



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

POSGRADO EN CIENCIAS EN BIOLOGIA MOLECULAR

**“Diseño de herramientas moleculares para la
caracterización de las proteínas Sir3 y Sir4 en
Candida glabrata”**

Tesis que presenta
Guillermo Juárez Vega

Para obtener el grado de
Maestro en Ciencias en Biología Molecular

Director de la Tesis:
Dr. Alejandro De Las Peñas Nava

San Luis Potosí, S.L.P., Septiembre de 2010



Constancia de aprobación de la tesis

La tesis “**Diseño de herramientas moleculares para la caracterización de las proteínas Sir3p y Sir4p en Candida glabrata**” presentada para obtener el Grado de de Maestro en Ciencias en Biología Molecular fue elaborada por **Guillermo Juárez Vega** y aprobada el **01 de Septiembre de 2010** por los suscritos, designados por el Colegio de Profesores de la División de Biología Molecular del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C.

Dr. Alejandro De Las Peñas Nava
(Director de la tesis)

Dra. Lina Raquel Riego Ruíz
(Asesor de la tesis)

Dr. Christian Alberto García Sepúlveda
(Asesor de la tesis)



Créditos Institucionales

Esta tesis fue elaborada en el Laboratorio de Microbiología Molecular de la División de Biología Molecular del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C., bajo la dirección del Dr. Alejandro De Las Peñas Nava.

Durante la realización del trabajo el autor recibió una beca académica del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología 227593 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 075 del Libro Primero de Actas de Exámenes de Grado del Programa de Maestría en Ciencias en Biología Molecular está asentado lo siguiente:

En la ciudad de San Luis Potosí a los 1 días del mes de septiembre del año 2010, se reunió a las 12:00 horas en las instalaciones del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C., el Jurado integrado por:

Dr. Christian Alberto García Sepúlveda	Presidente	UASLP
Dra. Lina Raquel Riego Ruiz	Secretaria	IPICYT
Dr. Alejandro De Las Peñas Nava	Sinodal	IPICYT

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

MAESTRO EN CIENCIAS EN BIOLOGÍA MOLECULAR

sustentó el C.

Guillermo Juárez Vega

sobre la Tesis intitulada:

Diseño de herramientas moleculares para la caracterización de las proteínas Sir3 y Sir4 en Candida glabrata

que se desarrolló bajo la dirección de

Dr. Alejandro De Las Peñas Nava

El Jurado, después de deliberar, determinó

APROBARLO

Dándose por terminado el acto a las 13:30 horas, procediendo a la firma del Acta los integrantes del Jurado. Dando fe el Secretario Académico del Instituto.

A petición del interesado y para los fines que al mismo convengan, se extiende el presente documento en la ciudad de San Luis Potosí, S.L.P., México, a los 1 días del mes de septiembre de 2010.


Dr. Marcial Bonilla Marín
Secretario Académico


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



Dedicatorias

Para mis padres María Juanita y Guillermo

A mis hermanos Sergio y Rodolfo

A mis sobrinos Marlene, Giovanna, Lolita y Óscar

A mis amigos Andrés Almendárez y Jesús Mondragón

A mi abuela Teresa

“La ciencia será siempre una búsqueda, jamás un descubrimiento real. Es un viaje, nunca una llegada”
Karl Popper

Agradecimientos

A Dios, por permitirme estar aquí y darme fuerzas todos los días.

Al Dr. Alejandro De Las Peñas, por brindarme su confianza, paciencia y sus valiosas enseñanzas.

A la Dra. Irene Castaño por su apoyo y enriquecedores comentarios.

Al Dr. Carlos Barajas por haber creído en mí y a Rosy Espinosa.

Al Dr. Omar Arroyo, por su asesoría técnica.

A la Dra. Lina Riego y al Dr. Christian García por sus acertados comentarios en este trabajo.

Al M. en C. Marco Martín González y al Dr. Sergio Casas, por permitirme explorar esta área de mi carrera.

A mis maestras de Micología: Alicia Zavalza y María Eugenia Torre, gracias por sus palabras.

A mi familia: Mis padres Ma. Juanita y Guillermo, gracias por su amor y paciencia; a mis hermanos Sergio y Rodolfo; A mis queridos sobrinos: Marlene, Giovanna, Lolita y Óscar; a mi cuñada Cristina.

A mis queridos amigos: Andrés Almendárez y Jesús Mondragón. Gracias inmensas por compartir tantas cosas.

A mis consentidos: Edith Elena, Zayra Ivonne, Sandra, MaryChuy, Saúl y Adriana. Siempre los tengo presentes.

A mis compañeros Marbella, Paul, Ana Paty y Mariana. En especial a Paco Santos

A todos mis compañeros del laboratorio No.6 de Microbiología molecular: Marcela Briones, Paty Yáñez, Liz Medina, Lupita Gutiérrez, Luis Medina, Gaby Mancilla, Gehenna Lobo, Albus Saucedo, MaryTere Lavaniegos y Gloria López. Gracias a todos ustedes por su apoyo

Y muy en especial a Candy Ramírez, Jacqueline Juárez, Emmanuel Orta, Alex Juárez y Vero Martínez. Gracias por su apoyo y consejos. Gracias por esas tardes tan amenas.

Y a todas aquellas personas que contribuyeron en mi paso por el IPICYT

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

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología.

Contenido

Carátula	i
Constancia de aprobación de la tesis	ii
Créditos institucionales	iii
Acta de examen	iv
Dedicatorias	v
Agradecimientos	vi
Lista de tablas	ix
Lista de figuras	x
Abreviaturas	xi
Glosario	xiii
Resumen	xv
Abstract	xvii
1. INTRODUCCIÓN	
1.1 <i>Candida glabrata</i> , un patógeno emergente.....	1
1.2 Relación filogenética entre <i>C. glabrata</i> y <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	1
1.3 Factores de virulencia en <i>C. glabrata</i>	3
1.4 El complejo Sir en el silenciamiento subtelomérico.....	4
1.5 Sir3p como blanco de señales externas.....	5
Objetivos generales y específicos.....	8
2. MATERIALES Y MÉTODOS	
2.1 Medios de cultivo y cepa de <i>Escherichia coli</i>	9
2.2 Cepas de <i>C. glabrata</i>	9
2.3 Plásmidos.....	11
2.4 Oligonucleótidos.....	13
2.5 Transformación de <i>C. glabrata</i>	14
2.6 Manipulación del DNA.....	15

2.7 Transformación de <i>Escherichia coli</i>	
2.7.1 Electroporación	15
2.8 Extracción de DNA genómico de <i>C. glabrata</i>	16
2.9 Concentración y purificación de DNA con Fenol:Cloroformo:Alcohol Isoamílico.	17
2.10 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).	17
2.11 Cuantificación de DNA	20
2.12 Extracción de proteínas de <i>C. glabrata</i>	20
2.13 Cuantificación de proteínas de <i>C. glabrata</i>	22
2.14 Ensayos de Western blot.	24
2.15 Análisis de la expresión del gen reportero <i>URA3</i>	27
2.16 Ensayos de adherencia a células HeLa.	28
3. RESULTADOS	
3.1 Construcción de vectores para fusiones traduccionales con los epítopes GFP, HA y FLAG	30
3.2 Integración de las fusiones traduccionales en <i>C. glabrata</i> por doble recombinación homóloga	34
3.3 Eliminación del casete de resistencia a higromicina e incorporación simultánea del terminador nativo de los genes <i>SIR3</i> y <i>SIR4</i>	46
3.4 Evaluación de la funcionalidad de las fusiones en <i>SIR3</i> y <i>SIR4</i>	
3.4.1 Expresión del gen reportero <i>URA3</i>	39
3.4.2 Ensayos de adherencia de las cepas etiquetadas a células HeLa	40
3.5 Inmunodetección de Sir3::Flag y Sir4::Flag.	44
4. DISCUSIÓN	45
5. CONCLUSIONES	51
6. REFERENCIAS	53

Lista de tablas

1. Características generales de los genomas de <i>Candida glabrata</i> y <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	2
2. Cepa de <i>Escherichia coli</i>	9
3. Cepas de <i>Candida glabrata</i>	9
4. Plásmidos	11
5. Oligonucleótidos	13
6. Componentes de la mezcla en la reacción de PCR con la enzima Amplificasa	17
7. Componentes de la mezcla en la reacción de PCR con la enzima DNA polimerasa Expand Long Template [®]	18
8. Estándares para cuantificación de proteínas en <i>C. glabrata</i>	23
9. Características generales de los vectores	34

Lista de figuras

1. Árbol filogenético de las especies en los clados de <i>Candida</i> y de <i>Saccharomyces</i>	2
2. Esquema de los componentes de transferencia	25
3. Generación de vectores para reemplazo génico con fusiones traduccionales	31
4. Representación esquemática de los vectores para Sir3 generados con diferentes epítopes	32
5. Representación esquemática de los vectores para Sir4 generados con diferentes epítopes	33
6. Fusión con epítopes por doble recombinación homóloga (un solo paso)	35
7. Ubicación de los oligonucleótidos para comprobar el reemplazo génico con la fusión traduccional y tamaños de banda esperados en los productos de PCR	36
8. Eliminación del casete de resistencia a higromicina e incorporación del terminador nativo	37
	38
10. Análisis de la expresión del gen reportero <i>URA3</i> en diferentes medios de crecimiento	40
11. Ensayo de adherencia de cepas etiquetadas a células HeLa	43
12. Inmunodetección por Western Blot de las proteínas etiquetadas con el epítope FLAG	44

Abreviaturas

5-FOA	Ácido 5-fluorótico, del inglés <i>5-FluOrotic Acid</i>
c.b.p.	Referente a cuanto baste para .
CAA	Medio casaminoácidos, del inglés <i>CasAminoAcids</i> .
Cg	Referente a <i>Candida glabrata</i> .
ChIP	Ensayo de inmunoprecipitación de la cromatina, del inglés <i>Chromatin ImmunoPrecipitation</i>
DMSO	DiMetilSulfÓxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico, del inglés DesoxyriboNucleic Acid
FRT	Secuencias de reconocimiento de recombinasa Flp1p, del inglés <i>Flippase Recognition Target</i> (GAAGTTCCTATTCTCTAGAAAGTATAGGAACTTC)
HeLa	Línea celular inmortal derivada de un cáncer cervical de Henrietta Lacks
HRP	Anticuerpo policlonal de ratón acoplado a peroxidasa de rábano. Del inglés HorseRadish Peroxidase
IP	Inmunoprecipitación
MAP	Proteína activadora de mitógenos, del inglés Mitogen-Activated Protein
NAD⁺	Nicotin Adenin Dinucleotido . NADH corresponde a la forma reducida. El NADP ⁺ es la forma fosforilada y también puede reducirse (NADPH)
OD_{600nm}	Densidad óptica registrada a la longitud de onda de 600nm. Del inglés <i>Optical Density</i> , y equivale a la absorbancia en este punto del espectro visible (A_{600nm}).
ORF	Marco abierto de lectura, del inglés <i>Open Reading Frame</i> .
p/v	Referente a peso/volumen
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa, del inglés <i>Polymerase Chain Reaction</i> .
PM	Referente a Peso Molecular
ROS	Especies reactivas de oxígeno, del inglés Reactive Oxygen Species
UTR	Región no traducible del gen, ya sea al 3' o al 5'; del inglés UnTranslated Region .
v/v	Referente a volumen/volumen
YPD	Medio de extracto de levadura, peptona y dextrosa. <i>Yeast extract-Peptone-Dextrose</i> .

Nombres de genes

<i>bla</i>	<i>Beta-lactamase.</i>
<i>CTA1</i>	<i>CaTalase A1</i>
<i>EPA</i>	<i>EPithelial Adhesin</i>
<i>FLAG</i>	<i>Gen que codifica para este epítotope</i>
<i>GFP</i>	<i>Green Fluorescent Protein.</i>
<i>HA</i>	<i>HemAglutinina</i>
<i>HIS</i>	<i>HIStidine requiring.</i>
<i>hph</i>	<i>Hygromycin phosphotransferase.</i>
<i>HST</i>	<i>Homologous of SIR Two.</i>
<i>RIF</i>	<i>RAP1 Interacting Factor.</i>
<i>SIR</i>	<i>Silent Information Regulator.</i>
<i>SOD</i>	<i>SuperOxide Dismutase.</i>
<i>TOR</i>	<i>Target Of Rapamycin</i>
<i>URA</i>	<i>URAcil requiring.</i>

Glosario

Árbol génico: Diagrama ramificado que representa las relaciones conocidas o inferidas de un grupo de genes o secuencias de aminoácidos históricamente relacionados.

Anticuerpo monoclonal: es un tipo de anticuerpo homogéneo producido por una célula híbrida producto de la fusión de un clon de linfocitos B, descendiente de una sola y única célula madre y una célula plasmática tumoral.

Anticuerpo policlonal: Son anticuerpos derivados de diferentes líneas de linfocitos B. Componen una mezcla de inmunoglobulina, secretados en contra de un antígeno específico, cada uno reconociendo diferentes epítopes.

Auxotrofia: Es la carencia de una ruta metabólica funcional en un microorganismo debida a una mutación, y sólo es capaz de proliferar en un medio de cultivo si a éste se le ha añadido la sustancia específica.

Comensalismo: Relación interespecífica entre dos organismos vivos, donde uno de los individuos se beneficia y el otro no se es perjudicado ni favorecido.

Epítopo: Es la parte más pequeña de un antígeno, capaz de estimular respuesta por medio de la unión específica de anticuerpos.

Especiación: Proceso mediante el cual una población de una determinada especie da lugar a otra u otras poblaciones, aisladas reproductivamente de la población anterior y entre sí, que con el tiempo irán acumulando otras diferencias genéticas.

Filogenia: La secuencia de eventos involucrados en el desarrollo evolutivo de una especie o un grupo taxonómico de organismos. Referente a las relaciones evolutivas entre un grupo de organismos.

Homólogo: Un gen relacionado a otro gen por descender de una secuencia ancestral de DNA.

Oportunista: Denota a un microorganismo que no causa ordinariamente enfermedad, pero que bajo ciertas circunstancias se vuelve patógeno.

Ortólogo: Genes en diferentes especies que evolucionaron a partir de un gen ancestral común por especiación. Normalmente, los genes ortólogos retienen la misma función a lo largo de la evolución.

Parálogo: Genes relacionados por la duplicación dentro de un genoma. Por lo general genes parálogos evolucionan nuevas funciones, incluso si están relacionadas a la original.

Patogenicidad: La capacidad potencial de producir enfermedad o cambios patológicos en un hospedero.

Sintenia: Es la localización conservada de genes en posiciones equivalentes en especies relacionadas con el mismo ancestro. También puede expresarse como la conservación o coherencia del contenido de genes y su orden en los cromosomas de diferentes genomas.

Virulencia: El grado de patogenicidad dentro de una especie. Es una medida cuantitativa de la patogenicidad y representa la severidad de la infección.

Resumen

Diseño de herramientas moleculares para la caracterización de las proteínas Sir3 y Sir4 en *Candida glabrata*

En los últimos años, *Candida glabrata* ha surgido como patógeno oportunista, especialmente en individuos inmunocomprometidos. Una característica que presenta esta levadura es que se adhiere a células epiteliales. Esta adherencia está mediada por proteínas de pared celular codificadas por una familia de más de 20 genes parálogos (genes *EPA*). La mayoría de estos genes se encuentran localizados en regiones subteloméricas, donde están sujetos al silenciamiento transcripcional dependiente de la cromatina. Este silenciamiento lo lleva a cabo el complejo Sir (Sir2, Sir3 y Sir4), Rap1, Ku70, Ku80 y Rif1. Mutaciones en cualquiera de los genes que codifican para la maquinaria del silenciamiento subtelomérico, vuelve a las células hiperadherentes y resistentes a estrés oxidativo.

Esto sugiere que la adherencia y la resistencia a estrés oxidativo, estarían co-regulados en este hongo patógeno por un mismo sistema de regulación global, como lo es el del silenciamiento subtelomérico. Adicionalmente ello sugiere que este sistema de regulación global pudiera detectar señales del medio ambiente y responder a éstas, reprogramando la expresión de genes subteloméricos específicos.

Hay evidencia que muestra que la maquinaria del silenciamiento subtelomérico puede estar detectando señales extracelulares. En *C. glabrata*, la proteína Sir2 (una desacetilasa de histonas dependiente de NAD^+) detecta los niveles de ácido nicotínico (el ácido nicotínico es precursor de NAD^+) extracelular. Al disminuir los niveles de ácido nicotínico, disminuyen también los niveles de NAD^+ y Sir2 pierde su actividad, esto permite la relajación de la cromatina y la transcripción de algunos genes *EPA* subteloméricos. En *S. cerevisiae*, Sir3 se fosforila en respuesta a estrés nutricional y osmótico. No obstante, si el complejo Sir pierde su actividad, ocurre de manera consecuente una desrepresión específica de los

genes silenciados. Con base en estos antecedentes nos propusimos determinar si Sir3 y Sir4, pudieran también ser blancos de señales ambientales.

Para caracterizar a éstas proteínas diseñamos una serie de herramientas moleculares, que nos permitirán etiquetar a las proteínas Sir3 y Sir4 con diferentes epítopes, y determinar si estas proteínas Sir son blancos de señales extracelulares.

PALABRAS CLAVE: *Candida glabrata*, adhesinas, estrés oxidativo, complejo Sir, silenciamiento subtelomérico, NAD⁺, epítopes.

Abstract

Construction of molecular tools to understand the role of Sir3 and Sir4 in *Candida glabrata*

In recent years, *Candida glabrata* has emerged as an opportunistic fungal pathogen, especially in individuals with weakened immune systems. *C. glabrata* is able to adhere to cultured epithelial cells and this adherence is mediated by the Epa cell wall proteins. These cell wall proteins are encoded by a family of around 20 paralogue genes, which are localized mainly in subtelomeric regions. Subtelomeric regions are subject to chromatin-based transcriptional silencing. The proteins involved in subtelomeric silencing are the Sir complex (Sir2, Sir3 and Sir4), Rap1, Ku70, Ku80 and Rif1. Mutations in any of the genes that encode for subtelomeric silencing machinery, render the yeast hyperadherent and resistant to oxidative stress. Adherence and resistance to oxidative stress might be co-regulated in this fungal pathogen by a single global regulatory system, subtelomeric silencing. Subtelomeric silencing might be able to sense and respond to environmental signals, thus reprogramming the expression of specific subtelomeric genes.

There is evidence that demonstrates that the silencing machinery could be the target of extracellular signals. In *C. glabrata*, Sir2 (a NAD⁺ dependent histone deacetylase) detects the levels of nicotinic acid (NA, NAD⁺ precursor) as an extracellular signal. Reduced levels of NA, causes reduced levels of NAD⁺, thus Sir2 loses its activity, allowing the relaxation of the chromatin, and transcription of subtelomeric genes like the *EPA* genes, which then become hyperadherent. In *S. cerevisiae*, Sir3 is phosphorylated in response to nutritional and osmotic stress, which causes loss of activity of the Sir complex, and consequently a specific derepression of silenced genes. Based on these findings, we sought to determine whether Sir3p and Sir4, might also be targets of environmental cues.

To further understand the role of Sir3 and Sir4, we designed a series of vectors to epitope-tagged these proteins. We envisage that such specific antibodies, would allow us to determine if Sir3 and/or Sir4 are in fact detecting environmental signals.

KEYWORDS: *Candida glabrata*, adhesins, oxidative stress, Sir complex, subtelomeric silencing, NAD⁺, epitopes.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 *Candida glabrata*, un patógeno emergente

El género *Candida* es responsable del 11% de todas las infecciones sistémicas hospitalarias de las cuales más de la mitad se deben a *C. albicans* y el 15% de todas las Candidiasis se deben a *Candida glabrata* (ALMIRANTE *et al.* 2005; MANZANO-GAYOSSO *et al.* 2000; TRICK *et al.* 2002). En México se ha reportado que el 12% de las vulvovaginitis y el 13% de las infecciones sistémicas por *Candida* se deben a *C. glabrata* (BUITRON GARCIA *et al.* 2002; MANZANO-GAYOSSO *et al.* 2000).

1.2 Relación filogenética entre *Candida glabrata* y *Saccharomyces cerevisiae*

Candida glabrata es una levadura haploide filogenéticamente más cercana a *Saccharomyces cerevisiae* que a *Candida albicans* (WONG *et al.* 2003) (Figura 1). Esto ha permitido que casi todas las técnicas de biología molecular desarrolladas para *S. cerevisiae* se puedan utilizar en *C. glabrata*. Además, es posible hacer estudios genéticos con facilidad ya que es haploide y otra gran ventaja es que su genoma está secuenciado totalmente y se encuentra disponible gracias al proyecto *Genólevures* de genómica comparativa (<http://www.genolevures.org/cagl.html#>). Con el análisis de su genoma se ha determinado que es de tamaño y características similares al de *S. cerevisiae* (Tabla 1).

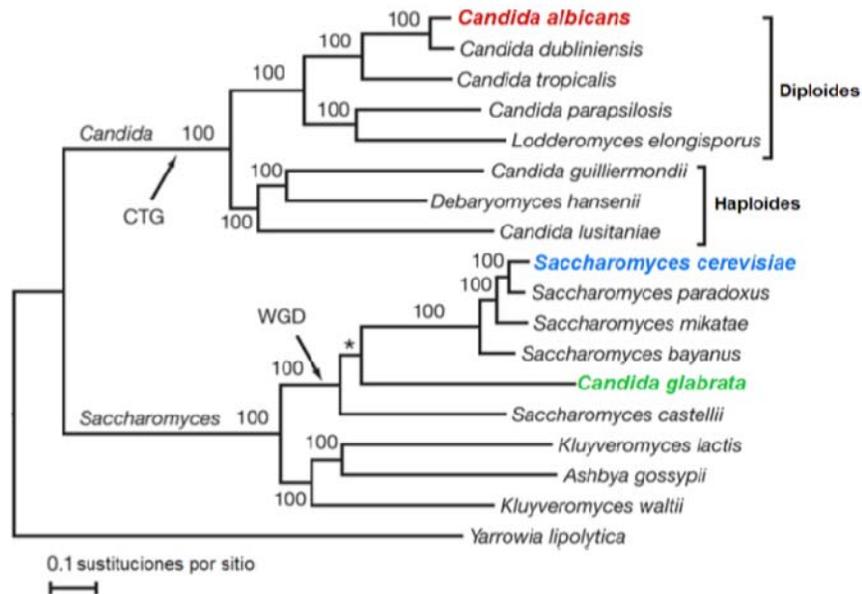


Figura 1. Árbol filogenético de las especies en los clados de *Candida* y de *Saccharomyces*. El análisis está basado en secuencias peptídicas de 706 genes de *S. cerevisiae* y los ortólogos de cada una de las 17 especies. A partir de los alineamientos peptídicos, la filogenia se infirió por un programa de inferencia Bayesiana (MrBayes Compañía y País). La leyenda “CTG” hace referencia a que todas las especies del clado *Candida* utilizan este codón para traducir serina en vez de leucina. También se indica el evento de duplicación genómica ancestral (WGD) y la rama construida con base a la conservación sinténica (*) Tomado y modificado de (BUTLER *et al.* 2009)

Tabla 1. Características generales de los genomas de *Candida glabrata* y *Saccharomyces cerevisiae*

Característica	<i>C. glabrata</i>	<i>S. cerevisiae</i>
Tamaño de genoma (Mb)	12.3	12.1
No. de cromosomas	13	16
No. de genes	5283	5516
% contenido G+C	38.8	38.3
% contenido intrones	~1	~5

Los genomas de *C. glabrata* y *S. cerevisiae* muestran un alto grado de sintenia y hay en promedio un 65% de identidad en aminoácidos entre las proteínas ortólogas de las dos especies. La inspección de la secuencia del genoma muestra que aunque la gran mayoría de los genes de *S. cerevisiae* tienen evidentes ortólogos en *C. glabrata*, *C. glabrata* ha modificado su capacidad metabólica en comparación con *S. cerevisiae*, posiblemente como resultado de su íntima asociación con su hospedero mamífero. Por ejemplo, *C. glabrata* ha perdido los genes implicados en la asimilación de algunos carbohidratos como la galactosa y la sacarosa, así como varios genes del metabolismo de nitrógeno, azufre, fosfato, y otros involucrados en la biosíntesis de las vitaminas como la tiamina, piridoxina y ácido nicotínico (KAUR *et al.* 2005).

1.3 Factores de virulencia de *C. glabrata*

Uno de los factores de virulencia que se han identificado en *C. glabrata* es la capacidad que presenta para adherirse con avidéz *in vitro* a las células epiteliales de mamíferos. Esta adherencia está mediada por proteínas de pared celular que están codificadas por una familia de más de 20 genes parálogos (genes *EPA*) en *C. glabrata*. La mayoría de estos genes se encuentran localizados en regiones subteloméricas donde están sujetos a silenciamiento transcripcional dependiente de la estructura de la cromatina (CASTANO *et al.* 2005; DE LAS PENAS 2003). Otra característica importante, es que presenta una alta capacidad para formar biopelículas en superficies de plástico, donde la adhesina Epa6p ha demostrado un papel fundamental (DOMERGUE *et al.* 2005).

Otros factores de virulencia conocidos en esta levadura, son la resistencia innata a los azoles, como el agente fungistático Fluconazol, utilizado como antimicrobiano en pacientes inmunocomprometidos; esta resistencia explica su elevada relevancia clínica (MANZANO-GAYOSSO *et al.* 2000; PFALLER and DIEKEMA 2007). La

supresión de ROS (especies reactivas de oxígeno, del inglés ROS, Reactive Oxygen Species) en el fagocito (WELLINGTON *et al.* 2009) y el aumento en la transcripción de la catalasa (*CTA1*), también le permite la adaptación a altas concentraciones en ensayos *in vitro* (KAUR *et al.* 2007) (KAUR *et al.* 2007).

1.4 El complejo Sir en el silenciamiento subtelomérico

Las proteínas del complejo Sir (Sir2, Sir3 y Sir4), tienen un papel crítico en el establecimiento y conservación de la cromatina silenciada (HECHT *et al.* 1995; HECHT *et al.* 1996; MOAZED *et al.* 1997; MORETTI *et al.* 1994; STRAHL-BOLSINGER *et al.* 1997). En *S. cerevisiae*, el silenciamiento ocurre en las regiones subteloméricas, en los *loci* de apareamiento y en el rDNA (repeticiones en tándem del DNA ribosomal). El silenciamiento subtelomérico comienza cuando la proteína Rap1 se une al telómero (estructura compuesta por repeticiones pequeñas de secuencia de DNA) sin nucleosomas. Rap1, Ku70 y Ku80 reclutan al complejo formado por Sir3 y Sir4 los cuales a su vez reclutan a Sir2 (una desacetilasa de histonas dependiente de NAD⁺). Las proteínas Sir se conocen como proteínas reguladoras de la información silenciosa (proteína SIR por sus siglas en inglés). Sir2 pertenece al grupo de las sirtuínas que son una familia de desacetilasas compuesto por Sir2, Hst1, Hst2, Hst3 y Hst4 (HST del inglés, **H**omologue of **S**ir **T**wo) por sus siglas en inglés) y están conservadas desde bacterias hasta humanos (COSGROVE *et al.* 2006; DENU 2005; KRUSZEWSKI and SZUMIEL 2005; PORCU and CHIARUGI 2005; TERVO *et al.* 2004). Para el silenciamiento Sir2 retira los grupos acetilo no cargados de las lisinas de las histonas H3 y H4 dejando expuesto el grupo amino que está cargado positivamente. Esto permite que las proteínas cargadas positivamente se unan al DNA cargado negativamente dando como resultado una cromatina más condensada que no permite la transcripción (cromatina silenciosa) ni la recombinación. Sir2 se requiere para el silenciamiento subtelomérico, los *loci* de apareamiento y el rDNA, a diferencia de Sir3 y Sir4 que no participan en este último (STONE and PILLUS 1998).

En *C. glabrata*, el silenciamiento subtelomérico lo llevan a cabo las proteínas del complejo Sir (Sir2, Sir3 y Sir4), Rap1, Ku70, Ku80 y Rif1 (CASTANO *et al.* 2005; DE LAS PENAS 2003). Se tiene evidencia en *C. glabrata*, que la proteína Sir2 detecta los niveles de ácido nicotínico (precursor de NAD⁺) como señal extracelular. Al disminuir los niveles de ácido nicotínico, disminuyen también los niveles de NAD⁺ y Sir2 pierde su actividad. Esto permite la relajación de la cromatina y la transcripción de algunos genes *EPA* subteloméricos y otros involucrados en la resistencia al estrés oxidativo. En presencia de bajos niveles de ácido nicotínico, las células se vuelven hiperadherentes y resistentes a las especies reactivas de oxígeno (DOMERGUE *et al.* 2005).

1.5 Sir3 como blanco de señales externas

La fosforilación de las proteínas se estima que afecta al 30% del proteoma, y se ha considerado que es un importante mecanismo regulatorio que controla muchos procesos celulares básicos (COHEN 2000; FICARRO *et al.* 2002; MANNING *et al.* 2002). Para llevar a cabo la fosforilación se necesita que exista una interacción proteína – cinasa (BADER and HOGUE 2000; GAVIN *et al.* 2002; ITO *et al.* 2001; UETZ *et al.* 2000; XENARIOS *et al.* 2000).

Sir3 puede hiperfosforilarse bajo diversas condiciones incluyendo la escasez de nutrientes, el tratamiento con feromonas y por el estrés por calor (STONE and PILLUS 1996). Además se fosforila durante el crecimiento y en presencia de Rapamicina (un fármaco inmunosupresor y anticancerígeno) y de Clorpromazina (neuroléptico antipsicótico perteneciente a la familia de las fenotiazinas).

La proteína TOR, blanco de la Rapamicina, es una proteína-cinasa altamente conservada en los eucariotas, y que controla el crecimiento y la proliferación celular (GINGRAS *et al.* 2001; ROHDE *et al.* 2001; SCHMELZLE and HALL 2000) así

como la síntesis de proteínas (DI COMO and ARNDT 1996), la biogénesis ribosomal (POWERS and WALTER 1999), y la expresión de genes (BERTRAM *et al.* 2000) en levaduras. En levaduras, TOR regula la fosforilación de Sir3 a través de la vía de las MAPcinasas (Mpk1). También se sabe, que en levaduras existen dos genes *TOR* (*TOR1* y *TOR2*) (CAFFERKEY *et al.* 1993; HELLIWELL *et al.* 1994) que son blancos específicos de la Rapamicina.

Sir3 fosforilado provoca una desrepresión de regiones subteloméricas que normalmente están silenciadas. Dentro de los genes que aumentan su expresión en estas regiones, se encuentra una familia de genes subteloméricos que codifican para manoproteínas de pared celular y que participan en el mantenimiento de ésta y en la integridad de la membrana plasmática (JELINSKY *et al.* 2000). De manera interesante, la fosforilación de Sir3 no afecta la expresión en el *locus HML* (del inglés Hidden Mat Left). Esto sugiere que la fosforilación de Sir3 tiene un efecto específico.

El uso de anticuerpos es muy útil para la detección y aislamiento de las proteínas *in vivo*, pero la generación de anticuerpos específicos contra alguna proteína de interés tiene una serie de desventajas como el tiempo en obtenerlos y su elevado costo, y una vez obtenidos, no garantiza su funcionalidad. Como alternativa, se pueden etiquetar a las proteínas de interés con epítopes que pueden ser detectados con anticuerpos monoclonales comercialmente disponibles (BRIZZARD 2008; JARVIK and TELMER 1998). En el presente trabajo, construimos una serie de vectores para realizar fusiones traduccionales con los epítopes de GFP (proteína verde fluorescente), HA (glicoproteína de superficie del virus de la influenza humana) y FLAG (epítope hidrofílico dependiente de enterocinasa) para etiquetar a Sir3 y Sir4 en *C. glabrata*. Estas fusiones nos permitirán determinar si estas proteínas son fosforiladas en respuesta a diferentes tipos de estrés (nutricional, oxidativo, o de pared celular).

Además, podremos realizar experimentos de tipo interacción proteína-proteína (IP), localización celular por microscopía de fluorescencia (GFP) y localización en regiones específicas del cromosoma (ChiPs).

Un punto importante en el desarrollo de estos vectores es que no son exclusivamente para el estudio de Sir3 y Sir4, sino que se pueden usar para etiquetar cualquier proteína de interés.

OBJETIVO GENERAL

Determinar si Sir3 y Sir4 son blancos de señales externas en presencia de diferentes tipos de estrés y evaluar la expresión de genes subtelo méricos sujetos a silenciamiento transcripcional en estas condiciones.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1) Construir los vectores para fusionar traduccionalmente los genes *SIR3* y *SIR4* con GFP, HA y Flag.
- 2) Introducir en el cromosoma de *C. glabrata* las fusiones de *SIR3::GFP*, *SIR3::HA*, *SIR3::FLAG*, *SIR4::GFP*, *SIR4::HA*, y *SIR4::FLAG*, a través de doble recombinación homóloga.
- 3) Verificar la funcionalidad de las proteínas etiquetadas.
- 4) Utilizar las proteínas etiquetadas funcionales en ensayos de inmunodetección.

2. MATERIAL Y MÉTODOS

2.1 Medios de cultivo

Para el aislamiento de plásmidos se usó la cepa de *E. coli* DH10B (Tabla 2). Para crecer las cepas de *E. coli*, se utilizó medio Luria-Bertani (LB). El medio contiene extracto de levadura 5 g/L, triptona 10 g/L y NaCl 5 g/L. En la mayoría de los casos se suplementó con carbenicilina (A.G. Scientific®) a una concentración final de 50 µg/mL (Lb-Cb50). Para medio LB sólido, con o sin carbenicilina, se añadió agar bacteriológico a una concentración final de 1.5% (p/v). Finalmente, para la recuperación de cepas bacterianas después de la electroporación, se utilizó medio SOC. Este medio contiene extracto de levadura 5 g/L, triptona 20 g/L, NaCl 10 mM, KCl 2,5 mM, MgSO₄ 10 mM, MgCl₂ 10 mM y glucosa a una concentración final de 0,4% (p/v).

Tabla 2. Cepa de *Escherichia coli*

Cepa	Genotipo	Uso	Referencia
DH10B	<i>F mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC)</i> <i>Φ80dlacZΔM15ΔlacX74 deoR</i> <i>recA1 endA1 araD139 Δ(ara,</i> <i>leu)7697 galU galK λ rpsL nupG</i>	Células electrocompetentes	(CALVIN and HANAWALT 1988)

Tabla 3. Cepas de *Candida glabrata*

Cepa	Parental	Genotipo	Comentario	Referencia
BG2	—	Aislado clínico (Cepa B)	—	(FIDEL <i>et al.</i> 1996)
BG14 wt	BG2	<i>ura3Δ::Tn903 G418^R</i>	Cepa Silvestre Ura ⁻ , Hyg ^S	(CORMACK and FALKOW 1999)
CGM73 <i>sir4Δ</i>	BG14	<i>ura3Δ::Tn903 G418^R</i> <i>(SIR4::hph)</i>	Silvestre <i>(SIR4::hph)</i> Ura ⁻ , Hyg ^R	Colección del laboratorio
CGM149	BG14	<i>ura3Δ::Tn903 G418^R</i>	<i>URA3</i> en la región intergénica entre	Colección del

		pAP553/ <i>Pst</i> I- <i>Eco</i> RI	<i>EPA3</i> y el telómero Ura ⁺ , Hyg ^R	laboratorio
CGM289	CGM149	<i>sir3Δ::hph</i> pIC120/ <i>Kpn</i> I- <i>Hpa</i> I + T4 DNA polimerasa	<i>URA3</i> en la región intergénica entre <i>EPA3</i> y el telómero Ura ⁺ , Hyg ^R	Colección del laboratorio
CGM312 <i>sir3Δ</i>	BG14	<i>ura3Δ::Tn903</i> G418 ^R pIC120/ <i>Kpn</i> I- <i>Hpa</i> I + T4 DNA polimerasa (<i>SIR3::hph</i>)	Silvestre (<i>SIR3::hph</i>) Ura ⁻ , Hyg ^R	Colección del laboratorio
CGM340	CGM149	<i>sir4Δ::hph</i> (pAP598/ <i>Bsg</i> I)	<i>URA3</i> en la región intergénica entre <i>EPA3</i> y el telómero Ura ⁺ , Hyg ^R	Colección del laboratorio
CGM862 <i>SIR3::GFP</i>	BG14	<i>ura3Δ::Tn903</i> G418 ^R pJV3/ <i>Bsg</i> I- <i>Bsg</i> I (<i>SIR3::GFP::hph</i>)	Silvestre (<i>SIR3::GFP::hph</i>) Ura ⁻ , Hyg ^R	Este trabajo
CGM919 <i>SIR4::GFP</i>	BG14	<i>ura3Δ::Tn903</i> G418 ^R pJV11/ <i>Bgl</i> II- <i>Bcg</i> I (<i>SIR4::GFP::hph</i>)	Silvestre (<i>SIR3::GFP::hph</i>) Ura ⁻ , Hyg ^R	Este trabajo
CGM921 <i>SIR4::FLAG</i>	BG14	<i>ura3Δ::Tn903</i> G418 ^R pJV13/ <i>Bgl</i> II- <i>Bcg</i> I (<i>SIR4::FLAG::hph</i>)	Silvestre (<i>SIR4::FLAG::hph</i>) Ura ⁻ , Hyg ^R	Este trabajo
CGM923 <i>SIR4::HA</i>	BG14	<i>ura3Δ::Tn903</i> G418 ^R pJV15/ <i>Bgl</i> II- <i>Bcg</i> I (<i>SIR4::HA::hph</i>)	Silvestre (<i>SIR4::HA::hph</i>) Ura ⁻ , Hyg ^R	Este trabajo
CGM957 <i>SIR3::FLAG</i>	BG14	<i>ura3Δ::Tn903</i> G418 ^R pJV22/ <i>Bsr</i> GI- <i>Hpa</i> I (<i>SIR3::FLAG::hph</i>)	Silvestre (<i>SIR3::FLAG::hph</i>) Ura ⁻ , Hyg ^R	Este trabajo
CGM959 <i>SIR3::HA</i>	BG14	<i>ura3Δ::Tn903</i> G418 ^R pJV20/ <i>Bsr</i> GI- <i>Hpa</i> I (<i>SIR3::HA::hph</i>)	Silvestre (<i>SIR3::HA::hph</i>) Ura ⁻ , Hyg ^R	Este trabajo
CGM1103 <i>SIR3::GFP</i>	BG14	<i>ura3Δ::Tn903</i> G418 ^R pJV3/ <i>Bsg</i> I- <i>Bsg</i> I Transformada con pMZ18 (<i>SIR3::GFP</i>)	Silvestre (<i>SIR3::GFP</i>) Ura ⁻ , Hyg ^S	Este trabajo
CGM1105 <i>SIR3::HA</i>	BG14	<i>ura3Δ::Tn903</i> G418 ^R pJV20/ <i>Bsr</i> GI- <i>Hpa</i> I Transformada con pMZ18	Silvestre (<i>SIR3::HA</i>) Ura ⁻ , Hyg ^S	Este trabajo

(SIR3::HA)				
CGM1107 SIR3::FLAG	BG14	<i>ura3Δ::Tn903</i> G418 ^R pJV22/ <i>BsrGI-HpaI</i> Transformada con pMZ18 (SIR3::FLAG)	Silvestre (SIR3::FLAG) Ura ⁻ , Hyg ^S	Este trabajo
CGM1109 SIR4::GFP	BG14	<i>ura3Δ::Tn903</i> G418 ^R pJV11/ <i>BglIII-BcgI</i> Transformada con pMZ18 (SIR4::GFP)	Silvestre (SIR3::GFP) Ura ⁻ , Hyg ^S	Este trabajo
CGM1111 SIR4::HA	BG14	<i>ura3Δ::Tn903</i> G418 ^R pJV15/ <i>BglIII-BcgI</i> Transformada con pMZ18 (SIR4::HA)	Silvestre (SIR4::HA) Ura ⁻ , Hyg ^S	Este trabajo
CGM1113 SIR4::FLAG	BG14	<i>ura3Δ::Tn903</i> G418 ^R pJV13/ <i>BglIII-BcgI</i> Transformada con pMZ18 (SIR4::FLAG)	Silvestre (SIR4::FLAG::hph) Ura ⁻ , Hyg ^S	Este trabajo

2.3 Plásmidos

Los plásmidos utilizados en este estudio se describen en la Tabla 4, los cuales se introdujeron por electroporación a la cepa de *E. coli* DH10B. Todas las cepas que contienen a estos plásmidos se encuentran resguardadas por duplicado en medio LB con glicerol al 10% a -80°C.

Tabla 4. Plásmidos		
VECTORES DE CLONACIÓN		
Plásmido	Descripción y/o genotipo relevante	Referencia
pGEM [®] -T	Vector de clonación. Amp ^R	Promega [®] No. Cat.: A3600
pOZ16	Vector para crear fusiones traduccionales con <i>GFP</i> . Fragmento <i>Bam</i> HI/ <i>Bgl</i> III de 725 pb (<i>GFP</i>) derivado de pAP742, clonado en pOZ14 digerido con <i>Bam</i> HI. Se seleccionó la orientación con el ORF de <i>GFP</i> en dirección 5'→3'.	Colección del laboratorio

	[<i>GFP::(FRT-3'UTR_{CTAI})P_{PGK}::hph::(3'UTR_{HIS3})-FRT</i>] <i>URA3 Hyg^R Amp^R</i>	
pGE33	Vector para crear fusiones traduccionales con <i>HA</i> . Fragmento <i>Bam</i> HI/ <i>Bgl</i> III de 110 pb (<i>HA</i>) clonado en pOZ14 digerido con <i>Bam</i> HI. Orientación verificada por secuenciación [<i>HA::(FRT-3'UTR_{CTAI})P_{PGK}::hph::(3'UTR_{HIS3})-FRT</i>] <i>URA3 Hyg^R Amp^R</i>	Colección del laboratorio
pGE36	Vector para crear fusiones traduccionales con <i>FLAG</i> . Fragmento <i>Bam</i> HI/ <i>Bgl</i> III de 100 pb (<i>FLAG</i>) clonado en pOZ14 digerido con <i>Bam</i> HI. Orientación verificada por secuenciación [<i>FLAG::(FRT-3'UTR_{CTAI})P_{PGK}::hph::(3'UTR_{HIS3})-FRT</i>] <i>URA3 Hyg^R Amp^R</i>	Colección del laboratorio
VECTORES REPLICATIVOS		
Plásmido	Descripción y/o genotipo relevante	Referencia
pMZ18	Vector replicativo que expresa la recombinasa (<i>ScFlp1p</i>) para la remoción del casete de resistencia a higromicina; [<i>P_{EPAl}::FLP1::(3'UTR_{HIS3}) URA3 Amp^R</i>].	Colección del laboratorio B. Cormack
VECTORES INTERMEDIARIOS		
Plásmido	Descripción y/o genotipo relevante	Referencia
pAP724	Producto de PCR (oligos #397 y #398) de 1300 pb del 3' del ORF <i>SIR3</i> sin codón de paro, clonado en pGEM [®] -T. <i>Amp^R</i> .	Colección del laboratorio
pAP726	Producto de PCR (oligos #395 y #396) de 998 pb del 3' del UTR <i>SIR3</i> , clonado en pGEM [®] -T. <i>Amp^R</i> .	Colección del laboratorio
pAP732	Producto de PCR (oligos #401 y #402) de 1318 pb del 3' del ORF de <i>SIR4</i> sin codón de paro, clonado en pGEM [®] -T. <i>Amp^R</i> .	Colección del laboratorio
pAP734	Producto de PCR (oligos #399 y #400) de 978 pb de la región 3' UTR de <i>SIR4</i> , clonado en pGEM [®] -T. <i>Amp^R</i> .	Colección del laboratorio
pJV1	Fragmento <i>SpeI/Bgl</i> III de 1300 pb (3' ORF de <i>SIR3</i>) derivado del pAP724, clonado en pOZ16 digerido con <i>SpeI/Bam</i> HI. <i>URA3 Amp^R</i>	Este trabajo
pJV3	Fragmento <i>KpnI/Hind</i> III de 998 pb (3' UTR de <i>SIR3</i>) derivado del pAP726, clonado en pJV1, digerido con <i>KpnI/Hind</i> III. <i>URA3 Amp^R</i>	Este trabajo
pJV5	Fragmento <i>KpnI/Hind</i> III de 978 pb (3' UTR de <i>SIR4</i>) derivado del pAP734, clonado en pOZ16, digerido con <i>KpnI/Hind</i> III. <i>URA3 Amp^R</i>	Este trabajo
pJV7	Fragmento <i>KpnI/Hind</i> III de 978 pb (3' UTR de <i>SIR4</i>) derivado del pAP734, clonado en pGE36, digerido con <i>KpnI/Hind</i> III. <i>URA3 Amp^R</i>	Este trabajo
pJV9	Fragmento <i>KpnI/Hind</i> III de 978 pb (3' UTR de <i>SIR4</i>) derivado del pAP734, clonado en pGE33, digerido con <i>KpnI/Hind</i> III. <i>URA3 Amp^R</i>	Este trabajo

pJV10	Fragmento <i>SpeI/BamHI</i> de 1318 pb (3' ORF de <i>SIR4</i>) derivado del pAP732, clonado en pJV5, digerido con <i>SpeI/BamHI</i> . <i>URA3 Amp^R</i>	Este trabajo
pJV12	Fragmento <i>SpeI/BamHI</i> de 1318 pb (3' ORF de <i>SIR4</i>) derivado del pAP732, clonado en pJV7, digerido con <i>SpeI/BamHI</i> . <i>URA3 Amp^R</i>	Este trabajo
pJV14	Fragmento <i>SpeI/BamHI</i> de 1318 pb (3' ORF de <i>SIR4</i>) derivado del pAP732, clonado en pJV9, digerido con <i>SpeI/BamHI</i> . <i>URA3 Amp^R</i>	Este trabajo
pJV16	Fragmento <i>KpnI/HindIII</i> de 998 pb (3' UTR de <i>SIR3</i>) derivado del pAP726, clonado en pGE33, digerido con <i>KpnI/HindIII</i> . <i>URA3 Amp^R</i>	Este trabajo
pJV18	Fragmento <i>KpnI/HindIII</i> de 998 pb (3' UTR de <i>SIR3</i>) derivado del pAP726, clonado en pGE36, digerido con <i>KpnI/HindIII</i> . <i>URA3 Amp^R</i>	Este trabajo
pJV20	Fragmento <i>SpeI/BglII</i> de 1300 pb (3' ORF de <i>SIR3</i>) derivado del pAP724, clonado en pJV16, digerido con <i>SpeI/BamHI</i> . <i>URA3 Amp^R</i>	Este trabajo
pJV22	Fragmento <i>SpeI/BglII</i> de 1300 pb (3' ORF de <i>SIR3</i>) derivado del pAP724, clonado en pJV18, digerido con <i>SpeI/BamHI</i> . <i>URA3 Amp^R</i>	Este trabajo

2.4 Oligonucleótidos

Los oligonucleótidos (Elim Biopharmaceuticals, Inc.) utilizados para la construcción de plásmidos y el diagnóstico de mutaciones o inserciones por la técnica de PCR se describen en la Tabla 5. Todos se utilizan a una concentración final de 250-300 nM en las reacciones de PCR.

Tabla 5. Oligonucleótidos[†]			
No.	Nombre	Secuencia 5'→3'	Sitios
15	P-PGK Rv out	CGATAAGAGGCCACGTGCTTTATG	—
16	3'UTR <i>HIS3</i> Fw out	AGAAATACGCACGAACACGATATAGAGG	—
55	<i>SIR3</i>@+968 Rev	AGGCAGCTCGCCAGAATCCCATTC	—
368	<i>SIR3B</i>@1270pb <i>Sac I</i> Fw <i>HIS</i>	CGCGAGCTCGAAGGAGATATAAAATGGG CAGGACCAATCAGAAA	<u><i>Sac I</i></u>
372	<i>SIR4B</i>@2121bp <i>BamH I</i> Fw <i>HIS</i>	GCGGGATCCGAAGGAGATATAAAATGAG TAAGAGACCTCTTCCAGAGAGTG	<u><i>BamH I</i></u>
397	<i>SIR3</i>@1889bp <i>Spe I</i> Fw	ACC <u>ACTAGT</u> GGAATCCCTAATTCAATG	<u><i>Spe I</i></u>

399	SIR4@+1bp Hind III	GCG <u>AAGCTT</u> TATTCTAACTTAATATATAT GCCCTATAATCAAAT	<u>Hind</u> <u>III</u>
400	SIR4@+977 Kpn I Rv	GCG <u>GGTACC</u> GAATACAACCAACTCAAAC AAGTACC	<u>Kpn I</u>
401	SIR4@3037pb Bgl II Fw	GCGACTAGTAGT <u>AGATCT</u> TCAATATTAGA AATAATTAAGAAGG	<u>Bgl II</u>
402	SIR4@4339bp BamH I Rv	GCG <u>GGATCC</u> TATCTTCGTTAGATTCTTTT GC	<u>BamH</u> <u>I</u>
409	GFP@715bp Bgl II Rv	CGC <u>AGATCT</u> TTATTTGTACAATTCATCCAT ACC	<u>Bgl II</u>
410	GFP@1bp BamH I Fw	GCG <u>GGATCC</u> TAATGTCTAAAGGTGAAGA ATTATTC	<u>BamH</u> <u>I</u>
701	SIR4@+2005bp Rv	TGAGGGTGTGTTAGATGAGC	—

[†]El nombre del oligonucleótido indica el nombre del gen, en dónde hibrida con respecto al gen y los sitios de restricción que posee. Números sin signo son coordenadas dentro del ORF, mientras que negativos y positivos indican que la hibridación es al extremo 5' o 3' fuera del gen, respectivamente. Fw denota orientación en sentido y Rv la antisentido. El sitio de restricción se muestra en negritas y subrayado.

2.5 Transformación de *C. glabrata*

Para transformar a *C. glabrata* con DNA lineal o superenrollado se utilizó una modificación del método de transformación con acetato de litio (LiAcO) (GIETZ *et al.* 1992). Cada cepa a transformar se creció en medio YPD durante la noche. Al día siguiente se transfirieron 0,3 mL de este inóculo a 30 mL de YPD fresco (dilución 1:100) y se incubó con agitación hasta alcanzar una OD_{600nm} de 0,8-1,0. Las células se colectaron por centrifugación y se lavaron con un volumen equivalente de agua estéril. Posteriormente, se concentraron 100 veces en LiAcO 100 mM y se dividieron en alícuotas de 50 µL c/u. Para cada transformación, a una alícuota de células se le añadieron 240 µL de polietilenglicol 50% Fluka Biochemica® (PM 400) (concentración final ~30%), 36 µL de LiAcO 1M (concentración final ~90 mM), 25 µL de DNA acarreador de cadena sencilla (Invitrogen® 2 mg/mL) desnaturalizado por calor (concentración final ~125 ng/µL) y el DNA a transformar, resuspendido en un volumen de 50 µL de Tris 10 mM. La mezcla se incubó a 30°C por 45 min. con agitación circular, después se le agregaron 43 µL de DMSO (Sigma®) y se sometió a choque térmico por 15 min. a 42°C. Por último, las células se centrifugaron para retirar el PEG y dependiendo

del tipo de selección a realizar, se resuspendieron en agua o en medio YPD. Para la selección de transformantes que complementen la auxotrofia por uracilo, las células se resuspendieron en 600 μL de agua y se sembraron en dos cajas con medio CAA; una con 50 μL de la suspensión y otra con 100 μL . Para la selección con higromicina se resuspendieron en 1 mL de YPD y se incubaron al menos 4 h a 30°C. Al término de este periodo, se sembraron 200, 300 y 400 μL en cajas con medio YPD-Hyg. Todas las cajas se incubaron a 30°C, al menos durante 48 horas.

Se eligieron en promedio 8 colonias de cada transformante y se purificaron dos veces en medio de selección (CAA o YPD-Hyg). Se estriaron en medio YPG para analizar su capacidad de utilizar glicerol como fuente de carbono no fermentable y de este modo descartar si tienen mutaciones que alteraran su función mitocondrial (*petit*). Posteriormente, se extrajo DNA genómico y se diagnosticó por PCR la modificación genética correspondiente.

2.6 Manipulación del DNA

Para aislar el DNA plasmídico de cultivos bacterianos se usó el kit *QIAprep*. La extracción de DNA de geles de agarosa se realizó con el kit *Gel Extraction QIAquick* y el *PCR Purification QIAquick* para la purificación de productos de PCR. Todos ellos de la marca comercial QIAGEN®.

2.7 Transformación de *Escherichia coli*

2.7.1 Electroporación

Se utilizaron cepas electrocompetentes DH10B (Tabla 1). La mezcla de una alícuota de células electrocompetentes con ~20-50 ng del DNA a transformar se transfirió a una celda de electroporación de 1 mm (BIORAD®). Con un electroporador [Gene Pulser Xcell Electroporation System (BIORAD®)], se le aplicó

un pulso eléctrico (1800V, 200mA, 50F) e inmediatamente después las células se resuspendieron en 600 µL de medio SOC frío y se incubó la transformación en hielo por 3 min. Se incubó después con agitación a 30°C por una hora. Al término de la recuperación se sembraron alícuotas en cajas de LB-Cb50 y se incubaron 12-24 h a 30°C.

Tras la obtención de las transformantes, se identificaron las clonas positivas mediante PCR de colonia. De las clonas positivas se resguardaron dos colonias independientes en glicerol al 10% a -80°C. Después se extrajeron los plásmidos mediante el kit comercial *QIAprep* y se analizó su patrón de restricción con las endonucleasas correspondientes para confirmar la presencia del inserto. Todas las enzimas de restricción utilizadas en este trabajo fueron de New England BioLaboratories®.

2.8 Extracción de DNA genómico de *C. glabrata*

Las cepas de interés se cultivaron por 36 h en YPD. Las células se colectaron por centrifugación y se resuspendieron en 500 µL de amortiguador A [Tris 0,05 M, EDTA 0,01 M, NaCl 0,15 M, Triton 1% (Caledon Labs.®) y SDS 1% (Fluka Biochemicals®)]. Se añadió un volumen equivalente de fenol:cloroformo:alcohol isoamílico de Fluka Biochemicals® [24:24:1] y se incubó a 44°C por 30 min, con agitación ocasional y vigorosa. Se recuperó la fase acuosa por centrifugación, se agregaron 50 µL del amortiguador A sin detergente con 3 IU de RNasa (AMBION®), y se incubó por 30 min. a 44°C. Para precipitar el DNA se añadieron 15 µL de NaCl 5 M y un volumen de etanol frío al 100%. El DNA se lavó con etanol al 70% y una vez seco se resuspendió en 250 µL de Tris 10 mM con 3 IU de RNasa.

2.9 Concentración y purificación de DNA con Fenol:Cloroformo:Alcohol Isoamílico

Para concentrar el DNA y eliminar proteínas y sales se llevó la muestra a un volumen final de 100 μL con agua grado biología molecular y se le añadió acetato de amonio a una concentración final de 2,5 M. Se agregó un volumen equivalente de Fenol:Cloroformo:Alcohol Isoamílico (24:24:1) y se agitó vigorosamente. Por centrifugación se separó la fase acuosa y se transfirió a un tubo limpio en donde se le adicionó 1 μL de glicógeno (20 mg/mL) (Roche[®], Alemania). Inmediatamente después se agregaron 2,5 volúmenes de etanol frío al 100% y se precipitó el DNA a -20°C por 20 minutos. Se concentró el DNA por centrifugación, se descartó el sobrenadante y se lavó la pastilla con etanol al 70%. Se decantó el etanol y se secó la pastilla. Una vez seco se resuspendió en 20 μL de Tris 10 mM.

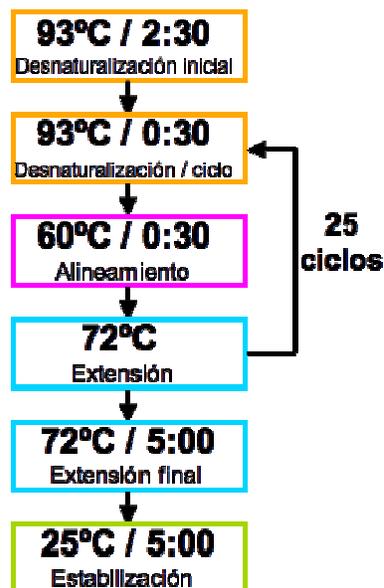
2.10 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Para las reacciones de diagnóstico de productos de hasta 3 Kb, se usó DNA genómico o de una colonia bacteriana. Se utilizó la Amplificasa (Facultad de Veterinaria UNAM). Las condiciones de reacción se esquematizan en la tabla 6, así como el algoritmo del programa de PCR. Cabe mencionar que para esta reacción se utiliza su propio amortiguador (10X) y se usa 1U en 20 μL de reacción.

Tabla 6. Componentes de la mezcla en la reacción de PCR con la enzima Amplificasa	
Componente	Concentración final
Amortiguador 10X	1X
dNTPs 2 mM	20 μM c/u
Oligo Fw 5 μM	0,25 μM
Oligo Rv 5 μM	0,25 μM
DNA molde	El necesario (\leq 500 ng)

Taq polimerasa (Amplificasa)	1 U
H2O mQ estéril	c.b.p. 20 µL

Algoritmo de PCR



La temperatura de alineamiento se determinó según las parejas de oligonucleótidos a utilizar, que generalmente fueron de 60°C. El tiempo de extensión depende de la longitud del fragmento, y el cálculo se hizo considerando que la enzima polimeriza aproximadamente 1 Kb/min.

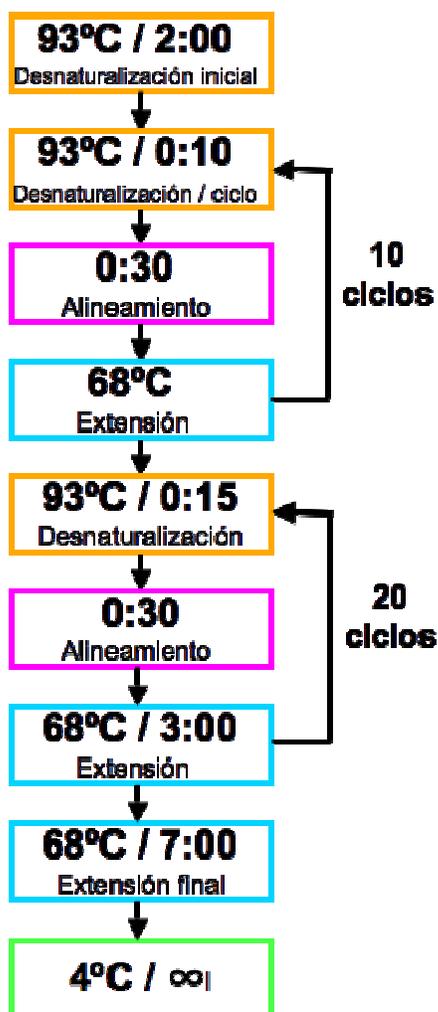
Para la amplificación de fragmentos mayores a 4 Kb, se utilizó la mezcla de DNA polimerasa Expand Long Template (Roche®). La tabla 7 indica las condiciones utilizadas en la reacción de PCR con esta enzima.

Tabla 7. Componentes de la mezcla en la reacción de PCR con la enzima DNA polimerasa Expand Long Template®

Componente	Concentración final
Amortiguador 10X con MgCl ₂ # 1	1 X (1,75 – 2,75 mM MgCl ₂)
dNTPs 2 mM	350 µM c/u

Oligo Fw 5 μ M	0,3 μ M
Oligo Rv 5 μ M	0,3 μ M
DNA molde	El necesario (\leq 500 ng)
Mezcla Expand Long Template [®]	0,75 U
H2O mQ estéril	c.b.p. 30 μ M

Algoritmo de PCR



La temperatura de extensión depende de la longitud del fragmento, teniendo en cuenta que la enzima polimeriza 1,5 Kb/min. La amplificación de los productos de PCR se detectó por electroforesis en geles de agarosa 0,8% teñidos con bromuro de etidio.

2.11 Cuantificación de DNA

Para cuantificar DNA en cantidades pequeñas se utilizó un método espectrofotométrico. Brevemente, en el espectrofotómetro UV-1700 PharmaSpec (SHIMADZU®) se colocó la celda de cuarzo TRAY CELL (HELLMA®) con 5 µL de Tris-HCl 10 mM para calibrar a cero de absorbancia a la longitud de onda de 260 nm. Posteriormente se limpió la celda con etanol al 100% y una vez seca, se añadieron 5 µL de la muestra de DNA. A partir de la lectura emitida a esa longitud de onda se calculó la concentración de la muestra con base en la siguiente fórmula:

$$[DNA]_{\left(\frac{ng}{\mu L}\right)} = f_{dsDNA} \times f_{cell} \times A_{\lambda 260nm}$$

Donde la concentración de la muestra está dada en ng/µL y es directamente proporcional al producto del factor de la celda (f_{cell}) con valor de 10, por el factor numérico del DNA de doble cadena (f_{dsDNA}) que es 50, y por la absorbancia de la muestra a 260 nm de longitud de onda ($A_{\lambda 260nm}$).

2.12 Extracción de proteínas de *C. glabrata*

Para la extracción de proteínas en *Candida glabrata*, primeramente se deja un preinóculo tomado de un glicerol resguardado a -80°C, durante toda la noche. Transcurridas unas 12 horas, se mide la densidad óptica del mismo mediante una dilución 1:100 en medio YPD. Con base al resultado obtenido, se calcula el

volumen del preinóculo necesario para obtener una suspensión de $OD_{600nm} = 0,5$. A partir de esta suspensión obtenida, se calcula el volumen necesario para obtener un cultivo de 50 mL de medio YPD con una $OD_{600 nm} = 1$; este cálculo se realiza con la siguiente fórmula:

$$A_{t=0} = \frac{A_{t=x}}{e^{m \cdot tx}}$$

Donde $A_{t=0}$ es el valor de la absorbancia al tiempo inicial de la inoculación; $A_{t=x}$ el valor de la absorbancia de 1; m , es el valor de la pendiente de la cepa silvestre BG14, considerando que tiene un valor de alrededor de 0,5945; y t_x , es el tiempo en el cual queremos que esté nuestra cepa en la $OD_{600nm} = 1$.

Ya obtenido el cultivo, se centrifuga en tubos cónicos de 50 mL a 3500 rpm durante 3 minutos a 4°C, descartando el sobrenadante (Cabe mencionar que a partir de este punto, el resto del procedimiento se hace en hielo). Se lava la pastilla en 500 μ L de Amortiguador Salino de Fosfatos (PBS pH=7,4) [NaCl 1,37 M, KCl 26,8 mM (Fisher BioReagents®), Na_2HPO_4 43 mM (Fisher BioReagents®) y KH_2PO_4 14 mM (Fisher BioReagents®)]. Se le adiciona además inhibidores de proteasas [C.b.p. volumen deseado, 1 tab/100 mL (Sigma Fast®)], ditiotritol 2 mM (PlusOne DTT, Amersham Biosciences®) y β -mercaptoetanol 7 mM (Fisher Scientific®).

Se transfiere el contenido a un tubo de microcentrífuga de 2 mL y se le añaden 300 μ L de perlas de zirconio [0,5 mm Zircornial Silica Beads (BioSpec Products Inc.®)]. Se agita la pastilla en vórtex por un minuto y después se coloca otro minuto en hielo. Este procedimiento se repite 20 veces. Se transfiere todo el sobrenadante a un tubo limpio de 1,5 mL (tener cuidado de no tomar las perlas de zirconio) y se centrifuga a 3 500 rpm durante 20 segundos a 4°C. Se vuelve a transferir el sobrenadante a otro tubo de 1,5 mL y se repite la centrifugación ahora a 15 000 rpm durante 30 minutos a 4°C. El nuevo sobrenadante se transfiere

ahora a otro tubo de microcentrifuga limpio de 1,5 mL. El extracto de proteínas solubles se cuantifica por el método de Bradford (Bradford *et al.*, 1976). Posteriormente, se dividió el extracto en varias alícuotas de 30 – 50 μ L en tubos para PCR, para luego rotularlos y resguardarlos a -80°C . La fracción insoluble que queda en el tubo, se lava con 400 μ L del Amortiguador Salino de Fosfatos, y se centrifuga a 15 000 rpm durante 15 minutos a 4°C . Finalmente se resuspende en 500 – 1000 μ L de Buffer de carga SDS 2X [Tris-HCl 125 mM pH=6,8 (IBI Scientific[®]), SDS 4% (Ultra Invitrogen[®]), glicerol 20%, β -mercaptoetanol 0,2% (Fisher Scientific[®]), azul de bromofenol 0,001% (Fisher Biotech[®]), agua destilada c.b.p. 100 mL]. Tanto la fracción soluble como la insoluble se analizaron en geles de poliacrilamida al 12% SDS-Page.

De las concentraciones calculadas en cada uno de los extractos primeramente se realizó un tamiz de concentración de proteína para evaluar la cantidad a cargar en los geles de poliacrilamida utilizando inicialmente las concentraciones de 1, 10, 25, 50 y 100 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$. Por la calidad visual de los geles se optó cargar 50 μg de proteína / μL .

2.13 Cuantificación de proteínas de *C. glabrata*

El ensayo de cuantificación de proteínas se realizó con el método de Bradford (Bradford *et al.*, 1976) en placas de plástico de 96 pozos. El reactivo de Bradford (Fermentas[®]) se equilibra primero a temperatura ambiente y se mezcla por inversión antes de usarse. Se preparan estándares frescos de BSA (Sigma Aldrich[®]) como se muestra en la tabla 8 y se colocan 5 μL en cada uno de los pozos individuales por duplicado.

Tabla 8. Estándares para cuantificación de proteínas en <i>C. glabrata</i>		
Estándar [BSA] (ng/μL)	Volumen del stock BSA (2000 ng/μL)	Volumen de amortiguador para obtener 200 μL
100	10	190
200	20	180
400	40	160
600	60	140
800	80	120
1000	100	100

A cada uno de los pozos se le añadieron 250 μL del reactivo y se mezclaron por pipeteo. Se cargó generalmente 1 μL de la muestra a cuantificar con 250 μL del reactivo. Cuando la cantidad de proteína era excesiva, se hizo una dilución 1:50 ó 1:100, y se cargaban 5 μL de la muestra. Luego, se dejaban incubando a temperatura ambiente durante 5 minutos, y no más de 60. Posteriormente, se ajustó el lector de microplacas [Microplate Manager III Benchmark Plus (BioRad®)] a 595 nm, utilizando blancos [120 μL del reactivo de Bradford + 5 μL de PBS pH=7,4 (Amortiguador Salino de Fosfatos)] y se miden las concentraciones tanto de las muestras como de los estándares. El programa del lector grafica la concentración de las proteínas en función de la absorbancia de los estándares, en unidades de ng/μL.

Finalmente, se determina la concentración de proteína en las muestras por interpolación en la gráfica obtenida del programa. Si se hizo una dilución, se toma en cuenta el factor que se utilizó para obtener la concentración de proteína.

2.14 Ensayos de Western Blot

Para realizar la separación de proteínas por peso molecular en geles de SDS (SDS-PAGE), se tomaron las alícuotas correspondientes resguardadas a -80°C y se sometieron a tratamiento con calor en el termociclador (100°C , 10 min.). Con base a la cantidad de proteína obtenida, para cada uno de los extractos en la curva estándar de BSA, se tomaron $50\ \mu\text{g}$ de proteína/ μL para cada pozo en el gel. Posteriormente, se tomó un volumen equivalente de Buffer de carga 2X para la muestra [TRIS-HCl 125 mM pH=6,8 (IBI Scientific[®]), glicerol 20%, SDS 4% (Ultra invitrogen[®]), β -mercaptoetanol 0,2% (Fisher Scientific[®]), azul de bromofenol 0,001% (Fisher Biotech[®]) y agua mQ c.b.p. 100 mL]

Se cargaron $50\ \mu\text{g}$ de proteína/ μL en cada uno de los pozos del gel desnaturizante de acrilamida al 6% [Acrilamida 30%, N'-N'-Bismetilen-acrilamida 0,8% (IBI Shelton Scientific Inc.[®]), Tris-HCl (IBI Scientific[®]) / SDS (Ultra invitrogen[®]) 4X pH=8,8, Persulfato de amonio 10% (p/v) (USB[®]), TEMED (Invitrogen[®]) y agua miliQ] y se corrió en una cámara de electroforesis (BioRad[®]) a 10 mA para gel concentrador, aumentando a 20 mA en el gel separador durante 2.5 horas aproximadamente, para una óptima separación de las proteínas. Así mismo se utilizaron marcadores de peso molecular de proteínas en estos geles desnaturizantes (Page Ruler Plus, Fermentas[®]) para la estimación del tamaño molecular de las proteínas.

Al término de la electroforesis, el gel se equilibra con Buffer de Transferencia [TB, Tris-HCl 25 mM (IBI Scientific[®]) glicina 192 mM (BioRad[®]), metanol 20% (Fermont[®]), SDS 0,02% (Ultra Invitrogen[®]), agua destilada c.b.p. 1 L] y se agita moderadamente por 5 minutos. Se lava una vez más con TB por 10 minutos. La membrana de PVDF (PoliVinilDenediFloride, Sequi-blot PVDF 0,2 μm , BioRad[®]) se equilibra con metanol al 100% por aproximadamente 10 segundos y después se equilibra en Buffer TB. El resto de los componentes para la transferencia (dos fibras y dos trozos de papel filtro) también se humedecen con

este mismo Buffer. En un recipiente de dimensiones adecuadas, se vierte el Buffer TB y se ensamblan todos los componentes para efectuar la transferencia (Figura 2). Cabe mencionar que es importante que todos estos componentes permanezcan húmedos, en especial la membrana de PVDF y que no existan burbujas entre las membranas y el gel de acrilamida, por lo que se puede utilizar un asa de vidrio para presionar suavemente la membrana contra el gel, partiendo del centro hacia la periferia de ambas capas.

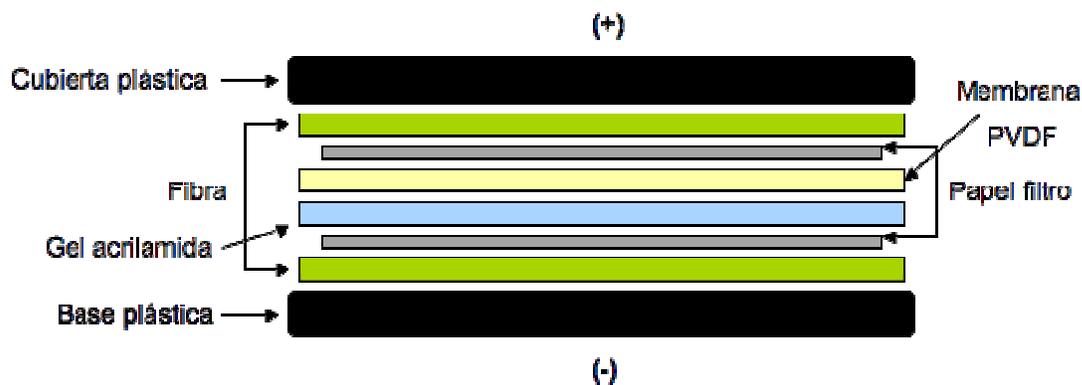


Figura 2. Esquema de los componentes de transferencia. Se tiene especial cuidado que al momento de armarlos se encuentren húmedos con el Buffer de Transferencia (TB), y que no existan burbujas entre las membranas y el gel, ya que podría intervenir con la transferencia de las proteínas.

Ya armados todos los componentes, se colocan en la cámara de electroforesis, junto con un recipiente refrigerante (lleno de hielo) y un agitador magnético. Se procede a iniciar la transferencia durante toda la noche a 30 V y 90 mA a 4°C.

Al término de la transferencia se retira la membrana y se marca con un lápiz de grafito la superficie que contiene a las proteínas. Inmediatamente después, se realizan tres lavados consecutivos con Buffer Tris-Salino-Tween (TTBS 1X) [Tris-HCl 20 mM (IBI Scientific®), NaCl 0,5 M, Tween 0,05% (USB®), Leche en polvo 0,1% (Svelty Nestle®) y Agua c.b.p. 400 mL] con duración de 5 minutos cada uno. Posteriormente, se incuba con la solución bloqueadora (TBS 1X-leche 3%) [Tris-

HCl 20 mM (IBI Scientific[®]), NaCl 0,5 M, Leche en polvo 3% (Svelty Nestle[®]) Tween 0,2% (USB[®]) y Agua c.b.p. 25 mL] con agitación moderada y constante durante 1,5 h a temperatura ambiente. Luego, se lava la membrana con Buffer Tris-Salino-Tween-leche 0,1% (TTBS 1X-leche 0,1%) tres veces por 10 minutos cada lavado.

Para la incubación con el anticuerpo primario, se usaron anticuerpos monoclonales dirigidos al epítipo con el cual se etiquetaron a las proteínas Sir3 y Sir4. Se utilizaron los anticuerpos anti-GFP [Monoclonal Antibody Anti-Green Fluorescent Protein (GFP), N-terminal, mouse IgG₁ isotype, Sigma[®]] en una concentración de 2 µg/mL; Anti-HA [Monoclonal Antibody Anti-Human influenza hemagglutinin (HA), IgG₃ isotype Millipore[®]] en una concentración de 0,25 µg/mL y anti-FLAG [Monoclonal Antibody Anti-FLAG M2, mouse IgG₁ isotype, Sigma[®]] se utilizó a 2,5 µg/mL. El anticuerpo se resuspende en TTBS 1X-Tween 0,2%-Leche 1%, y la membrana se incuba 1,5 horas a temperatura ambiente con la dilución respectiva del anticuerpo. Al término de esta incubación, se realizan tres lavados a la membrana con TTBS 1X-leche 0,1% durante 5 minutos cada uno.

Posteriormente, se incuba la membrana con el anticuerpo secundario, [Anticuerpo policlonal, NIF825 Peroxidase labelled Anti-mouse IgG – HRP, Amersham[®]] durante 1,5 horas con agitación moderada constante. Al final de la incubación, se repiten los tres lavados de 5 minutos cada uno, con la solución de TTBS 1X-leche 0,1%, y se procede con el revelado por quimioluminiscencia.

Para el revelado, todo el procedimiento se realiza en un cuarto oscuro, utilizando la luz roja de seguridad. Primero se prepara la solución de trabajo, mezclando partes iguales (5 mL) del reactivo de detección No. 1 (Peróxido de hidrógeno) con el reactivo de detección No. 2 (Luminol) [Pierce[®] ECL Western Blotting substrate (Thermo Scientific[®])]. Se utilizan 125 µL de la mezcla por cada cm de membrana. Se incuba la membrana con la solución a temperatura ambiente durante 1 minuto (la solución es estable hasta por una hora a esta temperatura);

posteriormente, se remueve de la solución y se seca el exceso de líquido, luego se coloca en la superficie de una película plástica en el casete metálico de revelado (Amersham Hypercassette[®]), presionando cuidadosamente a la membrana con un asa de vidrio para remover las burbujas. Se tiene especial cuidado en colocar la membrana con la superficie que contiene a las proteínas, de tal manera que este en contacto directo con la película fotosensible de revelado [Kodak[®], Sigma Aldrich[®] (BioMax Chemiluminescence, light film)] (se puede cortar con unas tijeras la película al tamaño de la membrana). Se cierra herméticamente el casete metálico y el tiempo de exposición varió de 10 minutos a 1 hora. Finalmente, se toma la película de revelado sumergiéndola primero en la solución reveladora por 4 minutos, seguida de un lavado con agua destilada; luego se sumerge en la solución fijadora por otros 4 minutos, se lava con agua destilada y se deja secando para obtener el resultado.

2.15 Análisis de la expresión del gen reportero *URA3*

Realizamos este análisis para evaluar la funcionalidad de las proteínas Sir3 y Sir4 etiquetadas con los diferentes epítopes. Se insertaron las fusiones traduccionales de GFP, HA y FLAG por doble recombinación homóloga en la cepa CGM149, la cual, tiene una inserción del gen reportero *URA3* en la región intergénica entre *EPA3* y el telómero.

Para realizar este ensayo se inoculan las cepas transformantes en medio YPD líquido, dejando crecer los cultivos hasta fase estacionaria durante 48 horas a 30°C. Al término de este período se mide la densidad óptica a 600 nm de cada uno de los cultivos y se calcula las diluciones necesarias para ajustarlos a una $OD_{600nm}=1$. Las diluciones se hacen en agua destilada estéril y posteriormente se hicieron cinco diluciones logarítmicas seriadas ($10^1 - 10^5$) en multiplacas placas de 96 pozos. Se toman 5 μ L de cada dilución y se gotea por duplicado, en tres

diferentes medios sólidos de crecimiento: YPD, CAA (sin uracilo) y 5-FOA. Las cajas se incubaron a 30°C en un lapso de 48 horas de crecimiento.

2.16 Ensayos de Adherencia a células HeLa

Este ensayo *in vitro*, se empleó para evaluar la funcionalidad de las fusiones traduccionales de Sir3 y Sir4 en *Candida glabrata*.

Se ponen preinóculos de las cepas a evaluar en 5 mL de medio YPD durante 48 horas a 30 °C en agitación constante. Posteriormente, se mide la densidad óptica a 600 nm de cada uno de los cultivos. Se transfiere una alícuota de 1 mL de éstos cultivos a un tubo de microcentrífuga. El volumen restante que queda en el tubo de vidrio se centrifuga a 3500 rpm para recuperar el medio usado que se utiliza para ajustar cada cultivo a una $OD_{600nm} = 1$ con la alícuota que se tomó previamente de 1 mL. Este último ajuste se realiza por duplicado.

Se utiliza una caja de cultivo de 24 pozos con células HeLa adheridas a las cuales se les retiraron las soluciones conservadoras que contengan, ya sea por decantación o por pipeteo cuidadoso para evitar que se despegue la monocapa celular, ya que esta adhesión es un proceso dependiente de calcio. Inmediatamente, se adiciona a cada uno de los pozos 1 mL de la solución HSSB [Hanks Salt Solution Balanced, NaCl 34 mM, KCl 1,34 mM (Fisher Scientific®), $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 202 μM (Caledon®), $Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$ 86 μM (Fisher BioReagents®), KH_2PO_4 110 μM (Fisher BioReagents®), Calcio 5 mM] para favorecer la adherencia.

Se agregó 1 mL de cada uno de los cultivos en $OD_{600 nm} = 1$ previamente preparados. Se procedió a incubar la placa de pozos durante 1,5 horas a temperatura ambiente. Al término de la incubación se decanta manualmente y con fuerza, el volumen de los pozos sobre la tarja; esto es, volteando la placa de

pozos de manera rápida y sacudiendo un poco para eliminar el exceso de líquido que hubiese quedado. Se deja reposar por unos 5 minutos y se añade 1 mL de agua destilada; finalmente, se toman fotografías de cada uno de los pozos con el objetivo seco de 40X.

3. RESULTADOS

3.1 Construcción de vectores para fusiones traduccionales con los epítopes GFP, HA y FLAG

Para evitar la generación de nuevos anticuerpos policlonales para cada una de las proteínas de interés, en el laboratorio se generaron vectores para etiquetar proteínas en la región C-terminal, con los epítopes de GFP (proteína verde fluorescente), HA (Hemaglutinina) y FLAG (sitio activo de la enterocinasa). El diseño de estos vectores permite clonar fragmentos del gen de interés en sitios estratégicos, recombinarlos en el cromosoma y **seleccionar** las levaduras que portan el gen fusionado.

Para este trabajo, se etiquetaron en el C-terminal a las proteínas Sir3 y Sir4 con los epítopes: GFP, HA y FLAG. Siempre se debe de tomar en cuenta que las proteínas fusionadas tanto en el C-terminal como en el N-terminal pueden perder su actividad (JARVIK and TELMER 1998).

Para construir estas proteínas etiquetadas, primero se clonó en p-GEM la región terminal del 3' del ORF de *SIR3* y *SIR4* y la región 3' no traducible (3'UTR) de cada uno de estos genes. Cada uno de estos fragmentos se subclonaron en sitios específicos, en los plásmidos con los epítopes GFP (pOZ18), HA (pGE33) y FLAG (pGE36). Los genes fusionados usan como terminador el 3' UTR de *CTA1*. Estos plásmidos llevan además el marcador de resistencia a higromicina ($P_{PGK1}::hph::3'UTR_{HIS3}$) flanqueado por las secuencias repetidas directas *FRT* que reconoce la recombinasa Flp1 de *S. cerevisiae*. De esta manera, se construyeron los vectores que contienen el fragmento 3'ORF y el 3'UTR de *SIR3* fusionados con GFP (pJV3), HA (pJV20) y FLAG (pJV22). De igual manera se obtuvieron los vectores para el 3'ORF y el 3'UTR de *SIR4* con GFP (pJV10), HA (pJV14) y FLAG (pJV12). En la figura 3 se esquematiza la estrategia general de la construcción de los diferentes plásmidos.

En las figuras 4 y 5 se ilustra a detalle los plásmidos generados con los genes de los epítopes correspondientes y en la tabla 9 se describe brevemente las características generales de los vectores.

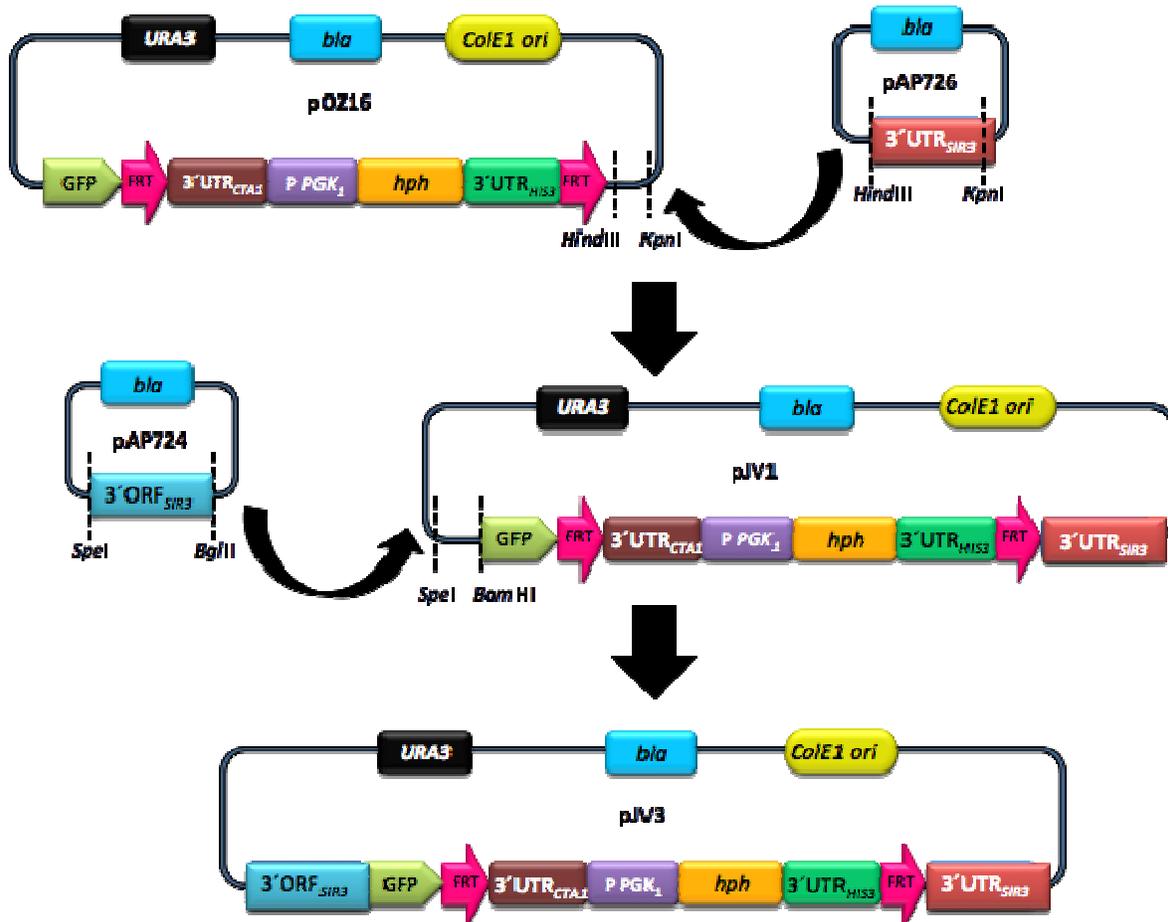


Figura 3. Generación de vectores para reemplazo génico con fusiones traducciónales. El extremo terminal del ORF de *SIR3* sin codón de paro, se obtuvo del plásmido pAP724, y su terminador (*3'UTR*), del plásmido pAP726. Siguiendo el orden de la figura, primero se clonó el fragmento *Hind* III/*Kpn* I, que corresponde al *3'UTR_{SIR3}* en el vector pOZ16, para generar el vector pJV1. Posteriormente, se digirió al pAP724 con *Spe* I y *Bgl* II, para liberar el fragmento *3'ORF_{SIR3}* y clonarlo en el pJV1 en los sitios *Spe* I y *Bam* HI. El *3'ORF_{SIR3}* queda fusionado traducciónalmente con *GFP*.

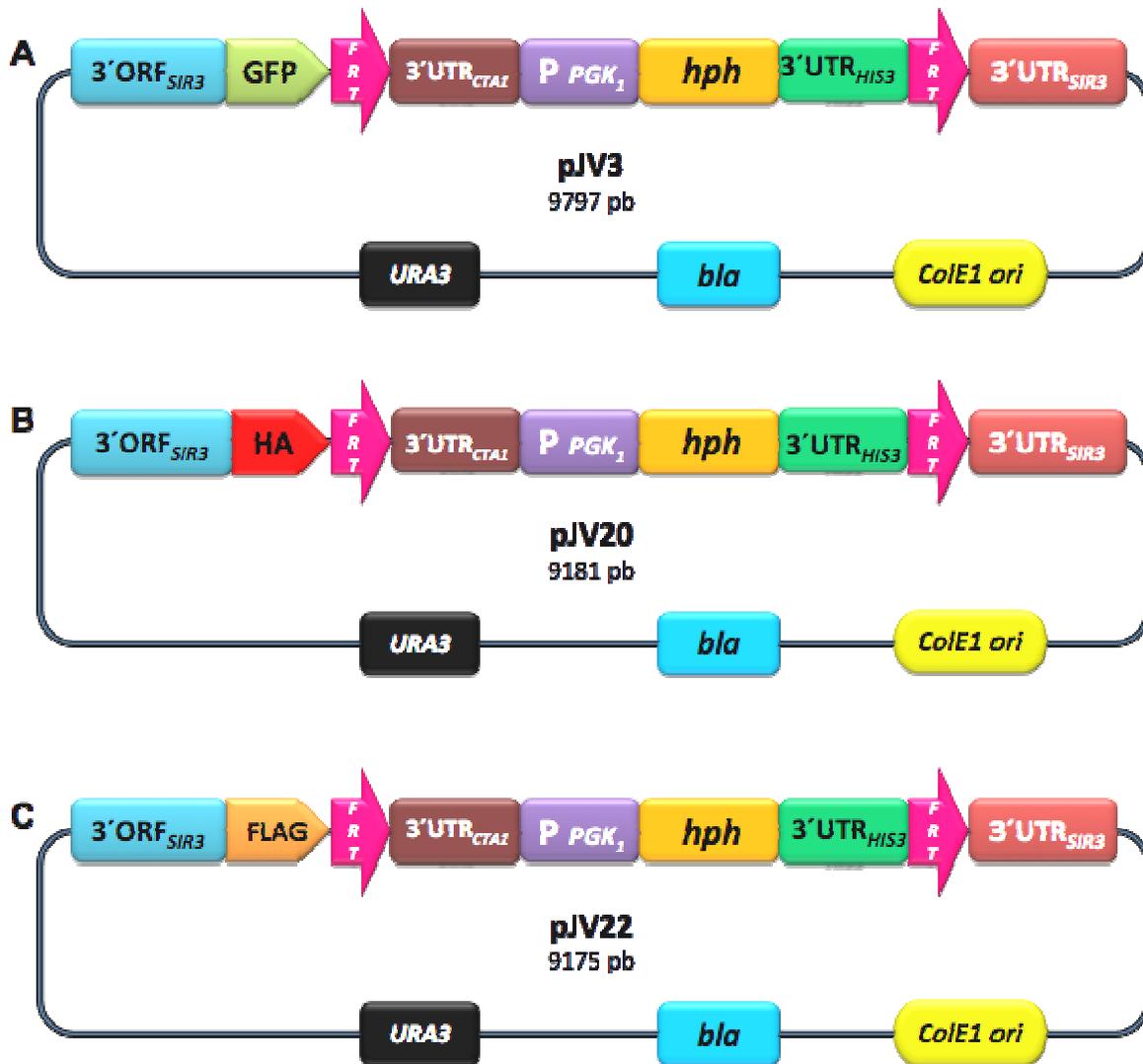


Figura 4. Representación esquemática de los vectores para *SIR3*, con diferentes epítopes. En A, se esquematiza el pJV3, que contiene al gen de GFP; en B, el pJV20 que contiene HA, y en C, se muestra al pJV22, que contiene FLAG. Estos vectores contienen la región 3'ORF_{SIR3} (en azul) y el 3'UTR_{SIR3} (en rojo). En la Tabla 6 se describen los genes que componen a los vectores.

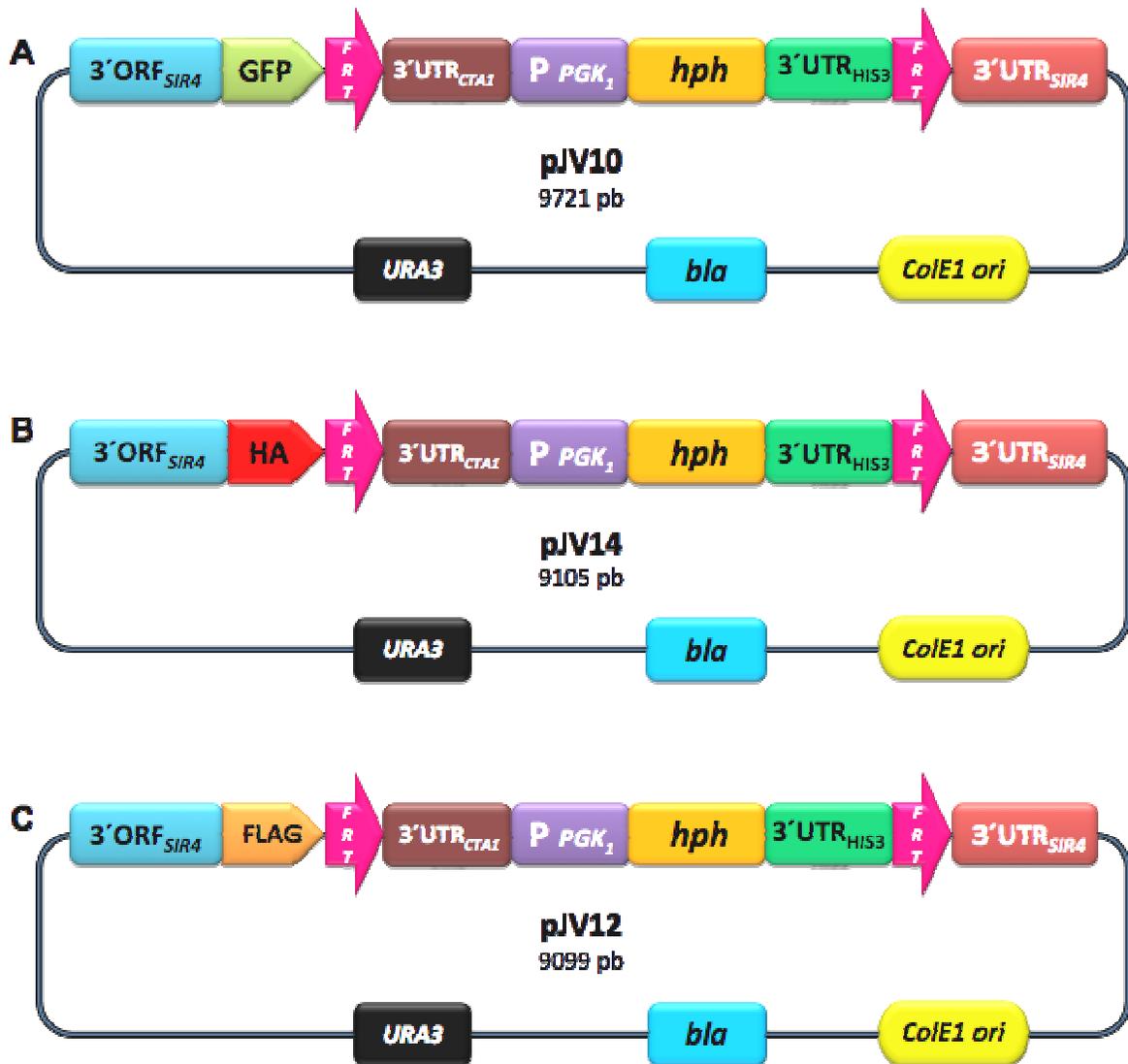


Figura 5. Representación esquemática de los vectores para *SIR4*, con diferentes epítopes. En A, se esquematiza el pJV10, que contiene al gen de GFP; en B, el pJV14 que contiene HA, y en C, se muestra al pJV12, que contiene FLAG. Estos vectores contienen la región 3'ORF_{SIR4} (en azul) y el 3'UTR_{SIR4} (en rojo). En la Tabla 6 se describen los genes que componen a los vectores.

Tabla 9. Características generales de los vectores

Secuencia	Comentario
URA3	Gen de 804 pb que codifica para la orotidina 5'-fosfato descarboxilasa. Participa en la biosíntesis <i>de novo</i> de pirimidinas en <i>S. cerevisiae</i> . Marcador de selección que complementa la auxotrofia por uracilo.
3'ORF_{SIR3}	Fragmento <i>SpeI/BglIII</i> de 1 300 pb derivado del pAP724.
3'ORF_{SIR4}	Fragmento <i>SpeI/BglIII</i> de 1 318 pb derivado del pAP732.
▶ GFP	Proteína verde fluorescente mutante 3 de <i>Aequoria victoria</i> . Contiene mutaciones S65G y S72A cerca del cromóforo. Optimizada para <i>S. cerevisiae</i> y <i>C. albicans</i> . Fluorescente a $\lambda=488\text{nm}$. Fragmento de 717 pb.
▶ HA	Glicoproteína de superficie del virus de la influenza humana, requerida para la infectividad del mismo. Corresponde a tres repeticiones de 10 aminoácidos. Ampliamente utilizada como epítipo en vectores de expresión, ya que facilita la detección, aislamiento y purificación de las proteínas de interés. Fragmento de 110 pb.
▶ FLAG	Sitio activo de la enterocinasa. Esta proteína tiene tres repeticiones de 10 aminoácidos (110 pb). Este epítipo es más hidrofílico que otros comunes. La proteína FLAG, puede escindirse utilizando una enteropeptidasa.
FRTs	Secuencias repetidas directas de 34 pb cada una para el reconocimiento de recombinasa Flp1p (<i>S. cerevisiae</i>). Flp1p genera rompimientos de doble cadena en las dos secuencias <i>FRT</i> y después une los extremos. Este proceso elimina el DNA entre las secuencias <i>FRT</i> .
3'UTR_{CTAI}	Terminador de la catalasa I de <i>C. glabrata</i> (<i>CTAI</i>) de 323 pb. Funciona como terminador temporal de la fusión traduccional. Posee un sitio <i>FRT</i> río arriba de la secuencia.
P_{PGKI}	Promotor constitutivo de la 3-fosfoglicerato cinasa de <i>S. cerevisiae</i> de 493 pb. Se induce fuertemente en glucosa como fuente de carbono.
hph	Gen de 1029 pb que codifica para la higromicina fosfotransferasa de <i>Klebsiella pneumoniae</i> . Cinasa que inactiva el antibiótico higromicina B por fosforilación. Marcador de selección que confiere resistencia a higromicina B.
3'UTR_{HIS3}	Terminador funcional de la imidazolglicerol-fosfato deshidratasa de 401 pb. Esta flanqueado por un sitio <i>FRT</i> río abajo de la secuencia.
3'UTR_{SIR3}	Fragmento de 998 pb digerido con <i>Kpn I/Hind III</i> derivado del pAP726.
3'UTR_{SIR4}	Fragmento de 978 pb digerido con <i>Kpn I/Hind III</i> derivado del pAP734.
ColE1 ori	Origen de replicación unidireccional de <i>E. coli</i> . Número de copias (10-30/célula).
bla	Gen de 861 pb que codifica para la β -lactamasa derivada de <i>E. coli</i> . Marcador de selección bacteriano. Degrada β -lactámicos y confiere resistencia a carbenicilina.

3.2 Integración de las fusiones traduccionales en el cromosoma de *Candida glabrata* por doble recombinación homóloga

Para transferir la fusión en el plásmido (3'ORF *SIR3*::X o 3'ORF *SIR4*::X) al gen (*SIR3* o *SIR4*) en el cromosoma de *C. glabrata*, se realizó por doble recombinación homóloga. Los vectores se cortan en los sitios diseñados para cada construcción dejando extremos homólogos y se transforma la cepa de *C. glabrata* por el método de acetato de litio, seleccionando las colonias transformantes resistentes a higromicina, lo cual representa una ventaja importante de este sistema (ver Material y Métodos) (Figura 6).

Una vez obtenidas las colonias transformantes, el reemplazo correcto se comprueba mediante PCR. Para este diagnóstico, se emplearon oligonucleótidos específicos, que alinean tanto dentro de la construcción, como en las regiones endógenas de *SIR3* y *SIR4* pero que no están presentes en el plásmido. Se verificó la integración en los extremos 5' y 3', así como la construcción completa en el cromosoma. En la figura 7, se visualiza la posición de los oligonucleótidos y los tamaños de banda esperados para las cepas que tuvieran el correcto reemplazo, tanto para *SIR3* como *SIR4*.

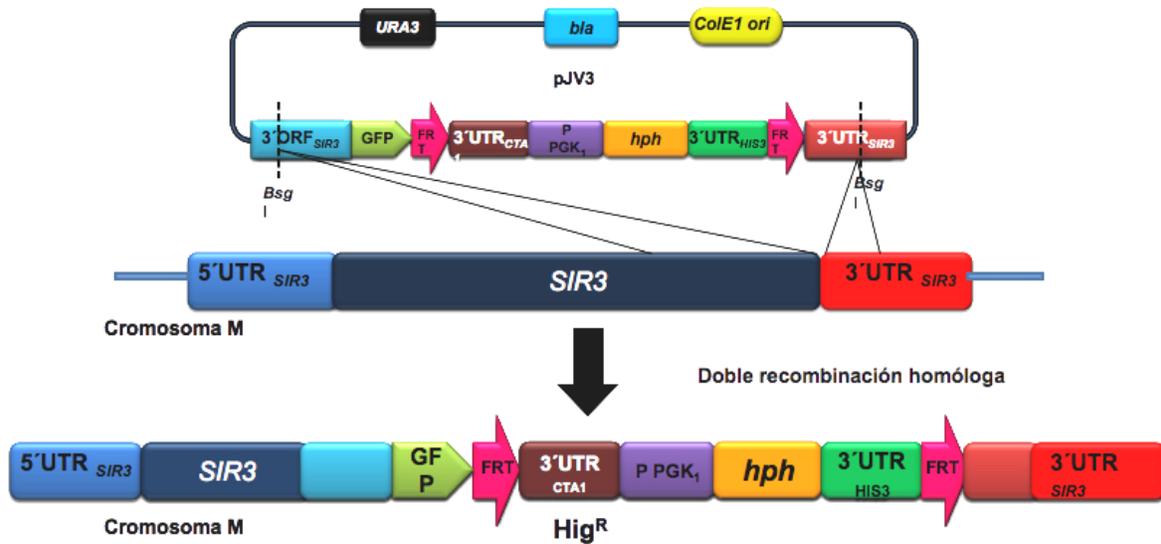


Figura 6. Fusión con epítopes por doble recombinación homóloga (un solo paso). Se esquematiza el proceso seguido para el reemplazo del gen silvestre de *SIR3* por la versión marcada con GFP. Para la transformación, el pJV3 se digirió con *Bsg* I / *Bsg* I, y se recombinó en el cromosoma. Se reemplaza el 3' del ORF de *SIR3*, por el 3' ORF *SIR3*::GFP y se fusiona el gen completo con el epítipo. En este paso el terminador de la catalasa sustituye al 3' UTR nativo, estabilizando temporalmente al transcrito. La inserción del casete de resistencia a higromicina, facilita la selección de las colonias transformantes.

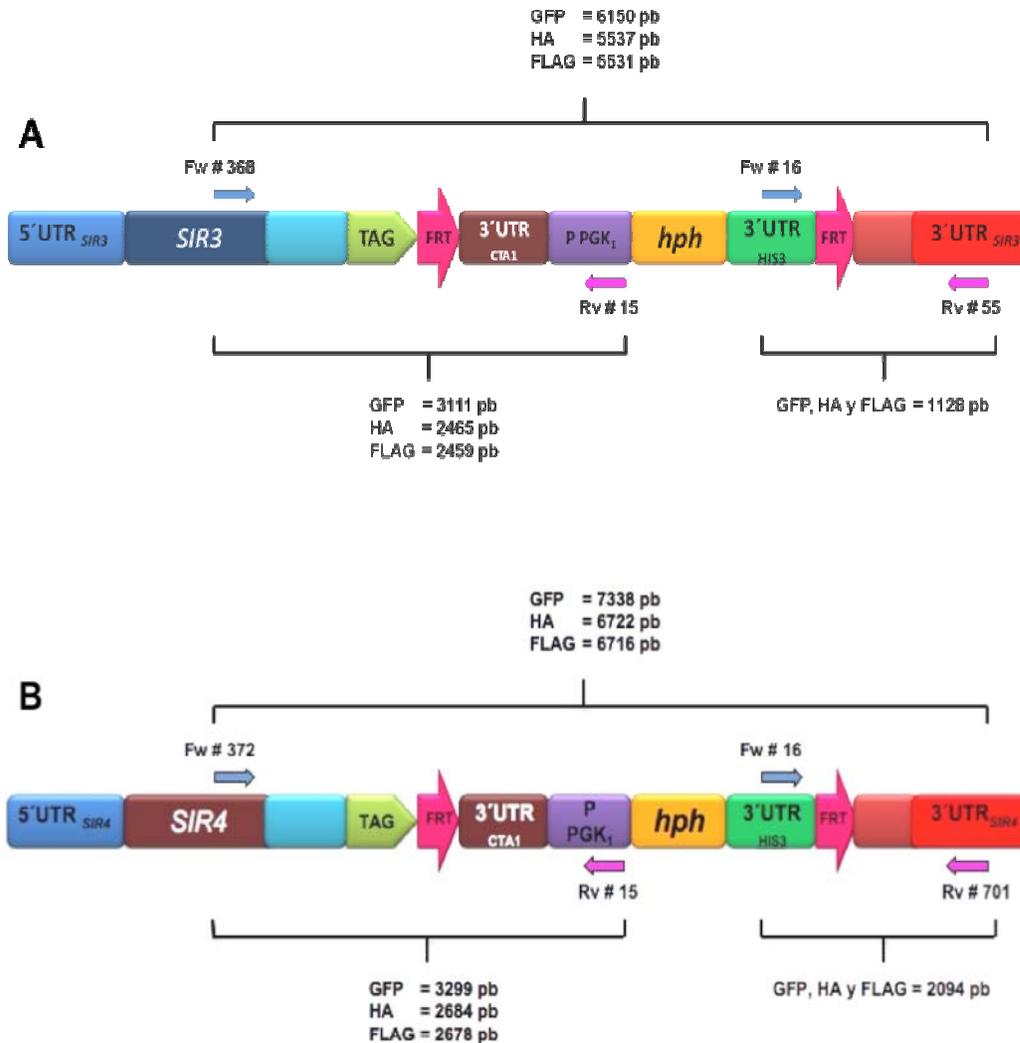


Figura 7. Ubicación de los oligonucleótidos para comprobar el reemplazo génico con la fusión traduccional y tamaños de banda esperados en los productos de PCR. Las comprobaciones se hicieron tanto para *SIR3* (inciso A) como para *SIR4* (inciso B). Se extrajo el DNA genómico y mediante PCR se diagnosticó la integración al locus correspondiente. Se utiliza un oligonucleótido sentido que hibride en el gen marcado, pero fuera de la secuencia utilizada para la clonación del vector (Para *SIR3* por ejemplo, el # 368, y para *SIR4* el # 372, en el extremo 5'), mientras que el oligonucleótido reverso reconoce algún componente exógeno, por ejemplo el promotor *PGK1* del casete de higromicina (# 15 en ambos casos). Para el extremo 3' se sigue el mismo principio (Para *SIR3* el par # 16 y # 55, y para *SIR4* el par # 372 y # 701) se amplifica toda la secuencia de la fusión insertada en el cromosoma. Arriba de cada llave se colocó la longitud del fragmento esperado.

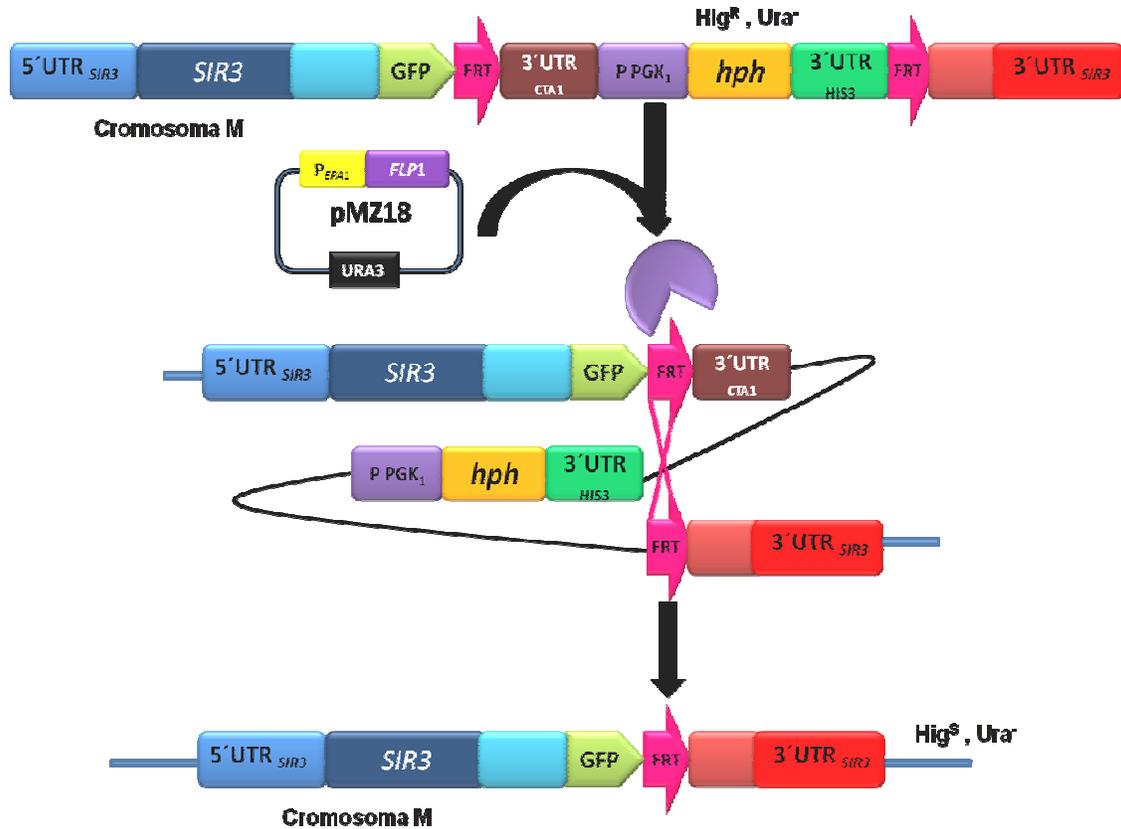


Figura No. 8. Eliminación del casete de resistencia a higromicina e incorporación del terminador nativo. Las cepas con la fusión traduccional se transformaron con el pMZ18, que codifica para la recombinasa Flp1p de *S. cerevisiae*. Tras la inducción de la expresión de Flp1 con medio fresco (YPD) en fase logarítmica, se escindió además el terminador de la catalasa, permitiendo así que el terminador nativo del gen se coloque en su sitio.

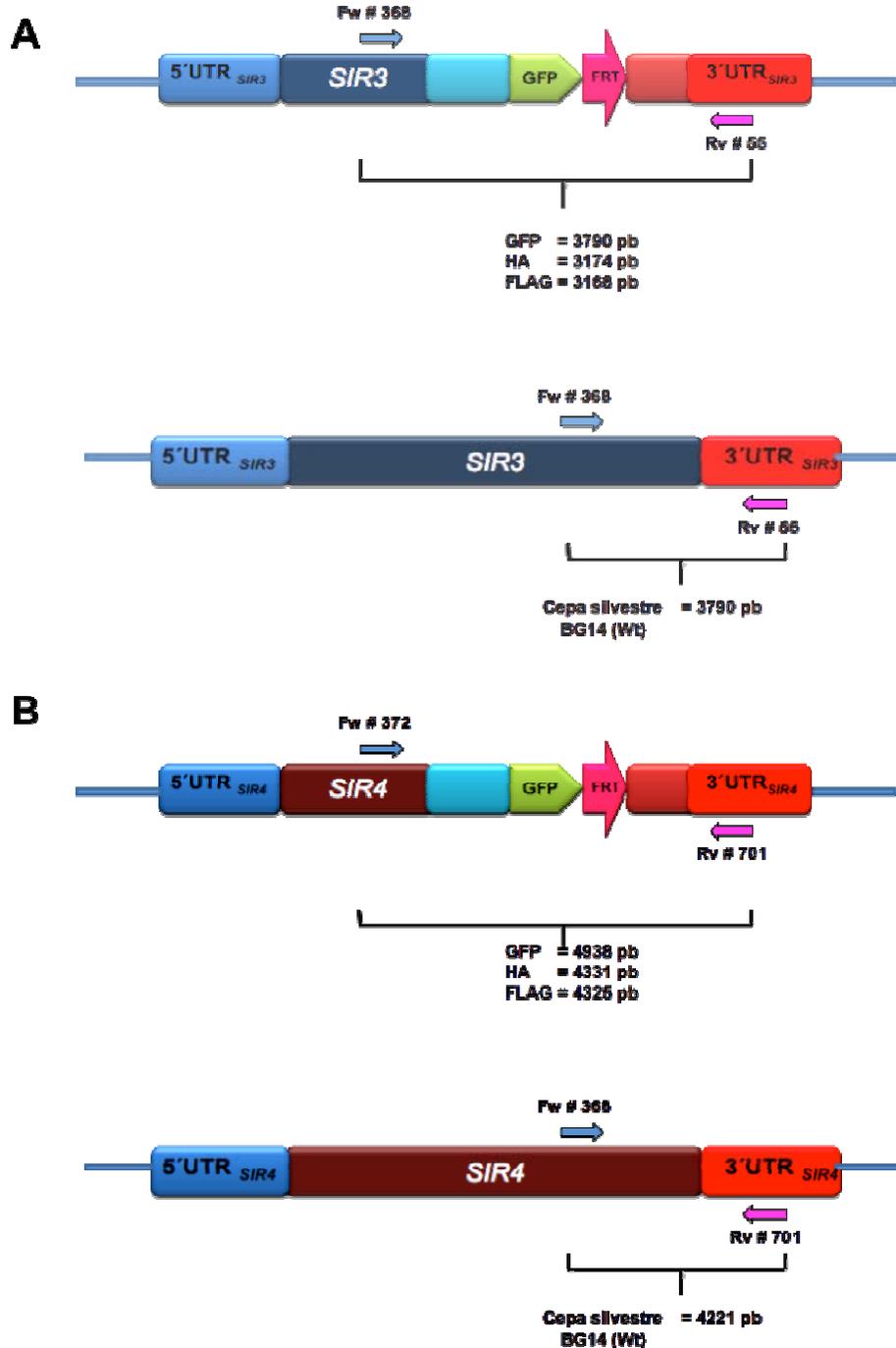


Figura No.9. Ubicación de los oligonucleótidos para comprobar la eliminación del casete de resistencia a higromicina por la recombinasa Flp1p en las cepas con la fusión traduccional y tamaños de banda esperados en los productos de PCR. Las comprobaciones se hicieron tanto para *SIR3* (A) como para *SIR4* (B). Se extrajo el DNA genómico de las colonias transformantes con el pMZ18, y mediante PCR se diagnóstico la escocion de Flp1 en las cepas con la fusión traduccional. Se utilizan el par de oligonucleótidos que amplificaron toda la secuencia de la fusión insertada en el cromosoma (Para *SIR3* el par # 368 y # 55, y para *SIR4* el par # 372 y # 701). Así mismo, se incluye un control de la cepa silvestre, que no posee el gen de la proteína química. Sobre cada llave se coloca la longitud del fragmento esperado.

3.4 Evaluación de la funcionalidad de las fusiones en *SIR3* y *SIR4*

3.4.1 Expresión del gen reportero *URA3*

Para determinar si las fusiones en el cromosoma son funcionales, se analizó la expresión/represión del gen reportero *URA3*, localizado en la región intergénica entre *EPA3* y el telómero. El gen *URA3* en este sitio, permanece totalmente reprimido por efecto del silenciamiento subtelomérico. Para el silenciamiento subtelomérico, se requieren de las proteínas Sir3 y Sir4 que forman parte del complejo Sir. Las células que expresen el gen reportero *URA3* en presencia de 5-FOA no serán viables ya que la enzima Ura3, que participa en la vía de biosíntesis de uracilo, toma como sustrato al 5-FOA, convirtiéndolo en un producto tóxico. Sólo las células que mantengan el gen *URA3* reprimido transcripcionalmente, podrán crecer en presencia de 5-FOA. Si las proteínas etiquetadas son funcionales, se espera que el gen reportero *URA3* se mantenga silenciado y las células puedan crecer en 5-FOA. En cambio, si las fusiones no son funcionales, habrá expresión de *URA3* y las células no podrán crecer en 5-FOA. En el medio YPD, se aprecia la cuenta viable de células, ya que todas las células pueden crecer independientemente de la expresión del gen reportero *URA3*. En el medio CAA (sin uracilo) se puede observar la población de células que están expresando el gen *URA3*. La expresión del gen *URA3* entre el *EPA3* y el telómero, se encuentra silenciada por las proteínas de la maquinaria del silenciamiento. Particularmente, las proteínas Sir3 y Sir4, participan fuertemente en el silenciamiento subtelomérico, las mutantes *sir3* Δ y *sir4* Δ no crecen en 5-FOA (Rosas-Hernández *et al.*, 2007). *SIR4::FLAG* es la única cepa que se comporta como la cepa parental en 5-FOA indicando que la fusión no altera la actividad de *SIR4*. De las fusiones analizadas pareciera que solo la cepa *SIR3::HA*, no es funcional, ya que permite la expresión del reportero y las células no pueden crecer en 5-FOA (Figura 10). Sin embargo, y dado que este ensayo es muy sensible a la expresión de *URA3* en presencia de 5-FOA, se puede apreciar que las fusiones *SIR3::GFP*, *SIR3::FLAG*, *SIR4::GFP* y *SIR4::HA* tiene menor crecimiento en 5-

FOA comparado con la cepa parental. Esto sugiere que estas fusiones pudieran ser parcialmente funcionales.

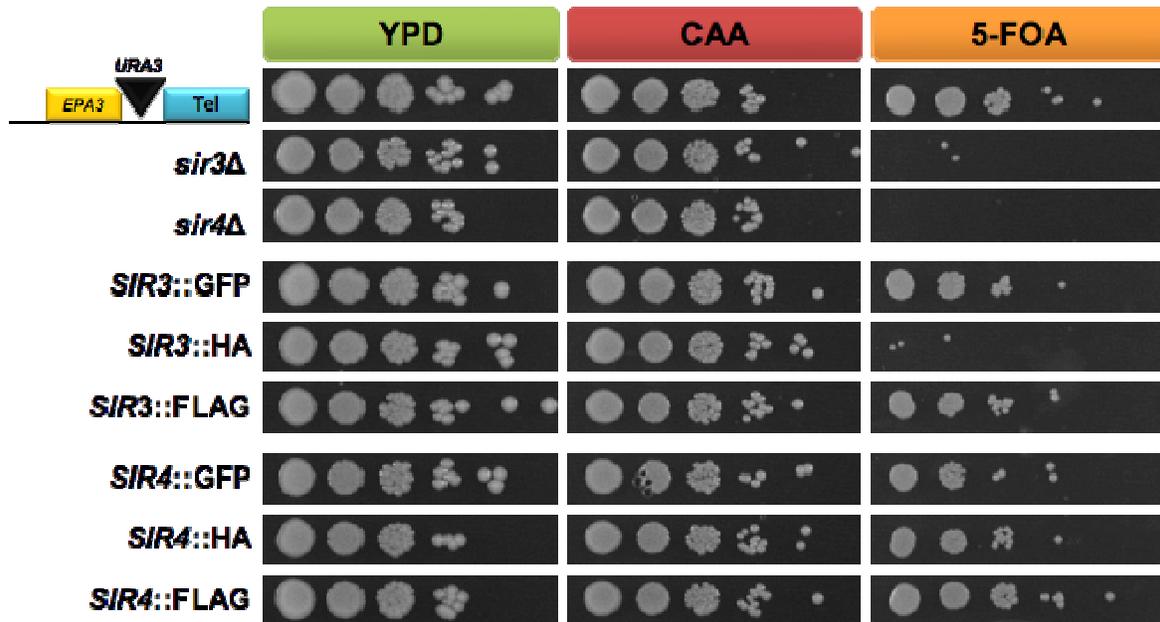


Figura 10. Análisis de la expresión del gen reportero *URA3* en diferentes medios de crecimiento. En YPD, se aprecia la cuenta viable; en CAA (sin uracilo) se observa la población de células que expresan *URA3*, y en el medio 5-FOA, se presentan aquellas células que no expresan *URA3*. La primera fila corresponde a la cepa parental con la inserción del reportero *URA3* que no se expresa, mientras que las mutaciones *sir3Δ* y *sir4Δ*, el gen reportero se expresa y las células no pueden formar colonias en presencia de 5-FOA.

3.4.2 Ensayos de adherencia de las cepas etiquetadas a células HeLa

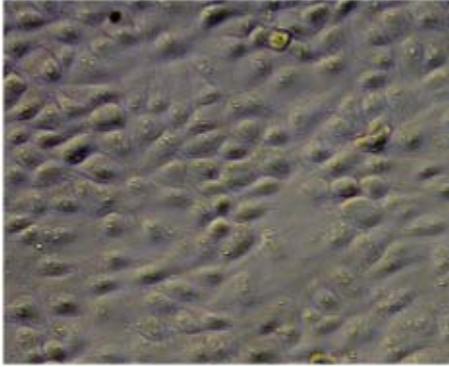
Sabemos que cualquier mutación en las proteínas del complejo Sir, elimina el silenciamiento subtelo mérico y se acompaña con la expresión de genes subtelo méricos (Gottschling, 1992). En la Figura 11, se analizó la funcionalidad de las proteínas fusionadas a GFP, HA y FLAG donde se muestra el efecto de Sir3 y Sir4 en el silenciamiento subtelo mérico, medido por la expresión del gen reportero *URA3*. Con la finalidad de continuar con el análisis de la funcionalidad de las

fusiones traduccionales de *SIR3* y *SIR4*, realizamos un ensayo cualitativo de adherencia *in vitro* a células HeLa.

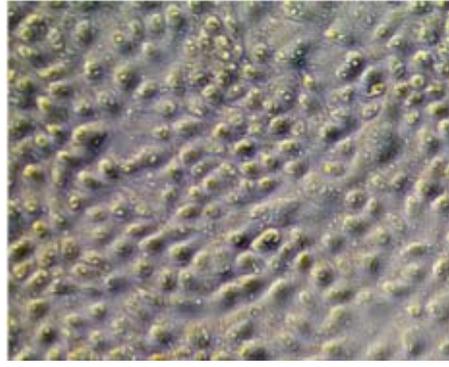
La cepa silvestre de *C. glabrata* no es adherente en fase estacionaria. Si células de fase estacionaria de *C. glabrata* etiquetadas con estos epítopes son hiperadherentes, indicaría que las fusiones no son funcionales, ya que se elimina el silenciamiento subtelomérico, y se expresan los genes subteloméricos *EPA* que codifican para adhesinas que median la adherencia a las células HeLa. Para estos ensayos, se incluyó un control de una cepa no adherente (cepa parental BG14, wt) y dos controles de cepas hiperadherentes (cepas *sir3* Δ y *sir4* Δ).

En el caso de la cepa BG14 (wt) no adherente, se muestran pocas células adheridas (ver figura 11). En cambio, las cepas hiperadherentes *sir3* Δ y *sir4* Δ , muestran un mayor número de levaduras adheridas a las células HeLa. Las cepas *SIR3::HA*, *SIR3::FLAG*, *SIR3::GFP*, *SIR4::HA* y *SIR4::GFP* se comportan como células hiperadherentes al igual que las cepas *sir3* Δ y *sir4* Δ . Esto sugiere que estas fusiones no son funcionales. Sin embargo, la cepa *SIR4::FLAG*, se comportan como la cepa BG14 (wt) no adherente (Figura 11 A y B) indicando que estas fusiones son las únicas funcionales.

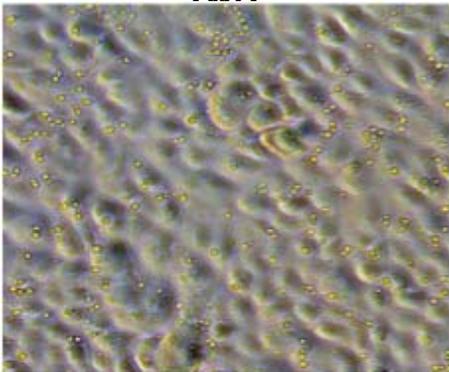
A



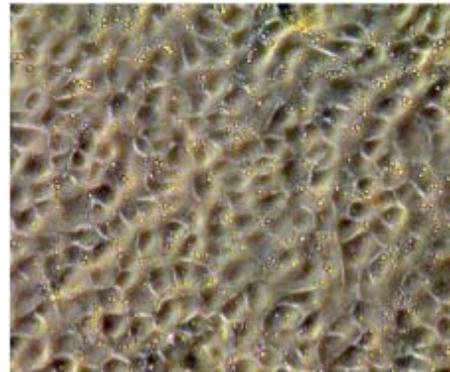
**BG14
(wt)**



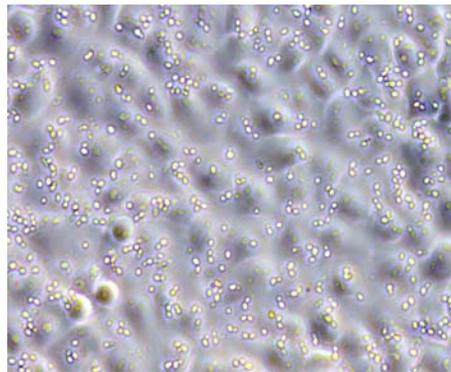
***sir3*Δ**



SIR3::HA

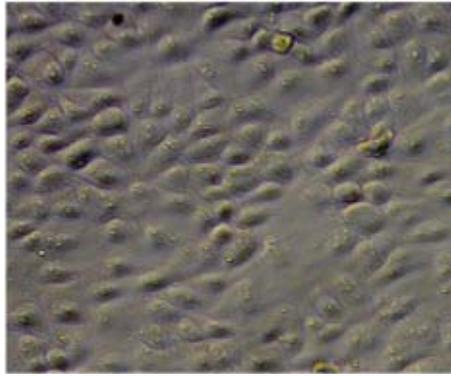


SIR3::FLAG

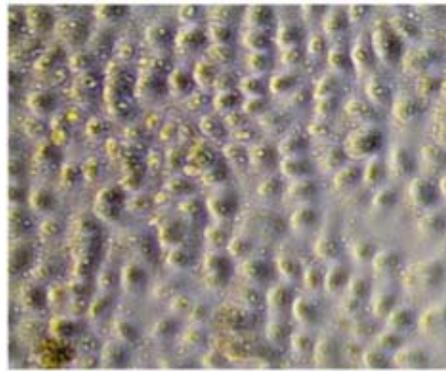


SIR3::GFP

B

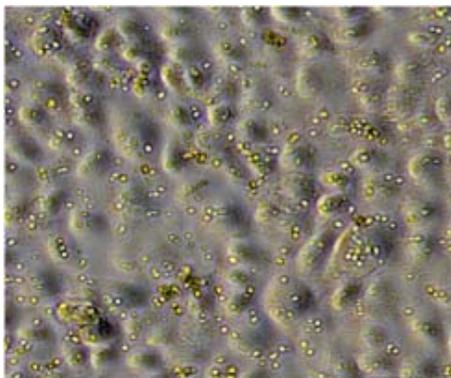


BG14 (wt)

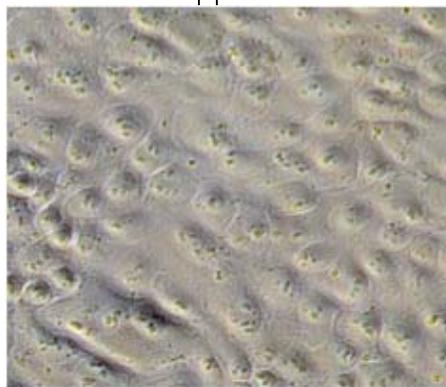


***sir4*Δ**

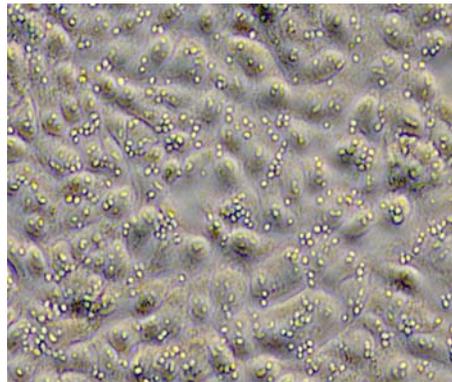
□



SIR4::HA



SIR4::FLAG



SIR4::GFP

Figura 11. Ensayo de adherencia de cepas etiquetadas a células HeLa. En A, se aprecia a las cepas de Sir3p etiquetadas con los epítopes GFP, HA y FLAG, y los controles de BG14 (wt) y la mutante en *sir3*Δ. En B, también se incluyen los controles de no adherencia BG14 (wt) y de adherencia *sir4*Δ, así como las cepas de *SIR4* etiquetadas con GFP, HA y FLAG. Las células hiperadherentes se aprecian como pequeños puntos refringentes sobre el césped de células HeLa (en gris).

3.5 Inmunodetección de Sir3::Flag y Sir4::Flag

Para determinar si las fusiones pueden ser inmunodetectadas, realizamos un ensayo de Western blot. Los extractos y la detección se realizaron como está descrito en la sección de Material y Métodos, así como los anticuerpos utilizados contra los epítopes (anti-GFP, anti-HA y anti-FLAG). Como anticuerpo secundario, usamos un policlonal Anti-mouse IgG – HRP. El ensayo se reveló por quimioluminiscencia. Se detectó a Sir3::Flag y Sir4::Flag. Las fusiones con los epítopes GFP y HA, no las pudimos detectar por Western blot (Figura 12).

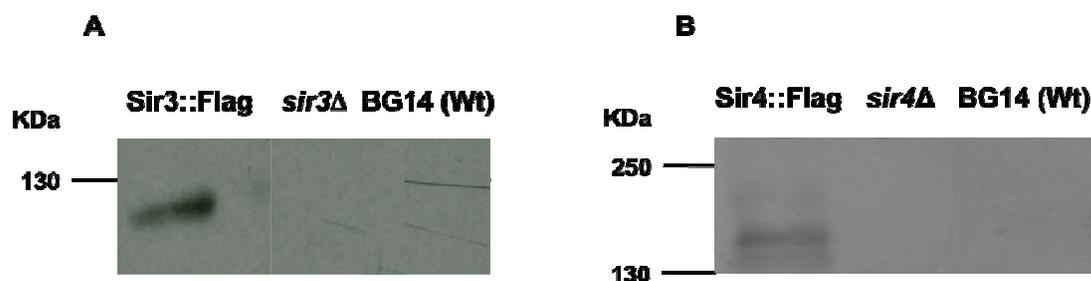


Figura 12. Inmunodetección por Western Blot de las proteínas etiquetadas con el epítipo FLAG. En A, se muestra a la proteína Sir3::Flag con un peso molecular de 127,5 KDa. En B, se observa la banda de 166 KDa que corresponde a Sir4::Flag. La carga de proteína fue de 50 μ g de proteína/ μ L.

4. DISCUSIÓN

4.1 Marcaje de proteínas con diferentes epítopes

El marcaje de proteínas con epítopes es una técnica en la cual un epítopo es fusionado a la proteína de interés por medio de Ingeniería Genética (BRIZZARD 2008). Esta técnica ha permitido una rápida y efectiva caracterización, purificación y localización *in vivo* de las proteínas, así como hacer posible evidenciar proteínas que no se pueden detectar por anticuerpos comercialmente disponibles; además, es especialmente útil para la caracterización de nuevas proteínas y de otras con baja inmunogenicidad (JARVIK and TELMER 1998).

Un enfoque tradicional es tener anticuerpos en contra de la proteína en cuestión lo que usualmente es exitoso, pero también es lento y costoso. El marcaje con epítopes en proteínas facilita su estudio y caracterización, pero la técnica tiene algunas limitaciones ya que la inserción de un epítopo puede alterar la función de la proteína (BRIZZARD 2008).

Entre las ventajas del marcaje con este tipo de epítopes bien caracterizados se encuentran aquellas en las cuales se utilizan anticuerpos disponibles contra éstos y se evitan reacciones cruzadas con otras proteínas no relacionadas, lo que en ocasiones dificulta el análisis de las interacciones.

Con los vectores que desarrollamos en el laboratorio, fusionamos los genes de *SIR3* y *SIR4* de *C. glabrata* con los epítopes GFP (Proteína verde fluorescente), HA (Hemaglutinina) y FLAG (Sitio activo para la enterocinasa). Además, el diseño de estos vectores nos permite fusionar cualquier gen de interés con los epítopes mencionados.

Es difícil determinar teóricamente si la fusión en el 5' o en el 3' pudieran afectar la actividad de la proteína (JARVIK and TELMER 1998). Muchas proteínas han sido etiquetadas tanto en el 5' como en el 3' sin afectar la función. En el

presente trabajo, éstos vectores sólo permiten hacer fusiones en el carboxilo-terminal del gen de interés.

El uso de proteínas marcadas en *S. cerevisiae*, ha sido una de las herramientas claves para el estudio de esta levadura. Por ejemplo, hay un estudio donde se hizo un escrutinio para identificar a nivel proteómico la interacción proteína – proteína (GAVIN *et al.* 2002; HO *et al.* 2002).

Queremos determinar si las proteínas Sir3 y Sir4 de *C. glabrata*, puedan ser blancos de señales externas generadas por estrés osmótico, nutricional o estrés de pared celular. Un primer paso es identificar si estas proteínas se fosforilan en respuesta a estas condiciones de estrés (AI *et al.* 2002).

Quizás la más importante aplicación del marcaje con epítopes es la co-inmunoprecipitación [Co-IP] (BRIZZARD 2008). Este tipo de ensayo permite determinar la interacción proteína – proteína de las proteínas etiquetadas, con otras que interactúan directamente con ellas. Este tipo de experimentos contribuyen enormemente a entender las redes de interacción proteína –proteína y en particular, la interacción a lo largo de los telómeros de *C. glabrata*.

4.2 Evaluación de las proteínas quiméricas a través del gen reportero *URA3*

Una vez etiquetadas las proteínas (Sir3 y Sir4), se tiene que determinar si son funcionales. Para esto se planteó el ensayo donde se observa la expresión o represión del gen reportero *URA3* insertado entre la región del gen *EPA3* y el telómero de *C. glabrata* (Cromosoma E-Derecho). El gen reportero *URA3* ubicado cerca del telómero, permanecerá reprimido por la maquinaria del silenciamiento subtelomérico, mientras que genes reporteros ubicados en regiones lejanas a éste o en una cepa mutante en cualquier gen que codifica para las proteínas del silenciamiento de esta región, el gen reportero se expresa (ROSAS-HERNANDEZ *et*

al. 2008). Normalmente esta región del cromosoma (Cromosoma E-Derecho), se encuentra silenciado, y Sir3 y Sir4 son esenciales para este silenciamiento.

Evaluamos si la adición de las etiquetas a las proteínas Sir3 y Sir4 podrían afectar su actividad, habiendo pérdida del silenciamiento en esta región.

En condiciones normales las células que no expresan el gen reportero *URA3* son viables en medio con 5-FOA. La enzima Ura3p, que participa en la vía de biosíntesis de uracilo, toma como sustrato al 5-FOA convirtiéndolo en un producto tóxico para las células. De esta manera, únicamente aquellas células que mantengan el gen *URA3* reprimido transcripcionalmente pueden crecer en este medio (fenotipo Ura⁻, 5-FOA^R) y las que lo expresen no podrán crecer.

Según los resultados de los goteos, *SIR4::FLAG* es la única cepa donde Sir4::Flag no perdió su actividad. La proteína Sir3::HA claramente perdió su actividad. Para el resto de las fusiones podría concluirse que lograron mantener al gen reportero reprimido; sin embargo *SIR3::GFP*, *SIR3::FLAG*, *SIR4::GFP* y *SIR4::HA* tienen menor crecimiento en 5-FOA comparado con la cepa parental. Esto indica que estas fusiones son parcialmente funcionales y que este ensayo no demuestra completamente si las proteínas son o no funcionales.

4.3 Evaluación de la funcionalidad de las proteínas etiquetadas a través de ensayos de adherencia a células HeLa

Dado que estas fusiones serán utilizadas para diversos experimentos, quisimos probar claramente si éstas son funcionales o no. Para esto hicimos otro experimento diferente al anterior para evaluar la funcionalidad de éstas proteínas etiquetadas. Realizamos un ensayo cualitativo de adherencia de cepas de *C. glabrata* conteniendo estas fusiones a células HeLa.

C. glabrata es capaz de adherirse a células epiteliales, y se adhiere principalmente a través de Epa1 (CORMACK and FALKOW 1999). Existen diversos genes parálogos de *EPA1* en el genoma de *C. glabrata*, los cuales permanecen silenciados dentro de las regiones subtelméricas. Se conoce que los genes *EPA1-7* se encuentran silenciados en al menos 4 telómeros y que este silenciamiento está en función de los genes *SIR*, *RAP1* y *RIF1* (CASTANO *et al.* 2005; DE LAS PENAS 2003). Las proteínas que conforman el complejo Sir (proteínas reguladoras de la información silenciosa) son Sir2, Sir3 y Sir4, y son éstas las fundamentales en el establecimiento y conservación de la cromatina silenciosa (HECHT *et al.* 1995; MOAZED *et al.* 1997; MORETTI *et al.* 1994; STRAHL-BOLSINGER *et al.* 1997).

La cepa silvestre de *C. glabrata* en las condiciones del ensayo no es capaz de adherirse a las células HeLa. Sin embargo, si no hay silenciamiento subtelmérico porque Sir3 o Sir4 etiquetados no sean funcionales, entonces la cepas expresarán los genes *EPA* subtelméricos, y éstos Epas mediarán la adherencia a las células HeLa. Los experimentos demuestran claramente que las cepas *SIR3::HA*, *SIR3::GFP*, *SIR4::HA* y *SIR4::GFP* no son funcionales ya que son hiperadherentes a las células HeLa. Solo las cepas *SIR3::FLAG* y *SIR4::FLAG* son las únicas funcionales. Si hubiéramos realizado sólo el ensayo del gen reportero *URA3*, hubiéramos concluido que sólo *SIR3::HA* era la única fusión no funcional.

Estos resultados aconsejan que dependiendo de la proteína fusionada, deberían de hacerse más de un ensayo para probar la funcionalidad de las proteínas etiquetadas.

4.4 Detección de las proteínas etiquetadas con los epítopes por análisis de Western Blot

Las proteínas etiquetadas pueden ser detectadas con anticuerpos específicos contra el epítope. Las técnicas que se pueden llevar a cabo son Western blot, inmunoprecipitación, ELISA, inmunofluorescencia, microscopía inmunoeléctrica. (JARVIK and TELMER 1998). Nosotros decidimos probar nuestras proteínas fusionadas por medio de Western blot.

Logramos detectar a la proteína Sir3::FLAG (127,5 KDa) y Sir4::FLAG (166 KDa) mediante esta técnica.

Para mejorar la detección se podría incrementar el número de copias del gen etiquetado, esto mejoraría la intensidad de la señal y disminuiría la señal de ruido.

En general las etiquetas son bien toleradas por las proteínas porque en muchos casos están en loops externos o en las regiones terminales donde no perturban a el resto de la proteína (JARVIK and TELMER 1998), pero también hay casos donde las fusiones afectan la actividad de la proteína etiquetada. Por ejemplo, las fusiones realizadas en el C – terminal con GFP de *Neurospora* no son funcionales (HONDA and SELKER 2009). Una de las razones para explicar esto, es que GFP puede afectar el plegamiento de la proteína quimérica, dando como resultado una proteína no funcional. El uso de linkers flexibles o copias en tándem de GFP pueden mejorar la detección y funcionalidad de las proteínas etiquetadas (SABOURIN *et al.* 2007). Cabe mencionar que en muchas aplicaciones del etiquetado con epítopes, el objetivo principal es determinar la localización (JARVIK and TELMER 1998). Si la proteína etiquetada no es funcional, entonces las conclusiones del experimento serán equivocadas.

Por otra parte, las regiones terminales parecen ser favorables para el etiquetado, porque probablemente estén en el exterior del polipéptido plegado; sin embargo muchas proteínas tienen una función crítica en su secuencia terminal (JARVIK and TELMER 1998).

Muchos de los anticuerpos disponibles reconocen al epítoto si es interno a la proteína o hacia alguna región terminal, pero en algunos casos el reconocimiento depende de la ubicación (JARVIK and TELMER 1998). El anticuerpo que utilizamos contra GFP, reconocía la porción N – terminal de este epítoto, y éste se encontraba fusionado a la región C – terminal de las proteínas, por lo que quizá pudo haber tenido algún impedimento estérico para que las proteínas etiquetadas con GFP, pudiera ser detectadas en el Western blot.

Cabe mencionar, que en las regiones hidrofóbicas de las proteínas, como los dominios transmembranales o los núcleos hidrofóbicos, no son un buen lugar para etiquetar, de igual forma lo son aquellas regiones altamente conservadas, porque probablemente son sensibles a alteraciones en la secuencia primaria (JARVIK and TELMER 1998).

5. CONCLUSIONES

Podemos resaltar las principales ventajas y desventajas del marcaje con epítopes:

Ventajas:

- 1) Los anticuerpos que se utilizan dirigidos a los epítopes están bien caracterizados, en general son monoclonales y son específicos de los mismos, por lo que se evita una reacción cruzada con otra proteína.
- 2) Las etiquetas son fácilmente añadidas en una localización conocida en el gen de interés.
- 3) Las proteínas y complejos proteícos pueden ser purificados usando condiciones estándar.
- 4) Las proteínas etiquetadas pueden ser distinguidas de otras sin etiquetar.
- 5) Múltiples etiquetas pueden ser añadidas si es necesario.
- 6) La inmunohistoquímica es posible para aquellas proteínas poco inmunogénicas.

Limitaciones:

- 1) El epítope puede interferir con la estructura y función de la proteína
- 2) Los genes etiquetados con epítopes son expresados a niveles anormales debido al uso de promotores heterólogos
- 3) El gen etiquetado con el epítope debe ser introducido dentro de la célula, tejido u organismo de interés.

Dentro de las principales aplicaciones del marcaje con epítopes se encuentran los estudios de expresión de proteínas, localización, purificación, topología, dinámica, interacciones, análisis funcional y descubrimiento de nuevas proteínas.

Las proteínas Sir3 y Sir4 etiquetadas con los epítopes GFP y HA resultaron comprometer su funcionalidad dentro del complejo Sir en los ensayos de

adherencia a células HeLa. Y sólo pudieron inmunodetectarse a las proteínas etiquetadas con el epítoto FLAG. Sólo son funcionales las proteína Sir3::Flag y Sir4::Flag para realizar los diferentes ensayos.

REFERENCIAS

- AI, W., P. G. BERTRAM, C. K. TSANG, T. F. CHAN and X. F. ZHENG, 2002 Regulation of subtelomeric silencing during stress response. *Mol Cell* **10**: 1295-1305.
- ALMIRANTE, B., D. RODRIGUEZ, B. J. PARK, M. CUENCA-ESTRELLA, A. M. PLANES *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**: 1829-1835.
- BADER, G. D., and C. W. HOGUE, 2000 BIND--a data specification for storing and describing biomolecular interactions, molecular complexes and pathways. *Bioinformatics* **16**: 465-477.
- BERTRAM, P. G., J. H. CHOI, J. CARVALHO, W. AI, C. ZENG *et al.*, 2000 Tripartite regulation of Gln3p by TOR, Ure2p, and phosphatases. *J Biol Chem* **275**: 35727-35733.
- BRIZZARD, B., 2008 Epitope tagging. *Biotechniques* **44**: 693-695.
- BUITRON GARCIA, R., R. ROMERO CABELLO, F. CRUZ TALONIA, A. BONIFAZ and F. ZARAMA MARQUEZ, 2002 [Study on *Candida no-albicans* species and its relation to recurrent vulvovaginal candidiasis]. *Ginecol Obstet Mex* **70**: 431-436.
- BUTLER, G., M. D. RASMUSSEN, M. F. LIN, M. A. SANTOS, S. SAKTHIKUMAR *et al.*, 2009 Evolution of pathogenicity and sexual reproduction in eight *Candida* genomes. *Nature* **459**: 657-662.
- CAFFERKEY, R., P. R. YOUNG, M. M. MCLAUGHLIN, D. J. BERGSMA, Y. KOLTIN *et al.*, 1993 Dominant missense mutations in a novel yeast protein related to mammalian phosphatidylinositol 3-kinase and VPS34 abrogate rapamycin cytotoxicity. *Mol Cell Biol* **13**: 6012-6023.
- CALVIN, N. M., and P. C. HANAWALT, 1988 High-efficiency transformation of bacterial cells by electroporation. *J Bacteriol* **170**: 2796-2801.
- CASTANO, I., S. J. PAN, M. ZUPANCIC, C. HENNEQUIN, B. DUJON *et al.*, 2005 Telomere length control and transcriptional regulation of subtelomeric adhesins in *Candida glabrata*. *Mol Microbiol* **55**: 1246-1258.
- COHEN, P., 2000 The regulation of protein function by multisite phosphorylation--a 25 year update. *Trends Biochem Sci* **25**: 596-601.
- CORMACK, B. P., and S. FALKOW, 1999 Efficient homologous and illegitimate recombination in the opportunistic yeast pathogen *Candida glabrata*. *Genetics* **151**: 979-987.
- COSGROVE, M. S., K. BEVER, J. L. AVALOS, S. MUHAMMAD, X. ZHANG *et al.*, 2006 The structural basis of sirtuin substrate affinity. *Biochemistry* **45**: 7511-7521.
- DE LAS PENAS, A., PAN, S.J., CASTANO, I., ALDER, J., CREGG, R., AND CORMACK, B.P., 2003 Virulence-related surface glycoproteins in the yeast pathogen *Candida glabrata* are encoded in subtelomeric clusters and subject to RAP1- and SIR-dependent transcriptional silencing *Genes Dev* **17**: 2245-2258.
- DENU, J. M., 2005 Vitamin B3 and sirtuin function. *Trends Biochem Sci* **30**: 479-483.

- DI COMO, C. J., and K. T. ARNDT, 1996 Nutrients, via the Tor proteins, stimulate the association of Tap42 with type 2A phosphatases. *Genes Dev* **10**: 1904-1916.
- DOMERGUE, R., I. CASTANO, A. DE LAS PENAS, M. ZUPANCIC, V. LOCKATELL *et al.*, 2005 Nicotinic acid limitation regulates silencing of *Candida* adhesins during UTI. *Science* **308**: 866-870.
- FICARRO, S. B., M. L. MCCLELAND, P. T. STUKENBERG, D. J. BURKE, M. M. ROSS *et al.*, 2002 Phosphoproteome analysis by mass spectrometry and its application to *Saccharomyces cerevisiae*. *Nat Biotechnol* **20**: 301-305.
- FIDEL, P. L., JR., J. L. CUTRIGHT, L. TAIT and J. D. SOBEL, 1996 A murine model of *Candida glabrata* vaginitis. *J Infect Dis* **173**: 425-431.
- GAVIN, A. C., M. BOSCHE, R. KRAUSE, P. GRANDI, M. MARZIOCH *et al.*, 2002 Functional organization of the yeast proteome by systematic analysis of protein complexes. *Nature* **415**: 141-147.
- GIETZ, D., A. ST JEAN, R. A. WOODS and R. H. SCHIESTL, 1992 Improved method for high efficiency transformation of intact yeast cells. *Nucleic Acids Res* **20**: 1425.
- GINGRAS, A. C., B. RAUGHT and N. SONENBERG, 2001 Regulation of translation initiation by FRAP/mTOR. *Genes Dev* **15**: 807-826.
- HECHT, A., T. LAROCHE, S. STRAHL-BOLSINGER, S. M. GASSER and M. GRUNSTEIN, 1995 Histone H3 and H4 N-termini interact with SIR3 and SIR4 proteins: a molecular model for the formation of heterochromatin in yeast. *Cell* **80**: 583-592.
- HECHT, A., S. STRAHL-BOLSINGER and M. GRUNSTEIN, 1996 Spreading of transcriptional repressor SIR3 from telomeric heterochromatin. *Nature* **383**: 92-96.
- HELLIWELL, S. B., P. WAGNER, J. KUNZ, M. DEUTER-REINHARD, R. HENRIQUEZ *et al.*, 1994 TOR1 and TOR2 are structurally and functionally similar but not identical phosphatidylinositol kinase homologues in yeast. *Mol Biol Cell* **5**: 105-118.
- HO, Y., A. GRUHLER, A. HEILBUT, G. D. BADER, L. MOORE *et al.*, 2002 Systematic identification of protein complexes in *Saccharomyces cerevisiae* by mass spectrometry. *Nature* **415**: 180-183.
- HONDA, S., and E. U. SELKER, 2009 Tools for fungal proteomics: multifunctional neurospora vectors for gene replacement, protein expression and protein purification. *Genetics* **182**: 11-23.
- ITO, T., T. CHIBA, R. OZAWA, M. YOSHIDA, M. HATTORI *et al.*, 2001 A comprehensive two-hybrid analysis to explore the yeast protein interactome. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**: 4569-4574.
- JARVIK, J. W., and C. A. TELMER, 1998 Epitope tagging. *Annu Rev Genet* **32**: 601-618.
- JELINSKY, S. A., P. ESTEP, G. M. CHURCH and L. D. SAMSON, 2000 Regulatory networks revealed by transcriptional profiling of damaged *Saccharomyces cerevisiae* cells: Rpn4 links base excision repair with proteasomes. *Mol Cell Biol* **20**: 8157-8167.

- KAUR, R., R. DOMERGUE, M. L. ZUPANCIC and B. P. CORMACK, 2005 A yeast by any other name: *Candida glabrata* and its interaction with the host. *Curr Opin Microbiol* **8**: 378-384.
- KAUR, R., B. MA and B. P. CORMACK, 2007 A family of glycosylphosphatidylinositol-linked aspartyl proteases is required for virulence of *Candida glabrata*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**: 7628-7633.
- KRUSZEWSKI, M., and I. SZUMIEL, 2005 Sirtuins (histone deacetylases III) in the cellular response to DNA damage--facts and hypotheses. *DNA Repair (Amst)* **4**: 1306-1313.
- MANNING, G., G. D. PLOWMAN, T. HUNTER and S. SUDARSANAM, 2002 Evolution of protein kinase signaling from yeast to man. *Trends Biochem Sci* **27**: 514-520.
- MANZANO-GAYOSSO, P., F. HERNANDEZ-HERNANDEZ, E. BAZAN-MORA, L. J. MENDEZ-TOVAR, J. GONZALEZ-MONROY *et al.*, 2000 [Identification and typing of yeast isolates from hospital patients in Mexico City]. *Rev Argent Microbiol* **32**: 1-6.
- MOAZED, D., A. KISTLER, A. AXELROD, J. RINE and A. D. JOHNSON, 1997 Silent information regulator protein complexes in *Saccharomyces cerevisiae*: a SIR2/SIR4 complex and evidence for a regulatory domain in SIR4 that inhibits its interaction with SIR3. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**: 2186-2191.
- MORETTI, P., K. FREEMAN, L. COODLY and D. SHORE, 1994 Evidence that a complex of SIR proteins interacts with the silencer and telomere-binding protein RAP1. *Genes Dev* **8**: 2257-2269.
- PFALLER, M. A., and D. J. DIEKEMA, 2007 Epidemiology of invasive candidiasis: a persistent public health problem. *Clin Microbiol Rev* **20**: 133-163.
- PORCU, M., and A. CHIARUGI, 2005 The emerging therapeutic potential of sirtuin-interacting drugs: from cell death to lifespan extension. *Trends Pharmacol Sci* **26**: 94-103.
- POWERS, T., and P. WALTER, 1999 Regulation of ribosome biogenesis by the rapamycin-sensitive TOR-signaling pathway in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Biol Cell* **10**: 987-1000.
- ROHDE, J., J. HEITMAN and M. E. CARDENAS, 2001 The TOR kinases link nutrient sensing to cell growth. *J Biol Chem* **276**: 9583-9586.
- ROSAS-HERNANDEZ, L. L., A. JUAREZ-REYES, O. E. ARROYO-HELGUERA, A. DE LAS PENAS, S. J. PAN *et al.*, 2008 yKu70/yKu80 and Rif1 regulate silencing differentially at telomeres in *Candida glabrata*. *Eukaryot Cell* **7**: 2168-2178.
- SABOURIN, M., C. T. TUZON, T. S. FISHER and V. A. ZAKIAN, 2007 A flexible protein linker improves the function of epitope-tagged proteins in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* **24**: 39-45.
- SCHMELZLE, T., and M. N. HALL, 2000 TOR, a central controller of cell growth. *Cell* **103**: 253-262.
- STONE, E. M., and L. PILLUS, 1996 Activation of an MAP kinase cascade leads to Sir3p hyperphosphorylation and strengthens transcriptional silencing. *J Cell Biol* **135**: 571-583.
- STONE, E. M., and L. PILLUS, 1998 Silent chromatin in yeast: an orchestrated medley featuring Sir3p [corrected]. *Bioessays* **20**: 30-40.

- STRAHL-BOLSINGER, S., A. HECHT, K. LUO and M. GRUNSTEIN, 1997 SIR2 and SIR4 interactions differ in core and extended telomeric heterochromatin in yeast. *Genes Dev* **11**: 83-93.
- TERVO, A. J., S. KYRYLENKO, P. NISKANEN, A. SALMINEN, J. LEPPANEN *et al.*, 2004 An in silico approach to discovering novel inhibitors of human sirtuin type 2. *J Med Chem* **47**: 6292-6298.
- TRICK, W. E., S. K. FRIDKIN, J. R. EDWARDS, R. A. HAJJEH and R. P. GAYNES, 2002 Secular trend of hospital-acquired candidemia among intensive care unit patients in the United States during 1989-1999. *Clin Infect Dis* **35**: 627-630.
- UETZ, P., L. GIOT, G. CAGNEY, T. A. MANSFIELD, R. S. JUDSON *et al.*, 2000 A comprehensive analysis of protein-protein interactions in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nature* **403**: 623-627.
- VERSTREPEN, K. J., and F. M. KLIS, 2006 Flocculation, adhesion and biofilm formation in yeasts. *Mol Microbiol* **60**: 5-15.
- WELLINGTON, M., K. DOLAN and D. J. KRYSAN, 2009 Live *Candida albicans* suppresses production of reactive oxygen species in phagocytes. *Infect Immun* **77**: 405-413.
- WONG, S., M. A. FARES, W. ZIMMERMANN, G. BUTLER and K. H. WOLFE, 2003 Evidence from comparative genomics for a complete sexual cycle in the 'asexual' pathogenic yeast *Candida glabrata*. *Genome Biol* **4**: R10.
- XENARIOS, I., D. W. RICE, L. SALWINSKI, M. K. BARON, E. M. MARCOTTE *et al.*, 2000 DIP: the database of interacting proteins. *Nucleic Acids Res* **28**: 289-291.