1973. Purification and properties of the catalase of bakers' yeast. J. Biol. Chem. 248:2889–2893.
67. Sherman, F., G. R. Fink, and J. B. Hicks. 1986. Methods in yeast genetics. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY.
68. Singh, P., N. Chauhan, A. Ghosh, F. Dixon, and R. Calderone. 2004. SKN7 of *Candida albicans*: mutant construction and phenotype analysis. Infect. Immun. 72:2390–2394.
69. Temple, M. D., G. G. Perrone, and I. W. Dawes. 2005. Complex cellular responses to reactive oxygen species. Trends Cell Biol. 15:319–326.
70. Thorpe, G. W., C. S. Fong, N. Alic, V. J. Higgins, and I. W. Dawes. 2004. Cells have distinct mechanisms to maintain protection against different reactive oxygen species: oxidative-stress-response genes. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 101:6564–6569.
71. Toda, T., M. Shimanuki, and M. Yanagida. 1991. Fission yeast genes that confer resistance to staurosporine encode an AP-1-like transcription factor and a protein kinase related to the mammalian ERK1/MAP2 and budding yeast FUS3 and KSS1 kinases. Genes Dev. 5:60–73.
72. Traczyk, A., T. Bilinski, J. Litwinska, M. Skoneczny, and J. Rytka. 1985. Catalase T deficient mutants of *Saccharomyces cerevisiae*. Acta Microbiol. Pol. 34:231–241.
73. Trick, W. E., S. K. Fridkin, J. R. Edwards, R. A. Hajjeh, and R. P. Gaynes. 2002. Secular trend of hospital-acquired candidemia among intensive care unit patients in the United States during 1989–1999. Clin. Infect. Dis. 35:627–630.
74. Vermitsky, J. P., K. D. Earhart, W. L. Smith, R. Homayouni, T. D. Edlind, and P. D. Rogers. 2006. Pdr1 regulates multidrug resistance in *Candida glabrata*: gene disruption and genome-wide expression studies. Mol. Microbiol. 61:704–722.
75. Westwater, C., E. Balish, and D. A. Schofield. 2005. *Candida albicans*-con-



- ditioned medium protects yeast cells from oxidative stress: a possible link between quorum sensing and oxidative stress resistance. *Eukaryot. Cell* 4:1654–1661.
76. **Wysong, D. R., L. Christin, A. M. Sugar, P. W. Robbins, and R. D. Diamond.** 1998. Cloning and sequencing of a *Candida albicans* catalase gene and effects of disruption of this gene. *Infect. Immun.* 66:1953–1961.
77. **Yanisch-Perron, C., J. Vieira, and J. Messing.** 1985. Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of the M13mp18 and pUC19 vectors. *Gene* 33:103–119.
78. **Zhang, X., M. De Micheli, S. T. Coleman, D. Sanglard, and W. S. Moye-Rowley.** 2000. Analysis of the oxidative stress regulation of the *Candida albicans* transcription factor, Cap1p. *Mol. Microbiol.* 36:618–629.

## Capítulo 3

**Oxidative stress response to menadione and cumene hydroperoxide in the opportunistic fungal pathogen *Candida glabrata***

**Running Title:** *Candida glabrata* oxidative stress response

**Oxidative stress response to menadione and cumene hydroperoxide in the opportunistic fungal pathogen *Candida glabrata***

Mayra Cuéllar-Cruz<sup>1,2</sup>, Irene Castaño<sup>1</sup>, Omar Arroyo-Helguera<sup>1</sup>, Alejandro De Las Peñas<sup>1/+</sup>

<sup>1</sup>División de Biología Molecular, Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, San Luis Potosí, San Luis Potosí, 78216, México

<sup>2</sup>Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo, Instituto de Ciencias Básicas e Ingeniería, Área Académica de Química, Pachuca, Hidalgo, 42060, México.

+Corresponding Author. Mailing address: Camino a la Presa San José 2055, División de Biología Molecular, Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, San Luis Potosí, San Luis Potosí, 78216, México. Phone: (52) 444 8342039. FAX: (52) 444 8342010. E-mail: cano@ipicyt.edu.mx

**ABSTRACT**

*Candida glabrata* is an opportunistic fungal pathogen which can cause severe invasive infections and can evade killing by phagocytic cells. We are interested in understanding the virulence of this fungal pathogen and in particular its oxidative stress response. Here we investigated *C. glabrata*, *Saccharomyces cerevisiae* and *Candida albicans* responses to two different oxidants: menadione and cumene hydroperoxide. In log-phase cells, in the presence of menadione, *C. glabrata* requires Cta1p (catalase), but Cta1p is dispensable in stationary phase cells. *C. glabrata* is less resistant to menadione than *C. albicans* in stationary phase. Even though *S. cerevisiae* laboratory reference strain is less resistant to menadione than *C. glabrata* and *C. albicans*, *S. cerevisiae* clinical isolates are more resistant than the lab reference strain. Furthermore, *S. cerevisiae* clinical isolates showed an increased catalase activity. Interestingly in stationary phase, *C. glabrata* and *S. cerevisiae* are more resistant to cumene hydroperoxide than *C. albicans* and Cta1p plays no apparent role in detoxifying this oxidant.

**Key words:** *Candida glabrata* – menadione - cumene - CTA1 - *Candida albicans* - *Saccharomyces cerevisiae*

## INTRODUCTION

**R**eactive **o**xxygen **s**pecies (ROS, including superoxide ion, hydrogen peroxide and hydroxyl radicals) are normal by-products of aerobic respiration. ROS can damage all biomolecules, but cells have developed enzymatic (catalases, superoxide dismutases, peroxidases) and non-enzymatic (glutathione, thioredoxin) mechanisms for keeping low levels of ROS. Phagocytic cells, which are the first line of defense against fungal infections, generate ROS in order to eliminate invading pathogens (Mansour & Levitz 2002). Interestingly, pathogens have co-opted these well conserved antioxidant mechanisms to evade phagocyte defenses, thus survival and persistence are ensured (Temple et al. 2005, Thorpe et al. 2004).

*Candida glabrata* is an opportunistic fungal pathogen which can cause severe invasive infections and recent surveys show that *C. glabrata* is one of the most frequently isolated species in hospital acquired disseminated infections (Trick et al. 2002). *C. glabrata* virulence factors have only recently been started to be identified (Kaur et al. 2005). *C. glabrata* has a well defined oxidative stress response. We have previously found that *C. glabrata* can withstand very high concentrations of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> relative to that of *S. cerevisiae* and even *Candida albicans* (Cuéllar-Cruz et al. 2008). **S**tationary **p**hase (SP) cells resistance to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> is dependent on the concerted role of Yap1, Skn7 and Msn4, well conserved stress-related transcription factors. **L**og-**p**hase cells (LP) of *C. glabrata* adapt to high levels of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and this adaptive response is dependent on Yap1 and Skn7 and partially on Msn2 and Msn4. The single catalase gene, *CTA1*, is absolutely required for resistance to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> *in vitro*, however, in a mouse model of systemic

infection, the catalase is dispensable. A strain lacking *CTA1* showed no effect on virulence (Cuéllar-Cruz et al. 2008).

In this report, in order to better understand the oxidative stress response in *C. glabrata*, we screened the resistance of *C. glabrata* to two different oxidants: menadione and cumene hydroperoxide (CHP). We asked whether *C.g.Cta1p* is important for this response. We compared the resistance to these oxidants with the distantly related fungal opportunistic pathogen *C. albicans*, and the non-pathogenic and closely related yeast *S. cerevisiae* (a laboratory reference strain and two *S. cerevisiae* clinical isolates [CIs]). Furthermore, we determined catalase activity in these strains.

## MATERIALS AND METHODS

### Strains

All strains used in this study are summarized in Table I.

### Media

Yeast media were prepared as described (Ausubel et al. 2001), and 2% agar was added for plates. YPD media contained yeast extract 10g/L peptone 20g/L, supplemented with 2% glucose.

### Menadione and cumene hydroperoxide sensitivity assays

All the starting overnight cultures of *C. glabrata*, *C. albicans* and *S. cerevisiae* were grown in YPD for 36 h at 30°C. Menadione and cumene hydroperoxide 88% (CHP) are from Sigma-Aldrich. All liquid cultures and plates were incubated at 30°C. For sensitivity assays for LP cells, overnight cultures were diluted in fresh rich media, YPD, in such a way that cells went through 7 doublings [D] to reach an OD<sub>600nm</sub> 0.5. The cultures were divided, exposed to different

menadione or CHP concentrations and incubated with shaking for 3 hours. After the treatment, the oxidant was removed, the cultures were adjusted when needed to O.D.<sub>600nm</sub> 0.5, serially diluted in 96-well plates and each dilution spotted onto YPD plates and incubated at 30°C. Each dilution has the same amount of cells.

For SP cells, 36 h cultures were diluted to O.D.<sub>600nm</sub> 0.5 with spent media from the same culture. The cells were divided into aliquots and treated with menadione or CHP at different concentrations for 3 hours at 30°C. After the treatment, the oxidant was removed. The cultures remained at the same O.D.<sub>600nm</sub> 0.5 and were diluted in 96-well plates and spotted onto YPD plates.

All manipulations for these assays were performed in our 30°C temperature controlled room to prevent abrupt changes in temperature. It has been reported that cold shock has an impact in oxidative stress resistance in *S. cerevisiae*. Experiments were repeated 3 times.

#### Preparation of cell-free extracts and catalase activity assay

Cells were grown for 48 h in YPD containing 2% glucose and were harvested by centrifugation at 800 g for 10 min. Cells were washed twice with distilled water and resuspended in lysis buffer (potassium phosphate pH 7.0 supplemented with SIGMAFAST protease inhibitor from SIGMA) and 0.5 g of glass beads (SIGMA). Cells were frozen and thawed 2 times and the mixture was vortexed 4 to 6 times with 1 min cooling on ice. The lysate was centrifuged for 20 min at 4°C to remove cell debris and glass beads. The supernatant was used for enzymatic activity. Protein quantification was determined by Bradford (Bradford 1976). Bovine serum albumin from Sigma was used as standard. Catalase activity was determined in cell-free extracts by a spectrophotometric method which

measures the breakdown of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> by catalase (Aebi 1984). Assays were performed 4 times. The catalase activity was normalized to total protein from the lysate and expressed as units per mg of protein. One unit is defined as the amount of catalase required for degradation of 1.0 μmol H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> per min.

## RESULTS

***C. glabrata* resistance to menadione.** In order to understand the oxidative stress response in *C. glabrata*, we decided to assess its resistance in LP cells to menadione, a cytotoxic quinone that generates superoxide. Cells were grown and exposed to menadione as described in the legend to Fig. 1 and in Materials and Methods. *C. glabrata* BG14 (wt, reference strain) grows up to 0.2 mM of menadione, however the *cta1*Δ strain which lacks the single catalase gene, showed reduced resistance to menadione (Fig. 1A). We then assessed whether *C. glabrata* cells are more resistant to menadione in SP (described in the legend for Fig. 1 and in Materials and Methods). Both strains BG14 and *cta1*Δ exhibited increased resistance to menadione to the same extent (Fig. 1B).

***C. albicans*, *S. cerevisiae*, and *C. glabrata* resistance to menadione in SP.**

Once we have established *C. glabrata* resistance to menadione in SP and that Cta1 is dispensable in SP, we decided to compare its resistance with a *C. albicans* strain [an opportunistic fungal pathogen], a *S. cerevisiae* lab reference strain [non-pathogenic] and two *S. cerevisiae* CI in SP. Cells were grown and exposed to menadione as described in the legend to Fig. 2 and in Materials and Methods. *C. albicans* which is distantly related to *C. glabrata* is more resistant to menadione than *C. glabrata* (Fig. 2). *C. albicans* can grow up to 1.2 mM of menadione while *C. glabrata* can only grow to 0.8 mM (Fig. 2). *S. cerevisiae* lab reference strain



W303 showed resistance only to 0.2 mM of menadione, however, both *S. cerevisiae* CIs (YJM128 and YJM336) showed increased resistance to menadione. These strains can grow in the presence of 0.6 mM (Fig. 2).

***C. albicans*, *S. cerevisiae*, and *C. glabrata* resistance to CHP in SP.** We decided to determine the resistance of these fungal strains to CHP, an organic hydroperoxide, in SP. Cells were grown and exposed to CHP as described in the legend to Fig. 3 and in Materials and Methods. Both strains BG14 and *cta1*Δ are resistant to 0.4 mM of CHP (Fig. 3) and more resistant than *C. albicans* strain CA5 which showed sensitivity to 0.4 mM (Fig. 3). Interestingly, the non-pathogenic *S. cerevisiae* strain W303 and both CIs, YJM128 and JYM336, showed almost the same resistance at 0.4 mM of CHP as *C. glabrata*. At this concentration, *C. albicans* strain CA5 is completely sensitive (Fig. 3).

***C. glabrata*, *C. albicans* and *S. cerevisiae* catalase activity.**

We have previously shown in plate assays that *C. glabrata* is more resistant to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> than *C. albicans* and *S. cerevisiae* (Cuéllar-Cruz et al. 2008). We decided then to assay catalase activity in these strains. Surprisingly, *C.g.*B14, *C.a.*CA5 and *S.c.*W303 showed almost no difference in catalase activity (Fig. 4). As expected, *C. glabrata* strain lacking catalase, *C.g.cta1*Δ, showed no activity. However, *S. cerevisiae* CI showed increased catalase activity which is consistent with the fact that these *S. cerevisiae* CI are more resistant to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> than *C.a.*CA5 and *S.c.*W303 (Cuéllar-Cruz et al. 2008) (Fig. 4).

## DISCUSSION

Pathogens are able to evade oxidative killing by phagocytes cells by using the well conserved enzymatic and non-enzymatic mechanisms that keep low levels of ROS

generated naturally by aerobic respiration (Gonzalez-Parraga et al. 2003). In this way, pathogens can survive and persist in their host. *C. glabrata* oxidative stress response has only recently been described (Chen et al. 2007, Cuéllar-Cruz et al. 2008, Roetzer et al. 2008). *C. glabrata* is extremely resistant to very high levels of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and can evade killing by phagocytes cells (Cuéllar-Cruz et al. 2008, Kaur et al. 2007). *C. glabrata* has one catalase (Cta1p) which is absolutely necessary to respond to oxidative stress generated by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Cuéllar-Cruz et al. 2008). Furthermore, the well-conserved transcription factors Yap1, Skn7, Msn2 and Msn4 coordinate in part the oxidative stress response in *C. glabrata* (Chen et al. 2007, Cuéllar-Cruz et al. 2008, Roetzer et al. 2008). In this report, we investigated the natural resistance of *C. glabrata*, *C. albicans* and *S. cerevisiae* to menadione and CHP. In addition, we measured their catalase activity in SP. Fig. 1A shows that LP cells of *C.g.* BG14 (wt) can resist to 0.2 mM of menadione and that this resistance is dependent on Cta1. Menadione is a cytotoxic quinone that generates superoxide and it has been shown that exposure to menadione induces the expression of *S.c.* and *S.p.* *CTA1* (Nakagawa et al. 1995, Osorio et al. 2003). This result would suggest that the superoxide generated by menadione is dismutated to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> which is then reduced by the catalase. Interestingly in SP, the resistance to menadione is increased and there is no difference in resistance between BG14 and the strain lacking the catalase [*cta1*Δ] (Fig. 1B). The increased resistance in SP is not surprising, it has previously been shown that SP cells of different pathogens are more resistant to different stresses including oxidative stress (Cyrne et al. 2003). Interestingly, Cta1 is dispensable in SP. This suggest that other genes are compensating the lack of Cta1, but only in SP. In LP, these genes must be silent. These other elements in SP could be superoxide dismutases, glutathione, glutathione

peroxidases and thioredoxins that could be playing important roles in detoxifying oxidative stress (Jamieson 1992, Jamieson et al. 1994, Stephen & Jamieson 1996, Zadinski et al. 1998). The regulatory network of the oxidative stress response in SP in *C. glabrata* is an important aspect that required further study.

We then compared the resistance to menadione in SP between *C. glabrata* and the closely related non-pathogenic yeast *S. cerevisiae* and the distantly related opportunistic fungal pathogen *C. albicans*. As shown in Fig. 2, *C. albicans* strain, *C.a.* CA5, is more resistant to menadione than *C. glabrata*. *S.c.* W303 is even more sensitive. The enzymatic removal of superoxide ion is carried out by the enzyme superoxide dismutase. Thus, the resistance to menadione shown by *C. albicans* could be explained in part to the fact that *C. albicans* has 6 superoxide dismutases genes, *SOD1*, *SOD2*, *SOD3*, *SOD4*, *SOD5* and *SOD6*. It has been shown that *C.a.SOD1*, *C.a.SOD2*, and *C.a.SOD3* are important for protection in LP and SP and that *C.a.SOD1* is important for virulence (Hwang et al. 2002, Lamarre et al. 2001, Martchenko et al. 2004). On the other hand, *C. glabrata* has only 2 superoxide dismutases, *C.g.SOD1* and *C.g.SOD2*, which are orthologs of *S. cerevisiae* *S.c.SOD1* and *S.c.SOD2* (Longo et al. 1996, Pereira et al. 2003) and *C. albicans* *C.a.SOD2* and *C.a.SOD3*, and analysis of the amino acid sequence homology between *C. glabrata*, *S. cerevisiae* and *C. albicans* superoxide dismutases showed that *C.g. SODs* are closely related to *S.c. SODs* than to *C.a. SODs* (*C.g.Sod1p* [CAGL0C04741g] 83% identical / 7% similar to *S.c.Sod1p*; *C.g.Sod2p* [CAGL0E04356g] 70% identical / 11% similar to *S.c.Sod2p*, 58% identical / 14% similar to *C.a.Sod2p*; 54% identical / 13% similar to *C.a.Sod3p*). Interestingly, both *S.c.* CIs YJM128 and YJM336 are more resistant to menadione than W303 (Fig. 2), and has been shown that these CIs are also more resistant to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> than W303 reference

strain (Cuéllar-Cruz et al. 2008). These results support the idea that pathogens need to have a proper response to oxidative damage in order to survive within the host (Cassone et al. 2003, Clemons et al. 1994, McCullough et al. 1998, Munoz et al. 2005) . These CI could have acquired an increased expression/activity of *SOD*, and *MDR* (multiple drug resistant) genes and/or reduced permeability.

We investigated the natural resistance of *C. glabrata* to CHP, an organic hydroperoxide. As shown in Fig. 3, *C. glabrata* is more resistant than *C. albicans*. *S. cerevisiae* (W303 and CIs) are almost as resistant as *C. glabrata*. The oxidative stress generated by CHP is removed in part by glutathione peroxidases and glutaredoxins. One likely explanation to the difference in resistance between *C. glabrata* and *S. cerevisiae* and *C. albicans* could be gene dosage: *S. cerevisiae* has 2 Phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidases *GPX1* and *GPX2* and 8 glutaredoxins *GRX 1-8* and *C. glabrata* has 5 glutaredoxins *GRX1 -5* and 4 glutathione peroxidases *GPX1-4*. Whereas *C. albicans* has only 3 glutaredoxins *GRX1-3*.

Analysis of the catalase activity (Fig. 4) showed almost no difference between *C. glabrata*, *C. albicans* and *S. cerevisiae* whereas *C. glabrata* has been shown to be more resistant to  $H_2O_2$  than *C. albicans* and *S. cerevisiae* (Cuéllar-Cruz et al. 2008). This result indicates that there must be additional elements in *C. glabrata* that determine the increased resistance. Interestingly, *S. cerevisiae* CI showed increased catalase activity. This result suggests that *S. cerevisiae* CI could have acquired a more robust response to oxidative stress, in order to evade the attack and elimination by phagocytic cells. It would be interesting to determine in *S. cerevisiae* CI whether *CTA1* expression is up regulated and/or the activity of Cta1 is increased.

Currently, we are making knockout mutants of *C. glabrata* *SOD*, *GPX* and *GRX* genes in order to evaluate their role in the response to menadione and CHP. Furthermore, we are determining whether expression of *S. cerevisiae* Cl *CTA1* is modified.

## **ACKNOWLEDGMENTS**

This work was funded by a CONACyT fellowship to M.C.C. (163140). This work was funded by a CONACyT grant No. CB-2005-48279 to A.D.L.P.

## REFERENCES

- Aebi H 1984. Catalase in vitro. *Method Enzymol* 105: 121-126.
- Ausubel F, Brent R, Kingston RE, Moore DD, Seidman JG, Smith JA, Struhl K 2001. *Current Protocolss in Molecular Biology*. New York: John Wiley & Sons, Inc.
- Bradford MA 1976. Rapid and sensitive method for microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Annals Biochem* 72: 248-254.
- Cassone M, Serra P, Mondello F, Girolamo A, Scafetti S, Pistella E, Venditti M 2003. Outbreak of *Saccharomyces cerevisiae* subtype boulardii fungemia in patients neighboring those treated with a probiotic preparation of the organism. *Journal of Clinical Microbiology* 41: 5340-5343.
- Chen KH, Miyazaki T, Tsai HF, Bennett JE 2007. The bZip transcription factor Cgap1p is involved in multidrug resistance and required for activation of multidrug transporter gene CgFLR1 in *Candida glabrata*. *Gene* 386: 63-72.
- Clemons KV, McCusker JH, Davis RW, Stevens DA 1994. Comparative pathogenesis of clinical and nonclinical isolates of *Saccharomyces cerevisiae*. *J Infect Dis* 169: 859-867.
- Cormack BP, Falkow S 1999. Efficient homologous and illegitimate recombination in the opportunistic yeast pathogen *Candida glabrata*. *Genetics* 151: 979-987.
- Cuéllar-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.
- 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.
- Fidel PL, Jr Cutright, JL Tait L, Sobel JD 1996. A murine model of *Candida glabrata* vaginitis. *J Infect Dis* 173: 425-431.
- 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.
- 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.
- Jamieson DJ 1992. *Saccharomyces cerevisiae* has distinct adaptive responses to both hydrogen peroxide and menadione. *J Bacteriol* 174: 6678-6681.
- Jamieson DJ, Rivers SL, Stephen DW 1994. Analysis of *Saccharomyces cerevisiae* proteins induced by peroxide and superoxide stress. *Microbiology* 140: 3277-3283.
- Kaur R, Domergue R, Zupancic ML Cormack BP 2005. A yeast by any other name: *Candida glabrata* and its interaction with the host. *Curr Opin Microbiol* 8: 378-384.

- Kaur R, Ma B, Cormack BP 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.
- 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.
- 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. *Journal of Biological Chemistry* 271: 12275-12280.
- 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. *Molecular Biology of the Cell* 15: 456-467.
- McCullough MJ, Clemons KV, Farina C, McCusker JH, Stevens DA 1998. Epidemiological investigation of vaginal *Saccharomyces cerevisiae* isolates by a genotypic method. *Journal of Clinical Microbiology* 36: 557-562.
- McDonald JP, Levine AS, Woodgate R 1997. The *Saccharomyces cerevisiae* RAD30 gene, a homologue of *Escherichia coli* dinB and umuC, is DNA damage inducible and functions in a novel error-free postreplication repair mechanism. *Genetics* 147: 1557-1568.



- Munoz P, Bouza E, Cuenca-Estrella M, Eiros JM, Perez MJ, Sanchez-Somolinos M, Rincon C, Hortal J, Pelaez T 2005. *Saccharomyces cerevisiae* fungemia: An emerging infectious disease. *Clinical Infectious Diseases* 40: 1625-1634.
- Nakagawa CW, Mutoh N, Hayashi Y 1995. Transcriptional regulation of catalase gene in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*: molecular cloning of the catalase gene and northern blot analyses of the transcript. *J Biochem* 118: 109-116.
- Osorio H, Carvalho E, del Valle M, Sillero MAG, Moradas-Ferreira P, Sillero A 2003. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, but not menadione, provokes a decrease in the ATP and an increase in the inosine levels in *Saccharomyces cerevisiae*- An experimental and theoretical approach. *European Journal of Biochemistry* 270: 1578-1589.
- Pereira MD, Herdeiro RS, Fernandes PN, Eleutherio ECA, Panek AD 2003. Targets of oxidative stress in yeast sod mutants. *Biochimica Et Biophysica Acta-General Subjects* 1620: 245-251.
- Roetzer A, Gregori C, Jennings AM, Quintin J, Ferrandon D, Butler G, Kuchler K, Ammerer G, Schuller C 2008. *Candida glabrata* environmental stress response involves *Saccharomyces cerevisiae* Msn2/4 orthologous transcription factors. *Mol Microbiol* 69: 603-620.
- Stephen DWS, Jamieson DJ 1996. Glutathione is an important antioxidant molecule in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Fems Microbiology Letters* 141: 207-212.
- Temple MD, Perrone GG, Dawes IW 2005. Complex cellular responses to reactive oxygen species. *Trends Cell Biol* 15: 319-326.

Thorpe GW, Fong CS, Alic N, Higgins VJ, Dawes IW 2004. Cells have distinct mechanisms to maintain protection against different reactive oxygen species: oxidative-stress-response genes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101: 6564-6569.

Trick WE, Fridkin SK, Edwards JR, Hajjeh RA, Gaynes RP 2002. Secular trend of hospital-acquired candidemia among intensive care unit patients in the United States during 1989-1999. *Clin Infect Dis* 35: 627-630.

Zadzinski R, Fortuniak A, Bilinski T, Grey M, Bartosz G 1998. Menadione toxicity in *Saccharomyces cerevisiae* cells: Activation by conjugation with glutathione. *Biochemistry and Molecular Biology International* 44: 747-759.

TABLE I Strains used in this study

***Saccharomyces cerevisiae* strain**

Strain	Parent	Genotype	Reference
W303		<i>MATa ura3-1 leu2-3,112 his3-11,15 trp1-1 can1-100 ade2-1 ade3::hisG</i>	(McDonald et al. 1997)
YJM128		Clinical isolate	(Clemons et al. 1994)
YJM336		Clinical isolate	(Clemons et al. 1994)

***Candida albicans* strain**

Strain	Parent	Genotype	Reference
CA5		Clinical isolate	Lab collection

***Candida glabrata* strains**

Strain	Parent	Genotype	Reference
BG2		Clinical isolate (strain B)	(Fidel et al. 1996)
BG14	BG2	<i>ura3Δ::Tn903 G418<sup>R</sup></i> Ura <sup>-</sup> strain used in this study	(Cormack & Falkow 1999)
CGM295 <i>cta1Δ</i>	BG14	<i>ura3Δ::Tn903 G418<sup>R</sup> cta1Δ::hph Hyg<sup>R</sup></i>	(Cuéllar-Cruz et al. 2008)

**Fig. 1:** *C. glabrata* resistance to Menadione.

A. For LP sensitivity assay, saturated cultures of *Candida glabrata* (*C.g.*) strains BG14 (wt) and CGM295 (*cta1*Δ) were diluted into fresh media (YPD) so that cells would reach an OD<sub>600nm</sub> 0.5 after 7 doublings (D) at 30°C. *C.g.*BG14 and CGM295 cultures were divided and exposed to 0, 0.2, and 0.4 mM of Menadione. After the treatment, the cultures were adjusted when needed to O.D.<sub>600nm</sub> 0.5, serially diluted and each dilution spotted onto YPD plates, assuring that same amount of cells are plated. Plates were incubated at 30°C. See Materials and Methods.

B. For SP sensitivity assay, saturated cultures of *C.g.* strains BG14 (wt) and CGM295 (*cta1*Δ) were diluted to O.D.<sub>600nm</sub> 0.5 with spent media from the same culture. The cells were divided into aliquots and treated for 3 hours with Menadione at different concentrations: 0, 0.2, 0.4, 0.8, and 1.2 mM. After the treatment, the cultures remained at O.D.<sub>600nm</sub> 0.5, oxidant was removed and cells were diluted and spotted onto YPD plates. Plates were incubated at 30°C. See Materials and Methods.

**Fig. 2:** *C. glabrata*, *C. albicans* and *S. cerevisiae* stationary phase resistance to Menadione.

Saturated cultures of *C.g.* strain BG14, *Candida albicans* (*C.a.*) strain CA5, *Saccharomyces cerevisiae* (*S.c.*) strains W303, CIs YJM128 and YJM336 were treated as described in Fig. Legend 1B and in Materials and Methods.

**Fig. 3:** *C. glabrata*, *C. albicans* and *S. cerevisiae* stationary phase resistance to CHP.

Saturated cultures of *C.g.* strains BG14 and CGM295 (*cta1*Δ), *Candida albicans* (*C.a.*) strain CA5, *Saccharomyces cerevisiae* (*S.c.*) strains W303, CIs YJM128 and

YJM336 were grown and treated as in Fig. 2, but cultures were exposed to CHP at 0, 0.4, and 0.8 mM. See Materials and Methods.

**Fig. 4:** *C. glabrata*, *C. albicans* and *S. cerevisiae* catalase activity.

*C.g.* strains BG14 and CGM295 (*cta1Δ*), *Candida albicans* (*C.a.*) strain CA5, *Saccharomyces cerevisiae* (*S.c.*) strains W303, CIs YJM128 and YJM336 were grown for 48 h (SP) in YPD containing 2% glucose and cell extracts were prepared as described in Materials and Methods. The catalase activity was normalized to total protein from the lysate and expressed as units per mg of protein. One unit is defined as the amount of catalase required for degradation of 1.0  $\mu\text{mol H}_2\text{O}_2$  per min. Data is presented as the mean  $\pm$  S.D. of 4 independent experiments.

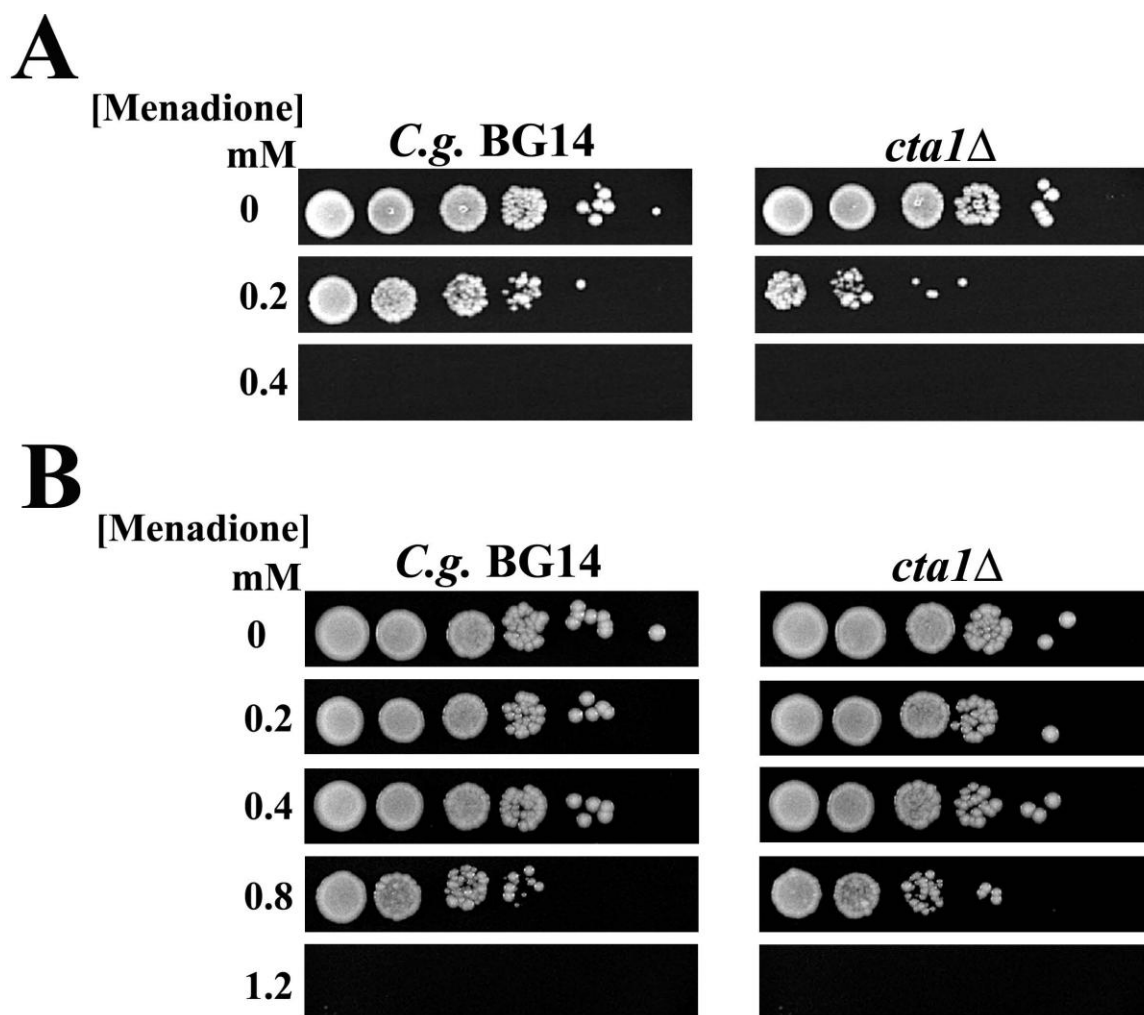


Figure 1.

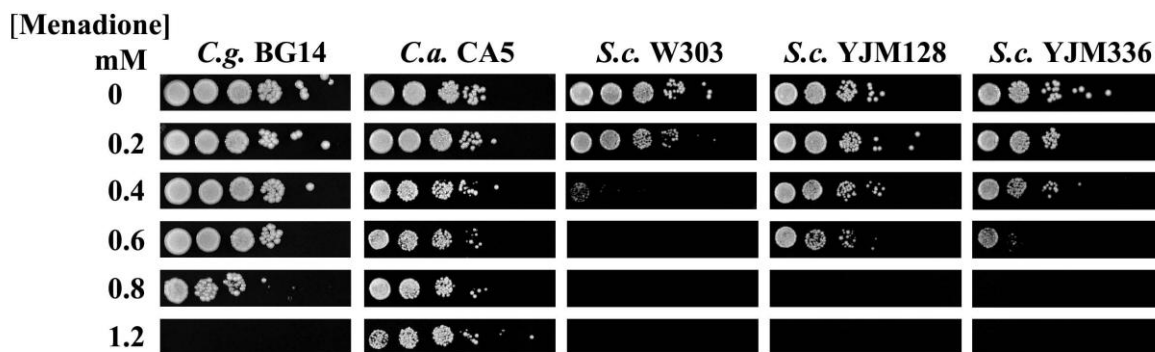


Figure 2.

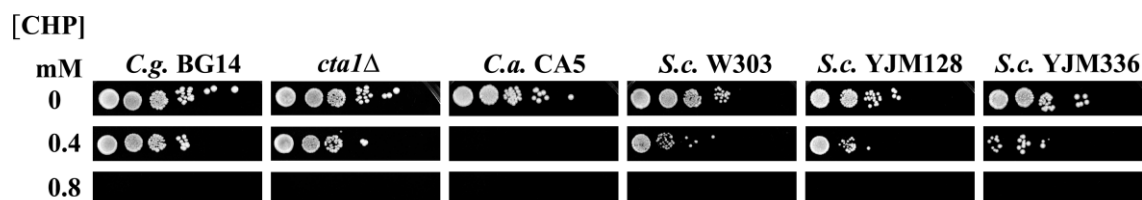


Figure 3.

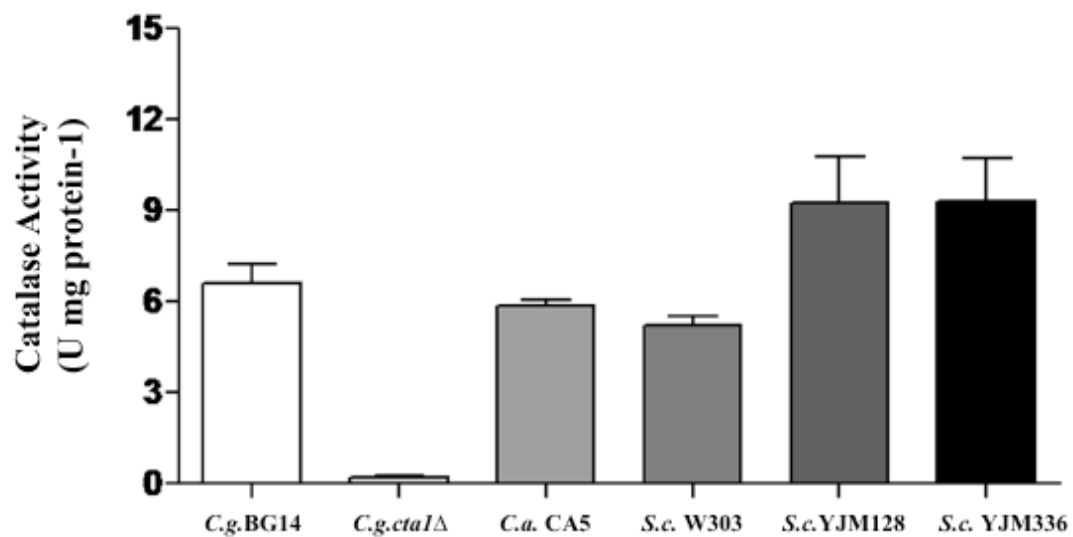


Figure 4.

## Capítulo 4

***Candida glabrata* clinical isolates adhered to HeLa cells expresses different adhesins**



***Candida glabrata* clinical isolates adhered to HeLa cells expresses different adhesins**

Mayra Cuéllar-Cruz, Irene Castaño, Luis Salazar-Olivo, José Romo-Yañez, and Alejandro De Las Peñas\*

División de Biología Molecular, Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, San Luis Potosí, San Luis Potosí 78216, México

\*Corresponding Author. Mailing address: Camino a la Presa San José 2055, División de Biología Molecular, Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, San Luis Potosí, San Luis Potosí, 78216, México. Phone: (52) 444 8342000. FAX: (52) 444 8342010. E-mail: cano@ipicyt.edu.mx

## Abstract

*Candida glabrata* has recently emerged as the second most common cause of invasive candidiasis after *Candida albicans* in immunocompromised patients (Pfaller and Diekema 2007). Several clinical studies have suggested a pathogenic link between adhesion and colonization. *C. glabrata* is able to adhere *in vitro* to human epithelial and endothelial cells by Epa1, Epa6 and Epa7 (epithelial adhesins). To determine whether *C. glabrata* strains isolated from various clinical sources were capable of adherence to epithelial cells, we used sixty-six clinical isolates from different origins, of which eleven were hyper-adherent to epithelial HeLa cells. We found that *C. glabrata* hyper-adherent clinical isolates contain the *EPA1*, *EPA6* and *EPA7* genes, this indicated that probably the adhesion of *C. glabrata* to HeLa cells is due to *EPA* family. An RT-PCR assay was developed to evaluate expression of *EPA* genes in *C. glabrata*. By analysis of RT-PCR we found that hyper-adherent clinical isolates to HeLa cells expressed one or more of the genes encode *EPA* family. These expression differences might be due to genetic variability of the *EPA* gene family which provide the opportunity for *C. glabrata* to display proteins with a large spectrum to provide sufficient specificity in adherence. The analysis here is the first evidence that there are clinical isolates of *C. glabrata* that *in vivo* not only expresses *EPA1*, *EPA6* and *EPA7*, and this is because there is a redundancy of adhesins in *C. glabrata* that allows its adherence both *in vitro* and *in vivo*.

## Introduction

*Candida* species are the most common cause of fungal infections in intensive care units and these are primarily caused by *Candida albicans* (Pfaller and Diekema 2007). However, *Candida glabrata* in the last two decades has emerged as the second species causing invasive candidiasis in immunocompromised hosts, diabetics, neonates and surgical patients (Trick, Fridkin et al. 2002; Pfaller and Diekema 2007). An important step in the establishment of *Candida* infections is the adhesion of yeast cell to the host cell (Fidel, Vazquez et al. 1999). The fungal proteins that mediate adherence to the human host are the adhesins, which are considered virulence factors. *C. glabrata* encodes a family of at least 23 members of a class of proteins termed glycosylphosphatidylinositol-dependent cell wall proteins (Kaur, Domergue et al. 2005), called EPA (adhesins epithelial). In contrast to the large number of *EPA* genes present in this yeast, by *in vitro* assay adherence to epithelial cells only Epa1, Epa6 and Epa7 have been identified that mediate adherence to epithelial cells (Cormack, Ghori et al. 1999). Although little is known about the rest of *C. glabrata EPA* genes involved *in vivo* in adhesion to host cells. Most of the *EPA* genes are present in subtelomeric clusters and they are transcriptionally repressed by the silencing machinery (De Las Peñas, Pan et al. 2003). Through a series of strains containing insertions of the reporter *URA3* gene within different intergenic regions in four telomeres of *C. glabrata*, assessed the roles of *SIR2*, *SIR3*, *SIR4*, *HDF1* (yKu70), *HDF2* (yKu80) and *RIF1* genes, which encodes the proteins involved in silencing subtelomeric. This analysis showed that *SIR* proteins are absolutely required for silencing of the reporter genes and the

native subtelomeric *EPA* genes, whereas the yKu70, yKu80 and Rif1 proteins differentially regulate silencing of the analyzed telomeres. These experiments clearly show that silencing of the *C. glabrata* telomeres varies from telomere to telomere (Rosas, Juárez et al. 2008). A deletion in one of the *C. glabrata* gene silencing subtelomeric, will make it hyper-adherent to epithelial cells (De las Peñas, Pan et al. 2003; Castaño, Pan et al. 2005; Iraqui, García-Sánchez et al. 2005). The large number of *EPA* genes in this yeast and its differential regulation may indicate the variety of sites in the host that can be invaded by *C. glabrata*.

Adherence *C. glabrata* clinical isolates from different clinical origins to epithelial cells has yet to be analyzed.

Here, through adherence assay in stationary phase, we found that *C. glabrata sir3Δ* mutant is unable adherence to HeLa cells. This result suggest that the *EPA* proteins that mediate adherence to HeLa cells are not under subtelomeric regulation of *SIR3*, and probably also Epa1, Epa6 and Epa7. There are other *EPA* proteins mediating adherence to HeLa cells. We present qualitative data to indicate that the *C. glabrata* clinical isolates from different clinical origins vary in their adherence capabilities to HeLa cells. Furthermore, we found that *C. glabrata* hyper-adherent clinical isolates expresses one or more of the genes that encode the *EPA* family. The analysis here is the first evidence that there are clinical isolates of *C. glabrata* that perhaps unidentified *EPA* proteins with functions redundant to Epa1, Epa6 and Epa7 are expressed *in vivo*.

## Materials and Methods

**Strains and Growth Media.** The *C. glabrata* strains and clinical isolates used in this study are listed in Table S1. The Sixty six clinical isolates of *C. glabrata* were isolated from different clinical origins (blood, urine, urinary catheter, vagina, knee and pancreas) of patients and identified by standard techniques. Strains were stored in 15% glycerol stocks at  $-80^{\circ}\text{C}$  and cultured on either YPD (1% yeast extract, 2% peptone, 2% glucose, uracile  $25\ \mu\text{g ml}^{-1}$ ) at  $30^{\circ}\text{C}$ . For solid media, 2% agar was added.

**Cell cultures and fixing conditions.** Cervical carcinoma cells (HeLa) were cultured in Dulbecco's modified Eagle's medium (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) supplemented with  $80\ \text{U ml}^{-1}$  of penicillin G,  $50\ \mu\text{g ml}^{-1}$  of streptomycin sulphate, and 7% calf serum (HyClone Laboratories Inc.). The cells were maintained at  $37^{\circ}\text{C}$  in 5%  $\text{CO}_2$ . Confluent growth was obtained in 24-well plates. The medium was aspirated and the cells were fixed with 3.7% formaldehyde in PBS for 0.5 h at  $4^{\circ}\text{C}$ . Each well was washed once with sterile water and PBS. One milliliter of PBS supplemented with Pen/Strep (Penicillin  $100\ \text{U ml}^{-1}$  and Streptomycin  $100\ \mu\text{g ml}^{-1}$ ) was added to each well for storage at  $4^{\circ}\text{C}$  for several months.

**In vitro adherence assays.** For the assay of adherence, the *C. glabrata* strains and clinical isolates were grown in 5 ml of YPD for 48 h (stationary phase). All cultures were adjusted to an  $\text{OD}_{600}$  of 6.0 with Hanks Balanced Salt Solution (HBSS) supplemented with 5 mM  $\text{CaCl}_2$ .  $100\ \mu\text{l}$  of yeast cell suspension was added to each well of 24-well plates containing previously fixed and washed epithelial cells in  $900\ \mu\text{l}$  of fresh PBS without antibiotics. The plates were incubated

at room temperature for 1 h. Non-adherent yeast cells were washed three times with HBSS with CaCl<sub>2</sub> and once with PBS. Adherent cells were recovered by lysing the epithelial cells with 500 µl of 0.1% triton 0.5% SDS in PBS. The cells were scraped off the plate and counted by viable account.

**Reverse transcription-PCR (RT-PCR).** RNA total of *C. glabrata* strains and clinical isolates in stationary phase was isolated using Trizol reagent (Invitrogen) according to the manufacturer's instructions. DNase I (Invitrogen) was used to eliminate DNA contamination from total RNA. Synthesis of cDNA and PCR were carried out as previously described using the AccessQuick™ RT-PCR system (Promega, Madison, USA) (Kaledin, A.S. et. al. 1981). The RT primers used for each gene were as showed in Table S2. The cDNA synthesis reaction was carried out at 55°C for *EPA1*, *EPA2*, *EPA3*, *EPA4/5*, *EPA6*, *EPA8*, *EPA11*, *EPA12*, *EPA13* and *EPA15*; at 59°C for *EPA7*; and at 50°C for *ACT1*. The PCR was carried out at 52°C for *EPA1*, *EPA2*, and *EPA4/5*; at 55°C for *EPA6*, *EPA11*, *EPA12*, *EPA13* and *EPA15*; at 57°C for *EPA3*, *EPA7* and *EPA8*; and at 50°C for *ACT1*. Extension time was 12 sec for all reactions with 26 cycles of amplification for *EPA1*, *EPA2*, *EPA3*, *EPA4/5*, *EPA6*, *EPA7*, *EPA8*, *EPA13*, 28 cycles for *EPA11*, *EPA12*; 30 cycles for *EPA15* and 22 cycles for *ACT1*. We performed PCR amplification of DNase-treated total RNA samples without the reverse-transcription procedure (No-RT). No amplification of PCR products indicated the complete elimination of DNA contamination of the DNase-treated total RNA samples did not contain the genomic DNA.

**PCR amplification.** Genomic DNA was extracted from *C. glabrata* strains and clinical isolates in the stationary phase and used as a template for amplification of the *EPA1*, *EPA6* and *EPA7* genes. PCR was carried out with Amplificase DNA polymerase (Biogénica, DF, México) with the primers for *EPA1*: 5'-GGGCTCAAAAACAGCTAAAG-3'(forward), 5'-AACAGTGTTTTCGTTTGAT-3' (reverse); for *EPA6*: 5'-TTTGAAATCAGGATCGAATC-3' (forward) and 5'-GACTTAATGCACCATCATTG-3'(reverse), and for *EPA7*: 5'-TACGGAAGAATGGTTCGTAC-3'(forward), 5'-GCTTGCCGGTAAATGATCT-3' (reverse). All PCR products were also run on 2.0% agarose gels.

TABLE S1. Strains used in this study

Strain	Parent	Genotype and/or description	Reference or source
<b><i>C. glabrata</i> strains</b>			
<b>BG14</b>	BG2, clinical isolate	<i>ura3Δ::Tn903 G418<sup>R</sup></i>	(Cormack and Falkow 1999)
<b>CGM71 (<i>sir2Δ</i> mutant)</b>	BG1048	<i>ura3Δ::Tn903 G418<sup>R</sup> sir2Δ::hph Hyg<sup>R</sup> (pAP596/Sac I-Kpn I)</i>	Domergue <i>et al</i> , 2005
<b>CGM24 (<i>sir3Δ</i> mutant)</b>	BG676	<i>ura3Δ::Tn903 G418<sup>R</sup> sir3Δ</i>	De Las Peñas <i>et al</i> , 2003
<b>CGM73 (<i>sir4Δ</i> mutant)</b>	BG1050	<i>ura3Δ::Tn903 G418<sup>R</sup> sir4Δ::hph Hyg<sup>R</sup> (pAP598 Bsg I)</i>	Rosas-Hernández <i>et al</i> , 2008
<b>CGM78 (<i>hdf1Δ</i> mutant)</b>	BG1080	<i>ura3Δ::Tn903 G418<sup>R</sup> hdf1Δ::hph Hyg<sup>R</sup> (pAP611 Bcg I)</i>	Rosas-Hernández <i>et al</i> , 2008
<b>CGM79 (<i>hdf2Δ</i> mutant)</b>	BG1081	<i>ura3Δ::Tn903 G418<sup>R</sup> hdf2Δ::hph Hyg<sup>R</sup> (pAP612 Bcg I)</i>	Rosas-Hernández <i>et al</i> , 2008
<b>CGM52 (<i>rif1Δ</i> mutant)</b>	BG509	<i>ura3Δ::Tn903 G418<sup>R</sup> rif1Δ</i>	Castaño <i>et al</i> , 2005
<b>CGM39 (<i>rap1-21Δ</i> mutant)</b>	BG592	<i>ura3Δ::Tn903 G418<sup>R</sup> rap1-21Δ pAP497/Xho I integrated in the chromosome</i>	De Las Peñas <i>et al</i> , 2003
<b>CGM87 (<i>epa1Δ</i> mutant)</b>	BG64	<i>ura3Δ::Tn903 G418<sup>R</sup> epa1Δ</i>	Castaño <i>et al</i> , 2005
<b>CGM40 (<i>epa6, epa7Δ</i>) mutant</b>	BG873	<i>ura3Δ::Tn903 G418<sup>R</sup> (epa6, epa7)Δ</i>	Castaño <i>et al</i> , 2005
<b>CGM48 (<i>epa1 epa7Δ</i>) mutant</b>	BG991	<i>ura3Δ::Tn903 G418<sup>R</sup> (epa1 epa7)Δ</i>	Castaño <i>et al</i> , 2005
<b>CGM42 (<i>epa1 epa6Δ</i>) mutant</b>	BG922	<i>ura3Δ::Tn903 G418<sup>R</sup> (epa1, epa6)Δ</i>	Castaño <i>et al</i> , 2005
<b>CGM43 (<i>epa1 epa6 epa7Δ</i>) mutant</b>	BG923	<i>ura3Δ::Tn903 G418<sup>R</sup> (epa1 epa6 epa7)Δ</i>	Castaño <i>et al</i> , 2005
<b>CGM106 (<i>epa1 epa2 epa3 epa4 epa5 epa6 epa7Δ</i>) mutant</b>	BG14	<i>ura3Δ::Tn903 G418<sup>R</sup> (epa1 epa2 epa3 epa4 epa5 epa6 epa7)Δ</i>	Castaño <i>et al</i> , 2005
<b><i>C. glabrata</i> clinical isolates</b>			
<b>MC1</b>	Clinical isolate	Endodontics	<sup>a</sup> UASLP, SLP, México
<b>MC(2,3,4,5,6,7,21,22,23)</b>	Clinical isolate		<sup>a</sup> UASLP, SLP, México
<b>MC8</b>	Clinical isolate	Vagina	<sup>b</sup> Hospital, León, México
<b>MC(10,11)</b>	Clinical isolate	Urinary tract	<sup>b</sup> Hospital, León, México
<b>MC(12,13,14,16,17,19,20,25, 26,27,28,29,30,31,32, 33, 34,35,36,37,38,39,40,</b>	Clinical isolate	Urine	<sup>c</sup> INNSZ



---

<b>41,</b> <b>42,43,44,45,46,51,52,</b> <b>53,</b> <b>56,57,58,59,60,61,62,</b> <b>63,</b> <b>64,65,66,67,68,70,71,</b> <b>72, 73,74)</b>			
<b>MC69</b>	Clinical isolate	Blood	<sup>c</sup> INNSZ
<b>MC55</b>	Clinical isolate	Pancreas	<sup>c</sup> INNSZ
<b>MC54</b>	Clinical isolate	Knee	<sup>c</sup> INNSZ

---

<sup>a</sup> Universidad Autónoma de San Luis Potosí, San Luis Potosí, México

<sup>b</sup> Clínica de Salud, León Guanajuato, México

<sup>c</sup> Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán, Distrito Federal, México

**Table S2. Oligonucleotides used in this study**

<b>Primer</b>	<b>Sequence</b>	<b>Description</b>
<i>EPA1</i>	TAACAGTGTTTTCGTTTGAT	Forward
<i>EPA1</i>	GGGCTCAAAAACAGCTAAAG	Reverse
<i>EPA2</i>	GAATGATTTCTTATTAAT	Forward
<i>EPA2</i>	GGGATCAGATTATGCAAAAG	Reverse
<i>EPA3</i>	TAATTTGATCAGTAGCACCG	Forward
<i>EPA3</i>	GCATGTTGATAGTTCCAAA	Reverse
<i>EPA4/5</i>	GTCAAATTCTGTAGTGAAAG	Forward
<i>EPA4/5</i>	GCTAACATTACTGTATTTCT	Reverse
<i>EPA6</i>	GACTTAATGCACCATCATTG	Forward
<i>EPA6</i>	GACTTAATGCACCATCATTG	Reverse
<i>EPA7</i>	GCTTGCCGGTAAATGATCT	Forward
<i>EPA7</i>	TACGGAAGAATGGTTCGTAC	Reverse
<i>EPA8</i>	TTCCTGGTTCCGTCCACCA	Forward
<i>EPA8</i>	GGGCGGGTACCAGAAAAGAC	Reverse
<i>EPA9</i>	TGTACTAAAAGTAGTGTCATCAACG	Forward
<i>EPA9</i>	GACTATCATTCGAAATTCATGG	Reverse
<i>EPA11</i>	TTAGTGGAGCCGGAGAATCG	Forward
<i>EPA11</i>	GGCCAATCAAGATAAGAAT	Reverse
<i>EPA12</i>	TATGCGCTCTGATCCATGT	Forward
<i>EPA12</i>	GGAAGGCGAATAGTGCGTA	Reverse
<i>EPA13</i>	TTTGCCGAATAGGCGAGTCA	Forward
<i>EPA13</i>	GGCCAGGCGTGAACAAAAC	Reverse
<i>EPA14</i>	GATACGTGTAGGCGCACCA	Forward

<i>EPA14</i>	CATGTTGACCATTCCAAGA	Reverse
<i>EPA15</i>	TTATTATTGCATTTGAATGC	Forward
<i>EPA15</i>	GGGCAAAAAAGCCTCAAAA	Reverse
<i>EPA16</i>	TAACAATTTCTTCACTAAAT	Forward
<i>EPA16</i>	GGGGCTCAAAAAATGCAAAAA	Reverse
<i>EPA17</i>	TTCTGTTAGGTAGTTAACACCG	Forward
<i>EPA17</i>	GTGATGGTATACCTTAATTCCG	Reverse
<i>ACT1</i>	CTTGGATTGAGCTTCGTC	Forward
<i>ACT1</i>	CGCCGGTGACGATGCTCC	Reverse

## Results

**The adhesion assay.** Adhesion of *Candida glabrata* to epithelial cells is necessary for it to colonize the different niches of the human host, and is one of the prerequisites that are essential to accomplish pathogenesis of *C. glabrata* in the host. Previous studies showed that *EPA1*, *EPA6* and *EPA7* mediate adherence of *C. glabrata* to epithelial cells (Cormack, Ghori et al. 1999; Castano, Pan et al. 2005; Iraqui, Garcia-Sanchez et al. 2005; Margaret L. Zupancic 2008). *EPA1* is expressed only in exponential phase (Cormack, Ghori et al. 1999) therefore, *C. glabrata* cells in stationary phase are non-adherent to epithelial cells (Castano, Pan et al. 2005). Most of the *EPA* genes are transcriptionally repressed by the silencing subtelomeric (De Las Peñas, Pan et al. 2003). *C. glabrata* mutants in the proteins of subtelomeric silencing (*SIR2*, *SIR3*, *SIR4*, *RIF1* and *RAP1-21*) in stationary phase showed increased adherence to epithelial cells. In order to study whether clinical isolates of *C. glabrata* obtained from different origins were capable of adherence to epithelial cells, we used sixty-six clinical isolates, of which eleven were hyper-adherent to epithelial HeLa cells (Table 1 and Fig. 1). As a control we used *C. glabrata* strains null in *EPA* and subtelomeric silencing genes. *sir2* $\Delta$ , *sir4* $\Delta$ , *rif1* $\Delta$  and *rap1* $\Delta$  strains showed increased adherence to HeLa cells, whereas *sir3* $\Delta$ , was not able to adhere to HeLa cells (Fig1 and data not show). This is not observed when *sir3* $\Delta$  to adhere to other cell lines such as Lec2 cells, A498 cells and T24 cells (Castaño, et al, 2005). This suggests that probably the *EPA* proteins that mediate adherence to epithelial cells of these eleven clinical isolates are not

under regulation of *SIR3*. In the case of *EPA1* $\Delta$ , *EPA6* $\Delta$  and *EPA7* $\Delta$  strains were not adherent to HeLa cells.

**Which *EPA* genes are responsible for the hyperadherent phenotypes of *Candida glabrata* clinical isolates.** *Epa1*, *Epa6* and *Epa7* are able to mediate adherence to a variety of epithelial cells. We tested which adhesins are expressed in hyperadherent isolates. As a first step in identifying the adhesins responsible for the hyperadherent phenotype of *C. glabrata* clinical isolates, we also tested whether these eleven hyper-adherent clinical isolates to HeLa cells had the *EPA1*, *EPA6* and *EPA7* complete genes. Using PCR amplification of genomic DNA from these clinical isolates, we found that *EPA1*, *EPA6* and *EPA7* genes were present in all clinical isolates (Fig. 2). Sequence of the *C. glabrata* genome revealed that there were a number of sequences with homology to the N-terminal ligand-binding domain of *EPA1*. We analyzed the expression of 16 distinct putative *EPA*-related sequences in eleven hyper-adherent clinical isolates. For each gene, we utilized specific oligonucleotides to assess transcript levels by RT-PCR. We found that expression of *EPA1*, *EPA8* and *EPA12* were increased in almost all *C. glabrata* clinical isolates. Expression of *EPA3,4/5,6,7,11,12,13* and *15* were increased depending on the clinical isolates (Fig. 3). The comparison between *EPA* expression levels from *C. glabrata* clinical isolates showed that all clinical isolates express one or several adhesins. This result indicated that depending on the place of origin which were isolated the *C. glabrata* clinical isolates, they are capable of expressing either adhesins, appeared to retain expression of adhesins that allow them to remain adhered to cells human host. We concluded from these results that there are clinical isolates of *C. glabrata* that perhaps unidentified *EPA*

proteins with functions redundant to Epa1, Epa6 and Epa7 are expressed *in vivo*. With this result we tried to correlate the origin of the clinical isolates with their ability to express one or another adhesin, we found that there is no correlation between the origin of the clinical isolate and expression adhesin (Table 2).

## Discussion

### ***SIR3* does not regulate the adhesins of *C. glabrata* that mediate adherence to HeLa cells**

The adherence of *Candida glabrata* to host cells is mediated by the family of *EPA* genes. *C. glabrata* expresses *in vitro* *EPA1*, *EPA6* and *EPA7*, which mediate adherence to epithelial cells (Cormack, 1999; Castaño, 2005). *EPA1* expresses weakly in the stationary phase, therefore *C. glabrata* stationary phase cells are non-adherent to epithelial cells. Our data show that *sir3Δ* strain is non-adherent to HeLa cells in the stationary phase (Table 1). This result suggested that the adhesins that mediate adherence to HeLa cells are not under the regulation of *SIR3*, and likely the adhesins involved in adherence of *C. glabrata* to HeLa cells are different from *EPA2-7*. De Las Peñas has shown that *EPA2-5* are silenced in an *SIR3*-dependent fashion. Castaño and Cormack have shown that *EPA6-7* were expressed in the *sir3Δ* strain. This result supports the hypothesis that Sir3p acts normally to repress some of the *EPA* genes (De Las Peñas, 2003). However, this results also suggests that Sir3p could be activating some *EPA* genes different from *EPA2-7*.

We show that some *C. glabrata* clinical isolates from different clinical origins were hyper-adherents in the stationary phase (Fig. 1 and Table 1). These data reveal

that *EPA1* is not the major adhesin that mediates adherence to HeLa cells and suggest that the rest of proteins in the *EPA* family mediate adherence to HeLa cells. A number of adhesins have been described in *C. albicans* that contribute to overall adherence (M. K. Hostetter, 1994). Two members of the *C. albicans* Als protein family (Als1p and Als5p) have been found to mediate adherence; however, the functions of other members of this family are unknown (Sheppard, 2004). A similar function of the adhesins family probably exists in *C. glabrata*, and might explain why the adhesins are expressed in differential manner depending of the epithelial tissue that they are adhered to.

We tested whether *C. glabrata* clinical isolates hyper-adherents to HeLa cells had the adhesins *EPA1*, *EPA6* and *EPA7* which are expressed in vitro. Using PCR amplification of genomic DNA from clinical isolates, we found that these genes were present in the clinical isolates hyper-adherents (Fig. 2), which is not the case with the other clinical isolates. Interestingly, we found that some *C. glabrata* clinical isolates that are non-adherent to HeLa cells do not have *EPA7*, however all have *EPA6* (data not shown). This result suggest that probably *in vivo EPA6* is the major adhesin that mediates the adherence of *C. glabrata* at all epithelial tissues in the human host. This is probably due to the specificity of the three proteins for glycans within this class varies, with *Epa6* having a broader specificity range than *Epa1* or *Epa7* (Zupancic, 2008).

### ***C. glabrata* clinical isolates hyper-adherents to HeLa cells express other adhesins besides *Epa1*, *Epa6* and *EPA7***

*C. glabrata* clinical isolates hyper-adherents to HeLa cells showed marked differences in the expression pattern of the *EPA* genes as measured by RT-PCR

(Fig. 3). These expression differences might be due to genetic variability of the *EPA* gene family which may provide the opportunity for *C. glabrata* to display proteins with a large spectrum to provide sufficient specificity in adherence. The availability of such a group of related proteins is likely to improve the ability of *C. glabrata* to respond differently to particular environmental signals and colonize and invade different anatomical and physiological niches during infection. This result also explains why the *EPA1*Δ strain shows no phenotype *in vivo* and this is because there is a redundancy of adhesins in *C. glabrata* that allows its adherence differently both *in vitro* and *in vivo*.

Is there a correlation between adhesin expression by clinical isolates hyper-adherents isolated from different clinical origins?, our results revealed that there is no correlation between the origin of the clinical isolate and the expressed adhesin (Table 2). This also occurs in *C. albicans* that has not been found a correlation between the clinical origin of clinical isolates and their capacity for adhesion to host cells. With these results we conclude that the adhesion and invasion of *C. glabrata* to host cells is complex, as also should be considered in the treatment and type of patient which are purified clinical isolates of *C. glabrata*.

## **Acknowledgments**

We thank A. Zavalza and V. Gallegos for kindly providing strains. This work was funded a CONACyT fellowship to M. C. C. (163140). This work was funded by a CONACyT grant No. CB-2005-48279 and Salud-2005-01-13927.



## References

Pfaller, M. A. and D. J. Diekema (2007). "Epidemiology of invasive candidiasis: a persistent public health problem." Clin Microbiol Rev **20**(1): 133-63.

Trick, W. E., S. K. Fridkin, et al. (2002). "Secular trend of hospital-acquired candidemia among intensive care unit patients in the United States during 1989-1999." Clin Infect Dis **35**(5): 627-30.

Fidel, P. L., Jr., J. A. Vazquez, et al. (1999). "*Candida glabrata*: review of epidemiology, pathogenesis, and clinical disease with comparison to *C. albicans*." Clin Microbiol Rev **12**(1): 80-96.

Kaur R., R. Domergue, et al. (2005). "A family of glycosylphosphatidylinositol-linked aspartyl proteases is required for virulence of *Candida glabrata*". Curr Opin Microbiol **8**(4):378-84.

Cormack, B. P., N. Ghori, et al. (1999). "An adhesin of the yeast pathogen *Candida glabrata* mediating adherence to human epithelial cells." Science **285**(5427): 578-82.

Alejandro, D. L. P., P. Shih-Jung, 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 and Dev **17**:2245-2258.

Lluvia, R.H., A. Juárez-Reyes, et al. (2008). "yKu70/yKu80 and Rif1 Regulate Silencing Differentially at Telomeres in *Candida glabrata*." Eukaryot Cell **7**(12):2168-2178.

Castano, I., S. J. Pan, et al. (2005). "Telomere length control and transcriptional regulation of subtelomeric adhesins in *Candida glabrata*." Mol Microbiol **55**(4): 1246-58.

Iraqi, I., S. Garcia-Sanchez, et al. (2005). "The Yak1p kinase controls expression of adhesins and biofilm formation in *Candida glabrata* in a Sir4p-dependent pathway." Mol Microbiol **55**(4): 1259-71.

Margaret L .Z., M. F., David Smith, et al. (2008). "Glycan microarray analysis of *Candida glabrata* adhesin ligand specificity." Molecular Microbiology **68**(3): 547-559.

## FIGURE LEGENDS

**Table 1. Qualitative analysis of the adherence of *Candida glabrata* clinical isolates to HeLa cells.** <sup>a</sup> Strains and clinical isolates of *C. glabrata* in stationary phase. <sup>b</sup> + means only a few cells of *C. glabrata* adhered to monolayer HeLa cells; ++ means saturated monolayer of HeLa cells with cells of *C. glabrata*; +++ means monolayer of HeLa cells completely saturated with *C. glabrata* cells. <sup>c</sup> Number of *C. glabrata* clinical isolates that adhered to HeLa cells expressed as percentage, in parenthesis indicates the ratio of the number of clinical isolates that satisfy this requirement with respect to total clinical isolates.

**Figure 1. Adherence of strains and clinical isolates of *C. glabrata* to HeLa epithelial cells.** *C. glabrata* strains and clinical isolates were grown until stationary phase. All cultures were adjusted to a final OD<sub>600</sub> of 0.6 with Hanks Balanced Salt Solution (HBSS) supplemented with 5 mM CaCl<sub>2</sub>. The plates were incubated at room temperature for 1 h. The determination of the adherence capacity of different strains and clinical isolates of *C. glabrata*, was confirmed by light inverted microscope. Image taken using 40X objective. Only presented some representative images that show the ability of each strain of *C. glabrata* used in assay adherence to HeLa cells.

**Figure 2. *C. glabrata* clinical isolates hyper-adherents to HeLa cells had the adhesins *EPA1*, *EPA6* and *EPA7*.**

PCR products from amplification of *C. glabrata* clinical isolates hyper-adherent to HeLa cells genomic DNA with *EPA1*, *EPA6* and *EPA7* gene-specific primer pairs. PCR reactions were run to determine if *EPA1*, *EPA6* and *EPA7* gene products were in these clinical isolates. The resulting products were separated on agarose gels and stained with ethidium bromide.

**Figure 3. RT-PCR products from analysis of EPA genes expression in *C. glabrata* clinical isolates hyper-adherents to HeLa cells.** The resulting RT-PCR products visualized on ethidium-bromide-stained agarose gels.

**Table 2. There was no correlation between the origin of the clinical isolates hyper-adherents to HeLa cells and expression adhesions.**

## Figures and tables

Strains <sup>a</sup>	Adherence to HeLa cells <sup>b</sup>	Total number of clinical isolates analyzed (%) <sup>c</sup>
<b>Controls</b>		
wt	+	
<i>hdf1</i> Δ, <i>hdf2</i> Δ, <i>rap1</i> Δ, <i>rif1</i> Δ	++	
<i>sir2</i> Δ, <i>sir4</i> Δ	+++	
<i>sir3</i> Δ, <i>epa1</i> Δ, <i>epa7</i> Δ, <i>epa(1,6)</i> Δ, <i>epa(1,7)</i> Δ, <i>epa(1,6,7)</i> Δ, <i>epa(1,2,3,4,5,6,7)</i> Δ	-	
<b>Clinical isolates</b>		
MC(1,2,25,29,48,51,61,63,65,66,68,73)	+++	18.20 (12/66)
MC(3,4,12,16,26,30,31,37,60,63,64,72)	++	18.20 (12/66)
MC(5,6,8,10,11,13,14,17,19,21,22,23,27,28,35,36,38,39,40,41,42,43,44,46,47,52,53,54,55,56,57,58,59,62,67,69)	+	54.55 (36/66)
MC(7,20,32,33,70,71)	-	9.05 (6/66)

Table 1.

Number <i>C. glabrata</i> clinical isolate	Origin	EPA expressed
MC1	Endodontics	<i>EPA1, EPA8</i>
MC2		<i>EPA1, EPA8, EPA11, EPA12, EPA13, EPA15</i>
MC25	Urine	<i>EPA11, EPA13, EPA15</i>
MC29	Urine	<i>EPA1, EPA3, EPA4/5, EPA6, EPA7, EPA8, EPA12, EPA15</i>
MC48	Urine	<i>EPA1, EPA8, EPA12</i>
MC51	Urine	<i>EPA1, EPA6, EPA7, EPA8, EPA11, EPA12</i>
MC61	Urine	<i>EPA1, EPA6, EPA7, EPA8, EPA12</i>
MC65	Urine	<i>EPA11, EPA13, EPA15</i>
MC66	Urine	<i>EPA1, EPA6, EPA8</i>
MC68	Urine	<i>EPA1, EPA3, EPA4/5, EPA6, EPA12, EPA15</i>
MC73	Urine	<i>EPA8</i>

Table 2.

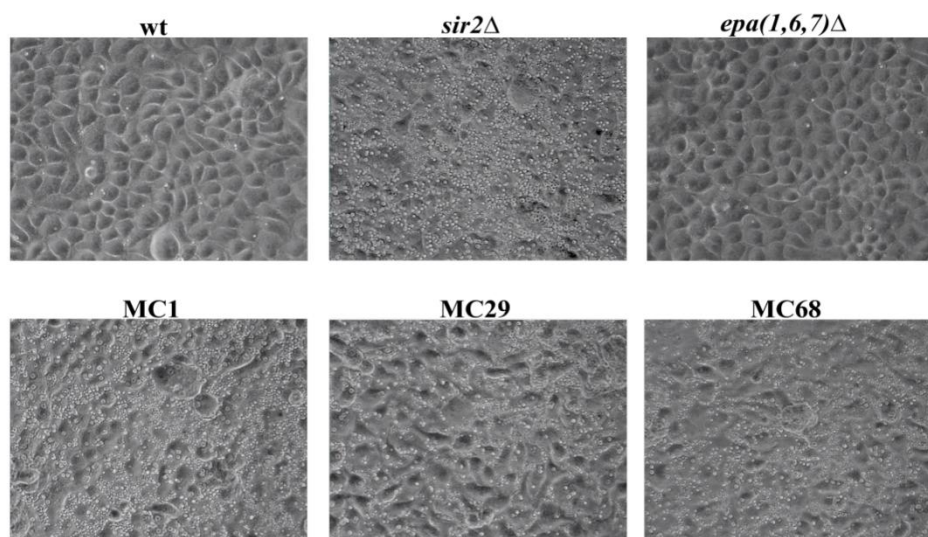
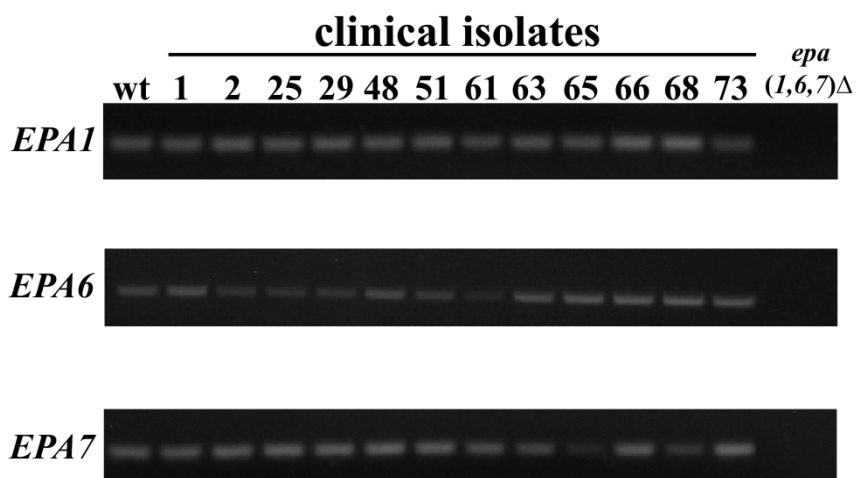


Figure 1.



**Figure 2.**

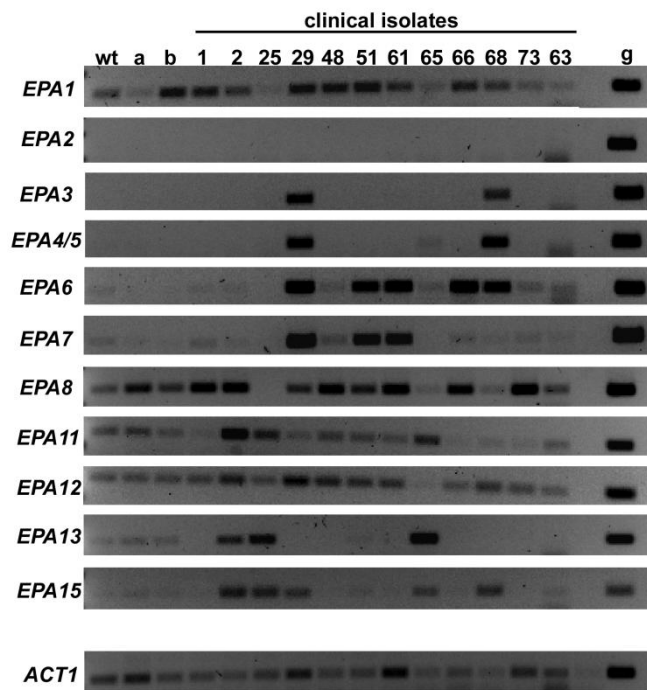


Figure 3.



## Capítulo 5

**Método *in vitro* para la detección de *Candida glabrata*, kit de diagnóstico y usos de los mismos**



**Instituto Mexicano de la Propiedad Industrial**



Solicitud de Patente  
 Solicitud de Registro de Modelo de Utilidad  
 Solicitud de Registro de Diseño Industrial

Modelo Industrial     Dibujo Industrial

Uso exclusivo Delegación Subdelegaciones de la Secretaría de Economía y Oficinas Regionales IMPI

Sello

Folio de entrada


Fecha y hora de recepción

**INSTITUTO MEXICANO DE LA PROPIEDAD INDUSTRIAL**

Dirección Divisinal de Patentes

OFICINA REGIONAL DEL BAJIO

Solicitud Expediente: MX/a/2009/002935  
 Fecha: 18/MAR/2009 Hora: 15:21  
 Folio: MX/E/2009/015724 264821



Antes de llenar la forma lea las consideraciones generales al reverso

I DATOS DEL (DE LOS) SOLICITANTE(S)	
El solicitante es el inventor <input type="checkbox"/>	El solicitante es el causahabiente <input checked="" type="checkbox"/>
1) Nombre (s): <b>INSTITUTO POTOSINO DE INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA Y TECNOLÓGICA, A.C.</b>	
2) Nacionalidad (es): <b>MEXICANA</b>	
3) Domicilio; calle, número, colonia y código postal: <b>CAMINO A LA PRESA SAN JOSÉ 2055 LOMAS 4ª SECCIÓN C.P.78126</b>	
Población, Estado y País: <b>SAN LUIS POTOSÍ, SAN LUIS POTOSÍ, MÉXICO</b>	
4) Teléfono (clave): <b>(444)834-20-00</b>	5) Fax (clave): <b>(444)834-20-10</b>
II DATOS DEL (DE LOS) INVENTOR(ES)	
6) Nombre (s): <b>EN HOJA ANEXA</b>	
7) Nacionalidad (es):	
8) Domicilio; calle, número, colonia y código postal:	
Población, Estado y País:	
9) Teléfono (clave):	10) Fax (clave):
III DATOS DEL (DE LOS) APODERADO(S)	
11) Nombre (s): <b>DANIEL BARRON PASTOR</b>	12) R G P:
13) Domicilio; calle, número, colonia y código postal: <b>CAMINO A LA PRESA SAN JOSE 2055, COL. LOMAS 4ª. SECCION. CP 78216</b>	
Población, Estado y País: <b>SAN LUIS POTOSI, SLP, MEXICO</b>	
14) Teléfono (clave): <b>(444)834-2000</b>	15) Fax (clave): <b>(444)834-20-10</b>
16) Personas Autorizadas para oír y recibir notificaciones: <b>DANIEL BARRON PASTOR, NORMA ISABEL GARCIA CALDERON</b>	
17) Denominación o Título de la Invención: <b>METODO IN VITRO PARA LA DETECCION DE CANDIDA GLABRATA, KIT DE DIAGNOSTICO Y USOS DE LOS MISMOS.</b>	
18) Fecha de divulgación previa Día    Mes    Año	19) Clasificación Internacional <span style="float: right;">uso exclusivo del IMPI</span>
20) Divisinal de la solicitud Número	21) Fecha de presentación Día    Mes    Año
22) Prioridad Reclamada: País    Fecha de presentación Día    Mes    Año	No. de serie
Lista de verificación (uso interno)	
No. Hojas	No. Hojas
<input type="checkbox"/> Comprobante de pago de la tarifa	<input type="checkbox"/> Documento de cesión de derechos
<input type="checkbox"/> Descripción y reivindicación (es) de la invención	<input type="checkbox"/> Constancia de depósito de material biológico
<input type="checkbox"/> Dibujo (s) en su caso	<input type="checkbox"/> Documento (s) comprobatorio(s) de divulgación previa

II	DATOS DEL (DE LOS) INVENTOR(ES)
6) Nombre:	<b>Castaño Navarro, Irene Beatriz</b>
7) Nacionalidad:	<b>Mexicano</b>
8) Domicilio; Montes y Valles No. 195 Colonia y código postal:	Col. Lomas 2da Sección. CP 78210
Población, Estado y País: <b>San Luis Potosí, San Luis Potosí, México</b>	
9) Teléfono (clave):	<b>(444) 834-20-39</b>
10) Fax (clave):	<b>(444)834-20-10</b>

6) Nombre:	<b>Cuéllar Cruz, Mayra</b>
7) Nacionalidad:	<b>Mexicano</b>
8) Domicilio; calle, número, Cordillera Oriental # 146 colonia y código postal:	Col. Lomas 3ª Sección. CP 78216
Población, Estado y País: <b>San Luis Potosí, San Luis Potosí, México</b>	
9) Teléfono (clave):	<b>(444) 834-20-00 ext.</b>
10) Fax (clave):	<b>(444)834-20-10</b>

6) Nombre:	<b>De Las Peñas Nava, Alejandro</b>
7) Nacionalidad:	<b>Mexicano</b>
8) Domicilio; Montes y Valles No. 195 colonia y código postal:	Col. Lomas 2da Sección. CP 78210
Población, Estado y País: <b>San Luis Potosí, San Luis Potosí, México</b>	
9) Teléfono (clave):	<b>(444) 834-20-39</b>
10) Fax (clave):	<b>(444) 834-20-10</b>



"2009, Año de la Reforma Liberal"

Certificado de acuse de recibo registro(s):  
MX/2009/015724

**DIRECCION DIVISIONAL DE PATENTES**  
**SUBDIRECCION DIVISIONAL DE PROCESAMIENTO ADMINISTRATIVO DE PATENTES**  
**COORDINACION DEPARTAMENTAL DE EXAMEN DE FORMA**  
Expediente de Patente de Invención Normal **MX/a/2009/002935**

**Asunto:** Resultado del Examen de Forma.

México, D.F., a 30 de marzo de 2009

**DANIEL BARRON PASTOR**  
Apoderado de  
**INSTITUTO POTOSINO DE INVESTIGACION CIENTIFICA Y TECNOLOGICA, A.C.**  
Camino a la Presa Sn Jose 2055  
Lomas 4a seccion  
78216, SAN LUIS POTOSI, San Luis Potosi

No. de Folio: **26125**

RECIBI ORIGINAL  
Nombre:  
Fecha:  
Firma:

REF: Se da acuse de recibo a su Solicitud presentada el 18/03/2009.

Se tiene por satisfecho el examen de forma señalado por la Ley de la Propiedad Industrial y su Reglamento.

El suscrito firma el presente oficio con fundamento en los artículos 6º fracciones III y XI y 7º bis 2 de la Ley de la Propiedad Industrial (Diario Oficial de la Federación (D.O.F.) 27/06/1991, reformada el 02/08/1994, 26/12/1997, 17/05/1999, 26/01/2004, 16/06/2005 y 25/01/2006); artículos 1º, 3º fracción V inciso a) sub inciso i), 4º y 12º fracciones I, II, III, IV y VI del Reglamento del Instituto Mexicano de la Propiedad Industrial (D.O.F. 14/12/1999, reformado el 01/07/2002, 15/07/2004, 28/07/2004 y 7/09/2007); artículos 1º, 3º, 5º fracción V inciso a) sub inciso i), 16 fracciones I, II, III, IV y VI y 30 del Estatuto Orgánico del Instituto Mexicano de la Propiedad Industrial (D.O.F. 27/12/1999, reformado el 10/10/2002, 29/07/2004, 04/08/2004 y 13/09/2007); 1º, 3º y 5º inciso e) e i) y penúltimo párrafo del Acuerdo que delega facultades en los Directores Generales Adjuntos, Coordinador, Directores Divisionales, Titulares de las Oficinas Regionales, Subdirectores Divisionales, Coordinadores Departamentales y otros subalternos del Instituto Mexicano de la Propiedad Industrial. (D.O.F. 15/12/1999, reformado el 04/02/2000, 29/07/2004, 04/08/2004 y 13/09/2007).

**A T E N T A M E N T E**  
**EL COORDINADOR DEPARTAMENTAL**

**C. RAFAEL E. ESTRADA MEJIA**

REEM/MLLP/2009



MX/2009/26125

# Capítulo 6

## Discusión

## **6.1 *Candida glabrata* responde diferente a estrés oxidativo que *Candida albicans* y *Saccharomyces cerevisiae***

Los hongos patógenos oportunistas como *C. glabrata* han desarrollado mecanismos para proteger sus componentes celulares de las ERO generadas por el metabolismo aerobio o las células fagocíticas (Jamieson, 1992; González-Parraga, 2003).

*C. glabrata* es más resistente a  $H_2O_2$  que *C. albicans* y *S. cerevisiae* durante las fases logarítmica y estacionaria. Esta habilidad de *C. glabrata* de detoxificar eficientemente el  $H_2O_2$ , se debe a su catalasa (Cta1p). A pesar de que *S. cerevisiae* posee dos catalasas, no son tan eficientes como la catalasa de *C. glabrata* (Munhoz y Soares-Netto, 2004).

Las células de *C. glabrata* en fase estacionaria resisten altas concentraciones de  $H_2O_2$ , lo que no se observa durante fase logarítmica. Levaduras en fase estacionaria son capaces de soportar condiciones adversas, como altas concentraciones de antifúngicos, compuestos químicos y radicales libres. En células de *S. cerevisiae* durante fase estacionaria se encontró que existe un arresto del ciclo celular acompañado de cambios fisiológicos, bioquímicos y morfológicos, que le confieren resistencia a diferentes tipos de estrés. Estos cambios incluyen engrosamiento de pared celular, acumulación de carbohidratos y adquisición de termotolerancia (Werner-Washburne y cols., 1993). *C. glabrata* posiblemente al igual que otras levaduras en fase estacionaria, sufre cambios fisiológicos y bioquímicos que le permiten resistir altas concentraciones de  $H_2O_2$ .

Encontramos que *C. glabrata* es más eficiente en la detoxificación de hidroperóxido de cumeno (CHP) que *S. cerevisiae* y *C. albicans*. Esto es debido a que las peroxidasas y glutatión peroxidasas presentes en *C. glabrata* tienen una alta velocidad catalítica con respecto a las de *C. albicans* o *S. cerevisiae*. Sorprendentemente, encontramos que tanto los aislados clínicos como la cepa silvestre de *S. cerevisiae* son más resistentes a CHP que *C. albicans*. Este es un dato interesante porque no existen reportes en donde se haya encontrado que *C. albicans* sea más sensible que *S. cerevisiae*. Esta resistencia probablemente se deba a que *S. cerevisiae* cuenta con un número grande de sistemas antioxidantes contra peróxidos orgánicos ya que tiene tres glutatión peroxidasas (Gpx) las cuales reducen el  $H_2O_2$  y los peróxidos orgánicos a agua y su correspondiente alcohol. Además de las Gpx, dos de las cuatro peroxiredoxinas (Tpx1 y Tsa1) de *S. cerevisiae* parecen tener mayor especificidad por hidroperóxidos orgánicos que por  $H_2O_2$  (Troter y cols., 2008; Park y cols., 2000; Cha y cols., 2003). *S. cerevisiae* posee siete glutaredoxinas (Grx1p-Grx7p) que la protegen de estrés (Izquierdo y cols., 2008; Mesecke y cols., 2008). Grx1p y Grx2p detoxifican los peróxidos orgánicos ya que presentan actividad de glutatión peroxidasas (Collison, 2002). Estos datos sugieren que el conjunto de estos sistemas enzimáticos le confieren resistencia a *S. cerevisiae* contra CHP en contraste con *C. albicans* que no tiene un número grande de enzimas antioxidantes para peróxidos orgánicos. Esto se debe posiblemente a que *C. albicans* se enfrenta principalmente a iones  $O_2^-$  y  $H_2O_2$  generados durante el estallido respiratorio en las células fagocíticas más que con peróxidos orgánicos.

Interesantemente, así cuando *C. glabrata* presenta una mayor resistencia a  $H_2O_2$  y a los peróxidos orgánicos como el CHP, *C. albicans* resiste concentraciones mayores de menadiona que *C. glabrata* y *S. cerevisiae*. Esto sugiere que *C. albicans* posee mecanismos más eficientes que *C. glabrata* y *S. cerevisiae* que le permiten detoxificar el  $O_2^{\cdot-}$  producido por la menadiona. La enzima antioxidante que se encarga de la dismutación del radical  $O_2^{\cdot-}$  a  $H_2O_2$ , es la superóxido dismutasa (Sod). *C. albicans* posee seis superóxido dismutasas con potencial para reducir el superóxido a agua y oxígeno (Chaves y cols., 2007; Martchenko y cols., 2004). Estas superóxido dismutasas presentes en *C. albicans*, deben de protegerla del estallido respiratorio producido por las células fagocíticas del hospedero. Durante el estallido respiratorio, la primera especie reactiva de oxígeno que se genera es el radical superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ) (Schrenzel y cols., 1998), el cual subsecuentemente es convertido a peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) y el radical hidroxilo ( $HO^{\cdot}$ ). Las Sod mejor estudiadas con respecto a su papel en patogénesis son Sod1 y Sod5 de *C. albicans* (Fradin y cols., 2005). Ambas enzimas se requieren para la virulencia en modelos de ratón (Hwang y cols., 2002) y Sod1 se requiere para sobrevivir al ataque de macrófagos (Hwang y cols., 2002). En conjunto, estas observaciones sugieren que cada hongo patógeno se enfrenta a distintas ERO en el hospedero, por lo cual, desarrollan más un sistema enzimático que otro (Frohner y cols., 2009).

### **6.1.2 Sistemas antioxidantes de *Candida glabrata***

*Candida glabrata* posee moléculas y sistemas antioxidantes que le permiten defenderse de los radicales libres. Una enzima antioxidante importante en la



detoxificación de especies reactivas de oxígeno es la catalasa, la cual también se considera un factor de virulencia tanto en bacterias como en *C. albicans* (NG y cols., 2004; Nakagawa y cols., 2003; Horsburgh y cols., 2001; Nakagawa y cols., 1999; Wysong y cols., 1998).

La Cta1p de *C. glabrata* es indispensable en la detoxificación de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, al igual que las catalasas de otras levaduras (Nakagawa y cols., 1999; Nakagawa y cols., 1995; Wysong y cols., 1998).

La cepa mutante *cta1*Δ en presencia de menadiona en fase logarítmica, no fue capaz de hidrolizar el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> generado por la dismutación del SO<sub>2</sub><sup>•-</sup> producido por la menadiona. Esto indica que la CgCta1p es la enzima principal que detoxifica el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> formado endógenamente. Sorprendentemente, en fase estacionaria la mutante *cta1*Δ presentó la misma resistencia que la cepa silvestre. El hecho de que esta cepa en fase estacionaria no presente sensibilidad a menadiona, indicaría que en esta fase del crecimiento celular otros mecanismos de defensa antioxidante independientes de la Cta1p son los que contribuyen al nivel de resistencia observado en estas células. Las enzimas en fase estacionaria que están involucradas en conferir resistencia al radical SO<sub>2</sub><sup>•-</sup> en *S. cerevisiae*, *Bacillus* sp. y *S. pombe*, son las superóxido dismutasas, glutatión peroxidasas, glutaredoxinas y la deshidrogenasa de glucosa-6-fosfato (Yan y cols., 2006; Jamieson, 1998; Lee y cols.; 1997). En fase estacionaria, además de los sistemas enzimáticos, existen moléculas que protegen a las levaduras de las condiciones adversas del medio. La trehalosa, es un metabolito que protege a los microorganismos de varios tipos de estrés, ya que incrementa su concentración durante choque térmico y exposición a compuestos químicos (Nwaka y Holzer,

1998; Hengge-Aronis y cols., 1991). En *C. glabrata* no se ha estudiado la función de este compuesto, pero, probablemente durante fase estacionaria existe acumulación de trehalosa que estabiliza la membrana (Leslie y cols., 1994), impidiendo de esta manera que la menadiona pase al interior de la célula y genere el radical  $\text{SO}_2^{\cdot-}$ . Otra molécula que se induce en respuesta al estrés oxidativo causado por menadiona, es el glutatión. En 1998, Ządziński y cols., mostraron que células de *S. cerevisiae* en presencia de menadiona, disminuyeron la concentración total del glutatión, la formación intracelular del conjugado menadiona-S-glutatión y la traslocación de este conjugado fuera de las células. Así una cepa mutante *gsh* $\Delta$  mostró mayor sensibilidad a menadiona que la cepa silvestre. Estos resultados indican que la formación del conjugado menadiona-S-glutatión es la principal ruta de detoxificación de menadiona ya que permite que la menadiona sea eliminada del interior de las células al medio extracelular. Estas observaciones sugieren que *C. glabrata* durante fase estacionaria posee una alta concentración de glutatión, lo que podría estar favoreciendo la formación del conjugado menadiona-S-glutatión.

En levaduras como *S. cerevisiae* y *C. albicans* se ha demostrado que sus catalasas no son capaces de hidrolizar los hidroperóxidos orgánicos (Netto y cols., 1996; Chae y cols., 1993). En *C. glabrata* con la finalidad de evaluar si la CgCta1p posee la misma especificidad por su sustrato como las catalasas de estas levaduras, células *cta1* $\Delta$  fueron tratadas con hidroperóxido de cumeno (CHP). Observamos que la cepa silvestre y la mutante *cta1* $\Delta$  de *C. glabrata* resistieron la misma concentración de CHP. Este resultado indica que la catalasa de *C. glabrata*

tiene especificidad de sustrato, como ocurre en *S. cerevisiae*, *C. albicans* y *S. pombe* donde se demostró que el gen *CTT1* no se induce por CHP (Mutoh y cols., 2005). Siendo probablemente las glutatión peroxidasas y las peroxidasas las enzimas encargadas de la detoxificación de los peróxidos orgánicos en *C. glabrata* como se ha reportado en *S. cerevisiae* (Munhoz y Soares-Netto, 2004).

La catalasa de *C. albicans* es considerada un factor de virulencia ya que en su ausencia, las células son menos virulentas. La Cta1p de *C. glabrata* no se puede considerar un factor de virulencia, ya que la cepa *cta1Δ* no disminuyó la colonización en un modelo murino de ratón, con respecto a la cepa silvestre. Aunque no observamos una disminución en la colonización de órganos por la cepa *cta1Δ* de *C. glabrata* en el modelo de ratón, no debemos descartar la posibilidad de que la Cta1p pudiera ser un factor de virulencia. Debido a que la importancia relativa del gen de la catalasa en la virulencia por *C. glabrata* puede depender del estado inmune del hospedero y del sitio de infección. La presencia únicamente de la catalasa no necesariamente tiene que tener alguna relevancia en la virulencia causada por este hongo. Como pasa con muchos factores de virulencia podemos postular que el gen de la catalasa pudiera tener un papel en el proceso de infección por *C. glabrata*, pero probablemente es insuficiente por sí misma para causar enfermedad.

### **6.1.3 Regulación de la respuesta transcripcional a estrés oxidativo en *Candida glabrata*: similitudes y diferencias con *Saccharomyces cerevisiae* y *Candida albicans***

En el presente trabajo hemos presentado evidencias que los factores transcripcionales Yap1p, Skn7p, Msn2p y Msn4p regulan diferencialmente la expresión de los sistemas enzimáticos en respuesta a estrés oxidativo en *C. glabrata* (Cuéllar-Cruz y cols., 2008; Capítulo 2). Esto se observa al exponer a *C. glabrata* a varios oxidantes en dos fases de crecimiento celular diferentes: fase logarítmica y fase estacionaria.

Durante la fase logarítmica en respuesta a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> *C. glabrata* expresa Yap1p, Skn7p y Msn4p. Yap1 es considerado un factor crítico en la respuesta a estrés oxidativo en levaduras como *S. cerevisiae*, *C. albicans* y *S. pombe*, donde la activación de sus genes blanco se lleva a cabo por su traslocación a núcleo en respuesta a un agente oxidante presente en el medio. Al igual que estas levaduras *C. glabrata* requiere de Yap1p para activar a sus genes diana en respuesta a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

Otro factor transcripcional que activa los sistemas enzimáticos en respuesta a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en *C. glabrata* es Skn7p. En *S. cerevisiae*, la mayoría de los genes implicados en respuesta a estrés oxidativo, se regulan tanto por Skn7 como por Yap1. Esta regulación es posible porque la localización nuclear constitutiva de Skn7 no depende de un compuesto oxidante, sino de la cooperación con Yap1 cuando este se trasloca a núcleo. Se sugiere que Skn7 en respuesta a un agente oxidante es fosforilado por Yap1. Se ha propuesto que la asociación de Yap1 con

Skn7 en el núcleo es un prerrequisito para que Skn7 se fosforile y active los genes en respuesta a estrés oxidativo (He y cols., 2009). Basados en esta observación, sugerimos que CgSkn7 coopera con CgYap1p para activar genes en respuesta a estrés oxidativo en fase logarítmica. La evidencia que apoya esta hipótesis, como se menciona en el párrafo anterior, es que *C. glabrata* en respuesta a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> durante fase logarítmica, requiere de Yap1p, Skn7p y Msn4p. Otro dato que sugiere que CgSkn7p requiere de CgYap1p para su activación, es el hecho que en respuesta a hidróperóxido de cumeno, Yap1p se comporta como activador, mientras que Skn7p presenta una resistencia moderada a este oxidante, sugiriendo que Skn7p es un activador de un grupo menor de genes que Yap1p.

Otros factores transcripcionales que tienen un papel importante en la regulación transcripcional de *C. glabrata* en respuesta a estrés oxidativo son Msn2p y Msn4p. En *S. cerevisiae*, estos factores transcripcionales en respuesta a varios tipos de estrés, activan genes que poseen el elemento STRE (CCCCT) y generalmente siempre actúan como heterodímero (Mager y de Kruijff, 1995; Martínez-Pastor y cols., 1996). Esto no se observa en *C. glabrata* en donde CgMsn4p se requiere para responder a estrés oxidativo, mientras CgMsn2p no. Interesantemente, también encontramos que en presencia de hidróperóxido de cumeno, las mutantes en *msn2Δ* y *msn4Δ* presentaron el mismo fenotipo que la cepa silvestre, esto indica que CgMsn2p y CgMsn4p no están implicados en la respuesta a CHP. Estos datos concuerdan con lo observado en *C. albicans* en donde la respuesta de CaMsn2/CaMsn4 difiere de *S. cerevisiae*. Debido a que en *C. albicans* estos factores transcripcionales actúan de manera independiente y no contribuyen significativamente a la respuesta a estrés (Nicholls y cols., 2004).

Nuestros datos sugieren que *C. glabrata* al ser un patógeno como *C. albicans* posee funciones de Msn2p/Msn4p similares en respuesta a estrés oxidativo, que han divergido de *S. cerevisiae*. Los datos encontrados en *C. glabrata* son consistentes con la idea que la respuesta al estrés oxidativo en esta levadura ha divergido significativamente de *S. cerevisiae*.

Interesantemente, durante fase estacionaria, la respuesta de *C. glabrata* a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, depende de los factores transcripcionales Skn7p, Msn2p y Msn4p y no de Yap1p. En principio, esperabamos que CgYap1p fuera indispensable en esta fase, debido a que en trabajos previos se ha demostrado que durante esta fase de crecimiento celular, al existir una limitación de glucosa en el medio, *S. cerevisiae* experimenta un incremento en su resistencia a estrés oxidativo, la cual es regulada por Yap1. Yap1 contribuye a la tolerancia a estrés oxidativo en fase estacionaria (Grant y cols., 1996; Stephen y cols., 1995) debido a que se localiza en el núcleo en respuesta a una limitación de carbono (Wiatrowski y Carlson, 2003). A diferencia de *S. cerevisiae* y *C. albicans*, *C. glabrata* no requiere de Yap1p en fase estacionaria. Esto indica que CgYap1p posee un mecanismo distinto a *S. cerevisiae* y *C. albicans* en respuesta a estrés oxidativo durante esta fase de crecimiento celular.

CgSkn7p regula transcripcionalmente la respuesta de *C. glabrata* a estrés oxidativo durante fase estacionaria. Como se discutió en el párrafo anterior, en *S. cerevisiae*, la mayoría de los genes implicados en respuesta a estrés oxidativo, se regulan tanto por Skn7 como por Yap1. Basados en nuestros resultados, proponemos que Skn7p de *C. glabrata* en fase estacionaria no requiere de Yap1p

para fosforilarse y activar a los genes en respuesta a estrés oxidativo como ocurre en *S. cerevisiae*, puesto que CgYap1p es dispensable durante esta fase. Además existen reportes en donde demuestran que existen genes que se inducen únicamente por Yap1p ó Skn7p, en respuesta a estrés oxidativo (Lee y cols., 1999), siendo probablemente el caso de los genes que se activan por CgSkn7p en respuesta a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Con estas evidencias podemos concluir que los genes que le confieren resistencia a *C. glabrata* al H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> durante esta fase, no se encuentran regulados por Yap1p, motivo por el cual Yap1p es dispensable en fase estacionaria. Otro dato que apoya esta conclusión es el hecho que las mutantes en *yap1Δ*, *skn7Δ* en presencia de CHP presentan el mismo fenotipo que la cepa silvestre, indicando que CgYap1p y CgSkn7p no participan en la detoxificación de CHP en fase estacionaria.

Un dato adicional que encontramos fue que mutantes en *yap1Δ*, *skn7Δ*, *msn2Δ* y *msn4Δ* al ser tratadas con menadiona, presentan el mismo fenotipo que la cepa silvestre. La resistencia de *C. glabrata* a menadiona no depende de ninguno de los cuatro factores transcripcionales estudiados en el presente trabajo. Este resultado nos hizo pensar que probablemente *C. glabrata* utiliza otros factores transcripcionales en respuesta a estrés oxidativo, distintos a los estudiados en el presente trabajo. Estos factores transcripcionales pueden ser, Hsf1, Ace1 y Mac1p. Hsf1 además de su función de respuesta a choque térmico, también se ha demostrado que es fosforilado en respuesta a menadiona (Liu y Thiele, 1996). Así, Hsf1 tiene un papel importante en la defensa de la célula contra estrés oxidativo. También se ha establecido que Skn7 y Hsf1 tienen funciones

sobrelapadas. Esto sugiere que *C. glabrata* en respuesta a menadiona requiere de Hsf1 para activar a los mecanismos enzimáticos que la protegen de este oxidante.

Mientras la respuesta adaptativa a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en *C. glabrata* depende en mayor grado de *yap1Δ skn7Δ* y levemente de *msn2Δ msn4Δ*. Yap1 es particularmente importante en la respuesta de adaptación a estrés oxidativo (Stephen y cols., 1995; Kuge y Jones, 1994; Schnell y cols., 1992). Cuando las células se exponen a una concentración baja de un oxidante, las células se adaptan y subsecuentemente son capaces de tolerar altos niveles del mismo u otro oxidante. Cuando las células son tratadas con varios oxidantes, Yap1 se acumula en el núcleo (Coleman y cols., 1999; Yan y cols., 1998; Kuge y cols., 1997) e induce la transcripción de genes que son esenciales para defenderse del estrés oxidativo.

En el presente trabajo, mostramos datos que sugieren que la respuesta a estrés oxidativo de *C. glabrata* ha divergido con respecto a *C. albicans* y *S. cerevisiae*. Esta divergencia se debe probablemente al nicho específico en el cual se desarrollan, ya que cada levadura se enfrenta a distintas condiciones del medio ambiente que hace que desarrollen distintos mecanismos de defensa que le permiten sobrevivir a diferentes situaciones de estrés.

## **6.2 Adhesión de *Candida glabrata* a células epiteliales**

### **6.2.1 Sir3p no regula las adhesinas de *Candida glabrata* que median adherencia a las células epiteliales HeLa**

La adherencia de *C. glabrata* a las células del hospedero es mediada por los genes de la familia EPA. *C. glabrata* expresa *in vitro* Epa1p, la cual media



adherencia a células epiteliales (Cormack, 1999; Castano, 2005). *EPA1* no se expresa en fase estacionaria, células de *C. glabrata* en esta fase de crecimiento no son adherentes a células epiteliales. Los genes *EPA* sólo se expresan cuando existe una delección de alguno de los genes que desreprimen la cromatina (*SIR2*, *SIR3*, *SIR4*, *RIF1*, *RAP1*, *HST1* ó *HST2*). Interesantemente, nuestros datos muestran que una cepa *sir3Δ* no es adherente a células epiteliales HeLa. Este resultado sugiere que las adhesinas que median la adherencia a las células HeLa no se encuentran bajo la regulación de *SIR3* y que probablemente las adhesinas que participan en la adherencia de *C. glabrata* a células HeLa son diferentes de *EPA2-7*. De Las Peñas y cols., demostró que *EPA2-5* son silenciadas de manera dependiente de *SIR3*. Castano y Cormack mostraron que *EPA6-7* se expresan en la cepa *sir3Δ*. Este resultado apoya la hipótesis que Sir3p normalmente reprime algunos de los genes *EPA* (De Las Peñas y cols., 2003) pero, también puede activar genes diferentes de *EPA2-7*.

Observamos que algunos de los aislados clínicos de *C. glabrata* provenientes de distintos orígenes clínicos, fueron hiper-adherentes en fase estacionaria. Este dato revela que Epa1p no es la principal adhesina que media adherencia a las células epiteliales HeLa, lo que sugiere que alguna otra adhesina media adherencia a células HeLa. *C. albicans* posee un número de adhesinas que contribuyen a la adherencia (Hostetter y cols., 1994). Se ha demostrado que dos miembros de la familia de las proteínas Als de *C. albicans* (Als1p y Als5p) median adherencia a células epiteliales, sin embargo las funciones de otros miembros de esta familia aún no se conocen (Sheppard y cols., 2004). Una función similar a las adhesinas Als de *C. albicans*, probablemente ocurre con las adhesinas Epa de *C.*

*glabrata*. Esto explicaría en parte porque las adhesinas se expresan diferencialmente. Tomando en cuenta este resultado, nos preguntamos si los aislados clínicos hiper-adherentes a células HeLa tenían los genes *EPA1*, *EPA6* y *EPA7* los cuales codifican para adhesinas que están implicadas en adherencia a células epiteliales *in vitro* y en la formación de bio-películas. Encontramos que todos los aislados clínicos poseen estos genes *EPA*. Interesantemente, algunos aislados clínicos que no son adherentes a células HeLa no tienen *EPA7*, mientras todos los aislados poseen *EPA6* (datos no mostrados). Esta especificidad de cada adhesina por sus glicanos, les confiere una alta especificidad para poder adherirse a las células de su hospedero (Zupancic y cols., 2008).

### **6.2.2 Los aislados clínicos de *C. glabrata* hiper-adherentes a células epiteliales expresan adhesinas diferencialmente**

Por medio de ensayos de expresión (RT-PCR), los aislados clínicos de *C. glabrata* hiper-adherentes a células HeLa, mostraron marcadas diferencias en el patrón de expresión de los genes *EPA*. Estas diferencias en el patrón de expresión puede deberse a la variabilidad genética de la familia de los genes *EPA*, lo que le proporciona a *C. glabrata* un intervalo amplio para poder adherirse específicamente a su hospedero. El poseer *C. glabrata* una familia grande de adhesinas, probablemente le ayuda a responder diferencialmente a señales del medio ambiente y poder colonizar e invadir diferentes nichos tisulares y fisiológicos durante la infección. Basados en esta inferencia, nos preguntamos, ¿existe correlación entre las adhesinas que expresan los aislados clínicos hiper-

adherentes y el origen tisular del cual se aislaron los aislados clínicos?, al realizar la correlación, encontramos que no hay correlación entre el origen del aislado clínico y la adhesina que expresa. Esto también ocurre en *C. albicans* en donde se ha observado que no existe correlación entre el origen del aislado clínico y su capacidad de adherirse a las células de su hospedero. Con estos resultados, podemos concluir que la adhesión e invasión de *C. glabrata* a las células de su hospedero es compleja, y también debemos considerar el tratamiento y el tipo del paciente del cual se toman los aislados clínicos de *C. glabrata*.

## Capítulo 7

### **Referencias introducción y discusión**

## 7.0 Referencias

- Akalin, H., Ener, B., Kahveci, F., Akcaglar, S., Gurcan, S., and Tore, O. (2004). Persistence of candiduria in ICU catheterized patients is not linked to adherence and proteolytic activities of *Candida strains*. *Intensive Care Med* 30, 972-975.
- Alarco, A. M., and Raymond, M. (1999). The bZip transcription factor Cap1p is involved in multidrug resistance and oxidative stress response in *Candida albicans*. *J Bacteriol* 181, 700-708.
- Alberts, A. S., Geneste, O., and Treisman, R. (1998). Activation of SRF-regulated chromosomal templates by Rho-family GTPases requires a signal that also induces H4 hyperacetylation. *Cell* 92, 475-487.
- Anderson, M. E. (1997). Glutathione and glutathione delivery compounds. *Adv Pharmacols* 38, 65-78.
- Avery, A. M., and Avery, S. V. (2001). *Saccharomyces cerevisiae* expresses three phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidases. *J Biol Chem* 276, 33730-33735.
- Balasundaram, D., Tabor, C. W., and Tabor, H. (1991). Spermidine or spermine is essential for the aerobic growth of *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88, 5872-5876.
- Balasundaram, D., Tabor, C. W., and Tabor, H. (1993). Oxygen toxicity in a polyamine-depleted spe2 delta mutant of *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90, 4693-4697.
- Berlett, B. S., and Stadtman, E. R. (1997). Protein oxidation in aging, disease, and oxidative stress. *J Biol Chem* 272, 20313-20316.
- Bobrowicz, P., Wysocki, R., Owsianik, G., Goffeau, A., and Ulaszewski, S. (1997). Isolation of three contiguous genes, *ACR1*, *ACR2* and *ACR3*, involved in resistance to arsenic compounds in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* 13, 819-828.
- Bossier, P., Fernandes, L., Rocha, D., and Rodrigues-Pousada, C. (1993). Overexpression of *YAP2*, coding for a new yAP protein, and *YAP1* in

- Saccharomyces cerevisiae* alleviates growth inhibition caused by 1,10-phenanthroline. *J Biol Chem* 268, 23640-23645.
- Bouganim, N., David, J., Wysocki, R., and Ramotar, D. (2001). Yap1 overproduction restores arsenite resistance to the ABC transporter deficient mutant *ycf1* by activating *ACR3* expression. *Biochem Cell Biol* 79, 441-448.
- Bouquin, N., Johnson, A. L., Morgan, B. A., and Johnston, L. H. (1999). Association of the cell cycle transcription factor Mbp1 with the Skn7 response regulator in budding yeast. *Mol Biol Cell* 10, 3389-3400.
- Burton, G. W., and Traber, M. G. (1990). Vitamin E: antioxidant activity, biokinetics, and bioavailability. *Annu Rev Nutr* 10, 357-382.
- Burton, G. W. and Ingold, K. V. (1981). Autooxidation of biological molecules. I. The antioxidant activity of vitamin E and related chain-breaking phenolic antioxidants *in vitro*. *J. Amer. Chem. Soc.* 103, 6472-6477.
- Cabiscols, E., Piulats, E., Echave, P., Herrero, E., and Ros, J. (2000). Oxidative stress promotes specific protein damage in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* 275, 27393-27398.
- Capdevila, J., Chacos, N., Werringloer, J., Prough, R. A., and Estabrook, R. W. (1981). Liver microsomal cytochrome P-450 and the oxidative metabolism of arachidonic acid. *Proc Natl Acad Sci U S A* 78, 5362-5366.
- Castano, I., Pan, S. J., Zupancic, M., Hennequin, C., Dujon, B., and Cormack, B. P. (2005). Telomere length control and transcriptional regulation of subtelomeric adhesins in *Candida glabrata*. *Mol Microbiol* 55, 1246-1258.
- Castro, F. A., Herdeiro, R. S., Panek, A. D., Eleutherio, E. C., and Pereira, M. D. (2007). Menadione stress in *Saccharomyces cerevisiae* strains deficient in the glutathione transferases. *Biochim Biophys Acta* 1770, 213-220.
- Castro, F. A., Mariani, D., Panek, A. D., Eleutherio, E. C., and Pereira, M. D. (2008). Cytotoxicity mechanism of two naphthoquinones (menadione and plumbagin) in *Saccharomyces cerevisiae*. *PLoS ONE* 3, e3999.
- Cha, M. K., Choi, Y. S., Hong, S. K., Kim, W. C., No, K. T., and Kim, I. H. (2003). Nuclear thiol peroxidase as a functional alkyl-hydroperoxide reductase

- necessary for stationary phase growth of *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* 278, 24636-24643.
- Chae, H. Z., Kim, I. H., Kim, K., and Rhee, S. G. (1993). Cloning, sequencing, and mutation of thiol-specific antioxidant gene of *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* 268, 16815-16821.
- Chance, B., Sies, H., and Boveris, A. (1979). Hydroperoxide metabolism in mammalian organs. *Physiol Rev* 59, 527-605.
- Chaves, G. M., Bates, S., Maccallum, D. M., and Odds, F. C. (2007). *Candida albicans* GRX2, encoding a putative glutaredoxin, is required for virulence in a murine model. *Genet Mol Res* 6, 1051-1063.
- Chen, K. H., Miyazaki, T., Tsai, H. F., and Bennett, J. E. (2007). The bZip transcription factor Cgap1p is involved in multidrug resistance and required for activation of multidrug transporter gene CgFLR1 in *Candida glabrata*. *Gene* 386, 63-72.
- Cohen, G., Rapatz, W., and Ruis, H. (1988). Sequence of the *Saccharomyces cerevisiae* CTA1 gene and amino acid sequence of catalase A derived from it. *Eur J Biochem* 176, 159-163.
- Coleman, S. T., Epping, E. A., Steggerda, S. M., and Moye-Rowley, W. S. (1999). Yap1p activates gene transcription in an oxidant-specific fashion. *Mol Cell Biol* 19, 8302-8313.
- Collinson, E. J., Wheeler, G. L., Garrido, E. O., Avery, A. M., Avery, S. V., and Grant, C. M. (2002). The yeast glutaredoxins are active as glutathione peroxidases. *J Biol Chem* 277, 16712-16717.
- Collinson, L. P., and Dawes, I. W. (1995). Isolation, characterization and overexpression of the yeast gene, *GLR1*, encoding glutathione reductase. *Gene* 156, 123-127.
- Cormack, B. P., Ghori, N., and Falkow, S. (1999). An adhesin of the yeast pathogen *Candida glabrata* mediating adherence to human epithelial cells. *Science* 285, 578-582.
- Costa, V., Amorim, M. A., Reis, E., Quintanilha, A., and 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.
- Csank, C., and Haynes, K. (2000). *Candida glabrata* displays pseudohyphal growth. *FEMS Microbiol Lett* 189, 115-120.
- Cuellar-Cruz, M., Briones-Martin-del-Campo, M., Canas-Villamar, I., Montalvo-Arredondo, J., Riego-Ruiz, L., Castano, I., and 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.
- Davidson, J. F., Whyte, B., Bissinger, P. H., and Schiestl, R. H. (1996). Oxidative stress is involved in heat-induced cell death in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 5116-5121.
- De Las Penas, A., Pan, S. J., Castano, I., Alder, J., Cregg, R., and Cormack, B. P. (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., Isnard, A. D., and Toledano, M. B. (2000). H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> sensing through oxidation of the Yap1 transcription factor. *Embo J* 19, 5157-5166.
- Delaunay, A., Pflieger, D., Barrault, M. B., Vinh, J., and Toledano, M. B. (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.
- Domergue, R., Castano, I., De Las Penas, A., Zupancic, M., Lockett, V., Hebel, J. R., Johnson, D., and Cormack, B. P. (2005). Nicotinic acid limitation regulates silencing of *Candida* adhesins during UTI. *Science* 308, 866-870.
- Draculic, T., Dawes, I. W., and Grant, C. M. (2000). A single glutaredoxin or thioredoxin gene is essential for viability in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Microbiol* 36, 1167-1174.
- Drakulic, T., Temple, M. D., Guido, R., Jarolim, S., Breitenbach, M., Attfeld, P. V., and Dawes, I. W. (2005). Involvement of oxidative stress response genes in



- redox homeostasis, the level of reactive oxygen species, and ageing in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Yeast Res* 5, 1215-1228.
- Drose, S., and Brandt, U. (2008). The mechanism of mitochondrial superoxide production by the cytochrome bc1 complex. *J Biol Chem* 283, 21649-21654.
- Elskens, M. T., Jaspers, C. J., and Penninckx, M. J. (1991). Glutathione as an endogenous sulphur source in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *J Gen Microbiol* 137, 637-644.
- Estruch, F., and Carlson, M. (1993). Two homologous zinc finger genes identified by multicopy suppression in a *SNF1* protein kinase mutant of *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* 13, 3872-3881.
- Fernandes, L., Rodrigues-Pousada, C., and Struhl, K. (1997). Yap, a novel family of eight bZIP proteins in *Saccharomyces cerevisiae* with distinct biological functions. *Mol Cell Biol* 17, 6982-6993.
- Fidel, P. L., Jr., Vazquez, J. A., and Sobel, J. D. (1999). *Candida glabrata*: review of epidemiology, pathogenesis, and clinical disease with comparison to *C. albicans*. *Clin Microbiol Rev* 12, 80-96.
- Flint, D. H., Tuminello, J. F., and Emptage, M. H. (1993). The inactivation of Fe-S cluster containing hydro-lyases by superoxide. *J Biol Chem* 268, 22369-22376.
- Forrest, G. N., Mankes, K., Jabra-Rizk, M. A., Weekes, E., Johnson, J. K., Lincalis, D. P., and Venezia, R. A. (2006). Peptide nucleic acid fluorescence in situ hybridization-based identification of *Candida albicans* and its impact on mortality and antifungal therapy costs. *J Clin Microbiol* 44, 3381-3383.
- Fradin, C., De Groot, P., MacCallum, D., Schaller, M., Klis, F., Odds, F. C., and Hube, B. (2005). Granulocytes govern the transcriptional response, morphology and proliferation of *Candida albicans* in human blood. *Mol Microbiol* 56, 397-415.
- Fridovich, I. (1995). Superoxide radical and superoxide dismutases. *Annu Rev Biochem* 64, 97-112.
- Frohner, I. E., Bourgeois, C., Yatsyk, K., Majer, O., and 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.
- Furuchi, T., Ishikawa, H., Miura, N., Ishizuka, M., Kajiya, K., Kuge, S., and Naganuma, A. (2001). Two nuclear proteins, Cin5 and Ydr259c, confer resistance to cisplatin in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Pharmacol* 59, 470-474.
- Galkin, A., and Brandt, U. (2005). Superoxide radical formation by pure complex I (NADH:ubiquinone oxidoreductase) from *Yarrowia lipolytica*. *J Biol Chem* 280, 30129-30135.
- Gasch, A. P. (2007). Comparative genomics of the environmental stress response in ascomycete fungi. *Yeast* 24, 961-976.
- Gasch, A. P., Spellman, P. T., Kao, C. M., Carmel-Harel, O., Eisen, M. B., Storz, G., Botstein, D., and Brown, P. O. (2000). Genomic expression programs in the response of yeast cells to environmental changes. *Mol Biol Cell* 11, 4241-4257.
- Gessler, N. N., Aver'yanov, A. A., and Belozerskaya, T. A. (2007). Reactive oxygen species in regulation of fungal development. *Biochemistry (Mosc)* 72, 1091-1109.
- Goldenberg, O., Herrmann, S., Adam, T., Marjoram, G., Hong, G., Gobel, U. B., and Graf, B. (2005). Use of denaturing high-performance liquid chromatography for rapid detection and identification of seven *Candida* species. *J Clin Microbiol* 43, 5912-5915.
- Gonzalez-Parraga, P., Hernandez, J. A., and Arguelles, J. C. (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.
- Gorner, W., Durchschlag, E., Martinez-Pastor, M. T., Estruch, F., Ammerer, G., Hamilton, B., Ruis, H., and Schuller, C. (1998). Nuclear localization of the C2H2 zinc finger protein Msn2p is regulated by stress and protein kinase A activity. *Genes Dev* 12, 586-597.

- Gounalaki, N., and Thireos, G. (1994). Yap1p, a yeast transcriptional activator that mediates multidrug resistance, regulates the metabolic stress response. *Embo J* 13, 4036-4041.
- Gralla, EB., Thiele, DJ., Silar, P., Valentine, JS. (1991). ACE1, a copper-dependent transcription factor, activates expression of the yeast copper, zinc superoxide dismutase gene. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 88(19), 8558–8562.
- Grant, C. M. (2008). Metabolic reconfiguration is a regulated response to oxidative stress. *J Biol* 7, 1.
- Grant, C. M., Maciver, F. H., and Dawes, I. W. (1996). Stationary-phase induction of GLR1 expression is mediated by the yAP-1 transcriptional regulatory protein in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Microbiol* 22, 739-746.
- Gutteridge, J. M. (1994). Biological origin of free radicals, and mechanisms of antioxidant protection. *Chem Biol Interact* 91, 133-140.
- Halliwell, B., and Gutteridge, J. M. (1995). The definition and measurement of antioxidants in biological systems. *Free Radic Biol Med* 18, 125-126.
- Harshman, K. D., Moye-Rowley, W. S., and Parker, C. S. (1988). Transcriptional activation by the SV40 AP-1 recognition element in yeast is mediated by a factor similar to AP-1 that is distinct from *GCN4*. *Cell* 53, 321-330.
- Hartig, A., and Ruis, H. (1986). Nucleotide sequence of the *Saccharomyces cerevisiae* *CTT1* gene and deduced amino-acid sequence of yeast catalase T. *Eur J Biochem* 160, 487-490.
- Hassan, H. M., and Fridovich, I. (1979). Paraquat and *Escherichia coli*. Mechanism of production of extracellular superoxide radical. *J Biol Chem* 254, 10846-10852.
- Hengge-Aronis, R., Klein, W., Lange, R., Rimmele, M., and Boos, W. (1991). Trehalose synthesis genes are controlled by the putative sigma factor encoded by *rpoS* and are involved in stationary-phase thermotolerance in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 173, 7918-7924.
- Herrero, E. (2005). Evolutionary relationships between *Saccharomyces cerevisiae* and other fungal species as determined from genome comparisons. *Rev Iberoam Micols* 22, 217-222.

- Hertle, K., Haase, E., and Brendel, M. (1991). The *SNQ3* gene of *Saccharomyces cerevisiae* confers hyper-resistance to several functionally unrelated chemicals. *Curr Genet* 19, 429-433.
- Hitchcock, C. A., Pye, G. W., Troke, P. F., Johnson, E. M., and Warnock, D. W. (1993). Fluconazole resistance in *Candida glabrata*. *Antimicrob Agents Chemother* 37, 1962-1965.
- Holmgren, A. (1989). Thioredoxin and glutaredoxin systems. *J Biol Chem* 264, 13963-13966.
- Horsburgh, M. J., Clements, M. O., Crossley, H., Ingham, E., and Foster, S. J. (2001). PerR controls oxidative stress resistance and iron storage proteins and is required for virulence in *Staphylococcus aureus*. *Infect Immun* 69, 3744-3754.
- Hostetter, M. K. (1994). Adhesins and ligands involved in the interaction of *Candida spp.* with epithelial and endothelial surfaces. *Clin Microbiol Rev* 7, 29-42.
- Hussain, M., and Lenard, J. (1991). Characterization of *PDR4*, a *Saccharomyces cerevisiae* gene that confers pleiotropic drug resistance in high-copy number: identity with *YAP1*, encoding a transcriptional activator [corrected]. *Gene* 101, 149-152.
- Hwang, C. S., Baek, Y. U., Yim, H. S., and Kang, S. O. (2003). Protective roles of mitochondrial manganese-containing superoxide dismutase against various stresses in *Candida albicans*. *Yeast* 20, 929-941.
- Hwang, C. S., Rhie, G. E., Oh, J. H., Huh, W. K., Yim, H. S., and Kang, S. O. (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, J. A. (2003). Pathways of oxidative damage. *Annu Rev Microbiol* 57, 395-418.
- Inoue, Y., Matsuda, T., Sugiyama, K., Izawa, S., and Kimura, A. (1999). Genetic analysis of glutathione peroxidase in oxidative stress response of *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* 274, 27002-27009.

- Iraqi, I., Garcia-Sanchez, S., Aubert, S., Dromer, F., Ghigo, J. M., d'Enfert, C., and Janbon, G. (2005). The Yak1p kinase controls expression of adhesins and biofilm formation in *Candida glabrata* in a Sir4p-dependent pathway. *Mol Microbiol* 55, 1259-1271.
- Izawa, S., Inoue, Y., and Kimura, A. (1996). Importance of catalase in the adaptive response to hydrogen peroxide: analysis of acatalasaemic *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochem J* 320 ( Pt 1), 61-67.
- Izquierdo, A., Casas, C., Muhlenhoff, U., Lillig, C. H., and Herrero, E. (2008). *Saccharomyces cerevisiae* Grx6 and Grx7 are monothiol glutaredoxins associated with the early secretory pathway. *Eukaryot Cell* 7, 1415-1426.
- Jamieson, D. J. (1992). *Saccharomyces cerevisiae* has distinct adaptive responses to both hydrogen peroxide and menadione. *J Bacteriol* 174, 6678-6681.
- Jamieson, D. J. (1998). Oxidative stress responses of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* 14, 1511-1527.
- Kaur, R., Domergue, R., Zupancic, M. L., and Cormack, B. P. (2005). A yeast by any other name: *Candida glabrata* and its interaction with the host. *Curr Opin Microbiol* 8, 378-384.
- Kaur, R., Ma, B., and Cormack, B. P. (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.
- Kim, S. T., Huh, W. K., Lee, B. H., and Kang, S. O. (1998). D-arabinose dehydrogenase and its gene from *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochim Biophys Acta* 1429, 29-39.
- Kim, IJ, Chung WI (1998). Molecular characterization of a cytosolic ascorbate peroxidase in strawberry fruit. *Plant Sci.* 133, 699-77.
- Kirkman, H. N., Galiano, S., and Gaetani, G. F. (1987). The function of catalase-bound NADPH. *J Biol Chem* 262, 660-666.
- Klaunig, J. E., Xu, Y., Isenberg, J. S., Bachowski, S., Kolaja, K. L., Jiang, J., Stevenson, D. E., and Walborg, E. F., Jr. (1998). The role of oxidative stress in chemical carcinogenesis. *Environ Health Perspect* 106 Suppl 1, 289-295.

- Kobayashi, N., and McEntee, K. (1993). Identification of cis and trans components of a novel heat shock stress regulatory pathway in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* 13, 248-256.
- Krems, B., Charizanis, C., and Entian, K. D. (1995). Mutants of *Saccharomyces cerevisiae* sensitive to oxidative and osmotic stress. *Curr Genet* 27, 427-434.
- Kuge, S., Arita, M., Murayama, A., Maeta, K., Izawa, S., Inoue, Y., and Nomoto, A. (2001). Regulation of the yeast Yap1p nuclear export signal is mediated by redox signal-induced reversible disulfide bond formation. *Mol Cell Biol* 21, 6139-6150.
- Kuge, S., and Jones, N. (1994). *YAP1* dependent activation of *TRX2* is essential for the response of *Saccharomyces cerevisiae* to oxidative stress by hydroperoxides. *Embo J* 13, 655-664.
- Kuge, S., Jones, N., and Nomoto, A. (1997). Regulation of yAP-1 nuclear localization in response to oxidative stress. *Embo J* 16, 1710-1720.
- Kusch, H., S. Engelmann, D. Albrecht, J. Morschhauser, and M. Hecker. (2007). Proteomic analysis of the oxidative stress response in *Candida albicans*. *Proteomics* 7,686–697.
- Kusmaul, L., and Hirst, J. (2006). The mechanism of superoxide production by NADH:ubiquinone oxidoreductase (complex I) from bovine heart mitochondria. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 7607-7612.
- Lamarre, C., LeMay, J. D., Deslauriers, N., and 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.
- Lapinskas, P. J., Cunningham, K. W., Liu, X. F., Fink, G. R., and Culotta, V. C. (1995). Mutations in *PMR1* suppress oxidative damage in yeast cells lacking superoxide dismutase. *Mol Cell Biol* 15, 1382-1388.
- Lee, J., Dawes, I. W., and Roe, J. H. (1995). Adaptive response of *Schizosaccharomyces pombe* to hydrogen peroxide and menadione. *Microbiology* 141 ( Pt 12), 3127-3132.

- Lee, J., Dawes, I. W., and Roe, J. H. (1997). Isolation, expression, and regulation of the *pgr1(+)* gene encoding glutathione reductase absolutely required for the growth of *Schizosaccharomyces pombe*. *J Biol Chem* 272, 23042-23049.
- Lee, J., Godon, C., Lagniel, G., Spector, D., Garin, J., Labarre, J., and Toledano, M. B. (1999). Yap1 and Skn7 control two specialized oxidative stress response regulons in yeast. *J Biol Chem* 274, 16040-16046.
- Leslie, S. B., Teter, S. A., Crowe, L. M., and Crowe, J. H. (1994). Trehalose lowers membrane phase transitions in dry yeast cells. *Biochim Biophys Acta* 1192, 7-13.
- Liochev, S. I., and Fridovich, I. (1999). Superoxide and iron: partners in crime. *IUBMB Life* 48, 157-161.
- Liu, X. D., and Thiele, D. J. (1996). Oxidative stress induced heat shock factor phosphorylation and HSF-dependent activation of yeast metallothionein gene transcription. *Genes Dev* 10, 592-603.
- Longo, V. D., Gralla, E. B., and Valentine, J. S. (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.
- Lushchak, V. I., and Gospodaryov, D. V. (2005). Catalases protect cellular proteins from oxidative modification in *Saccharomyces cerevisiae*. *Cell Biol Int* 29, 187-192.
- Mager, W. H., and De Kruijff, A. J. (1995). Stress-induced transcriptional activation. *Microbiol Rev* 59, 506-531.
- Mager, W. H., and Ferreira, P. M. (1993). Stress response of yeast. *Biochem J* 290 (Pt 1), 1-13.
- Marchler, G., Schuller, C., Adam, G., and Ruis, H. (1993). A *Saccharomyces cerevisiae* UAS element controlled by protein kinase A activates transcription in response to a variety of stress conditions. *Embo J* 12, 1997-2003.

- Martchenko, M., Alarco, A. M., Harcus, D., and 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.
- Martinez-Cayuela, M., (1998). Toxicidad de xenobióticos mediada por radicales libres de oxígeno. *Ars Pharmaceutica* 39, 5–18.
- Martinez-Pastor, M. T., Marchler, G., Schuller, C., Marchler-Bauer, A., Ruis, H., and Estruch, F. (1996). The *Saccharomyces cerevisiae* zinc finger proteins Msn2p and Msn4p are required for transcriptional induction through the stress response element (STRE). *Embo J* 15, 2227-2235.
- McCord, J. M., and Fridovich, I. (1969). The utility of superoxide dismutase in studying free radical reactions. I. Radicals generated by the interaction of sulfite, dimethyl sulfoxide, and oxygen. *J Biol Chem* 244, 6056-6063.
- Meister, A. (1995a). Glutathione biosynthesis and its inhibition. *Methods Enzymol* 252, 26-30.
- Meister, A. (1995b). Glutathione metabolism. *Methods Enzymol* 251, 3-7.
- Meister, A., and Anderson, M. E. (1983). Glutathione. *Annu Rev Biochem* 52, 711-760.
- Mendizabal, I., Rios, G., Mulet, J. M., Serrano, R., and de Larrinoa, I. F. (1998). Yeast putative transcription factors involved in salt tolerance. *FEBS Lett* 425, 323-328.
- Mesecke, N., Mittler, S., Eckers, E., Herrmann, J. M., and Deponce, M. (2008). Two novel monothiol glutaredoxins from *Saccharomyces cerevisiae* provide further insight into iron-sulfur cluster binding, oligomerization, and enzymatic activity of glutaredoxins. *Biochemistry* 47, 1452-1463.
- Molina, M. M., Belli, G., de la Torre, M. A., Rodriguez-Manzaneque, M. T., and Herrero, E. (2004). Nuclear monothiol glutaredoxins of *Saccharomyces cerevisiae* can function as mitochondrial glutaredoxins. *J Biol Chem* 279, 51923-51930.
- Morgan, B. A., Banks, G. R., Toone, W. M., Raitt, D., Kuge, S., and Johnston, L. H. (1997). The Skn7 response regulator controls gene expression in the



- oxidative stress response of the budding yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Embo J* 16, 1035-1044.
- Moye-Rowley, W. S. (2003). Regulation of the transcriptional response to oxidative stress in fungi: similarities and differences. *Eukaryot Cell* 2, 381-389.
- Mulkiidjanian, A. Y. (2005). Ubiquinol oxidation in the cytochrome bc1 complex: reaction mechanism and prevention of short-circuiting. *Biochim Biophys Acta* 1709, 5-34.
- Muller, E. G. (1996). A glutathione reductase mutant of yeast accumulates high levels of oxidized glutathione and requires thioredoxin for growth. *Mol Biol Cell* 7, 1805-1813.
- Munhoz, D. C., and Netto, L. E. (2004). Cytosolic thioredoxin peroxidase I and II are important defenses of yeast against organic hydroperoxide insult: catalases and peroxiredoxins cooperate in the decomposition of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> by yeast. *J Biol Chem* 279, 35219-35227.
- Murphy, M. P. (2009). How mitochondria produce reactive oxygen species. *Biochem J* 417, 1-13.
- Mutoh, N., Kawabata, M., and Kitajima, S. (2005). Effects of four oxidants, menadione, 1-chloro-2,4-dinitrobenzene, hydrogen peroxide and cumene hydroperoxide, on fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *J Biochem* 138, 797-804.
- Nakagawa, C. W., Mutoh, N., and Hayashi, Y. (1995). Transcriptional regulation of catalase gene in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*: molecular cloning of the catalase gene and northern blot analyses of the transcript. *J Biochem* 118, 109-116.
- Nakagawa, Y., Kanbe, T., and Mizuguchi, I. (2003). Disruption of the human pathogenic yeast *Candida albicans* catalase gene decreases survival in mouse-model infection and elevates susceptibility to higher temperature and to detergents. *Microbiol Immunol* 47, 395-403.
- Nakagawa, Y., Koide, K., Watanabe, K., Morita, Y., Mizuguchi, I., and Akashi, T. (1999). The expression of the pathogenic yeast *Candida albicans* catalase gene in response to hydrogen peroxide. *Microbiol Immunol* 43, 645-651.

- Netto, L. E., and Stadtman, E. R. (1996). The iron-catalyzed oxidation of dithiothreitol is a biphasic process: hydrogen peroxide is involved in the initiation of a free radical chain of reactions. *Arch Biochem Biophys* 333, 233-242.
- Ng, V. H., Cox, J. S., Sousa, A. O., MacMicking, J. D., and McKinney, J. D. (2004). Role of KatG catalase-peroxidase in mycobacterial pathogenesis: countering the phagocyte oxidative burst. *Mol Microbiol* 52, 1291-1302.
- Nicholls, S., Straffon, M., Enjalbert, B., Nantel, A., Macaskill, S., Whiteway, M., and Brown, A. J. (2004). Msn2- and Msn4-like transcription factors play no obvious roles in the stress responses of the fungal pathogen *Candida albicans*. *Eukaryot Cell* 3, 1111-1123.
- Nick, J. A., Leung, C.T., and Loewus, F. A. (1986). Isolation and identification of erythroascorbic acid in *Saccharomyces cerevisiae* and *Lypomyces starkeyi*. *Plant Sci* 46, 181-187.
- Nwaka, S., and Holzer, H. (1998). Molecular biology of trehalose and the trehalases in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* 58, 197-237.
- O'Brien, K. M., Dirmeier, R., Engle, M., and Poyton, R. O. (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.
- Oksuz, S., Sahin, I., Yildirim, M., Gulcan, A., Yavuz, T., Kaya, D., and Koc, A. N. (2007). Phospholipase and proteinase activities in different *Candida* species isolated from anatomically distinct sites of healthy adults. *Jpn J Infect Dis* 60, 280-283.
- Outten, C. E., Falk, R. L., and Culotta, V. C. (2005). Cellular factors required for protection from hyperoxia toxicity in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochem J* 388, 93-101.

- Packer, J. E., Slater, T. F., and Willson, R. L. (1979). Direct observation of a free radical interaction between vitamin E and vitamin C. *Nature* 278, 737-738.
- Park, S. G., Cha, M. K., Jeong, W., and Kim, I. H. (2000). Distinct physiological functions of thiol peroxidase isoenzymes in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* 275, 5723-5732.
- Pastore, A., Federici, G., Bertini, E., and Piemonte, F. (2003). Analysis of glutathione: implication in redox and detoxification. *Clin Chim Acta* 333, 19-39.
- Pedrajas, J. R., Kosmidou, E., Miranda-Vizuete, A., Gustafsson, J. A., Wright, A. P., and Spyrou, G. (1999). Identification and functional characterization of a novel mitochondrial thioredoxin system in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* 274, 6366-6373.
- Peterkofsky, B. (1991). Ascorbate requirement for hydroxylation and secretion of procollagen: relationship to inhibition of collagen synthesis in scurvy. *Am J Clin Nutr* 54, 1135S-1140S.
- Petrova, V. Y., Drescher, D., Kujumdzieva, A. V., and Schmitt, M. J. (2004). Dual targeting of yeast catalase A to peroxisomes and mitochondria. *Biochem J* 380, 393-400.
- Pfaller, M. A., and Diekema, D. J. (2007). Epidemiology of invasive candidiasis: a persistent public health problem. *Clin Microbiol Rev* 20, 133-163.
- Rai, P., Colse, T. D., Wemmer, D. E., and Linn, S. (2001). Localization of Fe(2+) at an RTGR sequence within a DNA duplex explains preferential cleavage by Fe(2+) and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. *J Mol Biol* 312, 1089-1101.
- Raitt, D. C., Johnson, A. L., Erkin, A. M., Makino, K., Morgan, B., Gross, D. S., and Johnston, L. H. (2000). The Skn7 response regulator of *Saccharomyces cerevisiae* interacts with Hsf1 in vivo and is required for the induction of heat shock genes by oxidative stress. *Mol Biol Cell* 11, 2335-2347.
- Reller, M. E., Mallonee, A. B., Kwiatkowski, N. P., and Merz, W. G. (2007). Use of peptide nucleic acid-fluorescence in situ hybridization for definitive, rapid identification of five common *Candida* species. *J Clin Microbiol* 45, 3802-3803.

- Rigby, S., Procop, G. W., Haase, G., Wilson, D., Hall, G., Kurtzman, C., Oliveira, K., Von Oy, S., Hyldig-Nielsen, J. J., Coull, J., and Stender, H. (2002). Fluorescence in situ hybridization with peptide nucleic acid probes for rapid identification of *Candida albicans* directly from blood culture bottles. *J Clin Microbiol* 40, 2182-2186.
- Rogers, P. D., Vermitsky, J. P., Edlind, T. D., and Hilliard, G. M. (2006). Proteomic analysis of experimentally induced azole resistance in *Candida glabrata*. *J Antimicrob Chemother* 58, 434-438.
- Rosas-Hernandez, L. L., Juarez-Reyes, A., Arroyo-Helguera, O. E., De Las Penas, A., Pan, S. J., Cormack, B. P., and Castano, I. (2008). yKu70/yKu80 and Rif1 regulate silencing differentially at telomeres in *Candida glabrata*. *Eukaryot Cell* 7, 2168-2178.
- Ruis, H., and Schuller, C. (1995). Stress signaling in yeast. *Bioessays* 17, 959-965.
- Schnell, N., and Entian, K. D. (1991). Identification and characterization of a *Saccharomyces cerevisiae* gene (PAR1) conferring resistance to iron chelators. *Eur J Biochem* 200, 487-493.
- Schnell, N., Krems, B., and Entian, K. D. (1992). The PAR1 (YAP1/SNQ3) gene of *Saccharomyces cerevisiae*, a c-jun homologue, is involved in oxygen metabolism. *Curr Genet* 21, 269-273.
- Schrenzel, J., Serrander, L., Banfi, B., Nusse, O., Fouyouzi, R., Lew, D. P., Demaurex, N., and Krause, K. H. (1998). Electron currents generated by the human phagocyte NADPH oxidase. *Nature* 392, 734-737.
- Schuller, C., Brewster, J. L., Alexander, M. R., Gustin, M. C., and Ruis, H. (1994). The HOG pathway controls osmotic regulation of transcription via the stress response element (STRE) of the *Saccharomyces cerevisiae* *CTT1* gene. *Embo J* 13, 4382-4389.
- Sen, C. K. (1998). Redox signaling and the emerging therapeutic potential of thiol antioxidants. *Biochem Pharmacol* 55, 1747-1758.
- Seneviratne, C.J., Wang, Y., Jin, L., Abiko, Y., and Samaranayake, LP. (2008). *Candida albicans* biofilm formation is associated with increased anti-oxidative capacities. *Proteomics* 8(14), 2936-47.

- Sevanian, A., Davies, K. J., and Hochstein, P. (1985). Conservation of vitamin C by uric acid in blood. *J Free Radic Biol Med* 1, 117-124.
- Shacter, E. (2000). Quantification and significance of protein oxidation in biological samples. *Drug Metab Rev* 32, 307-326.
- Sheppard, D. C., Yeaman, M. R., Welch, W. H., Phan, Q. T., Fu, Y., Ibrahim, A. S., Filler, S. G., Zhang, M., Waring, A. J., and Edwards, J. E., Jr. (2004). Functional and structural diversity in the Als protein family of *Candida albicans*. *J Biol Chem* 279, 30480-30489.
- Shin, DH., Jung, S., Park, SJ., Kim, YJ., Ahn, JM., Kim, W., and Choi, W. (2005). Characterization of thiol-specific antioxidant 1 (TSA1) of *Candida albicans*. *Yeast* 22(11), 907-18.
- Sies, H. (1993). Damage to plasmid DNA by singlet oxygen and its protection. *Mutat Res* 299, 183-191.
- Sies, H. (1997). Oxidative stress: oxidants and antioxidants. *Exp Physiol* 82, 291-295.
- Sies, H., and Menck, C. F. (1992). Singlet oxygen induced DNA damage. *Mutat Res* 275, 367-375.
- Singh, P., Chauhan, N., Ghosh, A., Dixon, F., and Calderone, R. (2004). SKN7 of *Candida albicans*: mutant construction and phenotype analysis. *Infect Immun* 72, 2390-2394.
- Spickett, C. M., Smirnoff, N., and Pitt, A. R. (2000). The biosynthesis of erythroascorbate in *Saccharomyces cerevisiae* and its role as an antioxidant. *Free Radic Biol Med* 28, 183-192.
- Srikantha, T., Zhao, R., Daniels, K., Radke, J., and Soll, D. R. (2005). Phenotypic switching in *Candida glabrata* accompanied by changes in expression of genes with deduced functions in copper detoxification and stress. *Eukaryot Cell* 4, 1434-1445.
- Stadtman, E. R., and Levine, R. L. (2003). Free radical-mediated oxidation of free amino acids and amino acid residues in proteins. *Amino Acids* 25, 207-218.

- Stadtman, E. R., Moskovitz, J., and Levine, R. L. (2003). Oxidation of methionine residues of proteins: biological consequences. *Antioxid Redox Signal* 5, 577-582.
- Starke, D. W., Chen, Y., Bapna, C. P., Lesnefsky, E. J., and Mieyal, J. J. (1997). Sensitivity of protein sulfhydryl repair enzymes to oxidative stress. *Free Radic Biol Med* 23, 373-384.
- Stephen, D. W., Rivers, S. L., and Jamieson, D. J. (1995). The role of the *YAP1* and *YAP2* genes in the regulation of the adaptive oxidative stress responses of *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Microbiol* 16, 415-423.
- Sturz, LA., Diekert, K., Jensen, LT., Lill, R., Cizewski, Culotta V. (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* 41, 38084–38089.
- Thorpe, G. W., Fong, C. S., Alic, N., Higgins, V. J., and Dawes, I. W. (2004). Cells have distinct mechanisms to maintain protection against different reactive oxygen species: oxidative-stress-response genes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 6564-6569.
- Toone, W. M., and Jones, N. (1999). AP-1 transcription factors in yeast. *Curr Opin Genet Dev* 9, 55-61.
- Toone, W. M., Morgan, B. A., and Jones, N. (2001). Redox control of AP-1-like factors in yeast and beyond. *Oncogene* 20, 2336-2346.
- Treger, J. M., Magee, T. R., and McEntee, K. (1998). Functional analysis of the stress response element and its role in the multistress response of *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochem Biophys Res Commun* 243, 13-19.
- Trick, W. E., Fridkin, S. K., Edwards, J. R., Hajjeh, R. A., and Gaynes, R. P. (2002). Secular trend of hospital-acquired candidemia among intensive care unit patients in the United States during 1989-1999. *Clin Infect Dis* 35, 627-630.

- Trotter, E. W., and Grant, C. M. (2005). Overlapping roles of the cytoplasmic and mitochondrial redox regulatory systems in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Eukaryot Cell* 4, 392-400.
- Trotter, E. W., Rand, J. D., Vickerstaff, J., and Grant, C. M. (2008). The yeast Tsa1 peroxiredoxin is a ribosome-associated antioxidant. *Biochem J* 412, 73-80.
- Tsuzi, D., Maeta, K., Takatsume, Y., Izawa, S., and Inoue, Y. (2004). Regulation of the yeast phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase *GPX2* by oxidative stress is mediated by Yap1 and Skn7. *FEBS Lett* 565, 148-154.
- Urban, C., Sohn, K., Lottspeich, F., Brunner, H., and Rupp, S. (2003). Identification of cell surface determinants in *Candida albicans* reveals Tsa1p, a protein differentially localized in the cell. *FEBS Lett* 544(1-3), 228-35.
- Veal, E. A., Ross, S. J., Malakasi, P., Peacock, E., and Morgan, B. A. (2003). Ybp1 is required for the hydrogen peroxide-induced oxidation of the Yap1 transcription factor. *J Biol Chem* 278, 30896-30904.
- Vogt, W. (1995). Oxidation of methionyl residues in proteins: Tools, targets and reversal. *Free Radic. Biol. Med.* 18, 93-105.
- Webster, N. R., and Nunn, J. F. (1988). Molecular structure of free radicals and their importance in biological reactions. *Br J Anaesth* 60, 98-108.
- Wemmie, J. A., Szczypka, M. S., Thiele, D. J., and Moye-Rowley, W. S. (1994). Cadmium tolerance mediated by the yeast AP-1 protein requires the presence of an ATP-binding cassette transporter-encoding gene, *YCF1*. *J Biol Chem* 269, 32592-32597.
- Werner-Washburne, M., Braun, E., Johnston, G. C., and Singer, R. A. (1993). Stationary phase in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol Rev* 57, 383-401.
- Wiatrowski, H. A., and Carlson, M. (2003). Yap1 accumulates in the nucleus in response to carbon stress in *Saccharomyces cerevisiae*. *Eukaryot Cell* 2, 19-26.
- Wieser, R., Adam, G., Wagner, A., Schuller, C., Marchler, G., Ruis, H., Krawiec, Z., and Bilinski, T. (1991). Heat shock factor-independent heat control of

- transcription of the *CTT1* gene encoding the cytosolic catalase T of *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* 266, 12406-12411.
- Wilson, D. A., Joyce, M. J., Hall, L. S., Reller, L. B., Roberts, G. D., Hall, G. S., Alexander, B. D., and Procop, G. W. (2005). Multicenter evaluation of a *Candida albicans* peptide nucleic acid fluorescent in situ hybridization probe for characterization of yeast isolates from blood cultures. *J Clin Microbiol* 43, 2909-2912.
- Wu, A. L., and Moye-Rowley, W. S. (1994). GSH1, which encodes gamma-glutamylcysteine synthetase, is a target gene for yAP-1 transcriptional regulation. *Mol Cell Biol* 14, 5832-5839.
- Wu, J., Harrison, J. K., Dent, P., Lynch, K. R., Weber, M. J., and Sturgill, T. W. (1993). Identification and characterization of a new mammalian mitogen-activated protein kinase kinase, *MKK2*. *Mol Cell Biol* 13, 4539-4548.
- Wysong, D. R., Christin, L., Sugar, A. M., Robbins, P. W., and Diamond, R. D. (1998). Cloning and sequencing of a *Candida albicans* catalase gene and effects of disruption of this gene. *Infect Immun* 66, 1953-1961.
- Yan, C., Lee, L. H., and Davis, L. I. (1998). Crm1p mediates regulated nuclear export of a yeast AP-1-like transcription factor. *Embo J* 17, 7416-7429.
- Yan, G., Hua, Z., Du, G., and Chen, J. (2006). Adaptive response of *Bacillus sp.* F26 to hydrogen peroxide and menadione. *Curr Microbiol* 52, 238-242.
- Yoshitake, S., Nanri, H., Fernando, M. R., and Minakami, S. (1994). Possible differences in the regenerative roles played by thioltransferase and thioredoxin for oxidatively damaged proteins. *J Biochem* 116, 42-46.
- Zadzinski, R., Fortuniak, A., Bilinski, T., Grey, M., and Bartosz, G. (1998). Menadione toxicity in *Saccharomyces cerevisiae* cells: activation by conjugation with glutathione. *Biochem Mol Biol Int* 44, 747-759.
- Zhang, X., De Micheli, M., Colseman, S. T., Sanglard, D., and Moye-Rowley, W. S. (2000). Analysis of the oxidative stress regulation of the *Candida albicans* transcription factor, Cap1p. *Mol Microbiol* 36, 618-629.



Zupancic, M. L., Frieman, M., Smith, D., Alvarez, R. A., Cummings, R. D., and Cormack, B. P. (2008). Glycan microarray analysis of *Candida glabrata* adhesin ligand specificity. *Mol Microbiol* 68, 547-559.

# Anexo

## ***Candida glabrata* posee vías de señalización específicas para las distintas especies reactivas de oxígeno**

### **Determinación de la concentración mínima inhibitoria de *Candida glabrata* con hidroperóxido de cumeno (CHP)**

El utilizar un compuesto químico como el Hidroperóxido de cumeno (CHP) que genera especies reactivas de oxígeno en los fosfolípidos de membrana es muy interesante; ya que los hongos patógenos como *C. glabrata* al ser sometidos a este tipo de estrés, se enfrentan a una serie de daños que deben reparar ó detener de manera eficiente, de lo contrario, su membrana perderá funcionalidad y pueden llegar a muerte celular.

Al realizar este ensayo con la cepa silvestre de *C. glabrata* para determinar la concentración máxima no letal y la concentración mínima letal encontramos que *C. glabrata* es capaz de resistir altas concentraciones de CHP, comparada con otros hongos patógenos y levaduras como *S. cerevisiae* que generalmente a concentraciones iguales o incluso inferiores de CHP son letales (Fig. 8). Las concentraciones que determinamos como máxima no letal y mínima letal fueron: 0.4 y 1.2 mM CHP respectivamente.

## **CgYap1p es crucial para la resistencia a estrés oxidativo generada por CHP en fase logarítmica**

Las cepas mutantes *yap1Δ*, *skn7Δ*, *msn2Δ* y *msn4Δ* de *C. glabrata* en fase logarítmica, fueron tratadas con las concentraciones máxima no letal y mínima letal (0.4 y 1.2 mM) de CHP. La mutante *yap1Δ* es sensible a la concentración máxima no letal (Fig. 9a); así, la respuesta a estrés oxidativo generada por CHP en *C. glabrata* es dependiente de Yap1p, quien esta actuando como un activador de genes de la respuesta a estrés oxidativo (REO). Mientras *skn7Δ* presentó un fenotipo igual al de la cepa silvestre, por lo que Skn7p no esta implicado en la respuesta a los genes REO (Fig. 9a). Al analizar la doble mutante *yap1Δ skn7Δ* encontramos que el fenotipo de *skn7Δ* es epistático sobre el fenotipo de *yap1Δ* (Fig. 9a), esto nos sugiere que probablemente Skn7p actua como un represor de genes de la REO ó bien como un represor de un activador de genes en REO.

## **Yap1p, Skn7p, Msn2p y Msn4p de *Candida glabrata* son necesarios para la resistencia a estrés oxidativo generado por CHP durante fase estacionaria**

En fase estacionaria la respuesta a estrés generada por CHP depende de Yap1p, Skn7p, Msn2p y Msn4p. Interesantemente encontramos que Yap1p y Skn7p actuan como represores de los genes de REO, como se observa en la figura 9b. Mientras Msn2p y Msn4p son activadores de genes en REO necesarios

para detoxificar a *C. glabrata* de los radicales lipídicos generados por CHP. A diferencia de fase logarítmica en donde la detoxificación únicamente depende de Yap1p y de Skn7p; en fase estacionaria la resistencia a CHP depende de estos cuatro factores transcripcionales, esto se debe probablemente a que durante fase estacionaria los factores transcripcionales que activan genes de respuesta a estrés se encuentran activos.

## **La adaptación de *Candida glabrata* a menadiona induce vías de señalización distintas**

Al tratar a *C. glabrata* con menadiona se determinó que la concentración máxima no letal y mínima letal fueron de 0.1 mM y 0.8 mM (Fig. 10). La cepa silvestre de *C. glabrata* no fue capaz de adaptarse a menadiona. Sin embargo, encontramos que la mutante *yap1Δ* es resistente a menadiona (Fig. 11). Skn7p actúa como un represor de los genes en REO. En la doble mutante *yap1Δ skn7Δ* encontramos que el fenotipo de *skn7Δ* es epistático sobre *yap1Δ* (Fig. 11), estos resultados indican que además de que Skn7p actúa como represor puede actuar como inductor. Esta dualidad de Skn7p nos sugiere que *C. glabrata* no tiene únicamente una ruta de detoxificación de superóxido sino que tiene dos o más rutas implicadas en la detoxificación de este radical.

Interesantemente, Msn2p y Msn4p, no están implicados en los mecanismos de detoxificación de *C. glabrata* inducidos por menadiona. Lo contrario de lo que

ocurre con la CgCta1p, la cual esta involucrada en la detoxificación del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> generado a partir del ion superóxido de la menadiona.

### **CgMsn2p y CgMsn4p son necesarios durante fase estacionaria en la respuesta a estrés oxidativo ocasionado por menadiona**

En fase estacionaria la resistencia de *C. glabrata* a menadiona esta dada por Msn2p y Msn4p y no por Skn7p, Yap1p ó la Cta1p (Fig. 11). Estos datos son interesantes porque como ya se discutió en el capítulo 2 encontramos que *C. glabrata* al ser sometida a estrés por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, la Cta1p es necesaria para la detoxificación en fase logarítmica y estacionaria. Esto no sucede con el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> que se forma de manera endógena, lo que sugiere que *C. glabrata* posee mecanismos enzimáticos que detoxifican diferencialmente al H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> endógeno y exogeno.

### **Aislados clínicos de *Candida glabrata* responden diferente a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>**

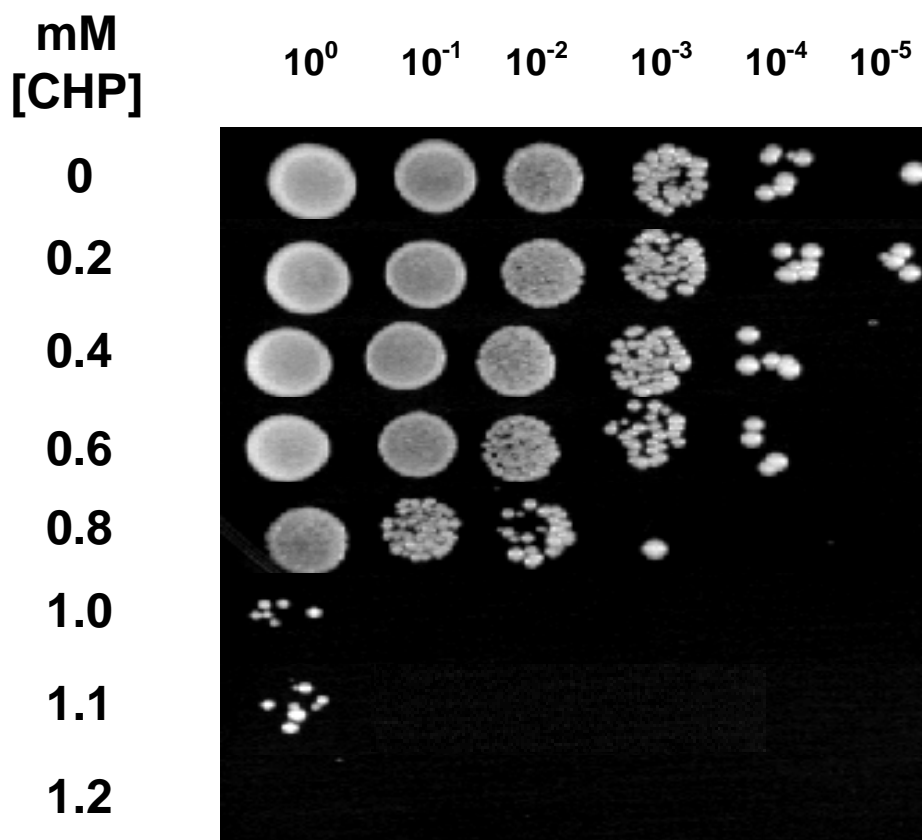
De nuestra colección de aislados clínicos de *C. glabrata*, analizamos la respuesta a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Sorprendentemente encontramos que existen tres grupos de aislados clínicos de *C. glabrata*: a) más resistentes que la cepa silvestre (31.26%), b) más sensibles que la cepa silvestre (14.58%) y c) presenta la misma resistencia que la cepa silvestre (54.16%) (Fig. 12). Estos resultados sugieren que los aislados clínicos de *C. glabrata* al provenir de distintos sitios tisulares, poseen la capacidad de neutralizar distintas especies reactivas de oxígeno, lo que depende

del tipo de células fagocíticas a las cuales se enfrentó *in vivo* en el hospedero humano.

### **Capacidad de formación de biopelículas de aislados clínicos de *Candida glabrata***

Se estima que un 65% de las infecciones humanas están relacionadas con la formación de biopelículas (Potera, 1999). Los microorganismos capaces de formar biopelículas sobre dispositivos médicos son muy variados y, entre las levaduras patógenas para el hombre, las especies del género *Candida*, sobre todo *C. albicans* y *C. glabrata*, son las que más frecuentemente forman biopelículas (Pemán y cols., 2008). Para analizar si los 64 aislados clínicos de *C. glabrata* de nuestra colección eran capaces de formar biopelículas, realizamos ensayos de formación de biopelículas en cajas de poliestireno por medio del ensayo de reducción del XTT. Encontramos que existen aislados clínicos de *C. glabrata* que poseen gran capacidad para formar biopelículas (Fig. 13), mientras otros no (Fig. 14). Esto nos indica que probablemente los aislados clínicos capaces de formar biopelículas, provienen de pacientes que tenían algún tipo de catéter.

## Figura 8



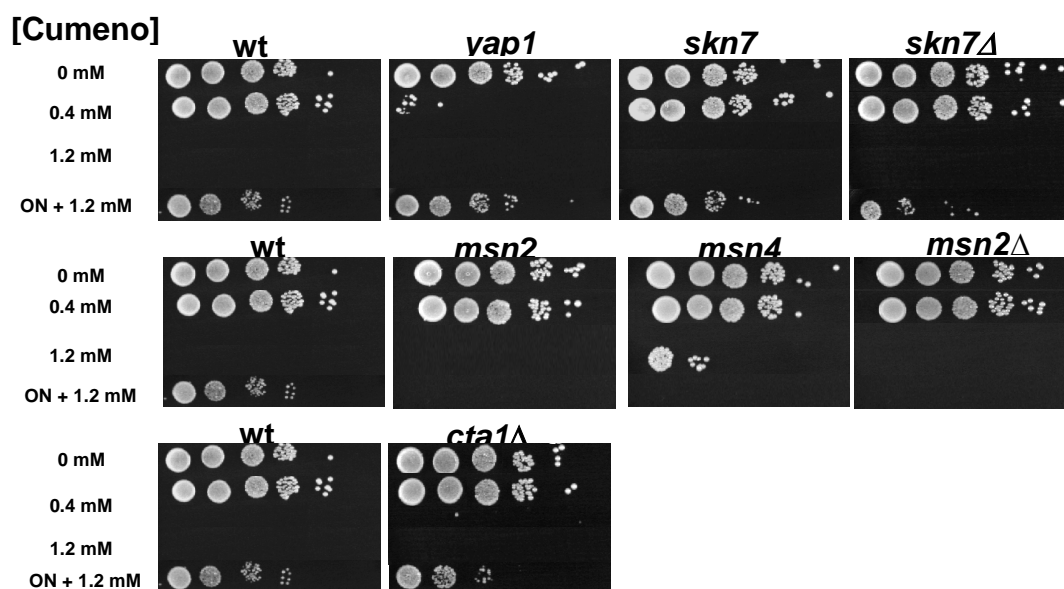
**Fig. 8** Cepa silvestre de *Candida glabrata* tratada con diferentes concentraciones de Hidroperóxido de Cumeno (CHP).

El tratamiento con diferentes concentraciones de CHP se realizó cuando el cultivo alcanzó una concentración de  $1 \times 10^7$  células/mL. Las células fueron incubadas durante 3 h con el CHP y posteriormente lavadas con agua estéril. Se realizaron diluciones seriales, de las cuales, se tomaron 5  $\mu$ l de cada una y se platearon en cajas de YPD. Las cajas fueron incubadas a 30°C durante 48 h.

De esta manera se determinó la concentración máxima no letal de 0.4 mM y la concentración mínima letal de 1.2 mM para el estudio posterior con las cepas mutantes.



## Figura 9



**Fig. 9** Yap1p, Skn7p, Msn2p y Msn4p activan genes en respuesta a estrés oxidativo en diferentes fases de crecimiento.

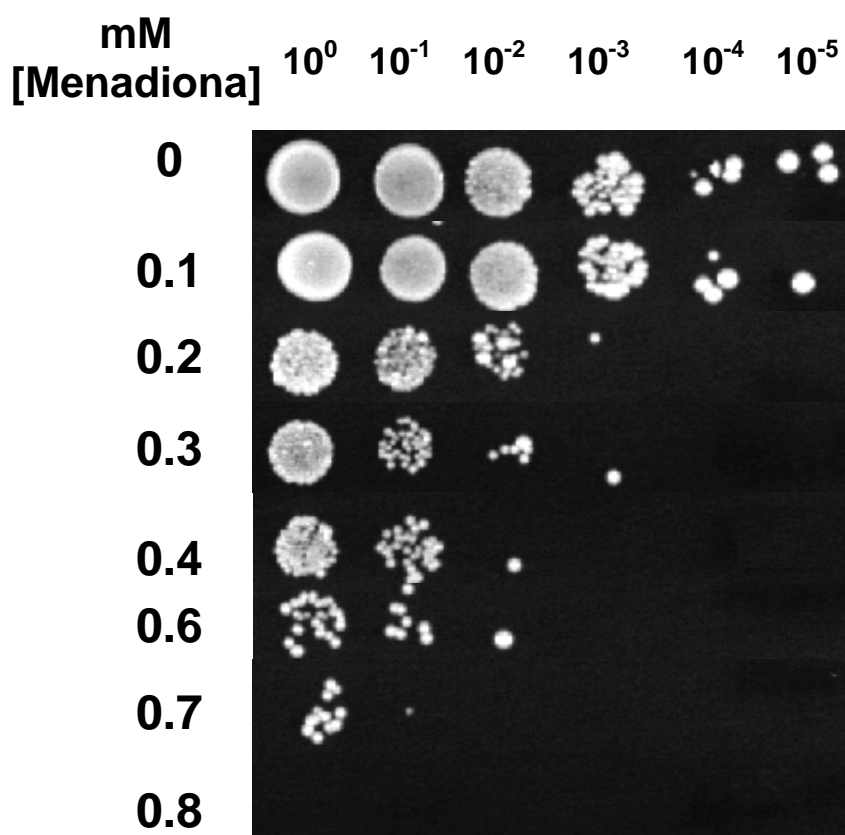
**Fig. 9a)** Yap1p es crucial para la resistencia a estrés oxidativo generada por CHP en fase logarítmica.

Las mutantes de los factores transcripcionales implicados en la resistencia a estrés oxidativo de *Candida glabrata* fueron tratadas con 0.4 y 1.2 mM de CHP; los cultivos se incubaron durante 3 h con el CHP. Una parte de estos cultivos fueron tratados con 0.4 mM durante 1 h y después se les adiciono 1.2 mM de menadiona durante 2 h. Posteriormente se lavaron con agua estéril. Se realizaron diluciones seriales, de las cuales, se tomaron 5  $\mu$ l de cada una y fueron plateadas en cajas de YPD. Las cajas fueron incubadas a 30°C durante 48 h.

**Fig. 9b)** Yap1p, Skn7p, Msn2p y Msn4p son necesarios para la resistencia a estrés oxidativo en fase estacionaria.

Las mutantes *yap1Δ*, *skn7Δ*, *msn2Δ* y *msn4Δ* en fase estacionaria fueron tratadas con 1.2 mM de CHP e incubadas durante 3 h a 30°C. Se lavaron con agua estéril y se realizaron diluciones seriales, de las cuales se tomaron 5  $\mu$ l de cada una y fueron plateadas en cajas de YPD. Las cajas fueron incubadas a 30°C durante 48 h.

## Figura 10

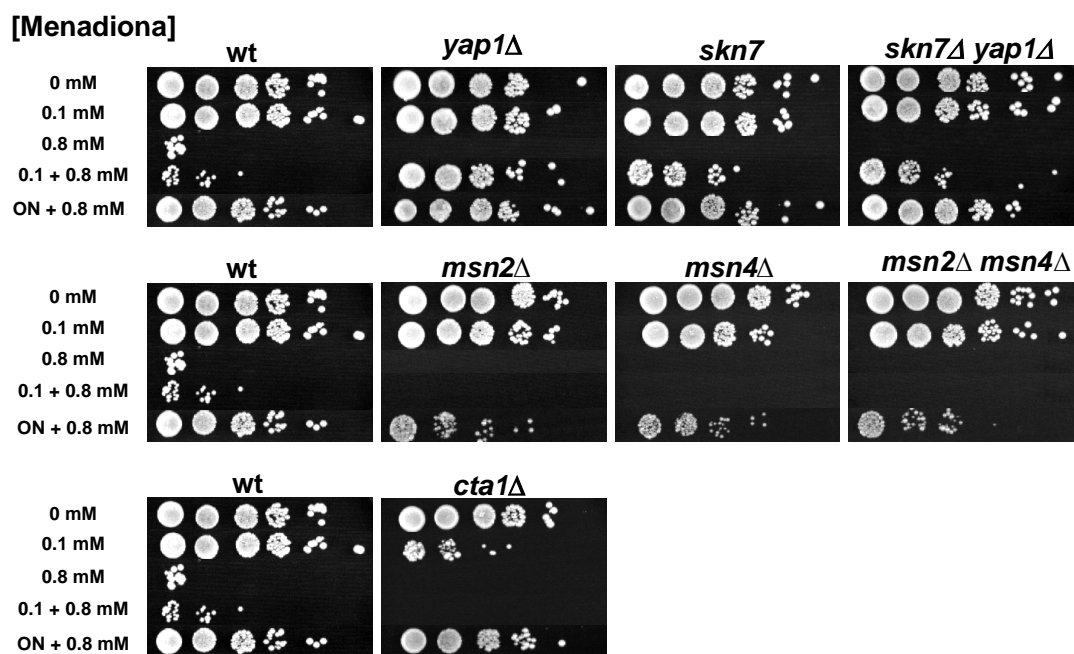


**Fig. 10 Cepas silvestre de *Candida glabrata* tratada con diferentes concentraciones de Menadiona.**

El tratamiento con diferentes concentraciones de menadiona se realizó cuando el cultivo alcanzó una concentración de  $1 \times 10^7$  células/mL. Las células fueron incubadas durante 3 h con menadiona y posteriormente lavadas con agua estéril. Se realizaron diluciones seriales, de las cuales, se tomaron 5  $\mu$ l de cada una y fueron plateadas en caja de YPD. Las cajas fueron incubadas a 30°C durante 48 h

Así, se determinó la concentración máxima no letal de 0.1 mM y la concentración mínima letal de 0.8 mM para el estudio posterior con las cepas mutantes.

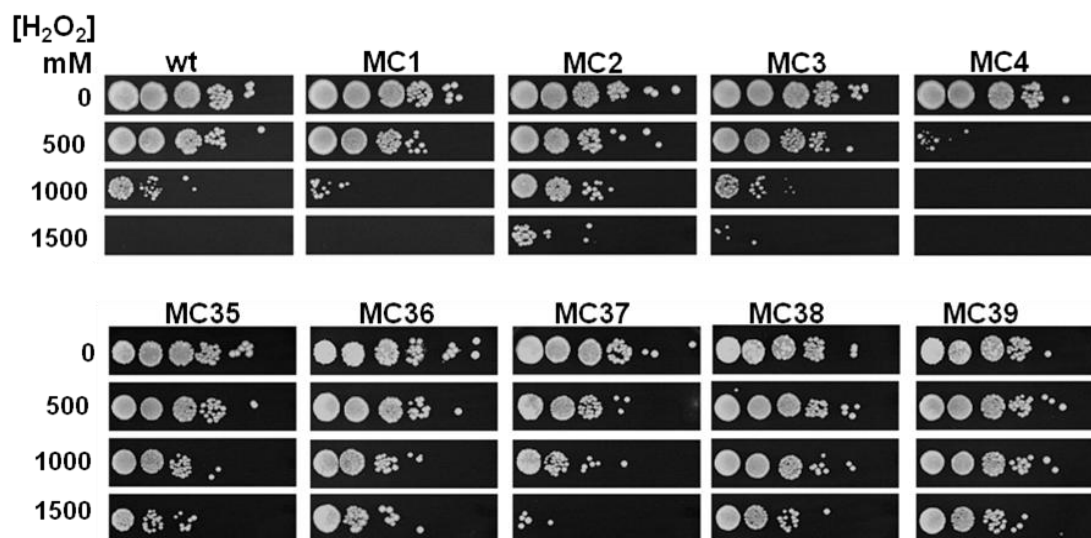
## Figura 11



**Fig. 11 Skn7p tiene una actividad dual en respuesta al estrés oxidativo generada por menadiona.**

Las cepas *yap1Δ*, *skn7Δ*, *msn2Δ* y *msn4Δ* fueron tratadas con 0.1 y 0.8 mM de menadiona durante 3h. Una parte de estos cultivos fueron tratados con 0.1 mM durante 1 h y posteriormente se les adiciono 0.8 mM de menadiona durante 2 h. Posteriormente se lavaron con agua estéril. Se realizaron diluciones seriales, de las cuales, se tomaron 5  $\mu$ l de cada una y fueron plateadas en cajas de YPD. Las cajas fueron incubadas a 30°C durante 48 h.

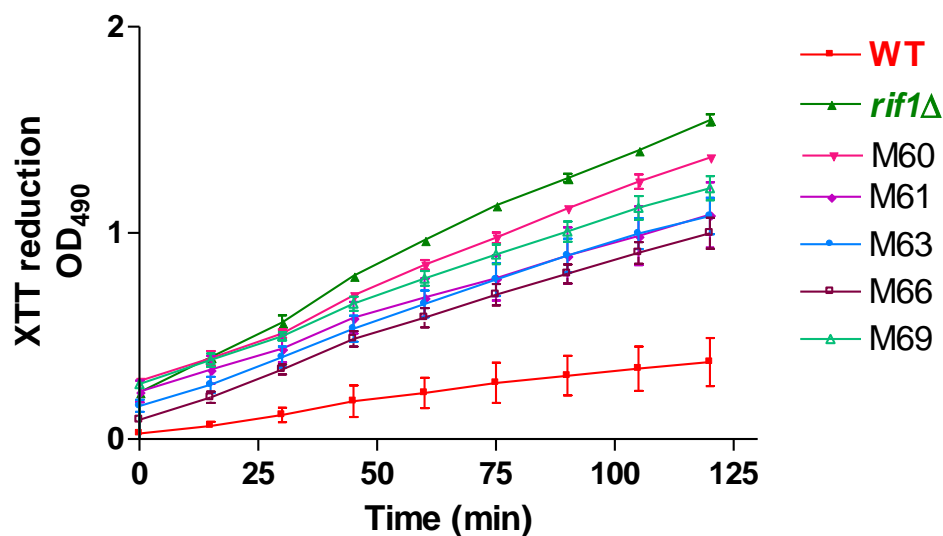
## Figura 12



**Fig. 12** Aislados clínicos responden diferente a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> durante fase estacionaria.

Fenotipos de algunos aislados clínicos en respuesta a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> durante fase estacionaria. Los aislados clínicos en fase estacionaria se ajustaron a OD<sub>600nm</sub> 0.5 (como se indicó en el capítulo dos para tratamiento en fase estacionaria) y fueron tratados con distintas concentraciones de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, posteriormente se incubaron durante 3 h a 30°C. Se lavaron con agua estéril y se realizaron diluciones seriales, de las cuales se tomaron 5 µl de cada una y fueron plateadas en cajas de YPD. Las cajas fueron incubadas a 30°C durante 48 h.

## Figura 13



**Fig. 13** Aislados clínicos de *Candida glabrata* con gran capacidad para formar biopelículas.

Los aislados clínicos de *Candida glabrata* se llevaron a fase estacionaria en 5 mL de medio CAA, suplementado con glucosa al 2% y uracilo [50 mg/l]. Posteriormente se ajustó OD a 1.0 con el medio en el que crecieron cada cepa (medio centrifugado). Se tomaron 100  $\mu$ l (por triplicado) de las suspensiones celulares y se distribuyen en cajas de 96 pozos. Se dejaron a 30 °C durante 24 h, para permitir la formación del biofilm. Las células no adherentes se remueven lavando cada pozo dos veces con agua estéril y una vez con buffer PBS, retirar el exceso de PBS con una micropipeta. (Medir la OD a 600 nm antes y después del lavado del biofilm). Las células fuertemente adheridas se cuantifican por medio del ensayo de reducción del XTT. De la solución de XTT-menadiona se toman 100  $\mu$ l y se adicionan a cada pozo, seguido por incubación en el lector de placas a 37°C durante 2 h (cada 15 minutos se toma una lectura). El cambio colorimétrico fue medido a 492 nm.

## Figura 14

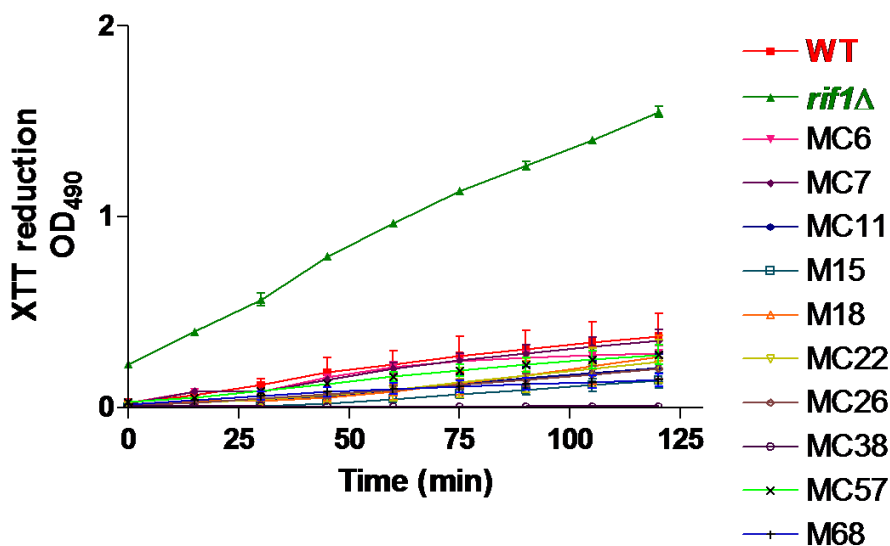


Fig. 14 Aislados clínicos de *Candida glabrata* sin capacidad para formar biopelículas.

Los aislados clínicos de *Candida glabrata* se llevaron a fase estacionaria en 5 mL de medio CAA, suplementado con glucosa al 2% y uracilo [50 mg/l]. Posteriormente se ajustó OD a 1.0 con el medio en el que crecieron cada cepa (medio centrifugado). Se tomaron 100  $\mu$ l (por triplicado) de las suspensiones celulares y se distribuyen en cajas de 96 pozos. Se dejaron a 30 °C durante 24 h, para permitir la formación del biofilm. Las células no adherentes se remueven lavando cada pozo dos veces con agua estéril y una vez con buffer PBS, retirar el exceso de PBS con una micropipeta. (Medir la OD a 600 nm antes y después del lavado del biofilm). Las células fuertemente adheridas se cuantifican por medio del ensayo de reducción del XTT. De la solución de XTT-menadiona se toman 100  $\mu$ l y se adicionan a cada pozo, seguido por incubación en el lector de placas a 37°C durante 2 h (cada 15 minutos se toma una lectura). El cambio colorimétrico fue medido a 492 nm.