



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

**POSGRADO EN CIENCIAS EN BIOLOGIA MOLECULAR**

**“Caracterización de la respuesta a estrés general  
de los factores de transcripción Msn2 y Msn4 de  
*Candida glabrata*”**

Tesis que presenta

**Cindy Miroslava Rodríguez Hernández**

Para obtener el grado de

**Maestra en Ciencias en Biología Molecular**

Codirectores de la Tesis:

**Alejandro De Las Peñas Nava, Ph. D.**

**Dra. Ma. Guadalupe Gutiérrez Escobedo**

San Luis Potosí, S.L.P., Junio de 2022



## Constancia de aprobación de la tesis

La tesis “**Caracterización de los factores de transcripción Msn2 y Msn4 en *Candida glabrata***” presentada para obtener el Grado de Maestra en Ciencias en Biología Molecular fue elaborada por **Cindy Miroslava Rodríguez Hernández** y aprobada el 17 de Junio de 2022 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.

---

**Alejandro De Las Peñas Nava, Ph. D.**

Co-Director de la tesis

---

**Dra. Ma. Guadalupe Gutiérrez Escobedo**

Co-Directora de la tesis

---

**Dr. Juan Francisco Jiménez Bremont**

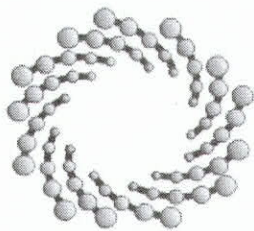
Miembro del Comité Tutorial



## **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 de Alejandro De Las Peñas Nava, Ph. D. y la Dra. Ma. Guadalupe Gutiérrez Escobedo. Esta tesis recibió financiamiento del proyecto A1-S-9550 de la Convocatoria de Investigación Científica Básica CB-2017-2018 del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT)

Durante la realización del trabajo el autor recibió una beca académica del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología con No. de registro 776035 y del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A. C.



**IPICYT**

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

## Acta de Examen de Grado

La Secretaria Académica del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C., certifica que en el Acta 230 del Libro Segundo de Actas de Exámenes de Grado del Programa de Maestría en Ciencias en Biología Molecular está asentado lo siguiente:

En la ciudad de San Luis Potosí a los 22 días del mes de junio del año 2022, se reunió a las 13:00 horas en las instalaciones del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C., el Jurado integrado por:

<b>Dr. Juan Francisco Jiménez Bremont</b>	<b>Presidente</b>	<b>IPICYT</b>
<b>Dra. Ma. Guadalupe Gutiérrez Escobedo</b>	<b>Secretaria</b>	<b>IPICYT</b>
<b>Dr. Alejandro De Las Peñas Nava</b>	<b>Sinodal</b>	<b>IPICYT</b>
<b>Dr. Carlos Ricardo Gonzalez Ruiz</b>	<b>Sinodal</b>	<b>IPICYT</b>

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

**MAESTRA EN CIENCIAS EN BIOLOGÍA MOLECULAR**

sustentó la C.

**Cindy Miroslava Rodríguez Hernández**

sobre la Tesis intitulada:

*Caracterización de la respuesta a estrés general de los factores de transcripción Msn2 y Msn4 de Candida glabrata*

que se desarrolló bajo la codirección de

**Dra. Ma. Guadalupe Gutiérrez Escobedo**  
**Dr. Alejandro De Las Peñas Nava**

El Jurado, después de deliberar, determinó

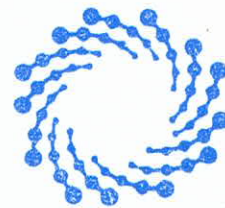
**APROBARLA**

Dándose por terminado el acto a las 15:05 horas, procediendo a la firma del Acta los integrantes del Jurado. Dando fe la Secretaria Académica 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 22 días del mes de junio de 2022.

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

**Dra. Lina Raquel Riego Ruiz**  
Secretaria Académica



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

## Dedicatorias

Con todo mi amor y respeto a Osvaldo Ibáñez Sandoval, por ser mi mayor motivación como persona y como un increíble científico. Gracias por estar a mi lado en los mejores y en los peores momentos de mi vida. Gracias Osvaldo por ser, estar y existir. Te amo con todo mi corazón.

A nuestra pequeña hija Elizabeth Adeline Ibáñez Rodríguez, te esperamos con todo el amor del mundo. Gracias por ser una motivación más en nuestras vidas e inspirarnos a seguir adelante. Te amamos.

A mi familia potosina: mi mamá Dolores, mis tías Refugio y Guadalupe por su apoyo, cariño y comprensión.

A mi familia poblana: Agustina, Araceli, Lilia, Clío, Miguel, Oscar, Gonzálo y Ricardo por recibirme con tanta alegría y por preocuparse por nosotros.

Al Dr. Juan Pablo Loyola Rodríguez, al Dr. Raúl Rosales Ibáñez y al Dr. Luis Gaytán Cepeda por motivarme a seguir en la ciencia.

“No es grande el que siempre triunfa, sino el que jamás se desalienta”

## **Agradecimientos**

Al Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica por el apoyo que me brindó desde mi ingreso a la maestría.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por el apoyo económico otorgado para la realización de mi maestría.

Al Dr. Alejandro De Las Peñas Nava por ser un excelente ejemplo como científico y brindarme gran parte de sus conocimientos.

A la Dra. Ma. Guadalupe Gutiérrez Escobedo por recibirme con gran entusiasmo, siempre apoyarme y darme consejos para la vida personal y científica.

A la Dra. Irene Beatriz Castaño Navarro por sus comentarios y el apoyo a este trabajo de maestría y por motivarnos día a día.

Al Dr. Juan Francisco Jimenez Bremont por sus observaciones y recomendaciones en la realización de nuestro proyecto.

Al Dr. Juan Ernesto López Ramos y a Laura Angélica Vera Salazar por sus consejos y por su amistad.

A Gloria López por siempre contagiarnos su alegría en el laboratorio, además de apoyarnos incondicionalmente.

A todos mis compañeros de laboratorio por el apoyo que me brindaron durante mi maestría.

# Contenido

Constancia de aprobación de la tesis	ii
Créditos Institucionales	iii
Acta de examen	iv
Dedicatorias	v
Agradecimientos	vi
Lista de tablas	ix
Lista de figuras	x
Lista de material suplementario	xii
Resumen	xiii
Abstract	xiv
INTRODUCCIÓN	1
MATERIALES Y MÉTODOS	
1. Medios de cultivo y cepas	5
2. Plásmidos y Oligonucleótidos	6
3. Aislamiento de plásmidos	6
4. Extracción de DNA genómico de <i>C. glabrata</i>	6
5. Cuantificación de DNA	7
6. Amplificación de DNA por PCR	7
7. Extracción de DNA con fenol:cloroformo:isoamílico	7
8. Reacciones de restricción y ligación	8
9. Transformación de plásmidos en <i>Escherichia coli</i>	8
10. Transformación genética de <i>C. glabrata</i>	8
11. Ensayos de sensibilidad con exposición crónica	8
12. Análisis de expresión transcripcional de <i>MSN2</i> y <i>MSN4</i> por citometría de flujo	9
13. Curvas de crecimiento	9
14. Análisis bioinformático de Msn2 y Msn4	10
15. Análisis estadísticos	10

RESULTADOS	
Homología de Msn2 y Msn4 de <i>C. glabrata</i> con <i>S. cerevisiae</i>	11
Expresión transcripcional de <i>MSN2</i> y <i>MSN4</i> en presencia de estrés oxidante	12
Expresión transcripcional de <i>MSN4</i> en presencia de estrés nutricional	13
Expresión transcripcional de <i>MSN4</i> en presencia de estrés nutricional por fuentes de carbono no fermentables	14
Expresión transcripcional de <i>MSN4</i> en presencia de fármacos	15
Expresión transcripcional de <i>MSN4</i> en presencia de estrés por metales	16
Expresión transcripcional de <i>MSN4</i> en presencia de estrés osmótico	17
Expresión transcripcional de <i>MSN4</i> en ausencia de <i>TRX2</i>	18
DISCUSIÓN	
<i>CgMsn2</i> / <i>CgMsn4</i> y <i>ScMsn2</i> / <i>ScMsn4</i> divergieron	19
El promotor de <i>MSN2</i> no contiene elementos regulatorios que respondan a xenobióticos	20
<i>CgMSN4</i> tiene una expresión alta constitutiva, se autorregula y solo responde a condiciones de estrés nutricional	21
<i>CgMsn2</i> y <i>CgMsn4</i> no son necesarios para la resistencia a diferentes condiciones de estrés	23
CONCLUSIONES	24
REFERENCIAS	25



## Lista de tablas

Tabla 1. Cepas de <i>Escherichia coli</i>	35
Tabla 2. Cepas de <i>Candida glabrata</i>	36
Tabla 3. Plásmidos usados en este estudio	37
Tabla 4. Oligonucleótidos usados en este estudio	39

## Lista de figuras

Fig. 1. Alineamientos de los dominios HD1 y DBD de Msn2 y Msn4 de <i>C. glabrata</i> y <i>S. cerevisiae</i> .	40
Fig. 2. Fusiones transcripcionales de los promotores de <i>MSN2</i> y <i>MSN4</i> con GFP.	42
Fig. 3. Expresión transcripcional de <i>MSN2</i> en estrés oxidativo.	44
Fig. 4. Expresión transcripcional de <i>MSN4</i> en estrés oxidativo.	46
Fig. 5. Expresión transcripcional de <i>MSN4</i> en estrés nutricional (0.2% glucosa).	48
Fig. 6. Expresión transcripcional de <i>MSN4</i> en estrés nutricional (3% glicerol).	50
Fig. 7. Expresión transcripcional de <i>MSN4</i> en estrés nutricional (3% etanol).	52
Fig. 8. Expresión de <i>MSN4</i> en presencia de fluconazol.	54
Fig. 9. Expresión de <i>MSN4</i> en presencia de rapamicina.	56
Fig. 10. Expresión de <i>MSN4</i> en presencia de 0.5mM de $\text{CdSO}_4$ .	58
Fig. 11. Expresión de <i>MSN4</i> en presencia de 1 mM de $\text{ZnSO}_4$ .	60
Fig. 12. Expresión de <i>MSN4</i> en presencia de 0.5M de NaCl.	62

Fig. 13. Expresión de *MSN4* en la mutante *trx2Δ*.

64

## Lista de material suplementario

- Fig. Sup. 1. Alineamiento de los factores de transcripción Msn2 y Msn4 de *S. cerevisiae* y *C. glabrata*. 58
- Fig. Sup. 2. Resistencia de *MSN2* y *MSN4* a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, fluconazol, ZnSO<sub>4</sub>, CdSO<sub>4</sub> y alta temperatura. 59

# Caracterización de la respuesta a estrés general de los factores de transcripción Msn2 y Msn4 de *Candida glabrata*

*Candida glabrata* es una levadura patógena oportunista que ha desarrollado estrategias para sobrevivir dentro del huésped. *C. glabrata* presenta una alta resistencia al estrés oxidativo y nutricional, y esta capacidad de responder a estos dos tipos de estrés esta controlada en parte por los factores de transcripción Msn2 y Msn4. En este trabajo hicimos un análisis bioinformático de las secuencias de las proteínas Msn2 y Msn4 de *C. glabrata* y de *S. cerevisiae*, analizamos la regulación transcripcional de *MSN2* y *MSN4* y determinamos su participación en la resistencia a xenobióticos. El análisis bioinformático indicó que los dominios funcionales de Msn2 y Msn4 se encuentran conservados, y que Msn4 es la proteína que más ha divergido entre ellas. El promotor de *MSN2* tiene una expresión baja constitutiva y en cambio la expresión de *MSN4* presenta una expresión alta constitutiva y se autorregula. La expresión *MSN4* solo respondió a condiciones de estrés nutricional y no a la presencia de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, ZnSO<sub>4</sub> y fluconazol. Finalmente, Msn2 y Msn4 no participan en la resistencia a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, ZnSO<sub>4</sub>, fluconazol, CdSO<sub>4</sub> ni a temperaturas altas (42°C y 45°C). Nuestros datos sugieren que las proteínas Msn2 y Msn4 divergieron en *C. glabrata* para participar en la virulencia de este hongo patógeno oportunista.

Palabras clave: *C. glabrata*, Msn2, Msn4, estrés

## **Characterization of the general stress response of the transcription factors Msn2 and Msn4 of *Candida glabrata***

*Candida glabrata* is an opportunistic pathogenic yeast that has developed strategies to survive within the host. *C. glabrata* has a high resistance to oxidative and nutritional stress and both responses are controlled in part by the transcription factors Msn2 and Msn4. In this work, we carried out a bioinformatic analysis of Msn2 and Msn4 of *C. glabrata* and of the closely related non-fungal pathogen *S. cerevisiae*. We analyzed the transcriptional regulation of *MSN2* and *MSN4* and we determined their role in resistance to xenobiotics. The bioinformatic analysis showed that the functional domains of Msn2 and Msn4 are conserved and that Msn4 has diverged. The *MSN2* promoter has a low expression whereas *MSN4* has a high constitutive expression and is auto-regulated. The expression of *MSN4* only responds to conditions of nutritional stress but not in the presence of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, ZnSO<sub>4</sub> and Fluconazole. Finally, Msn2 and Msn4 do not participate in resistance to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, ZnSO<sub>4</sub>, Fluconazole, CdSO<sub>4</sub> or heat shock. Msn2 and Msn4 diverged in *C. glabrata* to participate in the virulence of this opportunistic pathogenic yeast.

Key words: *C. glabrata*, Msn2, Msn4, stress

## Introducción

Las infecciones causadas por especies de *Candida* son muy comunes (Pais *et al.* 2019). Estas infecciones pueden ser superficiales hasta sistémicas que ponen en riesgo la vida del paciente (Polke *et al.* 2015, Antinori *et al.* 2016). Estas infecciones fúngicas son la cuarta causa de infecciones intrahospitalarias en los Estados Unidos de América y representan un grave problema de salud (Polke *et al.* 2015, Toda *et al.* 2019).

*Candida albicans*, *Candida glabrata*, *Candida tropicalis* y *Candida parapsilosis* son las principales especies que pueden colonizar el humano (Pais *et al.* 2019, Toda *et al.* 2019, Silva *et al.* 2012). *C. albicans* y *C. glabrata* se aíslan con mayor frecuencia en hospitales de E.U.A y Europa (Toda *et al.* 2019). Recientemente se ha reportado que *C. glabrata* se ha aislado casi en la misma proporción que *C. albicans*, lo que sugiere que *C. glabrata* ha desarrollado mecanismo que les permiten ser más patógeno (Singh *et al.* 2020, Seider *et al.* 2011, Toda *et al.* 2019).

*C. glabrata* se le considera un patógeno emergente (Seider *et al.* 2011). Esto se debe a que ha desarrollado estrategias para sobrevivir en el huésped (Gutiérrez-Escobedo *et al.* 2013, Rodrigues *et al.* 2014), como: 1) la resistencia intrínseca a antifúngicos (Diekema *et al.* 2002, Orta-Zavala *et al.* 2013), 2) la capacidad de adherirse a células epiteliales (Cormack *et al.* 1999, Castaño *et al.* 2003), 3) la capacidad de formar biopelículas (Tumbarello *et al.* 2007, Pierce *et al.* 2008, Hassan *et al.* 2021) y 4) la alta resistencia al estrés oxidativo (Cuellar *et al.* 2008). La resistencia al estrés oxidante es importante ya que las células fagocíticas (macrófagos, neutrófilos, células dendríticas, entre otras) son la primera línea de defensa del sistema inmune humano contra una infección por hongos. Al fagocitar a los patógenos, las células fagocíticas producen, entre otras moléculas, especies reactivas de oxígeno (ERO) a través del complejo NADPH<sup>+</sup> oxidasa (Babior 2004). Las altas concentraciones de ERO, dañan a todas las biomoléculas del patógeno, sin embargo, los microorganismos pueden neutralizar a estas ERO, a través de la

inducción de sus sistemas antioxidantes. Esto es lo que se conoce como la respuesta al estrés oxidativo (REO).

*C. glabrata* tiene una REO muy robusta que incluye mecanismos de defensa enzimáticos (catalasas, superóxido dismutasas, peroxidasas, tiorredoxinas, metalotioneínas y fitoquelatinas) y no enzimáticos (glutación y pigmentos) (Cuéllar-Cruz *et al.* 2008 y 2009, Brunke *et al.* 2010, Gutiérrez-Escobedo *et al.* 2013 y 2020, Briones-Martin-del-Campo *et al.* 2014 y 2015). *C. glabrata* no solo sobrevive dentro de las células fagocíticas, sino que también se replica (Kaur *et al.* 2007). *C. glabrata* regula su REO a través de los diversos factores de transcripción (FT): Yap1, Skn7, Msn2 y Msn4 (Cuéllar-Cruz *et al.* 2008, Rodrigues *et al.* 2014, Briones-Martin-del-Campo *et al.* 2014).

Msn2 y Msn4 son factores de transcripción y se les ha descrito como los factores generales de estrés que responden al estrés oxidante y al estrés nutricional (Cuéllar-Cruz *et al.* 2008, Vamvakas *et al.* 2019, Watanabe *et al.* 2011, Rep *et al.* 2000, Inoue *et al.* 2011). Además, estos factores de transcripción están conservados entre *S. cerevisiae* y *C. glabrata* (Briones-Martin-del-Campo *et al.* 2014, Martínez-Pastor *et al.* 1996). Los genes *MSN* se nombran así debido a que se aislaron como supresores multicopia de una mutante en el gen *SNF1* (*multicopy suppressor of SNF1 mutation*) (Estruch y Carlson 1993). Snf1 se requiere para la expresión de genes de respuesta a estrés nutricional (Celenza y Carlson 1986, Schüller y Entian 1987).

Actualmente no se ha descrito por completo la red de regulación de Msn2 y Msn4 en *S. cerevisiae* (Roetzer *et al.* 2008, Chapal *et al.* 2019). La actividad como factores de transcripción de Msn2 y Msn4 se regula negativamente en presencia de glucosa (vía cAMP-PKA) y aminoácidos (vía TORC1) (O'Brien *et al.* 1995, Roetzer *et al.* 2008). Msn2 y Msn4 se fosforilan y esto impide su entrada al núcleo. En cambio, cuando Msn2 y Msn4 se defosforilan en ausencia de nutrientes, ambos factores de transcripción entran al núcleo. Se ha propuesto que las peroxiredoxinas



y las tioredoxinas participan en el control de entrada al núcleo de Msn2 y Msn4 (Bodvard *et al.* 2017).

*C. glabrata* esta filogenéticamente más cercana a *S. cerevisiae* (Fitzpatrick *et al.* 2006, Kurtzmand y Robnett 2003, Gabaldon *et al.* 2016) y tiene dos ortólogos de ScMsn2 y ScMsn4 (Cuéllar-Cruz *et al.* 2008, Roetzer *et al.* 2008.). La homología a lo largo de toda la proteína es baja, sin embargo, el porcentaje de identidad cambia al analizar específicamente los diferentes dominios (Cuéllar-Cruz *et al.* 2008, Estruch y Carlson 1993, Eom *et al.* 2016, Razin *et al.* 2012, Rajvanshi *et al.* 2017). Mediante análisis genético y de microarreglos se determinó que Msn2 y Msn4 regulan la respuesta general a estrés en *C. glabrata* (Cuéllar-Cruz *et al.* 2008, Roetzer *et al.* 2008). Msn2 de *C. glabrata* se regula por la vía TORC1 y PKA-cAMP y su entrada al núcleo depende de que esté fosforilada (Roetzer *et al.* 2008).

*C. glabrata* cuando se expone a una dosis no letal de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, seguida de una dosis letal, *C. glabrata* puede adaptarse y sobrevivir. Esta adaptación depende de Cta1, Yap1, Skn7, y parcialmente de Msn2 y Msn4 (Cuéllar-Cruz *et al.* 2008). A pesar de que Msn2 y Msn4 controlan una parte de la REO, estos dos FT no son necesarios para la regulación de *SOD1*, *SOD2*, *SRX1*, *TSA1* y *TSA2* (Briones-Martin-del-Campo *et al.* 2008, Gutiérrez-Escobedo *et al.* 2013 y 2020, y datos no publicados). Aún cuando estos FT regulan la respuesta general de estrés en *C. glabrata*, no son esenciales para la virulencia de la levadura *in vivo* (Roetzer *et al.* 2008 y datos no publicados).

En este trabajo nos enfocamos en estudiar la participación de Msn2 y Msn4 en la respuesta a estrés en *C. glabrata*. Primero hicimos un análisis bioinformático de las secuencias de las proteínas Msn2 y Msn4 de *C. glabrata* y *S. cerevisiae* para determinar si los dominios regulatorios de ambas proteínas se encuentran conservadas. Posteriormente, dado que no se conoce cómo se regulan *MSN2* y *MSN4* y a qué señales podrían responder, construimos fusiones transcripcionales entre los promotores de estos genes y el gen reportero GFP. Con lo anterior,

determinamos la expresión transcripcional basal y en presencia de posibles inductores de *MSN2* y *MSN4*. Además, este análisis se realizó en ausencia de Msn2 y Msn4. Finalmente, para saber si Msn2 y Msn4 son necesarios para la supervivencia de *C. glabrata* a  $H_2O_2$ ,  $ZnSO_4$ , Fluconazol,  $CdSO_4$  y altas temperaturas (37°C y 42°C), expusimos a las cepas BG14, *msn2* $\Delta$ , *msn4* $\Delta$  y *msn2* $\Delta$  *msn4* $\Delta$  a exposición crónica con los agentes anteriormente mencionados. Nuestros resultados nos sugieren que la regulación y participación de Msn2 y Msn4 en la respuesta a diferentes tipos de estrés son diferentes a las de *S. cerevisiae* y, por lo tanto, divergieron en *C. glabrata* para participar en la virulencia de este hongo patógeno oportunista.

# Materiales y Métodos

## 1. Medios de cultivo y cepas

### 1.1. Medios de cultivo para bacterias

Las cepas bacterianas se incubaron a 30°C y se utilizó el medio Luria-Bertani (LB): extracto de levadura (5 g/L), triptona (10 g/L) y NaCl (5 g/L). A este medio LB se le añadió 50 µg/ml carbenicilina (Gold Biotechnology®) (Cb50). Para preparar medio LB sólido se le añadió agar (15 g/L). Para bacterias electrocompetentes se utilizó el medio LB bajo en sal extracto de levadura (5 g/L), triptona (10 g/L) y NaCl (1 g/L). Para recuperar las células electrocompetentes se utilizó el medio SOC: extracto de levadura (5 g/L), triptona (20 g/L), NaCl (10 mM), KCl (2.5 mM), MgSO<sub>4</sub> (10 mM), MgCl<sub>2</sub> (10 mM) y glucosa (20 mM).

### 1.2. Cepas utilizadas en esta tesis.

Las cepas bacterianas utilizadas en este trabajo se describen en la Tabla 1. Las cepas de levaduras utilizadas en este estudio se describen en la Tabla 2.

### 1.3. Medios de cultivo para levaduras

Todas cepas de levadura se incubaron a 30°C y se crecieron en diferentes medios. Medio YPD es extracto de levadura (10 g/L), peptona (20 g/L), glucosa (20 g/L) y uracilo (25 mg/L). El medio YPD para los ensayos de sensibilidad crónica a agentes generadores de estrés se suplementó con: H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Sigma-Aldrich®): 15, 20, 25 y 30 mM, CdSO<sub>4</sub> (Sigma-Aldrich®): 0.08, 0.15, 0.20 y 0.25 mM, ZnSO<sub>4</sub> (Sigma-Aldrich®): 10, 15, 20 y 30 mM y Fluconazol (Diflucan de Pfizer®): 8, 16, 32 y 64 µg/mL. Medio YPG es extracto de levadura (10 g/L), peptona (20 g/L), glicerol (20 g/L) y uracilo (25 mg/L). Medio CAA 2% glucosa es base nitrogenada de levadura sin amonio (1.7

g/L), sulfato de amonio (5 g/L), casaminoácidos (6 g/L) y glucosa (20 g/L). El medio CAA 2% glucosa se suplementó para citometría con: H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Sigma-Aldrich®) 5 mM, CdSO<sub>4</sub> (Sigma-Aldrich®) 0.5 mM, ZnSO<sub>4</sub> (Sigma-Aldrich®) 1 mM, Fluconazol (Diflucan de Pfizer®) 8 µg/mL, Rapamicina (Sigma-Aldrich®) 200 ng/mL y NaCl (Fisher Scientific®) 0.5 M. Medio CAA 3% glicerol es CAA con glicerol (3%). Medio CAA 3% etanol es CAA con etanol absoluto (3%). Para los medios sólidos se añadió agar (20 g/L).

## **2. Plásmidos y Oligonucleótidos**

Los plásmidos utilizados en este trabajo se describen en la Tabla 3. Los oligonucleótidos utilizados en este trabajo se describen en la Tabla 4. Los oligonucleótidos son de Integrated DNA Technologies, Inc.

## **3. Aislamiento de plásmidos**

La extracción de plásmidos se realizó con el kit de ZymoBIOMICS™ DNA Miniprep con las condiciones del fabricante.

## **4. Extracción de DNA genómico de *C. glabrata***

Las cepas se incubaron en medio YPD a 30°C durante 24Hrs. Las células se colectaron por centrifugación y se resuspendieron en 500 µL de la solución A que contiene (Tris 0.05 M, EDTA 0.01 M, NaCl 0.15 M, SDS 1% y Tritón 1%). Se agregaron 500 µL de la mezcla fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (24:24:1) (Fluka Biochemica®) y se incubaron durante 30 minutos a 44°C, agitando ocasionalmente. Se centrifugó y se colectó la fase acuosa. A esta fase se le añadió 50 µL de la solución A sin detergente y con RNasa (AMBION®) y se incubó a 44°C durante 30 minutos. Para precipitar el DNA, se agregó 15 µL de NaCl 5 M y un volumen de etanol frío al 100%. La pastilla de DNA se lavó con etanol frío al 70%, se secó a temperatura ambiente y se resupendió en Tris 10 mM con RNAasa.

## **5. Cuantificación de DNA**

El DNA se cuantificó por espectrometría con el equipo NANODROP 2000 (ThermoScientific®).

## **6. Amplificación de DNA por PCR**

Para hacer las fusiones transcripcionales entre la región promotora y la terminadora de *MSN2* y de *MSN4* con el ORF de GFP (Green Fluorescent Protein) se utilizó la técnica de PCR de fusión (Kuwayama, *et al.*, 2002; Cha-aim, *et al.*, 2012). Para amplificar los fragmentos individuales se utilizó la iProof High-Fidelity DNA Polymerase (Bio-Rad Laboratories, Inc.) de acuerdo con las condiciones del fabricante. Las condiciones fueron las siguientes: 98°C por 1:00 min, 98°C por 0:20 min, 70°C por 0:20 min, 72°C por 0:22 min, 30 ciclos, 72°C por 5:00 min y 12°C por 5:00 min. Para fusionar los tres fragmentos se utilizó el Expand Long Template PCR System con el Buffer 2 (Roche®) de acuerdo con las condiciones del fabricante. Todos los productos de PCR se visualizaron en geles de agarosa al 0.8%. Los geles se corrieron en una cámara de electroforesis Bio-Rad Laboratories, Inc., a 110 V durante 45 minutos. Los productos de PCR se purificaron de gel con el kit QIAquick Gel Extraction de QIAGEN®.

## **7. Extracción de DNA con fenol:cloroformo:isoamílico**

Para poder eliminar sales y proteínas del DNA, a la muestra se le agregó acetato de amonio y se extrajo con fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (24:24:1) (Fluka Biochemica®). A la fase acuosa se le añadió 1 µL de glucógeno (Roche®) y el DNA se precipitó con etanol frío al 100%. La pastilla de DNA se lavó con etanol frío al 70%. El DNA se resuspendió en Tris 10 mM.

## **8. Reacciones de restricción y ligación**

Para las reacciones de restricción y ligación se utilizaron enzimas y buffers de New England BioLabs, Inc. Las reacciones de restricción para plásmidos se realizaron a 37°C durante 2 horas. Los productos de PCR de fusión se digirieron y se purificaron por extracción con fenol:cloroformo:isoamílico y precipitación con acetato de amonio y etanol. Para las reacciones de ligación se utilizaron enzimas y buffers de ThermoScientific. Las ligaciones se incubaron a 22°C durante toda la noche. Las ligaciones se purificaron por extracción con fenol:cloroformo:isoamílico y precipitación con acetato de amonio y etanol.

## **9. Transformación de plásmidos en *Escherichia coli***

La transformación de plásmidos y ligaciones en la cepa DH10 (Tabla 1) se hizo por electroporación. Las transformantes se seleccionaron en cajas de LB Cb50 y se incubaron a 30°C durante una noche.

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

Para la transformar células de *C. glabrata* se utilizó el método de transformación con acetato de litio (LiAcO) (Castaño *et al.*, 2003; Gietz, *et. al.*, 1992). Las transformantes se seleccionaron en cajas de CAA 2% glucosa y se incubaron a 30°C durante 48 horas. Las transformantes se purificaron en cajas de CAA 2% glucosa y se confirmó su función mitocondrial en cajas de YPG. Las cepas transformadas se guardaron a -80°C en glicerol 15%.

## **11. Ensayos de sensibilidad con exposición crónica**

Las cepas BG14, *msn2* $\Delta$ , *msn4* $\Delta$  y *msn2* $\Delta$  *msn4* $\Delta$  se inocularon en 5 mL de medio YPD durante una noche a 30°C. Se tomaron 5  $\mu$ L del cultivo y se diluyeron en 5 mL de medio fresco YPD y se incubaron a 30°C durante 48 horas. Las células se

lavaron con agua estéril y se ajustó la densidad celular a  $1 \times 10^7$  células/mL ( $OD_{600nm}$  0.5). Se hicieron diluciones logarítmicas y se platearon 5  $\mu$ L de cada dilución en cajas de YPD con diferentes concentraciones de los compuestos generadores de estrés (ver medios de cultivo para levadura). Las cajas se incubaron a 30°C. Para el estrés por temperatura, las cajas se incubaron a 30, 37 y 42°C. Todas las cajas se monitorearon durante 24, 48 y 72 horas.

## **12. Análisis de expresión transcripcional de *MSN2* y *MSN4* por citometría de flujo**

Las cepas BG14, *msn2* $\Delta$ , *msn4* $\Delta$ , *msn2* $\Delta$  *msn4* $\Delta$  y *trx2* $\Delta$  transformadas con los plásmidos pGFP::3'UTR<sub>HIS3</sub>, pPMSN2::GFP::3'UTR<sub>MSN2</sub> y pPMSN4::GFP::3'UTR<sub>MSN4</sub> se inocularon en 5 ml de CAA 2% glucosa durante 48 horas a 30°C. Los cultivos se diluyeron en 5 mL de medio fresco CAA 2% glucosa y en 5 mL de CAA con los diferentes agentes generadores de estrés ajustando la densidad celular a  $4 \times 10^6$  células/mL ( $OD_{600nm}$  0.2). Los cultivos diluidos se colocaron en agitación constante a 30°C. La expresión de *MSN2* y *MSN4* se determinó en un BD FACS Calibur™ a las 0 horas (cultivos sin diluir) y 1, 2, 4, 6, 8, 10, 12 y 24 horas después de la dilución en medio fresco.

## **13. Curvas de crecimiento**

Las cepas BG14, *msn2* $\Delta$ , *msn4* $\Delta$ , *msn2* $\Delta$  *msn4* $\Delta$  y *trx2* $\Delta$  transformadas con los plásmidos pGFP::3'UTR<sub>HIS3</sub>, pPMSN2::GFP::3'UTR<sub>MSN2</sub> y pPMSN4::GFP::3'UTR<sub>MSN4</sub> se inocularon en 5 ml de CAA 2% glucosa durante 48 horas a 30°C. Los cultivos se diluyeron en 5 mL de CAA 2% glucosa y en 5 mL de CAA con los diferentes agentes generadores de estrés, ajustando la densidad celular a  $4 \times 10^6$  células/mL ( $OD_{600nm}$  0.2). Los cultivos diluidos se colocaron en agitación constante a 30°C. Se midió la densidad óptica ( $OD_{600nm}$ ) a las 0 horas (cultivos sin diluir) y 1, 2, 4, 6, 8, 10, 12 y 24 horas después de la dilución en medio fresco.

#### **14. Análisis bioinformático de Msn2 y Msn4**

Las secuencias de ScMsn2 y ScMsn4 de *S. cerevisiae* se obtuvieron de la base de datos SGD (<https://www.yeastgenome.org>) y las de CgMsn2 y CgMsn4 de *C. glabrata* de la base de datos CGD (<http://www.candidagenome.org>). Los alineamientos se hicieron por el método de ClustalW (Higgins, *et. al.*, 1996) con el programa MacVector (Accelrys).

#### **15. Análisis estadísticos**

Para los análisis estadísticos se usó la prueba de Kolmogorov-Smirnov para evaluar la normalidad de los datos considerando un valor de  $p < 0.05$  como significativa. Las diferencias estadísticas se evaluaron por una ANOVA de dos vías y un post-test de Tukey considerando un valor de  $p < 0.05$  como significativa. Se realizó con el programa GraphPad Prism v9.



## Resultados

Msn2 y Msn4 son factores de transcripción de respuesta a estrés general (Estruch y Carlson 1993, Martínez-Pastor *et al.* 1996). Para entender con mayor profundidad su participación en la respuesta a estrés, decidimos determinar cómo se regula la expresión transcripcional de *MSN2* y *MSN4*. Para ello, realizamos un análisis bioinformático de las secuencias de Msn2 y Msn4 (Figura 1). Además, las cepas BG14 (parental), *msn2* $\Delta$ , *msn4* $\Delta$  y *msn2* $\Delta$  *msn4* $\Delta$  se transformaron con los plásmidos pP<sub>MSN2</sub>::GFP::3'UTR<sub>MSN2</sub> y pP<sub>MSN4</sub>::GFP::3'UTR<sub>MSN4</sub> (Figura 2 y 3). Las cepas con los plásmidos reporteros se crecieron en CAA 2% glucosa y se diluyeron en CAA con diferentes agentes generadores de estrés. La expresión transcripcional de cada gen se determinó en un FACS (ver Materiales y Métodos).

### Homología de Msn2 y Msn4 de *C. glabrata* con *S. cerevisiae*

*S. cerevisiae* es el organismo más cercano filogenéticamente a *C. glabrata* y los factores de transcripción Msn2 y Msn4 se han descrito con detalle en *S. cerevisiae*. Debido a esto, hicimos un análisis bioinformático de las secuencias de las proteínas Msn2 y Msn4 de ambos organismos. Encontramos que el porcentaje de identidad a lo largo de toda la proteína es bajo (Figura 1A y Suplementaria 1), sin embargo, no es así cuando se analizan los dominios individuales de estas proteínas: la señal de exportación nuclear (NES), el dominio de homología 1 (HD1) que es el componente funcional de NES, la señal de localización nuclear (NLS) y el dominio de unión a DNA (DBD) (Figura 1). El dominio NES tiene bajo porcentaje de identidad entre Msn2 y Msn4 en ambos microorganismos, pero, se conservan los residuos importantes para su función entre ScMsn2 y CgMsn2 (Figura 1B). En cambio, el dominio NES de CgMsn4 parece que es el que más ha divergido. Lo mismo sucede con el dominio HD1 entre ScMsn4 y CgMsn4, pero este dominio está más conservado entre ScMsn2 y CgMsn2 (Figura 1C). El dominio que más ha divergido es el NLS, ya que en cada factor de transcripción cambia 1 aminoácido de los 4

aminoácidos importantes para la función del NLS (Figura 1D). En cambio, el dominio DBD es el que presenta mayor porcentaje de identidad y se conservan los residuos importantes para su función (Figura 1E). Estos datos nos sugieren que a) la función del dominio NES y HD1 de ScMsn2 pudiera estar conservada en CgMsn2, b) la función del NLS pudiera no estar conservada entre Msn2 y Msn4 de *S. cerevisiae* y *C. glabrata*, c) el DBD es el que debe de estar mediando la unión de CgMsn2 y CgMsn4 al DNA y posiblemente reconozcan la secuencia STRE (AGGGG) y d) que Msn4 parece ser la proteína que más ha divergido entre ellas.

### **Expresión transcripcional de *MSN2* y *MSN4* en presencia de estrés oxidante**

Se ha descrito que Msn2 y Msn4 participan en la respuesta a estrés oxidante (Cuellar *et al.* 2008, Rodrigues *et al.* 2014, Briones-Martin-del-Campo *et al.* 2014). Para determinar si la expresión transcripcional de *MSN2* y *MSN4* se induce en presencia de estrés oxidante, las cepas BG14 (parental), *msn2Δ*, *msn4Δ* y *msn2Δ msn4Δ* transformadas con pGFP::3'UTR<sub>HIS3</sub>, pP<sub>MSN2</sub>::GFP::3'UTR<sub>MSN2</sub> y pP<sub>MSN4</sub>::GFP::3'UTR<sub>MSN4</sub> se crecieron en presencia de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 5 mM. La expresión de *MSN2* es la misma en todas las cepas incluyendo el plásmido control sin promotor (Figura 3). Confirmamos por secuenciación que el plásmido pP<sub>MSN2</sub>::GFP::3'UTR<sub>MSN2</sub> no tuviera mutaciones en la región promotora ni en GFP. Este resultado indica que a) el promotor de *MSN2* no tiene actividad, b) la región intergénica entre *MSN2* y un ORF no anotado, no contiene el promotor de *MSN2*, c) el promotor podría estar localizado dentro el ORF no anotado o en la región intergénica entre *LYS7* y el ORF no anotado (Figura 2C) o d) la regulación de Msn2 es postranscripcional.

Por el contrario, la expresión de *MSN4* en BG14 y *msn2Δ* en el T<sub>0</sub> es alta y se induce en la primera hora después de la dilución en medio fresco (Figura 4A). A partir de la primera hora, la expresión de *MSN4* disminuye hasta las 6 horas y se mantiene en valores bajos de expresión (Figura 4A). No hay diferencia en la expresión de *MSN4* en BG14 y *msn2Δ* en medio en ausencia o presencia de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

Estos datos sugieren que la expresión de *MSN4* a) no esta regulada por *Msn2*, b) debe de haber un activador que induce la expresión de *MSN4*, y un represor que reduce la expresión de *MSN4* o el activador pierde actividad, y c) el estrés oxidativo no induce la expresión de *MSN4*.

A pesar de que la cinética de expresión de *MSN4* en las cepas *msn4Δ* y *msn2Δ msn4Δ* es similar que en la BG14 o *msn2Δ* en ausencia o presencia de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, encontramos las siguientes diferencias: empiezan en el T<sub>0</sub> alta y se inducen en la primera hora después de la dilución en medio fresco (Figuras 4B y 4C), luego, disminuye hasta las 6 horas y se mantiene en valores bajos de expresión; la expresión de *MSN4* en las mutantes *msn4Δ* y *msn2Δ msn4Δ* es mucho más alta que en la BG14 y *msn2Δ* (Figura 4A). Estos resultados sugieren que *MSN4* podría autorregularse negativamente.

### **Expresión transcripcional de *MSN4* en presencia de estrés nutricional**

Dado que el pP<sub>*MSN2*</sub>::GFP::3'UTR<sub>*MSN2*</sub> no tiene actividad transcripcional, nos enfocamos en analizar solo la expresión transcripcional de *MSN4*. Primero analizamos la expresión de *MSN4* en presencia de estrés nutricional. Las cepas BG14, *msn2Δ*, *msn4Δ* y *msn2Δ msn4Δ* transformadas con pGFP::3'UTR<sub>*HIS3*</sub> y pP<sub>*MSN4*</sub>::GFP::3'UTR<sub>*MSN4*</sub> se crecieron en CAA con diferentes fuentes de carbono: a) fermentable: reducido en glucosa (0.2%) y b) no fermentables: glicerol (3%) y etanol (3%). Las cepas se crecieron como esta descrito en la leyenda de la Figura 3 pero con las fuentes de carbono arriba mencionadas (ver Material y Métodos).

En CAA 0.2% glucosa, la expresión de *MSN4* en las cepas BG14 y *msn2Δ* se comporta igual durante las primeras dos horas que en medio rico en glucosa (2.0%): en el T<sub>0</sub> la expresión es alta y se induce en la primera hora después de la dilución en medio fresco reducido en glucosa y partir de la primera hora, la expresión de *MSN4* disminuye hasta las 6 horas y se mantiene en valores bajos de expresión. Sin embargo, a partir de la segunda hora, la expresión de *MSN4* se mantiene alta

constitutiva comparada con las cepas en medio rico en glucosa (2%) (Figura 5A). Además, nuevamente observamos que la expresión de *MSN4* en las cepas *msn4Δ* y *msn2Δ msn4Δ* es mucho más alta que la BG14 y la *msn2Δ* (Figuras 5B y 5C). Estos datos confirman que *MSN4* podría estar autorregulándose negativamente y sugieren que a) debe de existir un activador que induce la expresión de *MSN4* y que mantiene la expresión de *MSN4* alta constitutiva en estrés nutricional y b) el activador no pierde su actividad durante el estrés nutricional.

### **Expresión transcripcional de *MSN4* en presencia de estrés nutricional por fuentes de carbono no fermentables**

Las cepas BG14, *msn2Δ*, *msn4Δ* y *msn2Δ msn4Δ* transformadas con pGFP::3'UTR<sub>HIS3</sub> y pP<sub>MSN4</sub>::GFP::3'UTR<sub>MSN4</sub> se crecieron en CAA como esta descrito en la leyenda de la Figura 3 pero en 3% glicerol como fuente de carbono no fermentable (ver Material y Métodos).

En CAA 3% glicerol, las cepas BG14 y *msn2Δ* se comportan igual durante la primera hora que en medio rico en glucosa (2%): en el T<sub>0</sub> la expresión es alta y se induce en la primera hora después de la dilución en medio fresco CAA 3% glicerol, pero a partir de la segunda hora, la expresión de *MSN4* se mantiene alta constitutiva que en CAA glucosa 2% (Figura 6A). Nuevamente observamos que los niveles de expresión de *MSN4* en las cepas *msn4Δ* y *msn2Δ msn4Δ* son mucho más altos que la BG14 y la *msn2Δ* (Figuras 6B y 6C). La expresión en CAA 3% glicerol se mantiene alta constitutiva mas tiempo que en CAA 0.2% (Figuras 5B y 5C). Estos datos indican que a) la expresión de *MSN4* es aún mayor en una fuente no fermentable de carbono, b) el activador que induce la expresión de *MSN4* se mantiene activo en presencia de glicerol y el activador no pierde su actividad durante el estrés nutricional.

En cambio, la cinética de expresión de *MSN4* en las cepas BG14, *msn2Δ*, *msn4Δ* y *msn2Δ msn4Δ* transformadas con pGFP::3'UTR<sub>HIS3</sub> y pP<sub>MSN4</sub>::GFP::3'UTR<sub>MSN4</sub> en

CAA 3% etanol es diferente (Figura 7). La expresión de *MSN4* oscila en todas las cepas. Hay picos de inducción a las 2, 6 y 10 horas (Figura 7). Al igual que en los experimentos anteriores, observamos que los niveles de expresión de *MSN4* en la *msn4Δ* y *msn2Δ msn4Δ* son mucho más altos que la BG14 y la *msn2Δ* (Figuras 7B y 7C). Estos datos sugieren que a) las oscilaciones en la expresión de *MSN4* son independiente de *MSN2* y *MSN4* y b) puede existir un factor transcripcional que actué como represor o activador de la expresión de *MSN4*.

### **Expresión transcripcional de *MSN4* en presencia de fármacos**

Existen diversos fármacos que pueden generar daño a los hongos patógenos. Dentro de estos fármacos, algunos se utilizan específicamente para el tratamiento de infecciones causadas por hongos como los antifúngicos azólicos (fluconazol) (Shafiei *et. al.* 2020). Otros fármacos no son específicamente antifúngicos, sin embargo, también generan daño a los hongos patógenos: un ejemplo es el inmunosupresor rapamicina que inhibe a la vía TOR que es importante para detectar los cambios en la disponibilidad de nutrientes (específicamente de aminoácidos) y está involucrada en el control del crecimiento y envejecimiento celular (Loewith y Hall, 2011). La vía TOR en *S. cerevisiae* es una de las vías que regula la actividad de Msn2 y Msn4 y controla la entrada de Msn2 y Msn4 al núcleo. Debido a que ambos fármacos generan estrés celular, analizamos la expresión de *MSN4* en presencia de fluconazol y rapamicina. Las cepas BG14, *msn2Δ*, *msn4Δ* y *msn2Δ msn4Δ* transformadas con pGFP::3'UTR<sub>HIS3</sub> y pP<sub>MSN4</sub>::GFP::3'UTR<sub>MSN4</sub> se crecieron en CAA en presencia de 8 μg/ml fluconazol y 200 ng/mL rapamicina (ver Material y Métodos). La expresión de *MSN4* en presencia de fluconazol en las cepas BG14, *msn2Δ*, *msn4Δ* y *msn2Δ msn4Δ* no cambia y tiene la misma cinética de expresión que en presencia de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Figura 4 y 8). Estos resultados indican que Msn4 no cambia su expresión en respuesta a estrés por fluconazol.

En presencia de rapamicina, la expresión de *MSN4* en las cepas BG14 y *msn2Δ* se comporta igual durante la primera hora que en un medio sin rapamicina: en el T<sub>0</sub> la

expresión es alta y se induce en la primera hora después de la dilución en medio con rapamicina. Pero, a partir de la primera hora, la expresión de *MSN4* se mantiene alta constitutiva de igual manera que en presencia de CAA 3% glicerol (Figuras 6A y 9A). La expresión de *MSN4* en las cepas *msn4Δ* es aún más alta que en las cepas BG14 y *msn2Δ* (Figuras 9B y 9C). Sin embargo, la expresión de *MSN4* en *msn2Δ msn4Δ* no es igual que en la *msn4Δ*. Estos datos indican que a) la expresión de *MSN4* es mayor al inhibir la vía TOR, b) el activador que induce la expresión de *MSN4* se mantiene activo aún al inhibir la vía TOR y c) la vía TOR regula negativamente al activador de la expresión de *MSN4*.

### **Expresión transcripcional de *MSN4* en presencia de estrés por metales**

Algunos metales como el cadmio y el zinc en concentraciones altas pueden ser tóxicos para las células (Jacobson *et. al.* 2017; Bird y Wilson, 2020). Dado que estos compuestos generan estrés decidimos analizar la expresión de *MSN4* en presencia de estrés por metales. Las cepas BG14, *msn2Δ*, *msn4Δ* y *msn2Δ msn4Δ* transformadas con pGFP::*3'UTR<sub>HIS3</sub>* y pP<sub>*MSN4*</sub>::GFP::*3'UTR<sub>MSN4</sub>* se crecieron en CAA con 0.5 mM CdSO<sub>4</sub> y 1 mM ZnSO<sub>4</sub> (ver Material y Métodos). En CAA 2% glucosa, la expresión de *MSN4* en las cepas BG14, *msn2Δ*, *msn4Δ* y *msn2Δ msn4Δ* se comporta igual a lo que se describe de la Figura 3.

En CAA 0.5 mM CdSO<sub>4</sub>, la expresión de *MSN4* en las cepas BG14, *msn2Δ* y *msn4Δ* se comportan igual durante la primera hora que en CAA 2% glucosa: en el T<sub>0</sub> la expresión es alta y se induce en la primera hora después de la dilución en medio fresco CAA 0.5 mM CdSO<sub>4</sub> (Figuras 10A, 10B y 10C). A partir de la primera hora, la expresión de *MSN4* disminuye, pero se mantienen los niveles altos constitutivos hasta las 6 horas. Después, se vuelve a inducir la expresión de *MSN4* a partir de las 8 horas hasta las 10 horas y se mantiene alta la expresión hasta las 12 horas. La expresión de *MSN4* en las cepas carentes de *MSN4* con o sin tratamiento es alta. La expresión de *MSN4* en la *msn2Δ msn4Δ* sugiere que se requiere de Msn2 y Msn4 para la expresión alta en CdSO<sub>4</sub> (Figura 10C). Estos datos indican que a)

la expresión de *MSN4* se induce en presencia de  $\text{CdSO}_4$ , b) el activador que induce la expresión de *MSN4* se mantiene activo en presencia de  $\text{CdSO}_4$  y c) el activador requiere de la presencia de Msn2 o de Msn4 para poder mantener los niveles altos constitutivos de *MSN4* en presencia de  $\text{CdSO}_4$ .

En cambio, no hay diferencia en la expresión de *MSN4* en BG14, *msn2Δ*, *msn4Δ* y *msn2Δ msn4Δ* en medio CAA 1mM de  $\text{ZnSO}_4$ , comparado con medio CAA sin metal (Figuras 11A, 11B y 11C). Estos datos sugieren que Msn2 ni Msn4 participan en la regulación de *MSN4* en presencia de  $\text{ZnSO}_4$ .

### **Expresión transcripcional de *MSN4* en presencia de estrés osmótico**

Se ha descrito que *C. glabrata* requiere de Msn2 para la tolerancia a estrés osmótico generado por NaCl (Roetzer *et. al.* 2008). Analizamos la expresión de *MSN4* en presencia de NaCl con las cepas BG14, *msn2Δ*, *msn4Δ* y *msn2Δ msn4Δ* transformadas con pGFP::3'UTR<sub>HIS3</sub> y pP<sub>MSN4</sub>::GFP::3'UTR<sub>MSN4</sub> se crecieron en CAA con 0.5 M NaCl (ver Material y Métodos). En medio CAA 2% glucosa, la expresión de *MSN4* en las cepas BG14, *msn2Δ*, *msn4Δ* y *msn2Δ msn4Δ* se comporta igual a lo que se describe de la Figura 3.

En CAA con 0.5M de NaCl, la expresión de *MSN4* en las cepas BG14, *msn2Δ*, *msn4Δ* y *msn2Δ msn4Δ* se comportan igual durante las primeras dos horas que en medio CAA 2% glucosa: en el T<sub>0</sub> la expresión es alta y se induce en la primera hora después de la dilución en medio fresco CAA con NaCl (Figuras 12A, 12B y 12C). Después de la 1 hora, el nivel de expresión de *MSN4* baja, pero se mantiene a altos y se mantiene hasta las 6 horas. A partir de esta hora, aumenta la expresión de *MSN4* con máximo de expresión a las 12 horas. La expresión de *MSN4* es mayor en las cepas *msn4Δ* y *msn2Δ msn4Δ*. Estos datos nos sugieren que la expresión de *MSN4* se induce por estrés osmótico a partir de las 6 horas.

## Expresión transcripcional de *MSN4* en ausencia de *TRX2*

Se ha descrito que la fosforilación del NLS mediada por PKA inhibe la entrada de Msn2 y Msn4 al núcleo y para contrarrestar esta inhibición, se requiere de fosfatasa específicas. Se ha observado que peroxiredoxinas y las tioredoxinas podrían estar participando en la regulación de esta señalización de control de entrada al núcleo de Msn2 y Msn4 (Bodvard *et. al.* 2017). Para identificar si Trx2 participa en la regulación de la expresión de *MSN4* decidimos determinar la expresión de *MSN4* en la cepa *trx2Δ* transformada con  $pP_{MSN4}::GFP::3'UTR_{MSN4}$ . Las cepas con los plásmidos reporteros se crecieron en CAA 2% glucosa y se diluyeron en CAA en presencia de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y estrés nutricional en CAA 0.2% glucosa y CAA 3% glicerol y CAA 3% etanol como fuentes de carbono no fermentables (ver Materiales y Métodos).

En CAA 2.0 % glucosa, la expresión de *MSN4* en BG14 y *trx2Δ* en el T<sub>0</sub> es alta y se induce en la primera hora después de la dilución en medio fresco (Figura 13A). A partir de la primera hora, la expresión disminuye hasta las 6 horas y se mantiene en valores bajos de expresión. No hay diferencia en la expresión de *MSN4* en BG14 y *trx2Δ* en medio con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (figura 13A). Este dato sugiere que Trx2 no regula la expresión de *MSN4* en presencia o ausencia de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

En general la expresión de *MSN4* no se ve afectada por la ausencia de *TRX2* tanto en H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y estrés nutricional (CAA 0.2% glucosa y CAA 3% glicerol) (Figuras 13B y 13C). El único efecto claro es que en CAA 3% etanol, la ausencia de *TRX2* abate la inducción cíclica de *MSN4* a partir de las 6 horas (Figura 13D).

Estos datos sugieren que a) la expresión de *MSN4* es aún mayor en una fuente no fermentable de carbono (Figura 7A), b) el aumento de la expresión de *MSN4* es independiente de Trx2 y c) Trx2 podría participar como un regulador positivo (directa o indirectamente) en la expresión de *MSN4* en presencia de etanol.



## Discusión

*C. glabrata* se le considera un patógeno emergente (Seider *et al.* 2011). Esto se debe a que ha desarrollado diferentes estrategias para sobrevivir (Hassan *et al.* 2021). Una de estas estrategias es la alta resistencia al estrés oxidativo en la que participan mecanismos de defensa enzimáticos y no enzimáticos, que en conjunto forman la REO (Cuéllar-Cruz *et al.* 2008 y 2009, Brunke *et al.* 2010, Gutiérrez-Escobedo *et al.* 2013 y 2020, Briones-Martin-del-Campo *et al.* 2014 y 2015). En la REO se han descrito los factores de transcripción Msn2 y Msn4. En este trabajo estudiamos cómo se regulan *MSN2* y *MSN4* en la respuesta a estrés general en *C. glabrata*.

En este estudio, nosotros encontramos que los dominios funcionales de Msn2 y Msn4 se encuentran conservados, y que Msn4 es la proteína que más ha divergido entre *C. glabrata* y *S. cerevisiae*. Además, identificamos que el promotor de *MSN2* tiene una expresión muy baja constitutiva y en cambio, el promotor de *MSN4* tiene una expresión alta constitutiva y se autorregula. Sin embargo, también observamos que la expresión del promotor de *MSN4* solo responde a condiciones de estrés nutricional y no en presencia de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, ZnSO<sub>4</sub> y Fluconazol. Finalmente, identificamos que Msn2 y Msn4 no son necesarios para la resistencia de *C. glabrata* a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, ZnSO<sub>4</sub>, Fluconazol, CdSO<sub>4</sub> ni altas temperaturas.

### **CgMsn2 / CgMsn4 y ScMsn2 / ScMsn4 divergieron**

Los factores de transcripción Msn2 y Msn4 se describieron por primera vez en *S. cerevisiae* como proteínas tipo dedos de zinc (Estruch y Carlson 1993, O'Brien *et al.* 1995). ScMsn2 y ScMsn4 presentan cuatro dominios: la señal de exportación nuclear (NES), el dominio de homología 1 (HD1) que es el componente funcional de NES, la señal de localización nuclear (NLS) y el dominio de unión a DNA (DBD) (Figura 1A) (Martínez-Pastor *et al.* 1996, O'Brien *et al.* 1995, De Wever *et al.* 2005,

Görner *et al.* 2002, Boy-Marcotte *et al.* 1998). *CgMsn2* y *CgMsn4* también presentan los cuatro dominios funcionales de *S. cerevisiae*; sin embargo, la homología a lo largo de toda la proteína es baja entre *Msn2* y *Msn4* de *S. cerevisiae* y *C. glabrata* (Cuéllar-Cruz *et al.* y Roetzer *et al.* en el 2008 (Figura 1A). Además, *Msn4* de ambos organismos es la proteína que más ha divergido (Figura 1A).

La función del dominio NES y HD1 de *ScMsn2* esta conservada en *CgMsn2*, ya que se conservan los aminoácidos que, al fosforilarse, permiten la exportación nuclear de la proteína (Figura 1B y 1C). Por el contrario, la función del NLS no esta conservada entre *Msn2* y *Msn4* de *S. cerevisiae* y *C. glabrata*, por lo que la vía de señalización de entrada al núcleo puede ser diferente y, por tanto, pudiera responder a diferentes estímulos de estrés (Figura 1D). A pesar de esto, el DBD se encuentra altamente conservado y posiblemente reconozcan la secuencia STRE (AGGGG), como lo descrito por diversos autores que analizaron la secuencia del dedo de zinc de *S. cerevisiae* y *C. glabrata* (Figura 1E) (Sadeh *et al.* 2012, Cuéllar-Cruz *et al.* 2008, Estruch y Carlson 1993, Eom *et al.* 2016, Razin *et al.* 2012, Rajvanshi *et al.* 2017).

El análisis bioinformático ha sido importante, sin embargo, es necesario hacer un análisis estructural de cada FT mediante simuladores. La presencia de cambios en la secuencia de aminoácidos puede no afectar sustancialmente la estructura y por lo tanto la función de *Msn2* y *Msn4*.

### **El promotor de *MSN2* no contiene elementos regulatorios que respondan a xenobióticos**

*ScMsn2* y *ScMsn4* son FTs con funciones redundantes, es decir, que pueden compensarse uno al otro. A pesar de esto, se regulan de forma diferente lo que les confiere propiedades diferentes (Chapal *et al.* 2019). Por este motivo, entender cómo se regula la expresión de *CgMSN2* y *CgMSN4* nos permitió conocer su posible participación en diferentes condiciones de estrés.

Con respecto a *MSN2*, identificamos que su promotor tiene una expresión muy baja constitutiva, similar al control sin promotor (Figura 3). Una posible explicación es que no clonamos el promotor completo, sin embargo, clonamos una región intergénica de 0.708 kb donde debería de estar el promotor de *CgMSN2* (Figura 2A y 2C). Se ha descrito que el promotor de *ScMSN2* se encuentra dentro de 0.5 kb, lo que hace que *MSN2* forme parte del 2% de los genes con promotores largos de *S. cerevisiae* (Chapal *et al.* 2019). Esto indica que el promotor de *CgMSN2* puede ser aún mucho mayor que el de *S. cerevisiae*. Otra posibilidad es que el promotor de *CgMSN2* pudiera estar ubicado no en la región intergénica, sino que se encuentre localizado dentro del ORF no anotado al 5' de *CgMSN2* o localizado en la región intergénica entre *LYS7* y este ORF (Figura 2C). Es posible también que la regulación de *CgMSN2* sea a nivel postranscripcional. La clonación de diferentes regiones al 5' de *CgMSN2* es importante para identificar la región promotora o bien considerar vías de regulación postranscripcional de *CgMsn2*.

### ***CgMSN4* tiene una expresión alta constitutiva, se autorregula y solo responde a condiciones de estrés nutricional**

*ScMsn4* ha sido poco estudiado, ya que se ha descrito que su función es redundante con *ScMsn2* aún cuando hay experimentos que indican lo contrario. Consistente con esto, datos de nuestro laboratorio indican que *CgMsn2* y *CgMsn4* no son completamente redundantes.

*CgMSN4* tiene una expresión alta constitutiva desde a lo largo de la curva de crecimiento (de 0 a 12 horas) (Figura 5). Este dato es consistente con que la máxima expresión de *ScMSN4* se da durante la fase estacionaria y así se mantiene en esta fase (Chapal *et al.* 2019). El incremento en la expresión *CgMSN4* es aún mayor en las cepas *msn4Δ* y *msn2Δ msn4Δ* (Figura 5B y 5C). Por una parte, sugerimos la existencia de un activador de *CgMSN4* que se encuentra presente durante la fase de crecimiento con o en ausencia de estrés. Por otro lado, *CgMSN4*

se autorregula negativamente. Esto indica que debe de haber una interacción y un balance entre el activador y *CgMsn4* y así regular la expresión de *CgMSN4*.

Además de que la expresión de *CgMSN4* se mantiene alta constitutiva en condiciones sin estrés, también encontramos que esta expresión se incrementa en condiciones de estrés. Hay un incremento aún mayor en presencia de estrés nutricional (glicerol y etanol) (Figura 6 y 7). En ambas fuentes de carbono no fermentables se ha determinado la participación de *ScMsn2* y *ScMsn4* (Vamvakas *et. al.* 2019, Watanabe *et. al.* 2011, Rep *et. al.* 2000, Inoue *et. al.* 2011). Sin embargo, el patrón oscilatorio en la expresión *CgMSN4* en presencia de etanol no se ha descrito. Por lo que sugerimos que, en presencia de etanol, puede existir un factor transcripcional que sea responsable de la expresión cíclica de *CgMSN4*.

*ScMsn2* y *ScMsn4* se han descrito como FTs en respuesta a estrés oxidativo, sin embargo, la expresión de *CgMSN4* no cambia en presencia de  $H_2O_2$  (Figura 5). Esto no se contrapone con lo previamente descrito que ambos FTs participan de forma importante en la respuesta y adaptación a estrés oxidativo (Cuéllar-Cruz *et al.* 2008).

Consistente con lo anterior, agentes generadores de estrés como Fluconazol y  $ZnSO_4$ , tampoco indujeron cambios significativos en la expresión de *CgMSN4* (Figura 8 y 11). Al contrario, se ha descrito que *ScMsn2* y *ScMsn4* participan en condiciones de estrés por falta de zinc y no por un incremento en su concentración (Gauci *et. al.* 2009).

*CgMsn4* es el FT que más ha divergido comparado con *ScMsn2* y *ScMsn4* y esto apoya la evidencia de que su regulación como la participación en diferentes tipos de estrés sea diferente a *ScMsn2* y *ScMsn4*. Es importante identificar posibles activadores o represores de su expresión, además de estudiar su expresión en diferentes fondos genéticos de *C. glabrata*.

## **CgMsn2 y CgMsn4 no son necesarios para la resistencia a diferentes condiciones de estrés**

*C. glabrata* es el segundo patógeno aislado con mayor frecuencia en infecciones sanguíneas intrahospitalarias (Singh *et al.* 2020, Seider *et al.* 2011, Toda *et al.* 2019). Esto indica que es importante conocer los mecanismos que le permiten a *C. glabrata* ser un patógeno exitoso.

En base a nuestros experimentos que realizamos utilizando mutantes sencillas y la doble mutante de los genes *CgMsn2* y *CgMsn4* podemos concluir que no son necesarios para la supervivencia *in vitro* de *C. glabrata* a condiciones de estrés por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, ZnSO<sub>4</sub>, Fluconazol, CdSO<sub>4</sub> ni altas temperaturas (42°C y 45°C) (Figura Suplementaria 2). Estos datos se relacionan con lo que se ha demostrado en modelos de virulencia murinos y de insectos (*Drosophila melanogaster*), en donde *CgMsn2* y *CgMsn4* no se requieren para la virulencia *in vivo* (Roetzer *et al.* 2008 y datos de nuestro laboratorio).

El hecho de que ambos FTs no sean fundamentales para la supervivencia, no significa que no sean importantes, ya que, el hecho de que participen como reguladores de la respuesta general a estrés nos indica que su participación ha permitido que *C. glabrata* sea considerada actualmente como un patógeno emergente.

## Conclusiones

*C. glabrata* es un hongo patógeno que ha desarrollado diferentes estrategias para sobrevivir (Seider *et al.* 2011, Hassan *et al.* 2021). Una de las estrategias de supervivencia de *C. glabrata* es la alta resistencia al estrés oxidante en la que se han identificado la participación de los FTs *CgMsn2* y *CgMsn4*. Ambos FTs se describieron por primera vez en *S. cerevisiae*. En este trabajo identificamos que la regulación y participación de *CgMsn2* y *CgMsn4* en la respuesta a diferentes tipos de estrés son diferentes a las de *S. cerevisiae*. Esto indica que *CgMsn2* y *CgMsn4* divergieron en *C. glabrata* para participar en la virulencia de este hongo patógeno oportunista.

## Referencias

**Antinori, S., Milazzo, L., Sollima, S., Galli, M., & Corbellino, M.** (2016). Candidemia and invasive candidiasis in adults: A narrative review. *34*, 21-28. DOI: 10.1016/j.ejim.2016.06.029

**Babior, B.M.** (2004). NADPH oxidase. *Curr Opin Immunol*, *16* (1), 42-7. DOI: 10.1016/j.coi.2003.12.001

**Bird, A. J., & Wilson, S.** (2020). Zinc homeostasis in the secretory pathway in yeast. *Current opinion in chemical biology*, *55*, 145–150. DOI: 10.1016/j.cbpa.2020.01.011

**Brunke, S., Seider, K., Almeida, R. S., Heyken, A., Fleck, C. B., Brock, M., Barz, D., Rupp, S., & Hube, B.** (2010). *Candida glabrata* tryptophan-based pigment production via the Ehrlich pathway. *Molecular microbiology*, *76* (1), 25–47. DOI: 10.1111/j.1365-2958.2010.07052.x

**Bodvard, K., Peeters, K., Roger, F., Romanov, N., Igbaria, A., Welkenhuysen, N., Palais, G., Reiter, W., Toledano, M. B., Käll, M., & Molin, M.** (2017). Light-sensing via hydrogen peroxide and a peroxiredoxin. *Nature communications*, *8*, 14791. DOI: 10.1038/ncomms14791

**Boy-Marcotte, E., Perrot, M., Bussereau, F., Boucherie, H., & Jacquet, M.** (1998). Msn2p and Msn4p Control a Large Number of Genes Induced at the Diauxic Transition Which Are Repressed by Cyclic AMP in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Bacteriology*, *180* (5), 1044-1052.

**Briones-Martin-del-Campo, M., Orta-Zavala, E., Cañas-Villamar, I., Gutierrez-Escobedo, G., Juárez-Cepeda, J., Robledo-Márquez, K., Arroyo-Helguera, O.,**

**Castaño, I., & De Las Peñas, A.** (2015) The superoxide dismutases of *Candida glabrata* protect against oxidative damage and are required for lysine biosynthesis, DNA integrity and chronological life survival. *Microbiology*, 161 (Pt 2), 300-310. DOI: 10.1099/mic.0.000006

**Briones-Martin-del-Campo, M., Orta-Zavala, E., Juárez-Cepeda, J., Gutierrez-Escobedo, G., Cañas-Villamar, I., Castaño, I., & De Las Peñas, A.** (2014) The oxidative stress response of the opportunistic fungal pathogen *Candida glabrata*. *Rev Iberoam Micol.*, 31 (1), 67-71. DOI: 10.1016/j.riam.2013.09.012

**Calvin, N. M., & Hanawalt, P. C.** (1988). High-efficiency transformation of bacterial cells by electroporation. *Journal of bacteriology*, 170 (6), 2796–2801. DOI: 10.1128/jb.170.6.2796-2801.1988

***Candida* Genome Database:** <http://www.candidagenome.org>

**Castaño, I., Kaur, R., Pan, S., Cregg, R., Penas, A., Guo, N., Biery, M. C., Craig, N. L., & Cormack, B. P.** (2003). Tn7-based genome-wide random insertional mutagenesis of *Candida glabrata*. *Genome research*, 13 (5), 905–915. DOI: 10.1101/gr.848203

**Celenza, J. L., and M. Carlson.** (1986). A yeast gene that is essential for release from glucose repression encodes a protein kinase. *Science* 233:1175-1180.

**Cha-Aim, K., Hoshida, H., Fukunaga, T., & Akada, R.** (2012). Fusion PCR via novel overlap sequences. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, 852, 97–110. DOI: 10.1007/978-1-61779-564-0\_8

**Chapal, M., Mintzer, S., Brodsky, S., Carmi, M., & Barkai, N.** (2019). Resolving noise-control conflict by gene duplication. *PLoS biology*, 17 (11), e3000289. DOI: 10.1371/journal.pbio.3000289



**Cormack, B. P., & Falkow, S.** (1999). Efficient homologous and illegitimate recombination in the opportunistic yeast pathogen *Candida glabrata*. *Genetics*, *151*(3), 979–987. DOI: 10.1093/genetics/151.3.979

**Cormack, B.P., Ghori, N., & Falkow, S.** (1999). An adhesin of the yeast pathogen *Candida glabrata* mediating adherence to human epithelial cells. *Science*, *285*, 578–582. DOI: 10.1126/science.285.5427.578

**Cuéllar-Cruz, M., Briones-Martin-del-Campo, M., Cañas-Villamar, I., Montalvo-Arredondo, J., Riego-Ruiz, L., Castaño, I., & De Las Peñas, 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. *Eukaryotic cell*, *7* (5), 814–825. DOI: 10.1128/EC.00011-08

**De Las Peñas, A., Pan, S. J., Castaño, I., Alder, J., Cregg, R., & 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 & development*, *17*(18), 2245–2258. DOI: 10.1101/gad.1121003

**De Wever, V., Reiter, W., Ballarini, A., Ammerer, G., & Brocard, C.** (2005). A dual role for PP1 in shaping the Msn2-dependent transcriptional response to glucose starvation. *The EMBO Journal*, *24* (23), 4115–4123. DOI: 10.1038/sj.emboj.7600871

**Diekema, D. J., Messer, S. A., Brueggemann, A. B., Coffman, S. L., Doern, G. V., Herwaldt, L. A., & Pfaller, M. A.** (2002). Epidemiology of candidemia: 3-year results from the emerging infections and the epidemiology of Iowa organisms study. *Journal of clinical microbiology*, *40* (4), 1298–1302. DOI: 10.1128/jcm.40.4.1298-1302.2002

**Eom, K. S., Cheong, J. S., & Lee, S. J.** (2016). Structural Analyses of Zinc Finger Domains for Specific Interactions with DNA. *Journal of microbiology and biotechnology*, 26 (12). DOI: 10.4014/jmb.1609.09021

**Estruch, F., & Carlson, M.** (1993). Two Homologous Zinc Finger Genes Identified by Multicopy Suppression in a SNF1 Protein Kinase Mutant of *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular and Cellular Biology*, 13 (7), 3872-3881. DOI: 10.1128/mcb.13.7.3872

**Fitzpatrick, D. A., Logue, M. E., Stajich, J. E., & Butler, G.** (2006). A fungal phylogeny based on 42 complete genomes derived from supertree and combined gene analysis. *BMC Evol Biol*, 6 (99). DOI:10.1186/1471-2148-6-99

**Gabaldon, T., Naranjo-Ortiz, M. A., & Marcet-Houben, M.** (2016). Evolutionary genomics of yeast pathogens in the *Saccharomycotina*. *FEMS Yeast Res*, 16 (6). DOI: 10.1093/femsyr/fow064.

**Gallegos-García, V., Pan, S. J., Juárez-Cepeda, J., Ramírez-Zavaleta, C. Y., Martín-del-Campo, M. B., Martínez-Jiménez, V., Castaño, I., Cormack, B., & De Las Peñas, A.** (2012). A novel downstream regulatory element cooperates with the silencing machinery to repress EPA1 expression in *Candida glabrata*. *Genetics*, 190 (4), 1285–1297. DOI: 10.1534/genetics.111.138099

**Gauci, V. J., Beckhouse, A. G., Lyons, V., Beh, E. J., Rogers, P. J., Dawes, I. W., & Higgins, V. J.** (2009). Zinc starvation induces a stress response in *Saccharomyces cerevisiae* that is mediated by the Msn2p and Msn4p transcriptional activators. *FEMS yeast research*, 9 (8), 1187–1195. DOI: 10.1111/j.1567-1364.2009.00557.x

**Gietz, D., St Jean, A., Woods, R. A., & Schiestl, R. H.** (1992). Improved method for high efficiency transformation of intact yeast cells. *Nucleic acids research*, 20 (6), 1425. DOI: 10.1093/nar/20.6.1425

**Görner, W., Durchschlag, E., Wolf, J., Brown, E. L., Ammerer, G., Ruis, H., & Schüller, C.** (2002). Acute glucose starvation activates the nuclear localization signal of a stress-specific yeast transcription factor. *The EMBO journal*, 21 (1-2), 135–144. DOI: 10.1093/emboj/21.1.135

**Gutiérrez-Escobedo, G., Orta-Zavalza, E., Castaño, I., & De Las Peñas, A.** (2013). Role of glutathione in the oxidative stress response in the fungal pathogen *Candida glabrata*. *Curr Genet*, 59 (3), 91-106. DOI: 10.1007/s00294-013-0390-1

**Gutierrez-Escobedo, G., Hernández-Carreón, O., Morales-Rojano, B., Revuelta-Rodríguez, B., Vázquez-Franco, N., I., Castaño, I., & De Las Peñas, A.** (2019). *Candida glabrata* peroxiredoxins, Tsa1 and Tsa2, and sulfiredoxin, Srx1, protect against oxidative damage and are necessary for virulence. *Fungal Genetics and Biology*, 135, 103287. DOI: 10.1016/j.fgb.2019.103287.

**Gutiérrez-Escobedo, G., Hernández-Carreón, O., Morales-Rojano, B., Revuelta-Rodríguez, B., Vázquez-Franco, N., Castaño, I., & De Las Peñas, A.** (2020). *Candida glabrata* peroxiredoxins, Tsa1 and Tsa2, and sulfiredoxin, Srx1, protect against oxidative damage and are necessary for virulence. *Fungal genetics and biology: FG & B*, 135, 103287. DOI: 10.1016/j.fgb.2019.103287

**Gutin, J., Joseph-Strauss, D., Sadeh, A., Shalom, E., & Friedman, N.** (2019). Genetic screen of the yeast environmental stress response dynamics uncovers distinct regulatory phases. *Molecular systems biology*, 15 (8), e8939. DOI: 10.15252/msb.20198939

**Hassan, Y., Chew, S. Y., & Than, L. (2021).** *Candida glabrata*: Pathogenicity and Resistance Mechanisms for Adaptation and Survival. *Journal of fungi (Basel, Switzerland)*, 7(8), 667. DOI: 10.3390/jof7080667

**Inoue, Y., Maeta, K., & Nomura, W. (2011).** Glyoxalase system in yeasts: structure, function, and physiology. *Seminars in cell & developmental biology*, 22 (3), 278–284. DOI: 10.1016/j.semcd.2011.02.002

**Jacobson, T., Priya, S., Sharma, S. K., Andersson, S., Jakobsson, S., Tanghe, R., Ashouri, A., Rauch, S., Goloubinoff, P., Christen, P., & Tamás, M. J. (2017).** Cadmium Causes Misfolding and Aggregation of Cytosolic Proteins in Yeast. *Molecular and cellular biology*, 37 (17), e00490-16. DOI: 10.1128/MCB.00490-16

**Kaur, R., Ma, B., & Cormack, B. P. (2007).** A family of glycosylphosphatidylinositol-linked aspartyl proteases is required for virulence of *Candida glabrata*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104 (18), 7628–7633. DOI: 10.1073/pnas.0611195104

**Kurtzman, C. P., & Robnett, C. J. (2003).** Phylogenetic relationships among yeasts of the '*Saccharomyces complex*' determined from multigene sequence analyses. *FEMS Yeast Res*, 3 (4), 417–32. DOI: 10.1016/S1567-1356(03)00012-6.

**Kuwayama, H., Obara, S., Morio, T., Katoh, M., Urushihara, H., & Tanaka, Y. (2002).** PCR-mediated generation of a gene disruption construct without the use of DNA ligase and plasmid vectors. *Nucleic acids research*, 30 (2), E2. DOI: 10.1093/nar/30.2.e2

**Loewith, R., & Hall, M. N. (2011).** Target of rapamycin (TOR) in nutrient signaling and growth control. *Genetics*, 189 (4), 1177–1201. DOI: 10.1534/genetics.111.133363

**Martínez-Pastor, M.T., Marchler, G., Schuller, C., Marchler-Bauer, A., Ruis, H., & Estruch, F.** (1996). The *Saccharomyces cerevisiae* zinc finger proteins Msn2 and Msn4 are required for transcriptional induction through the stress-response element (STRE). *The EMBO Journal*, 15 (9), 2227-2235.

**O'Brien, R. M., Halmi, N., Stromstedt, P. E., Printz, R. L., & Granner, D. K.** (1995). Expression cloning of a zinc-finger cyclic AMP-response-element-binding protein. *The Biochemical journal*, 312 (Pt 1), 17–21. DOI: 10.1042/bj3120017

**Orta-Zavala, E., Guerrero-Serrano, G., Gutiérrez-Escobedo, G., Cañas-Villamar, I., Juárez-Cepeda, J., Castaño, I., & De Las Peñas, A.** (2013) Local Silencing Controls the Oxidative Stress Response and the Multidrug Resistance in *Candida Glabrata*. *Mol Microbiol.*, 88 (6), 1135-48. DOI: 10.1111/mmi.12247

**Pais, P., Galocha, M., Viana, R., Cavalheiro, M., Pereira, D., & Teixeira, M. C.** (2019). Microevolution of the pathogenic yeasts *Candida albicans* and *Candida glabrata* during antifungal therapy and host infection. *Microbial cell (Graz, Austria)*, 6 (3), 142–159. DOI: 10.15698/mic2019.03.670

**Pierce, C. G., Uppuluri, P., Tristan, A. R., Wormley, F. L., Jr, Mowat, E., Ramage, G., & Lopez-Ribot, J. L.** (2008). A simple and reproducible 96-well plate-based method for the formation of fungal biofilms and its application to antifungal susceptibility testing. *Nature protocols*, 3(9), 1494–1500. DOI: 10.1038/nprot.2008.141

**Polke, M., Hube, B., & Jacobsen, I.D.** (2015). *Candida* survival strategies, 91, 139-235. DOI: 10.1016/bs.aambs.2014.12.002.

**Rajvanshi, P. K., Arya, M., & Rajasekharan, R.** (2017). The stress-regulatory transcription factors Msn2 and Msn4 regulate fatty acid oxidation in budding yeast.

*The Journal of biological chemistry*, 292 (45), 18628–18643. DOI: 10.1074/jbc.M117.801704

**Razin, S. V., Borunova, V. V., Maksimenko, O. G., & Kantidze, O. L.** (2012). Cys<sub>2</sub>His<sub>2</sub> zinc finger protein family: classification, functions, and major members. *Biochemistry Biokhimiia*, 77 (3), 217–226. DOI: 10.1134/S0006297912030017

**Rep, M., Krantz, M., Thevelein, J. M., & Hohmann, S.** (2000). The transcriptional response of *Saccharomyces cerevisiae* to osmotic shock. Hot1p and Msn2p/Msn4p are required for the induction of subsets of high osmolarity glycerol pathway-dependent genes. *The Journal of biological chemistry*, 275(12), 8290–8300. DOI: 10.1074/jbc.275.12.8290

**Rodrigues, C. F., Silva, S., & Henriques, M.** (2014). *Candida glabrata*: a review of its features and resistance. *European journal of clinical microbiology & infectious diseases : official publication of the European Society of Clinical Microbiology*, 33 (5), 673–688. DOI: 10.1007/s10096-013-2009-3

**Roetzer, A., Gratz, N., Kovarik, P., & Schüller, C.** (2010). Autophagy supports *Candida glabrata* survival during phagocytosis. *Cellular microbiology*, 12 (2), 199–216. DOI: 10.1111/j.1462-5822.2009.01391.x

**Roetzer, A., Gregori, C., Jennings, A. M., Quintin, J., Ferrandon, D., Butler, G., Kuchler, K., Ammerer, G., & Schüller, C.** (2008). *Candida glabrata* environmental stress response involves *Saccharomyces cerevisiae* Msn2/4 orthologous transcription factors. *Molecular microbiology*, 69 (3), 603–620. DOI: 10.1111/j.1365-2958.2008.06301.x

**Saccharomyces Genome Database:** <https://www.yeastgenome.org>

**Sadeh, A., Baran, D., Volokh, M., & Aharoni, A.** (2012) Conserved motifs in the Msn2-activating domain are important for Msn2-mediated yeast stress response. *Journal of Cell Science*, 125 (Pt 14), 3333-42. DOI: 10.1242/jcs.096446

**Schüller, H.-J., and K.-D. Entian.** (1987). Isolation and expression analysis of two yeast regulatory genes involved in the derepression of glucose repressible enzymes. *Mol. Gen. Genet.* 209: 366-373.

**Seider, K., Brunke, S., Wilson, D., Majer, O., Barz, D., Haas, A., Kuchler, K., Schaller, M., Hube, B.** (2011). The facultative intracellular pathogen *Candida glabrata* subverts macrophage cytokine production and phagolysosome maturation. *J Immunol*, 187 (6), 3072-86. DOI: 10.4049/jimmunol.1003730

**Silva, S., Negri, M., Henriques, M., Oliveira, R., Williams, D.W., & Azeredo, J.** (2012). *Candida glabrata*, *Candida parapsilosis* and *Candida tropicalis*: biology, epidemiology, pathogenicity and antifungal resistance. *FEMS Microbiol Rev*, 36 (2), 288-305. DOI: 10.1111/j.1574-6976.2011.00278.x.

**Singh, D. K., Tóth, R., & Gácsér, A.** (2020). Mechanisms of Pathogenic *Candida* Species to Evade the Host Complement Attack. *Frontiers in cellular and infection microbiology*, 10, 94. DOI: 10.3389/fcimb.2020.00094

**Shafiei, M., Peyton, L., Hashemzadeh, M., & Foroumadi, A.** (2020). History of the development of antifungal azoles: A review on structures, SAR, and mechanism of action. *Bioorganic chemistry*, 104, 104240. DOI: 10.1016/j.bioorg.2020.104240

**Toda, M., Williams, S. R., Berkow, E. L., Farley, M. M., Harrison, M. D., Bonner, L., Marceaux, K. M., Hollick, R., Zhang, A. Y., Schaffner W., Lockhart, S. R., Jackson, B. R., & Vallabhaneni, S.** (2019). Population-Based Active Surveillance for Culture-Confirmed Candidemia- Four Sites, United States, 2012–2016. *US Department of Health and Human Services/CDC*, 68 (8), 1-15.

**Tumbarello, M., Posteraro, B., Treccarichi, E. M., Fiori, B., Rossi, M., Porta, R., de Gaetano Donati, K., La Sorda, M., Spanu, T., Fadda, G., Cauda, R., & Sanguinetti, M. (2007).** Biofilm production by *Candida* species and inadequate antifungal therapy as predictors of mortality for patients with candidemia. *Journal of clinical microbiology*, 45 (6), 1843–1850. DOI: 10.1128/JCM.00131-07

**Vamvakas, S. S., Kapolos, J., Farmakis, L., Koskorellou, G., & Genneos, F. (2019).** Ser625 of *msn2* transcription factor is indispensable for ethanol tolerance and alcoholic fermentation process. *Biotechnology progress*, 35 (5), e2837. DOI: 10.1002/btpr.2837

**Watanabe, M., Watanabe, D., Akao, T., & Shimoi, H. (2009).** Overexpression of *MSN2* in a sake yeast strain promotes ethanol tolerance and increases ethanol production in sake brewing. *Journal of bioscience and bioengineering*, 107 (5), 516–518. DOI: 10.1016/j.jbiosc.2009.01.006

**Zordan, R. E., Ren, Y., Pan, S. J., Rotondo, G., De Las Peñas, A., Iluore, J., & Cormack, B. P. (2013).** Expression plasmids for use in *Candida glabrata*. *G3 (Bethesda, Md.)*, 3(10), 1675–1686. DOI: 10.1534/g3.113.006908



## Tablas

**Tabla 1. Cepas de *Escherichia coli***

<b>Cepa</b>	<b>Genotipo</b>	<b>Referencia</b>
DH10	F <sup>-</sup> <i>mcrA</i> Δ( <i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i> ) Φ80Δ <i>lacZ</i> Δ <i>M15</i> Δ <i>lacX74</i> <i>deoR</i> <i>recA1</i> <i>endA1</i> <i>araD139</i> Δ( <i>ara,leu</i> )7697 <i>galU</i> <i>galK</i> λ <sup>-</sup> <i>rpsL</i> <i>nupG</i>	(Calvin y Hanawalt, 1988)
4500	F <sup>-</sup> <i>mcrA</i> Δ( <i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i> ) Φ80Δ <i>lacZ</i> Δ <i>M15</i> Δ <i>lacX74</i> <i>deoR</i> <i>recA1</i> <i>endA1</i> <i>araD139</i> Δ( <i>ara,leu</i> )7697 <i>galU</i> <i>galK</i> λ <sup>-</sup> <i>rpsL</i> <i>nupG</i> pRH1 Amp <sup>R</sup>	Este trabajo
4501	F <sup>-</sup> <i>mcrA</i> Δ( <i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i> ) Φ80Δ <i>lacZ</i> Δ <i>M15</i> Δ <i>lacX74</i> <i>deoR</i> <i>recA1</i> <i>endA1</i> <i>araD139</i> Δ( <i>ara,leu</i> )7697 <i>galU</i> <i>galK</i> λ <sup>-</sup> <i>rpsL</i> <i>nupG</i> pRH2 Amp <sup>R</sup>	Este trabajo
4502	F <sup>-</sup> <i>mcrA</i> Δ( <i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i> ) Φ80Δ <i>lacZ</i> Δ <i>M15</i> Δ <i>lacX74</i> <i>deoR</i> <i>recA1</i> <i>endA1</i> <i>araD139</i> Δ( <i>ara,leu</i> )7697 <i>galU</i> <i>galK</i> λ <sup>-</sup> <i>rpsL</i> <i>nupG</i> pRH3 Amp <sup>R</sup>	Este trabajo

**Tabla 2. Cepas de *Candida glabrata***

<b>Cepa</b>	<b>Parental</b>	<b>Genotipo</b>	<b>Referencia</b>
BG14	BG2	<i>ura3Δ::Tn903 Neo<sup>R</sup> Ura<sup>-</sup></i>	(Cormack y Falkow, 1999)
CGM833 <i>msn2Δ</i>	BG14	<i>msn2Δ::FRT Hyg<sup>S</sup> Ura<sup>-</sup></i> <i>ura3Δ::Tn903 Neo<sup>R</sup></i>	(Cuéllar-Cruz <i>et al.</i> , 2008)
CGM835 <i>msn4Δ</i>	BG14	<i>msn4Δ::hph Hyg<sup>R</sup></i> <i>ura3Δ::Tn903 Neo<sup>R</sup></i>	(Cuéllar-Cruz <i>et al.</i> , 2008)
CGM837 <i>msn2Δ msn4Δ</i>	CGM833	<i>msn4Δ::hph Hyg<sup>R</sup></i> <i>ura3Δ::Tn903 Neo<sup>R</sup></i>	(Cuéllar-Cruz <i>et al.</i> , 2008)
CGM910	BG14	<i>ura3Δ::Tn903 Neo<sup>R</sup></i> pAP353 Ura <sup>+</sup>	(Gallegos-García <i>et al.</i> , 2012)
CGM1923	BG14	<i>ura3Δ::Tn903 Neo<sup>R</sup></i> pCV37 Ura <sup>+</sup>	(Gutiérrez-Escobedo <i>et al.</i> , 2020)
CGM4179	BG14	<i>ura3Δ::Tn903 Neo<sup>R</sup></i> pRH1 Ura <sup>+</sup>	Este trabajo
CGM4181	BG14	<i>ura3Δ::Tn903 Neo<sup>R</sup></i> pRH3 Ura <sup>+</sup>	Este trabajo
CGM4195 <i>msn2Δ</i>	CGM833	<i>ura3Δ::Tn903 Neo<sup>R</sup></i> pRH3 Ura <sup>+</sup>	Este trabajo
CGM4199 <i>msn4Δ</i>	CGM835	<i>ura3Δ::Tn903 Neo<sup>R</sup></i> pRH3 Ura <sup>+</sup>	Este trabajo
CGM4267 <i>msn2Δ msn4Δ</i>	CGM837	<i>ura3Δ::Tn903 Neo<sup>R</sup></i> pRH3 Ura <sup>+</sup>	Este trabajo

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

Plásmidos	Genotipo	Referencia
<b>Vectores de clonación</b>		
pGRB2.0	Vector de clonación pRS406 <i>URA3 CgCEN ARS Amp<sup>R</sup></i> .	(De Las Penas <i>et al.</i> , 2003; Zordan <i>et al.</i> , 2013)
<b>Plásmidos para transcripcionales con GFP</b>		
pRH1	Producto de PCR de fusión de 1.958 Kb <i>Kpn I/Sac I</i> (oligonucleótidos 2661/2663) que lleva la región promotora de <i>MSN2</i> , GFP y la región 3'UTR de <i>MSN2</i> clonados en pGRB2.0  [pP <sub>MSN2</sub> ::GFP::3'UTR <sub>MSN2</sub> ]  <i>URA3 CgCEN ARS Amp<sup>R</sup></i>	Este trabajo
pRH2	Igual que pRH1, diferente aislado	Este trabajo
pRH3	Producto de PCR de fusión de 4.001 Kb <i>Kpn I/Sac I</i> (oligonucleótidos 2665/2667) que lleva a la región promotora de <i>MSN4</i> , GFP y la región 3'UTR de <i>MSN4</i> clonados en pGRB2.0  [pP <sub>MSN4</sub> ::GFP::3'UTR <sub>MSN4</sub> ]  <i>URA3 CgCEN ARS Amp<sup>R</sup></i>	Este trabajo
pAP353	Producto de PCR de 0.738 Kb <i>EcoR I/SaI I</i> que lleva a GFP y un producto de PCR de 0.397 Kb <i>Xho I/Kpn I</i> que lleva a la región 3'UTR de <i>HIS3</i> clonados en pGRB2.0.  [p::GFP::3'UTR <sub>HIS3</sub> ]	(Gallegos-García <i>et al.</i> , 2012)

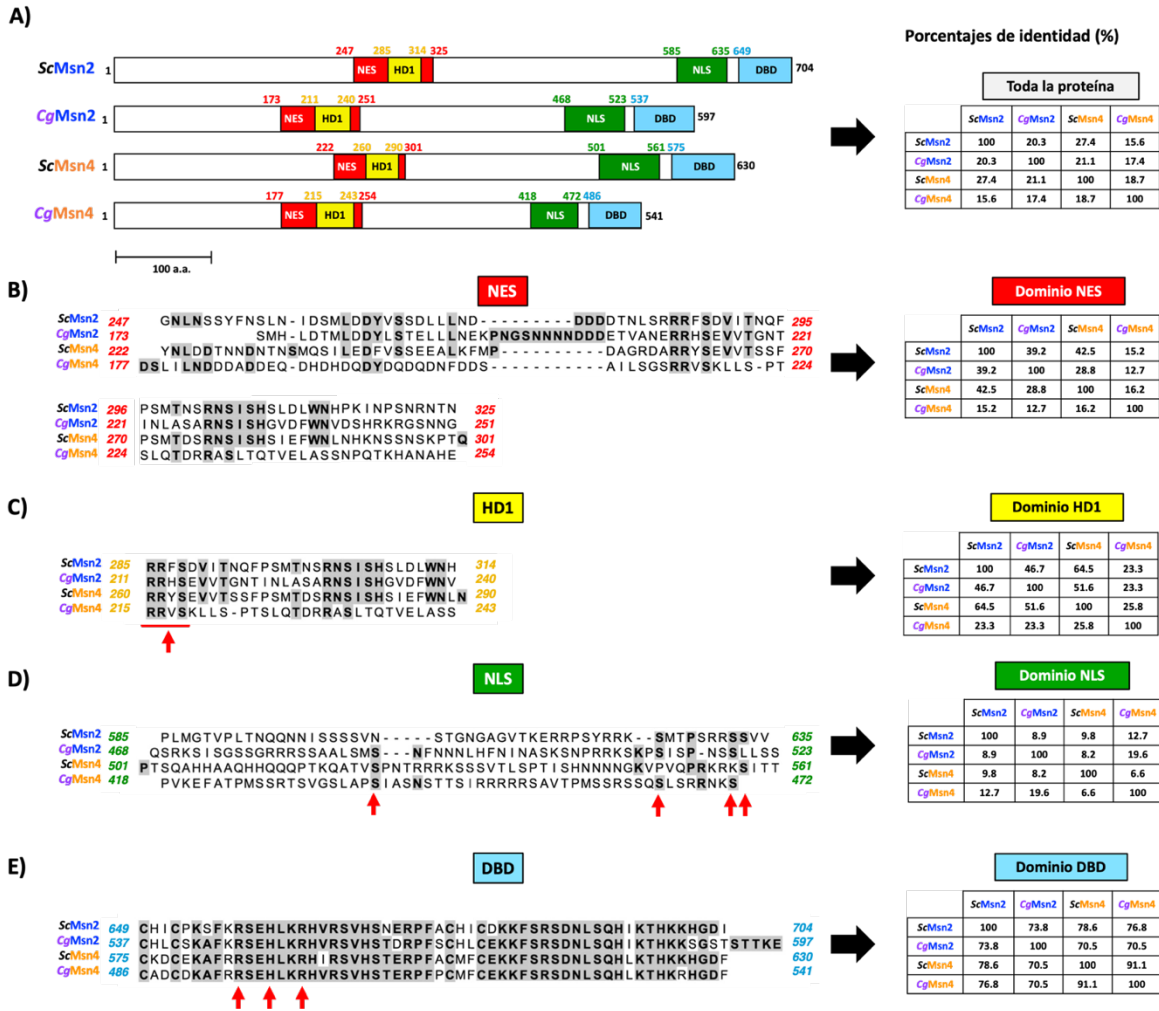
	<i>URA3 CgCEN ARS Amp<sup>R</sup></i>	
pCV37	<p>Producto de PCR de 4.56 Kb <i>Sac I/BamH I</i> que lleva a la región promotora de <i>CTA1</i> clonados en pMC14.</p> <p style="text-align: center;">[pP<sub>CTA1</sub>::GFP::3'UTR<sub>CTA1</sub>]</p> <p style="text-align: center;"><i>URA3 CgCEN ARS Amp<sup>R</sup></i></p>	(Gutiérrez-Escobedo <i>et al.</i> , 2020)

**Tabla 4. Oligonucleótidos usados en este estudio**

No.	Secuencia	Sitios
<b>Oligonucleótidos para fusiones transcripcionales con GFP</b>		
<b>GFP</b>		
2658	AAAAATGTCTAAAGGTGAAGAATTATTC	
2659	TTATTTGTACAATTCATCCATACC	
<b>Región promotora de <i>MSN2</i></b>		
2660	GAATAATTCTTCACCTTTAGACATTTTTCTGTTC TTGTTGATCTGTGTTTGGTATGGCC	
2661	CCGGGTACCGCTTATCACACACAACGGCATGGC	<i>Kpn I</i>
<b>Región 3'UTR de <i>MSN2</i></b>		
2662	GGTATGGATGAATTGTACAAATAATGACAGTGTT CCTTATTTTATCTAGTTGGCGTTGCT	
2663	CAAGAGCTCTCGTTACCGCGGATCTGTTACCAG	<i>Sac I</i>
<b>Región promotora de <i>MSN4</i></b>		
2664	GAATAATTCTTCACCTTTAGACATTTTTGGCAAG TCTTGTTTATTTTTACTTT	
2665	CCGGGTACCAAAGAGAGAAGAGAAGGGAGTTGT AAGGCC	<i>Kpn I</i>
<b>Región 3'UTR de <i>MSN4</i></b>		
2666	GGTATGGATGAATTGTACAAATAATTAAAGTCTC GAGCCATTCTTTATTT	
2667	CAAGAGCTCTTCGGAGACCATTCCGGTAACACT	<i>Sac I</i>

# Figuras

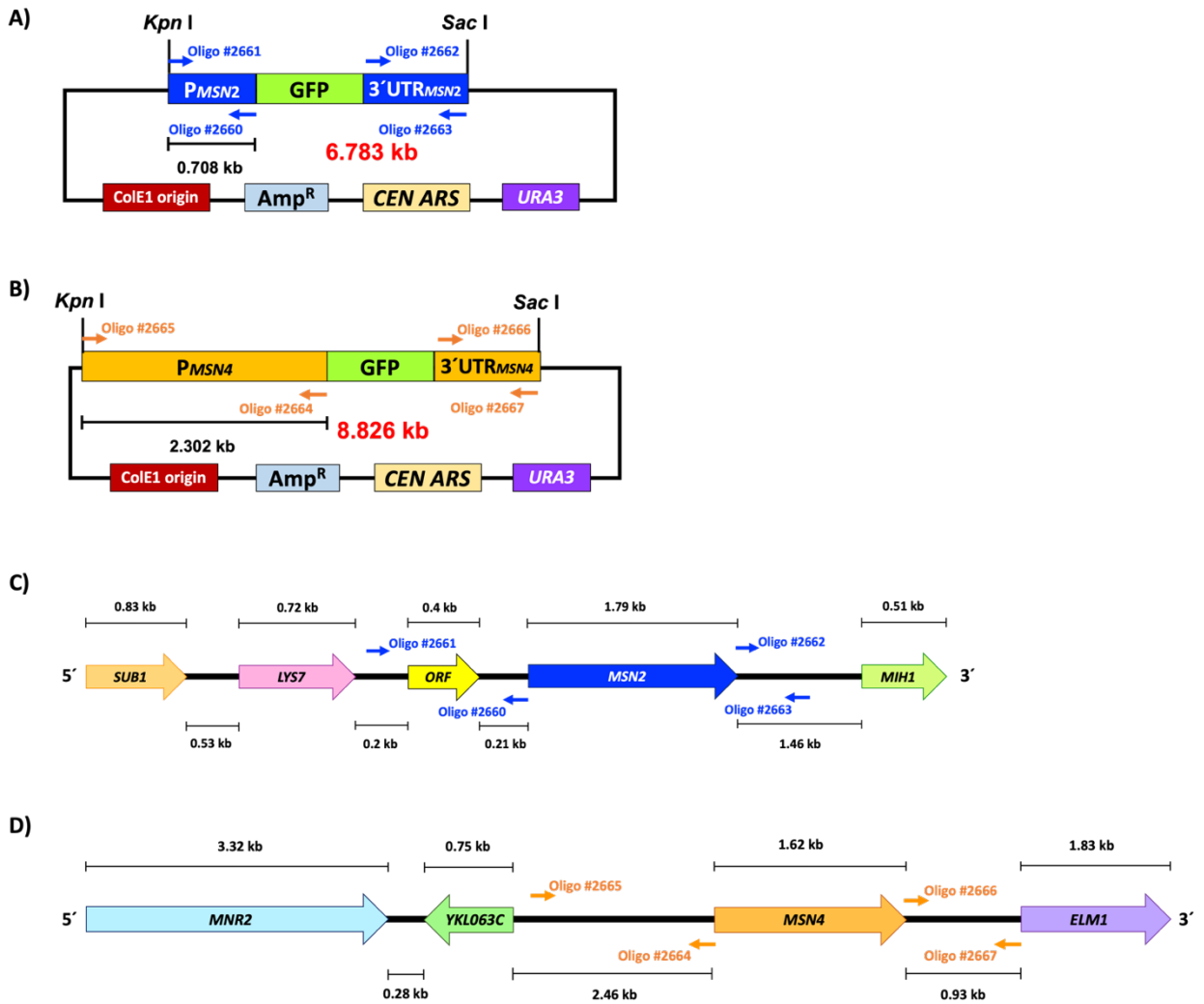
Fig. 1



**Fig. 1. Alineamientos de los dominios HD1 y DBD de Msn2 y Msn4 de *C. glabrata* y *S. cerevisiae*.**

**A)** Dominios caracterizados de ScMsn2 y ScMsn4 identificados en CgMsn2 y CgMsn4. Porcentaje de identidad de toda la proteína entre ScMsn2, ScMsn4, CgMsn2 y CgMsn4 **B)** Alineamiento y porcentajes de identidad del dominio de la señal de exportación nuclear (NES). Los sitios de identidad se encuentran sombreados con gris y en negritas. **C)** Alineamiento y porcentajes de identidad del dominio de homología 1 (HD1). Las flechas rojas apuntan los residuos que al ser fosforilados permiten la exportación nuclear de la proteína. **D)** Alineamiento y porcentajes de identidad del dominio de la señal de localización nuclear (NLS). Las flechas rojas apuntan los residuos que al ser fosforilados por PKA, impiden la entrada de Msn2 y Msn4 al núcleo. **E)** Alineamiento y porcentajes de identidad del dominio de unión a DNA (DBD). Las flechas rojas apuntan a los residuos que determinan el reconocimiento específico de la secuencia de DNA (secuencias STRE).

Fig. 2

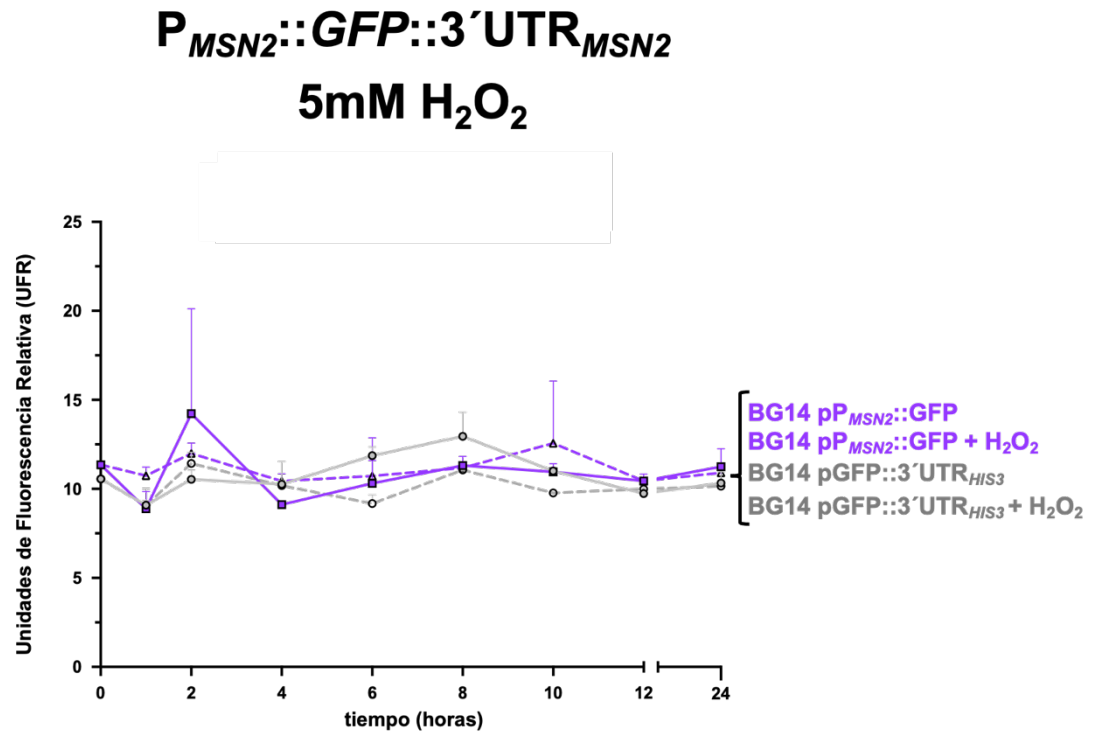




**Fig. 2. Fusiones transcripcionales de los promotores de *MSN2* y *MSN4* con GFP.**

**A)** Fusión transcripcional *MSN2::GFP* (pRH1). **B)** Fusión transcripcional *MSN4::GFP* (pRH3). *ColE1* origen de replicación en *E. coli*, *Amp<sup>R</sup>* gen que codifica para beta-lactamasa (resistencia a ampicilina), *CEN* secuencia centromérica y *ARS* origen de replicación para levaduras, *URA3* codifica para la descarboxilasa de orotidina 5'fosfato que participa en la biosíntesis de uracilo. (Ver Tablas 3 y 4). **C)** *Locus MSN2*. **D)** *Locus MSN4*. Las flechas azules indican a los oligos utilizados para amplificar la región 5' y el 3' UTR de *MSN2* (ver Tabla 4). Las flechas naranjas indican a los oligos utilizados para amplificar la región 5' y el 3' UTR de *MSN4*. Tamaños y distancias de los fragmentos están marcados en kilo bases.

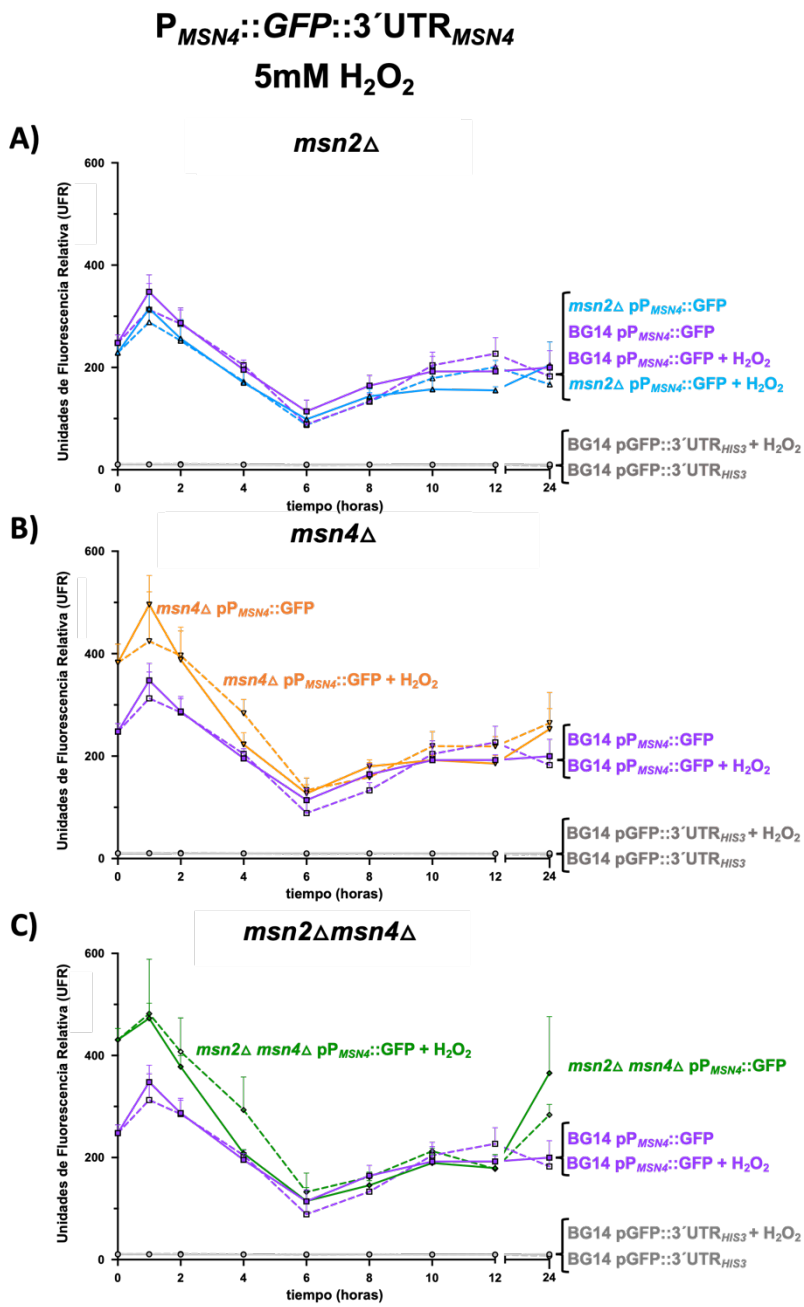
Fig. 3



**Fig. 3. Expresión transcripcional de *MSN2* en estrés oxidativo.**

Las cepas BG14 pGFP::3'UTR<sub>HIS3</sub> y BG14 pP<sub>MSN2</sub>::GFP::3'UTR<sub>MSN2</sub> se crecieron en CAA durante 48 horas a 30°C. Los cultivos se diluyeron a una OD<sub>600nm</sub> 0.2 en medio fresco en ausencia o presencia de 5mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. La actividad del promotor se midió mediante citometría de flujo en un FACScalibur<sup>BD</sup>. Se tomaron muestras a las 0, 1, 2, 4, 6, 8, 10, 12 y 24 horas. Los experimentos son promedios de triplicados biológicos. Se usó la prueba de Kolmogorov-Smirnov para evaluar la normalidad de los datos considerando un valor de  $p < 0.05$  como significativa. Las diferencias estadísticas se evaluaron por una ANOVA de dos vías y un post-test de Tukey considerando un valor de  $p < 0.05$  como significativa (ver Material y Métodos). Líneas continuas indican sin tratamiento y líneas discontinuas indican con tratamiento.

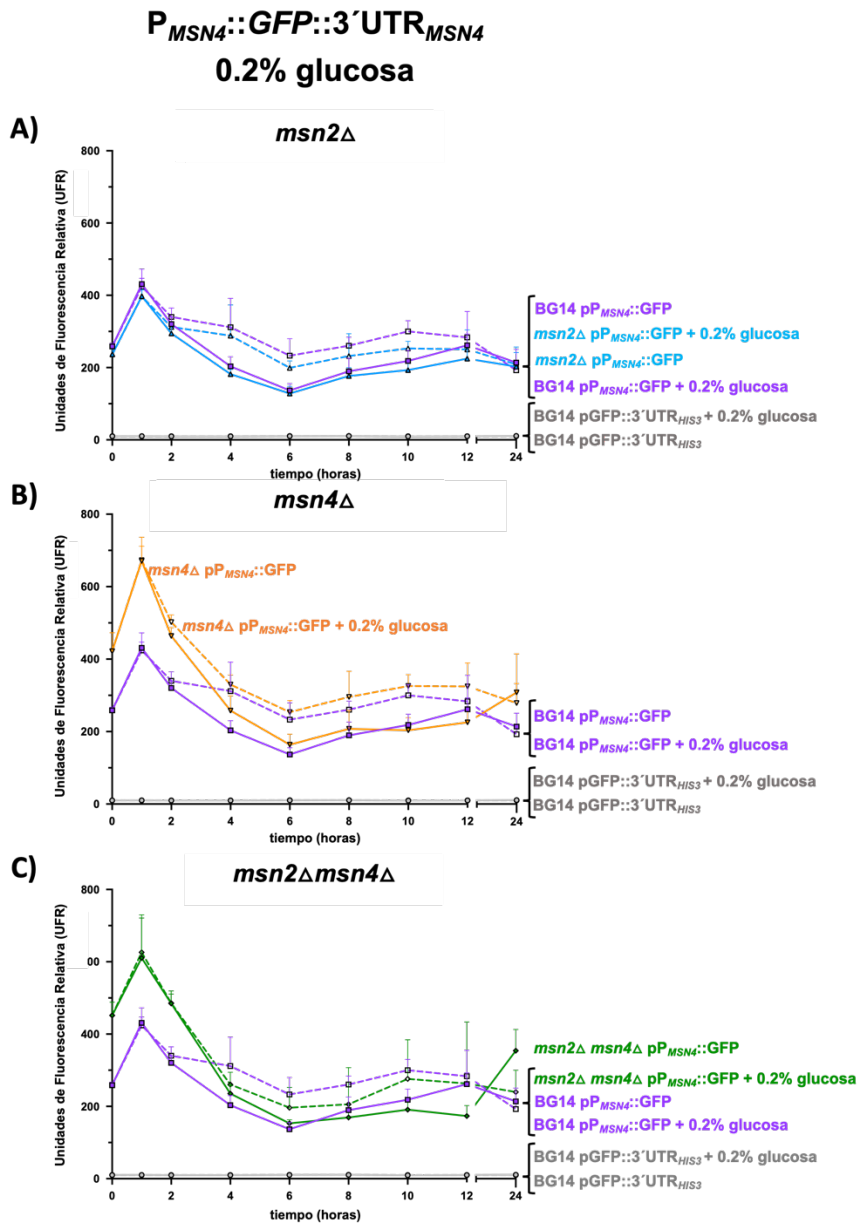
Fig. 4



**Fig. 4. Expresión transcripcional de *MSN4* en estrés oxidativo.**

Las cepas BG14, *msn2Δ*, *msn4Δ* y *msn2Δ msn4Δ* con los plásmidos pGFP::3'UTR<sub>HIS3</sub> y pP<sub>MSN4</sub>::GFP::3'UTR<sub>MSN4</sub> se crecieron y se analizaron como esta descrito en la leyenda de la Figura 3. Líneas continuas indican sin tratamiento y líneas discontinuas indican con tratamiento. **A)** Mutante *msn2Δ*. **B)** Mutante *msn4Δ*. **C)** Mutante *msn2Δ msn4Δ*.

Fig. 5

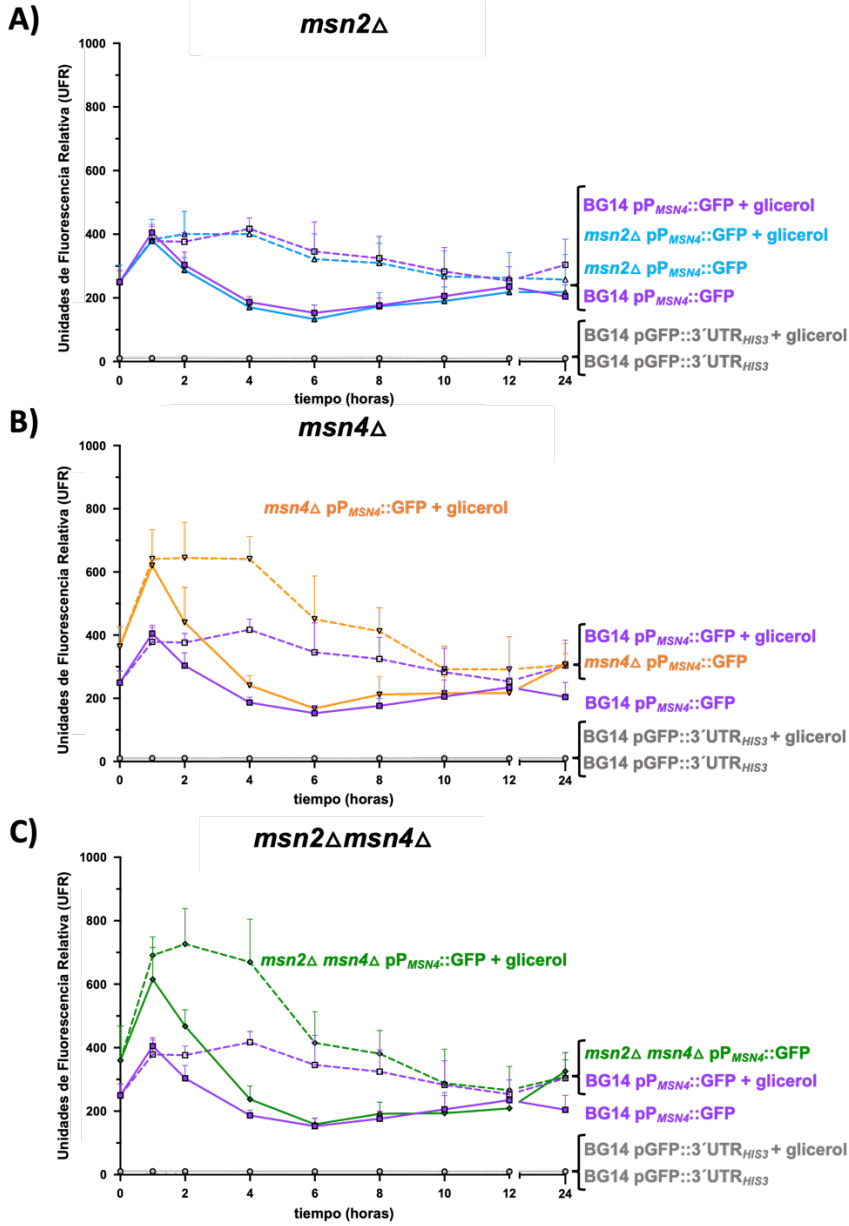


**Fig. 5. Expresión transcripcional de *MSN4* en estrés nutricional (0.2% glucosa).**

Las cepas BG14, *msn2Δ*, *msn4Δ* y *msn2Δ msn4Δ* con los plásmidos pGFP::3'UTR<sub>HIS3</sub> y pP<sub>MSN4</sub>::GFP::3'UTR<sub>MSN4</sub> se crecieron y se analizaron como esta descrito en la leyenda de la Figura 3, pero en CAA 0.2% glucosa y sin H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Líneas continuas indican sin tratamiento y líneas discontinuas indican con tratamiento. **A)** Mutante *msn2Δ*. **B)** Mutante *msn4Δ*. **C)** Mutante *msn2Δ msn4Δ*.

Fig. 6

$P_{MSN4}::GFP::3'UTR_{MSN4}$   
3% glicerol

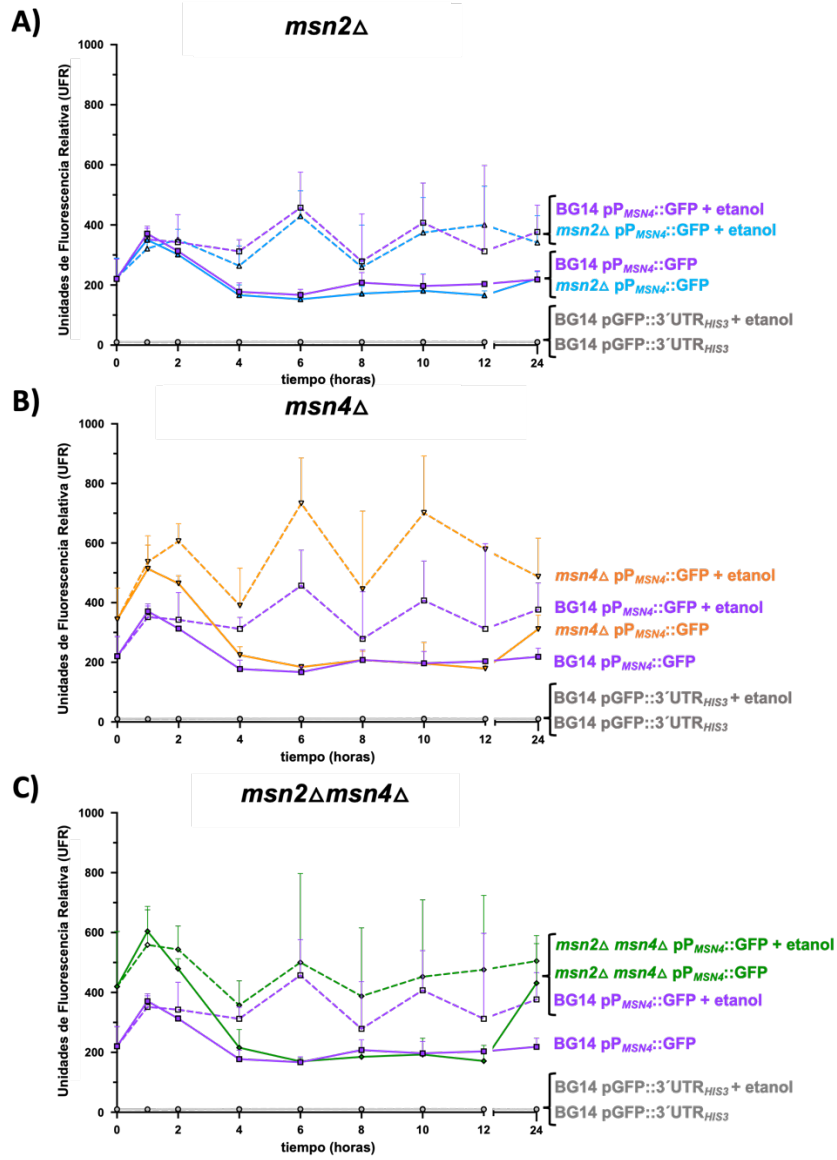




**Fig. 6. Expresión transcripcional de *MSN4* en estrés nutricional (3% glicerol).** Las cepas BG14, *msn2Δ*, *msn4Δ* y *msn2Δ msn4Δ* con los plásmidos pGFP::3'UTR<sub>HIS3</sub> y pP<sub>MSN4</sub>::GFP::3'UTR<sub>MSN4</sub> se crecieron y se analizaron como esta descrito en la leyenda de la Figura 3, pero en CAA 3% glicerol y sin H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Líneas continuas indican sin tratamiento y líneas discontinuas indican con tratamiento. **A)** Mutante *msn2Δ*. **B)** Mutante *msn4Δ*. **C)** Mutante *msn2Δ msn4Δ*.

Fig. 7

$P_{MSN4}::GFP::3'UTR_{MSN4}$   
3% etanol

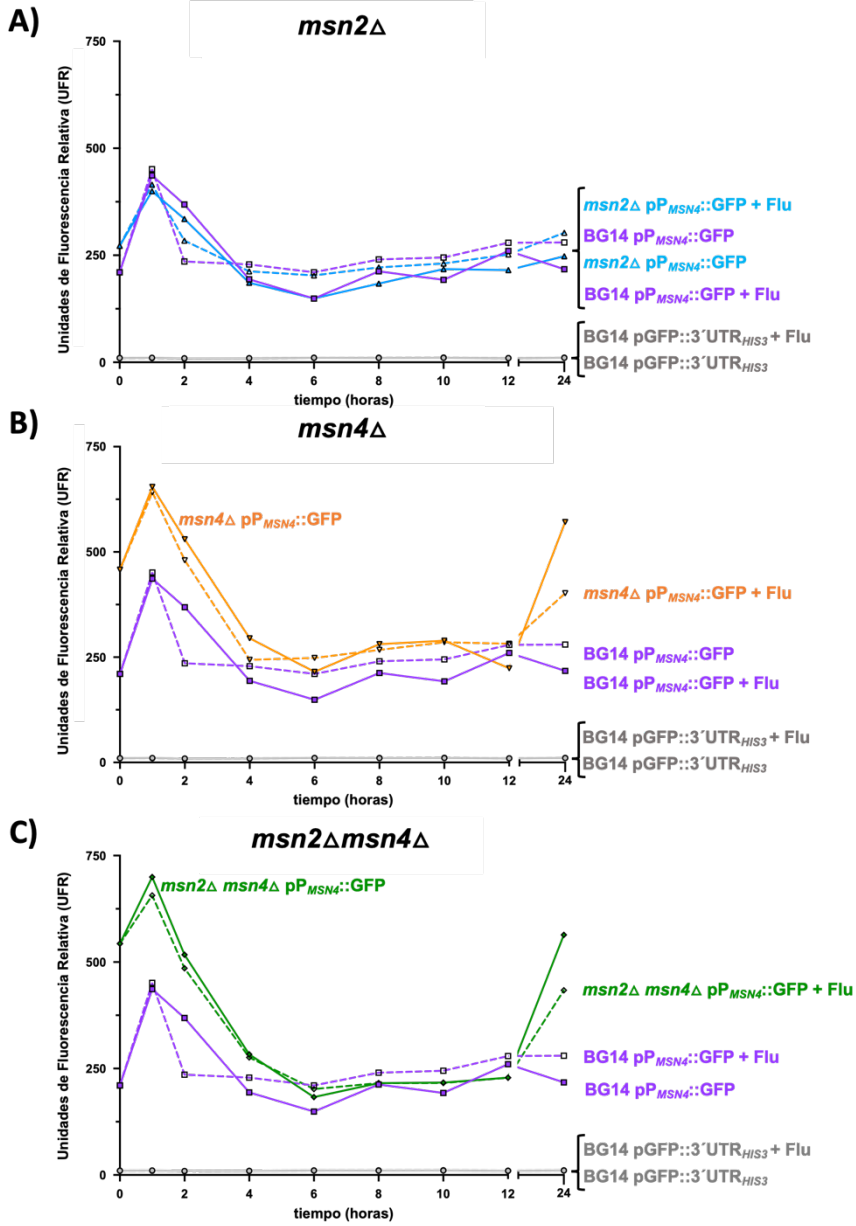


**Fig. 7. Expresión transcripcional de *MSN4* en estrés nutricional (3% etanol).**

Las cepas BG14, *msn2Δ*, *msn4Δ* y *msn2Δ msn4Δ* con los plásmidos pGFP::3'UTR<sub>HIS3</sub> y pP<sub>MSN4</sub>::GFP::3'UTR<sub>MSN4</sub> se crecieron y se analizaron como esta descrito en la leyenda de la Figura 3, pero en CAA 3% etanol y sin H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Líneas continuas indican sin tratamiento y líneas discontinuas indican con tratamiento. **A)** Mutante *msn2Δ*. **B)** Mutante *msn4Δ*. **C)** Mutante *msn2Δ msn4Δ*.

Fig. 8

$P_{MSN4}::GFP::3'UTR_{MSN4}$   
8  $\mu$ g/ml Fluconazol

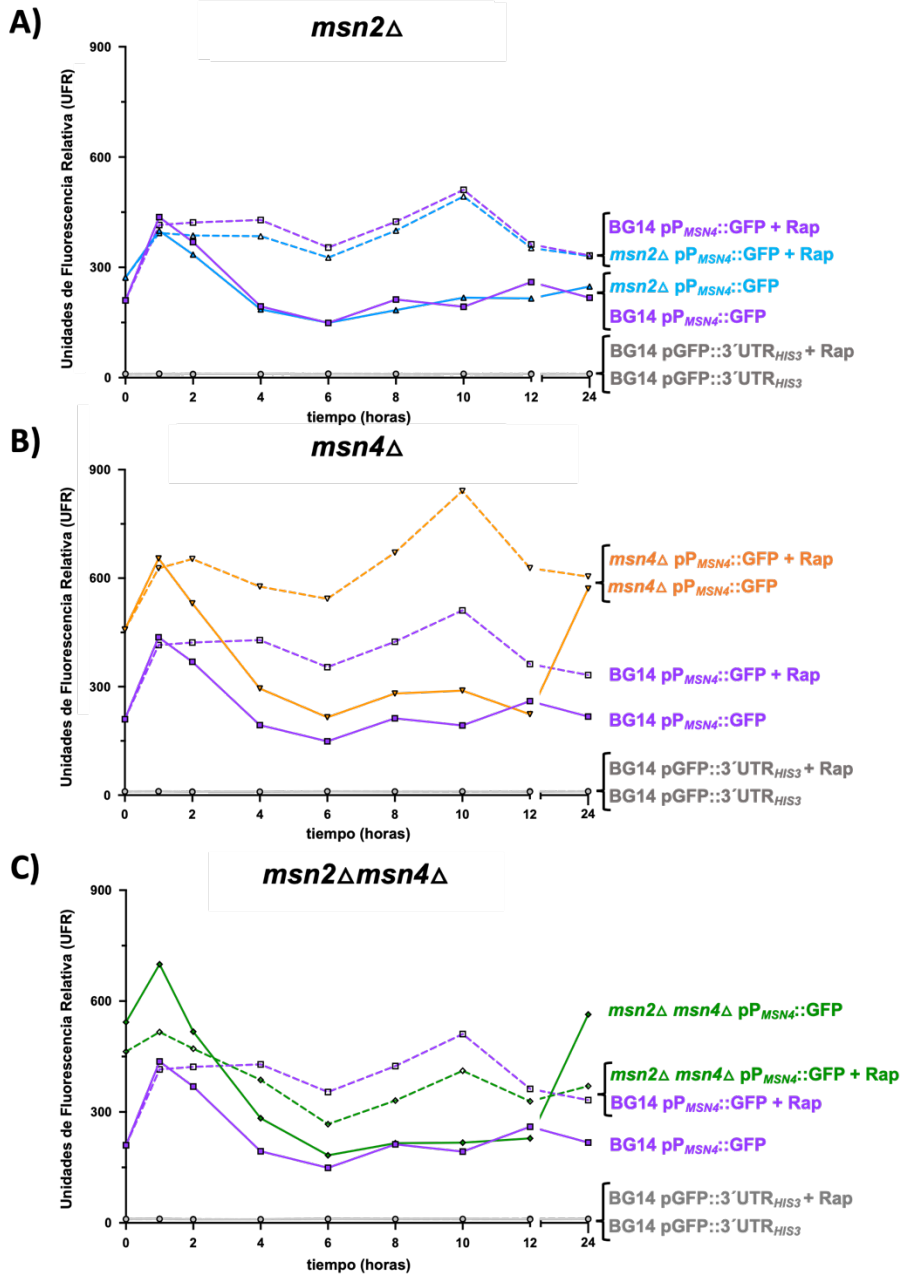


**Fig. 8. Expresión de *MSN4* en presencia de Fluconazol.**

Las cepas BG14, *msn2Δ*, *msn4Δ* y *msn2Δ msn4Δ* con los plásmidos pGFP::3'UTR<sub>HIS3</sub> y pP<sub>MSN4</sub>::GFP::3'UTR<sub>MSN4</sub> se crecieron como esta descrito en la leyenda de la Figura 3, pero en presencia de 8 μg/ml Fluconazol y sin H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Estos resultados son producto de un sólo experimento. Líneas continuas indican sin tratamiento y líneas discontinuas indican con tratamiento. **A)** Mutante *msn2Δ*. **B)** Mutante *msn4Δ*. **C)** Mutante *msn2Δ msn4Δ*.

Fig. 9

$P_{MSN4}::GFP::3'UTR_{MSN4}$   
200 ng/ml Rapamicina

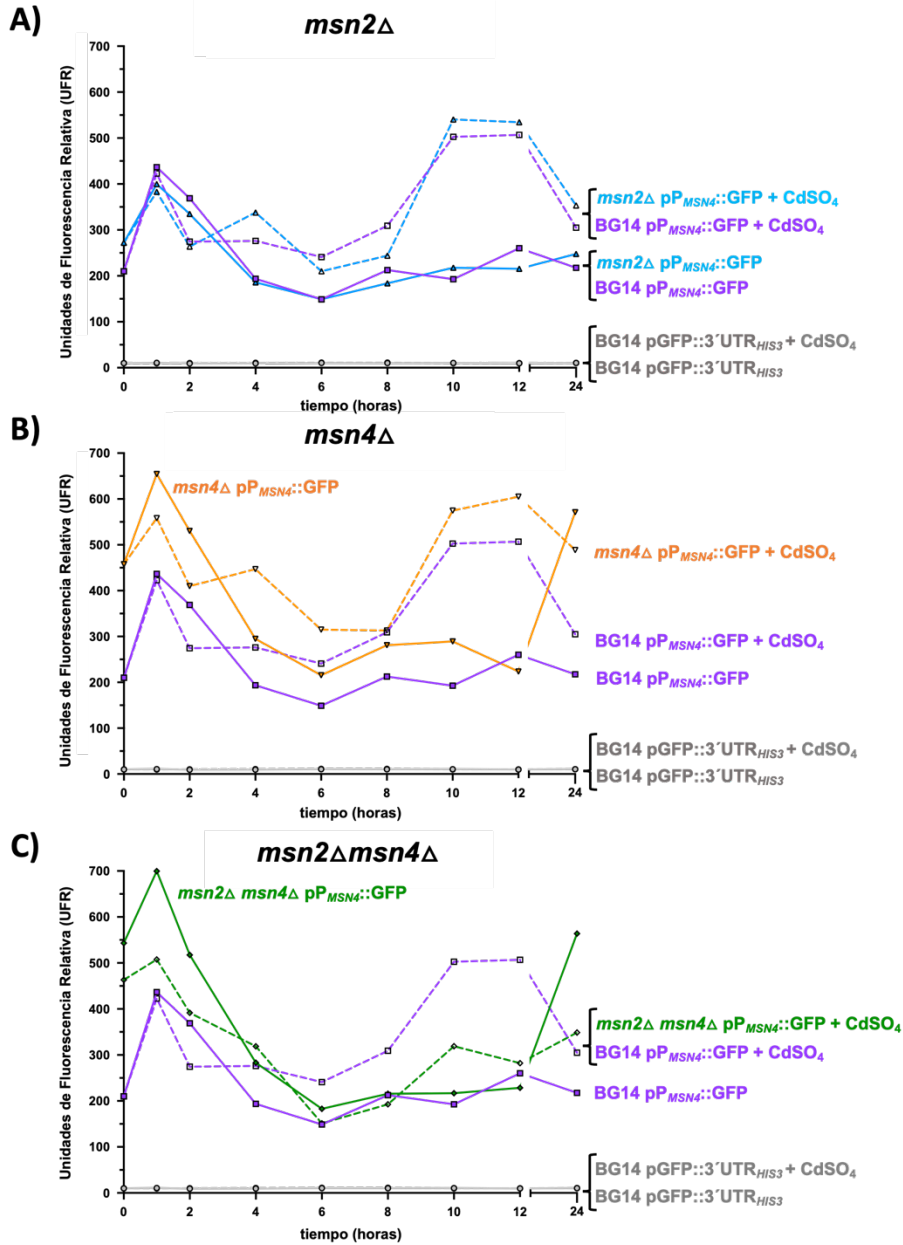


**Fig. 9. Expresión de *MSN4* en presencia de rapamicina.**

Las cepas BG14, *msn2Δ*, *msn4Δ* y *msn2Δ msn4Δ* con los plásmidos pGFP::3'UTR<sub>HIS3</sub> y pP<sub>MSN4</sub>::GFP::3'UTR<sub>MSN4</sub> se crecieron y se analizaron como esta descrito en la leyenda de la Figura 3, pero en presencia de 200 ng/ml rapamicina y sin H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Estos resultados son producto de un sólo experimento. Líneas continuas indican sin tratamiento y líneas discontinuas indican con tratamiento. **A)** Mutante *msn2Δ*. **B)** Mutante *msn4Δ*. **C)** Mutante *msn2Δ msn4Δ*.

Fig. 10

$P_{MSN4}::GFP::3'UTR_{MSN4}$   
0.5 mM CdSO<sub>4</sub>



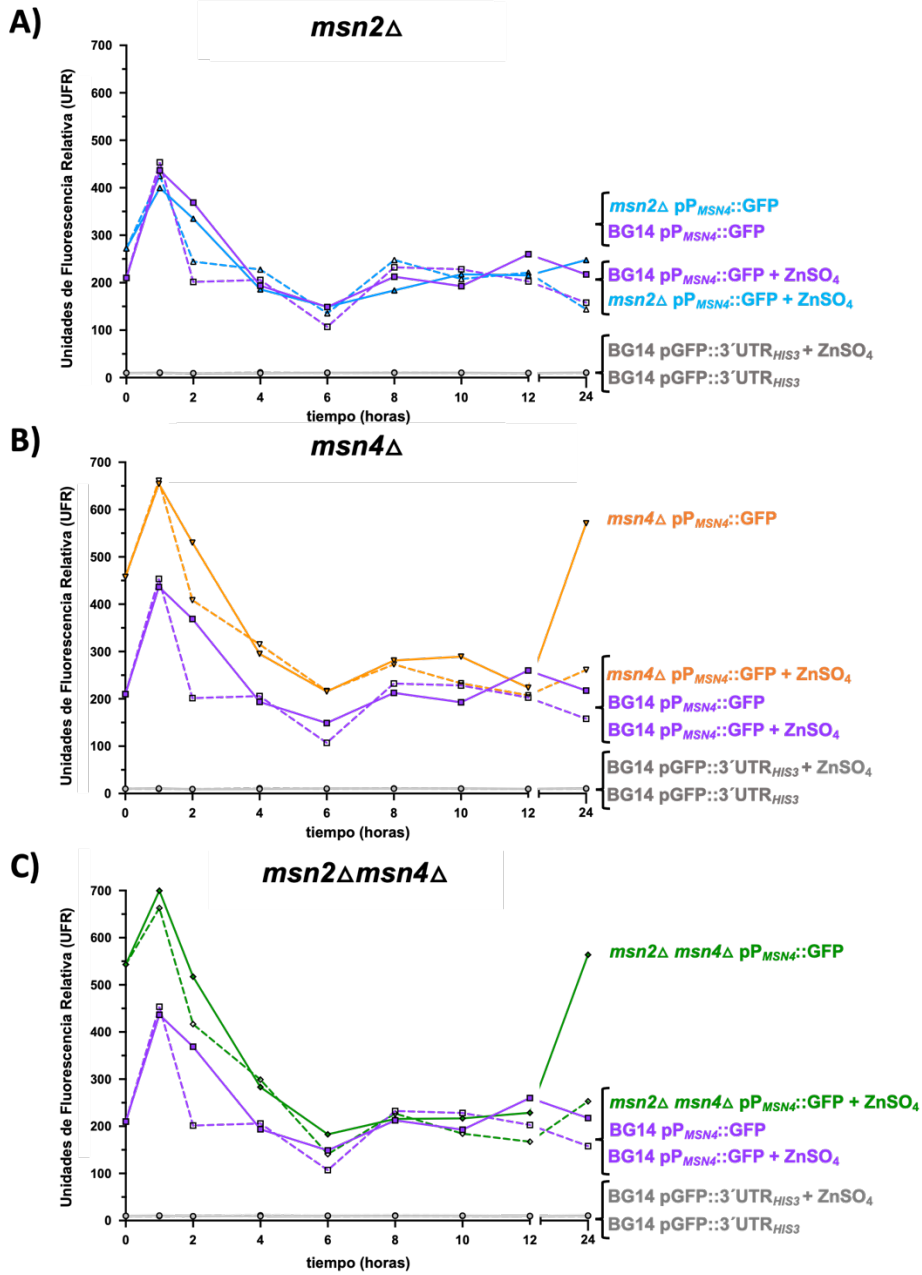


**Fig. 10. Expresión de *MSN4* en presencia de 0.5mM de  $\text{CdSO}_4$ .**

Las cepas BG14, *msn2* $\Delta$ , *msn4* $\Delta$  y *msn2* $\Delta$  *msn4* $\Delta$  con los plásmidos pGFP::3'UTR<sub>HIS3</sub> y pP<sub>MSN4</sub>::GFP::3'UTR<sub>MSN4</sub> se crecieron y se analizaron como esta descrito en la leyenda de la Figura 3, pero en presencia de 0.5 mM CdSO<sub>4</sub> y sin H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Estos resultados son producto de un sólo experimento. Líneas continuas indican sin tratamiento y líneas discontinuas indican con tratamiento. **A)** Mutante *msn2* $\Delta$ . **B)** Mutante *msn4* $\Delta$ . **C)** Mutante *msn2* $\Delta$  *msn4* $\Delta$ .

Fig. 11

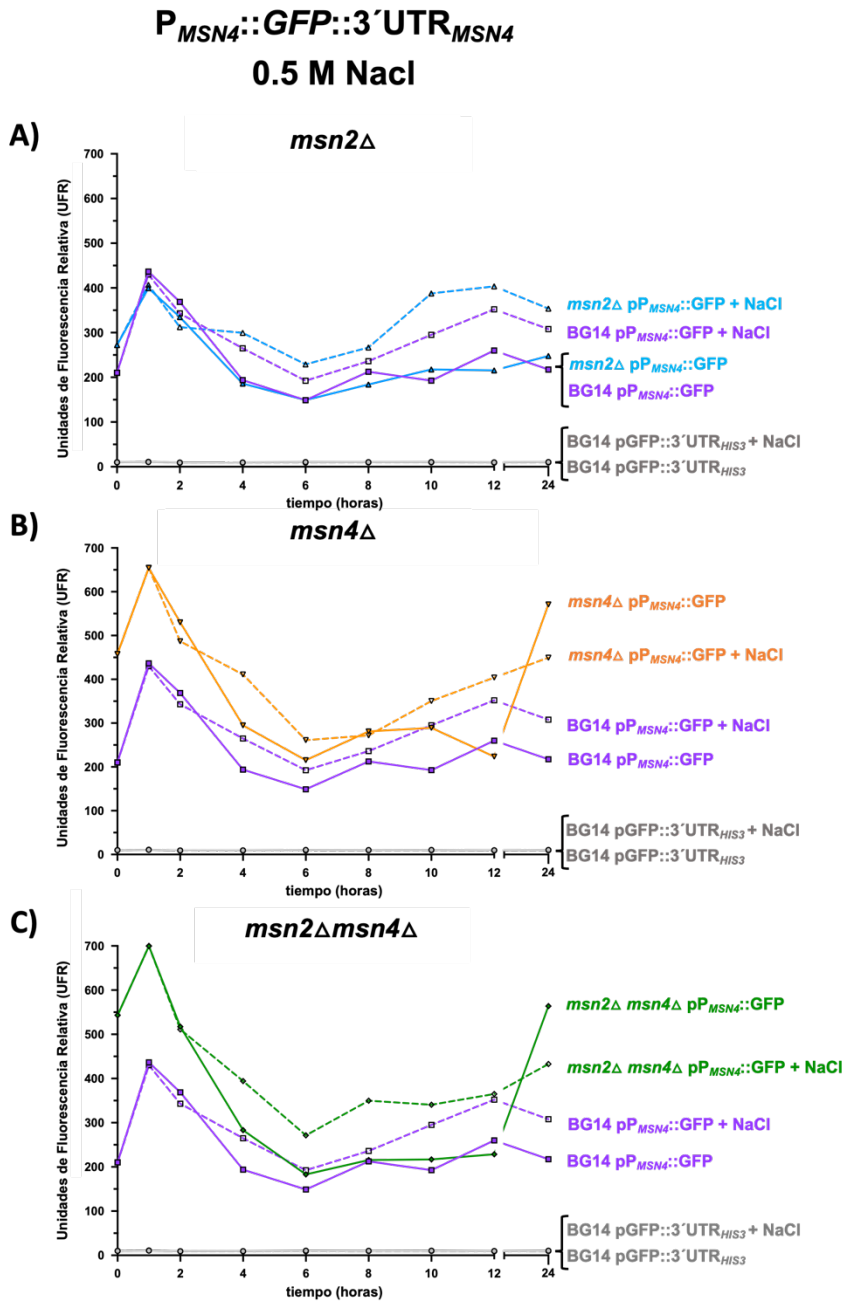
$P_{MSN4}::GFP::3'UTR_{MSN4}$   
1 mM  $ZnSO_4$



**Fig. 11. Expresión de *MSN4* en presencia de 1 mM de  $ZnSO_4$ .**

Las cepas BG14, *msn2Δ*, *msn4Δ* y *msn2Δ msn4Δ* con los plásmidos pGFP::3'UTR<sub>HIS3</sub> y pP<sub>MSN4</sub>::GFP::3'UTR<sub>MSN4</sub> se crecieron y se analizaron como esta descrito en la leyenda de la Figura 3, pero en CAA 1 mM  $ZnSO_4$  sin  $H_2O_2$ . Estos resultados son producto de un sólo experimento. Líneas continuas indican sin tratamiento y líneas discontinuas indican con tratamiento. **A)** Mutante *msn2Δ*. **B)** Mutante *msn4Δ*. **C)** Mutante *msn2Δ msn4Δ*.

Fig. 12

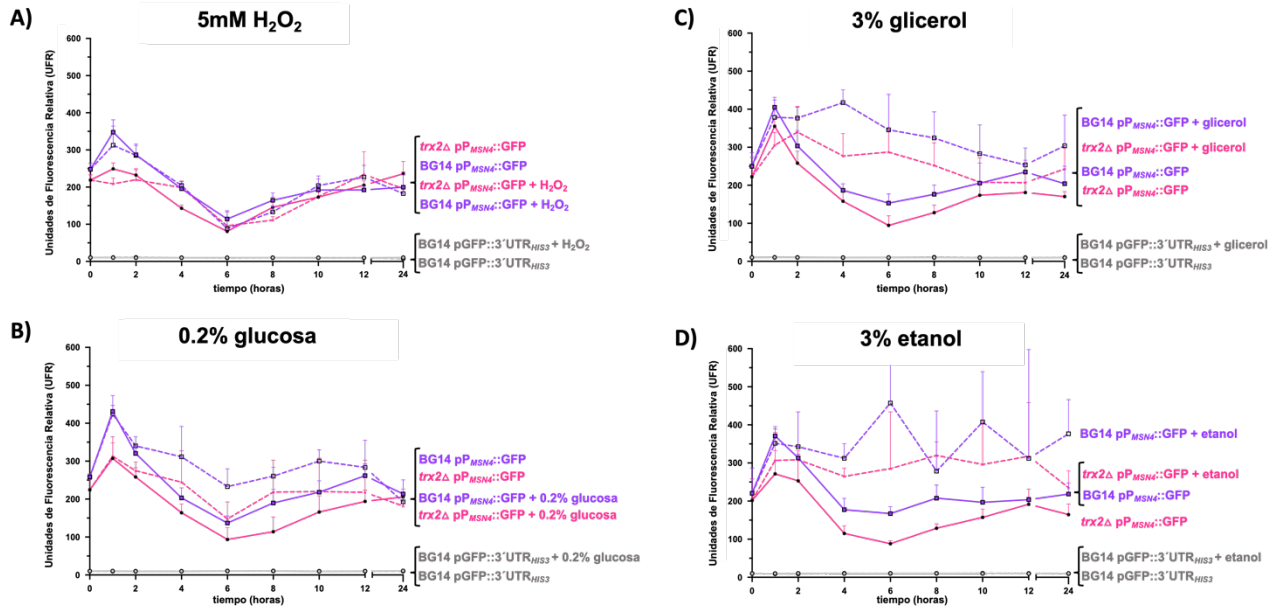


**Fig. 12. Expresión de *MSN4* en presencia de 0.5M de NaCl.**

Las cepas BG14, *msn2Δ*, *msn4Δ* y *msn2Δ msn4Δ* con los plásmidos pGFP::3'UTR<sub>HIS3</sub> y pP<sub>MSN4</sub>::GFP::3'UTR<sub>MSN4</sub> se crecieron como esta descrito en la leyenda de la Figura 3, pero en CAA 0.5 M NaCl y sin H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Estos resultados son producto de un sólo experimento. Líneas continuas indican sin tratamiento y líneas discontinuas indican con tratamiento. **A)** Mutante *msn2Δ*. **B)** Mutante *msn4Δ*. **C)** Mutante *msn2Δ msn4Δ*.

Fig. 13

*trx2Δ*  
 $P_{MSN4}::GFP::3'UTR_{MSN4}$

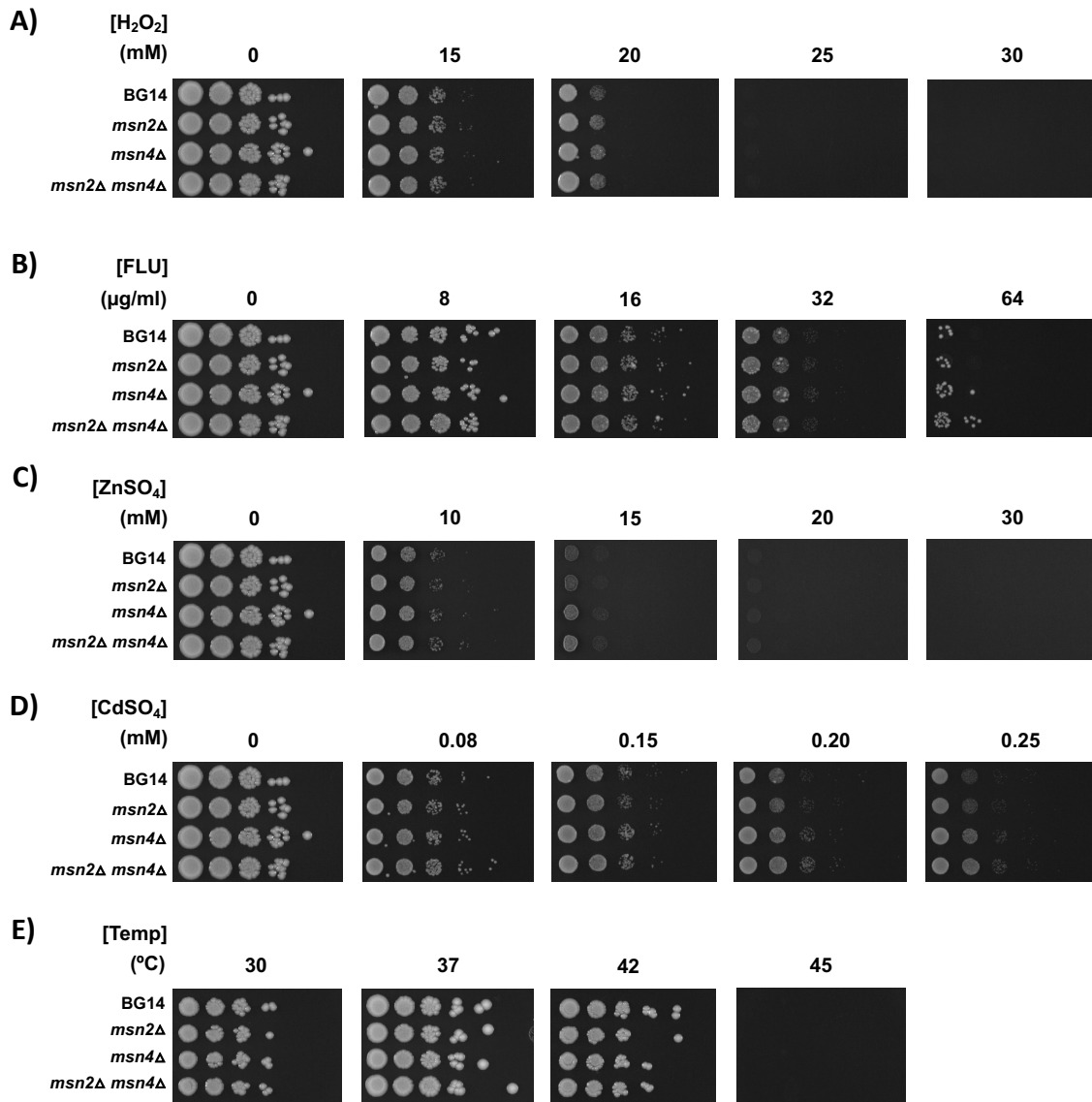


**Fig. 13. Expresión de *MSN4* en la mutante *trx2Δ*.**

Las cepas BG14 y *trx2Δ* con los plásmidos pGFP::3'UTR<sub>HIS3</sub> y pP<sub>MSN4</sub>::GFP::3'UTR<sub>MSN4</sub> se crecieron en CAA durante 48 horas a 30°C. Los cultivos se diluyeron a una OD<sub>600nm</sub> 0.2 en medio fresco en ausencia o presencia de 5mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 0.2% glucosa, 3% glicerol y 3% etanol. La actividad del promotor se midió mediante citometría de flujo en un FACScalibur<sup>BD</sup>. Se tomaron muestras a las 0, 1, 2, 4, 6, 8, 10, 12 y 24 horas. Los experimentos son promedios de triplicados biológicos. Se usó la prueba de Kolmogorov-Smirnov para evaluar la normalidad de los datos considerando un valor de  $p < 0.05$  como significativa. Las diferencias estadísticas se evaluaron por una ANOVA de dos vías y un post-test de Tukey considerando un valor de  $p < 0.05$  como significativa (ver Material y Métodos). Líneas continuas indican sin tratamiento y líneas discontinuas indican con tratamiento. **A)** 5 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> **B)** 0.2% glucosa **C)** 3% glicerol y **D)** 3% etanol.







**Fig. Sup. 2. Resistencia de las mutantes *msn2Δ*, *msn4Δ* y *msn2Δ msn4Δ* a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, fluconazol, ZnSO<sub>4</sub>, CdSO<sub>4</sub> y altas temperaturas.**

Las cepas BG14, *msn2Δ*, *msn4Δ* y *msn2Δ msn4Δ* se crecieron en medio YPD durante 48 horas a 30°C. Los cultivos se diluyeron y se ajustaron a una OD<sub>600nm</sub> a 0.5 y se hicieron diluciones seriadas en agua destilada. Las células se pusieron en cajas de YPD con diferentes concentraciones de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, fluconazol, ZnSO<sub>4</sub>, CdSO<sub>4</sub> y se incubaron a 30°C durante 48 horas. Además, las células se pusieron en cajas YPD sin ningún agente generador de estrés a diferentes temperaturas (30°C, 37°C, 42°C y 47°C).