



IPICYT

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

POSGRADO EN CIENCIAS EN BIOLOGIA MOLECULAR

**El secretoma de *Candida glabrata* induce la
expresión de *CTA1* (catalasa) y *EPA2* (adhesina)**

Tesis que presenta

Yazmín Contreras Bravo

Para obtener el grado de

Maestra en Ciencias en Biología Molecular

Director de la Tesis:

Alejandro De Las Peñas Nava Ph. D

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



Constancia de aprobación de la tesis

La tesis “El secretoma de *Candida glabrata* induce la expresión de *CTA1* (catalasa) y *EPA2* (adhesina)” presentada para obtener el Grado de Maestro(a) en Ciencias en Biología Molecular fue elaborada por **Yazmín Contreras Bravo** y aprobada el **30 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.

Dr. Alejandro De Las Peñas

Director de la tesis

Dr. Lina Raquel Riego Ruiz

Miembro del Comité Tutorial

Dr. Martha Leticia Santos Martínez

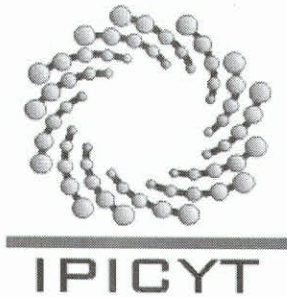
Miembro del Comité Tutorial



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.

Durante la realización del trabajo el autor recibió una beca académica del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (No. 1079999) y del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A. C.



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 235 del Libro Primero de Actas de Exámenes de Grado del Programa de Maestría en Ciencias en Biología Molecular está asentado lo siguiente:

En la ciudad de San Luis Potosí a los 12 días del mes de julio del año 2022, se reunió a las 09:00 horas en las instalaciones del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C., el Jurado integrado por:

Dra. Lina Raquel Riego Ruiz	Presidenta	IPICYT
Dra. Irene Beatriz Castaño Navarro	Secretaria	IPICYT
Dr. Alejandro De Las Peñas Nava	Sinodal	IPICYT
Dr. Carlos Ricardo González Ruiz	Sinodal	IPICYT

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

MAESTRA EN CIENCIAS EN BIOLOGÍA MOLECULAR

sustentó la C.

Yazmín Contreras Bravo

sobre la Tesis intitulada:

El secretoma de Candida glabrata induce la expresión de CTA1 (catalasa) y EPA2 (adhesina)

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 10:25 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 12 días del mes de julio de 2022.

Mtra. Ivonne Lizette Cuevas Vélez
Jefa del Departamento del Posgrado

Dra. Lina Raquel Riego Ruiz
Secretaria Académica



Dedicatorias

A mis padres

Juan Manuel y Antonia, mis metas profesionales son el reflejo de todo su esfuerzo, apoyo y amor incondicional. ¡Los amo!

A mis Hermanos

Martha y José, por su cariño, apoyo y complicidad.

Familia y Amigos

Quiero agradecer especialmente a Francisco Joel y a Laura Esperanza por ser mis compañeros durante este proceso, gracias por hacer mi vida más divertida.

Agradecimientos

Al Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica.

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

A mi director de tesis el Dr. Alejandro De Las Peñas, por recibirme en su laboratorio y por promover mi desarrollo intelectual día con día, pero, sobre todo, por incentivar mi carrera en el mundo de la ciencia.

A la Dra. Irene Castaño Navarro, por su valiosa asesoría en este trabajo de tesis.

A la Dra. Guadalupe Gutiérrez Escobedo, por enseñarme las técnicas experimentales del laboratorio.

A los miembros de mi comité tutorial, Dra. Lina Raquel Riego, Dra. Martha Leticia Santos, Dra. Irene Castaño y Dr. Ricardo González por su contribución en el manuscrito de la tesis.

A Gloria López, por brindarnos su amistad y ayudarnos con el material para nuestros experimentos.

A mis compañeros y amigos del Laboratorio 6: Ernesto, Norma, Alex, Laura, Guillermo, Ana, Grecia, Selene, Manuel y Cindy, por sus consejos y compañía dentro y fuera del laboratorio.

Contenido

Constancia de aprobación de la tesis	ii
Créditos Institucionales	iii
Acta de examen	iv
Agradecimientos	vi
Lista de Tablas	ix
Lista de Figuras	x
Resumen	xi
Abstract	xii
Introducción	1
Materiales y métodos	9
Cepas	9
Oligonucleótidos y plásmidos	9
Medios de cultivo	9
Generación de mutantes	9
Transformación de <i>C. glabrata</i>	10
Análisis de la inducción de los promotores de <i>SRX1</i> , <i>CTA1</i> y <i>EPA2</i>	10
Resultados	12
El medio condicionado induce la expresión de <i>CTA1</i>	12
<i>EPA2</i> se regula negativamente por Tpk3, Ygk3 y Rim15	12
La expresión de <i>CTA1</i> en condiciones basales y en presencia de MC está regulada por Yap1, Skn7, Msn2, Mns4 y Tpk3	13
El 1-dodeceno (C12) induce la expresión de <i>CTA1</i>	14
Yap1 y Skn7 participan en la expresión de <i>CTA1</i> en condiciones basales y en menor grado en presencia de 1-dodeceno (C12)	15
Tpk3 es un regulador negativo de la expresión de <i>CTA1</i> en condiciones basales y en presencia de 1-dodeceno (C12)	15
El 1-dodeceno (C12) inhibe la vía TOR para inducir la expresión de <i>CTA1</i>	16

Discusión	17
La Respuesta a Estrés Ambiental (REA) esta conservada entre <i>S. cerevisiae</i> y <i>C. glabrata</i>	17
El medio condicionado de <i>C. glabrata</i> induce la expresión de <i>CTA1</i>	18
Yap1 y Skn7 son importantes para la expresión de <i>CTA1</i> en presencia de MC y 1-dodeceno (C12)	20
Las vías PKA y TOR están involucradas en la expresión de <i>CTA1</i> en presencia de MC o de 1-dodeceno (C12)	21
Referencias	23
Pies de Figuras	34
Anexos	45

Lista de Tablas

1. Cepas de <i>C. glabrata</i> y <i>E. coli</i>	28
2. Oligonucleótidos utilizados en este trabajo	31
3. Plásmidos utilizados en este trabajo	33

Lista de Figuras

1. Regulación de la vía PKA en <i>S. cerevisiae</i> a través de la detección de glucosa intracelular y extracelular	34
2. Señalización de la vía TOR en <i>S. cerevisiae</i> en presencia de rapamicina	34
3. Expresión de los promotores <i>SRX1</i> , <i>EPA2</i> y <i>CTA1</i> en presencia de Medio Condicionado (MC)	34
4. La expresión de <i>EPA2</i> esta regulada por las cinasas Tpk3, Ygk3, Rim15	34
5. La expresión de <i>CTA1</i> está regulada por Yap1, Skn7, Msn2, Msn4 y Tpk3	35
6. Expresión de <i>CTA1</i> en presencia de 1-dodeceno	35
7. Regulación de la expresión de <i>CTA1</i> en presencia de 1-dodeceno	35
8. Expresión de <i>CTA1</i> en presencia de rapamicina	35
9. Resumen gráfico de resultados	36

Resumen

El secretoma de *Candida glabrata* induce la expresión de *CTA1* (catalasa) y *EPA2* (adhesina)

Todas las células están sujetas a fluctuaciones ambientales y para adaptarse y sobrevivir deben poseer mecanismos de detección y transmisión de información extracelular para inducir la transcripción de genes de **R**espuesta a **E**strés **A**mbiental (REA). Los principales estudios sobre la REA se han realizado en *S. cerevisiae* cercana filogenéticamente a *C. glabrata*, una levadura patógena oportunista, que causa candidiasis invasiva. *C. glabrata* tiene una alta resistencia al estrés oxidante principalmente en fase estacionaria. Esta alta resistencia puede deberse a que los metabolitos que secreta *C. glabrata* autoinducen la expresión de genes de **R**espuesta a **E**strés **O**xidante (REO), tal como ocurre en otros organismos. El objetivo de nuestro trabajo fue determinar si los metabolitos del secretoma en medio condicionado (MC) de *C. glabrata* inducen la REO así como determinar las posibles vías de señalización por las cuales se induce la expresión de genes REO en presencia de los metabolitos secretados. Utilizamos mutantes en los factores de transcripción Yap1, Skn7, Msn2 y Msn4 y en las cinasas Ygk3, Tpk3 y Rim15 que en *S. cerevisiae* se han relacionado con la REO. Para medir la actividad de los metabolitos y determinar las vías de transducción implicadas en esta respuesta utilizamos tres promotores de genes de la REO: *SRX1* (sulfiredoxina), *CTA1* (catalasa) y *EPA2* (adhesina) fusionados con la proteína verde fluorescente GFP. Finalmente evaluamos la expresión de cada promotor en los diferentes fondos genéticos en presencia de MC y/o en presencia de los compuestos puros del secretoma de *C. glabrata*. Determinamos que el MC induce la expresión de *CTA1*, que el 1-dodeceno (C12) es una de las moléculas señalizadoras del MC ya que induce la expresión de *CTA1* y que Tpk3 reprime la expresión de *CTA1* en presencia de C12, además el C12 induce la expresión de *CTA1* al inhibir la vía TOR. *EPA2* aumenta ligeramente su expresión en presencia de MC en las mutantes de Tpk3, Ygk3 y en particular en la mutante Rim15. *SRX1* no respondió a la presencia de MC ni al C12.

PALABRAS CLAVE: respuesta a estrés oxidante, 1-dodeceno, *CTA1*, *EPA2*, *SRX1*, *Candida glabrata*, Ygk3, Tpk3 y Rim15

Abstract

***Candida glabrata*'s secretome induces the expression of *CTA1* (catalase) and *EPA2* (adhesin)**

Living cells are exposed to environmental changes and in order to adapt and survive, they must have mechanisms for detecting and transducing extracellular information to induce the expression of the **E**nvironmental **S**tress **R**esponse (ESR) genes. ESR has been described in *S. cerevisiae*, which is closely related phylogenetically to *Candida glabrata*, an opportunistic fungal pathogen that causes invasive candidiasis. *C. glabrata* has a high resistance to oxidative stress, particularly in stationary phase conditions. This increase in resistance may be due to the presence of metabolites secreted by *C. glabrata*. These metabolites could autoinduce the expression of stress response genes, as has been described in other organisms. In this work, we determined whether the metabolites of *C. glabrata*'s secretome induce high resistance to oxidative stress and we evaluated the possible signal transduction pathways regulating the **O**xidative **S**tress **R**esponse (OSR) genes induced in the presence of the **C**onditioned **M**edium (CM). For this, we worked with mutant strains lacking the transcription factors Yap1, Skn7, Msn2 and Msn4 and the kinases Ygk3, Tpk3 and Rim15, which have been described in *S. cerevisiae*. In order to evaluate the activity of these metabolites and to determine which kinases could be implicated in the signal transduction pathways, we constructed transcriptional fusions with oxidative stress responsive promoters: *SRX1* (sulfiredoxin), *CTA1* (catalase) and *EPA2* (adhesin) with GFP. We evaluated the expression of each promoter in the different genetic backgrounds in the presence of CM and/or in the presence of pure metabolites identified in the secretome of *C. glabrata*. CM and 1-dodecene (C12), one of the signaling molecules of the CM induce the expression of *CTA1* and Tpk3 down-regulates the expression of *CTA1* in the presence of C12. Furthermore, we propose that C12 induces the expression of *CTA1* by inhibiting the TOR pathway. *EPA2* expression is increased slightly in the *tpk3Δ* and *ygk3Δ* mutants and especially in the *rim15Δ* mutant. *SRX1* expression was not affected by CM or C12.

KEY WORDS: Oxidative stress response, 1-dodecene, *CTA1*, *EPA2*, *SRX1*, *Candida glabrata*, Ygk3, Tpk3 and Rim15

Introducción

Todas las células detectan y responden a los cambios en el ambiente a través de la reprogramación de su expresión génica. En particular, cuando las levaduras se encuentran en un ambiente que genere estrés nutricional, osmótico, térmico u oxidativo, las células desencadenan una respuesta para adaptarse a la nueva condición. A este mecanismo se le conoce como **R**espuesta a **E**strés **A**mbiental (REA). La REA posee al menos dos elementos esenciales a) las cinasas que detectan y transmiten la información y b) los factores de transcripción que se activan e inducen la transcripción génica (Mace et al., 2020; Roetzer et al., 2008).

En la levadura *Saccharomyces cerevisiae* la regulación de la REA está regulada en mayor parte por las vías de señalización de Proteína Cinasa A (PKA) y por el Blanco de la Rapamicina (TOR). Esas son las principales cinasas (Tpk1/2/3 y Tor1/2) encargadas de fosforilar a los factores de transcripción que controlan los genes REA. Ambas vías consisten en la inducción o represión de genes bajo condiciones ambientales específicas (Mace et al., 2020).

En *S. cerevisiae*, PKA está compuesta por 2 subunidades reguladoras codificadas por el gen *BCY1* y 3 subunidades catalíticas codificadas por los genes *TPK1*, *TPK2* y *TPK3*. Estas 3 proteínas presentan una alta identidad en sus secuencias, Tpk1 tiene una identidad del 67.12% con Tpk2 y de 74.24% con Tpk3, mientras que Tpk2 y Tpk3 tienen una identidad del 67.3 %. La vía PKA actúa para regular la respuesta a nutrientes, el metabolismo, el ciclo celular, el crecimiento, la transcripción y la respuesta a estrés. PKA se activa en presencia de fuentes de carbono fermentables a través de dos mecanismos diferentes. La activación de PKA a través de la detección de glucosa extracelular comienza cuando el receptor Gpr1 acoplado a proteínas G, detecta la presencia de glucosa o sacarosa en el medio. Gpr1 transmite la señal a las proteínas G (complejo hetero-trimérico $G\alpha/\beta/\gamma$), donde la subunidad $G\alpha$ libera una molécula de GDP e incorpora una molécula de GTP. Una vez activa la proteína $G\alpha$ se disocia de las subunidades β y γ , para activar a la enzima adenilato ciclasa (Cyr1) e inducir la producción de Adenosín Monofosfato

Cíclico (AMPc) una pequeña molécula que se une a la subunidad reguladora de PKA e induce un cambio conformacional que permite la liberación de las subunidades catalíticas. Las subunidades catalíticas una vez liberadas pueden actuar sobre diversos factores de transcripción y regular la expresión de genes. Por otro lado, la activación de PKA a través del contenido de glucosa intracelular ocurre cuando se detecta el producto de degradación de glucosa Fructosa 1.6 bifosfato y la proteína Cdc25 activa a las proteínas Ras1/2 que actúan de forma directa sobre Cyr1 para inducir la producción de AMPc. La PKA es esencial solo en la triple mutante en las 3 subunidades catalíticas, mientras que la mutante de Gpa2 encargada de activar a la adenilato ciclasa o de alguna de las fosfodiesterasas Pde1 y Pde2 que controlan la concentración de AMPc no son esenciales, pero sí afectan la señalización de PKA (Barraza et al., 2021; Huang et al., 2019; Ma et al., 1999; Nikawa et al., 1987; Timmermans, 2021). (Figura 1).

TOR es una fosfatidinositol cinasa que pertenece a la vía de señalización por mitógenos. La vía TOR está regulada por nutrientes (aminoácidos y factores de crecimiento) y controla a su vez diversos procesos celulares tales como la transcripción, la traducción, la progresión de fase G1 a S en el ciclo celular y la autofagia. La vía TOR se puede inhibir con rapamicina. La rapamicina es un macrólido lipofílico que inhibe la proliferación celular al formar un complejo con la proteína Fkbp12. El complejo Rapamicina-Fkbp12 se une a TOR e inhibe su función. En presencia de nutrientes TOR regula positivamente la traducción, transcripción y biogénesis del ribosoma y regula negativamente procesos como la degradación de RNA y proteínas. Cuando las células detectan la presencia de nutrientes TOR induce la formación de un complejo entre la fosfatasa Sit4 y la proteína Tap42 y una vez en el complejo Tap42 inactiva la función de Sit4 que desfosforila proteínas efectoras de TOR. En las células expuestas a rapamicina el complejo Rapamicina-Fkbp12 inhibe la señalización de TOR y esto genera una alteración de muchos procesos celulares. TOR posee dos complejos Torc1 y Torc2 que tienen funciones coordinadas y opuestas a la vez. Torc1 se encarga de regular la traducción global, favorece la expresión de genes relacionados con el crecimiento y el metabolismo y reprime genes de respuesta a estrés. Por otro lado, Torc2 se encarga de la

transcripción, supervivencia celular, transporte de glucosa y la respuesta a estrés, entre otros (Cutler et al., 1999; Pelczar et al., 1998; Wilson & Roach, 2002) (Figura 2).

Candida glabrata es filogenéticamente más cercana a *S. cerevisiae* que a otras especies del género *Candida*. Se ha establecido que a pesar de algunas diferencias, la REA está muy conservada entre ambas especies (Roetzer et al., 2008).

Candida glabrata es una levadura patógena oportunista que se encuentra de forma normal como un organismo comensal en las mucosas del huésped, pero puede emerger como patógeno cuando el sistema inmunológico se debilita. *C. glabrata* en las últimas décadas se ha posicionado como la segunda especie de su género más aislada en individuos con candidiasis invasiva (Hassan et al., 2021; Toda et al., 2019).

En comparación con *C. albicans*, *C. glabrata* tiene una alta tasa de mortalidad, una mayor rapidez de propagación y a pesar de no ser una levadura dimórfica, causa una infección exitosa. La capacidad de adherencia a las células epiteliales, la formación de biopelículas, la secreción de enzimas hidrolíticas, la resistencia a antifúngicos y la adaptación a estrés ambiental son factores de virulencia que le permiten a *C. glabrata* colonizar los tejidos humanos y diseminar la infección de forma exitosa (Hassan et al., 2021).

Las células fagocíticas (macrófagos y neutrófilos) del huésped son la primera línea de defensa ante una infección por microorganismos. Estas células fagocíticas se encargan de eliminar a los patógenos al someterlos dentro del fagolisosoma a condiciones extremas como la liberación de **E**species **R**eactivas de **O**xígeno (EROs), especies **r**eactivas de nitrógeno, disminución del pH y presencia de enzimas hidrolíticas. Para sobrevivir a las condiciones hostiles del hospedero, *C. glabrata* debe tener una eficiente REA, dentro de la cual destaca la **R**espuesta a **E**strés **O**xidante (REO) que contrarresta el daño que generan las EROs (Gilbert et al., 2015; Orta Zavalza, 2014). Sin la REO, *C. glabrata* no podría sobrevivir dentro de las células fagocíticas y continuar con la infección, ya que las EROs dañan a

todas las biomoléculas (lípidos, proteínas, RNA y DNA) y producen muerte celular (Gutiérrez-Escobedo et al., 2020).

A pesar de la importancia de la REO para la supervivencia de *C. glabrata*, no se han descrito las vías de transducción de señales encargadas de activarla. Por otro lado, en *S. cerevisiae* tampoco se ha descrito una vía de transducción de señales exclusiva del estrés oxidante, sin embargo, se han registrado vínculos entre la actividad de las vías de PKA y TOR y la regulación de los genes de respuesta a estrés oxidante. Por un lado, la baja actividad de PKA induce la activación de los factores transcripcionales Msn2 y Msn4 a través de la regulación positiva de la cinasa Rim15. En presencia de nutrientes, la REO no se activa debido a la alta actividad de PKA donde las Tpk1/2/3 señalizan negativamente a Rim15 y mantienen inactivos a los factores de transcripción Msn2 y Msn4 (Figura 1). Por otro lado, la vía TOR también está implicada en la regulación de la respuesta a estrés oxidante al actuar sobre la cinasa Sch9 para regular negativamente a Rim15. Las vías TOR y PKA convergen en Rim15 para regular la REO. Además, en *S. cerevisiae* se ha identificado a la proteína de membrana Mtl1 como detector de estrés oxidante. Mtl1 transmite la señal de inhibición a TOR1 y RAS2 en presencia de EROs o restricción calórica para activar la REA y por ende a los factores de transcripción Msn2 y Msn4 que inducen la expresión de genes de la REO (De la Torre-Ruiz et al., 2011).

A pesar de que en *C. glabrata* no se conoce lo suficiente sobre las proteínas cinasas que controlan la señalización de la REO, se ha determinado que hay cuatro factores de transcripción responsables de inducir la expresión de genes de la REO:

1. Msn2 y Msn4 son factores de transcripción parálogos con dominios tipo dedos de zinc y su función esta conservada entre *C. glabrata* y *S. cerevisiae*. Ambas proteínas tienen mayor actividad durante la Fase Estacionaria (FE) para inducir la respuesta a condiciones generales de estrés. Msn2 y Msn4 contienen tres dominios importantes: 1) NES para la exportación nuclear ubicado al N-terminal que detecta las señales de estrés y regula la localización en el citoplasma de Msn2 y Msn4 gracias a un motivo denominado HD1, 2) en el C-terminal está el dominio NLS de localización nuclear y 3) el dominio DBD de unión al DNA que reconoce los

elementos STRE. En *S. cerevisiae* Msn2 y Msn4 controlan la expresión de al menos 27 genes de REO. La mutante *Scmsn2 y/o Scmsn4* ocasiona sensibilidad al H₂O₂. Por otro lado, se ha demostrado que las cepas mutantes sencillas o dobles de *CgMSN2* y *CgMSN4* no muestran sensibilidad en Fase Logarítmica (FL), pero si en FE lo que confirma que su participación es mayor durante FE (Briones-Martin-Del-Campo et al., 2014; Cuéllar-Cruz et al., 2008; Morano et al., 2012; Roetzer et al., 2008).

2. Yap1 es un factor de transcripción con cremallera de leucina tipo básico que se une a las secuencias consenso TTAATA de sus genes diana. Yap1 de *S. cerevisiae* y *C. glabrata* tienen un 37% de identidad y en *S. cerevisiae* se encarga de regular de forma positiva la expresión de genes que codifican para proteínas de respuesta a fármacos, metales pesados y agentes oxidantes. Yap1 posee dos dominios ricos en cisteína entre las regiones N-terminal y C-terminal denominados n-CRD o c-CRD que detectan al oxidante. Un análisis de interacciones reguladoras de las proteínas Yap1 han demostrado que *CgYap1* regula la expresión de genes que participan en la resistencia a diferentes fármacos, al choque térmico y al estrés oxidante, además, se autorregula, ya que controla su propia expresión y la de otros factores de transcripción al unirse a sus promotores. Ensayos de sensibilidad a H₂O₂ muestran que la mutante *Cgyap1Δ* pierde resistencia a concentraciones de 10 mM de H₂O₂ y presenta pérdida de viabilidad a partir de 100 mM de H₂O₂ en condiciones de FL. Mientras que en FE la mutante *Cgyap1Δ* tiene el mismo fenotipo que la cepa parental lo que sugiere que Yap1 se requiere solo en FL para regular la REO (Briones-Martin-Del-Campo et al., 2014; Cuéllar-Cruz et al., 2008; Merhej et al., 2016; Morano et al., 2012).

3. Skn7 es otro factor de transcripción también conservado entre *S. cerevisiae* y *C. glabrata* con un 48% de identidad. Skn7 permanece de forma constitutiva en el núcleo y contiene elementos proteicos similares a los sistemas reguladores bacterianos de dos componentes. Skn7 se ha vinculado con la respuesta a estrés osmótico porque su actividad la controla la cinasa Sln1. Además, se ha relacionado con la REO al regular la expresión de los genes que codifican para enzimas

antioxidantes como *TRX1*, *TRR1*, *TSA1* y *CTA1*. Al igual que Yap1, la actividad de Skn7 se reprime por la vía PKA al reclutar otros componentes en los promotores de genes diana. ScSkn7 interactúa con Ask10 para eliminar el efecto represor que causa la Ciclina C (CycC) en los genes REO. En *C. glabrata* la mutante *skn7Δ* es sensible a la exposición de H₂O₂ y t-BOOH. Además, CgSkn7 parece actuar de forma coordinada con CgYap1 en la expresión de algunos genes diana en presencia de 10 mM de H₂O₂ en FL, ya que las mutantes sencillas de *skn7Δ* y *yap1Δ* y la doble mutante *skn7Δ yap1Δ* presentan los mismos fenotipos, una disminución parcial de la expresión de los genes *TRX2* y *TRR1* y una disminución total de la expresión de *CTA1* y *TSA1* en presencia de estrés oxidante. De hecho, se ha demostrado que ScYap1 y ScSkn7 interactúan físicamente en ausencia de DNA. Por otro lado, en FE la mutante simple *skn7Δ* es más sensible que la cepa parental y esto indica que Skn7 está activa en ambas condiciones metabólicas (Briones-Martin-Del-Campo et al., 2014; Cuéllar-Cruz et al., 2008; Morano et al., 2012; Mulford & Fassler, 2011; Roetzer et al., 2008; Saijo et al., 2010).

En *C. glabrata* estos 4 factores de transcripción regulan la expresión de genes de la REO, entre los cuales se encuentran:

a) *CTA1* que codifica para una catalasa que descompone el H₂O₂ en agua y oxígeno para mantener el balance redox en las células. Además, Cg*CTA1* se induce bajo inanición por fuentes de carbono. Es posible que la mayor resistencia al estrés oxidante de *C. glabrata* respecto a otras levaduras se deba en gran medida a Cta1. *CTA1* contribuye a la resistencia a estrés oxidante y su expresión está regulada por Yap1 y Skn7 en FL y en FE se regula también por Msn2 y Msn4 (Briones-Martin-Del-Campo et al., 2014; Cuéllar-Cruz et al., 2008). Además, la expresión heteróloga de Cg*CTA1* en *S. cerevisiae* (cepa BY4741) a partir del promotor de Sc*CTA1* y en las mutantes Sc*ct1Δ*, Sc*cta1Δ* y Sc*ct1Δ Sccta1Δ*, confiere una mayor resistencia a H₂O₂ (datos no publicados del laboratorio).

b) *SRX1* codifica para una sulfiredoxina, que reduce el ácido sulfénico conservado en la región N-terminal de las peroxirredoxinas tipo 2-Cys Prx para reactivar su actividad antioxidante de convertir el H₂O₂ en H₂O. En *C. glabrata* se ha demostrado

que la expresión basal de *SRX1* es muy baja y puede incrementar 10 veces en presencia de 5 mM de H_2O_2 y esta inducción esta mediada por Yap1 y Skn7. Se ha propuesto que *Srx1* podría regular la expresión de *TSA2* que codifica para la principal peroxirredoxina encargada de neutralizar el H_2O_2 (Gutiérrez-Escobedo et al., 2020; Moon et al., 2013).

b) *EPA2* es un ejemplo particular ya que codifica para una proteína de pared tipo adhesina. *EPA2* se localiza en la región subtelomérica del cromosoma E - derecho y su expresión está sujeta a silenciamiento subtelomérico mediado por el complejo SIR (Sir2, Sir3 y Sir4). *EPA2* no se expresa *in vitro*, aún eliminando el silenciamiento subtelomérico. Sin embargo, *EPA2* se induce en presencia de H_2O_2 en FE y FL y esta expresión depende de Yap1 y Skn7. Además, *EPA2* se induce *in vivo* específicamente en el hígado (Juárez-Cepeda et al., 2015).

Se ha demostrado que los patógenos fúngicos presentan mayor resistencia al estrés oxidante en FE. Nuestro grupo de trabajo confirmó este hecho al observar que la cepa parental BG14 presenta una mayor resistencia a altas concentraciones de H_2O_2 en FE que en FL. Con base a este antecedente se propuso que las células en FE podrían sintetizar moléculas que señalizan e inducen la resistencia al estrés oxidante dentro de la población, ya que se ha demostrado que varios microorganismos secretan moléculas para establecer comunicación intercelular como el *quorum sensing*. *S. cerevisiae* secreta feniletanol, tirosol y triptofol para inducir filamentación en células dentro de la población, o *C. albicans* que secreta farmesol para inducir resistencia al estrés oxidante (Chen & Fink, 2006; Deveau et al., 2010). Para determinar si *C. glabrata* también tiene la capacidad de señalizar e inducir la REO, se expuso la cepa de *C. glabrata* en FL al medio usado de células en FE (MC, medio condicionado) y se observó que estas adquieren una mayor resistencia a altas concentraciones de H_2O_2 . Esto sugiere que las células en FE en *C. glabrata* secretan moléculas para establecer comunicación intercelular con células de su misma población e inducir la REO. La caracterización del secretoma de *C. glabrata* indicó que esta levadura también secreta moléculas que podrían estar involucradas en la inducción de los genes de REO. Los principales metabolitos

encontrados en la caracterización fueron: Feniletanol, ácido nonanoico y eicosano compartidas con otras especies de su género y con *S. cerevisiae*. *C. glabrata* también secreta moléculas únicas como el 1- dodeceno, 2,5 dimetil undecano, 3,7 dimetildecano y octadecano (López-Ramos et al., 2021).

El objetivo de este trabajo fue determinar si las moléculas del secretoma de *C. glabrata* inducen la REO, y evaluar cuáles son las vías de señalización que estas moléculas activan para generar dicha respuesta. Evaluamos a los factores de transcripción Yap1, Skn7, Msn2 y Msn4 y como genes reporteros usamos fusiones transcripcionales de los promotores de *SRX1*, *EPA2* y *CTA1* con la proteína verde fluorescente GFP. Para caracterizar las vías de señalización usamos a las cinasas Ygk3, Tpk3 y Rim15. Con estos experimentos determinamos que el Medio Condicionado (MC) y el 1-dodeceno(C12) presente en el secretoma de *C. glabrata* inducen la expresión de *CTA1* y que Tpk3 regula negativamente la expresión de *CTA1*. Además, encontramos que el C12 parece inducir la expresión de *CTA1* al inhibir la vía TOR. Para *EPA2* observamos que en MC se induce su expresión en ausencia de las cinasas Tpk3, Ygk3 y en especial en ausencia de Rim15. Esto indica que estas cinasas son reguladores negativos de la expresión de *EPA2*. La expresión de *SRX1* no está regulada por el MC ni por ninguna de estas cinasas.

Materiales y métodos

Cepas

Las cepas utilizadas en este trabajo están descritas en la Tabla 1.

Oligonucleótidos y plásmidos

Los oligonucleótidos y plásmidos utilizados en este trabajo están descritos en las Tablas 2 y 3 respectivamente.

Medios de cultivo

Las cepas de *C. glabrata* se crecieron en medio CAA que contiene 1.7 g/L de base nitrogenada de levadura, 6 g/L de casaminoácidos, 5 g/L de sulfato de amonio y 2% de dextrosa. Las cepas de *E. coli* se crecieron en medio LB que contiene 5g/L de extracto de levadura, 10g/L de Triptona, 5g/L de NaCl. El medio LB se suplemento con carbenicilina 100 µg/mL (Invitrogen TM 132) para seleccionar los plásmidos.

Para el Medio Condicionado (MC) de la cepa parental BG14 se utilizó medio YPD que contiene 10 g/L de extracto de levadura, 20 g/L de peptona, 10 mL/L de uracilo 100X y 2% dextrosa.

Generación de mutantes

Las mutantes nulas en los genes que codifican para cinasas se hicieron mediante el reemplazo del ORF por *URA3* de la siguiente manera: 1) Se identificaron en *C. glabrata* los genes ortólogos de *TPK2* (CAGL0G09020g), *TPK3* (CAGL0M08404g), *YGK3* (CAGL0E01683g) y *RIM15* (CAGL0K12562g) de *S. cerevisiae*. 2) Se amplificaron las regiones intergénicas del 5' y del 3' de cada gen, y estos fragmentos se fusionaron con el marcador *URA3* flanqueado por secuencias repetidas directas *FRT* mediante PCR de fusión. 3) La cepa parental BG14 se transformó con la fusión previamente purificada 5' *UTR*::*URA3*::3' *UTR* de cada gen. 4) Las cepas transformantes se seleccionaron en cajas de CAA. Para identificar las mutantes se hizo un PCR para detectar la ausencia de los genes de interés con oligonucleótidos que amplifican una región interna de cada gen. Para corroborar el correcto reemplazo de cada fusión en el *locus* se utilizó un oligo al 5' que se alinea fuera de la construcción y un oligo 3' que se alinea dentro de *URA3*, y un oligo al 5'

que se alinea en *URA3* y un oligo 3' que se alinea fuera de la construcción. Finalmente se hizo una amplificación que va del 5' al 3' con oligonucleótidos que se alinean fuera de la construcción original del PCR de fusión. Para eliminar el marcador *URA3*, se transformaron las cepas mutantes con el plásmido pLS9 que expresa Flp1, una recombinasa que reconoce las secuencias repetidas directas de *FRT* que flanquean a *URA3*. Flp1 induce la recombinación entre los sitios *FRT* para que el marcador *URA3* se escinda del cromosoma y deja una cicatriz de un solo sitio de *FRT* de 30 pb. Las colonias Ura⁻ se contraseleccionaron en cajas de 5-FOA.

Transformación de *C. glabrata*

Las cepas se transformaron por el método de acetato de litio descrito por (Castaño et al., 2003). Brevemente, se crecieron 50 mL de las cepas hasta una OD_{600nm} de 1, se recolectaron por centrifugación y se lavaron dos veces con agua. Las células se resuspendieron en 100mM de acetato de litio. La mezcla de transformación incluye: 50 µL del DNA (plásmido o producto de PCR, 3 µL de plásmido/PCR diluido en 47 µL de tris 10 mM), 50 µL de las células, 250 µL de PEG 50%, 36 µL de LiOAc 1M, 25 µL de DNA de esperma de salmón. La mezcla se incubó 45 minutos a 30°C. Se agregó DMSO y se aplicó choque térmico a 42°C por 15 minutos. Las células se centrifugaron y resuspendieron en agua estéril y se platearon en cajas de CAA. Los transformantes se purificaron dos veces y se guardaron 2 viales por cepa en 15% glicerol a -80°C.

Análisis de la inducción de los promotores de *SRX1*, *CTA1* y *EPA2*

El análisis de la actividad de los promotores de los genes *SRX1*, *CTA1* y *EPA2* se hizo mediante fusiones transcripcionales con el gen reportero *GFP* que codifica para la proteína verde fluorescente. Las células se crecieron durante 48 horas en medio CAA y se diluyeron en medio fresco CAA para obtener una OD_{600nm} de 0.5 después de 18 duplicaciones. Las células se centrifugaron y se resuspendieron en 5 mL de medio condicionado (MC). Para el MC se inoculó la cepa BG14 en YPD y se incubó por 72 horas. El cultivo se centrifugó y se esterilizó por filtración para tener un MC libre de células. Para cada cepa se evaluó la fluorescencia en el medio CAA. Para evaluar la expresión de los promotores en presencia de los metabolitos puros

identificados en el MC, las cepas se crecieron durante 48 horas en medio CAA, se ajustaron en medio CAA fresco para obtener una OD_{600nm} de 0.5 después de 18 duplicaciones. Se adicionaron los siguientes compuestos puros: Acido nonanoico (C9) 1, 10, 100 μ M, 1-Dodeceno (C12) 1, 10, 100 μ M, Eicosano (C18) 1, 10, 100 μ M, Feniletanol 20,200 y 500 μ M, Tyrosol 2, 20, 200 μ M, Triptofol 2, 20, 200 μ M. Para evaluar la expresión del promotor de *CTA1* en presencia de rapamicina, se crecieron las cepas por 48 horas en medio CAA, se ajustaron en medio CAA fresco hasta obtener una OD_{600nm} de 0.5 tras 18 duplicaciones, una vez alcanzada esta OD se adicionó rapamicina a una concentración de 200 ng / mL. Todas las muestras de los cultivos se tomaron cada hora durante 8 horas en presencia de MC y cada dos horas durante 6 horas en presencia de los compuestos puros. El efecto de la expresión de los promotores con rapamicina se midió cada 2 horas por 6 horas. Por cada muestra se tomó el valor de la media geométrica de 10,000 eventos. Como control negativo se usó la cepa BG14 con el gen *GFP* sin promotor (pGFP::3'UTR_{HIS3}). La actividad transcripcional se midió en un BD FACSCalibur™ en total se realizaron 3 réplicas biológicas. Los datos se analizaron con la prueba estadística ANOVA de dos vías (En el software Graph Pad Prisma), los valores $p < 0.1$ fueron considerados con significancia estadística.

Resultados

El medio condicionado induce la expresión de *CTA1*

Las células de *C. glabrata* de FE son más resistentes a estrés oxidante que las células de FL. Para determinar si el medio condicionado (MC) que proviene de células de FS induce la expresión de los genes de REO en células de FL, utilizamos la cepa parental BG14 transformada con los plásmidos $P_{SRX1}::GFP::3'UTR_{SRX1}$, $P_{CTA1}::GFP::3'UTR_{CTA1}$, $P_{EPA2}::GFP::3'UTR_{EPA2}$. Se analizó la inducción de cada promotor a partir de la expresión de *GFP* en presencia de MC durante 8 horas. *SRX1* mantiene una expresión baja constitutiva en presencia de MC y que aumenta ligeramente a las 6 horas (Figura 3A). La expresión del promotor de *EPA2* también fue baja tanto en condiciones basales como en presencia de MC (Figura 3B). A diferencia de los promotores de *EPA2* y *SRX1* la inducción del promotor de *CTA1* es mayor ya que duplica su inducción a las 4-5 horas de tratamiento con MC. (Figura 3C). Estos resultados indican que el MC induce claramente la expresión de *CTA1*.

EPA2 se regula negativamente por Tpk3, Ygk3 y Rim15

Los genes *EPA* codifican para proteínas de pared que median adherencia a células epiteliales. La mayoría de estos genes se encuentran en regiones subtelo méricas y su expresión está sujeta a silenciamiento subtelo mérico mediado por el complejo SIR (Sir2, Sir3 y Sir4). *EPA2* no se expresa *in vitro*, pero se induce por H_2O_2 aún en presencia de silenciamiento subtelo mérico mediante Yap1 y Skn7 (De Las Peñas et al., 2003; Juárez-Cepeda et al., 2015). A pesar de que en presencia de MC la expresión de *EPA2* es baja, evaluamos si la expresión de $P_{EPA2}::GFP::3'UTR_{Epa2}$ se altera en las mutantes *msn2Δ msn4Δ*, *yap1Δ skn7Δ*, *tpk3Δ*, *ygk3Δ* y *rim15Δ*. En condiciones basales en presencia de MC la expresión de *EPA2* es igual en las mutantes *msn2Δ msn4Δ* y *yap1Δ skn7Δ* y en la cepa parental BG14. Esto indica que los factores de transcripción Msn2, Msn4, Yap1 y Skn7 no regulan la expresión basal o la expresión en MC de *EPA2* (Figuras S5 y S6).

Dado que la expresión de *EPA2* se regula por la presencia de ROS, evaluamos si *EPA2* se regula por las cinasas Tpk3, Ygk3 y Rim15. La expresión

basal de *EPA2* en las mutantes *tpk3Δ* y *ygk3Δ* tiene un ligero aumento y en presencia de MC se observa un efecto similar (Figuras 4A y 4B). En cambio, la expresión basal de *EPA2* en la *rim15Δ* es igual a la cepa parental, sin embargo, en presencia de MC su expresión aumenta notablemente (Figura 4C). Estos datos sugieren que las cinasas Ygk3 y Tpk3 podrían actuar como reguladores negativos de la expresión de *EPA2* tanto en condiciones basales como en presencia de MC. En cambio, Rim15 es un regulador negativo de la expresión de *EPA2* sólo en presencia de MC (Figura 4C). Esto también sugiere que la inducción de la expresión de *EPA2* por MC tiene que anular la represión ejercida por Rim15 y además se aprecia un efecto sinérgico entre la ausencia de la represión por Rim15 y la presencia de MC. La inducción de la expresión de *EPA2* en ausencia de Tpk3, Ygk3 y Rim15 y en presencia de MC es independiente de los factores de transcripción Msn2, Msn4, Yap1 y Skn7.

La expresión de *CTA1* en condiciones basales y en presencia de MC está regulada por Yap1, Skn7, Msn2, Msn4 y Tpk3

Se sabe que la inducción de *CTA1* en presencia de H₂O₂ esta mediada por ambos factores de transcripción Skn7 y Yap1. Aquí nos preguntamos si la inducción que produce el MC también esta mediada por Yap1 y Skn7 y si Msn2 y Msn4 también participan en esta regulación. La expresión basal en CAA de *CTA1* está controlada por Yap1 y Skn7. Hay una sutil menor expresión de *CTA1* en *yap1Δ skn7Δ* en comparación con la BG14 (Figura 5A). En cambio, en MC hay una sutil disminución de la expresión de *CTA1* en la *yap1Δ skn7Δ* en comparación de la expresión en la cepa parental (Figura 5A). Estos datos indican que los factores de transcripción Yap1 y Skn7 se requieren para la expresión basal de *CTA1* en ausencia de estrés oxidante, es decir, que tanto Yap1 como Skn7 se encuentran dentro de núcleo activando la expresión de *CTA1*. Además, estos datos sugieren que debe de haber otros factores de transcripción activando la expresión de *CTA1* en MC en ausencia de Yap1 y Skn7. En la doble mutante *msn2Δ msn4Δ* la expresión basal de *CTA1* se mantiene baja constitutiva mientras que en la BG14 aumenta su

expresión a partir de la hora 6. En MC, la expresión de *CTA1* disminuye en la *msn2Δ msn4Δ* a partir de las 4-5 horas respecto a la cepa BG14 (Figura 5B). Estos datos indican que Msn2 y Msn4 se requieren para la expresión de *CTA1* para entrar a FE (a partir de las 6 horas) y que en presencia de MC participan para inducir la expresión de *CTA1* posiblemente debido a que el MC representa estrés nutricional. Por otro lado, en la mutante *tpk3Δ* la expresión basal de *CTA1* aumenta ligeramente en comparación con la expresión de la BG14. Sin embargo, en presencia de MC, la expresión de *CTA1* en *tpk3Δ* no se modifica con respecto a la cepa BG14 (Figura 5C). Estos resultados indican que la cinasa Tpk3 regula negativamente la expresión basal de *CTA1* pero no participa en la inducción en presencia de MC.

El 1-dodeceno (C12) induce la expresión de *CTA1*

Las células de *C. glabrata* en FE secretan 4 metabolitos: 2,5-dimetilundecano, C12, 3,7-dimetildecano y octadecano. Estos metabolitos son específicos de *C. glabrata* ya que no se encuentran en otras especies de su género o en *S. cerevisiae*. Además, hay 3 metabolitos compartidos entre *S. cerevisiae*, *C. glabrata* y *C. albicans*: feniletanol, ácido nonanoico y eicosano. Con *S. cerevisiae*, *C. glabrata* comparte de forma exclusiva 3 metabolitos dentro de los cuales se encuentra el tirosol (López-Ramos et al., 2021). Dado que *CTA1* se induce en MC y conocemos la identidad de los metabolitos del secretoma de *C. glabrata*, determinamos cuáles podían inducir la respuesta a estrés oxidante. Evaluamos la inducción de *CTA1* en presencia de ácido nonanoico, 1-dodeceno (C12), octadecano, eicosano, feniletanol, tirosol y triptofol. Las células se crecieron como en los experimentos anteriores, pero adicionamos diferentes concentraciones de estos compuestos. Solo el C12 a 100µM incrementa la expresión de *CTA1* a partir de las dos horas de tratamiento. Esta expresión es equivalente a la expresión de *CTA1* en presencia de MC a las 6 horas de tratamiento. Esto sugiere que el C12 es una de las moléculas del MC que activan una cascada de señalización para inducir la expresión de *CTA1* (Figura 6).

Yap1 y Skn7 participan en la expresión de *CTA1* en condiciones basales y en menor grado en presencia de 1-dodeceno (C12)

Para determinar si la inducción de *CTA1* por C12 esta mediada por Yap1, Skn7, Msn2 y Msn4, evaluamos la actividad de pP_{*CTA1*}::GFP::3'UTR_{*CTA1*} en las dobles mutantes *msn2Δ msn4Δ*, y *yap1Δ skn7Δ*. En la mutante *msn2Δ msn4Δ* la expresión de *CTA1* en ausencia o presencia de C12 no tiene diferencias significativas respecto a la cepa parental durante 4 horas de tratamiento, sin embargo, hay una ligera disminución de la expresión de *CTA1* en la doble mutante *msn2Δ msn4Δ* a las 6 horas de tratamiento (Figura 7A). Estos resultados sugieren que los factores de transcripción Msn2 y Msn4 no están involucrados en la inducción de la expresión de *CTA1* en presencia de C12 y que la disminución de la expresión a las 6 horas de tratamiento puede deberse a que ambos factores de transcripción se requieren durante la FE para controlar la falta de nutrientes en esta fase de crecimiento. En la cepa *yap1Δ skn7Δ* hay una reducción en la expresión de *CTA1* tanto en ausencia como en presencia de C12. Sin embargo, aún en ausencia de Yap1 y Skn7, el C12 puede inducir la expresión de *CTA1* (Figura 7B). En suma, estos resultados indican que 1) Msns2 y Msn4 no se requieren para inducir la expresión de *CTA1* en presencia de C12, 2) Yap1 y Skn7 se requieren para la expresión basal constitutiva, así como en presencia de C12 y 3) dado que el C12 induce la expresión de *CTA1* en ausencia tanto de Yap1 y Skn7 debe de haber factores de transcripción adicionales responsables de inducir a *CTA1*.

Tpk3 es un regulador negativo de la expresión de *CTA1* en condiciones basales y en presencia de 1-dodeceno (C12)

Se sabe que la vía de PKA tiene como objetivo reprimir a la mayoría de los genes de REO ya que actúa sobre varios de los factores de transcripción que regulan la REO. Dado que observamos que, en condiciones basales, Tpk3 reprime a *CTA1*, pero no lo hace en presencia de MC, decidimos evaluar la expresión de *CTA1* en la *tpk3Δ* en presencia de C12. En ausencia o presencia de C12, observamos que la expresión basal de *CTA1* en *tpk3Δ* es mayor que en la cepa parental (Figura 7C). Estos resultados indican que la subunidad catalítica Tpk3 de PKA reprime la expresión de *CTA1* en condiciones basales y en presencia de C12.

El 1-dodeceno (C12) inhibe la vía TOR para inducir la expresión de *CTA1*

Debido a que uno de los objetivos de las vías TOR y PKA es inhibir la expresión de genes de respuesta a estrés, determinamos si, al igual que la vía PKA, la vía TOR inhibe la expresión de *CTA1* en presencia de C12. Para estos experimentos las cepas se trataron con rapamicina y se midió la expresión de *CTA1*. La expresión de *CTA1* se induce igual con rapamicina o con C12. Al adicionar rapamicina y C12 juntos la expresión de *CTA1* permanece igual que con la adición de cualquiera de los tratamientos (Figura 8). Esto sugiere que el C12 podría actuar sobre la vía TOR para inducir la expresión de *CTA1*, tal como lo hace la rapamicina.

Discusión

La Respuesta a Estrés Ambiental (REA) esta conservada entre *S. cerevisiae* y *C. glabrata*

S. cerevisiae ha sido el principal modelo de estudio de la REA, debido a que en esta levadura se han descrito las cinasas y factores de transcripción involucrados en la inducción de la REA. A pesar del amplio conocimiento que se tiene en *S. cerevisiae* sobre la REA, no se han logrado definir cinasas o vías de señalización exclusivas de la respuesta a choque térmico o de la REO (Mace et al., 2020).

C. glabrata es una levadura patógena oportunista, con una relación filogenética más cercana a *S. cerevisiae* que a otras especies del propio género *Candida* y se ha demostrado que la REA está conservada entre estas dos especies. La conservación de los mecanismos de respuesta entre *S. cerevisiae* y *C. glabrata* permite basar los estudios de *C. glabrata* en los mecanismos conocidos en *S. cerevisiae* (Roetzer et al., 2011). La descripción de los mecanismos de la REA en *C. glabrata* es muy importante para determinar cómo es que esta levadura sobrevive dentro de las células fagocíticas del huésped. Estudios de *C. glabrata* han demostrado que esta levadura tiene diferentes estrategias para sobrevivir a las condiciones hostiles del huésped como la escasez de nutrientes y el estrés oxidante, entre otros. En presencia de EROs *C. glabrata* activa mecanismos enzimáticos (catalasa y superóxido dismutasas, entre otros) y no enzimáticos (glutación) para contrarrestar a las EROs (Gutiérrez-Escobedo et al., 2020).

A pesar de la cercanía filogenética con *S. cerevisiae*, *C. glabrata* presenta mayor resistencia al estrés oxidante y esta resistencia al estrés oxidante es mucho más alta en condiciones de fase estacionaria (Cuéllar-Cruz et al., 2008). Esto es consistente con los estudios que indican que microorganismos patógenos son más resistentes a estrés oxidante durante la fase estacionaria. Por un lado las células que entran en fase estacionaria reprimen la expresión de genes que codifican para proteínas ribosomales y de crecimiento en presencia de nutrientes e inducen la expresión de genes REA para sobrevivir a la limitación de nutrientes o daño oxidativo que se genera en esta fase de crecimiento (Gray et al., 2004). ¿Cómo se

inducen los genes de REA bajo estas condiciones? Se ha observado que muchas células tanto unicelulares como multicelulares secretan moléculas para establecer comunicación intercelular con células de su propia población con la finalidad de responder a una condición ambiental específica. Por ejemplo, cuando *S. cerevisiae* detecta escasez de nitrógeno secreta alcoholes aromáticos como feniletanol y triptofol que en conjunto autoinducen la formación de pseudohifas en células diploides y mejoran el crecimiento invasivo en células haploides a través de la vía PKA donde Tpk2 induce la expresión de *FLO11* que codifica para una proteína de pared celular esencial para el crecimiento filamentoso (Chen & Fink, 2006).

Por otro lado, la levadura patógena *C. albicans* secreta farnesol y tirosol durante la fase estacionaria. El farnesol autoinduce la REO y el cambio morfológico de micelio a levadura, mientras que el tirosol autoinduce la formación de tubos germinales y promueve el crecimiento exponencial (Cho et al., 2008; Deveau et al., 2010; Hornby et al., 2001).

El medio condicionado de *C. glabrata* induce la expresión de *CTA1*

La alta resistencia a estrés oxidante de *C. glabrata* en fase estacionaria se induce por la presencia de algún compuesto secretado que autoinduce la REO (datos no mostrados). El secretoma de *C. glabrata* se caracterizó con la finalidad de identificar moléculas señalizadoras responsables de autoinducir la REO (López-Ramos et al., 2021).

El MC de *C. glabrata* no tiene efecto en la inducción de *SRX1* o *EPA2*, sin embargo, se observó un aumento en la expresión de *CTA1* que codifica para la catalasa (Figura 3C). En *C. albicans* se ha observado que la exposición al MC que contiene farnesol induce la expresión de *CTA1* para inducir una mayor resistencia al estrés oxidante (Deveau et al., 2010). También en *S. cerevisiae* se identificó la inducción de *CTT1* (que codifica para una catalasa citosólica) en presencia de alcoholes aromáticos identificados en el MC (Chen & Fink, 2006).

El 1-dodeceno (C12) es la molécula responsable de la expresión de *CTA1* en el MC

MC de *C. glabrata* también tiene alcoholes aromáticos como el feniletanol, triptofol, tirosol y otros compuestos específicos como el ácido nonanoico (C9), 1-dodeceno (C12), octadecano (C18), eicosano (C20). A diferencia de lo reportado en *S. cerevisiae* y *C. albicans* los alcoholes aromáticos no tuvieron efecto en la expresión de *CTA1* (Figura S7). es posible que las concentraciones probadas de estos compuestos no fueran suficientes para inducir la expresión de *CTA1* o bien que se requiera la combinación de varias moléculas para ejercer un efecto sinérgico sobre la expresión de *CTA1*, como se ha reportado en otras levaduras.

El C12 fue el único compuesto que tuvo un efecto en la inducción de la expresión de *CTA1* (Figura 6). El C12 es un alqueno de una cadena simple de 12 carbonos y es uno de los metabolitos específicos del secretoma de *C. glabrata*. Estudios previos han reportado que el 1-dodeceno funciona como molécula señalizadora que expulsan algunas plantas para atraer o repeler insectos. También se ha observado que algunos insectos detectan este compuesto secretado de otros insectos, el insecto *Hypantria Cunea* provoca plagas en muchas plantas y secreta 1-dodeceno que es detectado por *Chouioia cunea Yang* y responde a su presencia a través de una reprogramación de su transcripción génica para controlar la plaga (Liu et al., 1989; Pan et al., 2019; Zhu et al., 2017). Nosotros presentamos el primer estudio donde el 1-dodeceno parece actuar como molécula señalizadora de la REO en levaduras.

Mns2 y Msn4 son importantes para la inducción de *CTA1* en presencia de MC pero no en presencia de 1-dodeceno (C12)

A pesar de que los factores de transcripción Msn2 y Msn4 parecen ser importantes para inducir la expresión de *CTA1* en presencia del MC (Figura 5B), la mutante *msn2Δ msn4Δ* no alteró la expresión de *CTA1* en presencia de C12 (Fig 7A). Es posible que Msn2 y Msn4 se requieran en presencia de medio condicionado y se activen al detectar la falta de nutrientes en el medio (Morano et al., 2012; Roetzer

et al., 2008). El tratamiento con 1-dodeceno fue con células en FL el cual aún contiene fuente de carbono disponible y que mantiene reprimidos a Msn2 y Msn4. Es interesante mencionar que en medio condicionado la expresión de *CTA1* no se modificó en la mutante Rim15 que actúa arriba de los factores de transcripción Msn2 y Msn4 (Figura S8).

Yap1 y Skn7 son importantes para la expresión de *CTA1* en presencia de MC y 1-dodeceno (C12)

Yap1 y Skn7 se requieren tanto para la expresión basal de *CTA1* como para la inducción en presencia de H₂O₂ (Cuéllar-Cruz et al., 2008). En presencia de MC, la expresión de *CTA1* en ausencia de Yap1 y Skn7 se redujo. Yap1 y Skn7 se requirieron parcialmente pero no son esenciales para la expresión de *CTA1* en presencia de MC (Figura 5B). Esto indica que debe haber otros factores de transcripción que inducen la expresión de *CTA1* en MC. Un candidato es el factor de transcripción Tog1 que responde al estrés oxidante sin embargo no parece actuar sobre *CTA1* en presencia de H₂O₂ (Pais et al., 2020). En presencia de C12 se observó una disminución de la expresión de *CTA1* en la doble mutante *yap1Δ skn7Δ*. Sin embargo, en condiciones basales también se observa un nivel de expresión de *CTA1* más bajo (Figura 7B). Estos resultados abren dos posibilidades, primero, el C12 induce la expresión de *CTA1* y segundo que Yap1 y/o Skn7 en ausencia de oxidante se encuentren unidos al promotor de *CTA1* y su ausencia provoca esta disminución en su expresión. En *S. cerevisiae*, Yap1 ingresa al núcleo sólo bajo condiciones de estrés, sin embargo, Skn7 permanece de forma constitutiva en el núcleo. Esto podría indicar que Skn7 se une al promotor de *CTA1* y regula su expresión constitutiva (Morano et al., 2012). Sin embargo por datos del laboratorio, sabemos que en *C. glabrata* la ausencia de ambos factores de transcripción, Skn7 y Yap1, reduce notablemente la expresión basal de *CTA1*. Esto indica que en ausencia de estrés oxidante, ambos factores de transcripción se encuentran en el núcleo y unidos al promotor de *CTA1*.

Las vías PKA y TOR están involucradas en la expresión de *CTA1* en presencia de MC o de 1-dodeceno (C12)

En *S. cerevisiae* en condiciones óptimas de crecimiento, la PKA es un regulador negativo de la expresión de genes de respuesta a estrés como *CTA1* (Conrad et al., 2014). El análisis de la mutante *tpk3Δ* que codifica para una de las subunidades de la PKA es consistente con lo descrito en *S. cerevisiae*; la expresión de *CTA1* es mayor en la mutante en comparación con la cepa parental (Figura 5C). En presencia de MC, la expresión de *CTA1* en la *tpk3Δ* no tiene diferencias respecto a la cepa parental (Figura 5C). Esto sugiere que en ausencia de nutrientes las subunidades catalíticas de PKA permanecen inactivas ya que no se sintetiza cAMP (Huang et al., 2019). En cambio en presencia de C12 en la *tpk3Δ* se observa que la expresión de *CTA1* aumenta (Fig 7C). Esto sugiere que al detectar el C12, la vía de PKA se encarga de reprimir la expresión *CTA1*.

Al tratar a la cepa parental con rapamicina, con C12 o con ambos compuestos combinados, observamos que la expresión de *CTA1* aumenta de la misma manera en las tres condiciones (Figura 8). Esto sugiere que el C12 podría reprimir la vía TOR para permitir que se active *CTA1*. Es posible que el C12 forme un complejo con la proteína Fkbp12 como lo hace la rapamicina para reprimir la señalización de la vía TOR.

Otro hallazgo interesante que observamos fue la regulación negativa que ejercen las cinasas Tpk3, Ygk3 y Rim15 sobre la expresión de *EPA2*. *EPA2* es un gen que codifica para una adhesina y su expresión está sujeta a silenciamiento subtelomérico. Al eliminar la represión mediada por la estructura de la cromatina que ejerce el complejo Sir, la expresión de *EPA2* se mantiene muy baja (Juárez-Cepeda et al., 2015). *EPA2* se induce en presencia de H₂O₂ y esta inducción está mediada por Yap1 y Skn7 aún en presencia de silenciamiento subtelomérico (Juárez-Cepeda et al., 2015). Además, *EPA2* se induce *in vivo* en el hígado en un modelo murino de infección sistémica. Esto indica que la expresión de *EPA2* además de estar sujeta al silenciamiento subtelomérico puede tener reguladores negativos adicionales (De Las Peñas et al., 2003; Juárez-Cepeda et al., 2015). En

condiciones basales *EPA2* incrementa ligeramente su expresión en *tpk3Δ* y *ygk3Δ*. Ygk3 codifica para una cinasa que en *S. cerevisiae* está implicada en la fosforilación de Gpa2 proteína crítica en la activación de la producción cAMP (Huang et al., 2019), mientras que Tpk3 actúa debajo de la misma vía de señalización al ser uno de los componentes catalíticos de PKA. Nuestros datos sugieren que la vía de PKA pudiera estar involucrada en la represión de *EPA2* en condiciones óptimas de crecimiento para inhibir su inducción por estrés oxidante. En la mutante Rim15 no se observó una alteración en la expresión basal de *EPA2*, sin embargo, en presencia de medio condicionado sí se encontró un aumento en la expresión de *EPA2* en la mutante *rim15Δ*. Rim15 es una cinasa que está regulada negativamente por las vías PKA y TOR. En condiciones de inanición por glucosa Rim15 de *S. cerevisiae* se activa para inducir la expresión de Msn2 y Msn4 que regulan la expresión de genes de respuesta a estrés general (Angeles de la Torre-Ruiz et al., 2011). Nuestros resultados indican que Rim15 podría tener un papel opuesto ya que actúa como regulador negativo de la expresión de *EPA2*.

Los Resultados obtenidos en este trabajo se ilustran en un resumen gráfico (Figura 9).

Preguntas abiertas

Dilucidar el mecanismo de acción del C12 para inducir la REO, ya que es central para entender la señalización en una población de células de *C. glabrata*.

Caracterizar el papel que tienen estas vías de señalización (PKA y TOR) sobre la expresión de los genes REO en presencia de agentes oxidantes.

La vía PKA es particularmente interesante ya que en *S. cerevisiae* las proteínas Tpk1, Tpk2 y Tpk3 están involucradas en la formación de cuerpos de procesamiento al poseer dominios similares a los priones. Estos mismos dominios se encuentra en CgTpk3 y CgTpk2.

Determinar la importancia de estas moléculas señalizadoras durante la infección en el huésped.

Referencias

- Angeles de la Torre-Ruiz, M., Mozo-Villarias, A., Pujol, N., & I. Petkova, M. (2011). How Budding Yeast Sense and Transduce the Oxidative Stress Signal and the Impact in Cell Growth and Morphogenesis. *Current Protein & Peptide Science*, 11(8), 669–679. <https://doi.org/10.2174/138920310794557628>
- Barraza, C. E., Solari, C. A., Rinaldi, J., Ojeda, L., Rossi, S., Ashe, M. P., & Portela, P. (2021). A prion-like domain of Tpk2 catalytic subunit of protein kinase A modulates P-body formation in response to stress in budding yeast. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research*, 1868(1), 118884. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2020.118884>
- Briones-Martin-Del-Campo, M., Orta-Zavalza, E., Juarez-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*. *Revista Iberoamericana de Micología*, 31(1), 67–71. <https://doi.org/10.1016/j.riam.2013.09.012>
- Castaño, I., Kaur, R., Pan, S., Cregg, R., De Las Peñas, 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. <https://doi.org/10.1101/gr.848203>
- Chen, H., & Fink, G. R. (2006). Feedback control of morphogenesis in fungi by aromatic alcohols. *Genes and Development*, 20(9), 1150–1161. <https://doi.org/10.1101/gad.1411806>
- Cho, T., Aoyama, T., Toyoda, M., Nakayama, H., Chibana, H., Kaminishi, H., & Calderone, R. A. (2008). Farnesol as a quorum-sensing molecule in *Candida albicans*. *Japanese Journal of Medical Mycology*, 49(4), 281–286. <https://doi.org/10.3314/jjmm.49.281>
- Conrad, M., Schothorst, J., Kankipati, H. N., Zeebroeck, G. Van, Rubio-texeira, M., & Thevelein, J. M. (2014). *Nutrient sensing and signaling in the yeast*

Saccharomyces cerevisiae. 38, 254–299. <https://doi.org/10.1111/1574-6976.12065>

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. <https://doi.org/10.1128/EC.00011-08>

Cutler, N. S., Heitman, J., & Cardenas, M. E. (1999). TOR kinase homologs function in a signal transduction pathway that is conserved from yeast to mammals. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 155(1–2), 135–142. [https://doi.org/10.1016/S0303-7207\(99\)00121-5](https://doi.org/10.1016/S0303-7207(99)00121-5)

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 and Development*, 17(18), 2245–2258. <https://doi.org/10.1101/gad.1121003>

Deveau, A., Piispanen, A. E., Jackson, A. A., & Hogan, D. A. (2010). Farnesol induces hydrogen peroxide resistance in *Candida albicans* yeast by inhibiting the Ras-cyclic AMP signaling pathway. *Eukaryotic Cell*, 9(4), 569–577. <https://doi.org/10.1128/EC.00321-09>

Gilbert, A. S., Wheeler, R. T., & May, R. C. (2015). Fungal pathogens: Survival and replication within macrophages. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 5(7), 1–13. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a019661>

Gray, J. V., Petsko, G. A., Johnston, G. C., Ringe, D., Singer, R. A., Gray, J. V., Petsko, G. A., Johnston, G. C., Ringe, D., Singer, R. A., & Werner-washburne, M. (2004). ' ' *Sleeping Beauty* ' ': *Quiescence in Saccharomyces cerevisiae* " *Sleeping Beauty* "': *Quiescence in Saccharomyces cerevisiae* †. <https://doi.org/10.1128/MMBR.68.2.187>

- 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*, 135(October 2019), 103287. <https://doi.org/10.1016/j.fgb.2019.103287>
- Hassan, Y., Chew, S. Y., & Than, L. T. L. (2021). *Candida glabrata*: Pathogenicity and resistance mechanisms for adaptation and survival. *Journal of Fungi*, 7(8). <https://doi.org/10.3390/jof7080667>
- Hornby, J. M., Jensen, E. C., Lisec, A. D., Tasto, J. J., Jahnke, B., Shoemaker, R., Dussault, P., & Nickerson, K. W. (2001). *Candida albicans* Is Mediated by Farnesol. *Applied and Environmental Microbiology*, 67(7), 2982–2992. <https://doi.org/10.1128/AEM.67.7.2982>
- Huang, S., Benben, A., Green, R., Cheranda, N., Lee, G., Joseph, B., Keaveney, S., & Wang, Y. (2019). Phosphorylation of the Gα protein Gpa2 promotes protein kinase A signaling in yeast. *Journal of Biological Chemistry*, 294(49), 18836–18845. <https://doi.org/10.1074/jbc.RA119.009609>
- Juárez-Cepeda, J., Orta-Zavalza, E., Cañas-Villamar, I., Arreola-Gómez, J., Pérez-Cornejo, G. P., Hernández-Carballo, C. Y., Gutiérrez-Escobedo, G., Castaño, I., & De Las Peñas, A. (2015). The EPA2 adhesin encoding gene is responsive to oxidative stress in the opportunistic fungal pathogen *Candida glabrata*. *Current Genetics*, 61(4), 529–544. <https://doi.org/10.1007/s00294-015-0473-2>
- López-Ramos, J. E., Bautista, E., Gutiérrez-Escobedo, G., Mancilla-Montelongo, G., Castaño, I., González-Chávez, M. M., & De Las Peñas, A. (2021). Analysis of volatile molecules present in the secretome of the fungal pathogen *Candida Glabrata*. *Molecules*, 26(13), 1–11. <https://doi.org/10.3390/molecules26133881>
- Ma, P., Wera, S., Van Dijck, P., & Thevelein, J. M. (1999). The PDE1-encoded low-

- affinity phosphodiesterase in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* has a specific function in controlling agonist- induced cAMP signaling. *Molecular Biology of the Cell*, 10(1), 91–104. <https://doi.org/10.1091/mbc.10.1.91>
- Mace, K., Krakowiak, J., El-Samad, H., & Pincus, D. (2020). Multi-kinase control of environmental stress responsive transcription. *PLoS ONE*, 15(3), 1–21. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0230246>
- Merhej, J., Thiebaut, A., Blugeon, C., Pouch, J., Ali Chaouche, M. E. A., Camadro, J. M., Le Crom, S., Lelandais, G., & Devaux, F. (2016). A network of paralogous stress response transcription factors in the human pathogen *Candida glabrata*. *Frontiers in Microbiology*, 7(MAY), 1–16. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00645>
- Moon, J. C., Kim, G. M., Kim, E. K., Lee, H. N., Ha, B., Lee, S. Y., & Jang, H. H. (2013). Reversal of 2-Cys peroxiredoxin oligomerization by sulfiredoxin. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 432(2), 291–295. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2013.01.114>
- Morano, K. A., Grant, C. M., & Moye-Rowley, W. S. (2012). The response to heat shock and oxidative stress in *saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*, 190(4), 1157–1195. <https://doi.org/10.1534/genetics.111.128033>
- Mulford, K. E., & Fassler, J. S. (2011). Association of the Skn7 and Yap1 transcription factors in the *saccharomyces cerevisiae* oxidative stress response. *Eukaryotic Cell*, 10(6), 761–769. <https://doi.org/10.1128/EC.00328-10>
- Nikawa, J., Sass, P., & Wigler, M. (1987). Cloning and characterization of the low-affinity cyclic AMP phosphodiesterase gene of *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular and Cellular Biology*, 7(10), 3629–3636. <https://doi.org/10.1128/mcb.7.10.3629-3636.1987>
- Orta Zavalza, E. (2014). *El silenciamiento local controla la respuesta al estrés oxidante y la resistencia multifarmacológica de Candida glabrata Tesis que presenta.* 1–126.

- Pais, P., Vagueiro, S., Mil-Homens, D., Pimenta, A. I., Viana, R., Okamoto, M., Chibana, H., Fialho, A. M., & Teixeira, M. C. (2020). A new regulator in the crossroads of oxidative stress resistance and virulence in *Candida glabrata*: The transcription factor CgTog1. *Virulence*, *11*(1), 1522–1538. <https://doi.org/10.1080/21505594.2020.1839231>
- Pelczar, M. J., Chan, E. C. S., & Krieg, N. R. (1998). *In: Microbiology*. [file:///Users/aylingokhan/Documents/Mendeley Desktop/Pelczar, Chan, Krieg - 1998 - In Microbiology.pdf](file:///Users/aylingokhan/Documents/Mendeley%20Desktop/Pelczar,%20Chan,%20Krieg%20-%201998%20-%20In%20Microbiology.pdf)
- 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. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2008.06301.x>
- Saijo, T., Miyazaki, T., Izumikawa, K., Mihara, T., Takazono, T., Kosai, K., Imamura, Y., Seki, M., Takeya, H., Yamamoto, Y., Yanagihara, K., & Kohno, S. (2010). Skn7p is involved in oxidative stress response and virulence of *Candida glabrata*. *Mycopathologia*, *169*(2), 81–90. <https://doi.org/10.1007/s11046-009-9233-5>
- Timmermans, B. (2021). *ROLE OF THE CAMP-PKA PATHWAY ON ADHESION AND PATHOGENICITY IN THE HUMAN FUNGAL PATHOGEN CANDIDA*. *September 2021*.
- Toda, M., Williams, S. R., Berkow, E. L., Farley, M. M., Harrison, L. H., 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. *MMWR Surveillance Summaries*, *68*(8), 1–17. <https://doi.org/10.15585/mmwr.ss6808a1>
- Wilson, W. A., & Roach, P. J. (2002). Nutrient-regulated protein kinases in budding yeast. *Cell*, *111*(2), 155–158. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(02\)01043-7](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(02)01043-7)

Tabla1. Cepas de *E. coli* y *C. glabrata*

Cepas de <i>E. coli</i>	Características	Genotipo	Referencia
(DH10B)	Células electrocompetentes	F ⁻ <i>mcrAΔ(mrr-hsdRMS-mcrBC)</i> <i>80ΔlacZΔM15ΔlacX74</i> <i>deoR recA1 andA1</i> <i>araΔ139 Δ(ara,leu)7697</i> <i>galU galk⁻ rpsL nupG</i>	Calvin y Hanawalt (1988)
Cepas <i>C. glabrata</i>	Parental	Genotipo	Referencia
BG14	BG2	<i>ura3Δ::Tn903 Neo^R Ura⁻</i>	Comarck y Falkow (1999)
CGM514	BG14	<i>ura3Δ::Tn903 Neo^R</i> pMC14 Ura ⁺	Colección del laboratorio
GCM1923	BG14	<i>ura3Δ::Tn903 Neo^R</i> pCV37 Ura ⁺	Colección del laboratorio
CGM3359 <i>yap1Δ skn7Δ</i>	CGM310	<i>ura3Δ::Tn903 Neo^R</i> <i>yap1Δ skn7Δ</i> pCV37 Ura ⁺	Colección del laboratorio
CGM4030 <i>msn2Δ msn4Δ</i>	CGM838	<i>ura3Δ::Tn903 Neo^R</i> <i>msn2Δ msn4Δ::hph Hyg^R</i> pCV37 Ura ⁺	Colección del laboratorio
CGM4326 <i>rim15Δ</i>	CGM4259	<i>ura3Δ::Tn903 Neo^R</i> <i>rim15Δ</i> pCV37 Ura ⁺	Este trabajo
CGM4359 <i>tpk3Δ</i>	CGM4263	<i>ura3Δ::Tn903 Neo^R</i> <i>tpk3Δ</i> pCV37 Ura ⁺	Este trabajo
CGM4362 <i>ygk3Δ</i>	CGM4265	<i>ura3Δ::Tn903 Neo^R</i> <i>ygk3Δ</i>	Este trabajo

		pCV37 Ura ⁺	
CGM827	BG14	<i>ura3Δ::Tn903</i> Neo ^R pAP417 Ura ⁺	Colección del laboratorio
CGM4332 <i>yap1Δ skn7Δ</i>	CGM310	<i>ura3Δ::Tn903</i> Neo ^R <i>yap1Δ skn7Δ</i> pAP417 Ura ⁺	Este trabajo
CGM4346 <i>msn2Δ msn4Δ</i>	CGM838	<i>ura3Δ::Tn903</i> Neo ^R <i>msn2Δ msn4Δ</i> pAP417 Ura ⁺	Este trabajo
CGM4328 <i>rim15Δ</i>	CGM4259	<i>ura3Δ::Tn903</i> Neo ^R <i>rim15Δ</i> pAP417 Ura ⁺	Este trabajo
CGM4350 <i>ygk3Δ</i>	CGM4265	<i>ura3Δ::Tn903</i> Neo ^R <i>ygk3Δ</i> pAP417 Ura ⁺	Este trabajo
CGM4354 <i>tpk3Δ</i>	CGM4263	<i>ura3Δ::Tn903</i> Neo ^R <i>ygk3Δ</i> pAP417 Ura ⁺	Este trabajo
CGM2896	BG14	<i>ura3Δ::Tn903</i> Neo ^R pGE107 Ura ⁺	Colección del laboratorio
CGM2882 <i>yap1Δ skn7Δ</i>	CGM310	<i>ura3Δ::Tn903</i> Neo ^R <i>yap1Δ skn7Δ::hph</i> Hyg ^R	Colección del laboratorio
CGM2888 <i>msn2Δ msn4Δ</i>	CGM837	<i>ura3Δ::Tn903</i> Neo ^R <i>msn2Δ msn4Δ::hph</i> Hyg ^R pGE107 Ura ⁺	Colección de laboratorio
CGM4330 <i>rim15Δ</i>	CGM4259	<i>ura3Δ::Tn903</i> Neo ^R <i>rim15Δ</i> pGE106 Ura ⁺	Este trabajo
CGM4352 <i>ygk3Δ</i>	CGM4265	<i>ura3Δ::Tn903</i> Neo ^R <i>ygk3Δ</i> pGE106 Ura ⁺	Este trabajo

CGM4356 <i>tpk3Δ</i>	CGM4263	<i>ura3Δ::Tn903 Neo^R</i> <i>tpk3Δ</i> pGE106 Ura ⁺	Este trabajo
--------------------------------	----------------	--	--------------

Tabla 2. Oligonucleótidos utilizados en este trabajo

Número	Secuencia	Sitios de hibridación
2147	GGAGACTGAGAATTGAACCC	<i>RIM15 -853FW</i>
2148	AAAAACTGGATGCTGCCC	<i>RIM15 -995FW</i>
2149	CGAATTCAGGAAGCTTGATATTTTTGTTTC TTTCAGGACACAGCG	<i>RIM15 -51 RV</i>
2145	CTCTATTGCTAGCTACATCCC	<i>RIM15 2290 FW</i>
2146	CGTAAAAAGCTAACCGGTG	<i>RIM15 2397 RV</i>
2150	CACGGCTACCACATCGTCTTTGCTTGAA ACTAATGGTTAATGC	<i>RIM15 +42 FW</i>
2152	GTGCTTAGTTGAACTTTGCC	<i>RIM15 +970RV</i>
2151	CTTATCTGTTTCAGAGCAACC	<i>RIM15 +809RV</i>
2624	CAGCTATTCCGAGTACCAGAG	<i>TPK2 -961FW</i>
2625	CCTCTCTTGTAGGCTTAGGGAG	<i>TPK2 -931FW</i>
2626	GGTGAGATCGGTTCAACAACG	<i>TPK2 201FW</i>
2627	TGCTAGCGTAACCTCAGCGG	<i>TPK2 464 RV</i>
2628	GAGGAACCTAGCTGTTCAAG	<i>TPK2 +997RV</i>
2629	CGCGGATGCATCCTATTGTAAC	<i>TPK2 +851RV</i>
2630	CGAATTCAGGAAGCTTGATATTTTTGCATA CAATCTTCTCCGCTTGG	<i>TPK2 -1 REV</i>
2631	GGCTACCACATCGTCTTTGACTTTCAAAT TGTTTTGGAATAAA	<i>TPK2 +5FW</i>
2640	CCGCCATAATCTTCAAGACTG	<i>TPK3 -974FW</i>
2641	CTATTTCAAGCCTTCAGTGCC	<i>TPK3 -923 FW</i>
2646	CGAATTCAGGAAGCTTGATATTTTTGGTAT AACCAAAAGCAATTGAG	<i>TPK3 -1 RV</i>
2642	GTGACGAACCTATGGGTCAAG	<i>TPK3 204 FW</i>
2643	GCTGTAGTCGTTGTTGTTGC	<i>TPK3 450 RV</i>
2644	GCAGCTTTCGCCAATAATAGG	<i>TPK3 +996RV</i>

2645	GCGATGGTGCACTATCTATG	<i>TPK3 +844 RV</i>
2647	GGCTACCACATCGTCTTTGCACATACTC GCAAGCTGATG	<i>TPK3 +11 FW</i>
2161	CGAATTCAGGAACTTGATATTTTTAGTAT TGAATCGAGCAGCC	<i>YGK3 -57 RV</i>
2162	CAAAGGCACTTACTAGGTGG	<i>YGK3 -875 FW</i>
2163	GCTAAGCTGTTCCCTAGGTGG	<i>YGK3 -909FW</i>
2164	CCAGACCCCAAATATCAACC	<i>YGK3 659 RV</i>
2165	AGACTTGAACCGAACCAGCC	<i>YGK3 564 FW</i>
2166	CACGGCTACCACATCGTCTTTGCTCTGA GCTGG	<i>YGK3 +226 FW</i>
2167	TTCAGATCAAGGCGAAACC	<i>YGK3 +911 RV</i>
2168	CTCTTTCATTGCATCCCC	<i>YGK3 +1252 RV</i>

Tabla 3. Plásmidos utilizados en este trabajo

Plásmido	Número de cepa de <i>E. coli</i>	Construcción	Referencia
pCV37	3028	$P_{CTA1}::GFP::3'UTR_{CTA1}$	Colección del laboratorio
pGE106	3984	$P_{SRX1}::GFP::3'UTR_{SRX1}$	Colección del laboratorio
pAP417	1469	$P_{EPA2}::GFP::3'UTR_{EPA2}$	Colección del laboratorio
pMC14		$pGFP::3'UTR_{CTA1}$	Colección del laboratorio

Pies de Figuras

Figura 1. Regulación de la vía PKA en *S. cerevisiae* a través de la detección de glucosa intracelular y extracelular. Figura modificada de (Timmermans, 2021).

Figura 2. Señalización de la vía TOR en *S. cerevisiae* en presencia de rapamicina. Figura modificada de (Cutler et al., 1999; Pelczar et al., 1998)

Figura 3. Expresión de los promotores *SRX1*, *EPA2* y *CTA1* en presencia de Medio Condicionado (MC).

Se crecieron cultivos de las cepas BG14 (pGFP::3'UTR_{HIS3}), BG14 (p_{EPA2}::GFP::3'UTR_{EPA2}), BG14 (p_{SRX1}::GFP::3'UTR_{SRX1}) y BG14 (p_{CTA1}::GFP::3'UTR_{CTA1}), durante 48 horas en medio CAA y se ajustaron en medio CAA fresco para obtener una OD_{600nm} de 0.5 tras 18 duplicaciones. Las células se recolectaron por centrifugación y se les adicionó MC. Para obtener el MC se inoculó la cepa BG14 en YPD y se incubó por 72 horas. Se centrifugó el cultivo y se filtró el para tener el MC libre de células. Se tomaron muestras del cultivo al tiempo 0 a 8 horas cada hora para evaluar la actividad transcripcional mediante citometría de flujo en un BD FACSCalibur™. Como control negativo se usó la cepa BG14 (pGFP::3'UTR_{HIS3}). A) Expresión del promotor *SRX1*. B) Expresión del promotor de *EPA2*. C) Expresión del promotor de *CTA1*. Los datos se analizaron con la prueba estadística ANOVA de dos vías (En el software Graph Pad Prisma), los valores p < 0.1 fueron considerados con significancia estadística.

Figura 4. La expresión de *EPA2* esta regulada por las cinasas Tpk3, Ygk3, Rim15

El análisis de la expresión de *EPA2* se realizó como esta descrito en el pie de la Figura 3. A) Expresión de *EPA2* en la mutante *tpk3Δ*. B) Expresión de *EPA2* en la mutante *ygk3Δ*. C) Expresión de *EPA2* en la mutante *rim15Δ*.

Figura 5. La expresión de *CTA1* está regulada por Yap1, Skn7, Msn2, Msn4 y Tpk3

El análisis de la expresión de *CTA1* se realizó como esta descrito en el pie de la Figura 1. A) Expresión de *CTA1* en la mutante *yap1 skn7Δ*. B) Expresión de *CTA1* en la mutante *msn2Δ msn4Δ*. C) Expresión de *CTA1* en la mutante *tpk3Δ*.

Figura 6. Expresión de *CTA1* en presencia de 1-dodeceno

Se crecieron cultivos de las cepas BG14 (pGFP::3'UTR_{HIS3}) y BG14 (Pp_{CTA1}::GFP::3'UTR_{CTA1}) durante 48 horas en medio CAA y se ajustaron en medio CAA fresco para obtener una OD_{600nm} de 0.5 tras 18 duplicaciones. Cuando las células alcanzaron la OD_{600nm} de 0.5 se les aplicó 1-Dodeceno (C12) a concentración 100 μM, como control se usó DMSO. Se tomaron muestras del cultivo al tiempo 0 y de 2,4 y 6 horas para evaluar la actividad transcripcional del promotor *CTA1* por citometría de flujo en un BD FACSCalibur™. Como control negativo se usó la cepa BG14 (pGFP::3'UTR_{HIS3}). Los datos se analizaron con la prueba estadística ANOVA de dos vías (En el software Graph Pad Prisma), los valores p < 0.1 fueron considerados con significancia estadística.

Figura 7. Regulación de la expresión de *CTA1* en presencia de 1-dodeceno

El análisis de la expresión de *CTA1* se realizó como esta descrito en el pie de la Figura 6. A) Expresión de *CTA1* en la mutante *msn2Δ msn4Δ*. B) Expresión de *CTA1* en la mutante *yap1Δ skn7Δ*. C) Expresión de *CTA1* en la mutante *tpk3Δ*.

Figura 8. Expresión de *CTA1* en presencia de rapamicina

Se crecieron cultivos de las cepas BG14 (pGFP::3'UTR_{HIS3}) y BG14 (Pp_{CTA1}::GFP::3'UTR_{CTA1}) durante 48 horas en medio CAA y se ajustaron en medio CAA fresco para obtener una OD_{600nm} de 0.5 tras 18 duplicaciones. Cuando las células alcanzaron la OD_{600nm} de 0.5 se les aplicó rapamicina a concentración de 200 ng/ mL. Se tomaron muestras del cultivo al tiempo 0 y de 2,4 y 6 horas y la actividad del promotor *CTA1* se evaluó por citometría de flujo en un BD FACSCalibur™. Como control negativo se usó la cepa BG14 (pGFP::3'UTR_{HIS3}). Los datos se analizaron con la prueba estadística ANOVA de dos vías (En el

software Graph Pad Prisma), los valores $p < 0.1$ fueron considerados con significancia estadística.

Figura 9. Resumen gráfico de resultados.

Los resultados obtenidos en este trabajo sobre las vías de señalización que inducen la REO se ilustran en el Resumen gráfico.

Figura 1.

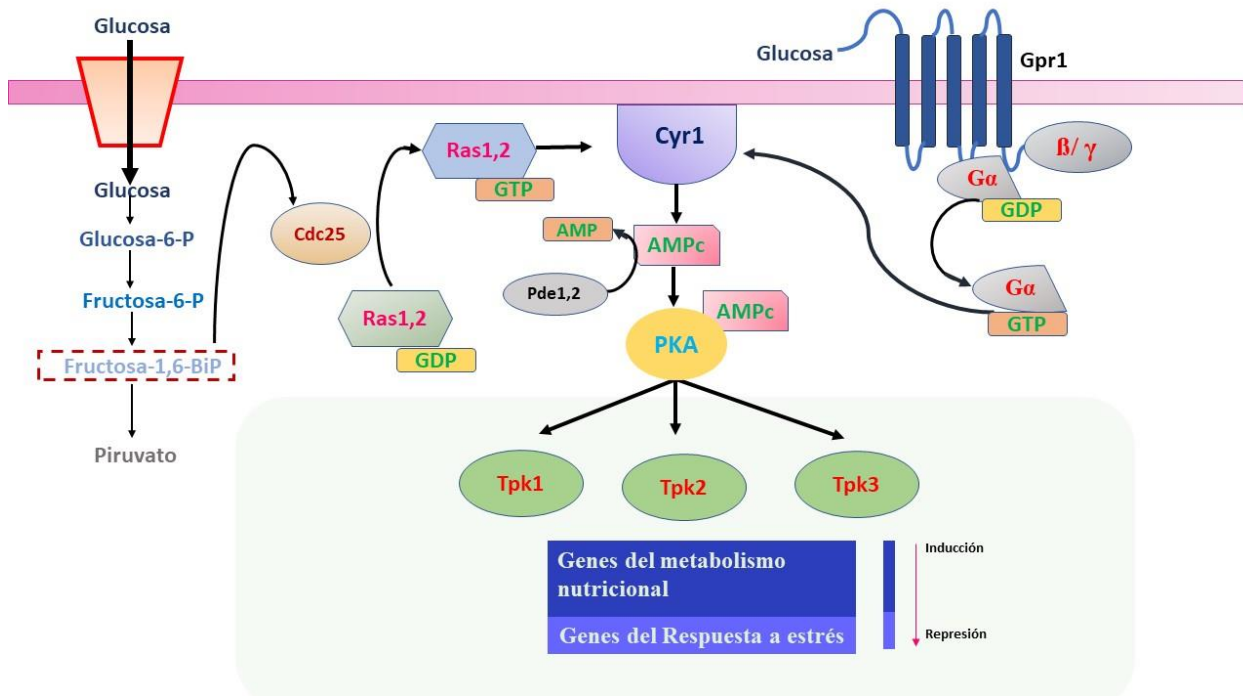


Figura 2.

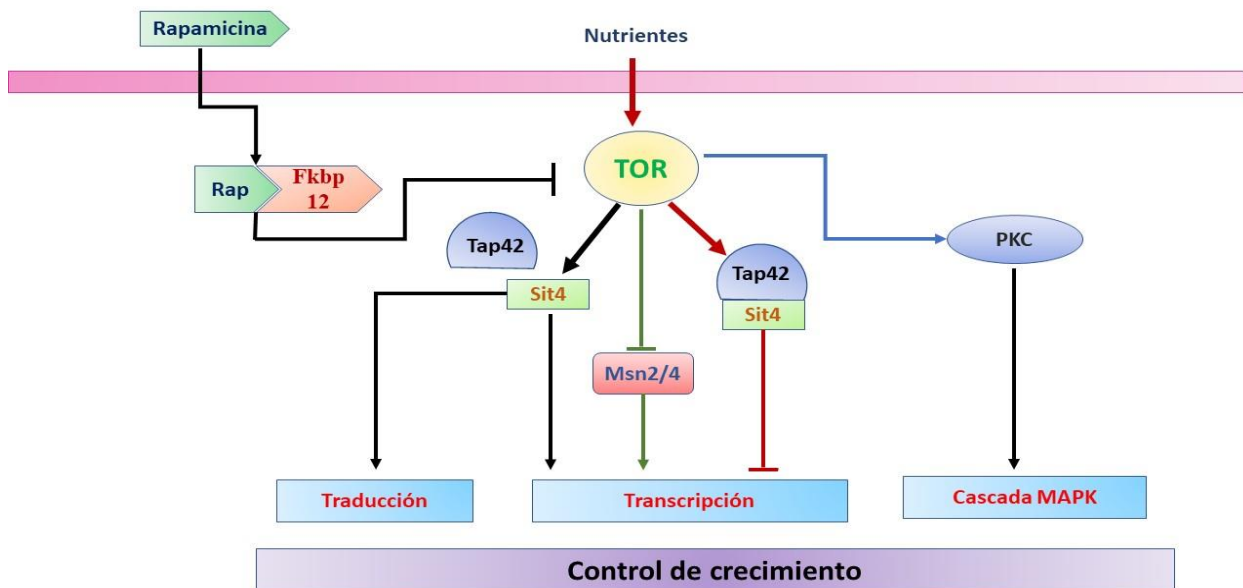


Figura 3.

Medio Condicionado (MC)

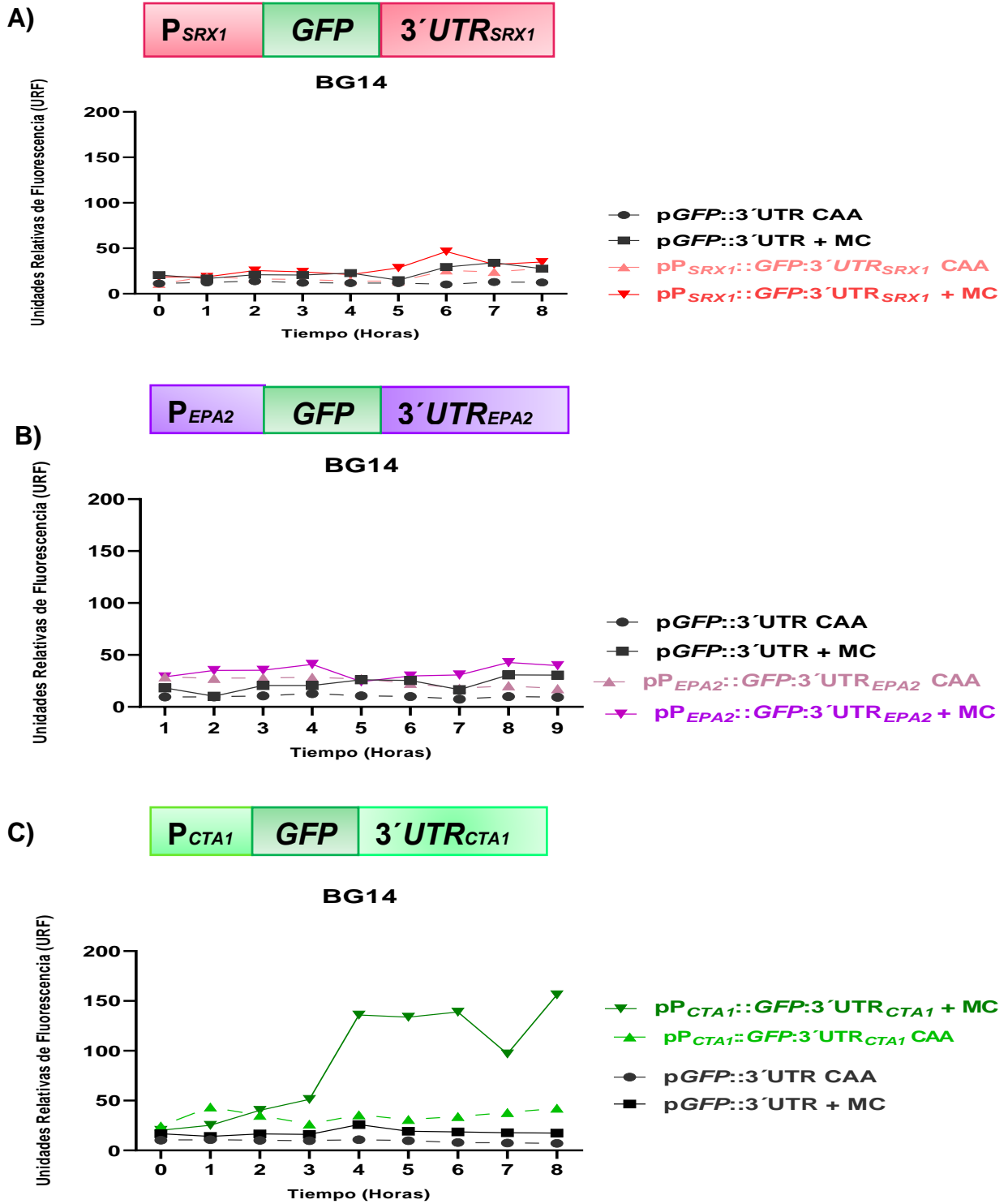
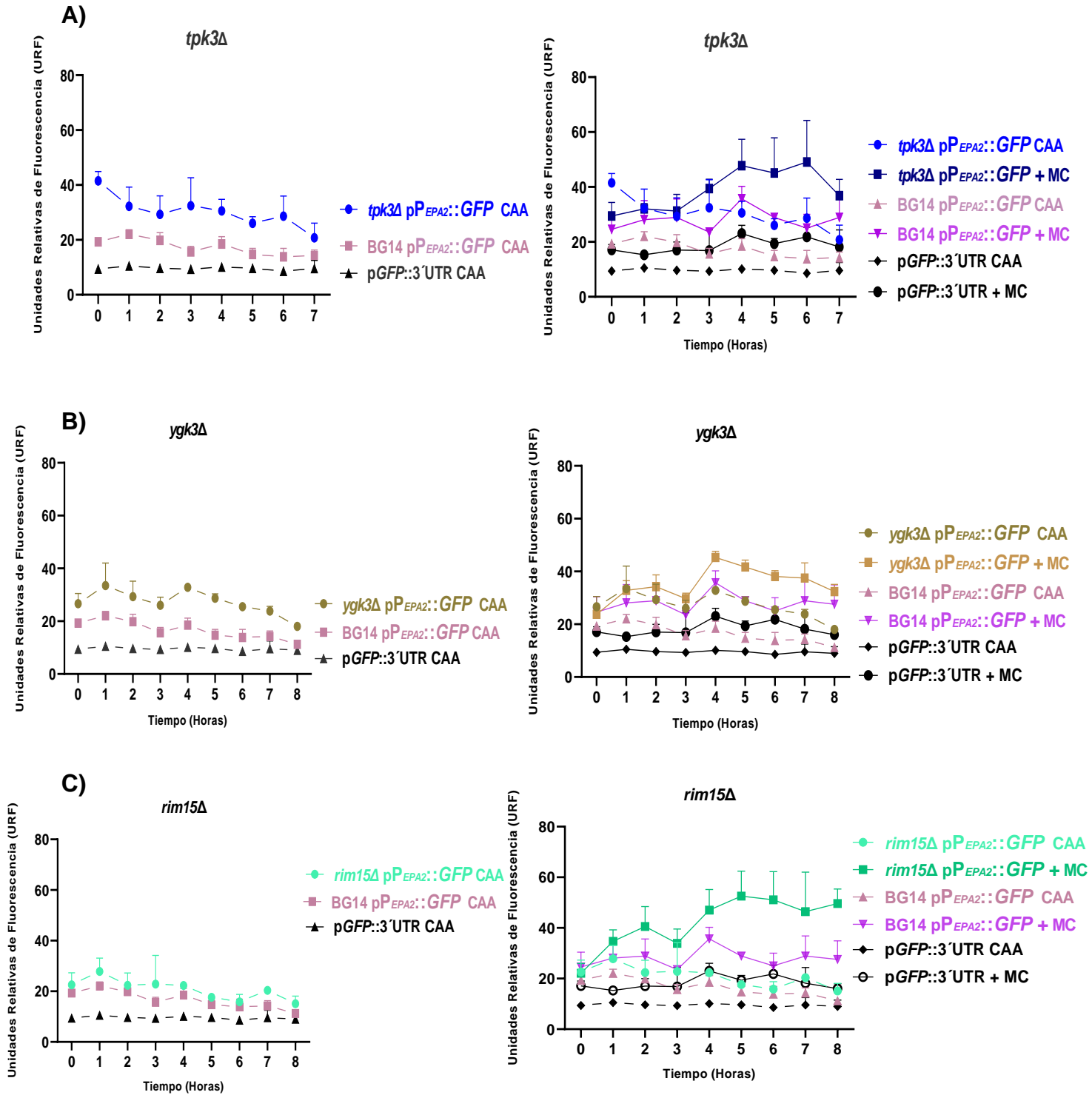


Figura 4.

Medio Condicionado (MC)



Medio Condicionado (MC)

Figura 5.

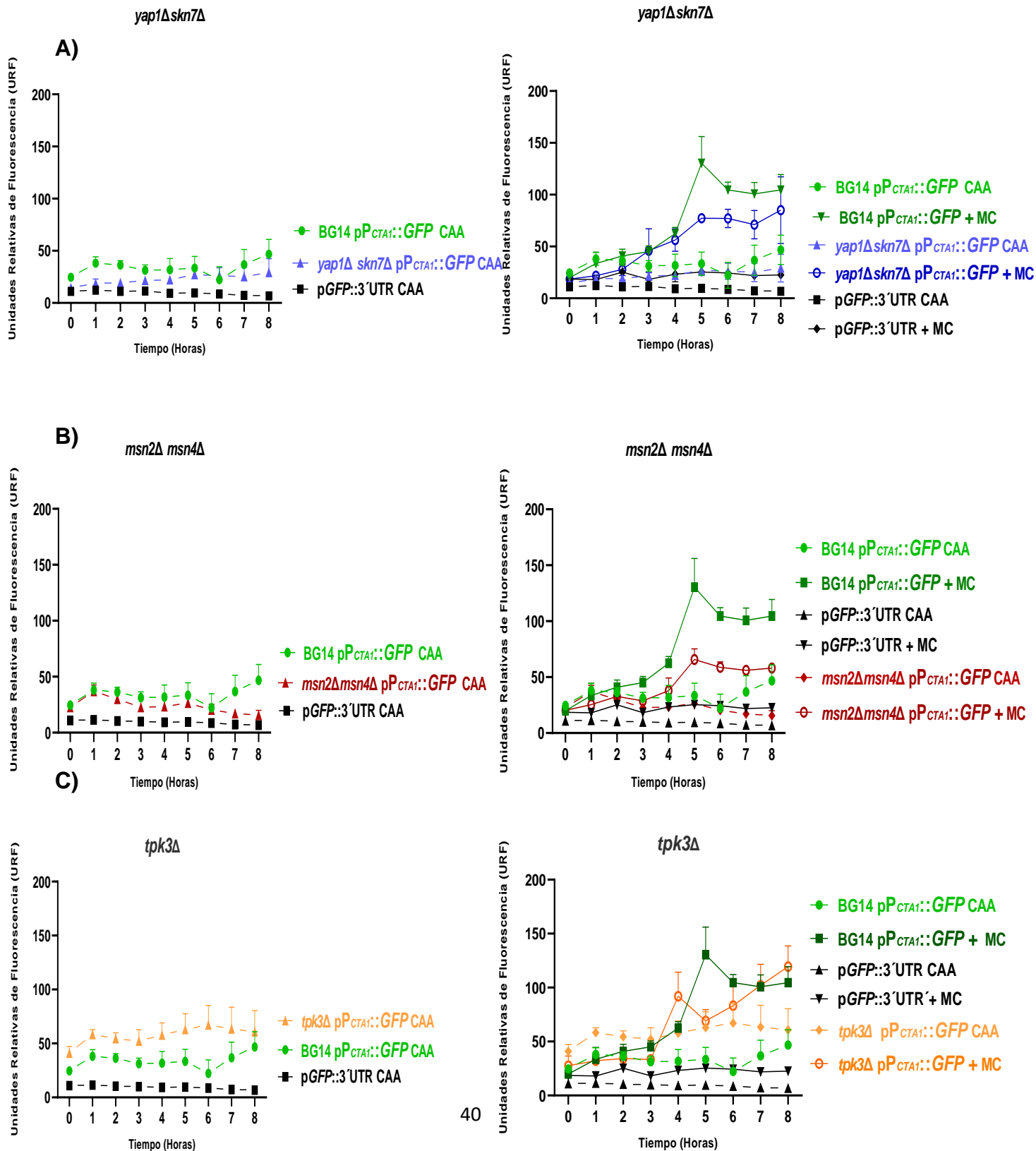
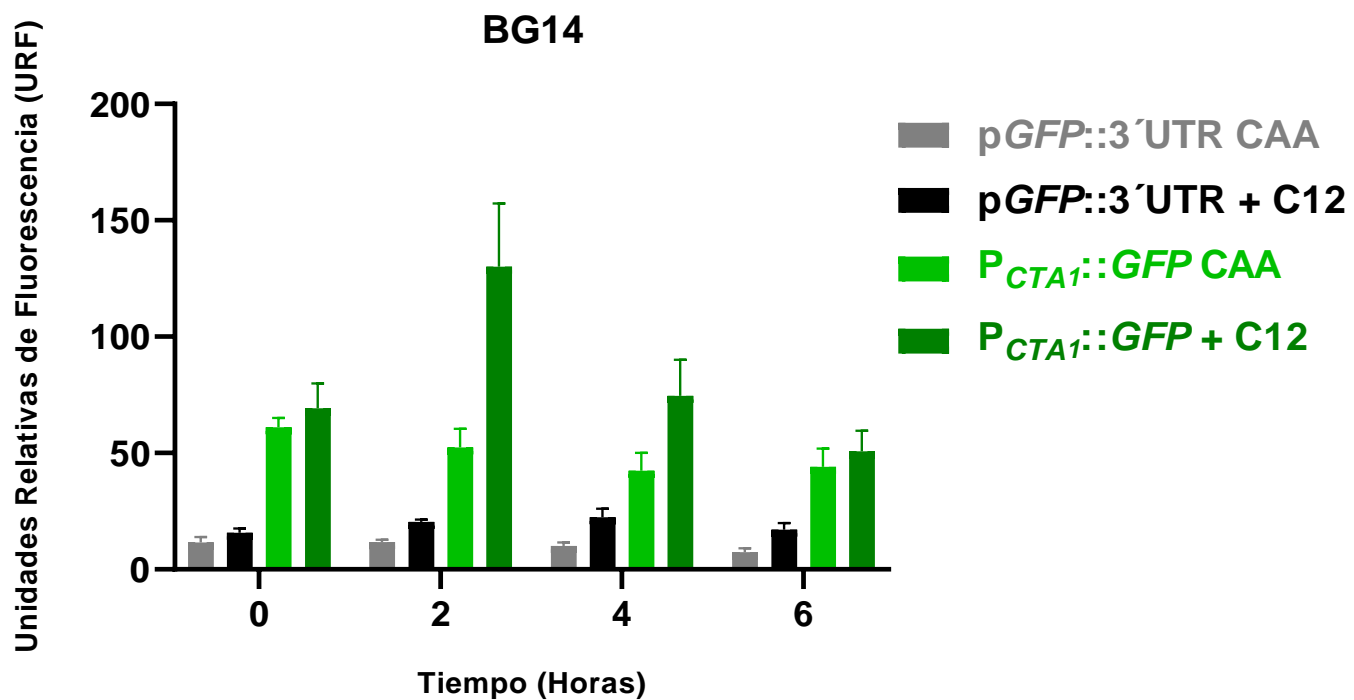


Figura 6.



1-dodeceno (C12) 100 μ M

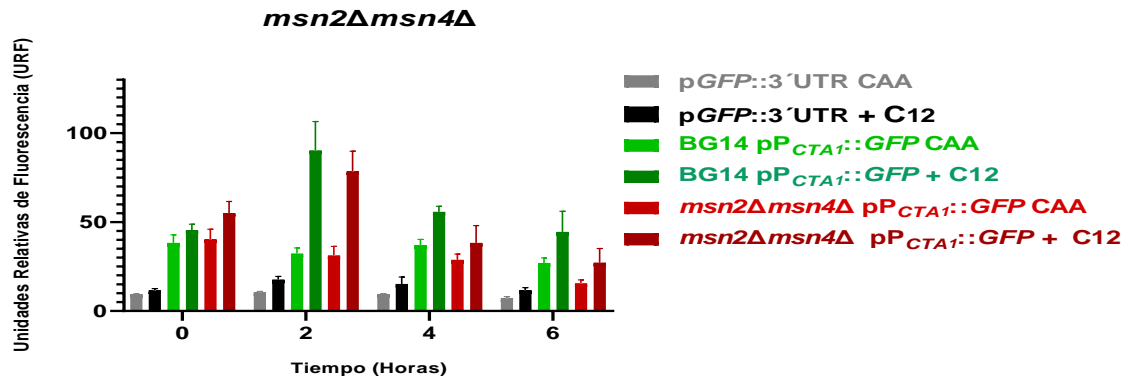




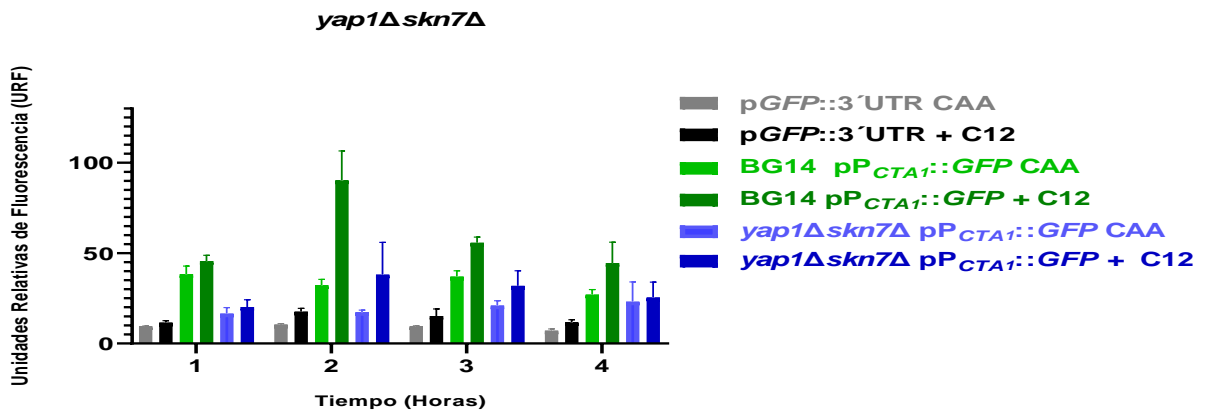
1-dodeceno (C12) 200 μ M

Figura7.

A)



B)



C)

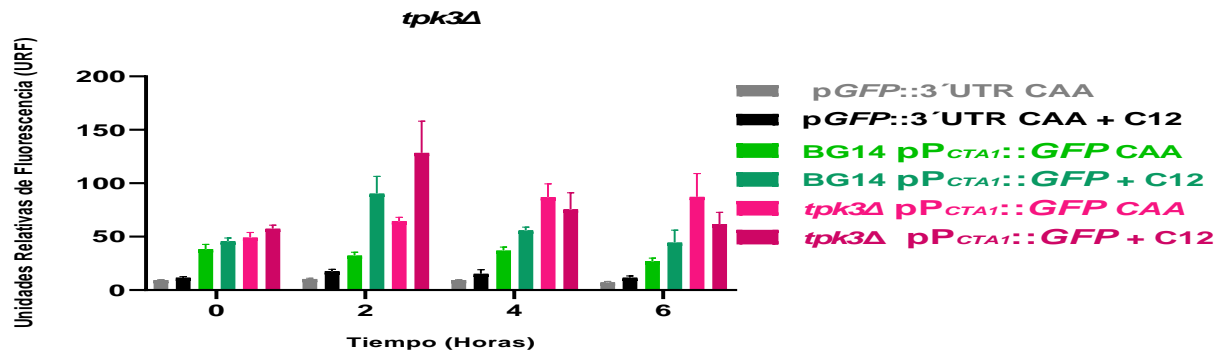


Figura 8.



Rapamicina 200 ng/mL
1-dodeceno (C12) 200 μM

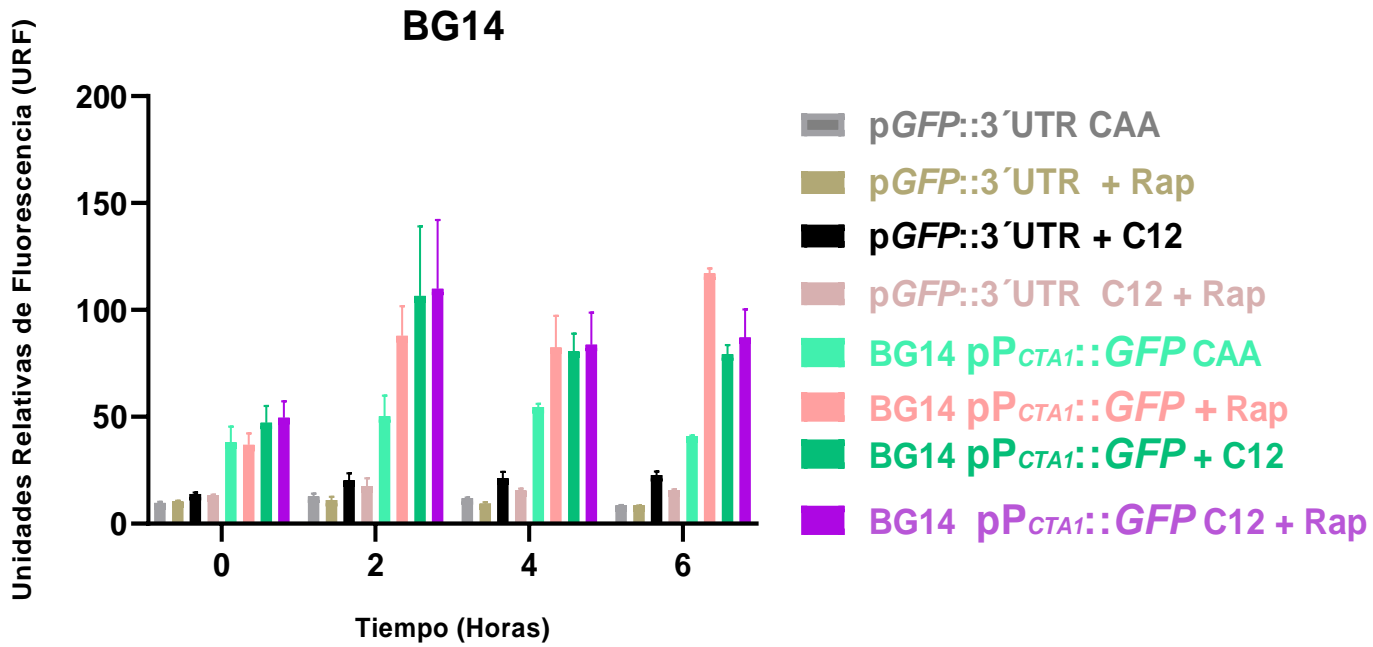
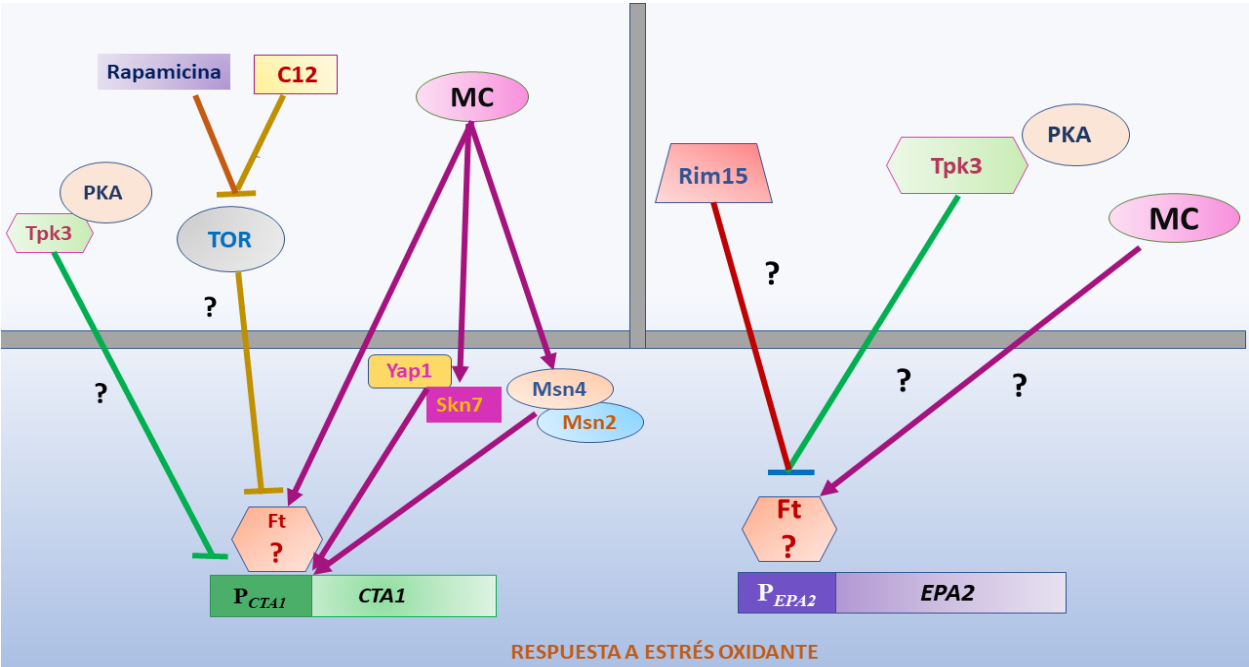


Figura 9.



Anexos

Figura S1. Alineamiento de aminoácidos ScYgk3 y CgYgk3 realizado en el software MacVector por el método de alineamiento múltiple de secuencias CLUSTAL W.

Identidad: 43.4%

Similitud: 22.9%

```
ScYgk3 1 MLKVNVVFGSNPNRMTKLEDEHYFIDDIVSIKNRQKSKMYVREGKRIHGSGFGTVTQSI LSSNSIEWLGPYAIAIKRVVKSP 80
CgYgk3 1 MSHEEVHDEFIAEDVTPNRPDETRGENGAPRRMLVREHRKIGRGAFGTVVQAYLTQDEQTYGPFPAIKKVPAAQT 74
      MLKVNN. . .ED D N .M VRE ..IG.G FGTV Q L.. W GP AIK.V. .

ScYgk3 81 KVSLELEILQNI RHPNLVTLEFFESHCTTKDGGHLYQKNFVMEYIPQTLSSSEIHEYFDNGSKMPTKHVKLYTFQILRA 160
CgYgk3 75 EYKSRELQILRLTDHPNIVKLEYFFHTSPKDN-KVYQH-LAMECLPETLQIEINRYTSNNLQLAIKHVKLYSYQIARG 151
      S EL IL HPN.V LE FF SH.. KD.G..YQ.N..ME..P TL. EI Y N. .. KH.KLY. QI.R

ScYgk3 161 LLTLHSMSICHGDLKPSNILIIPSSGIAKVCDFGSAQRLLDNTLKYFCRSFYRAPEL LLSKDYTTQIDIWLSLGCIG 240
CgYgk3 152 MLYLHALGICHRIKPSNILVDPKTGVLKI CDFGSAKRL EPNQPSISYICRSFYRAPEL I LGSQYTTQVDIWLGLGCVIG 231
      .L.LH ..ICH D.KPSNIL. P .G..K.CDFGSA RL. N. .Y.CRSFYRAPEL.L.S YTTQ.DIW.LGC.IG

ScYgk3 241 EMIKGQPLFKGDSANSQLEEIAKLLGRFPK-----SSIKNSQELQDS--LNDQKFKKFMHWFPSIEFFDVEFLLKVLTYD 313
CgYgk3 232 EMLIGRAIFQGQDPLLQLREIAKLLGPPDKKFIFFSNPRYTGPLYSTPLFNGTSLERFQKYFGHAGPDGIDLMLKVLKYE 311
      EM. G ..F G . QL EIAKLLG . KKFIFFS..... L. .PL.N . . .F . F . . .L.KVL Y.

ScYgk3 314 ATERCDARQLMAHEFFDALRNETYFLPRGSSMPVHLPDLFNFSASEKRALGEYNNLIVPSLD* 376
CgYgk3 312 PELRFSPRRIMAHFFDLRNEKYFFPREQTQPVLLPELFNFNEFELQVIGELLQIKPHSEEH* 376
      . R .R .MAH FFD LRNE YF.PR .. PV LP.LFNF. E ..GE . I P .EH
```

Figura S2. Alineamiento de aminoácidos ScTpk3 y CgTpk3. El alineamiento se realizó como se indica en la Figura S1.

Identidad: 66.1%

Similitud: 5.6%

```

ScTpk3 1 MYVDPMNNNEIRKLSI TAKTETT PDNVG----- QDTPVYN----- AHHSVHEECSSNTP----- 47
CgTpk3 1 MYVDPKKNNEVRKLSI PDKVVPEAEEESEQLTEQQQQMQQILL GENFKEVEIMDSEYDRRKLEEESSAGPPGDEPMGQENHEQL 80
MYVDP NNE.RKLSI K .. QLTEQQQ .. GENFKEVEIMDSEY . EE S . PGDEPMGQENHEQL

ScTpk3 48 ----- VEINGRNSG----- KLKEEASAG----- 65
CgTpk3 81 ENHIDKATESQMSKELVVEDDQYDQGSHNIDYEARNKEEHNNGTNRTDTGGHTQGTEQSNEQQTESNHEQQQQRLQQTEQ 160
ENHIDKATESQMSKELVVE . .GSHNIDYEA. KEE . GTNRTDTGGHTQGTEQSNEQQTESNHEQQQQRLQQTEQ

ScTpk3 66 ----- ILCLVKKPMLQYRDTSSGKYSLSDFQILRTLGTGSFGRVHLIRSNHNGRFYALKTLKKHTIVKLKQVEHTNDERRML 140
CgTpk3 161 HQQHQMETVKKPLIYGANTSGKYTLSDFQILRTLGTGSFGRVHLIRSNHNGRFYALKTLKKHTVVKLKQVEHTNDERRML 240
HQQHQ. VKKP... TSGKY.LSDFQILRTLGTGSFGRVHLIRSNHNGRFYALK LKKHT.VKLKQVEHTNDERRML

ScTpk3 141 SIVSHPFIRMWGTFQDSQQVFMVMDYIEGGELFSLLRKSQRFPNPVAKFYAAEVCLALEYLHSKDIIYRDLKPENILLD 220
CgTpk3 241 SIVSHPFIRMWGTFQDSQHVFMVMDYIEGGELFSLLRKSQRFPNPVAKFYAAEVCLALEYLHSKEIIYRDLKPENILLD 320
SIVSHPFIRMWGTFQDSQ VFMVMDYIEGGELFSLLRKSQRFPNPVAKFYAAEVCLALEYLHSK. IYRDLKPENILLD

ScTpk3 221 KNGHIKIDDFGFAKYVPDVTYTLCGTPDYIAPEVVSTKPYNKSVDWWSFGVLIYEMLAGYTPFYNSNTMKTYENILNAEL 300
CgTpk3 321 KNGHIKIDDFGFAKYVPDVTYTLCGTPDYIAPEVVSTKPYNKSVDWWSFGILIYEMLAGYTPFYDANTMKTYEHILNSEL 400
KNGHIKIDDFGFAKYVPDVTYTLCGTPDYIAPEVVSTKPYNKSVDWWSFG.LIYEMLAGYTPFY NTMKTYE ILN EL

ScTpk3 301 KFPFFHPDAQDLLKLITRDLSERLGNLQNGSEDVKNHPWFNEVIWEKLLARYIETPYEPPIQGGQGDTSQFDRYPEEE 380
CgTpk3 401 KFPSFFHPDVQDLLSKLITRDLSKRLGNLQNGSEDVKNHPWFSEVVWEKLLARYIETPYEPPIQGGQGDTSQFDRYPEEE 480
KFP FFHPD.QDLL KLITRDLS RLGNLQNGSEDVKNHPWF.EV.WEKLLARYIETPYEPPIQGGQGDTSQFDRYPEEE

ScTpk3 381 FNYGIQGEDPYMDLMKEF 398
CgTpk3 481 INYGVQGEDPYADLREEF* 499
.NYG.QGEDPY.DL..EF
    
```

Figura S3. Alineamiento de los aminoácidos ScTpk2 y CgTpk2. El alineamiento se realizó como se indica en la Figura S1.

Identidad: 79.5%

Similitud: 5.8%

```

ScTpk2 1  MEFVAERAQPVGQTIIQQQNVNTYGGVVLQPHHDLQQRQQQQQRQHQLLTSQLPQKSLVSKGKYTLHDFQIMRTLGTGS 80
CgTpk2 1  MEYSSQHHS---THMQQQ-----QHQQQHQNTHGTSQQSTLLAQRSTVSKGKYSLQDFHIMRTLGTGS 61
      ME . . .PVG. .QQQNVNTYGGVVLQPHHDLQ  QQ Q . . . . .L.Q.S VSKGKY.L DF IMRTLGTGS

ScTpk2 81  FGRVHLVRSVHNGRYIAIKVLKKAQVVKMKQVEHTNDERRMLKLVHPFLIRMWGTFQDARNIFMVMDYIEGGELFSLLR 160
CgTpk2 62  FGRVHLVRSVHNGRYIAIKVLKKAQVVKMKQIEHTNDERRMLKLVHPFLIRMWGTFQDSRNLFMVMDYIEGGELFTLLR 141
      FGRVHLVRSVHNGRYIAIKVLKKAQVVKMKQ.EHTNDERRMLKLVHPFLIRMWGTFQD RN.FMVMDYIEGGELF.LLR

ScTpk2 161  KSQRFNPVAKFYAAEVI LALEYLHANI IYRDLKPENILLDRNGHIKIDFGFAKEVQTVTWTLCGTPDYIAPEVITTK 240
CgTpk2 142  KSQRFNPVAKFYAAEVT LALEYLHFHNI IYRDLKPENILLDRNGHIKIDFGFAKEVETVTWTLCGTPDYIAPEVIATK 221
      KSQRFNPVAKFYAAEV LALEYLH.HNIIYRDLKPENILLDRNGHIKIDFGFAKEV TVTWTLCGTPDYIAPEVI TK

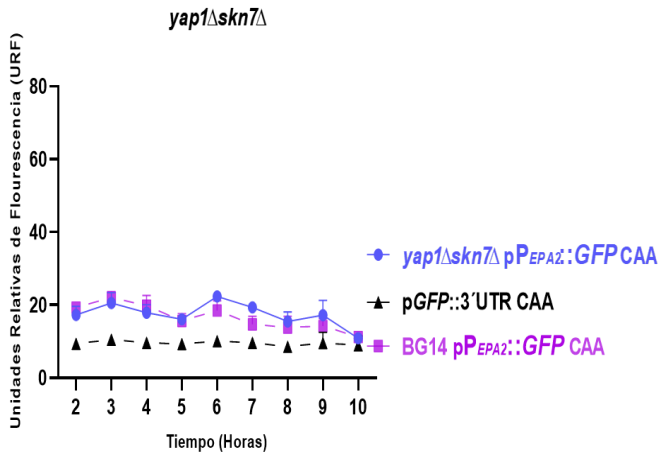
ScTpk2 241  PYNKSDWWSLGVLIYEMLAGYTPFYDTPMKTYEKILQGKVVYPYFHPDVVDLLSKLITADLRRIGNLQSGSRDIKA 320
CgTpk2 222  PYNKSDWWSLGVLIYEMLAGYTPFYDTPMKTYEKILHGKVVYPQFFNSDVI DLLSKLLTADLRRIGNLQKGAQDIKS 301
      PYNKSDWWSLGVLIYEMLAGYTPFYDTPMKTYEKIL GKVVYP F DV.DLLSKL.TADLRRIGNLQ G DIK

ScTpk2 321  HPWFSEVWVERLLAKDIETPYEPPITSGIGDTSLFDQYPEEQLDYGIQGDDPYAEYFQDF 380
CgTpk2 302  HPWFSEVWWEKLLAKDIETPYEPPITAGVGDTSLFDQYPEEQLDYGVQGS DPYASYFTDF* 362
      HPWF SEVWVE.LLAKDIETPYEPPIT G.GDTSLFDQYPEEQLDYG.QG DPYA YF.DF
  
```


Figura S5.



Caasaminoacidos (CAA)



Medio Condicionado (MC)

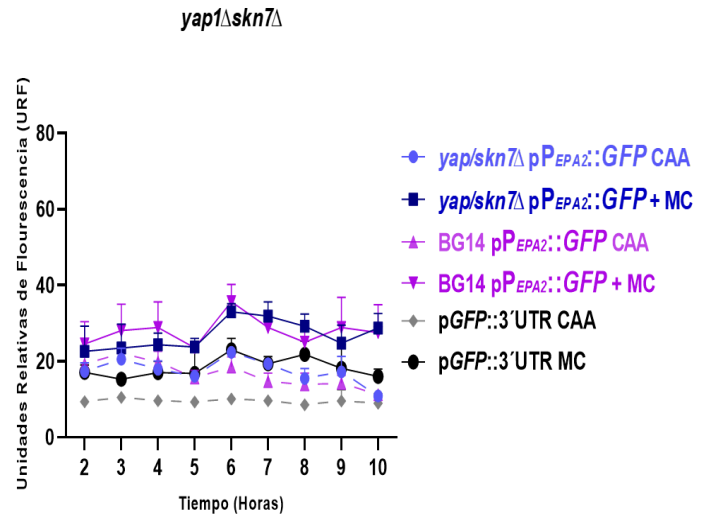
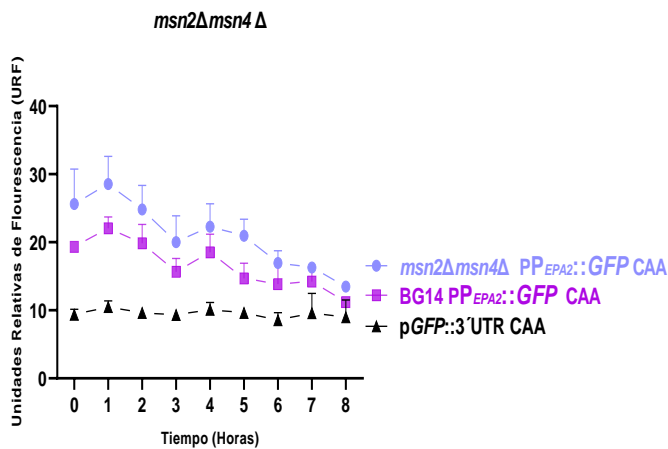


Figura S6.



Caasaminoacidos (CAA)



Medio Condicionado (MC)

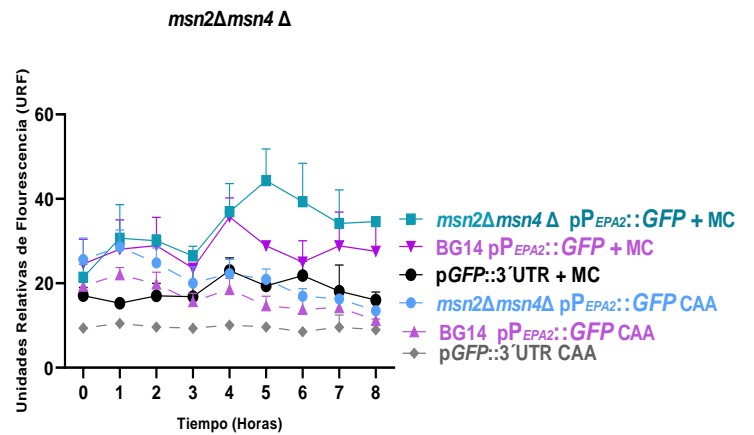


Figura S7.

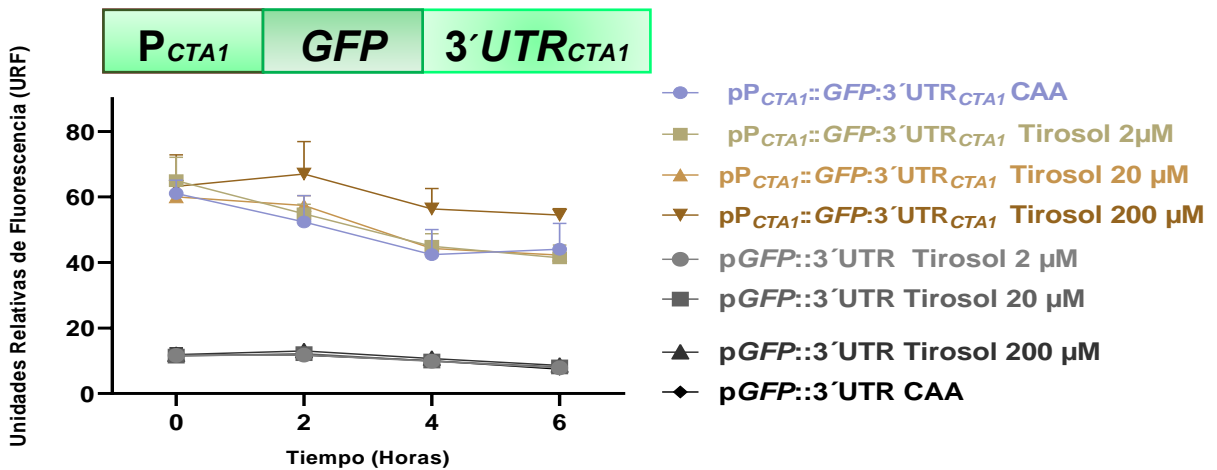
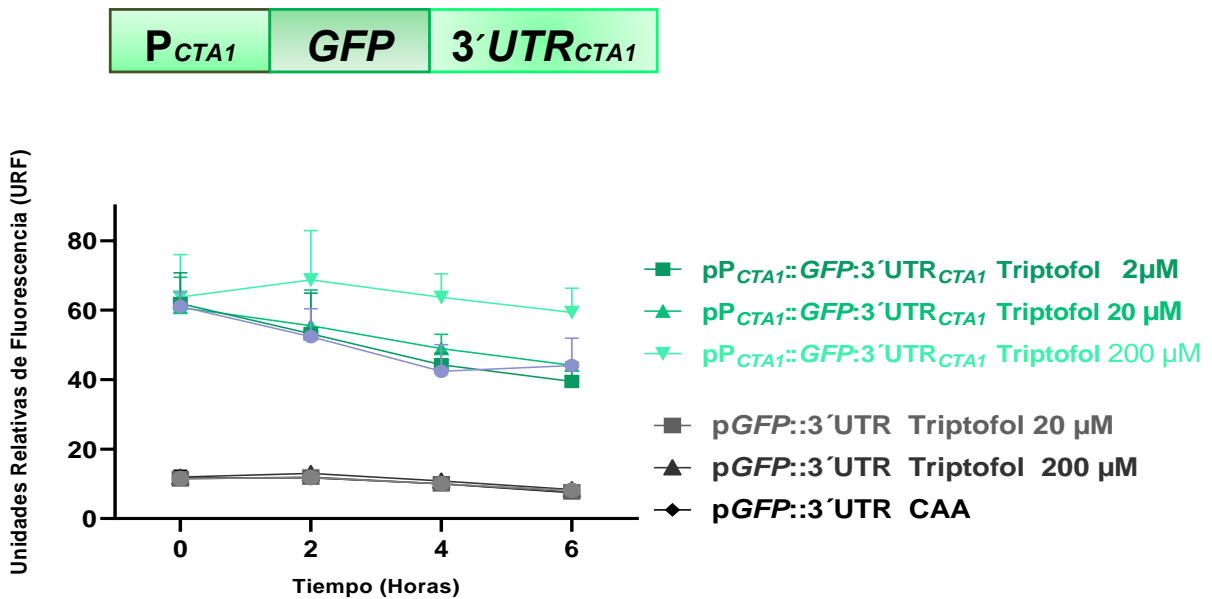
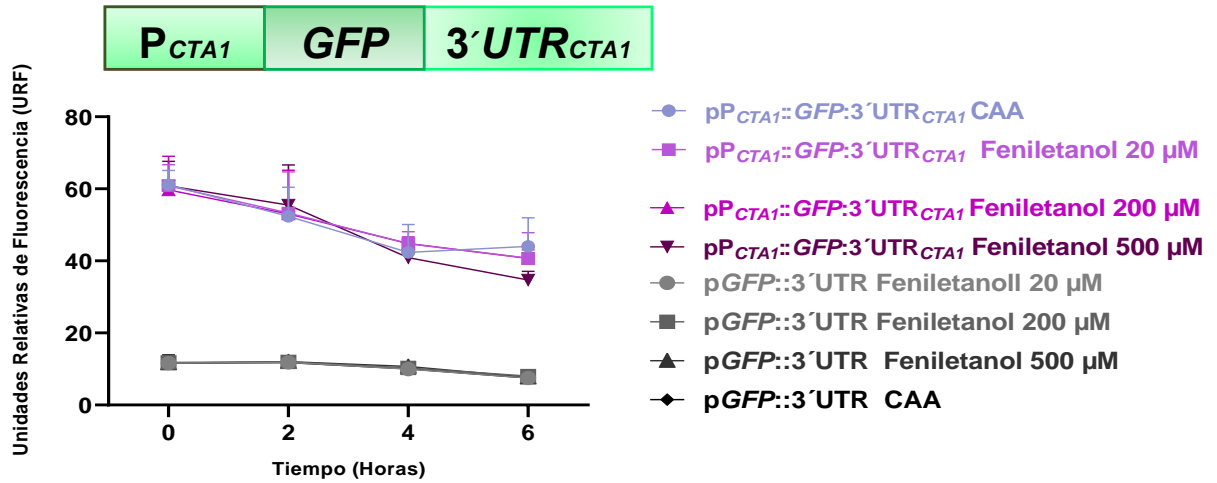


Figura S8.

