



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

POSGRADO EN CIENCIAS EN BIOLOGIA MOLECULAR

Caracterización de Abf1 en *Candida glabrata*

Tesis que presenta

Laura Angélica Vera Salazar

Para obtener el grado de

Maestra en Ciencias en Biología Molecular

Directora de la Tesis:

Dra. Irene Beatriz Castaño Navarro

San Luis Potosí, S.L.P., Julio 2021



Constancia de aprobación de la tesis

La tesis “**Caracterización de Abf1 en *Candida glabrata***” presentada para obtener el Grado de Maestra en Ciencias en Biología Molecular fue elaborada por **Laura Angélica Vera Salazar** y aprobada el **17 de junio de 2021** 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 B. Castaño Navarro
Directora de la tesis

Dr. María Jazmin Abraham Juárez
Miembro del Comité Tutorial

Dr. Antonio De León Rodríguez
Miembro del Comité Tutorial

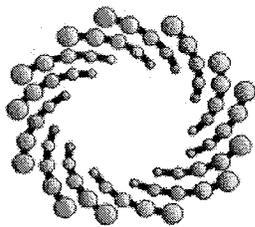


IPICYT

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 y apoyada por el proyecto de CONACYT No. 610281 de Ciencia de Frontera 2019.

Durante la realización del trabajo el autor recibió una beca académica del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología No. 1004640 y del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A. C.



IPICYT

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

Acta de Examen de Grado

El Secretario Académico del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C., certifica que en el Acta 224 del Libro Segundo de Actas de Exámenes de Grado del Programa de Maestría en Ciencias en Biología Molecular está asentado lo siguiente:

En la ciudad de San Luis Potosí a los 14 días del mes de julio del año 2021, se reunió a las 16:00 horas en las instalaciones del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C., el Jurado integrado por:

Dr. Antonio De León Rodríguez	Presidente	IPICYT
Dra. María Jazmín Abraham Juárez	Secretaria	IPICYT
Dra. Irene Beatriz Castaño Navarro	Sinodal	IPICYT

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

MAESTRA EN CIENCIAS EN BIOLOGÍA MOLECULAR

sustentó la C.

Laura Angélica Vera Salazar

sobre la Tesis intitulada:

Caracterización de Abf1 en Candida glabrata

que se desarrolló bajo la dirección de

Dra. Irene Beatriz Castaño Navarro

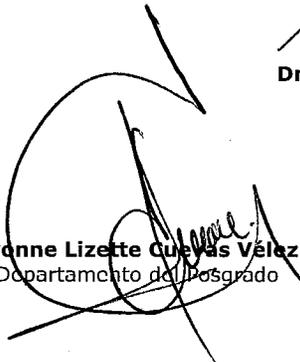
El Jurado, después de deliberar, determinó

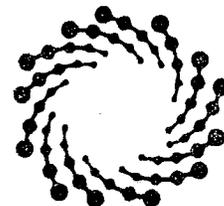
APROBARLA

Dándose por terminado el acto a las 18:23 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 14 días del mes de julio de 2021.


Dr. Marcial Bonilla Marín
Secretario Académico


Mtra. Ivonne Lizette Cuevas Vélaz
Jefa del Departamento de Posgrado



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

Dedicatorias.

Con amor a mis padres Juan y Sanjuana, por apoyarme en mis decisiones y guiarme hasta donde hoy me encuentro, siempre impulsando el esfuerzo.

A mis hermanas por su apoyo, cariño y comprensión siempre

A mis amigos en especial Isabel, por su amistad comprensión apoyo y compañía durante mi estancia en San Luis Potosí

El éxito es la suma de pequeños esfuerzos repetidos día tras día...

Agradecimientos

Al instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica por el apoyo institucional brindado

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por el apoyo económico brindado para la realización del trabajo de maestría

Al Laboratorio Nacional de Biotecnología Agrícola Médica y Ambiental (LANBAMA) por apoyo en la secuenciación de plásmidos.

A la Dra. Irene B. Castaño Navarro por guiarme, por los comentarios brindados tan acertados, por ser un ejemplo como persona y como científica.

Al Dr. Alejandro de las Peñas por los comentarios brindados para la realización del proyecto

A la Dra. Guadalupe Gutiérrez Escobedo por su apoyo técnico en el laboratorio, y sus observaciones en este proyecto

Al Dr. Antonio De León Rodríguez y a la Dra Maria Jazmín Abraham Juárez por sus comentarios y observaciones realizados para este proyecto

A Gloria López por su apoyo brindado en el laboratorio

A todos mis compañeros del laboratorio ser por brindarme su apoyo y su amistad durante mi estancia aquí.

Contenido

Constancia de aprobación de la tesis	ii
Créditos Institucionales	iii
Acta de Examen	iv
Dedicatorias	v
Agradecimientos	vi
Resumen	xi
Abstract	xii
INTRODUCCIÓN	1
MATERIALES Y MÉTODOS	7
Medios de cultivo	7
Cepas, oligos y plásmidos	7
Construcción de cepas con expresión reprimible de Abf1	8
Determinación de la velocidad de crecimiento	9
Ensayos de viabilidad	10
Microscopia de fluorescencia	11
Determinación de contenido de ADN	11
Análisis de los plásmidos obtenidos de las cepas supresoras.	12
RESULTADOS	14
Abf1 es esencial para el crecimiento de <i>Candida glabrata</i>	14
La ausencia de Abf1 causa arresto y posteriormente, muerte celular	15
La incubación prolongada en medio de represión de <i>ABF1</i> puede resultar en la aparición de mutantes supresoras.	16
Los plásmidos obtenidos de las cepas supresoras no confieren crecimiento en medio OFF y no contienen cambios identificables.	17
La represión de Abf1 causa retraso en el ciclo celular	18
La ausencia de expresión de <i>ABF1</i> causa retraso en el ciclo celular y posteriormente su muerte.	19
DISCUSIÓN	20
ABF1 es esencial para la viabilidad de <i>C. glabrata</i>	20
La represión de Abf1 disminuye la viabilidad de <i>C. glabrata</i> después de 9 h en cultivo en medio de represión	21
La represión de <i>ABF1</i> , causa un ciclo celular más lento y posteriormente su muerte	22
La incubación prolongada de <i>abf1Δ/pP_{MET3}::Flag-ABF1</i> en met/cis, causa aparición de mutantes supresoras	24

REFERENCIAS	26
Pies de Figuras	38
Figuras	41

Lista de figuras

Fig. 1 Comparación de la estructura de ScAbf1 y CgAbf1	38
Fig. 2 Abf1 es esencial para el crecimiento de <i>Candida glabrata</i>	38
Fig. 3 Pérdida de viabilidad a través del tiempo en medio represivo	38
Fig. 4 Aparición de mutantes supresoras de represión por met/cis	38
Fig. 5 Patrón de restricción de plásmidos recuperados de células supresoras	39
Fig. 6 Crecimiento de células con plásmidos provenientes de células supresoras de experimentos independientes en medios ON y OFF	39
Fig. 7 Morfología de <i>Candida glabrata</i> en medio ON y OFF	39
Fig. 8 Cuando se reprime la expresión de <i>ABF1</i> , se afecta el ciclo celular	40

Lista de tablas

Tabla 1 Cepas de <i>Candida glabrata</i> y <i>E. coli</i>	30
Tabla 2 Plásmidos utilizados en este trabajo	33
Tabla 3 Oligonucleótidos utilizados en este estudio	34
Tabla 4 Unidades formadoras de colonias en medio ON provenientes de los cultivos líquidos en medio ON y OFF	35
Tabla 5 número de células con gema y sin gema en medio ON y OFF en microscopio de fluorescencia después de 9h de cultivo	36
Tabla 6 Porcentajes poblacionales de cada fase del ciclo celular en las cepas indicadas	37

Resumen

Caracterización de Abf1 en *Candida glabrata*

Abf1 o *ARS binding factor 1* es una proteína de unión a ADN que participa en múltiples procesos celulares en la levadura *Saccharomyces cerevisiae*, tales como la regulación transcripcional de genes de diferentes vías metabólicas, en la replicación del ADN, en el silenciamiento de los loci *HML* y *HMR*, así como en reparación de ADN. Por otra parte, en *Candida glabrata* un hongo patógeno oportunista filogenéticamente cercano a *S. cerevisiae*, se ha identificado un ortólogo de este gen (*CgABF1*) y se determinó que es esencial para su viabilidad y que participa en el silenciamiento subtelomérico de varios genes *EPA* que codifican para adhesinas y son unos de sus factores de virulencia. El objetivo de este trabajo fue determinar la función de Abf1 en *C. glabrata*. Para ello diseñamos un sistema de expresión condicional de *ABF1* con el promotor del gen *MET3*, y determinamos si había pérdida de viabilidad cuando reprimimos su expresión adicionando metionina y cisteína al medio. También estudiamos cómo se afecta el ciclo celular y cambios en la morfología celular cuando se reprime *ABF1*. Encontramos que el crecimiento se detuvo y disminuyó su viabilidad después de 6 h de represión por estos aminoácidos. También se afectó la morfología y se alargó el ciclo celular. Concluimos que la represión de Abf1 conduce a un retraso en el ciclo celular, pero al cabo de 6 h las células se dividen sin haber terminado las fases anteriores, lo que resulta en disminución de la viabilidad.

PALABRAS CLAVE: Represión, Abf1, met/cis, ciclo celular, promotor de *MET3*

Abstract

Characterization of Abf1 in *Candida glabrata*

Abf1 or ARS binding factor 1, is a DNA binding protein involved in multiple cellular processes in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*, such as the transcriptional regulation of diverse metabolic pathways, DNA replication, silencing of the cryptic mating *loci* *HML* and *HMR* and DNA damage repair. In *Candida glabrata*, an opportunistic fungal pathogen closely related phylogenetically to *S. cerevisiae*, the orthologous *CgABF1* has been identified and we have determined that it is essential for viability and that it participates in the subtelomeric silencing of several *EPA* genes, which code for adhesins and constitute some of the virulence factors of this pathogen. In this work, we sought to determine the function of *CgAbf1* in *C. glabrata*. To do this, we designed a conditional expression vector for the transcriptional repression of *CgABF1* under the *MET3* promoter by the addition of the amino acids methionine and cysteine. We determined that repression of *CgAbf1* resulted in decrease of viability after 6 h loss of viability after 6 h of repression. We also observed that the passage through the cell cycle was delayed and taken longer in the absence of *CgAbf1* and that the cell morphology was also affected. We conclude that repression of Abf1 leads to a delay in the cell cycle. However, after 6 h the cells divide without having completed the previous phase of the cell cycle, which results in cell death.

KEY WORDS: Repression, Abf1, met/cis, cellular cycle, *MET3* promoter

INTRODUCCIÓN

1
2 Abf1 (ARS Binding Factor 1) es una proteína de unión a ADN, que se conserva entre
3 especies de hongos tanto patógenos como no patógenos. En *Saccharomyces*
4 *cerevisiae*, un hongo no patógeno, esta proteína se define como un factor general
5 de regulación debido a que se ha descrito su participación en diferentes procesos
6 del metabolismo del ADN, tales como la activación y represión transcripcional de
7 genes, replicación del ADN y el silenciamiento de los *loci* de apareamiento *HMR* y
8 *HML*

9 En *S. cerevisiae* el gen *ABF1* codifica para la proteína ScAbf1, la cual tiene una
10 longitud de 731 aminoácidos. Su estructura consta de dos secuencias de unión a
11 ADN: un dedo de zinc atípico con tres histidinas (H57, H61 y H67) y tres cisteínas
12 (C49, C66 y C77) y una secuencia de unión y reconocimiento de ADN entre los
13 aminoácidos 323 y 496.(Halfter *et al.* 1989; Cho *et al.* 1995).

14 El dominio C- terminal se encuentra a partir del aminoácido 608 al 731 (Li *et al.*
15 1998), dentro de este dominio se encuentran dos secuencias importantes para el
16 funcionamiento de Abf1 Secuencia C-terminal 1 y Secuencia C-terminal 2 (CS1 y
17 CS2 respectivamente). La primera regula negativamente la transcripción y se
18 encuentra entre los aminoácidos 624 a 628. En cambio, CS2 realiza las tres
19 funciones que se le atribuyen a Abf1 en silenciamiento, replicación y activación de
20 la transcripción, esta última se encontró en experimentos donde determinaron la
21 actividad de la enzima β -galactosidasa como resultado de la activación de la
22 transcripción del gen *LacZ* por Abf1 (Miyake *et al.* 2002).

23 Abf1 es una proteína que se considera esencial ya que desempeña múltiples
24 funciones en la célula. Además, en cepas diploides de *S. cerevisiae* se construyó
25 una cepa con una interrupción del gen de *ABF1* por Tn3-*LEU2*, estas mutaciones
26 se insertaron en una cepa *leu2⁻*, el análisis de tétradas en su mayoría produjo
27 solamente dos esporas viables, que fueron *leu2⁻*, lo que indicó que es un gen
28 esencial de una sola copia (Rhode *et al.* 1989). Dentro de los procesos celulares en
29 los que participa Abf1 se encuentra el silenciamiento regional de genes. Las
30 secuencias silenciadoras de los *loci* de apareamiento contienen sitios de unión para
31 Abf1, que en conjunto con Rap1 actúan para iniciar y mantener el silenciamiento de
32 estos (Buchman *et al.* 1988; Rivier *et al.* 1999). Se determinó también que participa
33 en la transcripción génica ya sea reprimiendo o activando genes, en el análisis de
34 microarreglos se encontró expresión diferencial de al menos 86 genes, incluyendo
35 genes de metabolismo de carbohidratos o biogénesis de ribosomas, incluso el
36 propio gen *ABF1*, presentó cambio en su expresión lo que sugiere que se encuentra
37 sujeto a autorregulación negativa (Miyake *et al.* 2004).

38 Uno de los procesos centrales que regula Abf1 es el inicio de la replicación del ADN
39 que ocurre durante la fase S del ciclo celular. Abf1 se une en el elemento B3 de las
40 Secuencias Autónomas de Replicación (ARS por sus siglas en inglés) que funcionan
41 como orígenes de replicación en levaduras. Las secuencias ARS están
42 generalmente compuestas por 3 elementos: 1) el elemento A, en el que se
43 encuentra la secuencia consenso, rica en A-T, que define a las secuencias ARS; 2)
44 el elemento B que está subdividido en B1, B2 y B3 y 3) el elemento C. Además, a
45 lo largo del genoma de *S. cerevisiae* se han identificado varias secuencias ARS que

46 contienen sitios de unión para Abf1 en su elemento B3 (Eisenberg *et al.* 1988;
47 Marahrens and Stillman 1992).

48 La región de la proteína necesaria para desempeñar la función durante la replicación
49 del ADN se encuentra en el carboxilo terminal, a partir del aminoácido 608. En un
50 experimento en el que utilizaron una proteína quimérica en la que se fusionaron los
51 últimos 123 aa de ScAbf1 (aminoácidos 608-731) con el dominio de unión a ADN
52 de Gal4, evaluaron la estabilidad de un plásmido que contiene la secuencia ARS1
53 modificada en la que se sustituyó el elemento B3 por el sitio de unión para Gal4
54 (GAL4-ARS1). Se encontró que la estabilidad del plásmido fue mayor, ya que la
55 proteína de fusión ScAbf1-Gal4 se unió con alta afinidad al ARS1 modificado del
56 plásmido (GAL4-ARS1), lo cual favoreció la replicación y por lo tanto la estabilidad
57 del plásmido. El control donde solo se utilizó el dominio de unión a ADN de Gal4 (y
58 no la proteína de fusión) mostró que no mantiene la estabilidad del plásmido
59 (Eisenberg *et al.* 1988; Li *et al.* 1998).

60 Abf1 también contribuye a la organización de la cromatina, tanto en los sitios ARS
61 manteniendo su estado condensado o relajado, como en el posicionamiento de los
62 nucleosomas. Abf1 puede competir con las histonas y tomar el lugar de los
63 nucleosomas para permitir el acceso de otras proteínas, ya sea para la replicación
64 del ADN o la activación de genes regulados por Abf1 (Yarragudi *et al.* 2004).

65 Otra función importante que se le atribuye a Abf1 en *S. cerevisiae*, es en la
66 reparación del ADN, por el sistema de reparación por escisión de nucleótidos. En
67 este sistema, la unión de Abf1 en su sitio de unión en la secuencia del silenciador
68 *HML-I* promueve que se lleve a cabo la reparación eficiente en una sola dirección,

69 rioabajo de *HML-I*. Mutaciones en el sitio de unión de Abf1 en el silenciador de *HML-*
70 *I*, provocan que la reparación de ADN por daño con radiación UV sea menos
71 eficiente. Además, Abf1 forma un complejo estable con las proteínas Rad7 y Rad16,
72 componentes del complejo de reparación por escisión de nucleótido (Yu *et al.* 2009)

73 *Candida glabrata* es un hongo ascomiceto que tiene una relación filogenética
74 relativamente cercana a *S. cerevisiae*, posee un gen ortólogo al gen *ScABF1*, que
75 se encuentra en el cromosoma J y genera un producto de 479 aa. Los últimos 10
76 aminoácidos son idénticos a la secuencia de *ScAbf1* y la proteína completa tiene
77 una identidad de 63.87% con esta. *CgAbf1* comparte alta homología en las dos
78 regiones que corresponden al dominio de unión a ADN (dedo de zinc 90.24% y
79 dominio de unión a ADN 65.22% de identidad con respecto a *ScAbf1*) así como en
80 el C- terminal, donde la región CS2 también comparte 86.67% de identidad (Fig. 1).
81 Esto sugiere que algunas de las funciones también se comparten con respecto a
82 *ScAbf1*.

83 En *C. glabrata* Abf1 es una proteína esencial para la viabilidad de la célula, lo cual
84 se determinó mediante un ensayo de pérdida de plásmido, donde una mutante nula
85 (*abf1Δ*) no puede perder el plásmido que complementa la mutación, por lo que se
86 concluye que es esencial. Asimismo, una mutante donde se eliminan los últimos 43
87 aminoácidos del extremo C-terminal, que corresponde a la región de homología con
88 el dominio conservado con *S. cerevisiae*, esta mutante presenta una menor tasa de
89 crecimiento comparada con la cepa silvestre en diferentes medios de cultivo.
90 (Hernández-Hernández, Tesis de maestría, 2017).

91 En *C. glabrata* se ha estudiado el silenciamiento de algunos genes que codifican
92 para adhesinas (localizados cerca del telómero derecho del cromosoma E [E_R]), y
93 por lo tanto sujetas a silenciamiento subtelomérico; sin embargo, la expresión de los
94 genes que codifican para estas adhesinas representa uno de los principales factores
95 de patogenicidad. Para llevar a cabo el silenciamiento de regiones subteloméricas,
96 se requiere de la participación de múltiples factores e incluyen también secuencias
97 en *cis* a las cuales se unen varios de estos factores. Una de estas secuencias en
98 *cis* es el protosilenciador Sil2126 que se encuentra entre el gen *EPA3* y el telómero
99 E-R, en el que se encontraron sitios putativos de unión para Abf1 y Rap1 (que es
100 una proteína represora/activadora que participa en el silenciamiento subtelomérico
101 y realiza funciones similares a Abf1). Sil2126 requiere de los sitios de unión para
102 Rap1 y Abf1, ya que, si estos se eliminan, la actividad de silenciamiento de Sil2126
103 se pierde. La actividad como silenciador se midió colocando Sil2126 a 32kb río
104 arriba de su sitio original seguido del gen reportero *URA3* y evaluando la
105 transcripción del reportero. Cuando se elimina uno de los sitios de unión, ya sea el
106 de Abf1 o el de Rap1, solo disminuye el silenciamiento más no lo elimina
107 completamente (Juárez-Reyes *et al.* 2012). Además, se analizó el enriquecimiento
108 de Abf1 en la secuencia de Sil2126 por medio de CHIP-qPCR y se encontró que
109 Abf1 se une tanto a Sil2126 como al Elemento Negativo (EN), que es otra secuencia
110 que actúa en *cis* y media la represión del gen *EPA1*, así como a otros sitios a lo
111 largo esta región subtelomérica. Por lo que se concluye que *CgAbf1* también
112 participa en silenciamiento en *C. glabrata* (López-Fuentes *et al.* 2018).

113 Este trabajo lo dirigimos a caracterizar la función de Abf1 en *C. glabrata*. Para ello
114 evaluamos cómo afecta la ausencia de Abf1 el crecimiento celular utilizando un
115 sistema de represión de la expresión del gen. Además, evaluamos cómo se afecta
116 el transcurso del ciclo celular cuando se reprime la expresión de *ABF1* y
117 corroboramos la esencialidad de la proteína en experimentos de viabilidad celular.

MATERIALES Y MÉTODOS

118

119

Medios de cultivo

120 Las cepas de *Candida glabrata* se cultivaron en medio mínimo (base nitrogenada

121 de levadura 1.7 g/L, sulfato de amonio 5 g/L, glucosa 2%). Cuando se requirió se

122 suplementó el medio con uracilo 25 mg/L o Nourseotricina a 100 µg/mL.

123 Adicionalmente en el medio suplementado con Nourseotricina se sustituyó el sulfato

124 de amonio por glutamato de sodio a 1 g/L. Para los medios solidos se añadió 2% de

125 agar. Para preparar medio con ácido 5-fluorootico (5-FOA Toronto Research

126 Chemicals), se añadió 0.9 g/L de 5-FOA y uracilo 25 mg/L al medio mínimo. El 5-

127 FOA es un compuesto que resulta tóxico en cepas que expresan el gen *URA3*.

128 Cuando fue necesario, se añadió 0.2 mM de los aminoácidos metionina y cisteína.

129 Las cepas de *E. coli* se crecieron en medio LB, que contiene extracto de levadura

130 5g/L, Triptona 10g/L, NaCl 5g/L. Todas las construcciones en plásmidos se

131 introdujeron por electroporación y se seleccionaron en medio LB suplementado con

132 carbenicilina (Invitrogen™) 100 µg/mL, en medio solido con 1.5% de agar.

133 Todos los medios se esterilizaron en autoclave a 15 lb de presión y 121°C por 15

134 minutos.

135

Cepas, oligos y plásmidos

136 Todas las cepas oligos y plásmidos generadas y utilizadas en este estudio se

137 muestran en las Tablas 1, 2 y 3 respectivamente

138

139 **Construcción de cepas con expresión reprimible de Abf1**

140 Para la construcción del vector de expresión reprimible del gen *ABF1*, subclonamos
141 el marco de lectura abierto (ORF) de *ABF1* proveniente del vector de clonación
142 pGH5 construido previamente (Hernandez-Henandez, 2017). Utilizamos la enzima
143 de restricción *ClaI* (New England Biolabs) para escindir el ORF. Este se clonó en el
144 vector pRM153 el cual también se digirió con *ClaI*. Este vector contiene el promotor
145 del gen *MET3*, el cual se reprime en presencia de los aminoácidos metionina y
146 cisteína y un epítipo Flag para etiquetar a Abf1 en su N-terminal. Los fragmentos
147 se purificaron y ligaron con la enzima T4 ligasa de Invitrogen a 22°C, se transformó
148 en células de *E. coli* DH10 por electroporación en cubeta de 0.1cm a 1800V en Gene
149 Pulser Xcell™ de BioRad. Las células se recuperaron en medio SOC y se
150 seleccionaron en medio LB con Carbenicilina 100 µg/mL. De las colonias obtenidas
151 analizamos 30 colonias por PCR y de estas se seleccionaron 6 para su análisis por
152 digestión enzimática

153 El plásmido resultante se introdujo en la cepa de *C. glabrata* mutante nula para el
154 gen de *ABF1* (*abf1*Δ) la cual esta complementada con un plásmido que expresa el
155 gen *ABF1* de manera episomal bajo su propio promotor y con el marcador de
156 selección *URA3*. Se transformó esta cepa con el protocolo de LiAc descrito
157 anteriormente por Castaño et al 2003. La cepa resultante contiene dos plásmidos
158 con un marcador de selección cada uno: el gen *URA3* y el casete de resistencia a
159 NAT respectivamente. Para favorecer la selección del plásmido con resistencia a
160 NAT (*pP_{MET3}::Flag-ABF1*) se inoculó esta cepa en medio mínimo líquido con NAT y
161 glutamato de sodio como fuente de nitrógeno, además se añadió uracilo 25 mg/L

162 para permitir el crecimiento de las células que perdieran el plásmido con el marcador
163 *URA3*. Esto se hizo a través de pases secuenciales cada 12h por 3 días, el último
164 pase se realizó en medio mínimo más 5-FOA para contra-seleccionar las células
165 que pierden el plásmido con el marcador *URA3*, ya que las células que expresan el
166 gen *URA3* no sobreviven en este medio. Para finalizar las células se colocaron en
167 medio mínimo solido con NAT y uracilo para seleccionar las células que mantienen
168 el plásmido pP_{MET3}::Flag-*ABF1*.NAT. Para escoger aquellas células que perdieron
169 el plásmido *URA3*, se realizó un replica print en medio sin uracilo, se guardaron
170 aquellas que crecieron en medio con uracilo, pero no en medio sin uracilo.

171

172 **Determinación de la velocidad de crecimiento**

173 Cada una de las cepas se cultivaron a partir de los resguardos en glicerol a -80°C
174 hasta alcanzar la fase estacionaria (48 h en incubación con agitación en el roller a
175 30°C) en los medios correspondientes. Una vez en fase estacionaria cada cultivo se
176 ajustó a OD₆₀₀ de 0.01 en 300 µL del medio correspondiente y se colocaron por
177 duplicado en una placa de 100 pozos y en tres replicas biológicas por experimento.
178 El cultivo se realizó a 30°C en constante agitación, y según la cepa, se dejó de 24 a
179 48 horas. El crecimiento se registró por medio de lecturas de densidad óptica a una
180 longitud de onda de 600 nm, cada 15 minutos utilizando el equipo Bioscreen C. El
181 tiempo de duplicación fue calculado de acuerdo con lo descrito por (Gutiérrez-
182 Escobedo *et al.* 2013)

183 **Ensayos de viabilidad**

184 Para determinar el tiempo del cultivo en el cual ocurre la muerte celular de *C.*
185 *glabrata* en ausencia de Abf1, utilizamos la cepa que contiene el plásmido que
186 contiene el gen *ABF1* cuya expresión es reprimible por la presencia de aminoácidos
187 y realizamos un ensayo de viabilidad a diferentes tiempos después de la represión
188 de *ABF1*. Partimos de un cultivo en fase estacionaria de 48h de la cepa mutante
189 nula (*abf1Δ/pP_{MET3}::Flag-ABF1*), ajustamos la densidad óptica (OD₆₀₀) a 0.1, en
190 medio ON (medio mínimo) y medio OFF (medio mínimo más 0.2 mM de met/Cis).
191 Tomamos lecturas de OD₆₀₀ en el espectrofotómetro de luz visible UV-1700
192 PharmaSpect cada hora durante seis horas seguidas tomando las primeras seis
193 horas en un primer experimento y después las segundas seis horas en otro.

194 Además de las lecturas, cada hora tomamos muestras para hacer diluciones
195 logarítmicas y obtener cuentas viables en cada punto de tiempo en medio mínimo
196 sólido. Todos los experimentos los realizamos por triplicado. El número de unidades
197 formadoras de colonias (UFC) se obtuvo con el siguiente calculo:

$$198 \qquad \frac{CFU}{ml} = \left(\frac{CFU}{FD} \right) * \left(\frac{1000\mu l}{V \text{ en } \mu l * 1ml} \right)$$

199 Donde

200 UFC/mL: es el número de unidades formadoras de colonias por mililitro en
201 determinado punto de tiempo

202 UFC: es el número de unidades formadoras de colonias contadas por caja

203 FD: es el factor de dilución de la placa

204 V en μL : volumen tomado de la dilución colocado en la placa

205 **Microscopia de fluorescencia**

206 Utilizamos cultivos en fase estacionaria (48 h) y ajustamos la OD_{600} a 0.5 y tomamos
207 muestras después de 9h, las células se lavaron y fijaron con paraformaldehído al
208 4% durante 15 min, posteriormente se volvieron a lavar y se resuspendieron en H_2O
209 miliQ estéril. Teñimos los núcleos añadiendo 1 μL de la solución de DAPI
210 (0.2mg/mL) a 1 mL de cada suspensión celular para visualizar al microscopio de
211 fluorescencia Axio Imager2. Las imágenes obtenidas se analizaron en el programa
212 ZEISS ZEN. Medimos el tamaño de las células de *C. glabrata* en el programa
213 ImageJ, los datos obtenidos de los diámetros de las células los analizamos en
214 GraphPad Prism, ver. 8 y realizamos el análisis de varianza de una vía y
215 comparación de medias de Dunn's para datos no paramétricos.

216 **Determinación de contenido de ADN**

217 Para determinar la progresión del ciclo celular de *C. glabrata* en ausencia de Abf1,
218 realizamos un experimento para determinar el contenido de ADN mediante tinción
219 del ADN con Sytox green y citometría de flujo a lo largo de una curva de crecimiento.
220 Para ello utilizamos las siguientes cepas: la cepa mutante nula con el vector que
221 complementa la mutación nula (*abf1* Δ /pP_{ABF1}::*ABF1*), la cepa mutante nula con
222 expresión reprimible de *ABF1* (*abf1* Δ /pP_{MET3}::Flag-*ABF1*), en medio ON (medio
223 mínimo) y medio OFF (medio mínimo + 0.2 mM de met/Cis). Partimos de cultivos de
224 48 h en fase estacionaria, ajustamos densidad óptica a 0.5, y tomamos muestras
225 cada 3 h por 9 h para analizar la progresión del ciclo celular. Seguimos el protocolo
226 de fijación y tinción con Sytox green estandarizado en el laboratorio de microbiología

227 molecular, de las poblaciones celulares en medios ON y OFF tomamos 1×10^7
228 células en cada punto de tiempo, centrifugamos y resuspendimos las células en 450
229 μL de agua estéril y añadimos lentamente etanol frío y dejamos incubando a
230 temperatura ambiente por una hora o a 4°C toda la noche. Lavamos la suspensión
231 celular en 1 mL de TRIS-HCl 50m. Para eliminar el RNA incubamos en solución con
232 RNAsa (2 mg/mL) por dos horas a 37°C . Posteriormente tratamos con solución de
233 proteinasa K (5mg/mL) durante 20 a 45 min a 37°C y lavamos las células con 1 mL
234 de TRIS-HCL 50mM pH8. En este punto las almacenamos por un día a 4°C para
235 llevar a cabo la medición las teñimos con Sytox green (1 μL en 4mL de TRIS HCl
236 50mM) y las analizamos por citometría de flujo en el citómetro BD FACS Calibur.
237 Los datos obtenidos los analizamos con el software FlowJo™ para datos de
238 citometría de flujo, donde utilizamos el modelo Dean Jet Fox para el cálculo del ciclo
239 celular y en cada muestra se ajustó el modelo al más cercano con los datos
240 obtenidos.

241 **Análisis de los plásmidos obtenidos de las cepas supresoras.**

242 Durante los experimentos de viabilidad en ausencia de *ABF1*, encontramos colonias
243 que sobreviven a la represión con aminoácidos. Para analizar si ocurrió alguna
244 mutación en el plásmido, que llevan estas colonias supresoras, aislamos el plásmido
245 de las células que sobrevivieron a la represión en medio OFF (*abf1* Δ /pP_{MET3}::Flag-
246 *ABF1*). El plásmido obtenido mediante el protocolo de smash and grab, lo
247 retransformamos en *E. coli* DH10, para resguardarlos y secuenciar la región del
248 promotor. Además, analizamos la estructura general de estos plásmidos mediante
249 PCR y restricción enzimática con las enzimas *Bam*HI, *Sac*I y *Cla*I y secuenciamos

250 la región del promotor para localizar cambios puntuales en la secuencia que
251 pudieran ser responsables de que el plásmido se volviera no reprimible por met/Cis.
252 Además, retransformamos estos plásmidos recuperados (que inicialmente
253 llamamos plásmidos supresores) en la cepa de *C. glabrata* mutante nula
254 (*abf1*Δ/pP_{ABF1}::*ABF1.URA3*) para realizar el experimento de intercambio del
255 plásmido que complementa la mutación nula en *ABF1*. Esta cepa obtenida se
256 seleccionó en medio mínimo con Nourseotricina (marcador de selección del
257 plásmido supresor) y en medio 5-FOA para obtener la cepa que solo contiene el
258 plásmido supresor recuperado de las cepas supervivientes en medio OFF. Estas
259 cepas se resguardaron en glicerol al 15% a -80°C. Para concluir evaluamos el
260 crecimiento en medio líquido con los aminoácidos met/cis 0.2 mM.

RESULTADOS

261

262 **Abf1 es esencial para el crecimiento de *Candida glabrata***

263 Anteriormente demostramos en nuestro laboratorio que el gen *ABF1* es esencial
264 para *Candida glabrata*, a través de un ensayo de pérdida de un plásmido que
265 complementa una mutación nula del gen *ABF1*. En esta cepa, el plásmido se
266 mantuvo en el 100% de células sometidas a selección negativa del mismo (Grecia
267 Hernández, Tesis de Maestría 2017).

268 En este trabajo corroboramos por otro método, que *CgAbf1* es esencial. Este
269 experimento lo realizamos a partir de la represión transcripcional del gen *ABF1* en
270 una mutante nula. Diseñamos un plásmido para la expresión condicional de *Abf1*
271 controlada por el promotor del gen *MET3*, el cual se reprime por la presencia de los
272 aminoácidos metionina y cisteína (*met* y *cis*) en el medio de crecimiento. Este
273 plásmido incluye el marco abierto de lectura del gen *ABF1*, que codifica para la
274 proteína *Abf1*, etiquetada con el epítipo Flag en el extremo amino-terminal (Fig.
275 2A). Con el plásmido *pVS1* (*pP_{MET3}::Flag-ABF1*) se transformó a la cepa mutante
276 nula, que contenía otro plásmido con el gen *ABF1* silvestre bajo su propio promotor,
277 el cual intercambiamos por el plásmido reprimible con la versión etiquetada con Flag
278 del gen *ABF1* (cepa *abf1Δ/pVS1*). En esta cepa, el promotor de *MET3* dirige la
279 expresión del gen *ABF1* del plásmido y nos permite reprimir su expresión para
280 evaluar las funciones en las que participa *Abf1* de *C. glabrata* cuando se reprime su
281 expresión.

282 Evaluamos el crecimiento de *C. glabrata* en ausencia de expresión de *ABF1* por 48
283 h en agitación constante, tomando lecturas cada 15 min. Observamos que en medio
284 OFF esta cepa no crece a lo largo de las 48 h del experimento, por lo que
285 corroboramos que Abf1 es esencial para el crecimiento de *C. glabrata* (Fig. 2B).

286

287 **La ausencia de Abf1 causa arresto y posteriormente, muerte celular**

288 Determinamos primero si la ausencia de Abf1 en la célula causa muerte celular y de
289 ser este el caso, evaluamos en qué punto del crecimiento de *C. glabrata* ocurre la
290 letalidad. Para ello partimos de un cultivo de 48 h, del cual inoculamos en medio ON
291 y OFF a una OD₆₀₀ de 0.1, tomamos lecturas de OD₆₀₀ cada hora. De cada muestra
292 realizamos diluciones logarítmicas seriadas y plateamos en cajas con medio sólido
293 ON para calcular las cuentas viables (UFC). Para obtener el número de UFC/mL,
294 multiplicamos el número de colonias en cada caja por el factor de dilución y el
295 volumen tomado correspondiente a 1 mL de la dilución. Como esperábamos, en
296 medio ON las células de *C. glabrata* aumentaron el número de UFC a lo largo del
297 experimento hasta llegar a fase estacionaria (un aumento de ~100 veces, (Tabla
298 4)), mientras que en el medio OFF la densidad óptica aumentó ligeramente en las
299 primeras 6 h, posteriormente la OD₆₀₀ se mantuvo entre 0.5 y 0.6. Después de 48 h
300 se observó un aumento en la densidad óptica hasta un valor de 1.5 (Fig. 3A y 3B)

301 Por otra parte, observamos que el número de células viables (UFC) provenientes
302 de medio OFF, aumentó ligeramente en las primeras 6 h. A partir de este punto la
303 población viable comenzó a reducirse hasta que la viabilidad se redujo
304 aproximadamente 10 veces a las 24 h (de 1.10×10^6 a 1.33×10^5 UFC/mL) por lo que

305 concluimos que el tiempo de muerte de *C. glabrata* en ausencia de Abf1 ocurre a
306 partir de la sexta hora de represión (medio OFF) (Tabla 4).

307 El ligero aumento de UFC en las primeras horas del experimento podría deberse al
308 remanente de Abf1 en las células, lo que lleva a que la muerte celular comience a
309 presentarse transcurridas seis horas de represión.

310

311 **La incubación prolongada en medio de represión de *ABF1* puede resultar en**
312 **la aparición de mutantes supresoras.**

313 En un experimento posterior se determinó que a las 48 h después de la represión
314 de Abf1, aparecen células en las cuales ocurrió una supresión del fenotipo de
315 ausencia de crecimiento al reprimir la expresión de Abf1. Inicialmente evaluamos si
316 estas células eran capaces de crecer en medio sólido OFF (con aminoácidos). Las
317 células tomadas de medio líquido ON y OFF se inocularon en medio sólido OFF, a
318 partir de diluciones logarítmicas seriadas de cada condición, las cajas se incubaron
319 a 30°C y calculamos las UFCs. Observamos que después de 24 h en condiciones
320 de represión (con aminoácidos) aparecen algunas células que pueden crecer en
321 medio con aminoácidos y después de 48 h el aumento es más significativo (Fig. 4A
322 y 4B). Es posible que después de 48 h de incubación en medio OFF, ocurra alguna
323 mutación en el plásmido que permita la expresión de *ABF1*, ya sea por una mutación
324 en el promotor de *MET3* que ya no sea susceptible a la represión por los
325 aminoácidos met y cis; o bien, en otro lugar del plásmido que permita la expresión
326 de *ABF1*. Otra posibilidad es que haya ocurrido una mutación supresora en genoma
327 y no en el plásmido.

328

329 **Los plásmidos obtenidos de las cepas supresoras no confieren crecimiento**
330 **en medio OFF y no contienen cambios identificables.**

331 Para distinguir entre las hipótesis planteadas en el párrafo anterior determinamos
332 si después de tiempos prolongados de represión de *ABF1* ocurrieron mutaciones
333 en el plásmido reprimible pVS1 que permitan de alguna manera la expresión de
334 Abf1, recuperamos el plásmido de las células que lograron crecer después de 48 h
335 de cultivarlas en medio de represión. El plásmido recuperado lo retransformamos
336 en *Escherichia coli* para obtener suficiente cantidad de ADN y realizamos un patrón
337 de restricción para determinar si existen rearrreglos visibles por restricción. En la Fig.
338 5A observamos que el patrón de restricción es indistinguible del plásmido parental
339 pVS1. Secuenciamos la región del promotor de estos plásmidos y no se encontraron
340 cambios en la secuencia en ninguno de ellos.

341 Para evaluar el crecimiento de *C. glabrata* obtuvimos 3 plásmidos independientes
342 de células supresoras y transformamos a la cepa *abf1Δ*, complementada con un
343 plásmido que lleva el gen *ABF1* y el marcador de selección *URA3* (pCI12). Con cada
344 uno de ellos realizamos intercambio del plásmido para obtener la cepa *abf1Δ*
345 complementada con los plásmidos obtenidos de las cepas supresoras (pSup1;
346 pSup2 y pSup3). Seleccionamos la pérdida del plásmido con el marcador selección
347 *URA3* en medio 5-FOA sin aminoácidos. Una vez obtenidas las células que
348 contienen únicamente cada uno de los plásmidos provenientes de las cepas
349 supresoras, evaluamos su crecimiento en medio represivo. Observamos el mismo
350 comportamiento que las células que contienen el plásmido parental pVS1, es decir

351 estas células no crecieron en medio que contiene los aminoácidos metionina y
352 cisteína durante las primeras 24 h. Después de 24 h y 48 h, se observa un ligero
353 aumento en la absorbancia y aparición de supresoras (detectadas como UFC en
354 medio OFF), igual que como ocurrió en los experimentos anteriores (Fig.6A y 6B
355 comparar con Fig. 3A).

356 **La represión de Abf1 causa retraso en el ciclo celular**

357 Utilizamos microscopia óptica y de fluorescencia como primer acercamiento para
358 determinar si la represión de la expresión de Abf1 en la cepa nula causa que las
359 células arreten su crecimiento en algún punto particular del ciclo celular.
360 Realizamos mediciones del tamaño de las células a partir de las imágenes
361 obtenidas y encontramos que las células de *C. glabrata* tienden a tener mayor
362 tamaño en condiciones de represión (Fig 7A). Para confirmarlo realizamos
363 mediciones de células en diferentes campos y encontramos que las células en
364 gemación tienden a tener un mayor tamaño en medio OFF en comparación con las
365 células en medio ON. Las células del medio OFF son ligeramente más grandes con
366 diferencia estadísticamente significativa con un valor de $p=0.016$ y un valor α de 0.5.
367 entre las células que no están gemando Fig(7B). Además, determinamos que
368 probablemente las células tienden a pasar tiempos más largos en la morfología de
369 células en gemación con gemas grandes posiblemente en la fase S de síntesis de
370 ADN ya que en medio OFF se apreciaron con mayor frecuencia células con gemas
371 (42%) que en medio ON (10%) después de 9 h de incubación (Tabla 5).

372 **La ausencia de expresión de *ABF1* causa retraso en el ciclo celular y**
373 **posteriormente su muerte.**

374 Después de analizar la morfología de las células de la cepa *abf1Δ*, con el sistema
375 reprimible de *ABF1*, estudiamos cómo se afecta el ciclo celular a través de la
376 medición del contenido de ADN por citometría de flujo, partiendo de la premisa que
377 1C corresponde a células en la fase G1 del ciclo celular y 2C corresponde a G2/M.
378 Para esto realizamos tinción de ADN como se describe en metodología, realizamos
379 citometría de flujo, y analizamos los datos obtenidos.

380 Observamos que, a las 3h en medio OFF, el cultivo de la cepa *abf1Δ* con el plásmido
381 reprimible, fue asincrónico con solo 2% de células en fase S, después de 6h se
382 acumularon en fase S donde aproximadamente el 35% de células se encontraron
383 en S y el restante se distribuyeron en fase G1 y G2. Después de 9 h de reprimir la
384 síntesis de Abf1, las células pasaron de S, a G1 nuevamente, logrando sobrepasar
385 el arresto celular. Sin embargo, es probable que las células que se dividieron sin
386 haber terminado de duplicar su ADN, produjeron progenie no viable con contenido
387 incompleto de ADN y daños en el ADN. En la Fig. 8 se muestran los histogramas
388 correspondientes a la cepa parental de *ABF1+*, y la cepa *abf1Δ*, con los diferentes
389 plásmidos que se utilizaron. En la Tabla 6 se muestran los porcentajes
390 correspondientes a cada fase del ciclo celular calculados con el modelo de Dean-
391 Jet-Fox, Tabla 6

392

DISCUSIÓN

393

394 **ABF1 es esencial para la viabilidad de *C. glabrata***

395 Abf1 se ha estudiado ampliamente en *Saccharomyces cerevisiae*, un hongo con
396 relación filogenética cercana a *Candida glabrata* y se observó que es una proteína
397 esencial que participa en múltiples procesos por lo que se define como un factor
398 general de regulación. La esencialidad de Abf1 en *S. cerevisiae* se determinó a partir
399 de un experimento en el que se interrumpió una de las copias cromosómicas del
400 gen *ABF1* en cepas diploides de *S. cerevisiae*, con el sistema Tn3-*LEU2*, de manera
401 que se generaron dos cepas haploides: 1) *leu2-1/leu2-1, ABF1/ABF1*; y 2), *leu2-*
402 *1/leu2-1, abf1Δ::LEU2 / ABF1*. Cuando se sometieron a esporulación y análisis de
403 tétradas se encontró que la gran mayoría de las tétradas analizadas resultan en solo
404 dos esporas viables (el resto de las tétradas sólo da una espora viable). Las esporas
405 que resultaron viables son todas Leu-, lo que indica que *ABF1* es un gen esencial
406 de una sola copia.

407 En *Candida glabrata* por su parte, corroboramos que *ABF1* es un gen esencial a
408 partir de la expresión reprimible de este gen en el contexto del promotor del gen
409 *MET3*, que es reprimible en presencia de los aminoácidos metionina y cisteína.
410 Observamos que, en medio OFF, que contiene 0.2 mM de cada uno de estos
411 aminoácidos, no hubo crecimiento a lo largo de 48h (Fig. 2). Estos datos confirmaron
412 lo observado anteriormente en nuestro laboratorio en donde se evaluó la pérdida de
413 plásmido, en ese ensayo observaron que al someter células mutantes nulas con
414 expresión episomal de *ABF1*, a crecimiento en medio que selecciona la pérdida del

415 plásmido, este permaneció en el 100% de las células, es decir el plásmido no se
416 puede perder. Por lo que en conjunto estos datos apoyan la idea de que es un gen
417 esencial para el crecimiento de *Candida glabrata*. Abf1 podría estar involucrada en
418 diferentes procesos celulares al igual que su ortólogo en *S. cerevisiae*.

419 **La represión de Abf1 disminuye la viabilidad de *C. glabrata* después de 9 h en** 420 **cultivo en medio de represión**

421 El sistema de represión de *ABF1* con aminoácidos, nos permitió medir la viabilidad
422 de *C. glabrata* cuando se reprime la síntesis de esta proteína. En la Fig. 3
423 observamos que después de 9 h de cultivo en medio líquido con met y cis (OFF), la
424 viabilidad disminuye 1 orden de magnitud hasta las 12 h de represión, además el
425 tiempo de duplicación fue más largo en comparación con la cepa que expresó *ABF1*
426 con su propio promotor. Registramos detenidamente el aumento en la OD₆₀₀ cada
427 hora y notamos que aumentó de 0.1 a 0.5 aproximadamente en las primeras 6 h de
428 crecimiento, lo que indica que al menos dos duplicaciones ocurrieron en este
429 periodo de tiempo con un tiempo de duplicación aproximado de 180 min. Esto podría
430 deberse a niveles remanentes de Abf1 que hacen posible estas primeras dos
431 duplicaciones después de la represión. En comparación, la cepa mutante nula con
432 el plásmido que expresa *ABF1* a partir de su propio promotor, en el mismo medio
433 OFF, su tiempo de duplicación fue de 120±3 min (Fig. 2B). En *S. cerevisiae*, se
434 determinó que Abf1 es una proteína abundante y está sujeta a autoregulación
435 negativa (Halfter *et al.* 1989; Miyake *et al.* 2004), aunque no se conoce la
436 abundancia de Abf1 en *C. glabrata* tanto a nivel de la proteína como a nivel
437 transcripcional ni se conoce su regulación, es posible que sea igualmente

438 abundante en cepas silvestres de *C. glabarrata* y que no se alcancen niveles tan
439 altos cuando la transcripción es a partir del promotor del gen *MET3* en medio ON.
440 Esta idea es congruente con el hecho de que el tiempo de duplicación de la cepa
441 donde la transcripción de *ABF1* proviene del promotor de *MET3* en medio ON es de
442 127 ± 4 min comparada con un tiempo de duplicación de 85 ± 8 min de la cepa en la
443 que la transcripción es a partir del promotor de *ABF1* (Fig. 2B).

444 La pérdida de viabilidad gradual que observamos en los cultivos de la cepa *abf1Δ*,
445 con aminoácidos, puede ser debido a que probablemente esta proteína está
446 involucrada en procesos celulares como la replicación de ADN y transcripción de
447 genes que pueden ser esenciales.

448 **La represión de *ABF1*, causa un ciclo celular más lento y posteriormente su** 449 **muerte**

450 En levaduras se han caracterizado los mecanismos de respuesta a daño al ADN
451 mediados por los puntos de control o *checkpoints*, de los cuales se conocen dos: el
452 de daño al ADN (*DNA damage checkpoint*, DDC) y *Checkpoint* de replicación del
453 ADN (*DNA replication checkpoint*, DRC) que se activan durante la fase S del ciclo
454 celular por una cascada de señalización que inicia con la proteína Med1 y converge
455 en la proteína efectora Rad53, que activa genes de respuesta a daño, induce arresto
456 celular, e inhibición de la mitosis entre otros (Pardo *et al.* 2017).

457 En *Saccharomyces cerevisiae* cuando existe daño al ADN se puede observar el
458 crecimiento mas lento, esto es el resultado del arresto en la fase S que permite
459 reparar el daño y es dependiente de Rad53 y Mec1 (Paulovich and Hartwell 1995).
460 Nosotros observamos retraso en el ciclo celular: después de 6 h en represión

461 encontramos que hay mayor acumulación de células en la fase S del ciclo celular
462 en la mutante *abf1Δ* en medio OFF comparada con la misma cepa en medio ON.
463 Además, en este punto, hay mayor población de células en la fase G1, lo que
464 sugiere que lograron superar el arresto, aún con posible daño al ADN, ya que Abf1
465 podría estar involucrada en la replicación de ADN (Fig. 7). El mecanismo de
466 reparación de ADN que se activa en la fase S en *S. cerevisiae* difiere del sistema
467 encontrado y estudiado en *C. glabrata*. En *C. glabrata* al inducir daño al ADN por
468 metil metasulfonato (MMS), no se observó la fosforilación de Rad53 ni se activó la
469 respuesta a daño en el ADN. Además, se observó que las células completaron su
470 ciclo celular, es decir no se arrestaron en la fase S. También observaron una
471 disminución en la viabilidad frente al tratamiento en comparación con cultivos de *S.*
472 *cerevisiae*, que sí se arrestaron en la fase S, lo que permitió la reparación del daño
473 para después continuar con el ciclo celular y mantenerse viables (Shor *et al.* 2020).
474 La manera en que los hongos responden al daño en el ADN varía ampliamente entre
475 especies del filo, En *Ascomycota* se ha observado que los genes de reparación del
476 ADN que responden a daño por luz UV, no están conservados entre especies. En
477 el hongo *Brettanomyces bruxellensis* al igual que en *C. glabrata*, no presentan
478 respuesta ante el daño mientras que *S. cerevisiae* sí puede recuperarse. Se
479 concluye que la falta de algunos genes de reparación de ADN podría conducir a la
480 evolución de las especies (Milo *et al.* 2019). En *C. glabrata* esta diferencia en la
481 respuesta al daño al ADN, podría contribuir a la plasticidad genómica que posee
482 para adaptarse a diferentes tipos de estrés después de exposición prolongada a
483 agentes estresantes.

484 **La incubación prolongada de *abf1Δ/pP_{MET3}::Flag-ABF1* en *met/cis*, causa**
485 **aparición de mutantes supresoras**

486 El promotor de *MET3* es un promotor caracterizado que se utiliza para generar
487 mutantes condicionales con fenotipo de letalidad (Mao *et al.* 2002). El promotor
488 corresponde al gen *MET3*, que codifica para una ATP-sulfurilasa y está involucrado
489 en el metabolismo de aminoácidos y de asimilación de azufre inorgánico, para la
490 producción de aminoácidos como metionina y cisteína, se reprime en presencia de
491 estos aminoácidos (Gierest *et al.* 1985)

492 En *C. glabrata* nosotros utilizamos este promotor para diseñar un sistema reprimible
493 de Abf1 en presencia de los aminoácidos metionina y cisteína y poder medir el
494 crecimiento celular cuando se reprime su expresión por estos aminoácidos.
495 Sorprendentemente, en ensayos de crecimiento observamos que después de 48 h
496 de represión con aminoácidos, comenzó a haber células que pueden crecer a pesar
497 de los aminoácidos en el medio, es decir, se pueden obtener células supresoras.
498 Analizamos si los cambios en el crecimiento se deben a cambios o mutaciones en
499 el promotor del gen *MET3* en el plásmido, mediante digestiones enzimáticas primero
500 y secuenciación después y determinamos que no es así. Es decir, los plásmidos de
501 las células supresoras son idénticos a los plásmidos parentales. Otra posibilidad
502 para explicar la aparición de células supresoras es que haya habido mutaciones en
503 algún regulador transcripcional del promotor del gen *MET3*. En *S. cerevisiae* el gen
504 *MET3* se regula por las proteínas Met4, Met32 y Met31 que forman un complejo que
505 responde cuando los niveles de S-adenosilmetionina son bajos y activa
506 transcripcionalmente la expresión de genes relacionados con la producción de

507 aminoácidos. Met31 y Met32, se unen a los promotores de los genes de esta vía, y
508 atraen a Met4 el cual se estabiliza por la unión de Met28 para activar la transcripción.
509 (Gierest *et al.* 1985; Blaiseau and Thomas 1998; Lee *et al.* 2010). *Candida glabrata*
510 conserva estas proteínas y la misma regulación del metabolismo de estos
511 aminoácidos (Hébert *et al.* 2011), entonces la aparición de supresoras podría
512 deberse al efecto de mutaciones en la regulación transcripcional de *MET3* que
513 resulten en la activación de este promotor, o bien en la señalización de la respuesta
514 a estos aminoácidos.

515 Este trabajo abre preguntas que serán resueltas con experimentos posteriores,
516 queda por investigar la abundancia de la proteína Abf1 en la célula cuando se
517 reprime por la presencia de metionina y cisteína, la cual será determinada por
518 Westernblot. Además, analizaremos si el sistema de regulación del gen *MET3* sufrió
519 cambios en las cepas supresoras; de ser así, determinaremos mediante
520 secuenciación de los genes relevantes cuales son esos cambios. Por otra parte,
521 investigaremos con mayor detalle el papel de Abf1 en la progresión del ciclo celular,
522 específicamente en la fase S donde se lleva a cabo la replicación de ADN.
523 Investigaremos si los puntos de regulación o checkpoints se activan en *C. glabrata*
524 por la represión de *ABF1* mediante estudios de marcas típicas de daño celular, y
525 por abundanciaa formas fosforiladas de proteínas como Rad53 que responde a daño
526 al ADN (Pardo *et al.* 2017).

REFERENCIAS

527

528

529 Blaiseau PL, Thomas D (1998) Multiple transcriptional activation complexes tether
530 the yeast activator Met4 to DNA. EMBO Journal.
531 <https://doi.org/10.1093/emboj/17.21.6327>

532 Buchman AR, Lue NF, Kornberg RD (1988) Connections between transcriptional
533 activators, silencers, and telomeres as revealed by functional analysis of a yeast
534 DNA-binding protein. Molecular and Cellular Biology.
535 <https://doi.org/10.1128/mcb.8.12.5086>

536 Cho G, Kim J, Mo Rho H, Jung G (1995) Structure-function analysis of the DNA
537 binding domain of *Saccharomyces cerevisiae* ABF1. Nucleic Acids Research.
538 <https://doi.org/10.1093/nar/23.15.2980>

539 Eisenberg S, Civalier C, Tye BK (1988) Specific interaction between a
540 *Saccharomyces cerevisiae* protein and a DNA element associated with certain
541 autonomously replicating sequences. Proceedings of the National Academy of
542 Sciences of the United States of America. <https://doi.org/10.1073/pnas.85.3.743>

543 Gierest H, Thao NN, Surdin-Kerjan Y (1985) Transcriptional regulation of the MET3
544 gene of *Saccharomyces cerevisiae*. Gene 34:269–281.
545 [https://doi.org/10.1016/0378-1119\(85\)90136-2](https://doi.org/10.1016/0378-1119(85)90136-2)

546 Gutiérrez-Escobedo G, Orta-Zavalza E, Castaño I, De Las Peñas A (2013) Role of
547 glutathione in the oxidative stress response in the fungal pathogen *Candida*

548 glabrata. *Current Genetics* 59:91–106. <https://doi.org/10.1007/s00294-013->
549 0390-1

550 Halfter H, Kavety B, Vandekerckhove J, et al (1989) Sequence, expression and
551 mutational analysis of BAF1, a transcriptional activator and ARS1-binding
552 protein of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *The EMBO Journal*.
553 <https://doi.org/10.1002/j.1460-2075.1989.tb08612.x>

554 Hébert A, Casaregola S, Beckerich JM (2011) Biodiversity in sulfur metabolism in
555 hemiascomycetous yeasts. *FEMS Yeast Research*.
556 <https://doi.org/10.1111/j.1567-1364.2011.00725.x>

557 Juárez-Reyes A, Ramírez-Zavaleta CY, Medina-Sánchez L, et al (2012) A
558 protosilencer of subtelomeric gene expression in *Candida glabrata* with unique
559 properties. *Genetics* 190:101–111.
560 <https://doi.org/10.1534/genetics.111.135251>

561 Lee TA, Jorgensen P, Bognar AL, et al (2010) Dissection of combinatorial control by
562 the Met4 transcriptional complex. *Molecular Biology of the Cell*.
563 <https://doi.org/10.1091/mbc.E09-05-0420>

564 Li R, Yu DS, Tanaka M, et al (1998) Activation of chromosomal DNA replication in
565 *Saccharomyces cerevisiae* by acidic transcriptional activation domains.
566 *Molecular and Cellular Biology*. <https://doi.org/10.1128/mcb.18.3.1296>

567 López-Fuentes E, Gutiérrez-Escobedo G, Timmermans B, et al (2018) *Candida*
568 *glabrata*'s Genome Plasticity Confers a Unique Pattern of Expressed Cell Wall
569 Proteins. *Journal of Fungi* 4:67. <https://doi.org/10.3390/jof4020067>

570 Mao X, Hu Y, Liang C, Lu C (2002) MET3 promoter: A tightly regulated promoter
571 and its application in construction of conditional lethal strain. *Current*
572 *Microbiology*. <https://doi.org/10.1007/s00284-001-0046-0>

573 Marahrens Y, Stillman B (1992) A yeast chromosomal origin of DNA replication
574 defined by multiple functional elements. *Science*.
575 <https://doi.org/10.1126/science.1536007>

576 Milo S, Harari-Misgav R, Hazkani-Covo E, et al (2019) Limited DNA repair gene
577 repertoire in Ascomycete yeast revealed by comparative genomics. *Genome*
578 *Biology and Evolution*. <https://doi.org/10.1093/gbe/evz242>

579 Miyake T, Loch CM, Li R (2002) Identification of a multifunctional domain in
580 autonomously replicating sequence-binding factor 1 required for transcriptional
581 activation, DNA replication, and gene silencing. *Molecular and Cellular Biology*.
582 <https://doi.org/10.1128/mcb.22.2.505-516.2002>

583 Miyake T, Reese J, Loch CM, et al (2004) Genome-wide analysis of ARS
584 (autonomously replicating sequence) binding factor 1 (Abf1p)-mediated
585 transcriptional regulation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Biological*
586 *Chemistry* 279:34865–34872. <https://doi.org/10.1074/jbc.M405156200>

587 Pardo B, Crabbé L, Pasero P (2017) Signaling pathways of replication stress in
588 yeast. *FEMS Yeast Research*

589 Paulovich AG, Hartwell LH (1995) A checkpoint regulates the rate of progression
590 through S phase in *S. cerevisiae* in response to DNA damage. *Cell*.
591 [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(95\)90481-6](https://doi.org/10.1016/0092-8674(95)90481-6)

592 Rhode PR, Sweder KS, Oegema KF, Campbell JL (1989) The gene encoding ARS-
593 binding factor I is essential for the viability of yeast. *Genes and Development*.
594 <https://doi.org/10.1101/gad.3.12a.1926>

595 Rivier DH, Ekena JL, Rine J (1999) HMR-I is an origin of replication and a silencer
596 in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*

597 Shor E, Garcia-Rubio R, Degregorio L, Perlin DS (2020) A noncanonical dna
598 damage checkpoint response in a major fungal pathogen. *mBio*.
599 <https://doi.org/10.1128/mBio.03044-20>

600 Yarragudi A, Miyake T, Li R, Morse RH (2004) Comparison of ABF1 and RAP1 in
601 chromatin opening and transactivator potentiation in the budding yeast
602 *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular and Cellular Biology*.
603 <https://doi.org/10.1128/mcb.24.20.9152-9164.2004>

604 Yu S, Smirnova JB, Friedberg EC, et al (2009) ABF1-binding sites promote efficient
605 global genome nucleotide excision repair. *Journal of Biological Chemistry*.
606 <https://doi.org/10.1074/jbc.M806830200>

607

608 **Tabla 1 Cepas de *Candida glabrata* y *E. coli***

Cepa <i>E.coli</i>	Uso	Genotipo	Referencia
DH10B	Celulas electrocompetentes	F ⁻ <i>mcrA</i> Δ(<i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i>) 80Δ <i>lacZ</i> Δ <i>M15</i> Δ <i>lacX74</i> deoR <i>recA1 andA1 ara</i> Δ139 Δ(<i>ara,leu</i>)7697 <i>galU galk- rpsL</i> <i>nupG</i>	Calvin y Hanawalt (1988)
Cepas <i>C. glabrata</i>	Parental	Genotipo	Referencia
BG14	BG2	<i>ura3</i> Δ::Tn903G418 ^R	Comarck y Falkow (1999)
pP_{MET3}::Flag-linker::ABF1			
CGM3584	CGM2746	<i>abf1</i> Δ::FRT pCI12(pP _{ABF1} :: <i>ABF1</i>)	colección del laboratorio
CGM3838	CGM3584	<i>abf1</i> Δ::FRT pCI12(pP _{ABF1} :: <i>ABF1</i>) pPVS1(pP _{MET3} ::Flag-linker:: <i>ABF1</i>)	Este trabajo

CGM3874	CGM3838	<i>abf1Δ::FRT</i> pPVS1(pP _{MET3} ::Flag- linker:: <i>ABF1</i>)	Este trabajo
CGM3842	BG14	<i>ura3Δ::Tn903G418^R</i> pVS1(pP _{MET3} ::Flag- linker:: <i>ABF1</i>)	Este trabajo
CGM3882	BG14	<i>ura3Δ::Tn903G418^R</i> pRM153(pP _{MET3} ::Flag-linker	Este trabajo
CGM4279	CGM3584	<i>abf1Δ::FRT</i> PCI12(pP _{ABF1} :: <i>ABF1</i>) pPVS9(pP _{MET3} ::Flag- linker:: <i>ABF1</i>) Sup	Este trabajo
CGM4280	CGM3585	<i>abf1Δ::FRT</i> PCI12(pP _{ABF1} :: <i>ABF1</i>) pPVS10(pP _{MET3} ::Flag- linker:: <i>ABF1</i>) Sup	Este trabajo
CGM4283	CGM3586	<i>abf1Δ::FRT</i> PCI12(pP _{ABF1} :: <i>ABF1</i>) pPVS11(pP _{MET3} ::Flag- linker:: <i>ABF1</i>) Sup	Este trabajo

CGM4284	CGM4279	<i>abf1Δ::FRT</i> pPVS9(pP _{MET3} ::Flag- linker:: <i>ABF1</i>) Sup	Este trabajo
CGM4287	CGM4280	<i>abf1Δ::FRT</i> pPVS10(pP _{MET3} ::Flag- linker:: <i>ABF1</i>) Sup	Este trabajo
CGM4289	CGM4283	<i>abf1Δ::FRT</i> pPVS11(pP _{MET3} ::Flag- linker:: <i>ABF1</i>) Sup	Este trabajo

609

610

611

612

613

614

615

616

617

618

619

620 **Tabla 2 Plásmidos utilizados en este trabajo**

Plásmido	Cepa <i>E. coli</i>	Genotipo relevante	Referencia
Vectores replicativos y etiquetados con Flag			
pRM153	4163	Fragmento Flag-linker (<i>SpeI/EcoRI</i>). (oligonucleotidos 2340 y 2341) clonado en pCN(<i>SpeI/EcoRI</i>) Nat ^R , Amp ^R , CgCEN/ARS) P _{MET3} ::Flag-linker	Robledo-Márquez no publicado
pVS1	4379	Fragmento de 1.44 Kb <i>ABF1</i> liberado de pGH5 con <i>ClaI</i> y clonado en pRM153 digerido con <i>ClaI</i>	Este trabajo
pVS9	4513	pVSsup1 plasmido recuperado por Smash and grab 1	Este trabajo
pVS10	4514	pVSsup2 plasmido recuperado por Smash and grab 2	Este trabajo
pVS11	4515	pVSsup3 plasmido recuperado por Smash and grab 3	Este trabajo

621

622

623

624

625 **Tabla 3 Oligonucleótidos utilizados en este estudio**

Número	Secuencia (5'-3')	Sitios añadidos	Sitio de hibridación
2579	CTCTGAACTTGGCGACATCA	ninguno	<i>ABF1@ 796 Rv</i>
2577	CAGTCGCGTTGCCCTATTAT	ninguno	<i>ABF1@ 165 Fw</i>
13	GGCCATTAAGTTGGGTAACGCCAGGG	ninguno	vector
2212	CTTGTCTCTGTAATGGTAATAGCTG	ninguno	<i>PMET3@960 Fw</i>
2578	TACTCGAGCTTGTGGTCGTG	ninguno	<i>ABF1@374 Rv</i>

626

627

628

629

630

631

632

633

634

635

636 **Tabla 4 Unidades formadoras de colonias en medio ON provenientes de los**
637 **cultivos líquidos en medio ON y OFF**

ON UFC/mL	OFF UFC/mL	Tiempo (h)
2.27E+06	1.10E+06	0
3.51E+07	3.70E+06	7
4.18E+07	2.37E+06	8
4.08E+07	1.23E+06	9
1.06E+08	6.67E+05	10
1.18E+08	4.67E+05	11
1.13E+08	5.33E+05	12
1.58E+08	1.33E+05	24
4.37E+08	1.05E+07	48

638

639

640

641

642

643

644

645

646

647

648 **Tabla 5 número de células con gema y sin gema en medio ON y OFF en**
649 **microscopio de fluorescencia después de 9h de cultivo**

Tipo de morfología	ON	OFF
Sin gemas	76 (90.5%)	28 (58.3%)
Con gema	8 (9.5%)	20 (41.7%)
Total	84 (100%)	48 (100%)

650

651

652

653

654

655

656

657

658

659

660

661

662

663 **Tabla 6 Porcentajes poblacionales de cada fase del ciclo celular en las cepas**
 664 **indicadas**

Medio	Plásmido	Tiempo	ON			OFF		
			G1(%)	S(%)	G2(%)	G1(%)	S(%)	G2(%)
Cepa <i>abf1Δ</i>								
<i>abf1Δ</i> /pP _{ABF1} :: <i>ABF1</i>	3 h	21.8	56.9	17.1	--	--	--	
	6 h	55.3	20.2	19.9	--	--	--	
	9 h	62	4.98	41	--	--	--	
<i>abf1Δ</i> /pP _{MET3} ::Flag- <i>ABF1</i>	3 h	29.5	33.4	22.2	35.5	1.61	57.3	
	6 h	32.3	33.7	28.1	19.8	35.3	28.3	
	9 h	57.1	14.5	22.8	61.2	17.9	18.8	
Parental <i>ABF1</i>⁺								
BG14/pP _{MET3} — Vector	3 h	44.8	3.1	50.9	73	2	22.5	
	6 h	54.6	26.1	16.5	13	69.3	15.5	
	9 h	52.8	37.5	10.1	56.9	-0.64	44.1	
BG14/pP _{MET3} ::Flag- <i>ABF1</i>	3 h	49.1	0.88	49.5	76.8	3.45	18.5	
	6 h	21.2	62.6	5.15	55.5	5.68	40.3	
	9 h	50	15.5	31.9	57.7	12.2	24.6	

665 Porcentajes de la población de cada cepa en distintas fases del ciclo celular en medio ON y OFF
 666 calculadas a partir del contenido de ADN en FlowJo™. **Experimento se llevó a cabo con NAT en
 667 el medio de cultivo de las cepas señaladas. (--): No se llevó a cabo el experimento en este medio

668

669

PIES DE FIGURAS

670 **Fig. 1 Comparación de la estructura de ScAbf1 y CgAbf1**

671 Estructura de ScAbf1-p y CgAbf1. Se muestra la posición de los dominios de unión
672 a ADN en negro y el dominio C-terminal que incluye a CS2 en azul, en rojo se
673 presenta la identidad de CgAbf1 con respecto a ScAbf1 a lo largo de toda la
674 proteína. Sc: *Saccharomyces cerevisiae*; Cg: *Candida glabrata*. Identidad obtenida
675 por alineamiento de secuencias con la matriz BLOSUM80 en BLASTp de NCBI.

676 **Fig. 2 Abf1 es esencial para el crecimiento de *Candida glabrata***

677 A) Esquema de la cepa de *Candida glabrata* con expresión episomal y condicional
678 de *ABF1* en un fondo genético tiene una mutación nula de *ABF1* en el cromosoma
679 (*abf1* Δ). B) Crecimiento de la cepa mutante nula con los plásmidos pP_{MET3}::*Flag-*
680 *ABF1* y pP_{ABF1}::*ABF1* en medios rico (YPD: OFF), Medio mínimo (ON) y medio
681 mínimo con metionina y cisteína 0.2 mM (OFF) y CAA (Casaminoácidos). Se
682 muestran los tiempos de duplicación con las desviaciones estándar al lado de cada
683 curva.

684 **Fig. 3 Pérdida de viabilidad a través del tiempo en medio represivo**

685 Crecimiento de la cepa mutante nula en medio mínimo (ON) y medio mínimo con
686 0.2 mM de los aminoácidos met y cis (OFF). A) Densidad óptica a 600 nm durante
687 las primeras seis horas de crecimiento. B) Densidad óptica a partir de la séptima
688 hora. C) Unidades formadoras de colonias durante las primeras 6 h. D) Unidades
689 formadoras de colonias a partir de la séptima hora.

690 **Fig. 4 Aparición de mutantes supresoras de represión por met/cis**

691 Células viables después de 24 y 48 h de incubación en medio mínimo ON y medio
692 mínimo con 0.2 mM de los aminoácidos met y cys (OFF), recuperadas en medio
693 solido con aminoácidos (OFF). A) Unidades formadoras de colonias después de 24
694 h del experimento 1 B) unidades formadoras de colonias después de 24 y 48 h del
695 experimento 2.

696 **Fig. 5 Patrón de restricción de plásmidos recuperados de células supresoras**

697 A) Esquema de los sitios de corte de las enzimas de restricción utilizadas para
698 determinar si existen rearrreglos visibles en el promotor de *MET3* y/o en el ORF de
699 *ABF1*.

700 B) Plásmidos recuperados por *smash* y *grab* de las cepas supresoras que
701 crecen en presencia de met y cys y transformados en *E. coli*. Como control incluimos
702 el plásmido parental pVS1. La digestión con *Bam*HI/*Sac*I (dirigida al promotor de
703 *MET3*) da un fragmento de 676 pb y la digestión con *Cla*I escinde el fragmento que
704 corresponde al ORF de *ABF1* de 1.4 kb.

705 **Fig. 6 Crecimiento de células con plásmidos provenientes de células**
706 **supresoras de experimentos independientes en medios ON y OFF**

707 A) Crecimiento de la cepa *abf1*Δ con plásmidos obtenidos de las células
708 supresoras (pSup1, pSup2; pSup3) en medio ON (YNB) durante 48 h, tomando
709 muestras cada 3 h por 9 h, a las 24 y a las 48 h

710 B) Igual que A) pero en medio OFF.

711 **Fig. 7 Morfología de *Candida glabrata* en medio ON y OFF**

712 A) Fotografías de *C. glabrata* con tinción DAPI y DIC a 9 h de crecimiento en medio
713 ON y OFF tomadas con microscopio de fluorescencia aumento 100x.

714 B) Tamaño de las células de la cepa *abf1Δ*/pP_{MET3}::*Flag-ABF1* en medios ON y OFF
715 después de 9 h de crecimiento. **p*=0.0166, por prueba de Dunn's para datos no
716 paramétricos a valor de $\alpha=0.5$

717 **Fig. 8 Cuando se reprime la expresión de *ABF1*, se afecta el ciclo celular**

718 Se muestran los histogramas con las fases calculadas del ciclo celular. En morado
719 fase G1, en amarillo fase S en verde fase G2. A) Cepa *abf1Δ* con los plásmidos
720 indicados: expresión episomal a partir de su propio promotor y con el plásmido
721 reprimible por aminoácidos crecidas tanto en medio ON como OFF durante los
722 tiempos señalados. B) Cepa parental (*ABF1+*) con el plásmido con expresión
723 reprimible de *ABF1* y el vector vacío.

724 * Cepas que crecieron con NAT, como marcador de resistencia de los plásmidos.

725

726

727

728

729

730

731

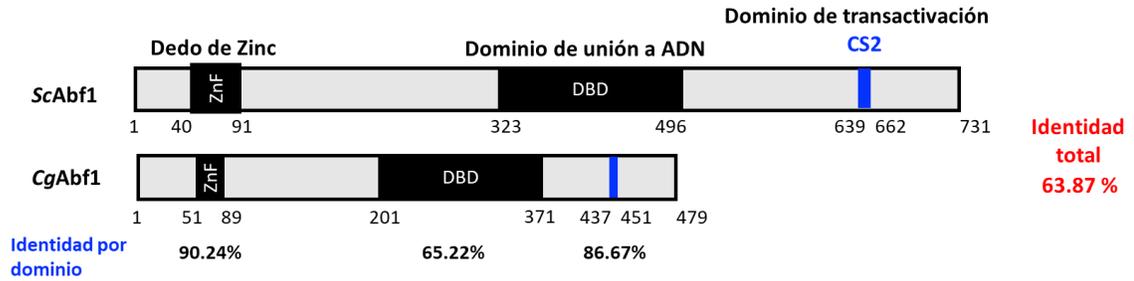
732

733

734

735 **Figuras**

736 **Fig. 1**



737

738

739

740

741

742

743

744

745

746

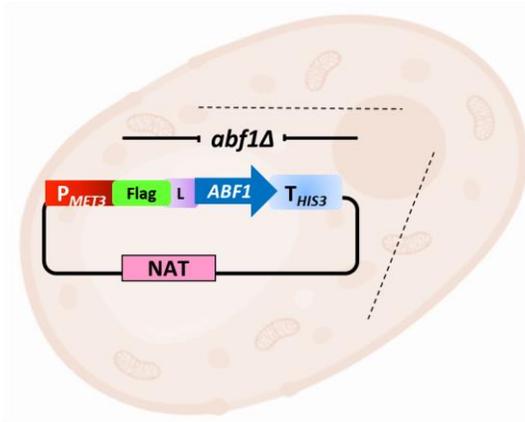
747

748

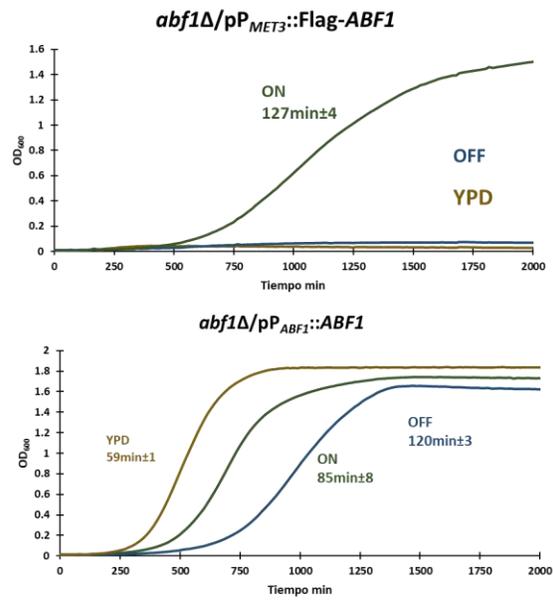
749

750 Fig. 2

A)



B)



751

752

753

754

755

756

757

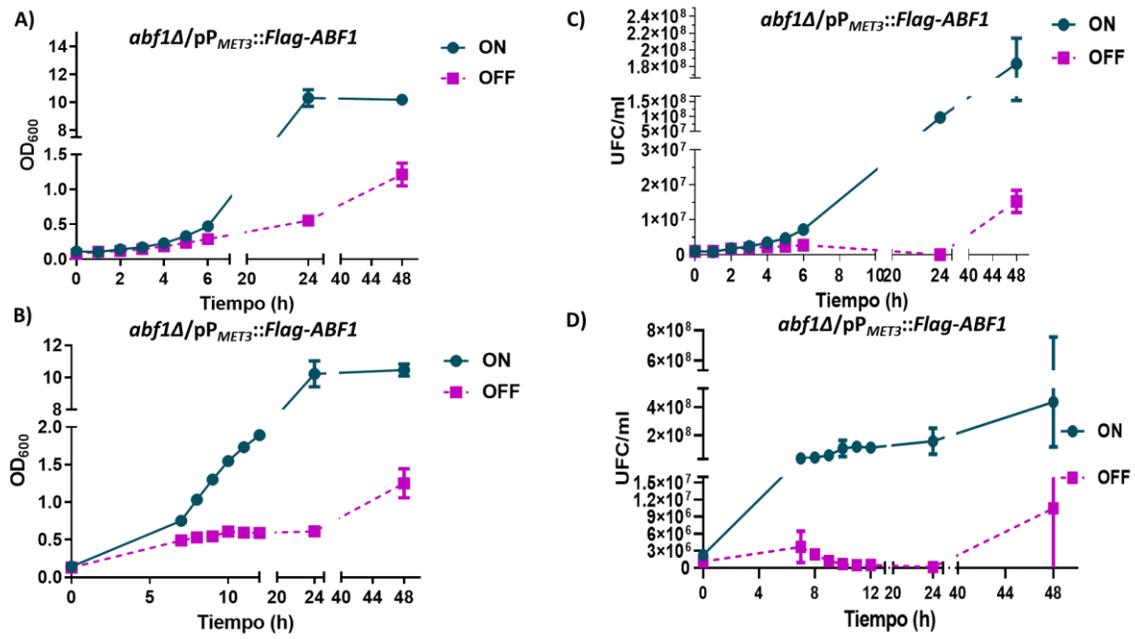
758

759

760

761

762 Fig. 3



763

764

765

766

767

768

769

770

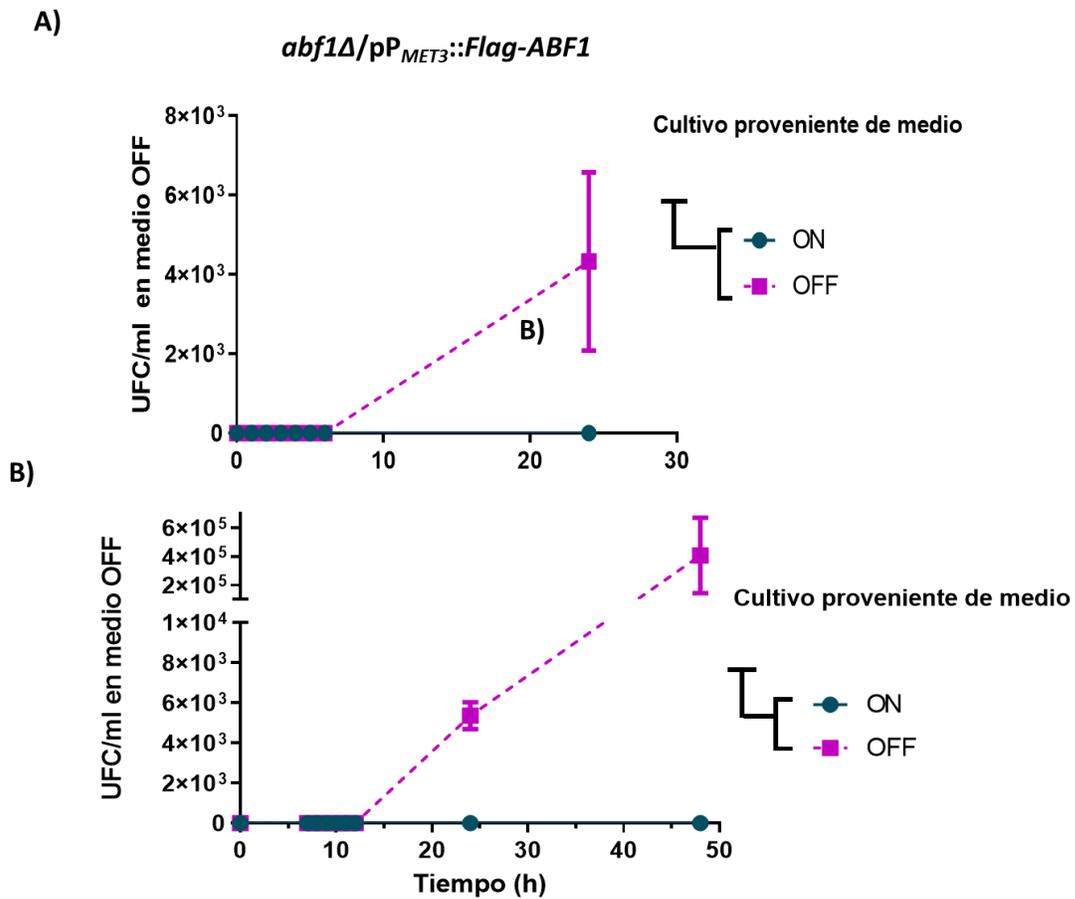
771

772

773

774 Fig. 4 A

775



776

777

778

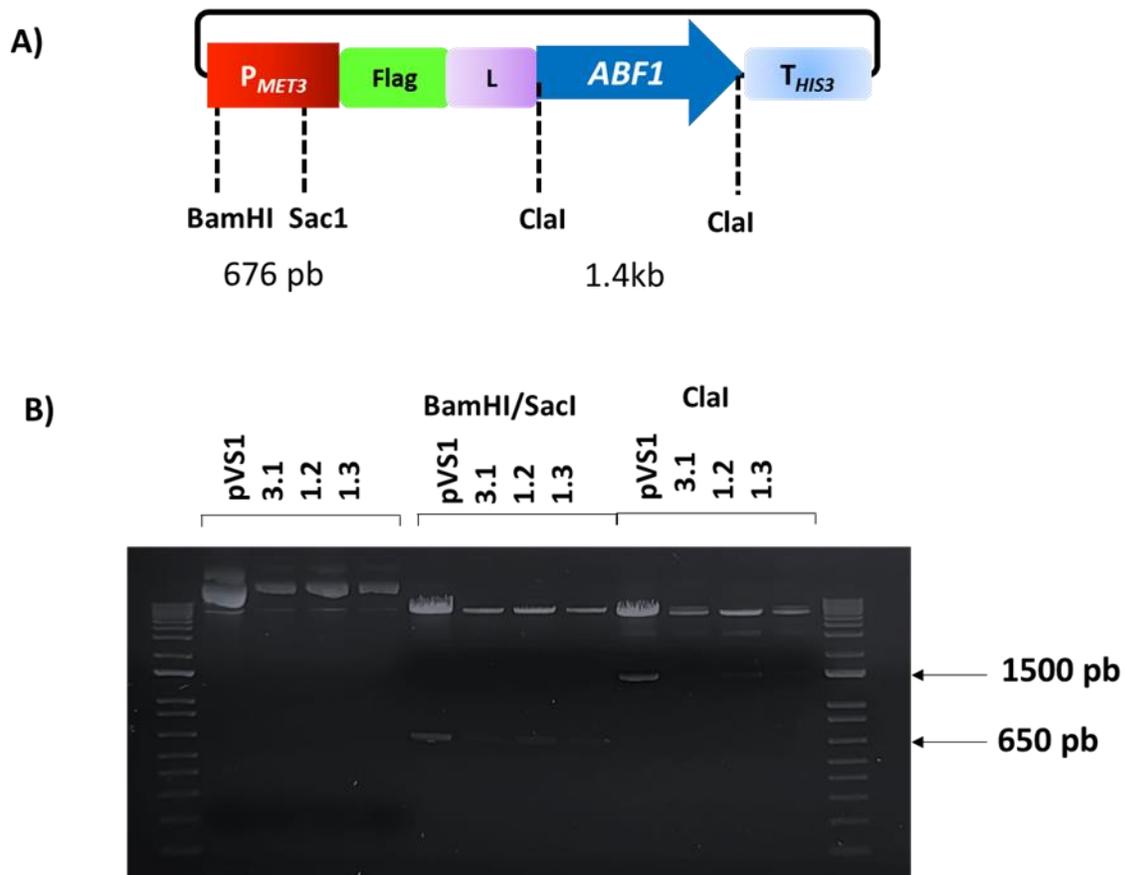
779

780

781

782

783 Fig 5



784

785

786

787

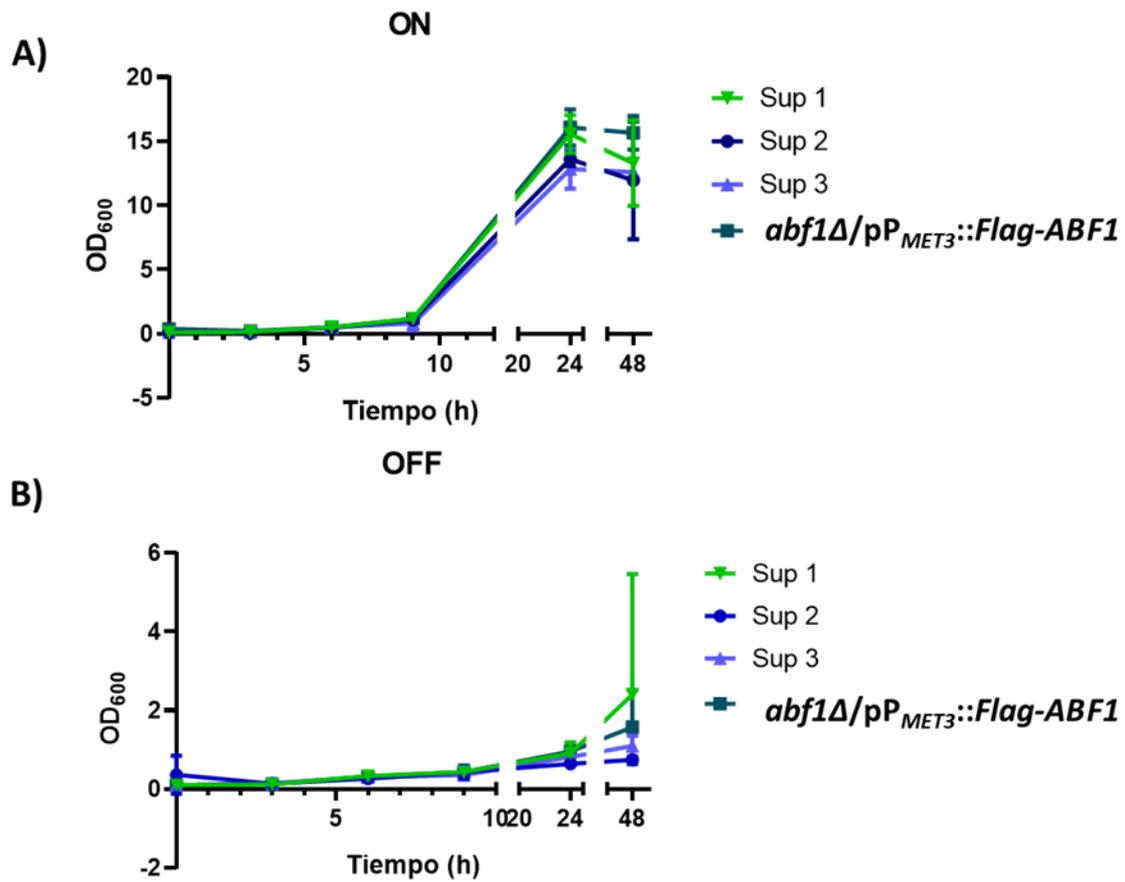
788

789

790

791

792 Fig. 6



793

794

795

796

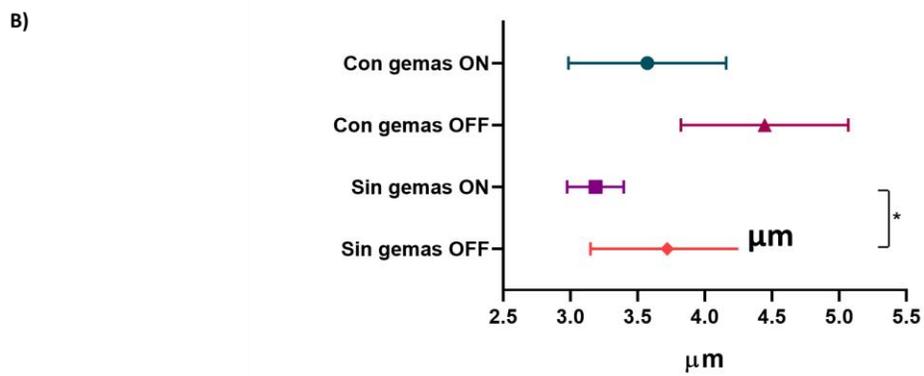
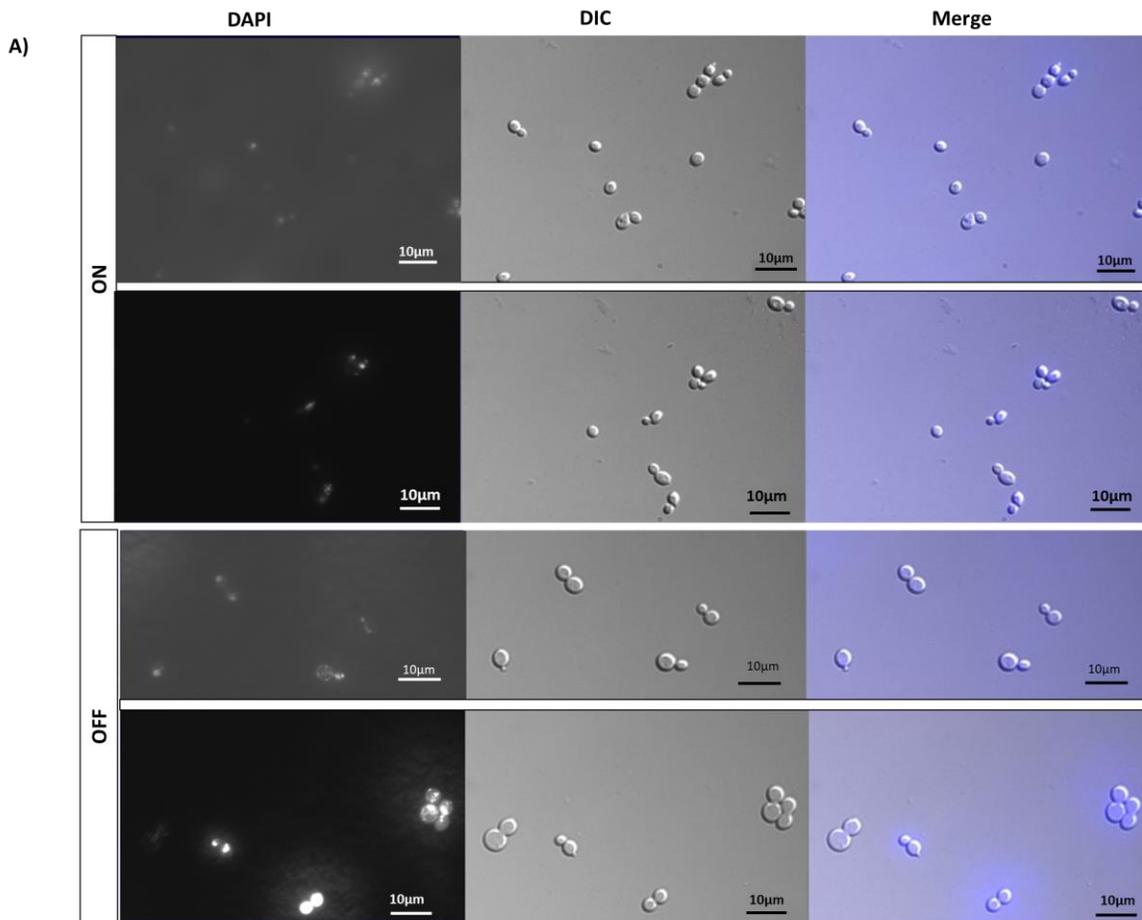
797

798

799

800

801 Fig 7

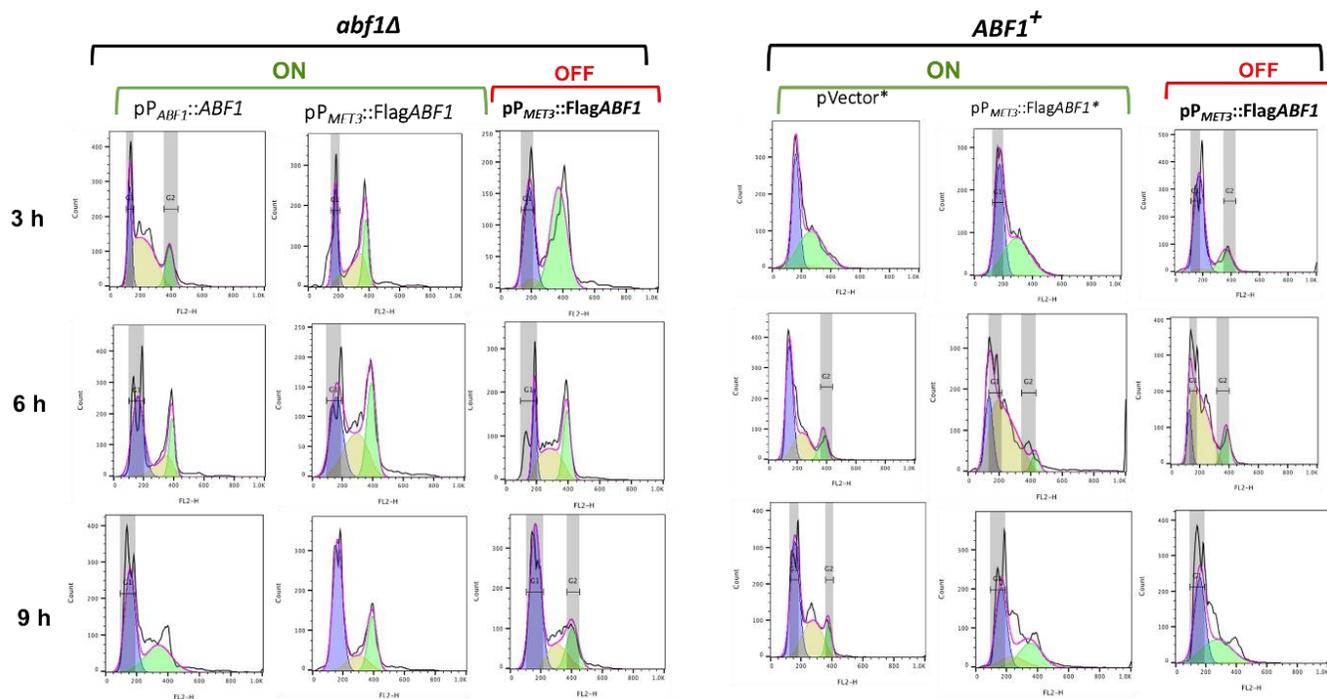


802

803

804

805 Fig 8



806