

**IPICYT**

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

**POSGRADO EN CIENCIAS EN BIOLOGÍA MOLECULAR**

**Heterogeneidad en la expresión de adhesinas y  
polimorfismos de *SIR3* en una colección de aislados  
clínicos de *Candida glabrata*.**

Tesis que presenta

**Verónica del Carmen Martínez Jiménez**

Para obtener el grado de

**Doctora en Ciencias en Biología Molecular**

Directora de la Tesis

**Dra. Irene Beatriz Castaño Navarro**



## Constancia de aprobación de la tesis

La tesis "Heterogeneidad en la expresión de adhesinas y polimorfismos de *SIR3* en una colección de aislados clínicos de *Candida glabrata*" presentada para obtener el Grado de Doctora en Ciencias en Biología Molecular fue elaborada por la **M.C. Verónica del Carmen Martínez Jiménez** y aprobada el **1° de Febrero de 2013** 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.

Dra. Irene Beatriz Castaño Navarro  
Directora de la tesis

Dr. Gerardo Rafael Argüello Astorga  
Miembro del Comité Tutorial

Dr. Luis Antonio Salazar Olivo  
Miembro del Comité Tutorial

Dr. Roberto Sánchez Olea  
Miembro del Comité Tutorial



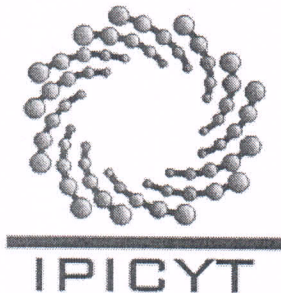
## **Créditos Institucionales**

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 la Dra. Irene Beatriz Castaño Navarro.

La investigación descrita en esta tesis fue financiada con recursos otorgados a la Dra. Castaño Navarro por los Fondos Sectoriales de Investigación en Salud.

Proyecto No. 161971.

Durante la realización del trabajo el autor recibió una beca académica del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología con número de registro **205619** 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

El Secretario Académico del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C., certifica que en el Acta 053 del Libro Primero de Actas de Exámenes de Grado del Programa de Doctorado en Ciencias en Biología Molecular está asentado lo siguiente:

En la ciudad de San Luis Potosí a los 28 días del mes de febrero del año 2013, se reunió a las 17:20 horas en las instalaciones del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C., el Jurado integrado por:

<b>Dr. Gerardo Rafael Argüello Astorga</b>	<b>Presidente</b>	<b>IPICYT</b>
<b>Dr. Luis Antonio Salazar Olivo</b>	<b>Secretario</b>	<b>IPICYT</b>
<b>Dra. Irene Beatriz Castaño Navarro</b>	<b>Sinodal</b>	<b>IPICYT</b>
<b>Dr. Roberto Sánchez Olea</b>	<b>Sinodal externo</b>	<b>UASLP</b>

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

**DOCTORA EN CIENCIAS EN BIOLOGÍA MOLECULAR**

sustentó la C.

**Verónica del Carmen Martínez Jiménez**

sobre la Tesis intitulada:

*Heterogeneidad en la expresión de adhesinas y polimorfismos de SIR3 en una colección de aislados clínicos de Candida glabrata.*

que se desarrolló bajo la dirección de

**Dra. Irene Beatriz Castaño Navarro**

El Jurado, después de deliberar, determinó

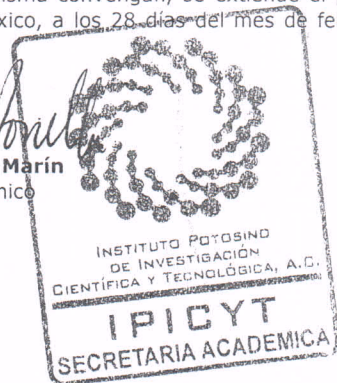
**APROBARLA**

Dándose por terminado el acto a las 18:57 horas, procediendo a la firma del Acta los integrantes del Jurado. Dando fe el Secretario Académico del Instituto.

A petición de la interesada y para los fines que a la misma convengan, se extiende el presente documento en la ciudad de San Luis Potosí, S.L.P., México, a los 28 días del mes de febrero de 2013.

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

  
**Dr. Marcial Bonilla Marín**  
Secretario Académico



## CONTENIDO

	Página
Portada.....	i
Constancia de aprobación de la tesis.....	ii
Créditos institucionales.....	iii
Contenido.....	iv
Resumen.....	vi
Abstract.....	vii
<b>ANTECEDENTES GENERALES</b>	
1. Generalidades biológicas de <i>Candida glabrata</i> .....	1
2. Epidemiología de <i>C. glabrata</i> .....	4
3. Factores de virulencia de <i>C. glabrata</i>	
3.1 Resistencia a fluconazol.....	5
3.2 Resistencia a estrés oxidante.....	5
3.3 Hidrolasas.....	6
3.4 Rearreglos cromosómicos.....	7
3.5 Formación de biofilms.....	7
3.6 Adherencia.....	8
4. El silenciamiento subtelomérico en levaduras	
El silenciamiento subtelomérico de <i>C. glabrata</i> .....	10
<b>ANTECEDENTES DIRECTOS</b> .....	13
<b>PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA</b> .....	15
<b>HIPÓTESIS</b> .....	15

## CONTENIDO

	<b>Página</b>
<b>ESTRATEGIA.....</b>	<b>16</b>
<b>OBJETIVO GENERAL.....</b>	<b>16</b>
<b>OBJETIVOS PARTICULARES.....</b>	<b>17</b>
<b>RESULTADOS.....</b>	<b>18</b>
<b>FIGURAS SUPLEMENTARIAS DEL ARTÍCULO.....</b>	<b>44</b>
<b>TABLAS DE LOS RESULTADOS ADICIONALES.....</b>	<b>47</b>
<b>FIGURAS DE LOS RESULTADOS ADICIONALES.....</b>	<b>51</b>
<b>DISCUSIÓN.....</b>	<b>61</b>
<b>CONCLUSIONES Y APORTACIONES DEL TRABAJO.....</b>	<b>72</b>
<b>PARTICIPACIÓN EN OTROS TRABAJOS.....</b>	<b>73</b>
<b>REFERENCIAS.....</b>	<b>76</b>

## Resumen

### **Heterogeneidad en la expresión de adhesinas y polimorfismos de *SIR3* en una colección de aislados clínicos de *Candida glabrata*.**

*Candida glabrata* ha surgido recientemente como la segunda causa más común de candidiasis invasiva en pacientes inmunocomprometidos, después de *Candida albicans*. La capacidad de adhesión de varias especies de *Candida* es importante para la colonización de mucosas. Bajo ciertas condiciones *in vitro*, la cepa de *Candida glabrata* (BG14) que estudiamos en el laboratorio, se adhiere a células epiteliales y endoteliales mediante las proteínas de pared celular Epa1, Epa6 y Epa7 (adhesinas epiteliales), codificadas por los genes *EPA*. Estos genes forman una familia de genes (de 17 a 23 según la cepa), la mayoría de los cuales se encuentran en regiones cercanas a los telómeros, y son regulados negativamente por las proteínas de la maquinaria del silenciamiento subtelomérico: Sir2, Sir3, Sir4, yKu70, yKu80, Rap1 y Rif1. En este trabajo caracterizamos la capacidad de adhesión a células epiteliales, o a superficies de plástico, de una colección de 79 aislados clínicos de *C. glabrata*, de diferentes orígenes. Once de ellos mostraron ser hiper-adherentes a células HeLa en condiciones en las que la cepa BG14 no se adhiere; sin embargo, casi todos tienen una capacidad de adherencia similar y uno de ellos mucha menor capacidad de formación de biofilms sobre superficies de plástico. La mayoría de los aislados hiperadherentes sobreexpresan uno o varios de los genes *EPA*. En este trabajo amplificamos y secuenciamos los genes *HDF1* y *SIR3* de varios aislados hiperadherentes. Los datos muestran que el gen *SIR3* de los aislados hiperadherentes tiene varios polimorfismos (silenciosos y/o con cambio de aminoácido) con respecto a la cepa BG14 y algunos de estos se localizan flanqueando regiones que en la proteína Sir3 de *Saccharomyces cerevisiae* son necesarias para el silenciamiento.

**PALABRAS CLAVE:** Hiperadherencia, genes *EPA*, biopelículas, silenciamiento.

## Abstract

### Heterogeneity in expression of adhesins and *SIR3* polymorphisms in a collection of clinical isolates of *Candida glabrata*.

*Candida glabrata* has recently emerged as the second cause of candidiasis in immunocompromised patients after *Candida albicans*. Adherence to epithelial cells by *Candida* species is thought to be important for colonization of mucosal tissue. This adherence is mainly mediated by the cell wall proteins Epa1, Epa6 and Epa7 (called epithelial adhesins), encoded by the corresponding *EPA* genes. The *EPA* gene family is composed of 17 to 23 genes (depending on the strain), the majority of which are localized close to the telomeres and are negatively regulated by the silencing proteins Sir2, Sir3, Sir4, yKu70, yKu80, Rap1 and Rif1. In strain BG14, the majority of the *EPA* genes are not expressed *in vitro* due to subtelomeric silencing. In this work we characterized the ability to adhere to epithelial cells or plastic surfaces of a collection of 79 *C. glabrata* clinical isolates from different origins. Eleven of these are hyperadherent to HeLa cells under conditions in which strain BG14 is non-adherent. However, almost all of the hyperadherent isolates display the same ability to form biofilms on plastic surfaces. The majority of the hyperadherent isolates overexpress one or several of the *EPA* genes analyzed although each one presents a different expression pattern and there is no direct correlation between *EPA* gene expression and the adherence to plastic or epithelial cells. In this work we amplified and sequenced *HDF1* and *SIR3* of some hyperadherent clinical isolates. Our data show that the *SIR3* gene of these isolates contain several polymorphisms respect to strain BG14, and some of these changes are localized at positions that flank regions required for silencing in the Sir3 protein of *Saccharomyces cerevisiae*.

**Keywords:** Hyperadherence, *EPA* genes, biofilms, silencing.

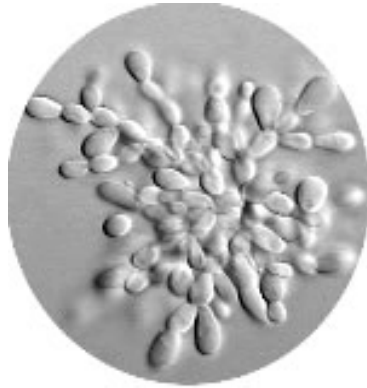


## ANTECEDENTES GENERALES

### 1. Generalidades biológicas de *Candida glabrata*

*Candida glabrata* es una levadura saprófita, que forma parte de la microbiota comensal de individuos sanos, es un residente normal del tracto digestivo y de la vagina, que por lo general no causa ningún daño. Cuando las condiciones ambientales son particularmente favorables (por ejemplo, en un clima cálido y húmedo) o si las defensas inmunitarias de una persona están debilitadas, la levadura puede infectar la piel; cuando se atenúa el sistema inmunológico por quimioterapias, cirugías o trasplantes de órganos, puede colonizar otros tejidos y causar enfermedades graves. Posee forma de blastoconidia (Figura 1) y es la única especie del género *Candida* que no forma pseudo-hifas a más de 37°C, aunque puede formarlas en respuesta a limitación de nitrógeno, una condición ambiental extrema (Csank & Haynes 2000). Las blastoconidias de *C. glabrata* miden de 1 a 4 µm y son más pequeñas que las de *Candida albicans*, que miden de 4 a 6 µm, y de las demás especies de *Candida*. *C. glabrata* forma colonias de color crema, lisas y brillantes, que son relativamente indistinguibles de las colonias de otras especies de *Candida*, excepto por su tamaño menor (Fidel *et al.* 1999).

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



### ***Candida glabrata***

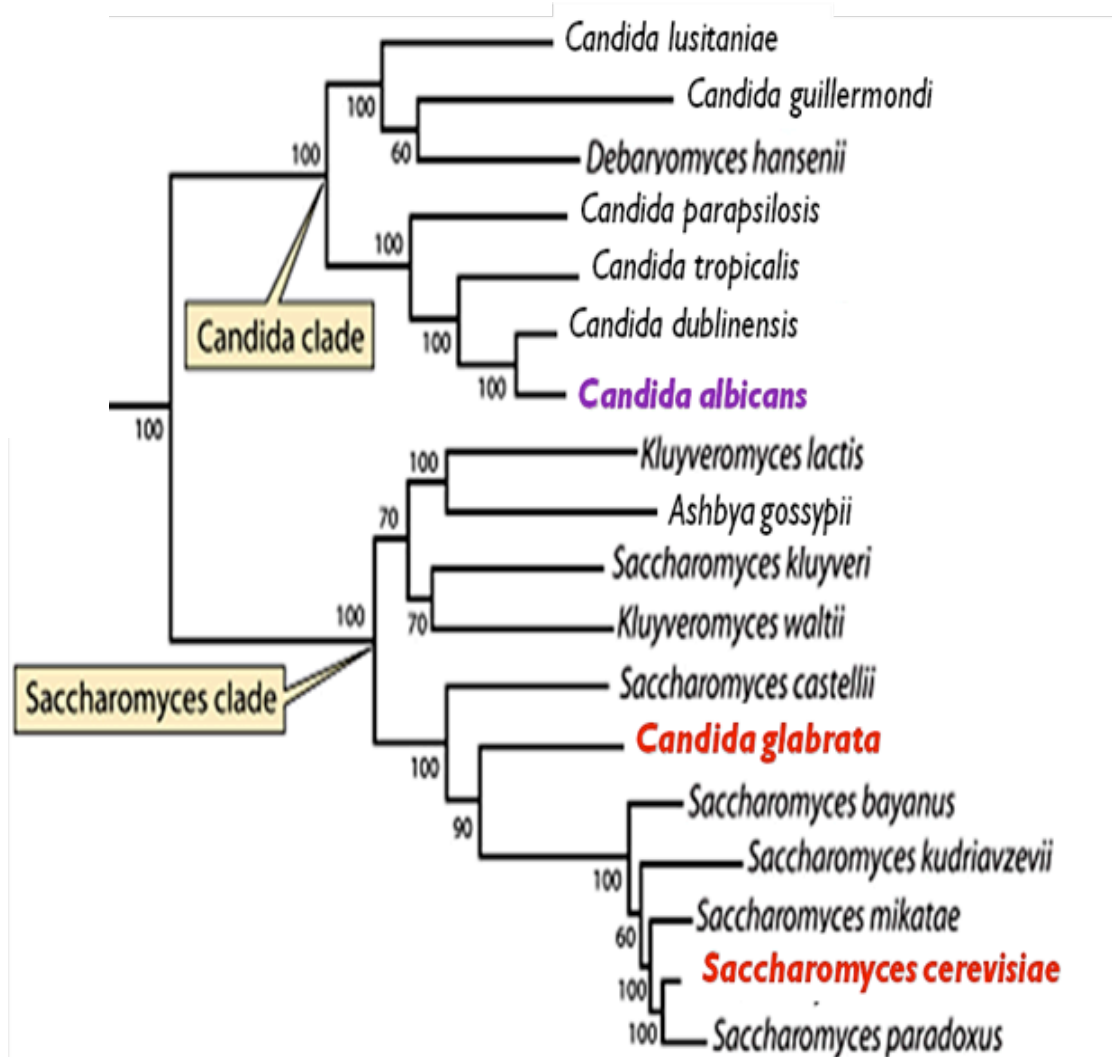
**Figura 1.** Blastoconidias. Estructuras de reproducción asexual que se originan por gemación en hongos levaduriformes como *C. glabrata*. Se crean gemaciones de manera repetida, formando cadenas y separadas por septos.

*C. glabrata* es una levadura haploide, filogenéticamente cercana a *Saccharomyces cerevisiae* que a *C. albicans* (Wong *et al.* 2003) por lo que todas las técnicas de biología molecular desarrolladas para *S. cerevisiae* se pueden utilizar en *C. glabrata* (Figura 2). Además es posible hacer estudios genéticos con facilidad ya que es haploide, y otra gran ventaja es que su genoma ha sido secuenciado en su totalidad y está disponible en bases de datos públicos.

El análisis del genoma de *C. glabrata* ha mostrado que es de un tamaño y contenido relativo de bases similares al de *S. cerevisiae*. El genoma de *Candida glabrata* es de 12.3 Mb y contiene 13 cromosomas, tiene un contenido G+C de 38.8% (Dujon *et al.* 2004). Cabe señalar que se ha descrito la presencia de rearrreglos cromosómicos en aislados clínicos de *C. glabrata* y esto está relacionado con la obtención de cepas resistentes a azoles.

En la naturaleza, *C. glabrata* y *C. albicans* sólo se asocian con mamíferos (Kaur *et al.* 2005). *Candida glabrata* es un organismo comensal en las mucosas (vaginal, oral e intestinal) de individuos sanos, sin embargo, cuando se atenúa el

sistema inmunológico por quimioterapias, cirugías o trasplantes de órganos, puede colonizar otros tejidos (retina, cerebro, riñones, corazón, piel, esófago, vías urinarias y/o sangre) y causar enfermedades graves (Castano *et al.* 2006).



**Figura 2.** *C. glabrata* es una levadura haploide, filogenéticamente mucho más relacionada con *S. cerevisiae* una levadura no patógena que a *C. albicans* que es una levadura diploide y patógena que pertenece al clado de las especies de *Candida* a diferencia de *C. glabrata* que pertenece al clado de *Saccharomyces*.

## 2. Epidemiología de *C. glabrata*

Existen más de 150 especies de *Candida*, aunque sólo 15 de ellas se reconocen como patógenas para el hombre (Pappas *et al* 2006). El género *Candida* es responsable del 11% de todas las infecciones sistémicas hospitalarias; más de la mitad de todas las candidiasis se deben a *C. albicans* y el 15% a *C. glabrata* (Almirante *et al.* 2005; Manzano-Gayosso *et al.* 2000; Trick *et al.* 2002). En México también se ha reportado que el 12% de las vulvovaginitis y el 13% de las infecciones sistémicas por *Candida* se deben a *C. glabrata* (Manzano-Gayosso *et al* 2000; Buitron *et al* 2002). *C. glabrata* es frecuentemente aislada de catéteres intravenosos, heces, orina, y mucosas de pacientes con HIV, con procesos oncológicos, pacientes de trasplante, diabéticos, con quemaduras graves y neonatos (Aisner *et al.* 1976; Hickey *et al.* 1983; Kao *et al.* 1999; Rangel Frausto *et al* 1999; Wingard *et al* 1993).

*C. glabrata*, se aísla tanto en infecciones intra-hospitalarias como en infecciones superficiales, fundamentalmente en candidiasis vulvovaginal (Fidel *et al.* 1996, Luo *et al.* 1999). En general, dentro del hospital, afecta a pacientes inmunocomprometidos o debilitados; se asocia al uso previo de antibacterianos y antifúngicos como fluconazol; puede ser portada en las manos del personal y asociarse a infección, en conjunto con otras especies de *Candida* (infección mixta) (Calderone *et al* 2002). Recientemente se ha reportado un incremento en el aislamiento de este agente en infecciones sistémicas (Pfaller *et al.* 2007). *C. glabrata* es el segundo agente en frecuencia aislado después de *C. albicans* en infecciones superficiales y característicamente se aísla con mayor frecuencia en candidiasis vulvovaginal recurrente, presentando además una mayor resistencia al fármaco fluconazol (Sobel *et al* 2007).

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

Aunque históricamente este microorganismo fue considerado como no patogénico, con el uso de la terapia antifúngica de amplio espectro, la frecuencia de infecciones superficiales y profundas por este agente ha aumentado significativamente en los últimos años, por lo que se considera un patógeno emergente.

El éxito de *C. glabrata* como patógeno se debe, en parte, a que posee varios factores de virulencia. A continuación se describen los principales.

#### 3.1 Resistencia a fluconazol

*C. glabrata* se aísla generalmente de pacientes que han recibido tratamiento antifúngico previo y se asocia a falla terapéutica por su mayor resistencia a fluconazol (Pfaller *et al.* 2004). Las infecciones por *C. glabrata* son difíciles de tratar; por sus características genéticas presenta resistencia innata a fármacos azólicos, principalmente a fluconazol. Debe solicitarse antifungigrama cuando se aísla esta levadura.

En *C. albicans* y en *C. glabrata* los azoles inhiben la enzima demetilasa de lanosterol 14 $\alpha$ , codificada por el gen *ERG11*, que participa en la biosíntesis de ergosterol (Morschhauser *et al.* 2009; Kaur, Domergue *et al.* 2005).

En *C. albicans*, los transportadores de la familia ABC (ATP-Binding Cassette) Cdr1 y Cdr2, así como el transportador Mdr1 de la familia MFS (Major Facilitator Superfamily) participan en la resistencia a los azoles. De manera similar, *C. glabrata* resiste a los azoles al incrementar la expresión de *CDR1*, *CDR2* (*PDH1*) y *ERG11*. El ortólogo en *C. glabrata* de *MDR1* confiere resistencia a los azoles cuando se expresa en *S. cerevisiae* (Morschhauser J., 2009; Kaur, Domergue *et al.* 2005).

Adicionalmente, el gen *PDR1* de *C. glabrata* es un factor de transcripción pleiotrópico de resistencia a fármacos que participa en la resistencia a estos compuestos, de manera similar a lo descrito en *S. cerevisiae*. En *C. glabrata*, Pdr1 incrementa la expresión de *CDR1* y *CDR2* (Morschhauser J., 2009; Kaur *et al.* 2005).

### **3.2 Resistencia a estrés oxidante**

Una gran variedad de patógenos tienen la capacidad de evadir el ataque oxidante de las células fagocíticas, por especies reactivas de oxígeno (ERO), esto mediante mecanismos enzimáticos y no enzimáticos que le permiten mantener niveles bajos de las ERO producidas naturalmente durante la respiración aeróbica. *In vitro*, *C. glabrata* es mucho más resistente que *C. albicans* y *S. cerevisiae* a altos niveles de peróxido de hidrógeno (Cuellar-Cruz *et al.* 2008) y puede evadir la muerte por células fagocíticas (Kaur *et al.* 2007). Esta resistencia a estrés oxidante depende de los factores de transcripción relacionados con estrés Yap1p, Skn7p, Msn2 y Msn4p (Cuellar-Cruz *et al.* 2008).

### **3.3 Hidrolasas**

En *C. albicans* las hidrolasas secretadas participan en su virulencia, sin embargo, hasta hace poco estas enzimas parecían ser menos importantes en la virulencia de *C. glabrata*. Las aspartil proteasas secretadas (SAPs, por sus siglas en inglés) de *C. albicans* se expresan durante la infección y se requieren para la virulencia en modelos de infecciones de mucosas y diseminadas (Naglik *et al.* 2004). El genoma de *C. glabrata* codifica varios ortólogos de los genes que codifican aspartil proteasas asociadas a glicosil fosfatidilinositol (GPI, por sus siglas en inglés) en *S. cerevisiae* llamadas yapsinas (genes *YPS*). Recientemente se mostró que células de *C. glabrata* en el interior de macrófagos incrementan la expresión de varios genes que codifican estas yapsinas. Los genes *YPS* de *C.*

*glabrata* participan en la integridad de la pared celular, adherencia a células de mamíferos y supervivencia en el interior de macrófagos (Kaur *et al.* 2007).

En *C. albicans*, la actividad de fosfolipasa B está implicada en su diseminación en el tracto gastrointestinal y en la sangre. El genoma de *C. glabrata* codifica tres genes de fosfolipasa B (*PBL*) con ortólogos en *S. cerevisiae*. *C. glabrata* posee actividad de fosfolipasa B (Kantarcioglu & Yucel 2002), pero no se ha determinado todavía su función en la virulencia.

### **3.4 Rearreglos cromosómicos**

En general, en eucariontes, la pérdida y ganancia de cromosomas es un fenómeno poco frecuente, por lo que tienden a conservarse bien su número y organización cromosómica. Sin embargo, en algunos parásitos protozoarios como *Leishmania* la pérdida y ganancia de cromosomas está relacionada con su elevada capacidad patogénica. Los cromosomas de aislados clínicos de *C. glabrata* difieren drásticamente en su estructura y organización, mostrando translocaciones en los brazos cromosómicos, duplicaciones de segmentos grandes y ocasionalmente cromosomas nuevos que incluyen genes relacionados con virulencia (Polakova *et al.* 2009).

La plasticidad que presenta el genoma de los aislados de *C. glabrata* correlaciona con su resistencia a anti fúngicos y se propone que la plasticidad es una ventaja para sobrevivir en un ambiente cambiante, tal como el de su hospedero humano (Polakova *et al.* 2009).

### **3.5 Formación de biofilms**

Otra característica que podría contribuir a la virulencia de *C. glabrata* es su alta capacidad para formar bio-películas en superficies de plástico debido a la expresión de los genes *EPA*. Se ha mostrado que la adhesina Epa6, es crucial para la formación de bio-películas, ya que la falta del gen *EPA6*, pero no de los

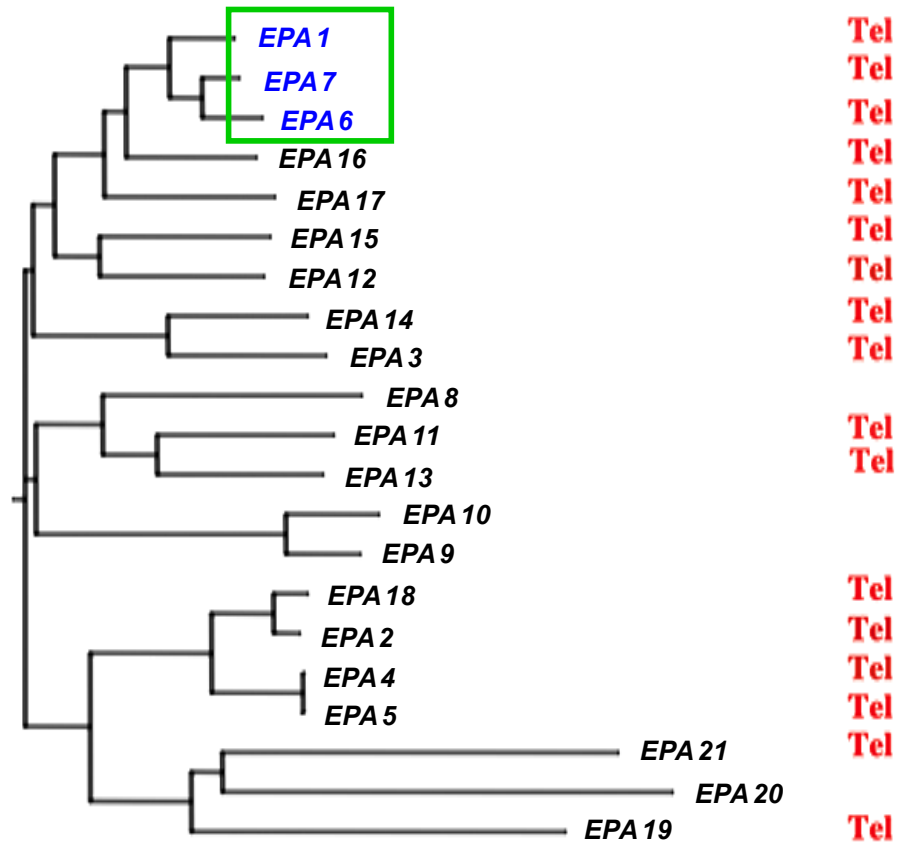
genes *EPA1-5*, disminuye la formación de bio-películas *in vitro*. Además, mutantes en el gen *SIR4*, que codifica para una de las proteínas que controlan el silenciamiento subtelomérico, muestran inducción transcripcional de los genes *EPA6* y *EPA7* y una capacidad aumentada para formar bio-películas *in vitro*. Estos resultados podrían tener implicaciones clínicas importantes, debido a que las infecciones por *C. glabrata* están asociadas con catéteres implantados (Iraqi *et al.* 2005).

### 3.6 Adherencia

La adherencia de las especies de *Candida* al tejido epitelial del hospedero es una característica importante de su virulencia. *C. albicans* se adhiere a células de mamífero por medio de las proteínas de pared celular que contienen sitio de ancla de glucosilfosfatidilinositol (GPI-CWPs, por sus siglas en inglés) Hwp1 (Hyphal cell wall protein) y Als1 (Agglutinin-like sequence) (Kaur *et al.* 2005).

*C. glabrata* se adhiere eficientemente a células epiteliales de mamíferos y esta capacidad depende, *in vitro*, de la proteína de pared celular Epa1 (Epithelial adhesin 1), codificada por el gen *EPA1*, que pertenece al grupo de las GPI-CWPs y se describe por primera vez la función de esta proteína en *C. glabrata* por Cormack y colaboradores en 1999 (Cormack *et al.* 1999). El genoma de *C. glabrata* tiene una familia de entre 17 y 23 genes parálogos de *EPA1*, dependiendo de la cepa (Figura 3). Algunos de estos codifican adhesinas funcionales, y la gran mayoría se ubican en regiones cercanas a los telómeros (subteloméricas). En la cepa silvestre BG14, todos los genes *EPA* subteloméricos cuya expresión se ha evaluado *in vitro* excepto *EPA1*, están silenciados por un mecanismo denominado silenciamiento subtelomérico o efecto por posición cercana al telómero (TPE por sus siglas en inglés), que se describirá más adelante (de Las Penas *et al.* 2003; Castano *et al.* 2005).





**Figura 3.** Filogenia de los genes *EPA* que codifican para las adhesinas subteloméricas en *C. glabrata*. La adhesina más importante es Epa1 seguida por Epa6 y Epa7, las cuales filogenéticamente son las más parecidas entre sí.

Los genes *EPA1* a 7 se ubican en cuatro telómeros de *C. glabrata* y están sujetos a silenciamiento subtelomérico controlado por las proteínas Sir, Rap1, Ku y Rif1 (de Las Penas *et al.* 2003; Castano *et al.* 2005). Mutantes de los genes *SIR*, *RAP1*, *HDF1* y *RIF1* eliminan el silenciamiento subtelomérico de algunos genes *EPA*, y las células se vuelven hiperadherentes en condiciones en las que *EPA1* no se expresa, debido a la expresión de varios genes *EPA* (Castano *et al.* 2005; Rosas-Hernandez *et al.* 2008).

La expresión de las adhesinas es importante para la virulencia de *C. glabrata in vivo*, pues al utilizar un modelo murino de infección sistémica, se observó que una mutante nula del gen *SIR3* coloniza mejor el riñón que la cepa silvestre (Castano *et al.* 2005). Además, una cepa que carece de los genes *EPA1*, *6* y *7* no coloniza eficientemente la vejiga de ratones infectados en vías urinarias (Domergue *et al.* 2005). Finalmente, debido a la deficiencia de ácido nicotínico (precursor de NAD<sup>+</sup>) en la orina, el gen *EPA6* se induce en la vejiga y el riñón durante una infección de vías urinarias de ratón. Este efecto se debe a que la desacetilasa de histonas Sir2 requiere como cofactor NAD<sup>+</sup> para silenciar las regiones subteloméricas donde se encuentra *EPA6* (Domergue *et al.* 2005).

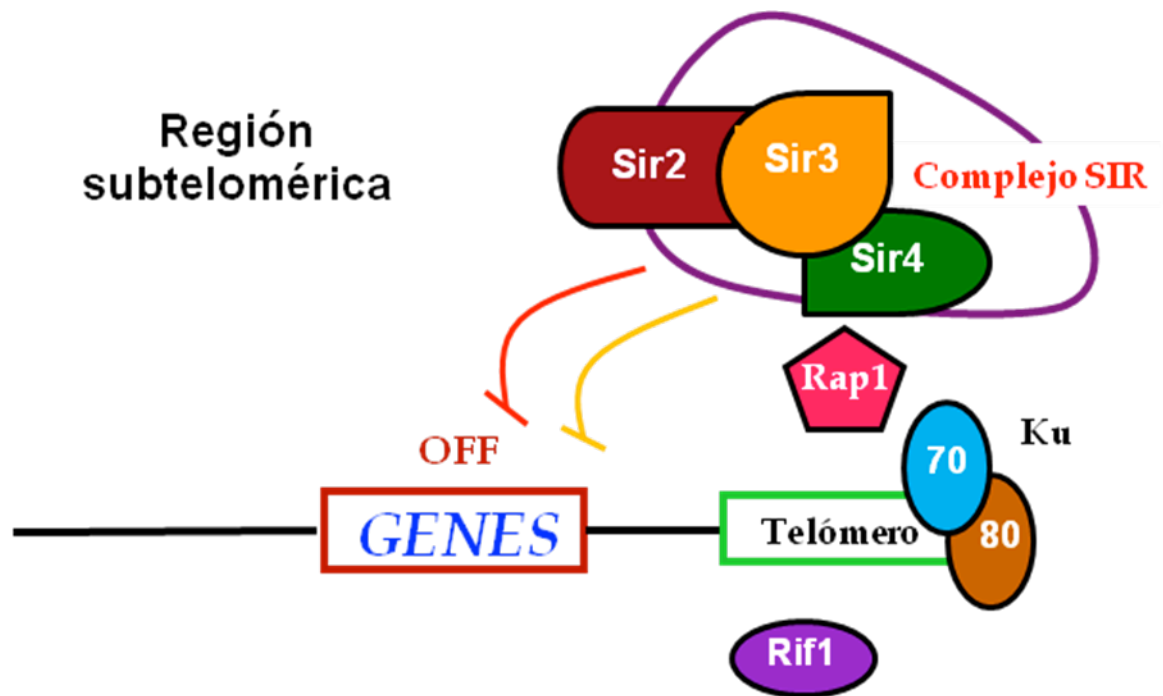
#### **4. El silenciamiento subtelomérico**

##### **4.1 El silenciamiento subtelomérico en *C. glabrata***

Resultados de nuestro laboratorio muestran que la cepa BG14 posee cuatro regiones subteloméricas que albergan los genes codificantes de adhesinas *EPA1* a *7*, las cuales están sujetas a silenciamiento (Figura 4). Esto se determinó al analizar la expresión o represión del gen reportero *URA3* insertado en regiones intergénicas de los genes *EPA* y entre los genes *EPA* y sus telómeros. Para ello se utilizaron cepas de *C. glabrata* cuyo gen endógeno *URA3* se eliminó completamente (genotipo *ura3Δ*) y en un paso posterior, se les insertó el gen *URA3* como reportero de la estructura de la cromatina, utilizando el transposón Tn7-*URA3* modificado (Castano *et al.* 2003).

El silenciamiento subtelomérico en *C. glabrata* se puede establecer de manera eficiente hasta una distancia de ~24 Kb del telómero (Rosas-Hernandez *et al.* 2008). Estudios sistemáticos con mutantes nulas de genes de la maquinaria de silenciamiento subtelomérico, muestran que Rap1p y Sir2, 3 y 4 son esenciales para el silenciamiento de las regiones subteloméricas de los cromosomas E-R, I-R, C-L y C-R, sin embargo, el requerimiento de las proteínas yKu70, yKu80 y Rif1 varía

en estas regiones (Figura 4) (de Las Penas *et al.* 2003; Castano *et al.* 2005; Rosas-Hernandez *et al.* 2008).



**Figura 4.** Complejo proteico de la maquinaria del silenciamiento de genes subteloméricos en *C. glabrata*.

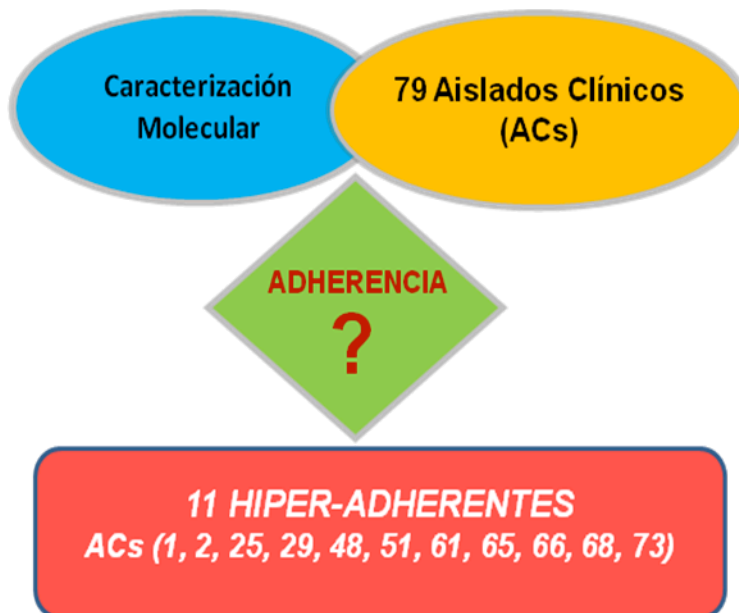
El patrón de expresión de los genes *EPA1-7* en mutantes nulas para las proteínas Ku (*hdf1Δ* y *hdf2Δ*), muestra que hay una des-represión de los genes *EPA4/ EPA5, EPA6* y *EPA7*, pero no de *EPA1, EPA2* y *EPA3*. En cambio, en mutantes *sir2Δ, sir3Δ* y *sir4Δ* hay una expresión simultánea de todos los genes *EPA* analizados, lo que sugiere que todas las proteínas Sir se requieren en todos los telómeros estudiados para mantener el silenciamiento subtelomérico. Sin embargo, las proteínas Ku no se requieren para establecer el silenciamiento en el telómero E<sub>R</sub>, donde se encuentran *EPA1, EPA2* y *EPA3*. De manera que la expresión del gen reportero *URA3* insertado en las regiones subteloméricas

mencionadas, correlaciona con la expresión de los genes *EPA* nativos de estas regiones (Rosas-Hernandez *et al.* 2008; Juárez-Reyes *et al.* 2012).

Otra evidencia sobre el papel de las adhesinas Epa en la virulencia de cepas de *C. glabrata*, es el trabajo de Halliwell y colaboradores (Halliwell *et al.* 2012). Este trabajo muestra, que existe una elevada heterogeneidad en la expresión de la adhesina Epa1 entre diferentes cepas de *C. glabrata*. Incluso en una misma población de células de *C. glabrata* existen dos subpoblaciones, una que expresa gran cantidad de Epa1 y otra que expresa poca. El principal mecanismo de regulación de la expresión de Epa1 en la cepa BG2 es el silenciamiento mediado por las proteínas Sir, sin embargo esto no sucede en la cepa CBS138. En esta última hay un silenciamiento ineficiente, el cual no se debe a diferencias en el gen *EPA1* o en la longitud de los telómeros, sino probablemente a la presencia de un alelo de *SIR3* menos eficiente o que se expresa a bajos niveles, ya que se observa que la expresión ectópica en la cepa CBS138 de su propio *SIR3* incrementa el silenciamiento en esas células y disminuye casi en su totalidad la expresión de Epa1 en esas células.

## ANTECEDENTES DIRECTOS

En un estudio cualitativo previo se encontró que en la colección de 79 aislados clínicos de *C. glabrata* que posee el laboratorio, existen al menos 11 aislados que presentan mayor capacidad de adhesión que la cepa silvestre BG14 en condiciones en las que Epa1 no se expresa. Además, algunos aislados hiperadherentes presentaron un patrón de sobre-expresión de varias adhesinas, lo que podría indicar que la regulación global por silenciamiento subtelomérico es menos eficiente en estos aislados hiperadherentes. Inicialmente amplificamos algunos de los genes de la maquinaria del silenciamiento (*SIR2*, *SIR3*, *SIR4*, *HDF1*, *HDF2*) para detectar polimorfismos con dos enzimas de restricción que cortan frecuentemente (Tsp509 y Sau3A) y encontramos que algunos de estos aislados clínicos presentan polimorfismos en los genes *HDF1*, *SIR3* y *SIR4*. Esto podría indicar la presencia de cambios en la secuencia de amino ácidos en los genes que presentan estos polimorfismos y que podrían afectar el grado de silenciamiento subtelomérico y en consecuencia la expresión de los genes *EPA*.



Genes sub-teloméricos estudiados	Aislados clínicos que poseen polimorfismos en fragmentos de restricción
<i>HDF1</i> (Ku70p)	MC25, MC29, MC65
<i>SIR3</i>	MC29, MC68
<i>SIR4</i>	MC48, MC66
<i>SIR2, HDF2</i> (Ku80p)	-----

**Tabla1.** Existen aislados clínicos de *C. glabrata* que son hiperadherentes y algunas de ellas presentan polimorfismos genéticos en genes del silenciamiento subtelomérico.

## PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Se ha propuesto que la adherencia es una característica importante para la virulencia de varios organismos patógenos como *C. albicans* y *C. glabrata*, ya que mutantes de *C. glabrata* que no son capaces de adherirse a células epiteliales [(*epa1,6,7*) $\Delta$ ] tienen una colonización disminuida en la vejiga en modelos murinos de infección de vías urinarias (Domergue *et al.* 2005).

En el fondo genético de la cepa BG14, la expresión de la gran mayoría de las adhesinas está controlada negativamente por el silenciamiento subtelomérico, de manera que no hay expresión detectable de ella en condiciones *in vitro*.

Nos preguntamos si dentro de una colección de aislados clínicos de diferentes orígenes, había algunos que tuvieran mayor capacidad de adhesión tanto a células epiteliales como a superficies inertes. Además nos preguntamos si la mayor adhesión correlaciona con una mayor expresión de varias de las adhesinas que median adherencia a estos sustratos, y si estos aislados contienen mutaciones en algunas proteínas del silenciamiento.

## HIPÓTESIS

La hipótesis del presente trabajo es que los aislados clínicos de *C. glabrata* que presentan una mayor adherencia a células epiteliales y/o superficies inertes, sobreexpresan varias adhesinas, probablemente debido a mutaciones en alguna o algunas de las proteínas del silenciamiento.

## **ESTRATEGIA**

Para comprobar que existen cambios en los fenotipos de estos aislados clínicos se procedió a realizar una caracterización molecular de los mismos y se evaluó su capacidad para adherirse a células HeLa, la capacidad para formar biofilms en superficies inertes como el plástico y además se secuenciaron algunos genes de la maquinaria del silenciamiento en busca de cambios genéticos en algunos de estos genes.

## **OBJETIVO GENERAL**

El objetivo principal de este proyecto es, la determinación cuantitativa de la capacidad de adherencia de una colección de 79 aislados clínicos de nuestro laboratorio, e investigar cuales son los mecanismos moleculares que median el fenotipo de hiperadherencia en algunos de estos aislados clínicos. Para ello analizaremos la expresión de varios genes que codifican adhesinas, y posibles mutaciones en algunos de los genes de la maquinaria del silenciamiento subtelomérico de las adhesinas (*HDF1* y *SIR3*).



## OBJETIVOS PARTICULARES

1. Determinar de manera cuantitativa la adherencia de los aislados clínicos clasificados como hiperadherentes, algunos no adherentes comparados con la cepa silvestre (BG14), y cepas mutantes en genes *EPA* específicos o en genes de la maquinaria del silenciamiento.
2. Evaluar la capacidad de formación de biofilms en superficies inertes (plástico) de todas las cepas bajo estudio (aislados clínicos hiperadherentes, no adherentes, mutantes en genes de la maquinaria del silenciamiento y mutantes en genes *EPA*).
3. Determinar por RT-PCR el patrón de expresión *in vitro* de los genes *EPA* que codifican para adhesinas en *C. glabrata*, en cultivos en fase estacionaria donde no hay expresión de los genes *EPA* en la cepa BG14.
4. Secuenciar los genes *HDF1* y *SIR3* de los aislados clínicos hiperadherentes que presentan un patrón de restricción diferente en estos genes, identificar posibles cambios (polimorfismos), comparados con la secuencia de la cepa silvestre BG14, que pudieran afectar la función de silenciamiento normal de estas proteínas.

## RESULTADOS

**From:** "Mycopathologia (MYCO)" <[kaushika.mahesh@springer.com](mailto:kaushika.mahesh@springer.com)>

**Subject:** MYCO-D-12-02219R1 - Editor Decision

**Date:** January 27, 2013 8:07:59 PM CST

**To:** Irene Castaño <[icastano@ipicyt.edu.mx](mailto:icastano@ipicyt.edu.mx)>

Dear Dr. Castaño,

We are pleased to inform you that your manuscript,

**"Sir3 polymorphisms in Candida glabrata clinical isolates."**, has been accepted for publication in

Mycopathologia.

You will receive an email from Springer in due course with regards to the following items:

1. Offprints
2. Colour figures
3. Transfer of Copyright

Please remember to quote the manuscript number, MYCO-D-12-02219R1, whenever inquiring about your manuscript.

With best regards,

K.-Y. Yuen

Editor

Mycopathologia

**Submissions with an Editorial Office Decision for Author Irene Castaño**

Page: 1 of 1 (1 total completed submissions)

Display  results per page.

Action	Manuscript Number	Title	Initial Date Submitted	Status Date	Current Status	Date Final Disposition Set	Final Disposition
<a href="#">Action Links</a>	MYCO-D-12-02219	Sir3 polymorphisms in Candida glabrata clinical isolates.	19 Nov 2012	27 Jan 2013	Accept		

Page: 1 of 1 (1 total completed submissions)

Display  results per page.

## Sir3 polymorphisms in *Candida glabrata* clinical isolates.

Verónica Martínez-Jiménez<sup>1</sup>, Candy Y. Ramírez-Zavaleta<sup>1</sup>, Emmanuel Orta-Zavalza<sup>1</sup>, Gabriel Díaz de León<sup>1</sup>, Guadalupe Gutiérrez-Escobedo<sup>1</sup>, Alfredo Ponce de León<sup>2</sup>, José Sifuentes-Osorio<sup>2</sup>, Miriam Bobadilla del Valle<sup>2</sup>, Alejandro De Las Peñas<sup>1</sup> and Irene Castaño<sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup> IPICYT, División de Biología Molecular, Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, Camino a la Presa San José, #2055, Col. Lomas 4ª. San Luis Potosí, San Luis Potosí 78216, México.

<sup>2</sup> Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición “Salvador Zubirán” (INNSZ).

Vasco de Quiroga 15, Belisario Domínguez Sección 16, México DF, Mexico

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

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

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65

## Abstract

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65

The opportunistic fungal pathogen *Candida glabrata* adheres tightly to epithelial cells in culture, mainly through the adhesin Epa1. *EPA1* is the founding member of a family of up to 23 putative adhesin-encoding genes present in the *C. glabrata* genome. The majority of the *EPA* genes are localized close to the telomeres, where they are repressed by subtelomeric silencing that depends on the Sir, Ku, Rif1 and Rap1 proteins. *EPA6* and *EPA7*, also encode functional adhesins that are repressed in vitro. *EPA1* expression in vitro is tightly controlled both positively and negatively, and in addition, presents high cell-to-cell heterogeneity, which depends on Sir mediated silencing. In this work we characterized the ability to adhere to HeLa epithelial cells and the expression of several *EPA* genes in a collection of 79 *C. glabrata* clinical isolates from several hospitals in Mexico. We found 11 isolates that showed increased adherence to mammalian cells compared to our reference strain under conditions where *EPA1* is not expressed. The majority of these isolates displayed over-expression of *EPA1* and *EPA6* or *EPA7*, but did not show increased biofilm formation. Sequencing of the *SIR3* gene of several hyper-adherent isolates revealed that all of them contain several polymorphisms with respect to the reference strain. Interestingly, two isolates have polymorphisms in positions flanked by clusters of amino acids required for silencing in the *Saccharomyces cerevisiae* Sir3 protein. Our data shows that there is a large variability in adhesin expression and adherence to epithelial cells among different *C. glabrata* clinical isolates.

**Keywords.** *Candida glabrata*, clinical isolate, *EPA* genes, adherence, Sir3 polymorphism, biofilm.

## Introduction

*Candida glabrata* has emerged recently as the second most frequent species of *Candida* isolated from blood stream infections in the US, second only to *Candida albicans* [1]. One of the characteristics thought to be important to establish successful infections is the ability of *C. glabrata* to adhere tightly to epithelial cells *in vitro* [2]. This *in vitro* adherence is primarily mediated by the Epa1 adhesin, a cell wall protein that belongs to a large family of putative adhesins encoded by the *EPA* genes. In our reference strain BG14 [3], the vast majority of the *EPA* genes are not expressed *in vitro* except *EPA1* and its expression is tightly regulated both positively and negatively [4]. Most of the *EPA* genes (including *EPA1*) are subject to subtelomeric silencing because they are localized close to the telomeres in *C. glabrata*. Silencing at these regions is mediated by the silencing proteins Sir2, Sir3, Sir4, Ku70, Ku80 (encoded by the *HDF1* and *HDF2* genes respectively), Rap1 and Rif1 [5, 6].

The *EPA* gene family consists of 17 to 23 members depending on the strain, and besides *EPA1*, at least two other genes have been shown to encode functional adhesins, *EPA6* and *EPA7* [5]. Epa1, Epa6 and Epa7 adhesins have different carbohydrate binding specificities and also differ in their ability to bind endothelial and epithelial cells depending on the carbohydrates exposed at the mammalian cell surface [7, 8].

*EPA6* is transcriptionally repressed *in vitro*, but is induced *in vivo* in a murine model of urinary tract infection (UTI). Together with Epa1, Epa6 and Epa7 play an important role in adhesion to uroepithelial cells [9]. Epa1, Epa6 and Epa7 have also been shown to be required for efficient kidney colonization in a disseminated model of infection [5]. Silencing of the *EPA1*, *EPA6* and *EPA7* genes is regulated by environmental signals through Sir2, which is a nicotinamide adenine dinucleotide (NAD<sup>+</sup>) dependent histone deacetylase. Limiting concentrations in the urine of nicotinic acid (NA), a precursor of NAD<sup>+</sup>, leads to decreased histone deacetylase activity of Sir2 (since *C. glabrata* is a NA auxotroph), thereby de-repressing *EPA1*, *EPA6* and *EPA7* [9]. Sir3 plays also an important role in the expression of *EPA1* [4]. Additionally, it has been shown that in certain strains like BG14 (and some clinical isolates), *EPA1* is subject to high gene expression heterogeneity due to Sir mediated transcriptional silencing. This heterogeneity consists of large cell-to-cell variations in *EPA1* expression levels in strains where silencing is efficient, while in other strains where silencing is less efficient (strain CBS138 [www.genolevures.org/cagl.html](http://www.genolevures.org/cagl.html)) there is homogeneous expression of *EPA1*, and over-expression of Sir3 increases heterogeneity [10].

Differences in the expression at the cell surface of many Epa adhesins during different growth phases and among *C. glabrata* strains have been previously found [11], and it is thought that this variation might endow *C. glabrata* with the ability to adhere to a wide variety of cell types and plastic surfaces under different environmental conditions. However, no correlations have been established between epithelial cell adherence and adhesion to plastic with differential *EPA* gene expression and subtelomeric silencing, among various strain backgrounds of *C. glabrata*.

In an effort to better understand the importance of *EPA* gene expression in clinical isolates for adherence to epithelial cells, in this work we have analyzed the adherence phenotype of 79 clinical isolates under conditions where Epa1 is not expressed. We

found 11 isolates that display various degrees of increased adhesion to epithelial cells with respect to BG14 strain, but show the same ability to adhere to plastic. Interestingly, all of these hyper-adherent isolates overexpress at least two of the five *EPA* genes analyzed, and in addition, many of these strains contain several polymorphisms in Sir3 relative to BG14.

## Materials and Methods

**Strains and oligonucleotides.** All the strains and clinical isolates are described in Table 1. The oligonucleotides used for sequencing and RT-PCR are listed in Table 2.

**Media.** Yeast were grown at 30°C in standard rich media YPD (Yeast extract-peptone-dextrose) medium contains 10 g/liter yeast extract, 20 g/liter peptone and supplemented with 2% glucose and 2% agar when solid media was needed. Casaminoacids media (CAA) contains 1.7 g/liter yeast nutrient base (without NH<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> and amino acids), 5 g/liter NH<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> supplemented with 0.6% casamino acids and 2% glucose.

HeLa (cervical carcinoma epithelial cells) were cultured in 24-well plates (Corning Costar) in Dulbecco Eagle Modified Medium (GIBCO, Invitrogen) or L-15 [12] supplemented with 10% fetal bovine serum until the monolayer reached confluence. Media was removed by aspiration and cells were fixed by adding para-formaldehyde 3.7% in PBS for 30 min. Each well was washed three times with PBS and then 1 mL of sterile PBS with Penicillin 100 U/mL and Streptomycin 100 µg/mL (Sigma) was added for long time storage (several months) at 4°C.

**Adherence assays.** Yeast cells from each strain were grown to stationary phase in YPD (48 hrs) and the OD<sub>600</sub> of all cultures was adjusted to 1 with HBSS supplemented with 5mM CaCl<sub>2</sub>. One mL of each cell suspension was added to each well of the 24-well plates containing the previously fixed HeLa cells. The plates were spun for 1 min and then incubated at room temperature for 1hr. Cells that did not adhere to the HeLa monolayer were washed four times with HBSS with CaCl<sub>2</sub>. Cells that remained adhered to the HeLa cells were recovered by lysing the epithelial cells with 0.5 mL of 0.1% triton, 0.5% SDS, 10mM EDTA in PBS. Yeast cells were scraped off the well and serial dilutions were made in distilled water. CFU of both adherent and input cells were obtained by plating 200µL of the appropriate dilutions of each strain on YPD. Percentage adherence was calculated by dividing CFU of adherent cells over the CFU of input cells of each strain and multiplied times 100.

**RT-PCR.** RNA was extracted from stationary cultures of each strain (grown for 48 hrs in YPD), using the TRIzol reagent (Invitrogen) according to the manufacturer's recommendations and treated with DNase I (Sigma-Aldrich). cDNA synthesis and PCR was performed with the AccessQuick reverse transcription-PCR system (Promega) as previously described [13]. RT and PCR primers (Rv and Fw) are described in Table 2. cDNA synthesis was performed at 52°C for *EPA1*, 55°C for *EPA6* and *EPA12*, at 57°C for *EPA3*, *EPA7* and *ACT1*. A reaction without reverse transcription was included for each pair of primers and no bands were obtained indicating that the RNA samples had no DNA contamination. These experiments were performed at

least two or three separate times each using different RNA extractions. The experiment shown in Fig. 3 is reproducible and shows a representative experiment. The only exception is clinical isolate MC66 where the independent RT-PCR experiments were not fully reproducible. The bands were quantified using the program Quantity One 1-D Analysis Software (BioRad) and mean values from independent experiments are shown in Table 3.

**Biofilm formation.** We used the microtiter plate model previously described with some modifications [14]. Briefly, all strains were grown in CAA medium supplemented with 50 mg/mL of uracil to stationary phase (48 hrs). The OD<sub>600</sub> was adjusted to 1 in CAA (without glucose) liquid medium supplemented with 0.2% glucose and 50 mg/mL uracil; 100 µL of cell suspension were incubated for 24 h at 37°C in individual wells of a 96-well polystyrene microtiter plates (round bottom). Non-adherent cells were then washed three times with sterile water and once with PBS. The remaining adherent cells were quantified by the previously described XTT reduction assay [15]. A solution of XTT-menadione was prepared as follows: 0.5 mg/mL of XTT in PBS was either freshly made or a previously frozen aliquot thawed, and menadione to 1 µM was added. 100 µL of the XTT-menadione were added per well and the plate was incubated at 37°C for 2 h in a plate reader (Benchmark Plus, BioRad) where the reduction of XTT was measured at 492 nm.

**Statistical Analysis.** Statistical analysis was performed by ANOVA. The *P* value was calculated by Dunnett multiple comparisons tests. A *P* value ≤ 0.05 was considered significant. In Fig. 1 and Fig. 2, a *P* < 0.05 was indicated with \*; and *P* < 0.01 with \*\*.

**Sequencing of *HDF1* and *SIR3* from clinical isolates.** Genomic DNA from the indicated hyper-adherent clinical isolates was extracted and *SIR3* gene was PCR amplified using high fidelity Expand Long template PCR system (Roche) using primers 54 and 55 (Table 2). The 5.238 kb products were purified using Qiaquick columns (Qiagen) and then sequenced with primers 108, 109, 367, 368, 369, 397, 1102, 1103, 1159, 1281 and 1265 (Table 2).

#### **GenBank Accession Numbers.**

GenBank Accession Numbers for the entire *SIR3* gene for each of the hyper-adherent clinical isolates are: MC2: KC146845; MC25: KC146846; MC29: KC146847; MC39: KC146848; MC48: KC146849; MC56: KC146850; MC65: KC146851; MC68: KC146852.

## **Results**

### ***Candida glabrata* clinical isolates display various levels of adherence to epithelial cells *in vitro*.**

The ability to adhere to mammalian epithelial cells is thought to be an important step for colonization and virulence of the opportunistic fungus *Candida glabrata*. To begin the molecular characterization of a collection of 79 clinical isolates obtained from three hospitals in Mexico (Table 1), we first performed a qualitative adherence assay of each isolate to previously fixed HeLa epithelial cells (see Materials and Methods). In this way, we identified those clinical isolates that displayed high capacity



to adhere to epithelial cells in vitro in stationary phase cultures, which is a condition where Epa1, the major adhesin in our reference strain BG14 [3], is not expressed and cells are non-adherent [5, 4]. We found that 11 of the 79 clinical isolates analyzed showed higher capacity than strain BG14 to adhere to HeLa cells; that is, these isolates display a “hyper-adherent” phenotype relative to the BG14 strain in these conditions (data not shown).

We then determined quantitatively the adherence displayed by each of the 11 clinical isolates in stationary phase cultures, and classified them into three categories according to the level of adherence. Under these conditions strain BG14 shows no adherence (<3% adherence) (See Fig. 1). Clinical isolates that showed from 10 to 15% adherence to HeLa cells were classified as slightly hyper-adherent, isolates that presented 23 to 45% adherence were classified as moderately hyper-adherent, and one isolate that displayed > 45% adherence was designated highly hyper-adherent (Fig. 1). It is noteworthy that the sequenced strain CBS138 (<http://www.genolevures.org/cagl>) shows a hyper-adherent phenotype under these conditions relative to strain BG14. Accordingly, CBS138 was classified as a moderately hyper-adherent (adherence level between 25-45%), along with eight other clinical isolates (Fig. 1).

For comparison, from the collection of clinical isolates we selected two independent isolates that are non-adherent, similar to strain BG14 (isolates MC39 and MC56) (Fig. 1).

As a control, we determined that adherence levels of single, double and triple mutants in *EPA1*, *EPA6* and *EPA7* as well as *EPA* mutants in a *sir3Δ* background (Online Resource 2). These experiments indicate that adherence to HeLa cells in the BG14 background is mainly due to Epa1, and in the *sir3Δ* mutant, the hyper-adherence is probably due to overexpression of Epa1, (and also probably Epa6 and Epa7), since in the quadruple mutant *sir3Δ, epa(1, 6, 7)Δ*, there is almost no detectable adherence (Online Resource 2).

#### **Hyper-adherent clinical isolates do not show higher capacity to form biofilms.**

We then asked whether the eleven hyper-adherent clinical isolates are more efficient at forming biofilms on plastic surfaces than strain BG14 using the microtiter plate model (Materials and Methods). As shown in Fig. 2, none of the eleven isolates displayed a significantly higher capacity to form biofilms than the BG14 strain, regardless of the level of adherence to epithelial cells, and including the non-adherent isolates MC39 and MC56. The only strain showing a significantly higher ability to form biofilms, is strain CBS138 (Fig. 2). Instead, MC66 (a moderately hyper-adherent isolate) displayed strongly reduced biofilm formation. Therefore there is no obvious correlation between adherence to epithelial cells and adherence to plastic surfaces among these clinical isolates. Control experiments using different mutants in the *EPA* genes, confirmed that *EPA6* is required for efficient biofilm formation in this model and that in the *sir3Δ* strain, there are probably other adhesins induced since deletion of *EPA1*, *EPA6* and *EPA7* does not significantly decrease biofilm formation (Online Resource 3).

**Hyper-adherent clinical isolates in stationary phase cells overexpress two or more *EPA* genes.**

In strain BG14, adherence to epithelial cells is mediated primarily by *Epa1*, *Epa6* and *Epa7*, while biofilm formation depends mainly on *Epa6*, although *Epa3* is induced in biofilms, raising the possibility that *Epa3* might play a role in this process [5, 14, 16]. We determined by semi-quantitative RT-PCR whether some of the major adhesins were over-expressed in these hyper-adherent clinical isolates relative to strain BG14 in stationary phase. The *EPA* genes we analyzed are all localized close to their respective telomeres except *EPA1*, which is located approximately 24 kb from the right telomere of chromosome E, but it is also regulated by subtelomeric silencing [4].

In this analysis we included for comparison the two non-adherent clinical isolates MC39 and MC56. As shown in Fig. 3, we could not detect expression on any of the five *EPA* genes we analyzed (*EPA1*, *EPA3*, *EPA6*, *EPA7* and *EPA12*) in either of the non-adherent isolates.

As can be seen in Fig. 3 and Table 3, expression of *EPA1* in hyper-adherent clinical isolates is generally slightly higher than the expression found in strain BG14 with the exception of MC73 and MC66 which may express roughly the same amount or slightly lower levels of this gene, although this difference is not statistically significant (Table 3). In contrast, we did not detect expression of *EPA3*, which is ~ 5 kb away from the right telomere on chromosome E, in most of the clinical isolates except for MC68, MC29 and MC66, as well as CBS138, all of which show high expression levels of this gene. Interestingly all of these isolates, including reference strain CBS138 belong to the same class of moderately hyper-adherent isolates adherent. With respect to *EPA6* (localized ~ 4.5 kb from the left telomere in chromosome E), we found higher levels of *EPA6* expression in almost all the hyper-adherent clinical isolates, particularly MC65, MC68, MC29 and CBS138; the rest of the isolates MC25, MC1, MC51, MC61, MC73, MC48 and MC2, display slightly elevated levels of *EPA6* mRNA (Fig. 3 and Table 3). *EPA7* is ~ 4.5 kb from the right telomere in chromosome E, and its expression was higher in MC65, MC1, MC29, MC51, MC61, MC48 and MC2 hyper-adherent isolates and in CBS138 as compared to strain BG14, while MC68, MC66 and MC73 show roughly the same or decreased levels of *EPA7* mRNA than BG14. *EPA12* gene is localized at approximately 14 kb from the left telomere in chromosome M, and we found that expression of this gene is similar or slightly higher in the moderately hyper-adherent isolates, particularly in MC68, CBS138 and MC48 relative to strain BG14. Most of these differences in *EPA* gene expression are statistically significant (Table 3). As a control, we determined the levels of each transcript in a *str3Δ* strain, and we found that the mRNA levels of *EPA3*, *EPA6* and *EPA7* are higher than in the parental BG14 strain, while *EPA1* shows a modest increase compared to BG14.

Therefore, in general, all the hyper-adherent clinical isolates over-express two or more of the major adhesin genes (generally *EPA6*, *EPA7* and or *EPA1*), while in the non-adherent isolates we could not detect expression of any of the 5 *EPA* genes analyzed.

***SIR3* genes from hyper-adherent clinical isolates contain several polymorphisms.**

Since most of the hyperadherent clinical isolates simultaneously over-express two or more subtelomeric adhesins in stationary phase cultures (particularly MC29 and MC68, but also MC25, MC65, MC1, MC51, MC61, MC48 and MC2), we considered that they might have an inefficient silencing machinery, possibly due to defective or less efficient silencing proteins, like the Sir, Rif1 or the Ku proteins.

We initially PCR-amplified *SIR3* and *HDF1* (which encodes yKu70) from isolates MC25, MC65 (slightly hyper-adherent), MC29 and MC68 (moderately hyper-adherent), and found by restriction analysis that they contained polymorphisms in these genes (Data not shown). We then sequenced the complete *HDF1* gene from isolates MC29 and MC68 which overexpress almost all the *EPA* genes we analyzed; even though we found three polymorphisms that generated the extra restriction site, these did not produce amino acid changes (Data not shown). We then sequenced the entire *SIR3* gene from the two non-adherent clinical isolates, MC39 and MC56; the two form the slightly hyper-adherent class: MC25 and MC65; three isolates form the moderately hyper-adherent MC29, MC48 and MC68 and the only highly hyper-adherent isolate, MC2. The results of this analysis are shown in Fig. 4 where we indicate the positions of the different alleles we found in the clinical isolates. We compared all sequences to our reference strain BG14, which shows strong epigenetic silencing of the *EPA* genes and we considered this as “wild-type”; we also compared with the *SIR3* gene from the sequenced strain CBS138, which shows a hyper-adherent phenotype and overexpresses all the *EPA* genes analyzed. As can be seen in Fig. 4, the Sir3 protein from all the hyper-adherent isolates contain 4 or more amino acid changes with respect to BG14. Strain CB138, contains only 3 polymorphisms, and these 3 changes (S236T, N268H and I503L) are also present in the rest of the hyper-adherent isolates with only one exception, isolate MC68, which like BG14, contains S236. The non-adherent isolate MC39 interestingly, does not contain any of these three mutations present in CBS138; instead it has another polymorphism, E486K, also shared by some hyper-adherent isolates. The other non-adherent isolate (MC56) contains 4 mutations with respect to BG14, the same 3 polymorphisms as CB138 and allele T919N shared by only one of the hyper-adherent strains, isolate MC48. Therefore there is no obvious correlation between the level of adhesion to epithelial cells in vitro, adhesins expressed and specific Sir3 allele.

**Discussion**

*Candida glabrata* is able to colonize the mucosal tissues and internal sites of immunosuppressed hospitalized patients. The ability to adhere is thought to be important for persistence within the host. In this work, we determined the adherence level, biofilm formation and expression of adhesin-encoding genes (*EPA*) in a collection of 79 clinical isolates obtained from three hospitals in Mexico. In addition we determined whether these phenotypes correlated with each other and with polymorphisms we found in the silencing protein Sir3.

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65

### **Biofilm formation and hyper-adherence phenotypes do not correlate.**

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65

We found that eleven out of seventy nine *C. glabrata* clinical isolates were hyper-adherent to HeLa cells under conditions where the major adhesin, Epa1, is not expressed in the reference strain BG14. We classified these isolates according to the relative adherence levels into three classes: slightly (2 strains), moderately (8) and highly (1) hyper-adherent isolates relative to BG14 (Fig. 1 and Table 3). The majority of the isolates fall in the moderately hyper-adherent class (25-45% adherence), including strain CBS138. The differences in adherence level between each class and BG14 and the two non-adherent isolates (non-adherent class) are statistically significant ( $P < 0.01$  ANOVA Dunnett multiple comparisons test), except MC25 where the difference was not significant ( $P > 0.05$ ) but in all repetitions performed the adherence was between >4 times higher than BG14. In addition all the clinical isolates display the same relative level of biofilm formation as strain BG14, except MC66, which shows greatly reduced biofilm formation. Interestingly, strains CBS138 and MC66 both belong to the moderately hyper-adherent class, however, CBS138 presents the highest capacity to form biofilms while MC66 the lowest, indicating that hyper-adherence, presumably through the overexpression of the *EPA* genes analyzed (see below), does not impact the capacity to form biofilms. For example *EPA3*, which is expressed at the cell surface during biofilm formation [16], is expressed only in three isolates (MC29, MC68 and MC66) and in CBS138, suggesting that *EPA3* expression might be related to less efficient silencing. The differences in biofilm formation between BG14 and MC66 and CBS138 are also statistically significant ( $P < 0.01$  ANOVA Dunnett multiple comparisons test) Therefore, the adherence levels to HeLa cells in vitro do not correlate with the ability to form biofilms in the microtiter model.

### **All hyper adherent, but not the non-adherent clinical isolates, over-express at least two of the *EPA* genes analyzed.**

33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65

We found that all of the hyper-adherent isolates overexpressed at least two of the *EPA* genes analyzed with respect to BG14. For example, the slightly hyperadherent isolate MC65, the moderately (MC48) and the highly hyper-adherent (MC2), significantly overexpressed *EPA1*, *EPA6* and *EPA7*, while the two moderately hyper-adherent MC29 and MC68, and CBS138, overexpress all the adhesins tested *EPA1*, *EPA3*, *EPA6*, *EPA7* and *EPA12*. On the other hand, slightly hyper-adherent isolate MC25 overexpresses *EPA1* and *EPA6* and moderately hyper-adherent MC51 mainly overexpresses *EPA1*, *EPA7* and *EPA12* (Fig. 3 and Table 3).

The moderately hyper-adherent isolates (MC61 and MC73) in general overexpressed *EPA6*, *EPA7* and *EPA12*, and possibly also *EPA1* ( $P > 0.05$  for *EPA1* in MC73) (Fig. 3 and Table 3). MC66 was the only isolate that was not reproducible in our RT-PCR assays, this may be in part due to the fact that it grows forming clumps of cells, which could suggest the expression of cell wall proteins that induce cell to cell interaction. In this strain, the RNA yield is highly variable, and so at least for *EPA1* and *EPA6* the differences are not statistically significant  $P > 0.05$ ).

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65

This analysis revealed therefore, that all the hyper-adherent isolates, overexpress a combination of *Epa1* and *Epa6* or *Epa7* relative to strain BG14 (except possibly MC66). It is possible that HeLa cells used for the in vitro adherence experiments, express at the surface a relatively high concentration of glycans to which *Epa6* or *Epa7* bind. In fact, a recent study shows that HeLa cells present at their surface glycans consisting of a galactose residue linked via  $\beta$ 1-4 linkage to glucose or N-acetylated glucose (GlcNAc). *Epa6* has a broad specificity for ligands that contain a terminal galactose residue joined to a galactose or glucose residue with  $\alpha$ 1-3,  $\alpha$ 1-4 bond; or  $\beta$ 1-3 or  $\beta$ 1-4 linkage to a galactose or glucose residue or N-acetylated derivatives. *Epa7* has a narrower specificity and binds to a terminal galactose with  $\beta$ 1-3 linkage to another galactose residue or a  $\beta$ 1-4 linkage to a glucose residue [17, 7, 8], but can still recognize the glycans expressed by HeLa cells. In addition, several hyper-adherent isolates also overexpress *Epa12* although this protein has not yet been shown to be a functional adhesin. Importantly, the two non-adherent isolates we studied MC39 and MC56, display greatly reduced levels of all the *EPA* genes analyzed, consistent with their non-adherent phenotype.

### Hyper-adherent clinical isolates contain multiple polymorphisms in *Sir3*.

Strain BG14 contains at least 23 *EPA* genes in its genome and subtelomeric silencing negatively controls the expression of the vast majority of these genes [5, 6, 4, 10]. Because we found that some isolates such as MC29 and MC68 overexpress all the adhesins tested, and most of the other isolates overexpressed more than one adhesin, we considered the possibility that these isolates might be defective in subtelomeric silencing, which would result in overexpression of several adhesins simultaneously. It has been shown recently that epigenetic silencing of the *EPA1* gene mediated by *Sir3*, results in a highly heterogeneous expression of *EPA1* in *C. glabrata* strain BG2 (the parental strain of BG14 of this study), while in strain CBS138, expression of *Epa1* is homogeneous. Interestingly, ectopic expression of *SIR3* in CBS138 leads to heterogeneous expression of *EPA1*, this is thought to be due to inefficient silencing in CBS138 that can be suppressed by overexpressing its own *SIR3* gene [10]. We sequenced the entire *SIR3* gene from two or three isolates from each class of the hyper-adherence phenotype (and included two non-adherent isolates as control). The results show that there are many polymorphisms in the *Sir3* proteins of each isolate relative to strain BG14. Strain CBS138, which may have inefficient silencing, contains three changes: S236T, N268H and I503L relative to BG14. These polymorphisms are shared by most hyper-adherent isolates, but they are also present in one of the non-adherent isolates (MC56) although not in the other one (MC39). Therefore, these three changes in CBS138 *Sir3* probably don't affect *Sir3* activity (because they are also present in non-adherent MC56), and show that there is no direct correlation between these particular polymorphisms in *Sir3* and the adherence phenotype in CBS138. In this case it is likely that the inefficient silencing we observed and the low heterogeneity of *EPA1* expression (due to inefficient silencing) observed by Halliwell et al [10] might be due other silencing proteins besides *Sir3*; and the fact that over-expression of CBS138 *SIR3*

can increase heterogeneity in CBS138, could reflect the effect of an extra copy of its own *SIR3* on the rest of the silencing proteins and therefore in the final subtelomeric silencing in this strain.

In Fig. 4 we also show schematically the *C. glabrata* Sir3 protein (CgSir3) compared to *S. cerevisiae* Sir3 (ScSir3), indicating the functional domains of the *S. cerevisiae* protein that have been previously characterized [18-20]. The Sir3 proteins of both organisms are only 38% similar; in fact only the amino terminal Bromo-adjacent homology (BAH) domain (amino acids 1 to 214), is well conserved between *S. cerevisiae* and *C. glabrata* (65% similarity of which 43% is identical). This domain in ScSir3 interacts with nucleosomes and several mutations in the BAH domain have been described that affect subtelomeric silencing [20, 21]. However, none of the polymorphisms found in the hyper-adherent clinical isolates mapped to this domain, and all isolates are identical to BG14 and CBS138 in this region. ScSir3 has a poorly conserved AAA<sup>+</sup> domain from amino acids 532 to 845, and the corresponding CgSir3 AAA<sup>+</sup> domain (residues 632 to 947), is only 37% similar to the *S. cerevisiae* domain. The majority of the substitutions found in the hyper-adherent isolates accumulate in the region between amino acids 236 and 534 which is between the BAH domain and the possible AAA<sup>+</sup> domain; with the exception of two of the moderately hyper-adherent isolates MC29 and MC68, which contain 3 substitutions in the putative AAA<sup>+</sup> domain. Furthermore CgSir3 alleles D679E and I739N, both in the putative AAA<sup>+</sup> domain of MC29 and MC68, are each flanked by two clusters of amino acids that are essential for telomeric silencing in the corresponding region of ScSir3 [19, 20]. Interestingly, the mutations in the putative AAA<sup>+</sup> domain of these moderately hyper-adherent isolates are not present in the non-adherent isolates (indicated by the arrows in Fig. 4). In addition, five more polymorphisms in Sir3 in these moderately hyper-adherent strains are also not present in the non-adherent isolates. This suggests that the particular Sir3 alleles carried in MC29 and MC68 might contribute to the hyper-adherence and *EPA* overexpression phenotypes, as these particular alleles could be less efficient at establishing subtelomeric silencing. In the other two classes of hyper-adherent isolates and in MC48 and CBS138, the Sir3 alleles share many polymorphisms with the non-adherent isolates. These data suggests that over-expression of *EPA* genes and hyper-adherence phenotypes found in these other classes, are probably due to some other mechanism, conceivably through other silencing proteins that might contain polymorphisms that result in less effective silencing. Also, one isolate of the slightly and highly hyper-adherent classes contain additional polymorphisms found after the putative AAA<sup>+</sup> domain, at the COO-terminal of Sir3, which are also not present in the non-adherent isolates. These data support the idea that the putative AAA<sup>+</sup> domain and possibly the entire carboxy-terminal third of CgSir3 might have a role in subtelomeric silencing in an analogous way to what has been described in ScSir3 [19, 20]. It is clear from the data presented in this work that each *C. glabrata* isolate studied differs significantly from each other in terms of adhesion to epithelial cells or plastic as well as adhesin gene expression. These differences do not correlate directly with specific alleles of Sir3, but particular alleles of Sir3 (especially those in the putative AAA<sup>+</sup> domain) might result in less efficient subtelomeric silencing of *EPA* genes. It is likely that the specific combination of alleles of all the silencing proteins could affect subtelomeric silencing resulting in a particular pattern of *EPA* gene expression

that defines the ability of that clinical isolate to adhere and thus persist in the mammalian host. We are currently investigating the possible participation of other silencing proteins in the regulation of expression of various *EPA* genes in hype-adherent clinical isolates of *C. glabrata*.

#### Acknowledgments

We want to thank Luis Salazar-Olivo for kindly providing the HeLa cells and expert advice on culturing conditions. We would like to thank Mayra Cuéllar-Cruz for preliminary experiments. We are grateful to Angélica Montoya-Contreras and José Romo-Yáñez for excellent technical assistance. This work was supported by Fondos Sectoriales-Salud-CONACyT grant No. 161971 to ICN; V.M.J. was supported by a Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) fellowship No. 205619 and E.O.Z. by CONACyT fellowship No. 233455.

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65

## References

1. M. A. Pfaller, D. J. Diekema. Epidemiology of Invasive Mycoses in North America. *Critical Reviews in Microbiology*. 2010;36(1):1-53.
2. B. P. Cormack, N. Ghorri, S. Falkow. An adhesin of the yeast pathogen *Candida glabrata* mediating adherence to human epithelial cells. *Science*. 1999;285(5427):578-82.
3. B. P. Cormack, S. Falkow. Efficient homologous and illegitimate recombination in the opportunistic yeast pathogen *Candida glabrata*. *Genetics*. 1999;151(3):979-87.
4. V. Gallegos-Garcia, Pan, SJ., Juarez-Cepeda, J., Ramirez-Zavaleta, CY., Briones-Martin-del-Campo, M., Martinez-Jimenez V., Castano, I., Cormack, B., De Las Penas, A. A novel downstream regulatory element cooperates with the silencing machinery to repress *EPA1* expression in *C. glabrata*. *Genetics*. 2012;In press: 10.1534/genetics.111.138099.
5. I. Castano, S. J. Pan, M. Zupancic, C. Hennequin, B. Dujon, B. P. Cormack. Telomere length control and transcriptional regulation of subtelomeric adhesins in *Candida glabrata*. *Mol Microbiol*. 2005;55(4):1246-58.
6. A. De Las Penas, S. J. Pan, I. Castano, J. Alder, R. Cregg, B. P. Cormack. Virulence-related surface glycoproteins in the yeast pathogen *Candida glabrata* are encoded in subtelomeric clusters and subject to RAP1- and SIR-dependent transcriptional silencing. *Genes Dev*. 2003;17(18):2245-58.
7. M. Maestre-Reyna, R. Diderrich, M. S. Veelders, G. Eulenburg, V. Kalugin, S. Bruckner, et al. Structural basis for promiscuity and specificity during *Candida glabrata* invasion of host epithelia. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2012. doi:10.1073/pnas.1207653109.
8. M. L. Zupancic, M. Frieman, D. Smith, R. A. Alvarez, R. D. Cummings, B. P. Cormack. Glycan microarray analysis of *Candida glabrata* adhesin ligand specificity. *Mol Microbiol*. 2008;68(3):547-59.
9. R. Domergue, I. Castano, A. De Las Penas, M. Zupancic, V. Lockatell, J. R. Hebel, et al. Nicotinic acid limitation regulates silencing of *Candida* adhesins during UTI. *Science*. 2005;308(5723):866-70.
10. S. Halliwell, Smith, MCA., Muston, P., Holland SL., Avery, SV. Heterogeneous expression of the virulence-related adhesin *Epa1* between individual cells and strains of the pathogen *Candida glabrata*. *Eukaryot Cell*. 2012;11(2):141-50.
11. P. W. J. de Groot, E. A. Kraneveld, Q. Y. Yin, H. L. Dekker, U. Gross, W. Crielaard, et al. The Cell Wall of the Human Pathogen *Candida glabrata*: Differential Incorporation of Novel Adhesin-Like Wall Proteins. *Eukaryotic Cell*. 2008;7(11):1951-64.
12. M. L. Herrera-Herrera, R. Zapata-Bustos, L. A. Salazar-Olivo. Simplified culture techniques for growth and differentiation of murine and human pre-adipocytes for translational applications. *Cytotherapy*. 2009;11(1):52-60. doi:10.1080/14653240802495963.
13. A. Juarez-Reyes, Ramirez-Zavaleta, CY., Medina-Sanchez, L., De Las Penas, A., Castano, I. A Protosilencer of subtelomeric gene expression in *Candida glabrata* with unique properties. *Genetics*. 2012;190:101-11.
14. I. Iraqui, S. Garcia-Sanchez, S. Aubert, F. Dromer, J. M. Ghigo, C. d'Enfert, et al. The Yak1p kinase controls expression of adhesins and biofilm formation in *Candida glabrata* in a Sir4p-dependent pathway. *Mol Microbiol*. 2005;55(4):1259-71.



15. G. Ramage, B. L. Wickes, J. L. Lopez-Ribot. Biofilms of *Candida albicans* and their associated resistance to antifungal agents. *Am Clin Lab.* 2001;20(7):42-4.

16. E. A. Kraneveld, J. J. de Soet, D. M. Deng, H. L. Dekker, C. G. de Koster, F. M. Klis, et al. Identification and Differential Gene Expression of Adhesin-Like Wall Proteins in *Candida glabrata* Biofilms. *Mycopathologia.* 2011;172(6):415-27.

17. N. X. Arndt, J. Tiralongo, P. D. Madge, M. von Itzstein, C. J. Day. Differential carbohydrate binding and cell surface glycosylation of human cancer cell lines. *Journal of cellular biochemistry.* 2011;112(9):2230-40. doi:10.1002/jcb.23139.

18. J. J. Connelly, P. Yuan, H. C. Hsu, Z. Li, R. M. Xu, R. Sternglanz. Structure and function of the *Saccharomyces cerevisiae* Sir3 BAH domain. *Mol Cell Biol.* 2006;26(8):3256-65. doi:10.1128/MCB.26.8.3256-3265.2006.

19. S. Ehrentraut, M. Hassler, M. Oppikofer, S. Kueng, J. M. Weber, J. W. Mueller, et al. Structural basis for the role of the Sir3 AAA+ domain in silencing: interaction with Sir4 and unmethylated histone H3K79. *Genes Dev.* 2011;25(17):1835-46. doi:10.1101/gad.17175111.

20. A. a. B. Norris, JD. Silent information regulator 3: the goldilocks of the silencing complex. *Genes & Development.* 2010;24(2):115-22.

21. V. Sampath, P. Yuan, I. X. Wang, E. Prugar, F. van Leeuwen, R. Sternglanz. Mutational analysis of the Sir3 BAH domain reveals multiple points of interaction with nucleosomes. *Mol Cell Biol.* 2009;29(10):2532-45. doi:10.1128/MCB.01682-08.

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65

**Table 1.** Strains and clinical isolates used in this study.

Strain	Relevant Genotype	Reference
CBS138	Clinical isolate from feces (ATCC2001)	<a href="http://www.genolevures.org/cagl.html">www.genolevures.org/cagl.html</a>
BG2	Clinical isolate from vagina	Fidel et al., 1996
BG14	Same as BG2 but <i>ura3Δ::Tn903</i> G418 <sup>R</sup>	[3]
BG676	Same as BG14 but <i>sir3Δ</i>	De Las Peñas <i>et al</i> , 2003
Strain	Description	Origin
MC1 to MC7	Clinical isolates from urine*	Hospital Central, SLP, México
MC8 to MC11	Clinical isolates from vagina or urine	Clínica León, GTO, México
MC12 to MC20	Clinical isolates	INNSZ, D.F., México
MC21 to MC23	Clinical isolates	Hospital Central, SLP, México
MC24 to MC74	Clinical isolates	INNSZ, D.F., México
MC77 to MC83	Clinical isolates	Hospital Central, SLP, México

\* Isolated from urinary tract.

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65

**Table 2.** Oligonucleotides used in this work.

Number	Sequence	Restriction site*
22	TAACAGTGTTCGTTTGAT	
24	TAATTTGATCAGTAGCACCG	
30	TTATGCGCTCTGATCCATGT	
36	GGGCTCAAAAACAGCTAAAG	
38	GCATGTTGATAGTTCCAAA	
40	GGGTTCTCAAACAGCTAAGG	
44	GGGAAGGCGAATAGTGCGTA	
50	GACTTAATGCACCATCATTG	
54	GCAGCCACTGCACAAGAATC	
55	AGGCAGCTCGCCAGAATCCCATT	
64	TACGGAAGAATGGTTCGTAC	
108	GACCTGGAAGGATGGCAGATAATC	
109	GGGCTTGAACCTCTTGTAGTAGTC	
367	<b>GTGAAGCTT</b> GAGGGTGCCACTTTG	<i>HindIII</i>
368	<b>CGCGAGCTC</b> GAAAGGAGATATAAAATGGGCAGGACCAATCAGAAA	<i>SacI</i>
369	<b>GCGAAGCTT</b> TCGGTGAGACACGATTG	<i>SpeI</i>
397	<b>ACCACTAGT</b> GAATCCCTAATTCAATG	
1102	GGATGTAAATGACTTTGCCG	
1103	GATGTGGCTGGACGTCTTC	
1159	CAGAAGCCTTAAAATACAAAGC	
1160	GATCGTGTATTCATCGTCAC	
1265	GCTGAAGAATTTAACAGTCAACG	
1281	GAAGGAACCCTACTCAAAGG	

\* Restriction sites added to some primers are indicated in bold letters in the corresponding sequence. Sequences are all 5' to 3'.

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65

Table 3. Summary of phenotypes of the hyper-adherent clinical isolates.

Adherence level (repressing conditions)	Clinical isolate or reference strain	%Adherence <sup>a</sup>	Biofilms <sup>b</sup>	Relative EPA gene expression <sup>c</sup>				
				EPA1	EPA3 <sup>d</sup>	EPA6	EPA7	EPA12
Wild-type reference	BG14	2.14± 1.64	1±0.06	1± 0.26	-	1±0.48	1±0.46	1±0.46
	MC39	1.5± 0.05	0.93±0.003	0.41 <sup>e</sup>	-	0.42 <sup>e</sup>	-	0.4 <sup>e</sup>
Non-adherent	MC56	1.37± 0.71	0.97±0.005	0.56 <sup>e</sup>	-	0.71 <sup>e</sup>	-	0.66 <sup>e</sup>
	MC25	11.82± 8.57	1.04±0.14	1.16± 0.45	-	1.27±0.71	1.1±0.45	0.79±0.30
Slightly adherent	MC65	13.64± 2.70	1.19± 0.05	1.29± 0.12	-	1.89±0.54	1.56±0.29	0.94±0.48
	CBS138	31.66± 3.06	1.61± 0.47	1.27±0.26	1.2 <sup>e</sup>	2.49±1.44	3.21±1.20	1.91±0.88
ATCC2001 reference	MC68	23.76± 3.66	0.99± 0.02	2.04±0.53	2.93 <sup>e</sup>	3.21±1.21	1.75±1.40	4.39 <sup>e</sup>
	MC1	27.41± 4.89	1.06± 0.09	1.26±0.35	-	1.26±0.65	1.75±0.96	1.07±0.44
	MC29	28.19± 5.29	1.25± 0.14	1.52±0.72	1.26 <sup>e</sup>	2.64±1.31	3.58±1.37	1.43±0.47
	MC51	29.06± 5.40	1.17± 0.06	1.38±0.45	0.17 <sup>e</sup>	1.21±0.76	2.18±0.93	1.25±0.62
	MC61	29.17± 4.54	0.95± 0.02	1.16±0.09	0.15 <sup>e</sup>	1.6±0.66	2.26±0.69	1.49±0.85
	MC73	32.66± 4.15	0.97± 0.02	0.96±0.35 <sup>§</sup>	-	1.8±0.80	1.26±0.49	1.29±0.56
	MC66	34.45± 4.92	0.42± 0.09	0.94±0.65 <sup>§</sup>	0.81 <sup>e</sup>	0.93±0.91 <sup>§</sup>	1.21±0.67	1.23±0.48
	MC48	42.87± 8.08	1.16± 0.04	1.28±0.28	-	1.18±0.56	2.72±1.30	1.38±0.72
Highly adherent	MC2	62.67± 9.71	1.18± 0.13	0.89±0.23	-	1.12±0.60	1.45±0.51	1.12±0.57
Silencing mutant	<i>sir3Δ</i>	16.33± 4.19	1.46± 0.13	1.01 <sup>e</sup>	0.99 <sup>e</sup>	1.73 <sup>e</sup>	4.06 <sup>e</sup>	1.28 <sup>e</sup>

<sup>a</sup> Adherence level is expressed as % of *C. glabrata* cells that remained adhered to HeLa cells after extensive washing with respect to input as described in Materials and Methods. Experiments

were done using stationary phase cultures, a condition where EPA genes are repressed. Numbers represent the mean of three independent experiments, each done in triplicate ± Standard Deviation. The statistical analysis (ANOVA, Dunnett multiple comparisons tests) indicates that all hyper-adherent clinical isolates show significantly more adherence than the wild-type BG14 ( $P<0.01$  or  $<0.05$  for MC65) except MC25 where the adherence is consistently higher than BG14 in the three independent experiments, but the difference did not reach statistical significance.

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49

<sup>b</sup> Numbers indicate the amount of XTT reduced (Absorbance OD<sub>420</sub>) after 2 h of incubation. Values correspond to the mean of 3 independent experiments and then normalized with respect to BG14 ± Standard deviation. The statistical analysis (ANOVA, Dunnett multiple comparisons tests) shows that only CBS138 and MC66 present significant differences with BG14 ( $P < 0.01$ ) while the rest of the isolates are not statistically different from BG14 ( $P > 0.05$ ).

<sup>c</sup> Quantification of bands corresponding to each *EPA* gene mRNA from each strain. Values were normalized first to the value of the corresponding *ACT1* band. All values were then normalized with respect to BG14 (wild-type). Numbers represent the mean of two to four independent experiments. The standard deviation values for experiments performed three or four independent times are indicated (±). The statistical analysis of the relative *EPA* gene expression was made by one way ANOVA with post test Dunnett multiple comparisons test. All the differences are statistically different ( $P < 0.01$ ) with respect to the wild-type (normalized to 1), and are indicated in bold numbers. The exceptions are *EPA1* for clinical isolates MC66 and MC73 and *EPA6* for MC66, these numbers are not in bold and are indicated by the symbol §.

<sup>d</sup> *EPA3* expression is not detectable in BG14. (-) symbol indicates that there was no detectable band in that strain. Relative expression of *EPA3* in moderately hyperadherent isolates is calculated relative to *ACT1* expression. *EPA3* expression was made only two times independently and no SD was calculated. In both experiments we observed the same tendency.

<sup>e</sup> Experiments that were done only two times independently have no standard deviation (SD) values. In every case the tendency in both experiments is the same except for MC66 (see text).

§ Indicates values that are not significantly different from the value obtained in the wild-type strain BG14.

### Figure legends

**Fig. 1 Quantitative adherence of hyper-adherent *C. glabrata* clinical isolates to HeLa cells.** Yeast cells were grown to stationary phase as described in Materials and Methods and adherence was determined as percentage of cells (measured as CFUs) that remained adhered to a monolayer of HeLa cells after extensive washing, relative to the total number of CFUs added of each yeast strain. Clinical isolates were classified and plotted according to the adherence level: non-adherent (< 3%) slightly (10-15%); moderately (25-45%) and only one highly (>45%) hyper-adherent (MC2). Data represents the mean of 3 independent experiments done in triplicate. Statistical analysis (ANOVA with Dunnett multiple comparisons tests) shows that all the hyper-adherent isolates are significantly more adherent than the wild-type BG14 ( $P<0.01$  for all isolates and isolate MC65 with a value  $P<0.05$ ). Only with MC25 the difference with BG14 did not reach statistical significance, but in all three independent experiments the adherence level was higher than BG14, and we classified it as slightly adherent. The non-adherent isolates MC39 and MC56 are not significantly different from BG14. \* means  $P<0.05$ ; \*\* means  $P<0.01$ .

**Fig. 2 All *C. glabrata* hyper-adherent isolates have the same capacity to form biofilms.** Yeast cells were grown to stationary phase and biofilm formation was measured using the microtiter plate method as described in Materials and Methods. Values are expressed relative to the value of our wild-type strain BG14, which was normalized to 1. Data presented are the mean of 3 experiments made in triplicate and XTT reduction is expressed as  $A_{492}$  obtained after 2 h of incubation. Clinical isolates are ordered as in Fig. 1 according to the level of adherence. Only CBS138 and MC66 show statistically significant differences with BG14 and indicated by \*\* ( $P<0.01$ ). Differences between BG14 and the rest of the clinical isolates are not statistically significant ( $P>0.05$ ; ANOVA, Dunnett multiple comparisons tests).

**Fig. 3 *C. glabrata* hyper-adherent clinical isolates over-express two or more *EPA* genes.** RNA was extracted from stationary phase cultures of the indicated strains and semi-quantitative RT-PCR analysis was performed using primers specific for *EPA1*, *EPA3*, *EPA6*, *EPA7* and *EPA12* as well as *ACT1* as an internal control. The last lane shown (g) is a positive control for PCR using genomic DNA from strain BG14. From two to four independent experiments were performed for each strain and gene; the results of a representative experiment are shown. The bands were quantified and numbers underneath each lane indicate the mean of the relative fold change with respect to BG14, of each band normalized to the corresponding *ACT1* band. A zero value means we could not detect the signal. Only in the case of *EPA3*, the values shown correspond to intensity of the signal normalized to the corresponding *ACT1* signal (not normalized to BG14), because BG14 does not show a detectable signal for *EPA3*.

**Fig. 4 *C. glabrata* hyper-adherent clinical isolates contain polymorphisms in Sir3.** *SIR3* from two clinical isolates from each hyper-adherence category was PCR-amplified and sequenced. Shown at the top are all the amino acid changes found, relative to BG14, which is considered the wild-type allele. Closed circles indicate the presence of the particular allele in the corresponding strain. Strains are ordered according to their adherence level and CBS138 reference strain is classified with the moderately hyper-adherent. Arrows indicate alleles present in the moderately hyper-adherent isolates, but not in the non-adherent ones. The bottom part shows a cartoon of *C. glabrata* and *S. cerevisiae* Sir3 (*CgSir3* and *ScSir3* respectively) where the BAH domains and the putative AAA<sup>+</sup> in both proteins are indicated. The gray box highlights the putative AAA<sup>+</sup> domain where several polymorphisms in the moderately hyper-adherent isolates accumulate.

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65

Figure1\_revised  
[Click here to download high resolution image](#)

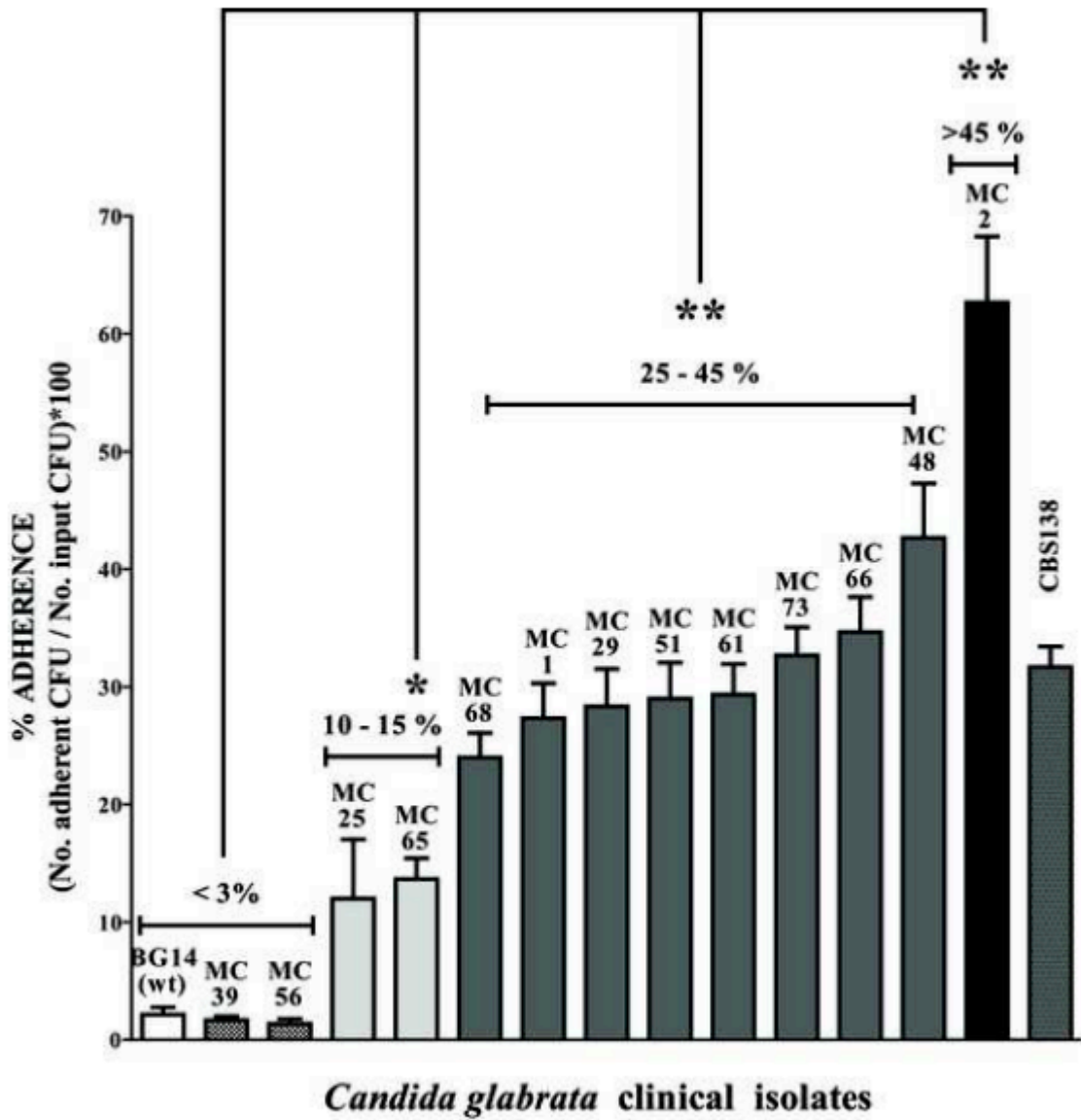




Figure 2\_revised  
[Click here to download high resolution image](#)

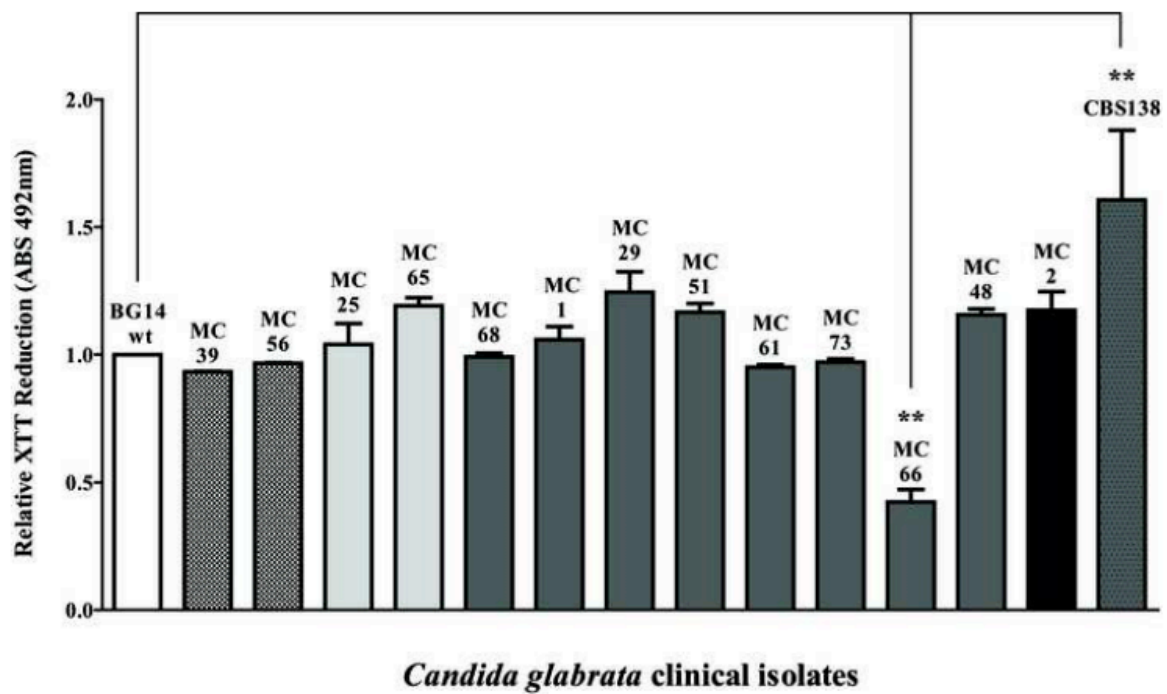


Figure 3  
[Click here to download high resolution image](#)

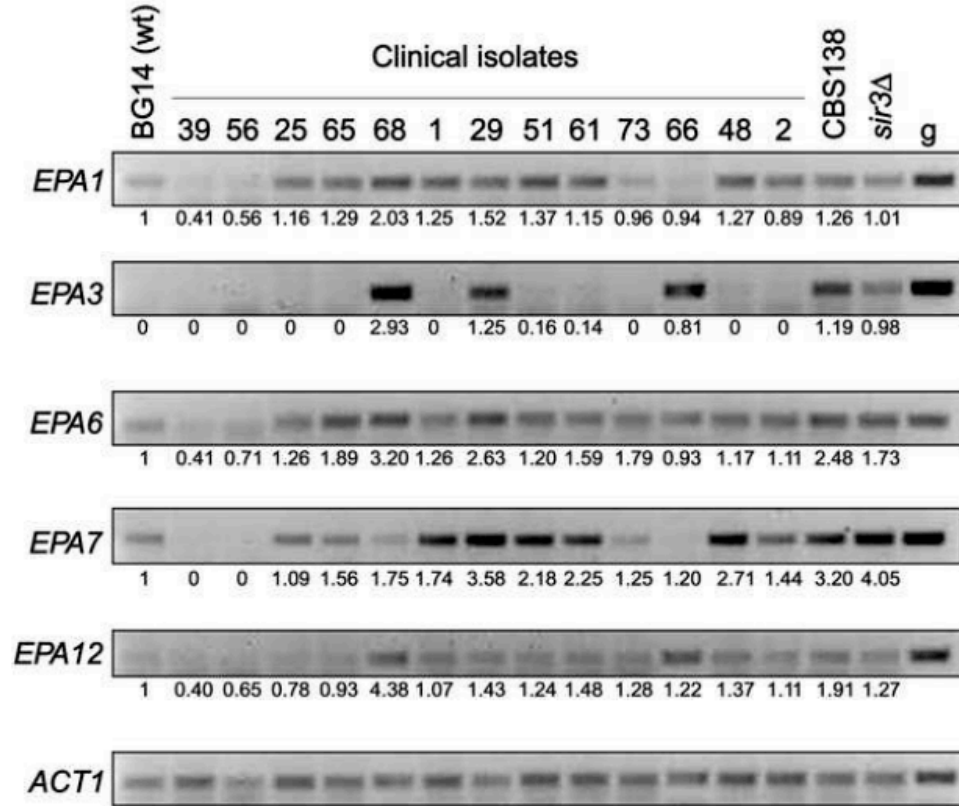
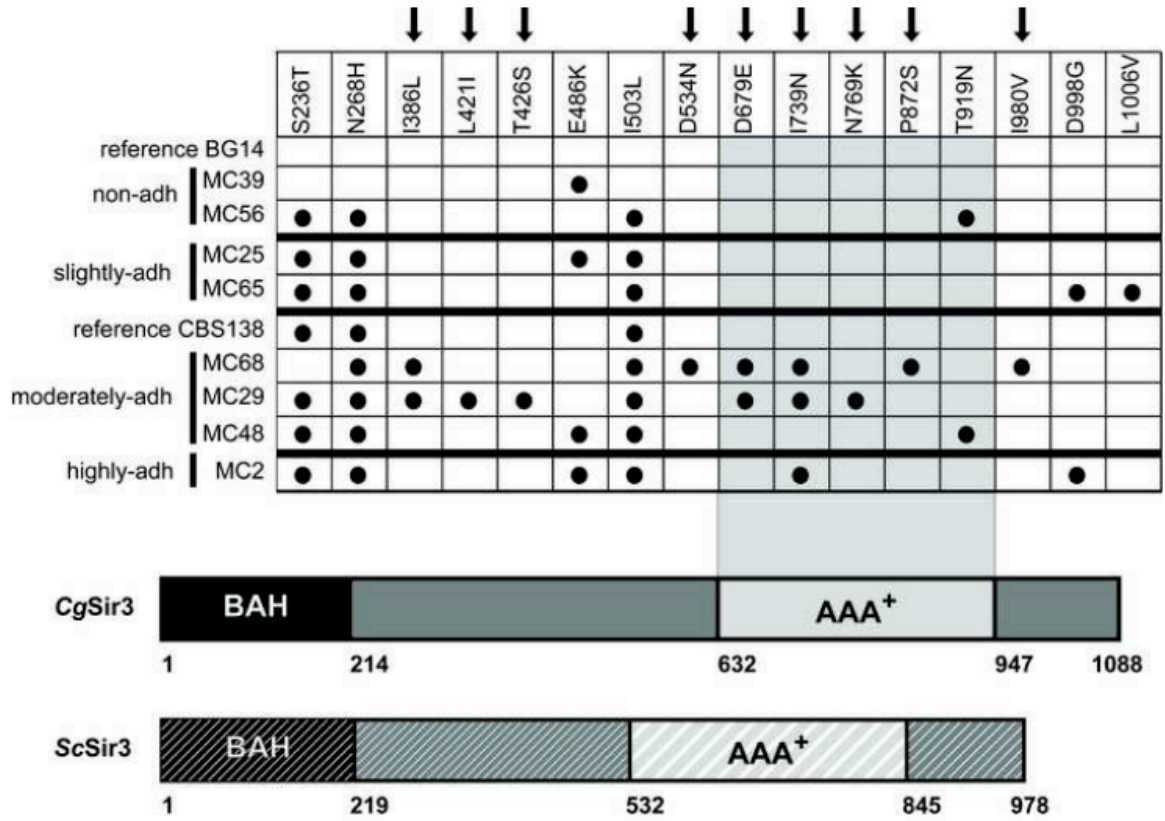
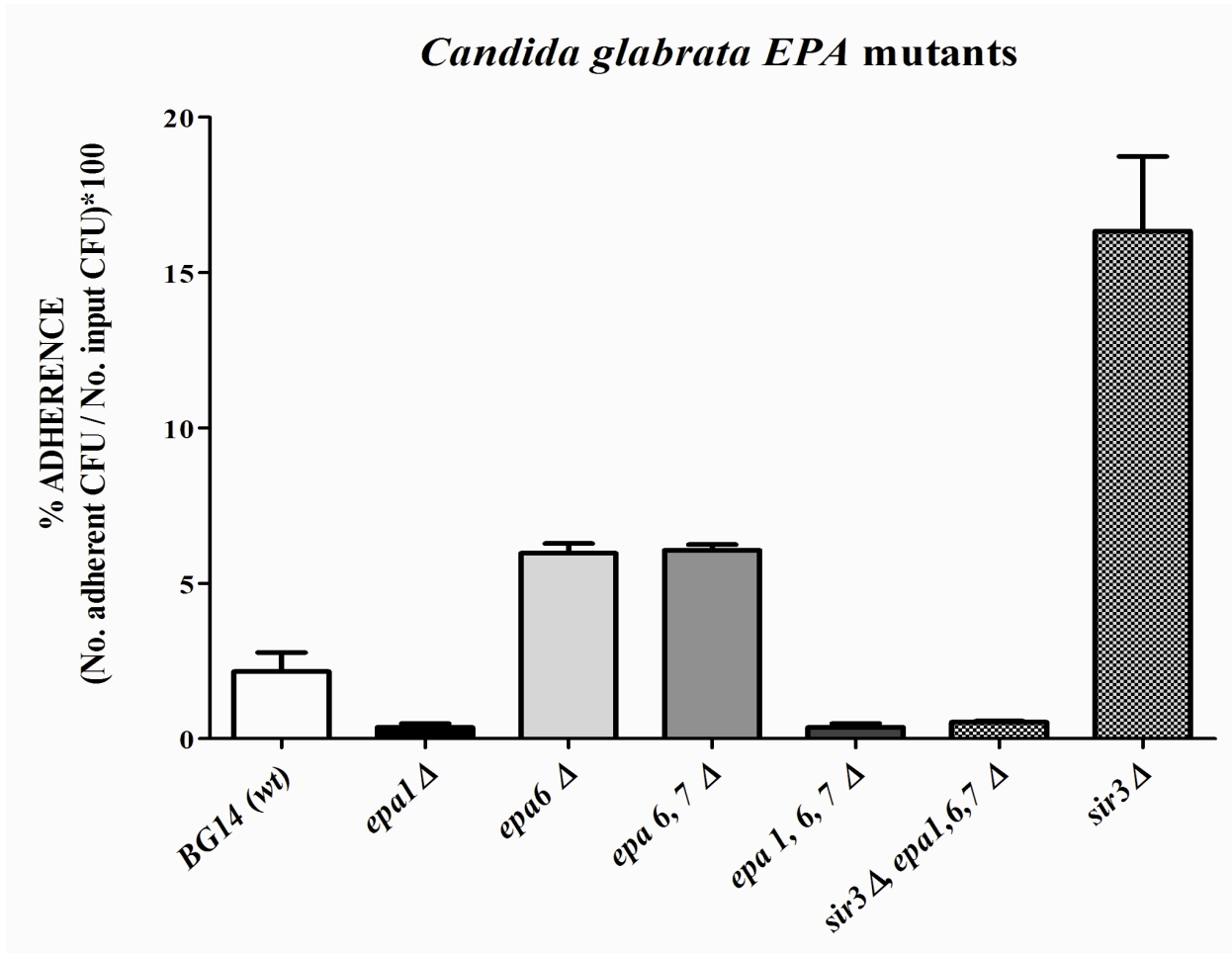


Figure 4\_revised  
[Click here to download high resolution image](#)



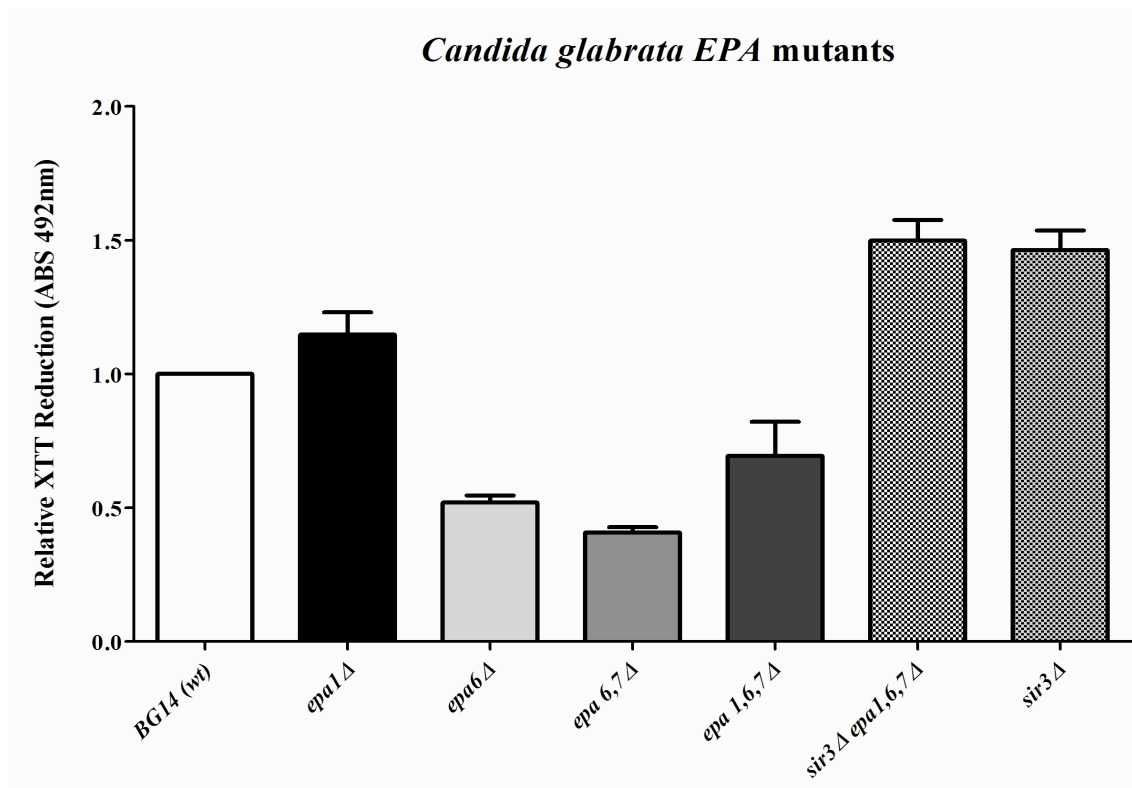
## FIGURAS SUPLEMENTARIAS DEL ARTÍCULO



**Figura Suplementaria 1.** Niveles de adherencia cuantitativa en cultivos de fase estacionaria de cepas *epa*Δ construídas en el fondo genético de la cepa BG14. Cultivos en fase estacionaria, de diferentes cepas mutantes en uno o más genes *EPA* o mutantes en *sir3*Δ en el fondo genético de la cepa BG14, se añadieron a las células HeLa previamente fijadas y después se eliminaron las células no adherentes con lavados. Las células adheridas de cada cepa se recuperan y se siembran para obtener el número de CFUs que corresponden a ese número de células recuperadas para cada cepa. El porcentaje de adherencia se expresa como la razón entre el número de CFUs que permanecieron adheridas a las células HeLa sobre las CFUs obtenidas del input de células que se incuban

inicialmente con las células HeLa para cada cepa. Bajo estas condiciones, la cepa BG14 mantiene reprimida la gran mayoría de los genes *EPA* y las células son normalmente no adherentes (<3% de adherencia). La poca adherencia basal que se observa en algunas cepas esta mediada por Epa1. La diferencia entre la adherencia de la cepa BG14 y *sir3Δ* es estadísticamente significativa ( $P < 0.01$ ). Por otro lado, las cepas *epa6Δ* y *epa(6,7)Δ* tienen una adherencia mayor que la cepa BG14 ( $P < 0.05$ ). Y la adherencia de las cepas *epa1Δ*, *epa(1,6,7)Δ* y *sir3Δ epa(1,6,7)Δ* no es significativamente menor que la adherencia de la BG14 ( $P > 0.05$ , ANOVA Dunnet multiple comparisons test).

## FIGURAS SUPLEMENTARIAS DEL ARTÍCULO



**Figura Suplementaria 2.** Formación de biofilms por cepas mutantes en genes *EPA* y *sir3*Δ. La formación de biofilms es mediada principalmente por Epa6, y en un fondo genético *sir3*Δ, posiblemente otras adhesinas pueden mediar adherencia al plástico en un modelo de ensayo en microplaca. En este ensayo células de las cepas mutantes que se indican se crecieron hasta fase estacionaria y se indujo la formación de los biofilms como se describe en Material y Métodos. La capacidad de formar biofilms se expresa como la absorbancia obtenida a 492nm después de 2hr de incubación normalizado con el valor obtenido para la cepa silvestre BG14. El análisis estadístico de estos datos, indica que la formación de biofilms en la cepa *epa (6,7)*Δ es significativamente menor que en la cepa silvestre BG14 ( $P < 0.05$ ) (ANOVA Dunnet multiple comparisons test). El resto de las cepas analizadas no difieren significativamente de los valores obtenidos para la cepa silvestre, pero las diferencias son reproducibles.

## TABLAS SUPLEMENTARIAS

**Tabla Suplementaria 1.** Cepas de *E. coli* y *C. glabrata* utilizadas en el presente trabajo.

<b>Cepas de <i>E. coli</i></b>	<b>Genotipo</b>	<b>Referencia</b>
DH10B	<i>F<sup>-</sup> mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC) φ80dlacZΔM15 ΔlacX74 deoR recA1 endA1 araD139 Δ(ara,leu)7697 galU galK λ<sup>-</sup> rpsL nupG</i>	Calvin and Hanawalt, 1988

<b>Cepas <i>C. glabrata</i></b>	<b>Genotipo</b>	<b>Referencia</b>
BG14	<i>ura3Δ::Tn903 G418<sup>R</sup></i>	Cormack and Falkow, 1999
BG1048	<i>ura3Δ::Tn903 G418<sup>R</sup> sir2Δ::hph Hyg<sup>R</sup> (pAP596/Sac I-Kpn I)</i>	Domergue <i>et al</i> , 2005
BG312	<i>ura3Δ::Tn903 G418<sup>R</sup> sir3Δ</i>	De Las Peñas <i>et al</i> , 2003
BG1050	<i>ura3Δ::Tn903 G418<sup>R</sup> sir4Δ::hph Hyg<sup>R</sup> (pAP598 Bsg I)</i>	Rosas-Hernández <i>et al</i> , 2008
BG1080	<i>ura3Δ::Tn903 G418<sup>R</sup> hdf1Δ::hph Hyg<sup>R</sup> (pAP611 Bcg I)</i>	Rosas-Hernández <i>et al</i> , 2008
BG1081	<i>ura3Δ::Tn903 G418<sup>R</sup> hdf2Δ::hph Hyg<sup>R</sup> (pAP612 Bcg I)</i>	Rosas-Hernández <i>et al</i> , 2008
BG509	<i>ura3Δ::Tn903 G418<sup>R</sup> rif1Δ</i>	Castaña <i>et al</i> , 2005
BG64	<i>ura3Δ::Tn903 G418<sup>R</sup> epa1Δ</i>	Castaña <i>et al</i> , 2005
BG612	<i>ura3Δ::Tn903 G418<sup>R</sup> epa6Δ</i>	Castaña <i>et al</i> , 2005
BG873	<i>ura3Δ::Tn903 G418<sup>R</sup> (epa6, epa7)Δ</i>	Castaña <i>et al</i> , 2005

BG923	<i>ura3Δ::Tn903 G418<sup>R</sup> (epa1, epa6, epa7)Δ</i>	Castaño <i>et al</i> , 2005
BG945	<i>ura3Δ::Tn903 G418<sup>R</sup> rif1Δ (epa1, epa6, epa7)Δ</i>	Castaño <i>et al</i> , 2005
BG966	<i>ura3Δ::Tn903 G418<sup>R</sup> sir3Δ (epa1, epa6, epa7)Δ</i>	Castaño <i>et al</i> , 2005

**Tabla Suplementaria 2.** Plásmidos utilizados y generados en el presente trabajo.

Plásmidos	Genotipo relevante	Reference
<b>Vectores de clonación utilizados</b>		
pMB11	Vector de clonación, Cm <sup>R</sup> , Sac <sup>S</sup>	Briones Martin del Campo, et al.
pAP379	Vector replicativo y de clonación, Amp <sup>R</sup>	De Las Penas, Pan <i>et al.</i> 2003
pAP701	Vector replicativo con cassette de <i>NATMx</i> , Amp <sup>R</sup>	De Las Penas, Pan <i>et al.</i> 2003; Sikorski and Hieter 1989
<b>Vectores generados</b>		
pMJ1 pMJ2	<i>HDF1</i> de la cepa BG14, amplificado con la enzima Phusion generó un fragmento romo de PCR de 1.821 Kb (oligos #354 y #355) y se clonó en pMB11 con <i>StuI</i> , Cm <sup>R</sup>	This work
pMJ3 pMJ4	<i>HDF1</i> de la cepa CBS138, amplificado con la enzima Phusion generó un fragmento romo de PCR de 1.821 Kb (oligos #354 y #355) y se clonó en pMB11 con <i>StuI</i> , Cm <sup>R</sup>	This work
pMJ5 pMJ6	<i>HDF1</i> de la cepa MC25, amplificado con la enzima Phusion generó un fragmento romo de PCR de 1.821 Kb (oligos #354 y #355) y se clonó en pMB11 con <i>StuI</i> , Cm <sup>R</sup>	This work



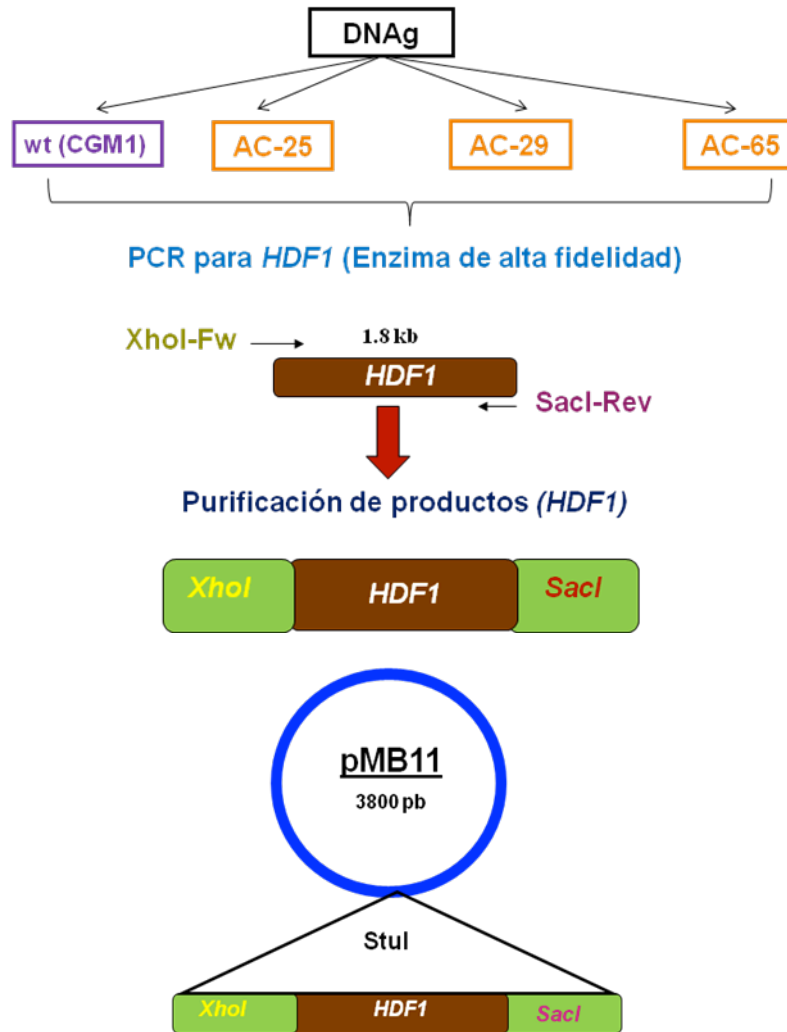
pMJ7 pMJ8	<i>HDF1</i> de la cepa MC29, amplificado con la enzima Phusion generó un fragmento romo de PCR de 1.821 Kb (oligos #354 y #355) y se clonó en pMB11 con <i>StuI</i> , <i>Cm<sup>R</sup></i>	This work
pMJ9 pMJ10	<i>HDF1</i> de la cepa MC65, amplificado con la enzima Phusion generó un fragmento romo de PCR de 1.821 Kb (oligos #354 y #355) y se clonó en pMB11 con <i>StuI</i> , <i>Cm<sup>R</sup></i>	This work
pMJ13 pMJ14	<i>HDF1</i> de la cepa BG14, amplificado con la enzima TaqExpand Long generó un fragmento de PCR de 3.824 Kb (oligos #671 y #672) y se clonó en pAP379 digiriendo vector e inserto con <i>KpnI</i> y <i>BamHI</i> , <i>Amp<sup>R</sup></i>	This work
pMJ15 pMJ16	<i>HDF1</i> de la cepa CBS138, amplificado con la enzima TaqExpand Long generó un fragmento de PCR de 3.824 Kb (oligos #671 y #672) y se clonó en pAP379 digiriendo vector e inserto con <i>KpnI</i> y <i>BamHI</i> , <i>Amp<sup>R</sup></i>	This work
pMJ17 pMJ18	<i>HDF1</i> de la cepa MC25, amplificado con la enzima TaqExpand Long generó un fragmento de PCR de 3.824 Kb (oligos #671 y #672) y se clonó en pAP379 digiriendo vector e inserto con <i>KpnI</i> y <i>BamHI</i> , <i>Amp<sup>R</sup></i>	This work
pMJ19 pMJ20	<i>HDF1</i> de la cepa MC29, amplificado con la enzima TaqExpand Long generó un fragmento de PCR de 3.824 Kb (oligos #671 y #672) y se clonó en pAP379 digiriendo vector e inserto con <i>KpnI</i> y <i>BamHI</i> , <i>Amp<sup>R</sup></i>	This work
pMJ21	<i>HDF1</i> de la cepa MC65, amplificado con la enzima TaqExpand Long generó un fragmento de PCR de 3.824 Kb (oligos #671 y #672) y se clonó en pAP379 digiriendo vector e inserto con <i>KpnI</i> y <i>BamHI</i> , <i>Amp<sup>R</sup></i>	This work
pMJ22 pMJ23	Vector replicativo NATMx. pAP379 digerido con <i>PmlI</i> y <i>KpnI</i> , cassette NATMx proviene de pAP701 y se digiere con <i>SacI</i> y <i>KpnI</i> . <i>SacI</i> se rellena con T4 DNA Pol para generar sitio romo. Fragmento NATMx ( <i>SacI</i> / T4 DNA Pol y <i>KpnI</i> ) se liga con pAP379 ( <i>PmlI</i> y <i>KpnI</i> ).	This work
pMJ24 pMJ25	<i>SIR2</i> de la cepa CBS138, amplificado con la enzima TaqExpand Long generó un fragmento de PCR de 3.707 Kb (oligos #523 y #524) y se clonó como <i>KpnI</i> / <i>MfeI</i> en pMJ22 digerido con <i>KpnI</i> / <i>EcoRI</i> , <i>Amp<sup>R</sup></i>	This work
pMJ26 pMJ27	<i>SIR2</i> de la cepa BG14, amplificado con la enzima TaqExpand Long generó un fragmento de PCR de 3.707 Kb (oligos #523 y #524) y se clonó como <i>KpnI</i> / <i>MfeI</i> en pMJ22 digerido con <i>KpnI</i> / <i>EcoRI</i> , <i>Amp<sup>R</sup></i>	This work

**Tabla Suplementaria 3.** Oligonucleótidos adicionales utilizados en este trabajo

<b>Oligo</b>	<b>Secuencia (5'-3')</b>	<b>Sitio (s) añadidos</b>
<b>Clonación de <i>HDF1</i></b>		
355	CGCGAGCTCGAAGGAGATATAAAATGTCAGAGTTGGATTTCCC	<i>SacI</i>
354	GCGCTCGAGGTTTAGTTTAGGCTTTTTTTCAGA	<i>XhoI</i>
671	GCGAGGTACGAAGATATAGAACGC	
672	CCCGTACTACAACATAACAATGCAGC	
<b>Clonación de <i>SIR2</i></b>		
523	AACCGCTGAAATTATTAGAGCCACG	
524	TTGGGCAGAGGTGTTCAACTCTAGACC	
<b>Secuenciación de <i>HDF1</i> en pMB11</b>		
80	CGGAACATATGTTTCGAGGTAC	
81	GGAATGTTTAGTTTCTTATTCTGATC	
376	CAA <b>ACTAGT</b> TATATGAAAACCAGGAAATAAGG	<i>SpeI</i>
604	AAAAATATCAAGTTCCTGAATTCG	
605	CAAAGACGATGTGGTGGTAGCC	

## RESULTADOS ADICIONALES

### 1. CLONACIÓN DE LOS GENES DE *HDF1* en pMB11.



**Fig 5.** A partir de extractos de DNA total de la cepa silvestre BG14 (CGM1) y los aislados clínicos hiperadherentes con diferente patrón de restricción que la cepa silvestre, se amplificó el gen *HDF1* con una enzima de alta fidelidad (Phusion Enzyme) y los productos de PCR se clonaron en el vector pMB11 para su posterior secuenciación con el uso de oligos internos.

## 2. SECUENCIACIÓN DE ALELOS DE *HDF1* CLONADOS EN pMB11.

En el estudio preliminar de los aislados clínicos hiperadherentes realizado por Cuellar (datos no publicados), se encontraron cambios en los patrones de restricción de varios genes de la maquinaria del silenciamiento provenientes de esos aislados. En el caso particular del gen *HDF1* se encontró que, los aislados MC25, MC29 y MC65 presentaban cambios en los patrones de restricción generados por la enzima *Tsp509I*. Sin embargo para el caso del gen *HDF2* ninguno de los aislados clínicos hiperadherentes presentaban cambios en los patrones de restricción, aunque eso no significa que no existan mutaciones dentro del gen. En el presente trabajo se clonó el ORF de los genes *HDF1* y *HDF2* proveniente de los aislados hiperadherentes MC25, MC29, MC65 y la cepa BG14. Sin embargo sólo se secuenciaron los genes *HDF1* provenientes de los MC25, MC29 y MC65 así como la cepa silvestre BG14 (CGM1) y se compararon las secuencias obtenidas con la secuencia reportada del gen *HDF1* para la cepa silvestre.

<i>HDF1</i> <b>BG14</b>	GGAGAAAAAGA	<b>AATT</b>	GAAATGGAG
Ku70p	Gly-Glu-Lys-Glu-Ile-Glu-Met-Glu		
<i>HDF1</i> <b>MC25</b>	GGAGAAAAAGA	<b>AATC</b>	GAAATGGAG
<i>HDF1</i> <b>MC29</b>	GGAGAAAAAGA	<b>AATC</b>	GAAATGGAG
<i>HDF1</i> <b>MC65</b>	GGAGAAAAAGA	<b>AATC</b>	GAAATGGAG
Ku70p	Gly-Glu-Lys-Glu-Ile-Glu-Met-Glu		

**Fig 6.** Análisis de las secuencias de *HDF1* proveniente de aislados clínicos hiperadherentes y la cepa silvestre BG14 (CGM1). Encontramos el sitio de restricción de la enzima *Tsp509I* (AATT) que se perdió en los tres aislados secuenciados y esto genera un patrón de restricción diferente al de la cepa BG14,

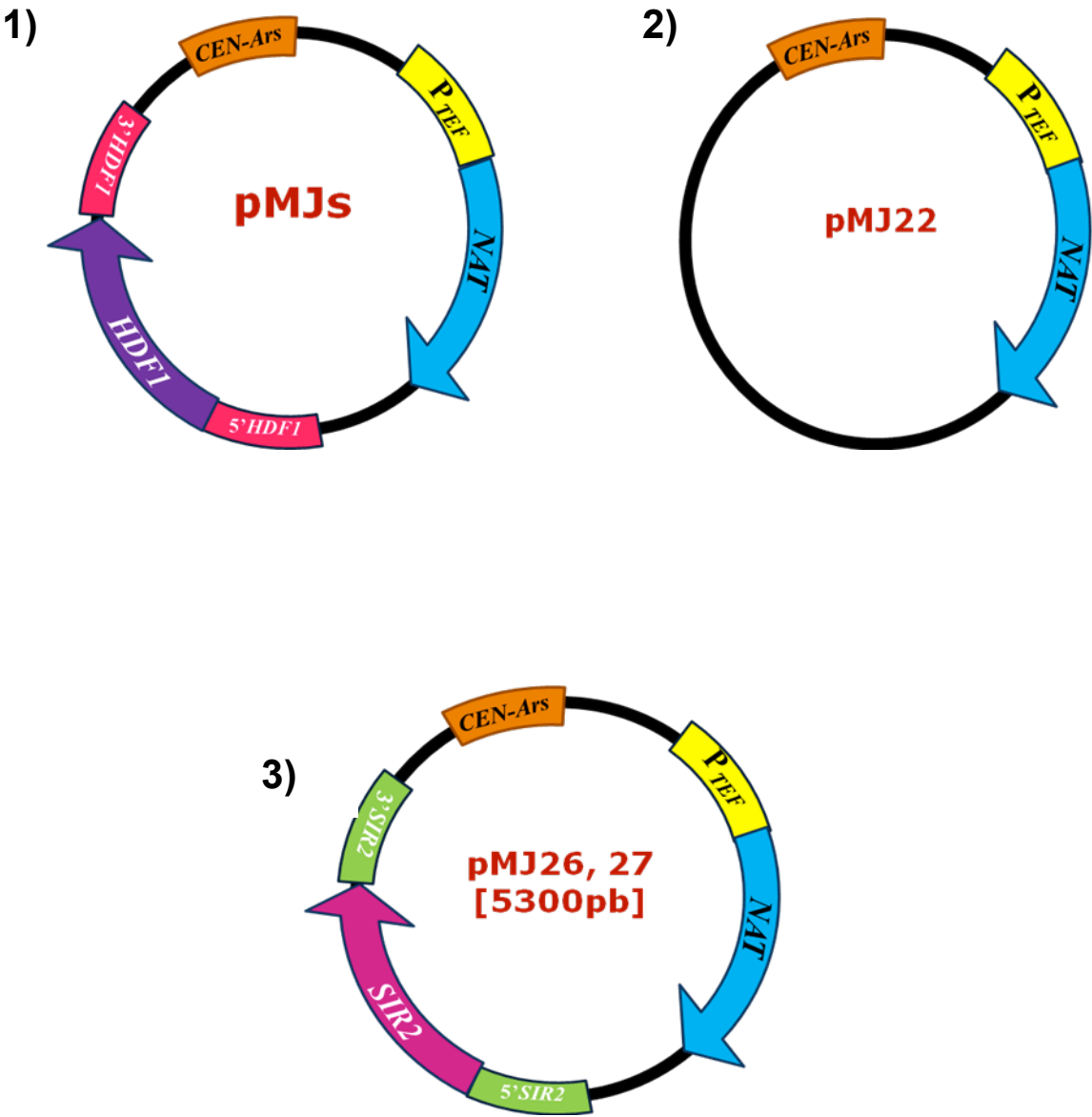
sin embargo, este cambio no genera un cambio en el aminoácido codificado por dicha secuencia. Es decir, el cambio en la secuencia de *HDF1* en los aislados hiperadherentes es una mutación “silenciosa” que no genera un cambio en la proteína Ku70p codificada por el gen *HDF1*.

### 3. GENERACIÓN DE VECTORES REPLICATIVOS

Se generaron varios vectores replicativos que contienen genes de la maquinaria del silenciamiento con sus secuencias de las regiones 5' y 3', que son los siguientes:

- 1) Vectores que contienen *HDF1* de diferentes cepas de *C. glabrata* y que tienen marcador de resistencia a Higromicina (pMJ13 hasta pMJ21). Se clonó *HDF1* proveniente de BG14 (pMJ13, 14), CBS138 (pMJ15, 16), MC25 (pMJ17, 18), MC29 (pMJ19, 20) y MC65 (pMJ21).
- 2) Vector replicativo que contiene un cassette de resistencia a NATMx en lugar del cassette de resistencia a Higromicina.
- 3) Sobre el vector de NATMx se clonaron los genes *SIR2* provenientes de las cepas silvestres BG14 y CBS138.

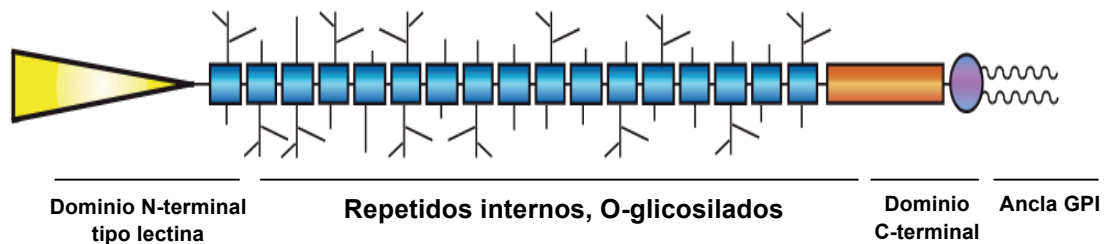
Vectores replicativos que contienen genes de la maquinaria del silenciamiento.



#### 4. ENSAYOS DE INHIBICIÓN DE ADHERENCIA EN CEPAS DE *C. glabrata* CON DIFERENTES AZÚCARES (LACTOSA Y GALACTOSA).

El papel de la mayoría de las proteínas Epa no se entiende por completo todavía. Se sabe que la adherencia mediada por Epa1 es inhibida por lactosa y N-acetilactosamina (Cormack & Falkow 1999) y se ha demostrado que Epa6 y Epa7 median adherencia a células epiteliales *in vitro* (Castano *et al.* 2005; Domergue *et al.* 2005). Sin embargo, se sabe muy poco acerca de los ligandos que une cada una de las proteínas Epa. Las proteínas Epa son proteínas de pared celular con un ancla GPI (glicosilfosfatidilinositol) [GPI-CWP].

Entre las principales características de las proteínas GPI-CWP incluyen una región central rica en serina y treonina con varias repeticiones, así como una señal N-terminal tipo lectina que le da la especificidad para los ligandos y una secuencia hidrofóbica hacia el C-terminal que es necesaria para llevar a cabo la unión de la proteína a la pared celular (Kapteyn *et al.* 1999).



**Fig 8.** Estructura básica de las adhesinas, clasificadas como proteínas GPI-CWP (GPI-Cell Wall Proteins). El extremo N-terminal tipo lectina es el que les da la especificidad para los diferentes ligandos, en el caso de las proteínas Epa se han identificado ligandos tipo azúcares como lactosa y galactosa, entre otros.

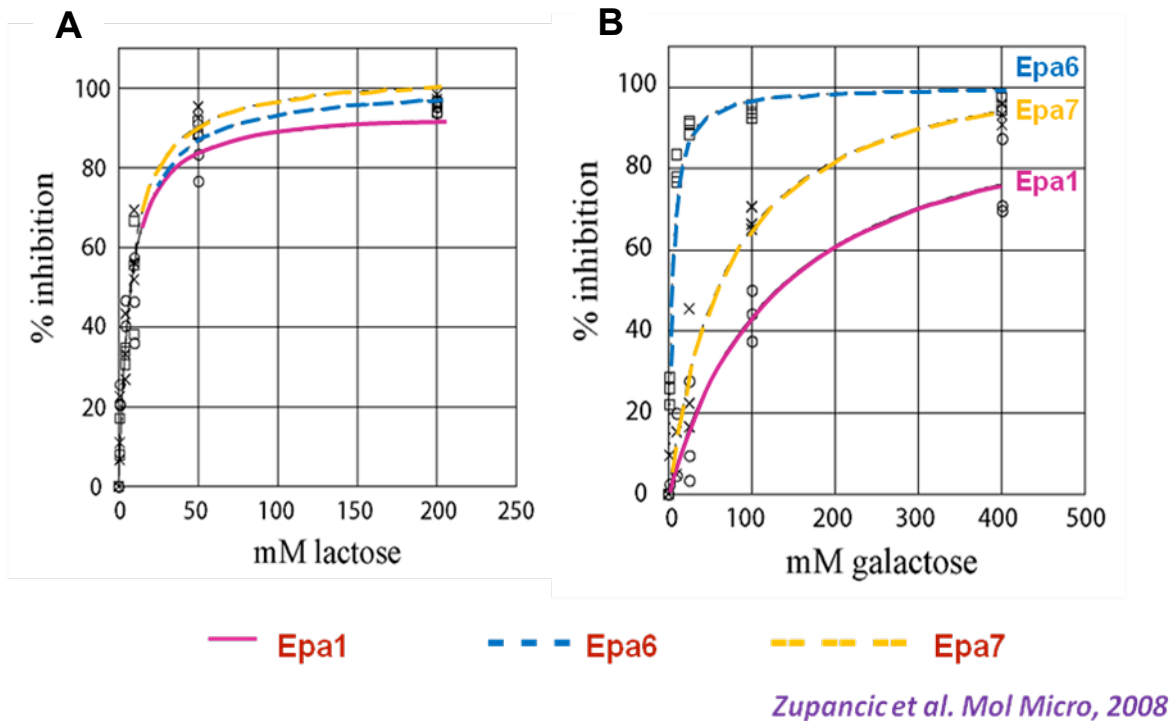
Se ha comprobado que la porción N-terminal de estas adhesinas es el dominio que está expuesto hacia el espacio extracelular para la unión con su respectivo ligando tipo lectina, además se han generado construcciones funcionales de las proteínas Als (Sheppard *et al.* 2004) y las proteínas Epa (Frieman *et al.* 2002), dichas construcciones fusionan el dominio N-terminal de la adhesina con el dominio C-terminal de diferentes proteínas GPI-CWP.

La expresión de estas construcciones en la levadura no patógena *Saccharomyces cerevisiae*, normalmente no adherente, le confiere a este organismo la capacidad de adherirse a diferentes células epiteliales de mamífero (Frieman *et al.* 2002; Sheppard *et al.* 2004).

En el caso de *C. glabrata*, el gran repertorio de genes *EPA* presentes en su genoma y algunos con funciones redundantes, hacen impráctica la construcción de cepas de *C. glabrata* que expresen sólo una de las adhesinas Epa. Por lo tanto, el uso de cepas de *S. cerevisiae* que expresen de forma heteróloga adhesinas Epa, es una herramienta indispensable para evaluar la función de las proteínas Epa en el fenómeno de adherencia mediado por cepas de *C. glabrata*.

En un reporte reciente de Zupancic y colaboradores (Zupancic *et al.* 2008), donde utilizan la estrategia mencionada anteriormente, encuentran que tres miembros de la familia de proteínas Epa, funcionalmente caracterizados como adhesinas en *C. glabrata* (Epa1, Epa6 y Epa7) se unen a ligandos que contienen un residuo terminal de galactosa.





**Fig 9.** Inhibición de la adherencia, de *S. cerevisiae*, mediada por Epas a células lec2 (ovario de hámster). En función de **A)** concentración de lactosa or **B)** concentración de galactosa.

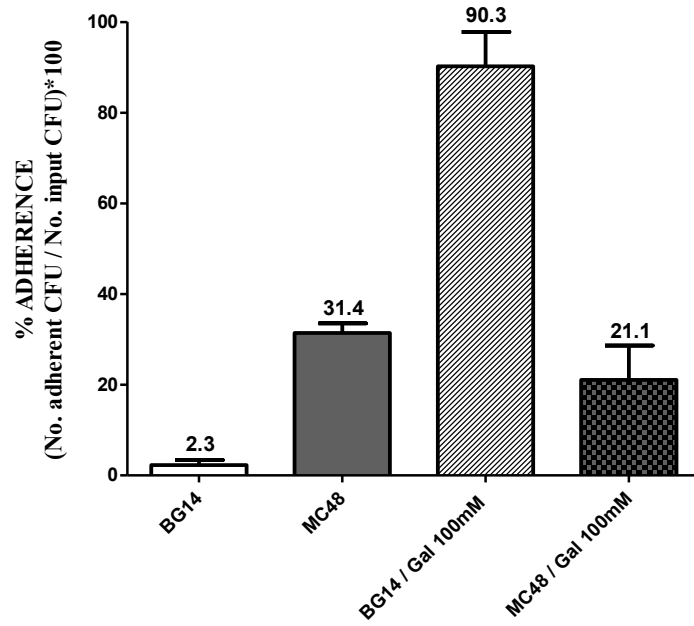
En el presente trabajo se realizaron ensayos de inhibición de adherencia utilizando lactosa (200mM), por el estudio de Zupancic *et al.* (2008) sabemos que a esa concentración de lactosa se inhibe casi al 100% la adherencia mediada por Epa1, Epa6 y Epa7. También se utilizó galactosa (100 mM), con la cual se inhibe casi al 100% de adherencia mediada por Epa6, pero sólo un 60% de adherencia mediada por Epa7 y un 40% de adherencia mediada por Epa1. Al realizar ensayos utilizando estos azúcares esperábamos poder determinar si Epa6 contribuye de manera importante a la adherencia que presenta el aislado MC48 (y planeamos realizarlo para los demás también); ya que si la adición de galactosa inhibiera

notablemente la adherencia, esto sugeriría que Epa6 contribuye significativamente a la adherencia en ese caso.

Los ensayos de adherencia en presencia de diferentes azúcares, se realizaron con la cepa BG14 como control y el aislado clínico 48, que sabemos tiene un fenotipo hiperadherente (~30-40% de adherencia) a células HeLa en fase estacionaria *in vitro*. Se crecen cultivos de las cepas mencionadas por 48hrs para alcanzar la fase estacionaria, que son condiciones en las que Epa1 no se expresa. Se coloca una cantidad fija ( $OD_{600nm}$ ) de células de las diferentes cepas a probar en contacto con el azúcar correspondiente, durante un periodo de 1hr que es lo que dura el procedimiento de adherencia *in vitro*, los azúcares se disuelven en solución de Hanks a la concentración requerida y en esa solución se ajusta la cantidad de levaduras adecuada para incubarlas con las células HeLa. Posteriormente se cuantifica el número de células (CFUs) que se recuperan tras la incubación con los azúcares correspondientes y se evalúa el efecto de los azúcares en el proceso de adherencia a esta línea celular.

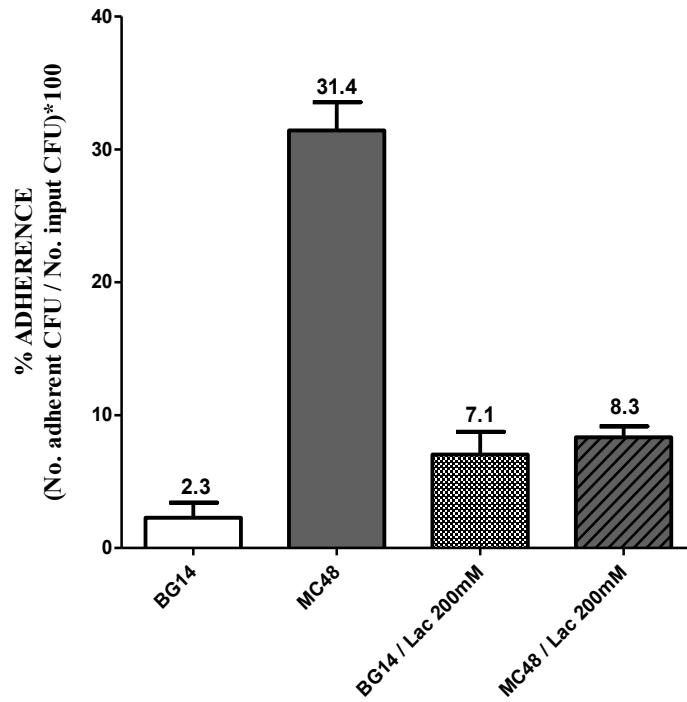
Enseguida se muestran los resultados de los ensayos de adherencia que se realizaron en presencia de lactosa y galactosa con cultivos de cepas en fase estacionaria.

**A**



*Candida glabrata* Clinical Isolates

**B**



*Candida glabrata* Clinical Isolates

**Fig 10. Inhibición de la adherencia a células HeLa mediante lactosa y galactosa.** Se observa en el panel A) que la adición de galactosa 100mM disminuye aproximadamente 10% la adherencia del aislado MC48, además se observa un incremento de la adherencia por parte de la cepa silvestre BG14 tras la adición de galactosa 100mM. En el panel B) podemos observar que la adición de lactosa 200mM disminuye drásticamente la adherencia del MC48 e incrementa un poco la adherencia de la cepa silvestre BG14.

De acuerdo a lo observado en el presente ensayo, podemos concluir que al menos para el aislado clínico MC48, el fenotipo de adherencia que observamos está mediado principalmente por Epa1, 6 y 7 pero existe una adherencia basal que no es inhibida con estos azúcares y posiblemente existan otras adhesinas implicadas en este proceso de adherencia pero que no usan como ligandos lactosa ni galactosa. Además se observó que en estos ensayos al poner en contacto a la cepa BG14 con los diferentes azúcares, se incrementa el porcentaje de adherencia en estas células, quizá exista la posibilidad de que estos azúcares induzcan a la cepa BG14 para expresar mayor cantidad de adhesinas u otros tipos de adhesinas en presencia de estos azúcares.

## DISCUSIÓN

Desde inicios de 1980, los hongos han emergido como una de las principales causas de enfermedad en humanos (Beck-Sague & Jarvis *et al.* 1993; Pfaller *et al.* 2007). A partir de la década de los 90's en que se aprobó el uso de fluconazol se ha visto un incremento en la aparición de las enfermedades infecciosas causadas por hongos oportunistas (Trick *et al.* 2002), principalmente en la población inmunocomprometida y en aquellos pacientes hospitalizados con enfermedades debilitantes, algunos ejemplos son pacientes de cáncer sujetos a tratamiento de quimioterapia, pacientes de cirugía y receptores de trasplantes de órganos tratados con inmuno-supresores (Krcmery *et al.* 1999). La mayoría de las micosis oportunistas están asociadas con especies de *Candida*, *Aspergillus* y *Criptococcus* (Richardson *et al.* 1991; Pfaller *et al.* 2006; Lass-Flörl *et al.* 2009) y en los últimos años se han incrementado las causadas por las especies de *Candida* no *albicans* (*C. glabrata*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis* y *C. krusei*) (Trick *et al.* 2002). Las infecciones causadas por *C. glabrata* son la segunda o tercera en frecuencia después de *C. albicans*, son difíciles de tratar y están asociadas con un alto índice de mortalidad (Fidel *et al.* 1999; Wisplinghoff *et al.* 2004).

Cada microorganismo patógeno posee factores de virulencia importantes que les confieren la capacidad de poder sobrevivir en el hospedero y así causar enfermedad (Pirofski & Casadevall 2012; Ehrlich *et al.* 2008). En la levadura patógena *C. glabrata* se han descrito varios factores de virulencia que la convierten en un patógeno exitoso como son: la resistencia innata a fluconazol, a estrés oxidante, producción de hidrolasas, generación de rearrreglos cromosómicos, formación de biofilms y adherencia a células epiteliales. Estos factores contribuyen a su capacidad para sobrevivir a los ambientes hostiles a los que se enfrenta (Cormack *et al.* 1999; de Las Penas *et al.* 2003; Naglik *et al.* 2004; Pfaller *et al.* 2004; Castano *et al.* 2005; Domergue *et al.* 2005; Iraqui *et al.* 2005; Kaur *et al.* 2007; Cuellar-Cruz *et al.* 2008; Polakova *et al.* 2009).

En el presente trabajo investigamos la capacidad que poseen múltiples aislados clínicos de *C. glabrata* para adherirse a diferentes sustratos (biológicos e inertes), como son células epiteliales (HeLa) y la formación de biofilms sobre plástico y determinamos el patrón de expresión de algunas de las adhesinas que median adherencia a este tipo de sustratos. Además, investigamos si algunas de las proteínas de la maquinaria del silenciamiento poseen polimorfismos asociados con la mayor expresión de ciertas adhesinas.

La adherencia de cada aislado clínico de *C. glabrata* a cada uno de los dos sistemas que utilizamos simulan por un lado, uno de los nichos en los que es capaz de colonizar *C. glabrata* (células HeLa que son un modelo de células del epitelio cervical) y además realizamos ensayos de formación de biofilms sobre superficies plásticas en placas de poliestireno, para simular las superficies sobre las que generalmente *C. glabrata* forma biofilms (catéteres, sondas, prótesis dentales, etc.).

### **Aislados clínicos de *C. glabrata* tienen diferentes capacidades de adhesión a células epiteliales (HeLa).**

La adherencia de *C. glabrata* a células epiteliales del hospedero en su mayoría esta mediada por la familia de genes *EPA* (Epithelial Adhesin). El genoma de *C. glabrata* codifica para múltiples genes *EPA* (de Las Penas *et al.* 2003; Castano *et al.* 2005). La cepa BG2 de *C. glabrata* (Cormack & Falkow 1999), un aislado clínico de vaginitis humana que también es virulento en un modelo murino de vaginitis (Fidel *et al.* 1996), se adhiere a células epiteliales humanas (HEp2) *in vitro* vía una proteína de pared celular (una lectina) codificada por el gen *EPA1*, la cual reconoce en las células del hospedero glico-conjugados que contienen N-acetil-lactosamina (Cormack *et al.* 1999).

Clasificamos a los aislados clínicos con respecto a la capacidad de adherencia que presentan, comparada con la adherencia que presenta nuestra cepa de

laboratorio en condiciones en las que *Epa1* no se expresa, es decir en cultivos en fase estacionaria. En estas condiciones, la cepa BG14 se considera no adherente ya que solamente una pequeña fracción de la población permanece adherida a células HeLa in vitro (~2%).

Los aislados clínicos (en fase estacionaria) se pueden clasificar en al menos cuatro grupos: no adherentes (<3 % adherencia), adherencia moderada (10–15 %), adherencia elevada (25–45 %) y adherencia muy elevada ( $\geq 45$  %). La mayoría de los aislados clínicos analizados caen dentro de la clasificación de aislados clínicos hiperadherentes (25-45% de adherencia), incluyendo a la cepa secuenciada CBS138.

Las mutantes nulas en cada una de las proteínas del silenciamiento subtelo mérico, presentan también niveles mucho mayores de adherencia que la cepa silvestre BG14 (derivada *ura3* $\Delta$  de la cepa BG2 Cormack y Falkow Genetics 1999), y estos también podrían clasificarse en grupos según su capacidad de adherencia a células HeLa. Mutantes nulas en los genes *SIR2* o *SIR3* presentan adherencia moderada en estas condiciones mientras que mutantes *sir4* $\Delta$ , *hdf1* $\Delta$  y *hdf2* $\Delta$  tienen adherencia elevada y las cepas *rif1* $\Delta$  corresponden a adherencia muy elevada.

El fenotipo de hiper-adherencia que presentan los 11 aislados clínicos hiperadherentes identificados de nuestra colección, podría haberse originado por varias causas. Una posibilidad es que se hayan generado mediante mutaciones en la región regulatoria de uno o varios de los genes *EPA* que codifican las principales adhesinas en *C. glabrata*. Otra posibilidad es que existan mutaciones, en algunos de los genes que regulan la expresión de las adhesinas *EPA* por medio del silenciamiento subtelo mérico (*SIR2*, *SIR3*, *SIR4*, *HDF1*, *HDF2* y *RIF1*). También es posible que estos aislados tengan rearrreglos cromosómicos que abarquen regiones grandes del genoma, y que esto resulte en mayor expresión de algunas adhesinas, tal como se ha descrito en el caso de algunos aislados clínicos en los que se presentan inserciones, deleciones o duplicaciones cromosómicas

que afectan gran variedad de genes y se ha correlacionado con una mayor resistencia al antimicótico fluconazol (Polakova *et al.* 2009).

**La capacidad para formar Biofilms sobre superficies de plástico es una característica que distingue a ciertas cepas y aislados clínicos de *C. glabrata*.**

Las infecciones por *Candida* están comúnmente asociadas con la formación de biofilms, los cuales pueden formarse sobre mucosas, superficies plásticas o dispositivos permanentes. Esta estructura especializada, llamada biofilm, consiste de microcolonias de levaduras inmersas en una matriz extracelular secretada por las células que forman parte del microambiente generado en el sitio de la infección, todo esto forma una estructura compleja sobre diferentes sustratos y es difícil de eliminar por los antifúngicos convencionales utilizados en la terapia habitual (Hasan *et al.* 2009).

*C. glabrata* presenta una elevada capacidad de formar biofilms en superficies de plástico, y se le ha atribuido un papel importante a la adhesina Epa6. Así mismo, mutaciones en *sir4* (que afectan el silenciamiento), forman biofilms con una mayor eficiencia, presumiblemente por la sobre-expresión de *EPA6* (Iraqi *et al.* 2005). Estos resultados pueden tener importantes implicaciones clínicas ya que muchas de las infecciones están asociadas con catéteres implantados o sondas.

Aunado a la adherencia, la formación de biofilms genera una mayor persistencia de *Candida* o cualquier microorganismo capaz de formar estas estructuras especializadas en el hospedero, lo cual conlleva a generar infecciones difíciles de tratar y una elevada tasa de tratamientos fallidos en estas enfermedades oportunistas.

Los 11 aislados clínicos hiperadherentes que utilizamos en este estudio, así como los no adherentes, presentan en general (excepto uno de ellos, MC66), una capacidad similar de formación de biofilms a la cepa de referencia BG14; sin



embargo, la cepa secuenciada CBS138 tiene una mayor capacidad de formación de biofilms.

Es claro que no hay una correlación clara entre la capacidad de adherencia a células HeLa y la capacidad de formación de biofilms de los aislados clínicos hiperadherentes. Por ejemplo, los dos aislados no adherentes (MC39 y MC56) tienen una baja adherencia e igual capacidad para formar biofilms que los aislados hiper-adherentes MC48 o MC2. La única cepa que tiene una capacidad para formar biofilms mucho menor que la cepa BG14 es el aislado hiperadherente MC66, mientras que la cepa secuenciada CBS138, con elevada adherencia, tiene una mayor capacidad para formar biofilms que la cepa silvestre.

La capacidad de formación de biofilms, para todas las mutantes sencillas en genes de la maquinaria del silenciamiento (*sir2Δ*, *sir3Δ*, *sir4Δ*, *hdf1Δ*, *hdf2Δ* y *rif1Δ*) es mayor comparada con la cepa silvestre, esto correlaciona con el hecho de que estas mutantes sobre-expresan varias adhesinas *EPA*. En los ensayos realizados encontramos que el MC66 posee menos capacidad de formar biofilms y la CBS138 una mayor capacidad, esto con respecto a la cepa BG14 (ANOVA,  $P < 0.01$ )

Como no todos los aislados clínicos que presentan mayor adherencia a células HeLa que la cepa silvestre, poseen la misma capacidad para formar biofilms, es probable que ambos fenómenos sean mediados por un conjunto de adhesinas diferente en cada caso. Además todos los aislados clínicos presentan el mismo nivel relativo de formación de biofilms que la cepa BG14, excepto MC66, el cual presenta una reducción significativa en la capacidad para formar biofilms.

De forma interesante, las cepas CBS138 y MC66 ambos pertenecen al grupo de aislados clínicos moderadamente hiperadherentes, sin embargo, CBS138 presenta la mayor capacidad para formar biofilms mientras que MC66 la menor, indicando que la hiperadherencia, quizá mediante la sobre-expresión de los genes *EPA* analizados, no altera la capacidad de formación de biofilms. Por ejemplo *EPA3*, el cual es expresado en la superficie celular durante la formación

de biofilms, se expresa solo en tres aislados (MC29, MC68 y MC66) y en la CBS138, esto sugiere que la expresión de *EPA3* podría deberse a la disminución de la eficiencia del silenciamiento. Sin embargo, los niveles de adherencia a células HeLa in vitro no correlacionan con la habilidad para formar biofilms en el modelo de microplaca.

### **La expresión de genes *EPA* podría conferir diferentes capacidades de adhesión a sustratos biológicos o superficies inertes.**

En cultivos en fase estacionaria de la cepa BG14, se observa una expresión muy baja de la mayoría de los genes *EPA*, por ejemplo *EPA1*, *EPA3* y *EPA6*, *EPA7* y *EPA12*, que se pueden detectar por medio de RT-PCR. En cambio en los aislados clínicos hiper-adherentes se observó una expresión diferencial de estos genes comparado con la cepa silvestre.

Nosotros encontramos que todos los aislados hiperadherentes sobreexpresan al menos dos de los genes *EPA* analizados con respecto a la cepa BG14. Por ejemplo, el aislado ligeramente adherente MC65 y el aislado de la clase altamente hiperadherentes (MC2), sobreexpresan *EPA1*, *EPA6* y *EPA7*, mientras los dos aislados moderadamente hiperadherentes MC29 y MC68, y la cepa CBS138, sobreexpresan todas las adhesinas evaluadas *EPA1*, *EPA3*, *EPA6*, *EPA7* y *EPA12*. Por otro lado, el otro aislado ligeramente hiperadherente MC25 sobreexpresa *EPA1* y *EPA6* y el aislado moderadamente hiperadherente MC51 sobreexpresa principalmente *EPA1* y *EPA7* (Fig. 3 y Tabla 3).

Los aislados moderadamente hiperadherentes MC61 y MC73 en general sobreexpresan *EPA6*, *EPA7* y *EPA12*, y posiblemente también *EPA1* (Fig. 3 y Tabla 3). El MC66 fue el único aislado que no tuvo ensayos reproducibles de RT-PCR, esto probablemente en parte debido a que es un aislado que en cultivo presenta un elevado grado de floculación, lo cual sugiere que la expresión de proteínas de pared incrementa la interacción célula a célula. En esta cepa, la

cantidad de RNA presente en las muestras es muy variable debido al número de células obtenidas en las extracciones.

Este análisis demuestra sin embargo, que todos los aislados hiperadherentes, sobreexpresan una combinación de Epa1 y Epa6 o Epa7 relativo a la cepa BG14 (excepto posiblemente el MC66). Es posible que las células HeLa utilizadas para los experimentos in vitro de adherencia, expresen en la superficie una concentración relativamente elevada de azúcares a los cuales se pueden unir Epa6 o Epa7. En relación a esto, un estudio reciente muestra que las células HeLa presentan en su superficie azúcares que consisten de un residuo de galactosa unido vía un enlace  $\beta$ 1-4 a la glucosa o N-acetilglucosa. Epa6 tiene un amplio repertorio de ligandos que contienen un residuo terminal de galactosa unido a residuos de galactosa o glucosa con enlaces  $\alpha$ 1-3,  $\alpha$ 1-4; o uniones  $\beta$ 1-3 o  $\beta$ 1-4 con residuos de galactosa o glucosa o derivados N-acetilados. Epa7 posee un estrecho espectro de especificidad en los ligandos y se une a galactosa terminal con uniones  $\beta$ 1-3 a otros residuos de galactosa o uniones  $\beta$ 1-4 a residuos de glucosa, pero puede reconocer los azúcares expresados por las células HeLa (Arndt *et al.* 2011; Maestre-Reyna *et al.* 2012; Zupancic *et al.* 2008). Además, varios aislados hiperadherentes también expresan Epa12, pero esta proteína no ha sido caracterizada como una adhesina funcional. Un hallazgo muy importante que encontramos en el presente estudio fue que los dos aislados caracterizados como no adherentes MC39 y MC56, presentan niveles reducidos de todos los genes *EPA* analizados en este estudio, y esto es consistente con su fenotipo no adherente.

**Polimorfismos en la secuencia del gen *SIR3* de algunos aislados clínicos podrían explicar su elevada capacidad de adherencia a diferentes sustratos biológicos o superficies inertes.**

Previamente a este estudio, se realizó un análisis de polimorfismos mediante los fragmentos de restricción producidos por las enzimas *Sau3A* y *Tsp509* (RFLPs) en los genes de la maquinaria del silenciamiento, provenientes de algunos de los aislados clínicos clasificados como hiperadherentes. Se encontró que, algunos aislados presentan polimorfismos en el gen *SIR3* (MC29 y MC68). Se amplificó y secuenció el gen *SIR3* de los aislados clínicos MC29 y MC68 que presentan RFLPs en este gen. Encontramos que existen varios cambios en la secuencia de nucleótidos del gen *SIR3* proveniente de estos aislados clínicos comparando con la secuencia de la cepa BG14. Algunos de estos cambios, si producen un cambio en el aminoácido correspondiente. También secuenciamos la región completa del gen *SIR3* proveniente de dos aislados de cada clase de los niveles de adherencia (y se incluyeron dos aislados no adherentes como control).

La cepa BG14 contiene al menos 23 genes *EPA* en su genoma y el silenciamiento subtelomérico controla negativamente la expresión de la mayoría de estos genes (Gallegos-García *et al.* 2012; Halliwell *et al.* 2012; de Las Penas, Pan *et al.* 2003; Castano *et al.* 2005). Debido a que nosotros encontramos que algunos aislados clínicos como MC29 y MC68 sobreexpresan todas las adhesinas evaluadas en este estudio, y la mayoría de los demás aislados sobreexpresan más de una adhesina, consideramos la posibilidad de que estos aislados tengan un silenciamiento subtelomérico deficiente, el cual podría resultar en la sobreexpresión de varias adhesinas simultáneamente.

Por otro lado, es muy importante mencionar un hallazgo que es relevante para los fenotipos encontrados en nuestras cepas de *C. glabrata*, al comparar la secuencia de Sir3 de los aislados clínicos 29 y 68 con la secuencia de la cepa secuenciada CBS138, observamos que hay 3 cambios que comparte con los aislados clínicos MC29 y MC68 y esto podría correlacionar con lo encontrado

previamente al evaluar la adherencia de la cepa CBS138 que resultó ser hiperadherente a células HeLa, al igual que los aislados 29 y 68. Probablemente los alelos de *SIR3* en estas cepas no sean tan eficientes para llevar a cabo su función o estos cambios eliminan la función de la proteína.

Un reporte reciente, donde utilizan como modelo a la cepa CBS138 para evaluar la expresión del gen *EPA1* in vitro, encuentran que existe una heterogeneidad en la expresión de *EPA1* en una misma población celular de levaduras provenientes de las cepas BG2 (la cepa parental de la cepa BG14 utilizada en el presente estudio), mientras que en la cepa CBS138 la expresión de *Epa1* es homogénea, así como en algunos aislados clínicos de *C. glabrata*. Esta heterogeneidad se debe al silenciamiento epigenético de la expresión de *EPA1*, y por lo tanto también encuentran que existe variabilidad en el silenciamiento y expresión de *EPA1* entre diferentes cepas. Un hallazgo importante del presente estudio fue que, la expresión ectópica del propio gen *SIR3* en la cepa CBS138 permite una expresión heterogénea de *EPA1*, esto quizá es debido a que un silenciamiento ineficiente en la cepa CBS138 puede ser suprimido mediante la sobreexpresión de su propio gen *SIR3* (Halliwell *et al.* 2012). Este trabajo previo, nos muestra que es importante evaluar la funcionalidad de los alelos de *SIR3* y su relación con la expresión de las adhesinas subteloméricas para explicar el fenotipo hiperadherente de algunos aislados clínicos de *C. glabrata*.

Nuestros resultados de secuenciación del gen *SIR3* nos muestran que hay múltiples polimorfismos en las proteínas Sir3 provenientes de cada aislado relativo a la cepa BG14. La cepa CBS138, la cual posiblemente posea un silenciamiento ineficiente, contiene tres cambios: S236T, N268H y I503L relativos a la cepa BG14. Estos polimorfismos están presentes en la mayoría de los aislados hiperadherentes, pero también están presentes en uno de los aislados no adherentes (MC56), aunque no están en el otro aislado no adherente secuenciado MC39. De manera que estos tres cambios en Sir3 de la cepa CBS138 probablemente no afectan la actividad de Sir3 (porque estos cambios también están presentes en el aislado no adherente MC56), y muestran que no existe una

correlación directa entre estos polimorfismos en Sir3 y el fenotipo de adherencia de la cepa CBS138. En este caso parece que el silenciamiento ineficiente que observamos en este estudio y la baja heterogeneidad en la expresión de *EPA1* (debido a un silenciamiento ineficiente) observado por Halliwell *et al* ( 2012) puede ser debido a otras proteínas del silenciamiento además de Sir3; y el hecho de que la sobreexpresión de *SIR3* de la CBS138 pueda incrementar la heterogeneidad en la CBS138, podría reflejar el efecto de una copia extra de su propio *SIR3* sobre el resto de las proteínas del silenciamiento y por consiguiente en el silenciamiento subtelomérico de esta cepa.

En la Fig. 4 se muestra esquemáticamente la proteína Sir3 de *C. glabrata* (*CgSir3*) comparada con Sir3 de *S. cerevisiae*, indicando los dominios funcionales de la proteína proveniente de *S. cerevisiae* que ha sido previamente caracterizada (Ehrentraut *et al.* 2011; Norris & Boeke 2010; Connelly *et al.* 2006). Las proteínas Sir3 de ambos organismos son solamente 38% similares; en efecto sólo el extremo amino terminal que corresponde al dominio BAH (Bromo-adjacent homology) del aminoácido 1 al 214, se encuentra bien conservado entre *S. cerevisiae* y *C. glabrata* (65% de similitud, 43% de identidad). Este dominio en *ScSir3* interactúa con los nucleosomas y se han descrito varias mutaciones en el dominio BAH que afectan el silenciamiento subtelomérico (Norris & Boeke 2010). Sin embargo, ninguno de los polimorfismos encontrados en los aislados clínicos hiperadherentes se localizan en este dominio, y todos los aislados son idénticos a la cepa BG14 y la cepa CBS138 en esta región. *ScSir3* posee un dominio AAA+ poco conservado en los aminoácidos 532 al 845, y el dominio correspondiente en *CgSir3* (residuos 632 al 947), es solamente 37% similar al dominio de *S. cerevisiae*. La mayoría de las sustituciones encontradas en los aislados clínicos hiperadherentes se acumulan en la región entre los aminoácidos 236 al 534 que es la región entre el dominio BAH y el posible dominio AAA+; con la excepción de dos aislados moderadamente hiperadherentes que son MC29 y MC68, los cuales contienen 3 sustituciones en el dominio AAA+ putativo. Además los alelos de D679E e I739N de *CgSir3*, ambos en el dominio putativo AAA de MC29 y MC68,

están flanqueados por dos bloques de aminoácidos que son esenciales para el silenciamiento subtelomérico en la región correspondiente de *ScSir3* (Ehrentraut *et al.* 2011). De forma interesante, las mutaciones en el dominio AAA+ putativo de los aislados moderadamente hiperadherentes no está presente en los aislados no adherentes (indicado con flechas en la Fig. 4). Además, cinco polimorfismos más en Sir3 en las cepas moderadamente hiperadherentes tampoco están presentes en los aislados no adherentes. Esto sugiere que los alelos encontrados en MC29 y MC68 podrían contribuir a la hiperadherencia y los fenotipos de sobreexpresión de los genes *EPA*, así que estos alelos podrían ser menos eficientes para establecer el silenciamiento subtelomérico en las células. En las otras dos clases de aislados hiperadherentes y en la CBS138, los alelos de Sir3 comparten muchos polimorfismos con los aislados no adherentes. Estos datos sugieren que la sobreexpresión de los genes *EPA* y los fenotipos de hiperadherencia encontrados en estas otras clases, son probablemente debido a algún otro mecanismo, tal vez a través de otras proteínas del silenciamiento que probablemente contienen polimorfismos que dan como resultado un silenciamiento menos eficiente. Además, un aislado proveniente de los grupos de los aislados muy poco adherentes y el altamente hiperadherente contiene polimorfismos adicionales que se encuentran después del dominio putativo AAA+, en el COO-terminal de Sir3, los cuales tampoco se encuentran en los aislados no adherentes. Estos datos sustentan la idea de que el dominio putativo de AAA+ y posiblemente todo el extremo carboxilo terminal podrían tener un rol en el silenciamiento subtelomérico de una manera análoga a lo descrito en *ScSir3* (Ehrentraut *et al.* 2011; Norris & Boeke 2010). Es claro de los datos presentados en este trabajo que cada aislado de *C. glabrata* estudiado difiere significativamente de otros en términos de adhesión a células epiteliales o superficies plásticas así como la expresión de los genes para adhesinas. Estas diferencias no correlacionan directamente con alelos específicos de Sir3, pero alelos particulares de Sir3 (especialmente aquellos dentro del dominio putativo AAA+) podrían resultar en un silenciamiento subtelomérico menos eficiente de los genes *EPA*. Posiblemente la combinación específica de alelos de todas las proteínas del silenciamiento podría afectar el

silenciamiento subtelomérico de manera que resulta en un patrón de expresión particular de genes *EPA* que define la habilidad de ese aislado clínico para adherirse y persistir en el hospedero mamífero. Actualmente estamos investigando la posible participación de otras proteínas del silenciamiento en la regulación de la expresión de varios genes *EPA* en aislados clínicos de *C. glabrata* hiperadherentes.

## CONCLUSIONES Y APORTACIONES DEL TRABAJO

*Candida glabrata* surge como un patógeno importante en la década de 1990. Anteriormente, en gran medida ignorado, este organismo recibió poca atención, por lo tanto, no es sorprendente que nuestro conocimiento de ella sea incompleto. Con las herramientas moleculares de que disponemos actualmente para estudiar a *C. glabrata*, se pueden realizar estudios que nos permitan identificar más factores importantes para la patogenicidad y virulencia de esta levadura.

El presente trabajo nos aporta un primer acercamiento a la caracterización molecular de una colección de aislados clínicos de *C. glabrata*.

Este estudio nos muestra que hay una gran variabilidad de fenotipos de adherencia a células epiteliales y a superficies plásticas, y no hay una correlación evidente entre estos fenotipos en los aislados estudiados. Sin embargo, todos los aislados identificados como hiperadherentes presentan una sobre-expresión de una combinación particular de las adhesinas más importantes, la cual difiere de aislado a aislado. De forma interesante, también mostramos que existen múltiples alelos de Sir3 entre los aislados de diferentes clases de hiper-adherencia, y en este caso tampoco existe una correlación clara entre alelos particulares de Sir3 y la capacidad de adherencia. Sin embargo, es posible que ciertos alelos particulares de Sir3 en el dominio AAA+ putativo resulte en una proteína menos eficiente para el establecimiento de silenciamiento subtelomérico.



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

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

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

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

**C***CANDIDA glabrata*, an opportunistic fungal pathogen normally present in the mucosal flora, can cause severe disseminated infections. *C. glabrata* is the second most common agent of candidiasis, accounting for 15–20% of *Candida* bloodstream infections worldwide (Pfaller and Diekema 2010). Some traits of *C. glabrata* that allow it to cause disease have been described (Kaur *et al.* 2005; Roetzer *et al.* 2011). These include resistance to oxidative stress (Cuellar-Cruz *et al.* 2008, 2009) and adherence to epithelial cells (Cormack *et al.* 1999; Castaño *et al.* 2005).

Adherence to host cells has been proposed to be an important initial step for virulence. Additionally, the ability to adhere to abiotic substrates and the adherence between microbial cells are essential attributes for biofilm formation

in many pathogens. Adherence in pathogenic fungi has been shown to be mediated primarily by glycosylphosphatidylinositol-anchored cell wall proteins (GPI-CWPs) which are found broadly in different fungal species including *Saccharomyces cerevisiae*, *C. glabrata*, and *C. albicans* (Castaño *et al.* 2006). In *S. cerevisiae*, the *FLO* family of genes (*FLO1*, *FLO5*, and *FLO9–FLO11*) encode a group of (GPI-CWPs) that are required for flocculation, pseudohyphal growth, and biofilm formation on abiotic substrates (Kobayashi *et al.* 1998; Guo *et al.* 2000). *C. albicans* encodes ~104 putative GPI-CWPs including the Als family, the Hwp family, Hyr1, and Eap1 (De Groot *et al.* 2003a,b; Li and Palecek 2003), many of which are thought to mediate adhesion to host epithelial and endothelial cells as well as to extracellular matrix proteins (Hoyer 2001; Li and Palecek 2003; Sheppard *et al.* 2004; Klotz *et al.* 2004; Hoyer *et al.* 2008). *C. glabrata* can adhere to epithelial cells and also to inert surfaces. *EPA1* encodes the major epithelial adhesin in the BG2 strain, binding to *N*-acetyl lactosamine-containing glycoconjugates (Cormack *et al.* 1999; Zupancic *et al.* 2008). *EPA1* belongs to a large gene family (*EPA* family) of ~23 paralogues, of which *EPA6* and *EPA7* have also been shown to mediate

Copyright © 2012 by the Genetics Society of America

doi: 10.1534/genetics.111.138099

Manuscript received September 28, 2011; accepted for publication December 25, 2011

<sup>1</sup>These authors contributed equally to this work.

<sup>2</sup>Present address: Facultad de Enfermería, Universidad Autónoma de San Luis Potosí, San Luis Potosí, San Luis Potosí, 78240, México.

<sup>3</sup>Corresponding author: Camino a la Presa San José 2055, División de Biología Molecular, Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, San Luis Potosí, San Luis Potosí, 78216, México. E-mail: cano@ipicyt.edu.mx

## **PARTICIPACIÓN EN OTROS TRABAJOS**

### **ADHERENCE, VIRULENCE AND CELL WALL PROTEINS OF *Candida glabrata***

**Alejandro De Las Peñas, Emmanuel Orta-Zavalza, Verónica Martínez-Jiménez  
and Irene Castaño\***

IPICYT. Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica. División de Biología Molecular

Camino a la Presa San José # 2055, Col. Lomas 4<sup>a</sup>, San Luis Potosí, SLP, México CP 78216.

#### **Abstract**

The cell wall of human pathogenic fungi is a dynamic organelle that forms the interface between the fungus and its host environment. It gives shape, provides protection against the environmental conditions within the host, and mediates host-fungus interactions that allow the establishment of the infections.

The fungal cell wall is a bi-layered structure composed of an inner network of complex carbohydrates and an outer layer of glycosylated mannoproteins (cell wall glycoproteins or CWPs) covalently linked to the wall glucans. There are two major types of cell surface glycoproteins: glycosylphosphatidylinositol-dependent glycoproteins (GPI-CWPs) and the Pir proteins: proteins with internal repeats (Pir-CWPs).

The outer layer is essential for cell wall recognition processes such as adhesion to other fungal or mammalian cells. Proteins present at the

---

\* icastano@ipicyt.edu.mx

cell surface display variations among different species and also within a single species depending on the environment or the growth phase, allowing fungi to adapt to changing environmental conditions. One group of highly diverse GPI-CWPs is the adhesins, which mediate interactions between the fungus and the mammalian host cells and to abiotic surfaces to form biofilms.

*Candida glabrata*, an opportunistic pathogenic yeast that adheres to epithelial and endothelial cells, is responsible for 18-26% of all *Candida* systemic infections in the US. The cell wall of *C. glabrata* contains 67 adhesin-like GPI-CWPs classified into 7 groups, and the majority of these proteins are encoded at subtelomeric regions of the genome. Adherence to epithelial cells is mediated primarily by members of the largest group of GPI-CWPs, the Epa family of adhesins, encoded by the paralogous *EPA* genes.

The subtelomeric localization of the *EPA* genes (and probably other GPI-CWPs) has important consequences in the evolution and regulation of the expression of the *EPA* genes. Unequal crossing-over between members of the *EPA* gene family can generate variability; and the chromatin-based transcriptional repression found at subtelomeres in some strains of *C. glabrata* results in expression of only one or very few *EPA* genes in each cell. Epigenetic regulation of adhesin expression can respond to specific environmental cues within the host by inducing the expression of specific *EPAs*. Remarkably, Sir-protein dependent epigenetic silencing occurs in some, but not all, *C. glabrata* strains analyzed thus far.

Understanding how the variability of GPI-CWPs is generated and how *C. glabrata* senses the environmental cues to regulate *EPA* expression are still open questions in the virulence of this pathogen.

## REFERENCIAS

- Aisner, J., S. C. Schimpff, et al. (1976). "Torulopsis glabrata infections in patients with cancer. Increasing incidence and relationship to colonization." Am J Med **61**(1): 23-8.
- Almirante, B., D. Rodriguez, et al. (2005). "Epidemiology and predictors of mortality in cases of Candida bloodstream infection: results from population-based surveillance, barcelona, Spain, from 2002 to 2003." J Clin Microbiol **43**(4): 1829-35.
- Arndt, N. X., J. Tiralongo, et al. "Differential carbohydrate binding and cell surface glycosylation of human cancer cell lines." J Cell Biochem **112**(9): 2230-40.
- Beck-Sague, C. and W. R. Jarvis (1993). "Secular trends in the epidemiology of nosocomial fungal infections in the United States, 1980-1990. National Nosocomial Infections Surveillance System." J Infect Dis **167**(5): 1247-51.
- Buitron Garcia, R., R. Romero Cabello, et al. (2002). "[Study on Candida non-albicans species and its relation to recurrent vulvovaginal candidiasis]." Ginecol Obstet Mex **70**: 431-6.
- Calvin, N. M. and P. C. Hanawalt (1988). "High-efficiency transformation of bacterial cells by electroporation." J Bacteriol **170**(6): 2796-801.
- Castano, I., B. Cormack, et al. (2006). "[Virulence of the opportunistic pathogen mushroom Candida glabrata]." Rev Latinoam Microbiol **48**(2): 66-9.
- Castano, I., R. Kaur, et al. (2003). "Tn7-based genome-wide random insertional mutagenesis of Candida glabrata." Genome Res **13**(5): 905-15.
- Castano, I., S. J. Pan, et al. (2005). "Telomere length control and transcriptional regulation of subtelomeric adhesins in Candida glabrata." Mol Microbiol **55**(4): 1246-58.
- Connelly, J. J., P. Yuan, et al. (2006). "Structure and function of the Saccharomyces cerevisiae Sir3 BAH domain." Mol Cell Biol **26**(8): 3256-65.
- Cormack, B. P. and S. Falkow (1999). "Efficient homologous and illegitimate recombination in the opportunistic yeast pathogen Candida glabrata." Genetics **151**(3): 979-87.

- Cormack, B. P., N. Ghori, et al. (1999). "An adhesin of the yeast pathogen *Candida glabrata* mediating adherence to human epithelial cells." Science **285**(5427): 578-82.
- Csank, C. and K. Haynes (2000). "*Candida glabrata* displays pseudohyphal growth." FEMS Microbiol Lett **189**(1): 115-20.
- Cuellar-Cruz, M., M. Briones-Martin-del-Campo, et al. (2008). "High resistance to oxidative stress in the fungal pathogen *Candida glabrata* is mediated by a single catalase, Cta1p, and is controlled by the transcription factors Yap1p, Skn7p, Msn2p, and Msn4p." Eukaryot Cell **7**(5): 814-25.
- De Las Penas, A., S. J. Pan, et al. (2003). "Virulence-related surface glycoproteins in the yeast pathogen *Candida glabrata* are encoded in subtelomeric clusters and subject to RAP1- and SIR-dependent transcriptional silencing." Genes Dev **17**(18): 2245-58.
- Domergue, R., I. Castano, et al. (2005). "Nicotinic acid limitation regulates silencing of *Candida* adhesins during UTI." Science **308**(5723): 866-70.
- Dujon, B., D. Sherman, et al. (2004). "Genome evolution in yeasts." Nature **430**(6995): 35-44.
- Ehrentraut, S., M. Hassler, et al. "Structural basis for the role of the Sir3 AAA+ domain in silencing: interaction with Sir4 and unmethylated histone H3K79." Genes Dev **25**(17): 1835-46.
- Ehrlich, G. D., N. L. Hiller, et al. (2008). "What makes pathogens pathogenic." Genome Biol **9**(6): 225.
- Fidel, P. L., Jr., J. L. Cutright, et al. (1996). "A murine model of *Candida glabrata* vaginitis." J Infect Dis **173**(2): 425-31.
- Fidel, P. L., Jr., J. A. Vazquez, et al. (1999). "*Candida glabrata*: review of epidemiology, pathogenesis, and clinical disease with comparison to *C. albicans*." Clin Microbiol Rev **12**(1): 80-96.
- Frieman, M. B., J. M. McCaffery, et al. (2002). "Modular domain structure in the *Candida glabrata* adhesin Epa1p, a beta1,6 glucan-cross-linked cell wall protein." Mol Microbiol **46**(2): 479-92.

- Gallegos-Garcia, V., S. J. Pan, et al. "A novel downstream regulatory element cooperates with the silencing machinery to repress EPA1 expression in *Candida glabrata*." Genetics **190**(4): 1285-97.
- Halliwell, S. C., M. C. Smith, et al. "Heterogeneous expression of the virulence-related adhesin Epa1 between individual cells and strains of the pathogen *Candida glabrata*." Eukaryot Cell **11**(2): 141-50.
- Hasan, F., I. Xess, et al. (2009). "Biofilm formation in clinical *Candida* isolates and its association with virulence." Microbes Infect **11**(8-9): 753-61.
- Hickey, W. F., L. H. Sommerville, et al. (1983). "Disseminated *Candida glabrata*: report of a uniquely severe infection and a literature review." Am J Clin Pathol **80**(5): 724-7.
- Iraqi, I., S. Garcia-Sanchez, et al. (2005). "The Yak1p kinase controls expression of adhesins and biofilm formation in *Candida glabrata* in a Sir4p-dependent pathway." Mol Microbiol **55**(4): 1259-71.
- Juarez-Reyes, A., C. Y. Ramirez-Zavaleta, et al. "A protosilencer of subtelomeric gene expression in *Candida glabrata* with unique properties." Genetics **190**(1): 101-11.
- Kantarcioglu, A. S. and A. Yucel (2002). "Phospholipase and protease activities in clinical *Candida* isolates with reference to the sources of strains." Mycoses **45**(5-6): 160-5.
- Kao, A. S., M. E. Brandt, et al. (1999). "The epidemiology of candidemia in two United States cities: results of a population-based active surveillance." Clin Infect Dis **29**(5): 1164-70.
- Kapteyn, J. C., H. Van Den Ende, et al. (1999). "The contribution of cell wall proteins to the organization of the yeast cell wall." Biochim Biophys Acta **1426**(2): 373-83.
- Kaur, R., R. Domergue, et al. (2005). A yeast by any other name: *Candida glabrata* and its interaction with the host. Curr Opin Microbiol. **8**: 378-84.
- Kaur, R., B. Ma, et al. (2007). "A family of glycosylphosphatidylinositol-linked aspartyl proteases is required for virulence of *Candida glabrata*." Proc Natl Acad Sci U S A **104**(18): 7628-33.

- Krcmery, V. (1999). "Torulopsis glabrata an emerging yeast pathogen in cancer patients." Int J Antimicrob Agents **11**(1): 1-6.
- Lass-Flörl, C. (2009). "The changing face of epidemiology of invasive fungal disease in Europe." Mycoses **52**(3): 197-205.
- Maestre-Reyna, M., R. Diderrich, et al. "Structural basis for promiscuity and specificity during *Candida glabrata* invasion of host epithelia." Proc Natl Acad Sci U S A **109**(42): 16864-9.
- Manzano-Gayosso, P., F. Hernandez-Hernandez, et al. (2000). "[Identification and typing of yeast isolates from hospital patients in Mexico City]." Rev Argent Microbiol **32**(1): 1-6.
- Morschhauser, J. "Regulation of multidrug resistance in pathogenic fungi." Fungal Genet Biol **47**(2): 94-106.
- Naglik, J., A. Albrecht, et al. (2004). "*Candida albicans* proteinases and host/pathogen interactions." Cell Microbiol **6**(10): 915-26.
- Norris, A. and J. D. Boeke "Silent information regulator 3: the Goldilocks of the silencing complex." Genes Dev **24**(2): 115-22.
- Pappas, P. G. (2006). "Invasive candidiasis." Infect Dis Clin North Am **20**(3): 485-506.
- Pfaller, M. A., L. Boyken, et al. (2006). "Global surveillance of in vitro activity of micafungin against *Candida*: a comparison with caspofungin by CLSI-recommended methods." J Clin Microbiol **44**(10): 3533-8.
- Pfaller, M. A., S. A. Messer, et al. (2007). "Use of fluconazole as a surrogate marker to predict susceptibility and resistance to voriconazole among 13,338 clinical isolates of *Candida* spp. Tested by clinical and laboratory standards institute-recommended broth microdilution methods." J Clin Microbiol **45**(1): 70-5.
- Pfaller, M. A., S. A. Messer, et al. (2004). "Geographic variation in the susceptibilities of invasive isolates of *Candida glabrata* to seven systemically active antifungal agents: a global assessment from the ARTEMIS Antifungal Surveillance Program conducted in 2001 and 2002." J Clin Microbiol **42**(7): 3142-6.

- Pirofski, L. A. and A. Casadevall "Q and A: What is a pathogen? A question that begs the point." BMC Biol **10**: 6.
- Polakova, S., C. Blume, et al. (2009). "Formation of new chromosomes as a virulence mechanism in yeast *Candida glabrata*." Proc Natl Acad Sci U S A **106**(8): 2688-93.
- Rangel-Frausto, M. S., T. Wiblin, et al. (1999). "National epidemiology of mycoses survey (NEMIS): variations in rates of bloodstream infections due to *Candida* species in seven surgical intensive care units and six neonatal intensive care units." Clin Infect Dis **29**(2): 253-8.
- Richardson, M. D. (1991). "Opportunistic and pathogenic fungi." J Antimicrob Chemother **28 Suppl A**: 1-11.
- Rosas-Hernandez, L. L., A. Juarez-Reyes, et al. (2008). "yKu70/yKu80 and Rif1 regulate silencing differentially at telomeres in *Candida glabrata*." Eukaryot Cell **7**(12): 2168-78.
- Sheppard, D. C., M. R. Yeaman, et al. (2004). "Functional and structural diversity in the Als protein family of *Candida albicans*." J Biol Chem **279**(29): 30480-9.
- Sikorski, R. S. and P. Hieter (1989). "A system of shuttle vectors and yeast host strains designed for efficient manipulation of DNA in *Saccharomyces cerevisiae*." Genetics **122**(1): 19-27.
- Sobel, J. D. (2007). "Vulvovaginal candidosis." Lancet **369**(9577): 1961-71.
- Trick, W. E., S. K. Fridkin, et al. (2002). "Secular trend of hospital-acquired candidemia among intensive care unit patients in the United States during 1989-1999." Clin Infect Dis **35**(5): 627-30.
- Wingard, J. R., W. G. Merz, et al. (1993). "Association of *Torulopsis glabrata* infections with fluconazole prophylaxis in neutropenic bone marrow transplant patients." Antimicrob Agents Chemother **37**(9): 1847-9.
- Wisplinghoff, H., T. Bischoff, et al. (2004). "Nosocomial bloodstream infections in US hospitals: analysis of 24,179 cases from a prospective nationwide surveillance study." Clin Infect Dis **39**(3): 309-17.



Wong, S., M. A. Fares, et al. (2003). "Evidence from comparative genomics for a complete sexual cycle in the 'asexual' pathogenic yeast *Candida glabrata*." Genome Biol **4**(2): R10.

Zupancic, M. L., M. Frieman, et al. (2008). "Glycan microarray analysis of *Candida glabrata* adhesin ligand specificity." Mol Microbiol **68**(3): 547-59.