



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

**POSGRADO EN CIENCIAS EN BIOLOGÍA MOLECULAR**

**Caracterización molecular del complejo Sir en  
aislados clínicos hiperadherentes de  
*Candida glabrata***

Tesis que presenta

**Osney Leiva Peláez**

Para obtener el grado de

**Doctor en Ciencias en Biología Molecular**

Directora de la Tesis:

**Dra. Irene Beatriz Castaño Navarro**

San Luis Potosí, S.L.P., Julio de 2018



## Constancia de aprobación de la tesis

La tesis “**Caracterización molecular del complejo SIR en aislados clínicos hiperadherentes de *Candida glabrata***” presentada para obtener el Grado de Doctor en Ciencias en Biología Molecular fue elaborada por **Osney Leiva Peláez** y aprobada el once de julio del dos mil dieciocho por los suscritos, designados por el Colegio de Profesores de la División de Biología Molecular del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C.

**Dra. Irene Beatriz Castaño Navarro**  
Directora de la tesis

**Dr. Luis Antonio Salazar Olivo**  
Miembro del Comité Tutorial

**Dr. J. Sergio Casas Flores**  
Miembro del Comité Tutorial

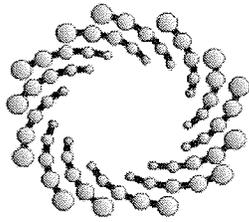
**Dr. Roberto Sánchez Olea**  
Miembro del Comité Tutorial



## **Créditos Institucionales**

Esta tesis fue elaborada en el Laboratorio de Microbiología Molecular de la División de Biología Molecular del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C., bajo la dirección de la Dra. Irene Beatriz Castaño Navarro, apoyada por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) con el proyecto No. CB-2014-239629 y el proyecto No. 161971 del Fondo Sectorial de Salud (FOSISS).

Durante la realización del trabajo el autor recibió una beca académica del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología con No. de registro 623207.



**IPICYT**

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

## Acta de Examen de Grado

El Secretario Académico del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C., certifica que en el Acta 100 del Libro Primero de Actas de Exámenes de Grado del Programa de Doctorado en Ciencias en Biología Molecular está asentado lo siguiente:

En la ciudad de San Luis Potosí a los 11 días del mes de julio del año 2018, se reunió a las 17:00 horas en las instalaciones del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C., el Jurado integrado por:

<b>Dr. Luis Antonio Salazar Olivo</b>	<b>Presidente</b>	<b>IPICYT</b>
<b>Dr. J. Sergio Casas Flores</b>	<b>Secretario</b>	<b>IPICYT</b>
<b>Dra. Irene Beatriz Castaño Navarro</b>	<b>Sinodal</b>	<b>IPICYT</b>
<b>Dr. Roberto Sánchez Olea</b>	<b>Sinodal externo</b>	<b>UASLP</b>

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

**DOCTOR EN CIENCIAS EN BIOLOGÍA MOLECULAR**

sustentó el C.

**Osney Leiva Peláez**

sobre la Tesis intitulada:

*Caracterización molecular del complejo SIR en aislados clínicos hiperadherentes de Candida glabrata*

que se desarrolló bajo la dirección de

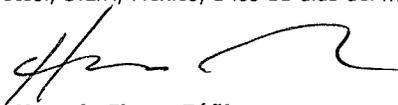
**Dra. Irene Beatriz Castaño Navarro**

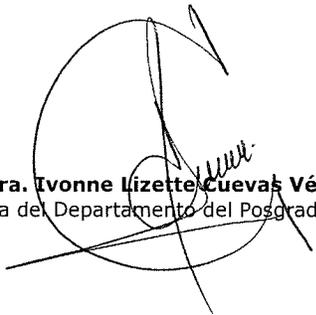
El Jurado, después de deliberar, determinó

**APROBARLO**

Dándose por terminado el acto a las 18:55 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 11 días del mes de julio de 2018.

  
**Dr. Horacio Flores Zúñiga**  
Secretario Académico

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



## Dedicatorias

Esta tesis se la dedico en especial a mis padres y a mi abuela, a todas esas personas que me apoyaron y se sienten orgullosas de mí.

A mis amigos de antes y ahora, los que siempre me apoyan.

A la persona más especial: Jose Luis.

*"Haz las cosas que te gusten, aunque de momento no sepas por qué te atraen. No te cortes las alas. Sigue tu intuición"* **Steve Jobs**

## **Agradecimientos**

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

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología

Al Laboratorio Nacional de Biotecnología Agrícola, Médica y Ambiental (LANBAMA)

A la Dra. Irene Castaño por todo lo que me enseñó durante este largo recorrido, cada día mostrando lo que es ser un buen pedagogo e investigador. Gracias por su paciencia y por ayudarme a mejorar mi pensamiento científico.

Al Dr. Alejandro de las Peñas, el Dr. Roberto Sanchez, el Dr. Luis Salazar y también al Dr. Sergio Casas, ya que siempre tuvieron comentarios oportunos para la mejora y comprensión de este trabajo.

A la Dra. Guadalupe Gutierrez por su ayuda técnica en los experimentos y dudas surgidas durante el trabajo en el laboratorio.

A Cintia Gomez Muñoz por su ayuda con los experimentos de Electroforesis de Campo Pulsante.

A Gloria Lopez por su constante apoyo con el material de laboratorio y su optimismo.

Y sobre todo muchas gracias a mis amigos del laboratorio 6, los presentes y los que ya no están aquí, por su apoyo, sus ideas, y compartir todas mis locuras.

# Contenido

<b>PORTADA</b>	<b><i>i</i></b>
<b>CONSTANCIA DE APROBACIÓN DE LA TESIS</b>	<b><i>ii</i></b>
<b>CRÉDITOS INSTITUCIONALES</b>	<b><i>iii</i></b>
<b>ACTA DE EXAMEN</b>	<b><i>iv</i></b>
<b>DEDICATORIAS</b>	<b><i>v</i></b>
<b>AGRADECIMIENTOS</b>	<b><i>vi</i></b>
<b>LISTA DE ILUSTRACIONES</b>	<b><i>ix</i></b>
<b>LISTA DE TABLAS</b>	<b><i>xi</i></b>
<b>ANEXOS</b>	<b><i>xii</i></b>
<b>RESUMEN</b>	<b><i>xiii</i></b>
<b>ABSTRACT</b>	<b><i>xiv</i></b>
<b>1.INTRODUCCION</b>	
1. <i>Candida glabrata</i> : un patógeno emergente	1
1.2 Factores de virulencia	2
1.3 Resistencia a antifúngicos	2
1.4 Resistencia a estrés oxidante	3
1.5 Rearreglos cromosómicos	4
1.6 Formación de biopelículas	6
1.7 Adherencia a superficies	7
1.8 Silenciamiento subtelomérico	10
1.9 Proteínas Sir en el silenciamiento subtelomérico	11
<b>2. ANTECEDENTES DIRECTOS</b>	<b>14</b>
<b>3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA</b>	<b>16</b>
<b>4. HIPÓTESIS</b>	<b>17</b>

<b>5. ESTRATEGIA</b>	<b>17</b>
<b>6. OBJETIVO GENERAL</b>	<b>17</b>
<b>7. OBJETIVOS ESPECÍFICOS</b>	<b>18</b>
<b>8. MATERIALES Y MÉTODOS</b>	<b>19</b>
<b>9. RESULTADOS</b>	<b>27</b>
<b>10. RESULTADOS ADICIONALES</b>	<b>34</b>
<b>11. DISCUSIÓN</b>	<b>41</b>
<b>12. CONCLUSIONES</b>	<b>47</b>
<b>13. ANEXOS</b>	<b>49</b>
<b>14. REFERENCIAS</b>	<b>94</b>

## LISTA DE ILUSTRACIONES

**Ilustración 1.** Dos posibles mecanismos de formación de nuevos cromosomas.

**Ilustración 2.** Ultraestructura de biopelícula en *C. glabrata* a los 6 días en superficie de poliuretano.

**Ilustración 3.** El genoma de *C. glabrata* codifica 66 proteínas putativas de pared celular.

**Ilustración 4.** Representación esquemática del complejo Sir y los dominios de la proteína Sir3.

**Ilustración 5.** Modelo de asociación del complejo Sir con la cromatina a través de puentes internucleosomales.

**Ilustración 6.** Dominios de la proteína Sir3 en *C. glabrata* y *S. cerevisiae*.

**Ilustración 7.** Dominios de la proteína Sir4 en *C. glabrata* y *S. cerevisiae*.

**Ilustración 8.** Plásmidos construidos durante clonación del gen *SIR3*.

**Ilustración 9.** Ensayos de complementación con los alelos *SIR* de los aislados clínicos en estudio.

**Ilustración 10.** El alelo *sir3*-MC2 no complementa la cepa *sir3* $\Delta$ .

**Ilustración 11.** El alelo *sir3*-MC2 no disminuye el fenotipo hiperadherente de la cepa *sir3* $\Delta$ .

**Ilustración 12.** La interacción de polimorfismos en el alelo *sir3*-MC2 son necesarios para su pérdida de función.

**Ilustración 13.** La Quimera 2 no complementa la información genética de la cepa BG14 *sir3* $\Delta$  en el ensayo de adherencia a células epiteliales.

**Ilustración 14.** Polimorfismos en la longitud de cromosomas en el cariotipo de los aislados clínicos de *C. glabrata* en estudio.

**Ilustración 15.** Representación esquemática de la estructura de genes *EPA*.

**Ilustración 16.** Representación esquemática del minisatelite presente en *EPA1*.

**Ilustración 17.** Los minisatélites de los genes *EPA1* en los aislados clínicos presentan polimorfismos de tamaño.

**Ilustración 18.** Detección del EN asociado al gen *EPA1* en los aislados clínicos en estudio de *C. glabrata*.

**Ilustración 19.** Adherencia al plástico de cepas de *C. glabrata*.

## LISTA DE TABLAS

**Tabla 1.** Distribución de aislados de *Candida sp.* en infecciones sistémicas en distintas zonas geográficas: Programa de vigilancia SENTRY 2008-2009.

**Tabla 2.** Clasificación de minisatelites (MS).

**Tabla 3.** El genoma de *C. glabrata* codifica 66 proteínas putativas de pared celular.

**Tabla 4.** Expresión de genes *EPA* en respuesta a diversas señales ambientales.

**Tabla 5.** Detección de la presencia de algunos genes *EPA* en aislados clínicos de *C. glabrata*.

**Tabla 6.** Detección del minisátelite presente en el gen *EPA1* de los aislados clínicos.

## ANEXOS

- Anexo 1.** Cepas de *C. glabrata* y *Saccharomyces cerevisiae* usadas en este estudio.
- Anexo 2.** Cepas de *Escherichia coli* y plásmidos usados en este trabajo.
- Anexo 3.** Oligonucleótidos usados en este trabajo.
- Anexo 4.** Polimorfismos presentes en la proteína Sir3 de los aislados clínicos en estudio.
- Anexo 5.** Polimorfismos presentes en la proteína Sir4 de los aislados clínicos en estudio.
- Anexo 6.** Alineamiento del Elemento Negativo asociado a *EPA1* en los aislados clínicos.
- Anexo 7.** El Elemento Negativo asociado a *EPA1* se encuentra conservado entre los aislados clínicos.
- Anexo 8.** Alineamiento de la adhesina Epa1 entre cepas control de *C. glabrata*.
- Anexo 9.** Alineamiento de la adhesina Epa2 entre cepas control de *C. glabrata*.
- Anexo 10.** Alineamiento de la adhesina Epa3 entre cepas control de *C. glabrata*.
- Anexo 11.** Alineamiento de las regiones promotoras de los genes *SIR3* en las cepas BG14, CBS138 y el aislado clínico MC2.
- Anexo 12.** Alineamiento de las regiones 3' UTR de los genes *SIR3* en las cepas BG14, CBS138 y el aislado clínico MC2.
- Anexo 13.** El gen *sir3*-MC2 se expresa a niveles similares a los genes *SIR3*-BG14 y *SIR3*-CBS138.
- Anexo 14.** Ficha bibliográfica del artículo publicado.

## RESUMEN

### “Caracterización molecular del complejo Sir en aislados clínicos hiperadherentes de *Candida glabrata*”

*Candida glabrata* se ha convertido en un patógeno de humanos importante debido al incremento de su aislamiento en infecciones fúngicas de la sangre. Un factor de virulencia importante para el patógeno *C. glabrata* es su habilidad para adherirse a las células del hospedero, lo cual es mediado por la expresión de adhesinas. Epa1 es la adhesina responsable de ~95% de la adherencia *in vitro* a células epiteliales y es el primer miembro de la familia de adhesinas Epa. La mayoría de los genes *EPA* se encuentran localizados cerca de diferentes telómeros, lo cual causa su represión transcripcional debido al mecanismo de silenciamiento subtelomérico. En *C. glabrata* hay tres proteínas Sir (Sir2, Sir3 y Sir4) que son esenciales para el silenciamiento subtelomérico. En una colección de 79 aislados clínicos, algunos de ellos muestran un fenotipo hiperadherente a células epiteliales comparado con nuestra cepa estándar de laboratorio BG14. Estos aislados hiperadherentes también expresan varios genes *EPA* simultáneamente. Nosotros clonamos los genes *SIR2*, *SIR3* y *SIR4* de los aislados clínicos hiperadherentes, de la cepa BG14 y la cepa secuenciada CBS138 en un vector replicativo para complementar cepas mutantes nulas de estos genes en el fondo genético de la cepa BG14. Todos los alelos evaluados de los genes *SIR2* y *SIR4* provenientes de los aislados clínicos hiperadherentes escogidos, fueron funcionales y eficientes para silenciar un gen reportero *URA3* insertado en la región subtelomérica, a pesar de tener polimorfismos en la secuencia de amino ácidos respecto a la cepa BG14. Los alelos *SIR3* también fueron funcionales, excepto el alelo *SIR3* del aislado clínico MC2 (*sir3*-MC2), que no fue funcional para silenciar el gen reportero y no complementó el fenotipo hiperadherente de la cepa BG14 *sir3*Δ. Consecuentemente, el alelo *sir3*-MC2 es recesivo al alelo *SIR3* de la cepa BG14. La combinación de polimorfismos en el alelo *sir3*-MC2 y en el alelo *SIR4*-MC2 podrían explicar en parte el fenotipo hiperadherente mostrado por este aislado clínico.

**Palabras clave:** *Candida glabrata*, hiperadherencia, aislados clínicos, complejo *SIR*

## ABSTRACT

### “Molecular characterization of the silencing complex *SIR* in *Candida glabrata* hyperadherent clinical isolates”

*Candida glabrata* has become an important human pathogen due to the increased frequency of isolation in fungal blood infections. An important virulence factor for *C. glabrata* is the ability to adhere to the host cells, which is mediated by the expression of adhesins. Epa1 is responsible for ~95% of the *in vitro* adherence to epithelial cells and is the founding member of the Epa family of adhesins. The majority of *EPA* genes are localized close to different telomeres, which causes transcriptional repression due to subtelomeric silencing. In *C. glabrata* there are three Sir proteins (Sir2, Sir3 and Sir4) that are essential for subtelomeric silencing. Among a collection of 79 clinical isolates, some display a hyperadherent phenotype to epithelial cells compared to our standard laboratory strain, BG14. These isolates also express several subtelomeric *EPA* genes simultaneously. We cloned the *SIR2*, *SIR3* and *SIR4* genes from the hyperadherent isolates and from the BG14 and the sequenced strain CBS138 in a replicative vector, to complement null mutants in each of these genes in the BG14 background. All the *SIR2* and *SIR4* alleles tested from selected hyper-adherent isolates were functional and efficient to silence a *URA3* reporter gene inserted in a subtelomeric region, even though they contain several amino acid polymorphisms when compared to the BG14 proteins. The *SIR3* alleles from these isolates were also functional, except the allele from isolate MC2 (*sir3*-MC2), which was not functional to silence the reporter and did not complement the hyperadherent phenotype of the BG14 *sir3*Δ. Consistently, *sir3*-MC2 allele is recessive to the *SIR3* allele from BG14. The combination of polymorphisms in *sir3*-MC2 and in *SIR4*-MC2 could explain in part the hyperadherent phenotype displayed by this isolate.

**Keywords:** *Candida glabrata*, hyperadherence, clinical isolates, *SIR* complex

# 1.INTRODUCCIÓN

## 1.1 *Candida glabrata*: un patógeno emergente

*Candida glabrata* es una levadura saprófita que se encuentra como comensal en las mucosas de personas sanas y que en condiciones normales no produce enfermedad. Sin embargo, *C. glabrata* puede comportarse como un patógeno oportunista y causar infección de la mucosa oral o vaginal o incluso infección sistémica, cuando las defensas inmunológicas del hospedero están debilitadas a consecuencia de otras enfermedades, tratamientos invasivos como el uso de catéteres y nutrición parenteral o largas estadías hospitalarias. Debido en parte al uso indiscriminado de terapias antifúngicas las infecciones generadas por *C. glabrata* son cada vez más comunes.

*Candida albicans* es la especie mayormente aislada en candidemias en todo el mundo pero en EUA la levadura *C. glabrata* ocupa el segundo lugar como agente etiológico en infecciones fúngicas sistémicas (Diekema et al. 2012) (Cleveland et al. 2015). Es importante destacar que la frecuencia de aislamiento de *C. glabrata* en México y Latinoamérica en candidemias es distinto que en EUA, con valores de 4-6% y 22-26% respectivamente (Diekema et al. 2009) (Pfaller et al. 2011)(Tabla 1). En estas regiones el aislamiento de otras especies como *Candida tropicalis* y *Candida parapsilosis* son cada vez más frecuentes (Nucci et al. 2013) (J. Villalobos et al. 2016).

**Tabla 1.** Distribución de aislados fúngicos en infecciones sistémicas en distintas zonas geográficas: Programa de vigilancia SENTRY 2015. Modificada de Pfaller et al., 2017.

Organism	Asia-Pacific	Europe	Latin America	North America	All
<i>Candida albicans</i>	32	161	28	83	304*
<i>Candida glabrata</i>	12	53	7	49	121
<i>Candida parapsilosis</i>	8	46	9	20	83
<i>Candida tropicalis</i>	20	14	10	11	55
<i>Candida krusei</i>	2	6	1	5	14
<i>Candida dubliniensis</i>	2	5	0	5	12
<i>Cryptococcus neoformans</i> var. <i>grubii</i>	0	2	5	7	14
<i>Aspergillus fumigatus</i>	8	36	7	46	97
<i>Aspergillus flavus</i> species complex	0	6	5	2	13
Total	84	329	72	228	713

\* Total number of isolates

## 1.2 Factores de virulencia

El éxito de *C. glabrata* como patógeno se debe en parte a la presencia de diversos factores de virulencia, los cuales contribuyen a que la levadura pueda adaptarse mejor en los distintos tejidos del hospedero, resistir condiciones no favorables o adherirse a superficies abióticas, lo que facilita su supervivencia y/o diseminación.

## 1.3 Resistencia a antifúngicos

Las infecciones causadas por *C. glabrata* son difíciles de tratar ya que se ha visto que existen cepas que presentan resistencia innata a fluconazol y otros azoles (Pfaller et al. 2004) los cuales interfieren con la síntesis de ergosterol en la membrana celular del hongo inhibiendo de esta forma su crecimiento (White et al. 1998). Los azoles son generalmente los primeros medicamentos que se prescriben para tratar candidiasis en pacientes que no están gravemente enfermos (Pappas et al. 2015), de lo contrario se utilizan antifúngicos diferentes como son las equinocandinas (casposfungina, anidulafungina y micafungina), los cuales actúan por inhibición de la síntesis de 1,3- $\beta$ -D-glucano en la pared celular fúngica (Perlin 2009)(Pfaller et al. 2017).

En *C. glabrata* la resistencia a fluconazol está regulada negativamente por el complejo Hst1-Rfm1-Sum1 (complejo HRS). El complejo HRS reprime la expresión de los genes *CDR1* y *PDR1*, los cuales codifican para una bomba de flujo de fármacos y el factor de transcripción de *CDR1* respectivamente (Orta-Zavalza et al. 2013) (Ma et al. 2009). Sin embargo, existen varios mecanismos por los cuales *C. glabrata* puede adquirir resistencia al fluconazol: 1) Inducción de bombas de flujo para expulsar el fluconazol de la célula, 2) Mutaciones puntuales en el gen *ERG11* (codifica una enzima diana a la cual se une el fluconazol) que disminuyen la afinidad de unión de su producto a los azoles, 3) Sobreexpresión de *ERG11*, 4) Desarrollo de vías alternas para compensar el daño del fluconazol en la membrana celular (Pfaller 2012).

Debido a lo anterior, está recomendado el estudio de la sensibilidad a azoles de

todos los aislados clínicos provenientes de la sangre o de otros sitios anatómicos relevantes, y en casos donde haya resistencia a azoles y equinocandinas se debe proceder al uso de formulaciones lipídicas como la amfotericina B (Pappas et al. 2015). A pesar del esfuerzo de la comunidad médica en los últimos años ya se ha reportado en Europa y Norteamérica la presencia de aislados clínicos de *C. glabrata* resistentes a fluconazol que también lo son a equinocandinas (Pfaller et al. 2011).

#### **1.4 Resistencia a estrés oxidante**

En las células las especies reactivas del oxígeno (ERO) se producen normalmente durante la respiración aeróbica, aunque estas moléculas también pueden aparecer debido a determinados estímulos como exposición a radiaciones ionizantes o a altas presiones de oxígeno. En condiciones fisiológicas normales las células cuentan con sistemas enzimáticos y no enzimáticos de detoxificación para eliminar las ERO debido a que estas moléculas pueden causar diferentes tipos de daño en las estructuras celulares y en el DNA. Estos sistemas de detoxificación han sido estudiados en hongos como *S. cerevisiae* (Kuge and Jones 1994)(Morgan et al. 1997), *Candida albicans* (Nakagawa et al. 2003), *Aspergillus fumigatus* (Fan et al. 2016) y *C. glabrata* (Cuellar-Cruz et al. 2008)(Gutiérrez-Escobedo et al. 2013) entre otros, ya que durante las infecciones fúngicas el sistema inmune del hospedero utiliza como primera barrera de defensa a las células fagocíticas para contrarrestar el avance de la infección (Mansour and Levitz 2002).

Muchas de las proteínas que participan en la respuesta a estrés oxidante están bien conservadas en hongos (Aguirre et al. 2005). En *C. glabrata* la resistencia a estrés oxidante está regulada por los factores de transcripción Yap1, Skn7, Msn2 y Msn4 (Cuellar-Cruz et al. 2008) (Hasan et al. 2002) y de forma similar ocurre en *S. cerevisiae* (Morgan et al. 1997), mientras que en *C. albicans* Msn2 y Msn4 no parecen estar involucrados en la respuesta al estrés oxidante (Nicholls et al. 2004). Se ha visto que *C. glabrata* resiste altas concentraciones de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> *in vitro*, incluso mucho más que *C. albicans* y *S. cerevisiae* (Cuellar-Cruz et al. 2008).

Además *C. glabrata* puede sobrevivir y multiplicarse dentro de los macrófagos del hospedero a través de la activación de un cluster de ocho genes llamados *YPS* que codifican una familia de aspartil proteasas putativas (Kaur et al. 2007).

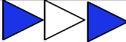
Estas características le proporcionan ventajas a *C. glabrata* para evadir la respuesta inmune del hospedero y de esta forma diseminarse exitosamente.

### **1.5 Rearreglos cromosómicos**

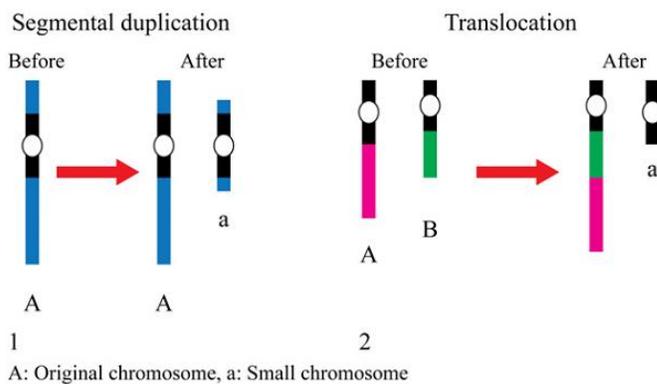
De manera general, el número de cromosomas en las especies eucariontes es estable y es muy raro que ocurran fenómenos de pérdida o ganancia de los mismos. Sin embargo, se ha reportado que el genoma de *C. glabrata* muestra gran plasticidad ya que se rearregla frecuentemente incluso durante el curso de la infección en un mismo paciente (Klemp-Selb et al. 2000) (Jong et al. 2007) (Poláková et al. 2009) lo cual se correlaciona con una mejor adaptación. Algunos cambios en el genoma de *C. glabrata* correlacionan con mayor resistencia a antifúngicos, lo cual puede resultar en tener mayor ventaja de adaptación a los ambientes cambiantes del hospedero (Poláková et al. 2009).

Los cambios más frecuentes en el cariotipo de *C. glabrata* son debido a polimorfismos en el tamaño de los cromosomas, principalmente debido a translocaciones de secuencias repetidas en tándem dentro de algunos genes llamadas minisatélites (Muller et al. 2009). En *C. glabrata* existen dos tipos inusuales de minisatélites (Tabla 2), llamados MS compuestos (tienen dos motivos diferentes repetidos alternativamente) y megasatélites (son MS con motivos de más de 100 nucleótidos) (Thierry et al. 2008) (Tekai et al. 2013). El genoma de *C. glabrata* de la cepa secuenciada presenta 40 megasatélites distribuidos en 11 cromosomas y muchos de ellos se encuentran en genes cercanos a los telómeros. La presencia de minisatélites ha sido descrita en distintos genes *EPA* como: *EPA1*, *EPA2*, *EPA3*, *EPA11*, *EPA13* and *EPA15* (Thierry et al. 2008).

**Tabla 2.** Clasificación de minisatélites (MS)

Minisatélites	Longitud de los motivos base	Disposición y tipo de los motivos
Simples	12 a 99 nucleótidos	
Compuestos	12 a 99 nucleotidos	
Megasatélites	Más de 99 nucleótidos	

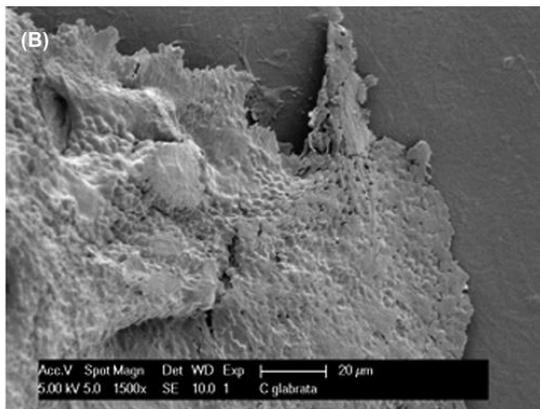
Segmentos duplicados de cromosomas, duplicación de cromosomas o aparición de cromosomas extras es un fenómeno muy frecuente en *C. glabrata* (Ilustración 1). De manera general cuando se forman nuevos cromosomas en *C. glabrata* estos presentan genes duplicados relacionados con la resistencia a antifúngicos como son los genes de la familia de transportadores ABC (Ahmad et al. 2013). También se ha reportado la duplicación de un gran número de genes que codifican adhesinas pertenecientes a distintas familias en aislados clínicos de *C. glabrata* obtenidos de manera secuencial luego de terapia antifúngica (Vale-Silva et al. 2017).



**Ilustración 1.** Dos posibles mecanismos de formación de nuevos cromosomas. Imagen tomada de Ahmad et al. 2014.

## 1.6 Formación de biopelículas

La formación de biopelículas es otro de los factores de virulencia que hacen de *C. glabrata* un patógeno exitoso. Las biopelículas son comunidades de microorganismos que crecen en tres dimensiones protegidos por una matriz de glicoproteínas unidos a una superficie biótica o abiótica (Donlan and Costerton 2002) (Ilustración 2), lo cual en el caso de aislados clínicos cobra mayor importancia ya que pueden colonizar instrumentos médicos como catéteres venosos y urinarios, dispositivos intrauterinos, materiales dentales etc.



**Ilustración 2.** Ultraestructura de biopelícula de *C. glabrata* a los 6 días en superficie de poliuretano. Modificado de Kucharikova et al. 2015.

La matriz extracelular de la biopelícula contribuye a la protección de las células debido a que por ejemplo: 1) Limita la entrada de leucocitos y macrófagos (Thurlow et al. 2012), 2) Secuestra antimicrobianos lo que hace que las células sobrevivan concentraciones más altas a la Concentración Mínima Inhibitoria en condiciones planctónicas para esas mismas drogas (Hall-Stoodley and Stoodley 2009) (Marshall C Walters et al. 2003), 3) Se ha sugerido que puede bloquear la activación del complemento durante la respuesta inmune (Wilson 2001).

A diferencia de otras levaduras, en *C. glabrata* la formación de biopelículas está mediada principalmente por la familia de proteínas de pared celular Epa, donde Epa6 y Epa7 juegan un rol muy importante en la formación de una biopelícula madura (Kaur et al. 2005) (Iraqi et al. 2005) (D'Enfert and Janbon 2015). Por

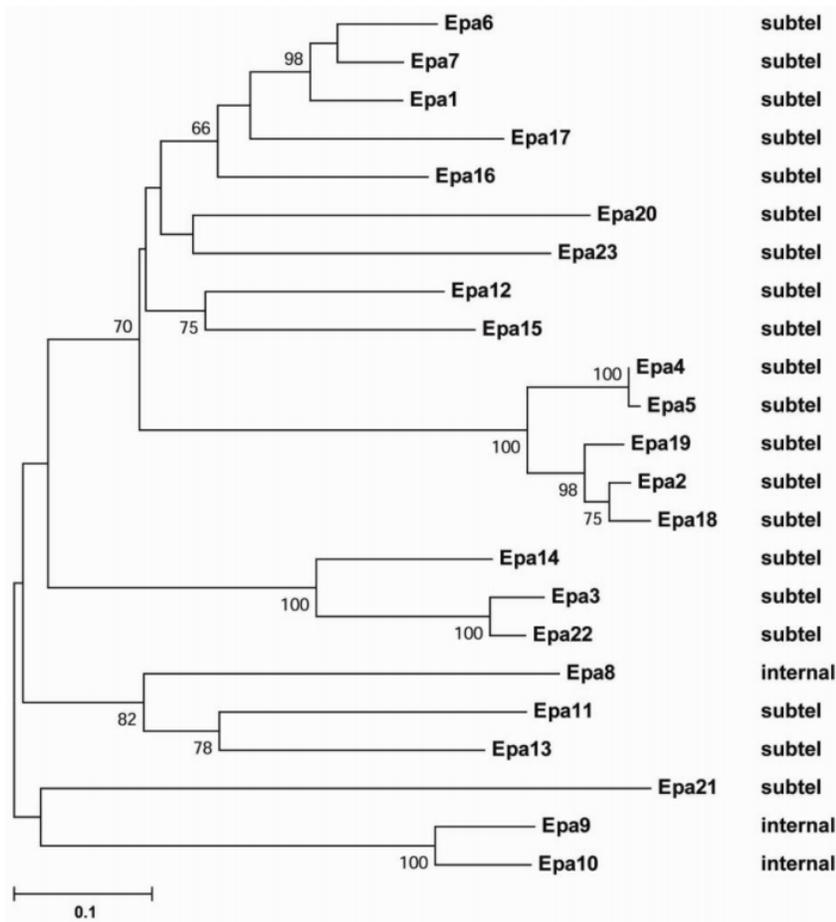
otro lado, se ha visto que durante la formación de biopelículas en *C. glabrata* ocurre una remodelación de la pared celular incluyendo variaciones en sus propiedades físicas como por ejemplo la hidrofobicidad, ya que esto le facilita la adhesión a superficies abióticas (El-Kirat-Chatel et al. 2015) (Kraneveld et al. 2011) (Kucharíková et al. 2015).

## 1.7 Adherencia

La adherencia a los tejidos del hospedero es un factor de virulencia muy importante ya que facilita el comienzo de la infección de los patógenos. En *C. glabrata* se han descrito varias familias de proteínas de pared celular de acuerdo a la similitud en el extremo N-terminal de las mismas (De Groot et al. 2008) (Tabla 3). La familia Epa (epitelial adhesins)(Ilustración 3) codifica proteínas de pared celular tipo lectinas pues reconocen ligandos que contienen residuos de galactosa gracias a su dominio PA14 en el extremo N-terminal (Zupancic et al. 2008). Esta familia ha sido bien estudiada y se ha visto que Epa1, Epa6 y Epa7 median la adherencia *in vitro* a células epiteliales y endoteliales (Cormack et al. 1999)(Castaño et al. 2005)(Zupancic et al. 2008)(Domergue 2005)(Martínez-Jiménez et al. 2013). Por otro lado, la familia Epa también media la adhesión a superficies plásticas y participa en la formación de biopelículas. Se ha visto que en la cepa secuenciada CBS138 la adhesina Epa3, pero no Epa6, se induce en la formación de biopelículas *in vitro* en placas de poliestireno cuando el cultivo crece en medio de cultivo YPD (Kraneveld et al. 2011). Sin embargo, El-Kirat-Chatel et al. 2015, reportaron en esta misma cepa la participación de Epa6 en la formación de biopelículas maduras. Iraqui et al. 2005 reportó que en la cepa BG2 durante la formación *in vitro* de biopelículas se indujeron las adhesinas Epa6 y Epa7. Estas diferencias de expresión y participación de adhesinas en biopelículas podrían estar relacionadas en parte con el fondo genético de cada cepa y con los medios de cultivo utilizados en los experimentos.

Subgrupo	No. de proteínas	No. de proteínas con localización subtelomérica
I, Familia Epa	17	14
II, Familia Pwp	7	1
III	13	11
IV	3	3
V, incluye Awp2	13	12
VI, incluye Awp1	7	1
VII	5	2
Otros	2	0
<b>Total</b>	<b>66</b>	<b>44</b>

**Tabla 3.** El genoma de *C. glabrata* codifica 66 proteínas putativas de pared celular. Modificado de: De Groot et al. 2008.



**Ilustración 3.** Familia de adhesinas Epa en la cepa BG2. Dendrograma mostrando la relación filogenética de las 23 adhesinas de la cepa BG2, según similitud en el extremo N-terminal.

La expresión de estas adhesinas Epa está fuertemente regulada y puede responder a diversas señales ambientales (Tabla 4). Debido a que estos genes se encuentran localizados en regiones subteloméricas, en la cepa BG14 (Cormack and Falkow 1999) se encuentran reprimidos transcripcionalmente en la mayoría de las condiciones estudiadas *in vitro* (De Las Peñas et al. 2003) (Castaño et al. 2005) debido al mecanismo de silenciamiento subtelomérico. Epa1 se encuentra a ~20kb del telómero derecho del cromosoma E y se encuentra sujeto a una doble regulación negativa, por parte del silenciamiento subtelomérico y por parte de un elemento en *cis* llamado NE (Elemento Negativo) localizado en la región intergénica entre *EPA1* y *EPA2* (Gallegos-García et al. 2012). En la cepa BG14 *EPA1* se induce inmediatamente después de diluir en medio fresco células que se encuentran en fase estacionaria, es decir, durante la primera división celular. Esta inducción es rápidamente reprimida aproximadamente a los 120 minutos en un proceso dependiente del NE y es además específica del promotor de *EPA1* (Gallegos-García et al. 2012).

Adhesin	Induction	Expression in strain
EPA1	First cell division	BG2 CBS138
EPA2	Oxidative stress (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> )	BG2
EPA3	Osmotic stress Glucose starvation	CBS138
EPA4/5		BG2
EPA6	Weak acid-related compounds NA limitation	BG2 CBS138
EPA7		BG2 CBS138
EPA22	Osmotic stress Glucose starvation	CBS138

**Tabla 4.** Inducción de genes *EPA* en respuesta a diversas señales ambientales. Modificado de De Las Peñas *et al.* 2015.

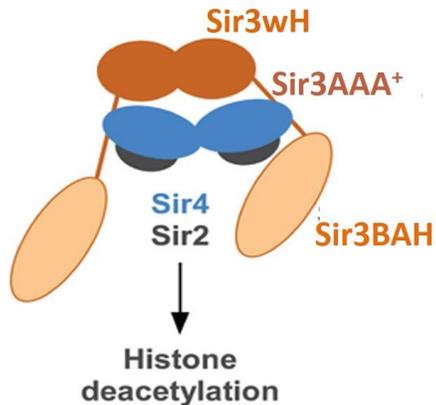
## 1.8 Silenciamiento subtelomérico

Los telómeros son las regiones finales de los cromosomas eucariotas y presentan secuencias cortas repetidas que son diferentes en cada especie. De manera general en *S. cerevisiae* se ha visto que todos los genes cercanos a los telómeros (genes nativos) o insertados cerca de estos, se encuentran silenciados por el mecanismo de silenciamiento subtelomérico (Gottschling et al. 1990). Este es un mecanismo donde la formación de heterocromatina impide la expresión génica y se requiere la participación de diferentes proteínas las cuales varían entre distintos organismos. Se ha propuesto que el silenciamiento comienza en los telómeros y se propaga al interior de los cromosomas ya que la represión de genes reporteros insertados en estas regiones es menor a medida que aumenta la distancia a los telómeros (Rosas-Hernández et al. 2008).

De manera general en *S. cerevisiae* participan durante el silenciamiento subtelomérico las proteínas del complejo Sir (**S**ilent **I**nformation **R**egulators): Sir2, Sir3 y Sir4, junto a la proteína Rap1 (**R**epressor **A**ctivator **P**rotein) y el heterodímero Yku70/80. Rap1 se une a las secuencias repetidas del telómero (Longtine et al. 1989) (Wang and Zakian 1990) y recluta a las proteínas Sir3 y Sir4 (Cockell et al. 1995). Sir4 interactúa con la proteína Sir2, que es una desacetilasa de histonas dependiente de NAD (Hsu et al. 2013) formando un heterodímero estable. La acción de Sir2 genera sitios de unión para Sir3/4 en los extremos N-terminal de las histonas H3 y H4 de los nucleosomas cercanos (Liou et al. 2005) con lo cual el silenciamiento puede propagarse. También se ha reportado en *S. cerevisiae* que el heterodímero Yku70/80 interactúa con Sir4 y esta interacción juega un papel importante en la formación de la cromatina silenciosa (Roy et al. 2004) (Mishra and Shore 1999).

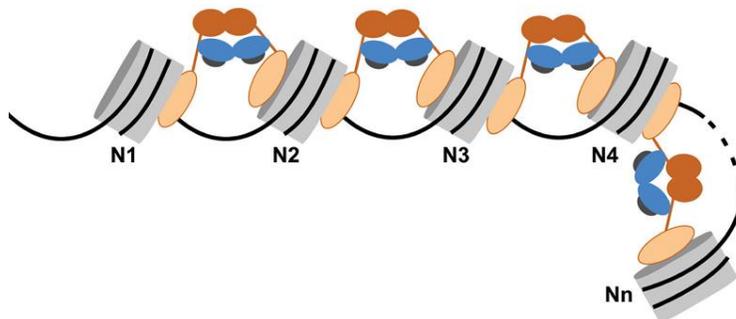
## 1.9 Proteínas Sir en el silenciamiento subtelomérico

Debido a que Sir3 y Sir4 pueden formar homodímeros, y tomando en cuenta la interacción de Sir2 con Sir4, se plantea al complejo Sir como un heterohexámero (Ilustración 4).



**Ilustración 4.** Representación esquemática del complejo Sir y los dominios de la proteína Sir3. Tomado de Behrouzi et al. 2016.

La propagación de la cromatina silenciosa se produce a través de puentes internucleosomales formados a través de la interacción de los monómeros de Sir3 con los nucleosomas adyacentes. Estos puentes son estabilizados por los dominios Sir3-AAA<sup>+</sup> y los dímeros de Sir4 (Ilustración 5). La formación de estos puentes inter-nucleosomales es dependiente del estado de desacetilación de H4K16 y la ausencia de metilación de H3K79 y todo el proceso ocurre de manera cooperativa (Behrouzi et al. 2016).



**Ilustración 5.** Modelo de asociación del complejo Sir con la cromatina a través de puentes internucleosomales. Tomado de Behrouzi et al. 2016.

### Sir3

Sir3 surgió luego de la duplicación genómica ocurrida en *S. cerevisiae* a partir del gen *ORC1* el cual está involucrado en la replicación del ADN (Kellis et al. 2004).



formación de homodímeros de Sir3 contribuye a la estabilización de la proteína y del complejo Sir en su unión a los nucleosomas (Oppikofer et al. 2013).

## Sir4

Sir4 es una proteína no globular sin actividad catalítica descrita, pero juega un papel estructural muy importante en silenciamiento ya que tiene interacciones con diversas proteínas.

Sir4 interacciona con Sir2 a través de su dominio SID formando un heterodímero (Hsu et al. 2013). En su extremo C-terminal Sir4 presenta los dominios PAD y de dimerización (ccD) (Ilustración 7). El dominio Sir4-ccD interacciona con el dominio de dimerización (wH) y el dominio AAA<sup>+</sup> de Sir3, y esta interacción contribuye a la estabilidad del complejo Sir unido a los nucleosomas (Behrouzi et al. 2016). Esta descrito en *S. cerevisiae* que mutaciones en el dominio de dimerización de Sir4 pueden eliminar su interacción *in vitro* con Sir3 (Chang et al. 2003). Los extremos N-terminal y C-terminal de Sir4 interaccionan además con las proteínas de silenciamiento yKu70/80 (Roy et al. 2004) (Tsukamoto et al. 1997), las cuales están involucradas en el mantenimiento de los telómeros y el silenciamiento subtelomérico (Mishra and Shore 1999)(Gravel S., Larrivee M. 1998).

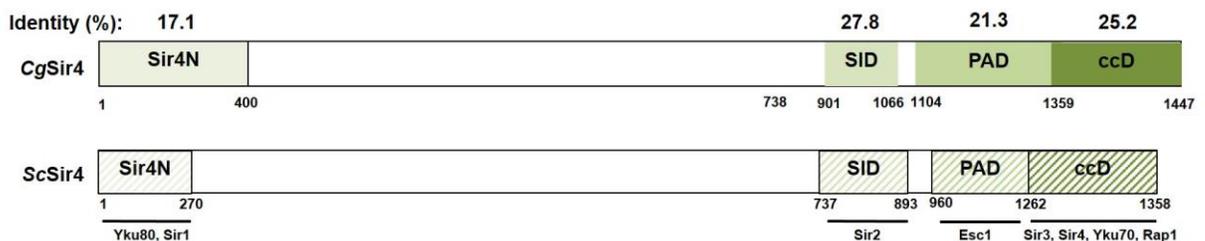


Ilustración 7. Dominios de la proteína Sir4 en *C. glabrata* y *S. cerevisiae*.

## Sir2

Sir2 forma parte de la familia de sirtuinas y son proteínas muy conservadas desde bacterias hasta humanos. En *S. cerevisiae* hay cinco sirtuinas (Sir2 y Hst1-4) (Brachmann CB et al. 1995) y en humanos hay siete (SIRT1-7) (Frye 2000). La

familia de sirtuinas está compuesta por desacetilasas de histonas dependientes de NAD<sup>+</sup> y esta actividad catalítica es muy importante ya que así se crea un ambiente hipoacetilado el cual es un prerrequisito para el silenciamiento. Sir2 interacciona con Sir4 formando un heterodímero durante la formación del complejo Sir y esta interacción estimula alostéricamente la actividad catalítica de Sir2 (Hsu et al. 2013). La desacetilación de los extremos N-terminal de las histonas H3 y H4 crean sitios de afinidad para las proteínas Sir3 y Sir4 (Liou et al. 2005).

## **2. ANTECEDENTES DIRECTOS**

Jiménez y colaboradores, en el año 2013, describieron la presencia de polimorfismos en el gen *SIR3* de aislados clínicos de *C. glabrata*. En ese estudio se caracterizó la capacidad de adherencia a células epiteliales (HeLa) y la expresión de varios genes *EPA* en una colección de 79 aislados clínicos procedentes de distintos hospitales de la Ciudad de México y San Luis Potosí. Los autores encontraron que hubo 11 aislados que mostraron un incremento en los niveles de adhesión a células epiteliales comparado con la cepa de referencia (BG14) de nuestro laboratorio (Cormack and Falkow 1999), en condiciones en las cuales *EPA1* no se expresa. La mayoría de los aislados presentaron una sobreexpresión de *EPA1*, *EPA6* o *EPA7*, pero no mostraron incrementos en su capacidad para formar biopelículas. La secuenciación del gen *SIR3* de algunas de las cepas hiperadherentes mostró que éstas contienen varios polimorfismos en ese gen con respecto a la cepa de referencia (Anexo 4). Sin embargo, no se encontró una correlación clara entre el incremento en la capacidad de adhesión y algún polimorfismo en *SIR3*; aunque en dos aislados hiperadherentes (MC29 y MC68) los polimorfismos encontrados se localizaron en una región flanqueada por grupos de aminoácidos requeridos para el silenciamiento en la proteína Sir3 de *S. cerevisiae*.

En resumen, los autores encontraron que existe una gran variabilidad en la expresión de adhesinas y la adherencia a células epiteliales en *C. glabrata*. De hecho, el artículo propone que hay dos tipos de cepas de *C. glabrata*: aquellas

que en condiciones de fase estacionaria del crecimiento presentan una expresión muy reducida o hasta indetectable de *EPA1* y algunas otras adhesinas debido al silenciamiento subtelomérico (la cepa BG14 pertenece a esta clase de cepas); y la otra clase de cepas se compone de aquellas que bajo estas condiciones de represión por silenciamiento (fase estacionaria) sí expresan algunos de los genes *EPA* y, por lo tanto, se propone que presentan un silenciamiento subtelomérico ineficiente. La cepa secuenciada, CBS138, pertenece a esta segunda categoría. Debido a que el conocimiento actual sobre los mecanismos de regulación de la expresión de genes *EPA* por parte de las diferentes proteínas de silenciamiento es aún insuficiente, se hace necesario estudiar la participación de estas proteínas para entender la función que tienen en la expresión de los genes *EPA* en los diferentes tipos de cepas de *C. glabrata*.

### 3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La capacidad de adherencia a superficies bióticas y abióticas es un factor de virulencia importante en *C. glabrata* ya que facilita el inicio de la infección. Esta adherencia es mediada por proteínas de pared celular llamadas adhesinas y su presencia en la superficie celular puede variar en las cepas dependiendo del fondo genético o de las condiciones de crecimiento (De Groot et al. 2008).

En *C. glabrata* la adherencia a las células del hospedero está mediada fundamentalmente por la familia de adhesinas Epa (Domergue 2005), donde Epa1 juega un rol muy importante en la adhesión a células epiteliales (Cormack et al. 1999). Sin embargo, debido a la localización en el genoma de los genes *EPA*, la mayoría de estos se encuentran sujetos a silenciamiento subtelomérico, al menos en algunas cepas.

En nuestro laboratorio contamos con aislados clínicos hiperadherentes que expresan simultáneamente distintas adhesinas en condiciones que la cepa control BG14 es no adherente (Martínez-Jiménez et al. 2013). Esto sugiere que probablemente en este tipo de aislados hiperadherentes algunas proteínas del silenciamiento no son completamente eficientes.

Nos preguntamos si entre esos aislados clínicos hiperadherentes hay alguno que tenga proteínas Sir deficientes para su función en el silenciamiento subtelomérico y si todos los polimorfismos presentes en estas proteínas se requieren para disminuir o abolir la función de las proteínas Sir.

#### **4. HIPÓTESIS**

La hipótesis del trabajo es que los aislados clínicos hiperadherentes de *C. glabrata* contienen alelos de una o más proteínas Sir deficientes en la actividad de silenciamiento y, por esta razón, expresan varias adhesinas *EPA* simultáneamente.

#### **5. ESTRATEGIA**

Para comprobar nuestra hipótesis realizamos una caracterización molecular de las proteínas del complejo Sir en los aislados clínicos hiperadherentes. Para ello realizamos ensayos de complementación con los alelos *SIR* de los aislados clínicos en el fondo genético de nuestra cepa control BG14 y evaluamos la expresión de un gen reportero *URA3* insertado en una región subtelomérica. También realizamos ensayos de complementación cuantificando el nivel de adherencia a células HeLa en distintos fondos genéticos.

#### **6. OBJETIVO GENERAL**

El objetivo principal de este proyecto es evaluar la funcionalidad de los distintos alelos *SIR* de tres categorías de aislados clínicos hiperadherentes. Para ello se determinó (1) el grado de silenciamiento del gen reportero *URA3* a diferentes distancias de varios telómeros y (2), la capacidad de adherencia a células epiteliales *in vitro*, que indirectamente evalúa el silenciamiento de genes subteloméricos que codifican para adhesinas. El segundo objetivo es caracterizar con mayor detalle la capacidad de adhesión al plástico de los aislados clínicos y la presencia y longitud de los mini-satélites de varios de los genes *EPA*.

## 7. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Clonar los alelos *SIR* de las cepas en estudio en el vector replicativo pMJ22 para realizar los experimentos de complementación.
2. Secuenciar los diferentes alelos *SIR2* y *SIR4* de los aislados clínicos en estudio para identificar la presencia de polimorfismos respecto a nuestra cepa control BG14.
3. Determinar si los genes *SIR* de los diferentes aislados hiperadherentes complementan a cepas mutantes nulas en esos genes en la cepa BG14.
4. Realizar experimentos de complementación para comprobar la funcionalidad del alelo *sir3-MC2* mediante la cuantificación de la adherencia a células epiteliales (HeLa) en distintos fondos genéticos.
5. Separar en dos grupos los polimorfismos del gen *sir3-MC2* para evaluar la contribución de sus polimorfismos en la funcionalidad de ese alelo mediante ensayos de complementación.
6. Determinar el cariotipo de los aislados clínicos para evidenciar la presencia de rearrreglos cromosómicos.
7. Determinar la presencia de distintos genes *EPA* en las cepas evaluadas (aislados clínicos hiperadherentes, no adherentes y cepas estándar) a través de la detección por PCR de su extremo N-terminal.
8. Determinar la presencia de minisatelites en el gen *EPA1* en los aislados clínicos en estudio y correlacionarlo con la adherencia a células epiteliales.
9. Determinar la presencia en los aislados clínicos de la secuencia en *cis* llamada Elemento Negativo que regula negativamente la expresión de *EPA1*.
10. Determinar la capacidad de adherencia al plástico de los aislados clínicos en estudio.

## **8. MATERIALES Y MÉTODOS**

### **8.1 Cepas, plásmidos y oligonucleótidos.**

La Tabla Anexo1 describe todas las cepas de *Escherichia coli* y *C. glabrata* utilizadas en este estudio, mientras que las Tablas Anexo 2 y Anexo 3 enumeran los plásmidos y los oligonucleótidos empleados.

### **8.2 Medios de cultivo.**

Las células de la levadura *C. glabrata* se cultivaron en medio de levadura estándar YPD (del inglés Yeast extract-Peptone-Dextrose) como se describió anteriormente por Sherman et al., 1986. Se añadió agar al 2% final para medios sólidos. Cuando fue necesario, las cajas de YPD fueron suplementadas con nourseotricina (GoldBio) a 100 ug/mL de concentración final.

Las células de bacterias se cultivaron en medio Luria-Bertani como se describió previamente por Ausubel et al., 2003, y se agregó agar a una concentración final de 1.5% para los medios sólidos. Cuando fue necesario el medio Luria-Bertani fue suplementado con diferentes reactivos como carbenicilina (A. G. Scientific) a una concentración final de 50 µg/mL; con 20 µg/ml de cloramfenicol (Shelton Scientific) o con sacarosa (J.T.Baker) esterilizada por filtración a una concentración final de 5%. La cepa bacteriana DH10 se usó para la electroporación.

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

Todas las transformaciones de levaduras con plásmidos lineales o superenrollados se realizaron siguiendo el protocolo descrito por (Castaño et al., 2003).

### **8.4 Secuenciación de genes *SIR* y plásmidos.**

El ADN de los genes *SIR* clonados de los aislamientos clínicos se obtuvo utilizando un kit de extracción Qiagen y se siguieron las instrucciones del fabricante. El ADN se envió a secuenciar al Laboratorio Nacional de

Biotecnología Agrícola, Médica y Ambiental (LANBAMA) con cebadores específicos.

### **8.5 Ensayos de adherencia a placas de poliestireno**

Usamos el protocolo descrito por Martínez-Jiménez et al. 2013 con algunas modificaciones. Las cepas fueron crecidas en medio de cultivo YPD durante 48 horas. Se tomaron 3 mL del precultivo y se centrifugó para colectar las células de levadura. Posteriormente se hicieron dos lavados con PBS 1X y las células se resuspendieron en esta misma solución. Para el cálculo de la concentración celular requerida de  $1 \times 10^7$  células/mL se hizo una dilución 1/1000 y se observaron las células en una cámara de Neubauer. Se adicionaron 100uL de células en cada pozo de la placa de poliestireno resuspendidas en Solución de Hanks suplementado con 5mM de  $\text{Ca}^{2+}$  y se incubó por 90 minutos a 37 grados. Luego de la incubación se procedió a eliminar las células no adherentes mediante dos lavados con 150uL de PBS 1X preparado con agua mili-Q. Para la cuantificación de las células adherentes se utilizó el ensayo de reducción de XTT como fue descrito por Jin et al. 2003 con algunas modificaciones. La solución de XTT fue preparada con PBS a una concentración de 1mg/mL. También se utilizó en el ensayo una solución de menadiona preparada en acetona a 0.5M. Ambas soluciones fueron preparadas en oscuridad. Se adicionaron 100  $\mu\text{L}$  de la solución de XTT-menadiona a las células de levadura adheridas en la placa de poliestireno y se incubó 1 hora a 37°C en la oscuridad en un lector de placas (Benchmark Plus, BioRad). Cada 15 minutos se midió la densidad óptica a una longitud de onda de 490 nm.

### **8.6 Construcción de plásmidos.**

Los genes *SIR2* y *SIR4* de los aislados clínicos hiperadherentes seleccionados se clonaron en el plásmido replicativo de *C. glabrata* pMJ22 (Yáñez-Carrillo et al., 2015, Número Acceso GenBank: KP238569). En términos generales, se amplificaron todos los genes *SIR* con la enzima de alta fidelidad Iproof (Bio-Rad), utilizando los oligonucleótidos apropiados con los correspondientes sitios de

restricción (Anexo 3), de manera que el marco de lectura abierto más las regiones flanqueantes 5' y 3' de cada gen fue amplificado. Los productos de PCR se digirieron con las enzimas de restricción apropiadas para clonarlos en el vector replicativo. Cuando fue necesario, los productos de PCR se clonaron primero en el vector de clonación pMB11 (Briones M. 2008) para asegurar una digestión correcta. Para ello el vector pMB11 se digirió con la enzima *StuI* y luego se ligó al producto de PCR. Para clonar los alelos *SIR2* se usaron los oligonucleótidos 523Fw y 524Rv para amplificar un producto de 3.5kb. Este producto de PCR fue digerido con las enzimas *MfeI* y *KpNI* que cortan en las regiones flanqueantes 5' y 3' respectivamente, para posteriormente rellenar con la enzima Klenow y obtener extremos romos. Con esta digestión se obtuvieron productos con 680pb en la región 5' y 824pb en la región 3' de todos los alelos de *SIR2*. Estos fragmentos fueron clonados en el vector replicativo pMJ22 (Nat<sup>R</sup>) previamente digerido con *EcoRV*.

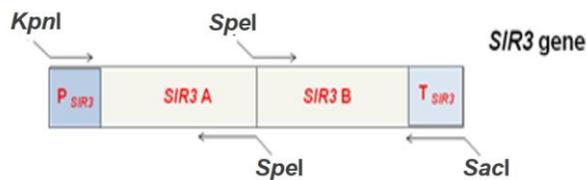
Para clonar los alelos *SIR4* de los aislados clínicos se amplificó un producto de PCR de 6.3kb con los oligonucleótidos 2191Fw y 2192Rv y posteriormente se clonaron en el vector pMB11. Este nuevo vector fue digerido con las enzimas *SnaBI* y *XbaI* las cuales cortan 500pb y 787pb hacia las regiones 5' y 3' respectivamente, resultando en un fragmento de 5.6kb. Los fragmentos de *SIR4* obtenidos de la digestión con *SnaBI* y *XbaI* fueron clonados en el vector replicativo pMJ22 previamente digerido con *EcoRV* y *XbaI*.

Para la clonación de los alelos *SIR3* de los aislados clínicos en el vector replicativo pMJ22 fue necesario seguir otra estrategia (Ilustración 8) ya que no se pudieron obtener los plásmidos con la metodología empleada para clonar *SIR2* y *SIR4*, puesto que es posible que el gen *SIR3* de *C. glabrata* sea tóxico en *E. coli*. Generamos dos productos de PCR para cada alelo utilizando los oligonucleótidos 2178Fw y 2122Rv para el primer producto (A) que contiene la mitad 5' del gen y los oligonucleótidos 2124Fw y 2123Rv para el segundo producto (B) que contiene la mitad 3' de *SIR3*. Cada producto fue clonado por separado en el vector pMB11. El fragmento *SIR3-A* se extrajo de pMB11 con las enzimas *KpNI* (corta 944pb

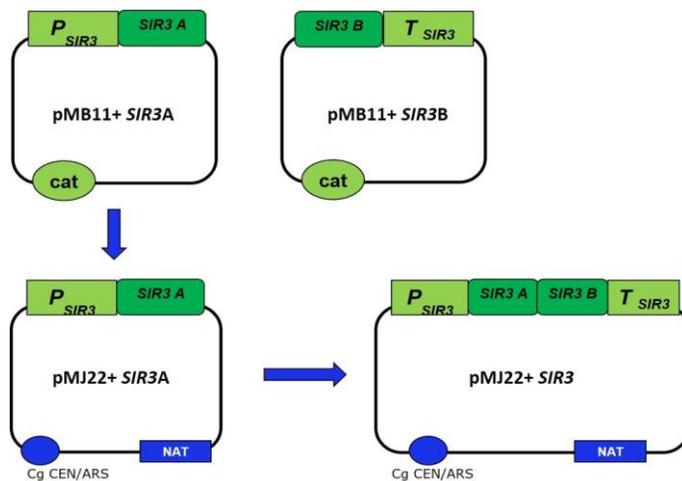
corriente arriba del codón de inicio de *SIR3*) y *SpeI* (corta dentro del marco abierto de lectura de *SIR3* en la base 1088). *SIR3-A* fue clonado en el vector pMJ22 previamente digerido con las mismas enzimas. El fragmento *SIR3-B* fue escindido de pMB11 con las enzimas *SpeI* (corta en la base 1088 de *SIR3*) y *SacI* (corta 1036pb después del codón de paro de *SIR3*). *SIR3-B* contiene los últimos 1379pb del marco de lectura abierto del gen y fue clonado en el plásmido que ya contenía al fragmento *SIR3-A* previamente digerido con las enzimas *SpeI* y *SacI* para reconstituir al gen *SIR3*.

Las clonas de todos los alelos se identificaron por ensayos de PCR de colonias y las colonias positivas se verificaron a continuación por análisis de restricción y posteriormente por secuenciación.

A)



B)



**Ilustración 8.** Plásmidos construidos durante la clonación del gen *SIR3*. A) Estrategia diseñada para la digestión enzimática del gen *SIR3* en los fragmentos *SIR3-A* y *SIR3-B*. B) Representación esquemática de cada paso para obtener la clonación completa del gen *SIR3* en el vector pMJ22.

### 8.7 Construcción de quimeras.

Hemos construido dos quimeras del gen *SIR3* en el vector replicativo pMJ22. En estas quimeras, los fragmentos del gen *SIR3* de la cepa estándar BG14 se intercambiaron por los fragmentos correspondientes del alelo *sir3* del aislado clínico MC2 (*sir3-MC2*). Las quimeras se clonaron en el vector replicativo en *C. glabrata* pMJ22, usando como base al vector pLP189 que contiene al gen *SIR3* de la cepa BG14 e intercambiando los fragmentos correspondientes del alelo *sir3-MC2*. Para obtener la Quimera 1 intercambiamos un fragmento *SpeI/BamHI* de 1354pb en el plásmido que contiene el alelo *SIR3-BG14* por el fragmento correspondiente del alelo *sir3-MC2*. La Quimera 2 se obtuvo sustituyendo el fragmento *XhoI/SpeI* de 1234pb del ORF de *SIR3-BG14* por el fragmento correspondiente de *sir3-MC2*. A continuación, se realizaron pruebas de complementación usando las Quimeras 1 y 2 para determinar el nivel de silenciamiento del gen reportero *URA3*.

### 8.8 Ensayos de complementación.

Realizamos dos ensayos diferentes de complementación para evaluar la funcionalidad de los diferentes alelos *SIR* de los aislados clínicos. Primero determinamos la funcionalidad complementando las correspondientes cepas *sirΔ* en el fondo BG14 y evaluando el nivel de silenciamiento de un gen reportero *URA3* insertado en diferentes posiciones en tres telómeros de estas cepas. El nivel de silenciamiento fue evaluado utilizando el ensayo de sensibilidad a 5-FOA como describió anteriormente Castaño et al., 2005. Las cepas que expresan el gen *URA3* no pueden crecer en las placas con 5-FOA debido a la formación de un compuesto tóxico. El crecimiento en placas con 5-FOA se correlaciona directamente con el nivel de silenciamiento del gen reportero.

### **8.9 Crecimiento y fijación de células HeLa.**

La línea celular HeLa proviene de carcinoma de cuello uterino humano y crece en monocapas como una línea celular epitelial. Las células se cultivaron en placas de cultivo celular (Cell Treat, Scientific Products) de acuerdo con las instrucciones del proveedor en medio de cultivo DMEM (medio esencial mínimo con sales de Earle) [CORNING] suplementado con 10% de FBS (suero fetal bovino) (GOLD-BIO) a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub> en una incubadora de CO<sub>2</sub> (Thermo Scientific). El medio de cultivo se reemplazó cada 2-3 días hasta que la monocapa fue confluyente. Los medios de cultivo se descartaron en condiciones estériles y las células HeLa se fijaron con paraformaldehído al 3.7% en PBS (solución salina tamponada con fosfato) durante 30 minutos a 4°C. Después de la incubación, cada pozo se lavó tres veces con PBS. Se añadió a cada pozo un mililitro de PBS con penicilina 100 U/mL (GOLD-BIO) y estreptomycin 100 µg/mL (SIGMA) para la conservación a 4°C.

### **8.10 Ensayos de adherencia a células HeLa.**

Los ensayos de adherencia se realizaron como describió previamente Martínez-Jiménez et al. 2013. Las células de levadura que portan plásmidos con los alelos *SIR3* se hicieron crecer hasta la fase estacionaria (48h) en YPD suplementado con nourseotricina (100 µg / mL) (SIGMA). Después de las primeras 24 horas de crecimiento, el medio se suplementó una segunda vez con nourseotricina (100 µg / ml) para evitar la pérdida del plásmido.

### **8.11 Ensayos de electroforesis de campo pulsante**

El estudio del cariotipo de los aislados clínicos se realizó mediante la técnica de electroforesis de campo pulsante. La técnica fue llevada a cabo como describió Poláková et al. 2009. Brevemente, 6 x10<sup>8</sup> células de levadura se utilizaron para formar plugs de agarosa al 0.75% luego de que se les adicionaran 30uL de un stock de Liticasa (BIORAD). Las células en contacto con agarosa se mezclaron suavemente y se mantuvieron a 50°C. Para solidificar la agarosa de los plugs, éstos se colocaron a 4 °C de 10 a 15 minutos. Posteriormente los plugs de

agarosa se colectaron en un tubo de 50mL que contenía una solución de liticasa y se incubaron 2 horas a 37°C. Después de la incubación los plugs se lavaron con agua destilada estéril. El tratamiento de los plugs continuó con una incubación a 50°C durante toda la noche en una solución de Proteinasa K (BIORAD). Luego de la incubación se lavaron los plugs cuatro veces con Solución de Lavado 1X (BIORAD). Los plugs se mantuvieron a 4°C. Los cromosomas de los aislados clínicos embebidos en plugs de agarosa fueron separados en un equipo de electroforesis de campo pulsante siguiendo un programa de cinco etapas: etapa 1, pulsos de 240 segundos por 6 h; etapa 2, pulsos de 160 segundos durante 13h; etapa 3, pulsos de 120 segundos por 10 h; etapa 4, pulsos de 90 segundos durante 10 h; y etapa 5, pulsos de 60 segundos por 3h. El voltaje utilizado fue de 150 V (4.5 V/cm).

### **8.12 Ensayo de Western blot**

Para realizar este ensayo construimos cepas mutantes en el fondo genético del aislado clínico MC2 y de la cepa CBS138 en donde etiquetamos el extremo C-terminal de *SIR3* con el epitopo Flag. Para la construcción del vector pCM1 en *E. coli* que contiene el fragmento C-terminal del ORF de *sir3*-MC2-Flag-3'UTR *SIR3*-BG14, primero se amplificó un fragmento de 1.3kb del 3'ORF de *sir3*-MC2 a partir de ADN genómico del aislado MC2, con una enzima de alta fidelidad (Iproof). En esta reacción de PCR se utilizaron los oligonucleótidos 397 Fw y 398 Rv que contienen respectivamente los sitios de restricción *SpeI* y *Bam*HI. El fragmento de PCR se digirió con estas enzimas y se clonó en el vector integrativo pJV18 previamente digerido con *SpeI*/*Bam*HI. Luego de transformar las células de *E. coli* DH10 y verificar que el plásmido pCM1 fuera correcto se hicieron gliceroles de dos colonias independientes con números de cepas 4342 y 4343.

Posteriormente el plásmido pCM1 fue extraído de *E. coli* y digerido con *SpeI* y *Bst*EII para obtener un fragmento de 4.1kb que fue usado para realizar una transformación por doble recombinación homóloga de *sir3* en el aislado clínico MC2. De esta forma se obtuvieron las cepas CGM3780 y CGM3781 de *C. glabrata*. En el caso de las cepas mutantes en el fondo de la CBS138 se utilizó

el plásmido integrativo pJV22 que fue digerido con *SpeI* y *BstEII* para obtener el fragmento de 4.1kb usado para la transformación por doble recombinación de *SIR3*-CBS138. Este procedimiento dió origen a las cepas CGM3752 y CGM3755 en *C. glabrata*.

Todas las cepas del experimento fueron crecidas en YPD y colectadas en fase estacionaria de crecimiento. La extracción de proteínas y el ensayo de Western blot fueron hechos siguiendo el protocolo descrito por Orta-Zavalza et al. 2013 y Robledo-Márquez et al. 2016. Brevemente, las células fueron resuspendidas en buffer de lisis (45 mM HEPES, 400 mM Acetato de Potasio, 0.5% Nonidet P-40, 1 mM EDTA, 1 mM DTT, 1 mM PMSF, y 1X Inhibidor de proteasas completo ROCHE®). 100 µl de perlas de zirconia fueron adicionadas y las células se rompieron usando el equipo FastPrep®-24 (MP Biomedicals) tres veces por 60 s a 6 m/s. Las células se centrifugaron a 15000 rpm por 40 min a 4°C, el sobrenadante fue colectado y la concentración de proteínas se determinó por el método de Bradford. 50 µg del total de proteínas mezclado con 2X SDS de buffer de corrida precalentado (95°C for 8 min) fue corrido en un gel de DS-poliacrilamida al 10%. Después de la electrophoresis las proteínas fueron transferidas a membranas PVDF (BIO-RAD®) y se utilizó un anticuerpo anti-Flag (Sigma®) a una concentración final de 3 µg/ml toda la noche para detectar la proteína Sir3. Se hicieron lavados de la membrana y despues se puso en contacto con una solución de anticuerpo secundario (MERCCK®) conjugado con peroxidasa. La señal fue detectada por quimioluminiscencia (BioRad ChemiDoc MP System).

### **8.13 Análisis estadístico**

El análisis estadístico se desarrolló a través de un ANOVA y el test de comparación múltiple de Dunnett (GraphPad PRISM® versión 5.03). Un valor de  $P \leq 0.05$  fue considerado estadísticamente significativo.

## **9.RESULTADOS**

## 9.1 Publicación de la investigación en la revista Fungal Genetics and Biology (Anexo 14).

Fungal Genetics and Biology 118 (2018) 21–31



Contents lists available at ScienceDirect

Fungal Genetics and Biology

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/yfgbi](http://www.elsevier.com/locate/yfgbi)



Regular Articles

### Molecular characterization of the silencing complex SIR in *Candida glabrata* hyperadherent clinical isolates



Osney Leiva-Peláez, Guadalupe Gutiérrez-Escobedo, Eunice López-Fuentes, José Cruz-Mora, Alejandro De Las Peñas, Irene Castaño\*

IPICYT, Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, División de Biología Molecular, Camino a la Presa San José #2055, Col. Lomas 4a, San Luis Potosí 78216, Mexico

#### ARTICLE INFO

**Keywords:**  
*Candida glabrata*  
Hyperadherence  
Clinical isolates  
SIR complex  
Polymorphisms  
SIR3  
SIR4

#### ABSTRACT

An important virulence factor for the fungal pathogen *Candida glabrata* is the ability to adhere to the host cells, which is mediated by the expression of adhesins. Epa1 is responsible for ~95% of the *in vitro* adherence to epithelial cells and is the founding member of the Epa family of adhesins. The majority of EPA genes are localized close to different telomeres, which causes transcriptional repression due to subtelomeric silencing. In *C. glabrata* there are three Sir proteins (Sir2, Sir3 and Sir4) that are essential for subtelomeric silencing. Among a collection of 79 clinical isolates, some display a hyperadherent phenotype to epithelial cells compared to our standard laboratory strain, BG14. These isolates also express several subtelomeric EPA genes simultaneously. We cloned the SIR2, SIR3 and SIR4 genes from the hyperadherent isolates and from the BG14 and the sequenced strain CBS138 in a replicative vector to complement null mutants in each of these genes in the BG14 background. All the SIR2 and SIR4 alleles tested from selected hyper-adherent isolates were functional and efficient to silence a URA3 reporter gene inserted in a subtelomeric region. The SIR3 alleles from these isolates were also functional, except the allele from isolate MC2 (*str3*-MC2), which was not functional to silence the reporter and did not complement the hyperadherent phenotype of the BG14 *str3Δ*. Consistently, *str3*-MC2 allele is recessive to the SIR3 allele from BG14. Sir3 and Sir4 alleles from the hyperadherent isolates contain several polymorphisms and two of them are present in all the hyperadherent isolates analyzed. Instead, the Sir3 and Sir4 alleles from the BG14 and another non-adherent isolate do not display these polymorphisms and are identical to each other. The particular combination of polymorphisms in *str3*-MC2 and in SIR4-MC2 could explain in part the hyperadherent phenotype displayed by this isolate.

#### 1. Introduction

In the last decades *Candida glabrata* has become a frequently isolated human fungal pathogen from disseminated infections (Diekema et al., 2012; Pfaller et al., 2014). In part, the success of *C. glabrata* as a pathogen is due to the presence of several virulence factors such as high resistance to oxidative stress (Cuellar-Cruz et al., 2008; Gutiérrez-Escobedo et al., 2013), innate low susceptibility to azole antifungal drugs, rapid emergence of multiple antifungal resistant isolates after clinical exposure to these drugs (Castanheira et al., 2016; Kolaczowska and Kolaczowski, 2016; Pfaller et al., 2014; Pfaller et al., 2009; Salazar et al., 2018) and adherence to medical devices and host epithelial and endothelial cells (Castaño et al., 2005; Desai et al., 2011; Martínez-Jiménez et al., 2013). Furthermore, an interesting correlation between the emergence of antifungal drug resistance and increased virulence

and adherence to epithelial cells in *C. glabrata* has recently been described (Ni et al., 2018; Vale-Silva et al., 2017; Vale-Silva et al., 2013; Vale-Silva et al., 2016).

Adherence to biotic or abiotic surfaces in *C. glabrata* is mediated by cell wall proteins called adhesins, which are synthesized and incorporated to the cell wall in a process that depends on particular growth conditions and the genetic background of the strain (de Groot et al., 2008; Kraneveld et al., 2011). Different clinical isolates display various levels of adherence and expression of different kinds of adhesins depending on the particular clinical strain (de Groot et al., 2008; Desai et al., 2011; Gomez-Molero et al., 2015). Adherence to epithelial cells *in vitro* is mediated mostly by the Epa1 adhesin in *C. glabrata*, which is encoded by the EPA1 gene. EPA1 deletion in the laboratory reference strain BG14 (Cormack and Falkow, 1999), causes almost complete loss of this adherence (Cormack et al., 1999). Epa1 belongs to a family of

\* Corresponding author at: División de Biología Molecular, IPICYT, Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, Camino a la Presa San José # 2055, Lomas 4a Sección, San Luis Potosí, SLP 78216, Mexico.  
E-mail address: [icastano@ipicyt.edu.mx](mailto:icastano@ipicyt.edu.mx) (I. Castaño).

<https://doi.org/10.1016/j.fgb.2018.05.005>

Received 21 December 2017; Received in revised form 16 May 2018; Accepted 28 May 2018  
Available online 29 May 2018

1087-1845/© 2018 Elsevier Inc. All rights reserved.

From: "FGB (ELS)" <[eesserver@eesmail.elsevier.com](mailto:eesserver@eesmail.elsevier.com)>

**Subject: FGB-17-319R1: Final Decision**  
**Date:** May 28, 2018 at 5:13:32 PM CDT  
**To:** [icastano@ipicyt.edu.mx](mailto:icastano@ipicyt.edu.mx)  
**Reply-To:** "FGB (ELS)" <[fgb@elsevier.com](mailto:fgb@elsevier.com)>

Ms. No.: FGB-17-319R1

Title: Molecular characterization of the Silencing complex SIR in *C. glabrata* hyperadherent clinical isolates

Corresponding Author: Dr. Irene Castaño

Authors: Osney Leiva-Peláez; Guadalupe Gutiérrez-Escobedo; Eunice López-Fuentes; José Cruz-Mora; Alejandro De Las Peñas;

Dear Dr. Castaño,

I am pleased to inform you that your manuscript, referenced above, has been accepted for publication in Fungal Genetics and Biology.

Many thanks for submitting your fine paper to Fungal Genetics and Biology.

Your accepted manuscript will now be transferred to our production department and work will begin on creation of the proof. If we need any additional information to create the proof, we will let you know. If not, you will be contacted again in the next few days with a request to approve the proof and to complete a number of online forms that are required for publication.

FGB is proud to announce that we now connect articles with external databases, including FungiDB, MycoBank and Genbank amongst others. See <http://www.elsevier.com/databaselinking> for more information and a full list of supported databases. We now require that all accepted papers include reference of appropriate data (e.g. genes, proteins, etc.) to relevant databases. We particularly encourage use of fungal databases such as FungiDB. Please refer to relevant database identifiers using the following format in your article: Database: xxx (e.g., TAIR: AT1G01020; CCDC: 734053; PDB: 1XFN). Further instructions are included in 'instructions to the authors'.

When your paper is published on ScienceDirect, you want to make sure it gets the attention it deserves. To help you get your message across, Elsevier has developed a new, free service called AudioSlides: brief, webcast-style presentations that are shown (publicly available) next to your published article. This format gives you the opportunity to explain your research in your own words and attract interest. You will receive an invitation email to create an AudioSlides presentation shortly. For more information and examples, please visit <http://www.elsevier.com/audioslides>.

With kind regards,

Amy Gladfelter  
Associate Editor  
Fungal Genetics and Biology

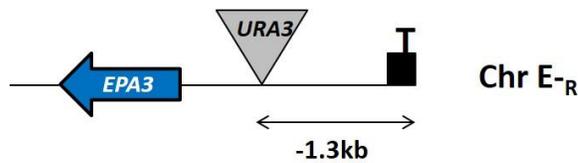
Fungal Genetics and Biology, Editorial Office  
Elsevier  
[Email: fgb@elsevier.com](mailto:fgb@elsevier.com)

Elsevier Policies and Services for Authors

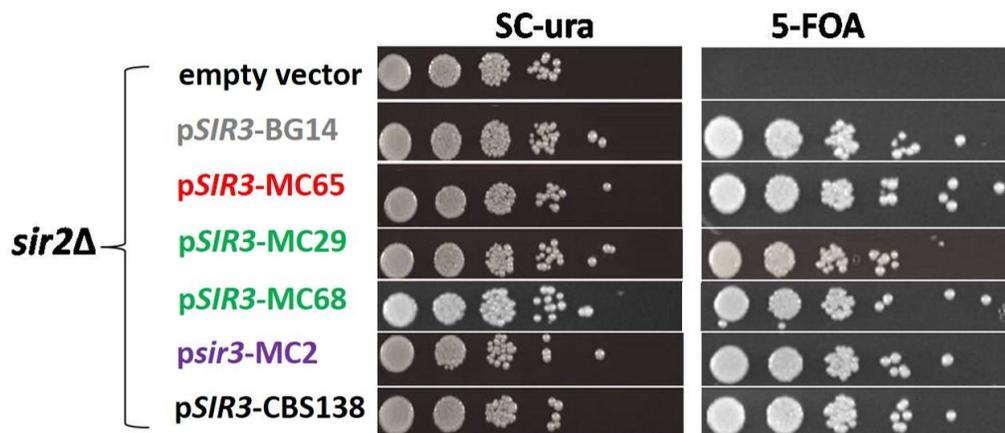
## **9.2 Los alelos *SIR2* y *SIR4* de los aislados clínicos en estudio son funcionales para silenciar el gen reportero *URA3* en la región subtelomérica**

Mediante ensayos de complementación evaluamos la funcionalidad de los alelos *SIR2*, *SIR3* y *SIR4*, para el silenciamiento de un gen reportero *URA3* insertado cerca del telómero E derecho de *C. glabrata*. Cada alelo *SIR* fue clonado en un vector replicativo que luego fue transformado en la cepa *sirΔ* correspondiente en el fondo de la cepa BG14. Obtuvimos que los alelos *SIR2* y *SIR4* de los aislados clínicos fueron eficientes para silenciar el gen reportero, mientras que de todos los alelos *SIR3* estudiados también fueron funcionales excepto el alelo *sir3-MC2*, que no fue capaz de mantener silenciado al gen reportero *URA3* (Ilustración 9).

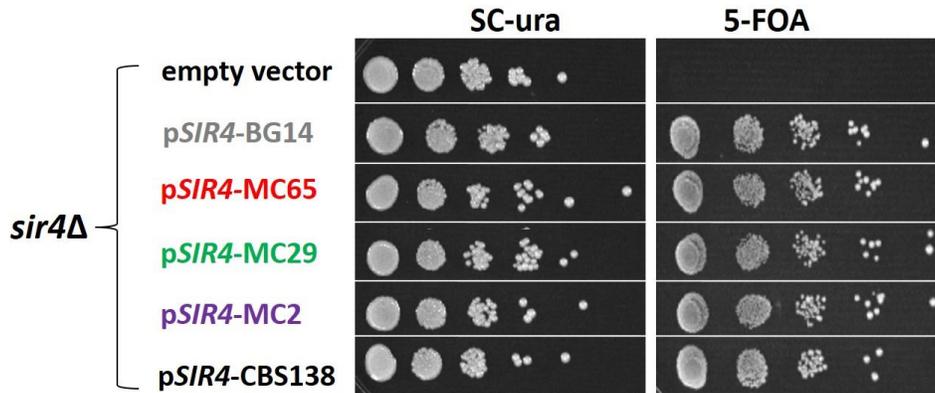
A)



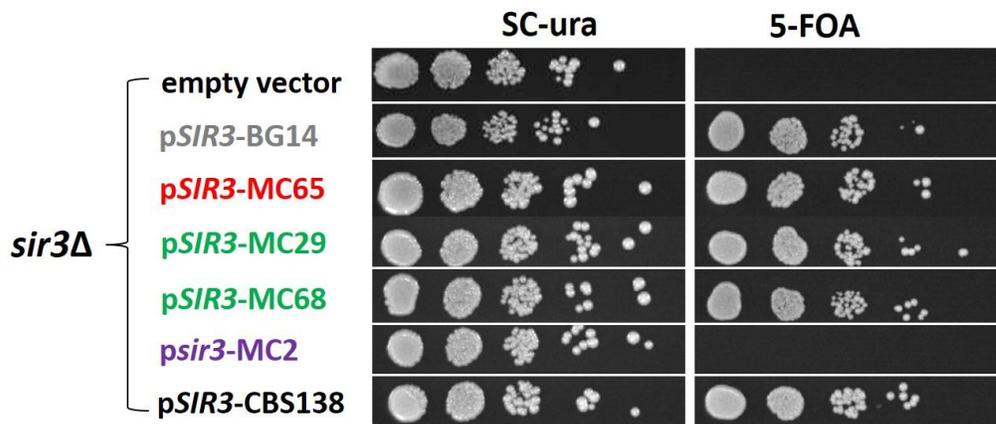
B)



C)



D)



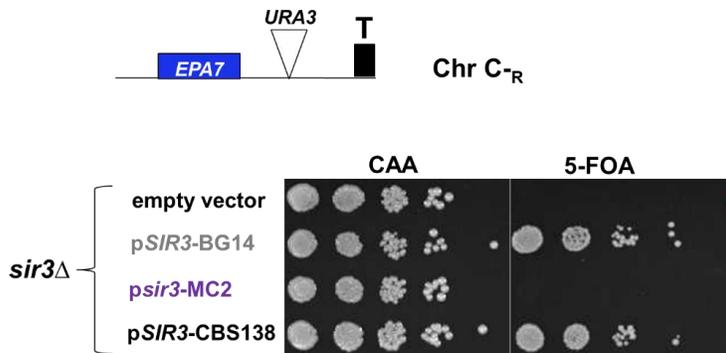
**NA:** No adherente  
**LA:** Ligeramente adherente  
**MA:** Moderadamente adherente  
**HA:** Hiperadherente

**Ilustración 9.** Ensayos de complementación con los alelos *SIR* de los aislados clínicos. A) Representación esquemática de la posición del gen reportero *URA3*. B) Los alelos *SIR2* complementan el fondo genético de la cepa BG14 *sir2*Δ. C) Los alelos *SIR4* de los aislados clínicos complementan el fondo genético de la cepa BG14 *sir4*Δ. D) El alelo *sir3*-MC2 no puede silenciar el gen reportero *URA3*.

**9.3 El alelo *sir3*-MC2 no es funcional para silenciar al gen reportero *URA3* en otros telómeros ni para disminuir la hiperadherencia de una cepa *sir3* $\Delta$ .**

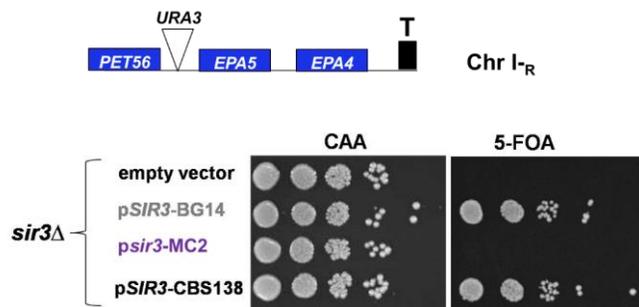
Para determinar si el alelo *sir3*-MC2 tampoco puede silenciar el reportero *URA3* cercano a otros telómeros, se transformó el plásmido replicativo que contiene este alelo en dos cepas distintas: la primera contiene un gen reportero *URA3* insertado a 2.23 kb del telómero derecho del cromosoma C y en la segunda cepa el gen reportero está insertado a 23.69 kb del telómero derecho del cromosoma I. Encontramos que el alelo *sir3*-MC2 no fue capaz de reprimir la expresión de los genes *URA3* en ninguno de los dos telómeros estudiados (Ilustración 10).

**A)**



HA: Hiperadherente

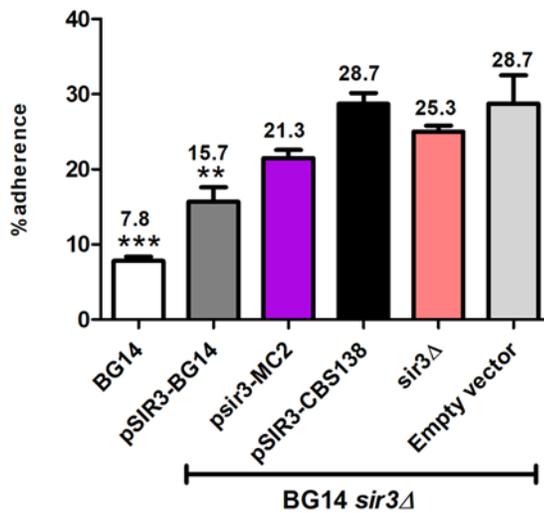
**B)**



HA: Hiperadherente

**Ilustración 10.** El alelo *sir3*-MC2 no complementa la cepa *sir3* $\Delta$ . A) El alelo *sir3*-MC2 no puede silenciar el gen reportero *URA3* insertado en el telómero C derecho. B) El alelo *sir3*-MC2 no puede silenciar el gen reportero *URA3* insertado en el telómero I derecho.

Además se realizaron ensayos de complementación utilizando otro modelo experimental, esta vez cuantificando la capacidad de adhesión a células epiteliales HeLa. En estos experimentos evaluamos si el alelo *sir3*-MC2 es funcional para disminuir el fenotipo hiperadherente de una cepa *sir3* $\Delta$  a través del silenciamiento de los genes subteloméricos *EPA*. Para ello transformamos el plásmido que contiene el alelo *sir3*-MC2 y controles en la cepa BG14*sir3* $\Delta$ . Observamos que el alelo *sir3*-MC2 no disminuyó significativamente el fenotipo hiperadherente de la cepa *sir3* $\Delta$ , ya que los niveles de adherencia fueron similares al mostrado por la cepa transformada con el vector vacío. También encontramos que el alelo *SIR3*-CBS138 tampoco complementó el fondo genético de la cepa *sir3* $\Delta$  mientras que la cepa transformada con el alelo *SIR3*-BG14 sí disminuyó significativamente el nivel de adherencia (Ilustración 11).

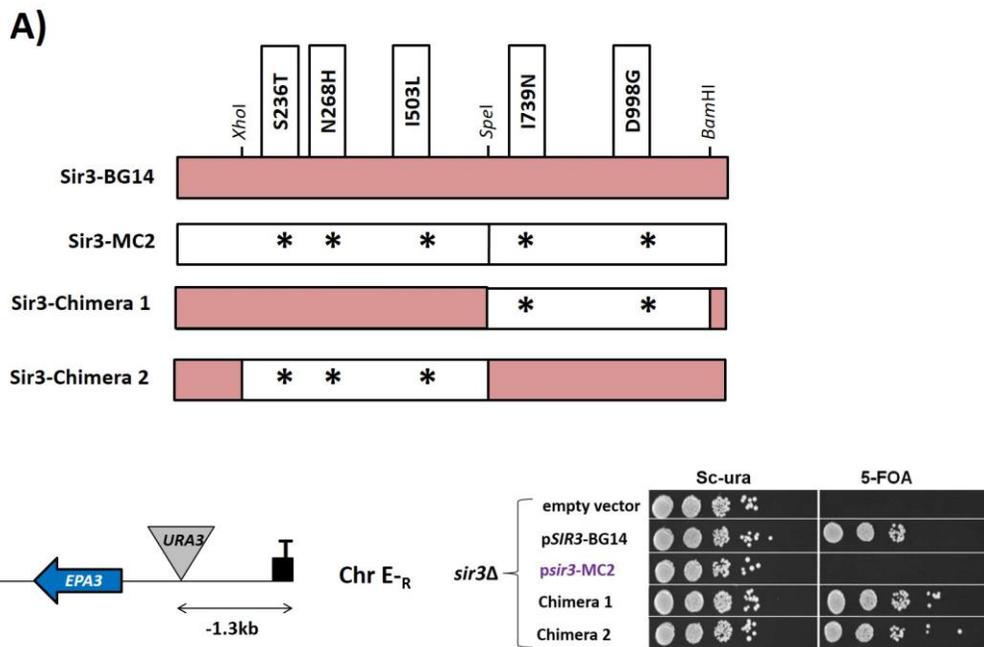


Dunnett's Multiple Comparison Test  $P < 0.05$

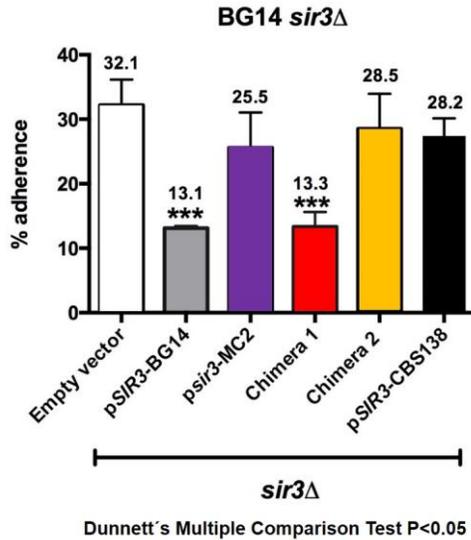
**Ilustración 11.** El alelo *sir3*-MC2 no disminuye el fenotipo hiperadherente de la cepa *sir3* $\Delta$ .

## 9.4 Las Quimeras estudiadas del alelo Sir3 son funcionales para silenciar el gen reportero *URA3*

Para analizar la contribución de los polimorfismos presentes en el alelo Sir3-MC2 reportados por Martínez-Jiménez et al. 2013 (Anexo 4), construimos dos quimeras (Ilustración 12A) donde introdujimos los polimorfismos del alelo *sir3*-MC2 en la secuencia del gen *SIR3*-BG14 y realizamos ensayos de complementación: 1) para evaluar el silenciamiento del gen reportero *URA3* y 2) para cuantificar la capacidad de adherencia a células epiteliales en cepas mutantes transformadas con estas quimeras. En ambos ensayos obtuvimos que la Quimera 1 es funcional y complementa el fondo genético de la cepa BG14 *sir3* $\Delta$  pero la Quimera 2 no complementó ese fondo genético en el ensayo de adherencia a células epiteliales (Ilustración 12B y 13), aunque sí complementa para el silenciamiento del reportero insertado a 1.3kb del telómero E-R.



**Ilustración 12.** La interacción de polimorfismos en el alelo *sir3*-MC2 son necesarios para su pérdida de función. A) Representación esquemática de las quimeras 1 y 2. B) Las Quimeras 1 y 2 pueden silenciar al gen reportero *URA3* insertado en la región subtelomérica.



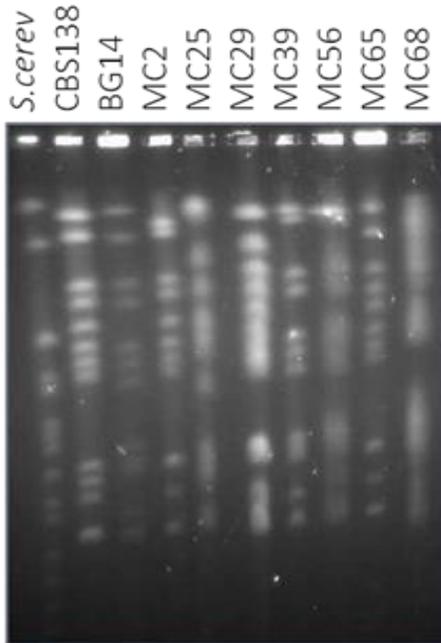
**Ilustración 13.** La Quimera 2 no complementa la información genética de la cepa BG14 *sir3*Δ en el ensayo de adherencia a células epiteliales.

## 10. RESULTADOS ADICIONALES

### 10.1 Análisis del cariotipo de los aislados clínicos en estudio

Otro aspecto importante en la virulencia de *C. glabrata* es la capacidad que tiene para reorganizar su genoma de manera frecuente (Jong et al. 2007) lo cual puede hacer incluso durante la infección del paciente. Los rearrreglos cromosómicos en *C. glabrata* se han correlacionado con un incremento en la virulencia.

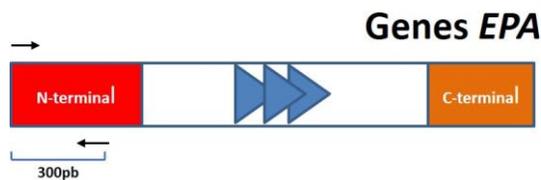
Realizamos ensayos de electroforesis de campo pulsante (PFGE) de los cromosomas de cada aislado clínico y observamos que hay diferencias notables en el tamaño de algunos cromosomas en los distintos aislados (Ilustración 14).



**Ilustración 14.** Polimorfismos en la longitud de cromosomas en el cariotipo de los aislados clínicos de *C. glabrata* en estudio.

## 10.2 Detección de extremos amino terminal de genes *EPA* en los aislados clínicos en estudio

Aproximadamente 66 genes en el genoma de *C. glabrata* codifican adhesinas putativas, y al menos 17 o 23 de estas proteínas (según la cepa) pertenecen a la familia de genes subtelo méricos *EPA*. Con el objetivo de comprobar la presencia de diferentes genes *EPA* en los aislados clínicos realizamos reacciones de PCR para amplificar los primeros 300 pares de bases de algunos de estos genes (Ilustración 15 y Tabla 5).



**Ilustración 15.** Representación esquemática de la estructura de genes *EPA*.

**Tabla 5.** Detección de la presencia de algunos genes *EPA* en aislados clínicos de *C. glabrata*.

Detección de genes <i>EPA</i>									
	NA	NA	NA	LA	LA	MA	MA	HA	MA
	BG14	MC39	MC56	MC25	MC65	MC68	MC29	MC2	CBS138
<b><i>EPA1</i></b>	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
<b><i>EPA2</i></b>	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
<b><i>EPA3</i></b>	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
<b><i>EPA4/5</i></b>	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	Ausente	Ausente
<b><i>EPA6</i></b>	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
<b><i>EPA7</i></b>	✓	✓	✓	✓	Ausente	Ausente	✓	✓	✓

NA: No adherente, LA: Ligeramente adherente, MA: Moderadamente adherente, HA: Hiperadherente

### 10.3 Presencia de minisatélites en el gen *EPA1* de los aislados clínicos

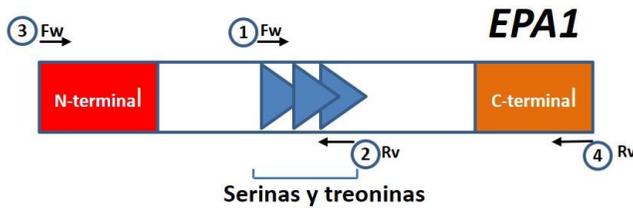
Dentro de los genes estructurales de algunas de las adhesinas codificadas por los genes *EPA*, así como de otros genes relacionados con la formación de la pared celular, podemos encontrar regiones de secuencias repetidas en tándem ricas en treoninas y serinas (Ilustración 16). En estas regiones se pueden encontrar Minisatélites (MS) y se ha reportado que existen variaciones en cuanto a la longitud de los mismos en diferentes tipos de levaduras (Richard et al. 2008).

Detectamos la presencia del minisatélite presente en *EPA1* con una longitud de 120 nucleótidos repetidos por cuatro veces (4x120) en todos los aislados clínicos (Ilustración 17A y Tabla 6). Para ello utilizamos el programa MREPS para localizarlos (Kolpakov et al. 2003), diseñamos oligonucleótidos específicos y amplificamos las secuencias. También se amplificaron los genes *EPA1* de los aislados clínicos y se correlacionaron los tamaños teniendo en cuenta la longitud de sus minisatélites (Ilustración 17B).

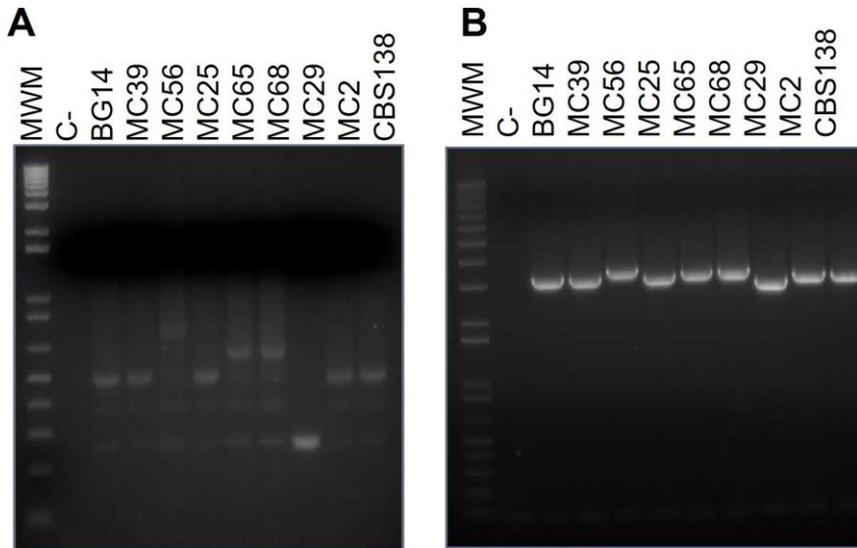
**Tabla 6.** Detección del minisatélite presente en el gen *EPA1* de aislados clínicos.

Minisatélites									
	NA	NA	NA	LA	LA	MA	MA	HA	MA
	BG14	MC39	MC56	MC25	MC65	MC68	MC29	MC2	CBS138
<i>EPA1</i> 4x120	~500pb	~500pb	~700pb	~500pb	~600pb	~600pb	~250pb	~500pb	~500pb

NA: No adherente, LA: Ligeramente adherente, MA: Moderadamente adherente, HA: Hiperadherente



**Ilustración 16.** Representación esquemática del minisatelite presente en *EPA1*.

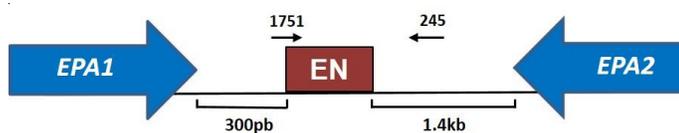


**Ilustración 17.** Los minisatélites de los genes *EPA1* en los aislados clínicos presentan polimorfismos de tamaño. A) Presencia de diferentes tamaños en los minisatélites del gen *EPA1* en los aislados clínicos. Los minisatélites se amplificaron por PCR con los oligos 1 Fw y 2 Rv. B) Presencia de polimorfismos en el tamaño de *EPA1* en los aislados clínicos. El gen completo *EPA1* se amplificó por PCR con los oligos 3 Fw y 4 Rv. El minisatélite de *EPA1* se amplificó con los oligos 1 Fw y 2 Rv.

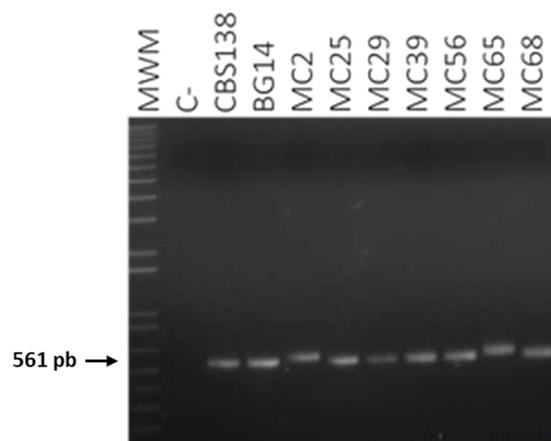
#### 10.4 Detección del elemento negativo asociado a *EPA1* en los aislados clínicos en estudio

La expresión del gen *EPA1* está sujeta a dos tipos de regulación negativa, una por parte del silenciamiento subtelo mérico y la otra está mediada por una secuencia reguladora en *cis* localizada al extremo 3' del gen *EPA1* conocida como Elemento Negativo (EN) (Gallegos-García et al. 2012). Amplificamos y secuenciamos el EN asociado a *EPA1* en cada aislado clínico en estudio y encontramos que existen polimorfismos de tamaño y secuencia entre los distintos EN (Ilustración 18, Anexo 6).

A)



B)



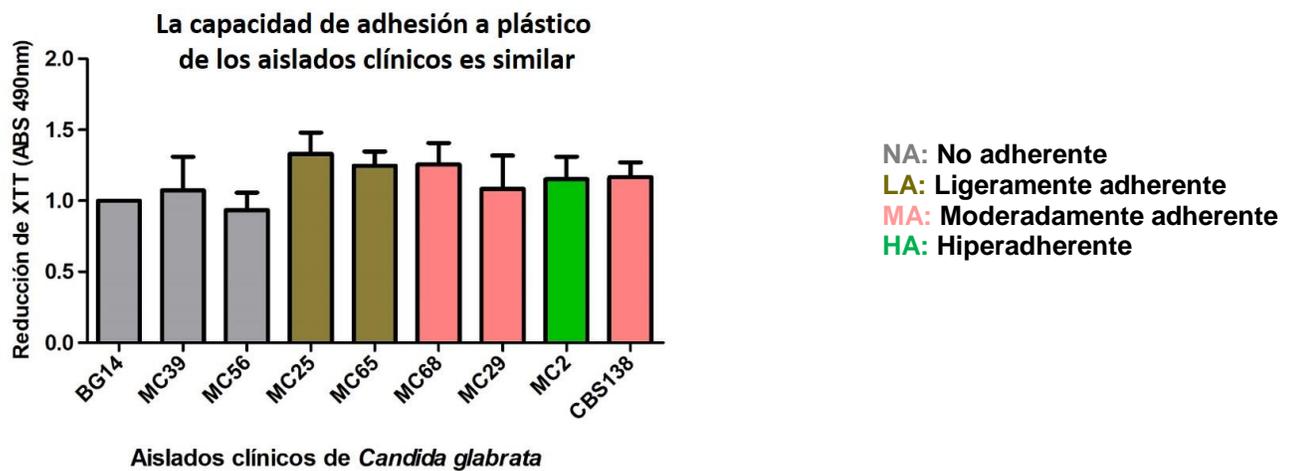
**Ilustración 18.** Detección del EN asociado al gen *EPA1* en los aislados clínicos en estudio de *C. glabrata*. A) Representación esquemática de la distancia entre *EPA1* y el Elemento Negativo. B) Presencia de polimorfismos en la longitud de los ENs de los aislados clínicos.

#### 10.5 Adherencia a plástico de los aislados clínicos y cepas mutantes

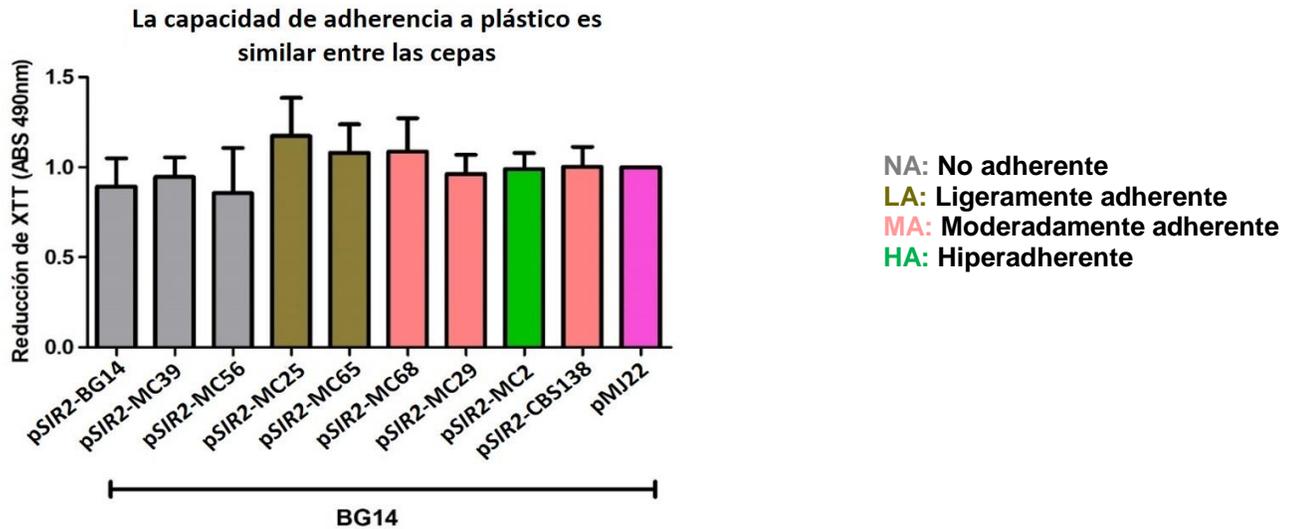
Los aislados clínicos de *C. glabrata* han mostrado diferentes niveles de adhesión a superficies plásticas y expresión de adhesinas dependiendo no solo de la cepa sino además del tipo de material (Desai et al. 2011)(Gomez Molero et al. 2015).

Martínez-Jiménez et al. 2013 realizó ensayos de formación de biopelículas sobre cajas de poliestireno con los aislados clínicos de ese estudio y no encontraron correlación con la hiperadherencia mostrada a células epiteliales. Es por ello que nos interesó conocer la capacidad de adherencia a placas de poliestireno de estos aislados clínicos y de cepas mutantes (Ilustración 19). Estas cepas transformadas son la cepa silvestre (BG14) y la cepa con delección en el gen *SIR2* (CGM252). Encontramos que no hay diferencias significativas entre los niveles de adhesión al plástico entre los aislados clínicos ni tampoco entre las cepas mutantes con una copia extra de *SIR2* o entre las cepas mutantes en el fondo genético de la cepa *sir2Δ*.

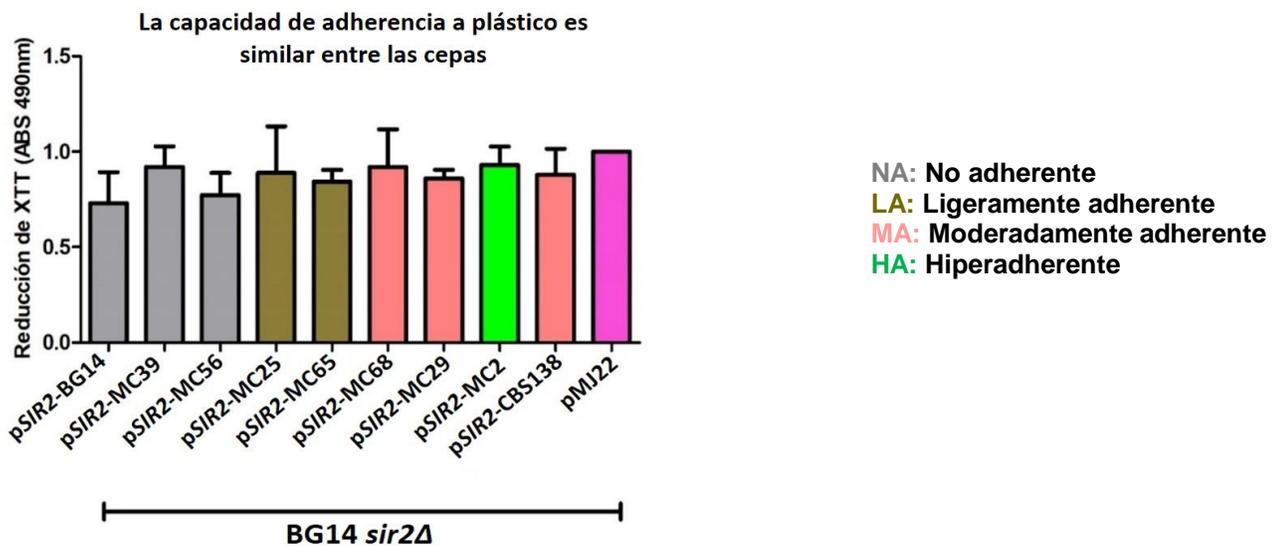
A)



B)



C)



**Ilustración 19.** Adherencia al plástico de cepas de *C. glabrata*. **A)** Los aislados clínicos de *C. glabrata* no presentan diferencias en el nivel de adhesión a plástico. **B)** Las cepas transformadas con una copia extra de *SIR2* en un plásmido replicativo no presentan diferencias en su adhesión a plástico respecto a la cepa transformada con el vector vacío en el fondo genético de la cepa control BG14. **C)** Las cepas transformadas con los alelos *SIR2* de los aislados clínicos no presentan diferencias con la cepa transformada con el vector vacío en el fondo genético BG14 *sir2Δ*.

## 11. DISCUSIÓN

Aproximadamente más del 90% de las candidiasis invasivas son causadas por cinco especies del género *Candida*: *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, and *C. krusei* (Pappas et al. 2015) (Guinea 2014). Las infecciones causadas por *C. glabrata* pueden ocupar desde el segundo al cuarto puesto en frecuencia dependiendo de la zona geográfica o el tipo de población afectada (Pfaller et al. 2011) (Nucci et al. 2013) (Pfaller et al. 2017), y son infecciones difíciles de tratar debido a la resistencia innata de este microorganismo a las drogas azólicas (Jong et al. 2007) (Pfaller 2012). Esto conlleva a una estadía hospitalaria más prolongada y también al aumento de los costos de atención.

*C. glabrata* posee diversos factores de virulencia que le permiten adaptarse dentro del hospedero lo que asegura su supervivencia. Algunos de estos factores de virulencia son: resistencia a estrés oxidante, capacidad de adhesión a superficies bióticas y abióticas, resistencia a drogas azólicas, producción de rearrreglos cromosómicos y formación de biopelículas (Cormack 1999)(Cuellar-Cruz et al. 2008)(Castaño et al. 2005)(Kucharíková et al. 2015)(Poláková et al. 2009)(De Las Peñas et al. 2003) (Pfaller et al. 2017).

### **Genes EPA en aislados clínicos en estudio**

El genoma de *C. glabrata* contiene aproximadamente 66 genes que putativamente codifican proteínas de pared celular, y estos genes se han clasificado en siete diferentes grupos de acuerdo a su similitud en la región N-terminal (de Groot et al. 2013). La familia Epa (adhesinas epiteliales) es la mejor caracterizada hasta el momento y se sabe que puede mediar la adherencia a superficies bióticas y abióticas.

Hemos encontrado que existen diferencias en la secuencia de aminoácidos de algunas adhesinas Epa entre cepas de *C. glabrata*. Por ejemplo la adhesina Epa1 de la cepa secuenciada CBS138 presenta 9 cambios de aminoácidos respecto Epa1-BG14 con un total de 99% de identidad entre ambas proteínas (Anexo 8). Sin embargo, la adhesina Epa2-CBS138 presenta un 82% de identidad respecto a la proteína Epa2-BG14 (Anexo 9). Por otro lado, Epa3-CBS138 solo presenta un 11% de identidad respecto a Epa3-BG14 (Anexo 10) por lo que es la adhesina menos conservada de las tres que conforman este

cluster en el cromosoma E derecho. No tenemos las secuencias de los genes *EPA* en los aislados clínicos estudiados, pero podría suceder que en estas cepas de *C. glabrata* también haya diferencias en las secuencias de genes *EPA* localizados en este y otros cromosomas. Este es un ejemplo de la variabilidad que podemos encontrar en genes vinculados a virulencia de *C. glabrata*, en este caso en la familia de genes *EPA*.

Al analizar los aislados clínicos encontramos que todos poseen los genes *EPA1*, *EPA2*, *EPA3* y *EPA6* (Tabla 5). Sin embargo, el aislado MC2 es el único que no presenta los genes *EPA4* y *EPA5*, al igual que la cepa secuenciada CBS138. Esta ausencia de genes *EPA* en el MC2, la similitud de su cariotipo con el de la CBS138 (Ilustración 14) y el hecho de que el MC2 sea un aislado hiperadherente, indica que es un aislado clínico con un fenotipo más cercano a la cepa CBS138 que a la cepa control BG14.

### **El alelo *sir3* del aislado MC2 es no funcional**

El complejo *SIR* juega un papel fundamental en el silenciamiento de las adhesinas localizadas cerca de los telómeros, las cuales al expresarse contribuyen a la virulencia de los aislados clínicos. El alelo *sir3*-MC2, no fue capaz de mantener silenciado al gen *URA3* insertado cerca de tres telómeros estudiados.

Debido a la presencia de polimorfismos en la secuencia del alelo *sir3*-MC2 (Anexo 4) nos preguntamos si la ausencia de actividad de este alelo se debe a la interacción de estos cambios de manera que se pierde su función biológica. El análisis de mutaciones en los dominios BAH<sup>+</sup> y AAA<sup>+</sup> de ScSir3 mostraron que ciertas mutaciones pueden abolir total o parcialmente el silenciamiento subtelomérico (Sampath *et al.* 2009)(Ehrentraut *et al.* 2011). El dominio CgSir3 AAA<sup>+</sup> es sólo un 21.2% similar al dominio ScSir3 AAA<sup>+</sup> (Martínez-Jiménez *et al.* 2013). El alelo Sir3-MC2 presenta los cambios I739N y D998G comparado con la cepa control BG14 en los dominios AAA<sup>+</sup> y wH (Winged helix) respectivamente. Los otros tres polimorfismos presentes en el alelo Sir3-MC2 (S236T; N268H; I503L) son compartidos con la secuencia del alelo Sir3-CBS138 el cual es un alelo eficiente para el silenciamiento del gen reportero

*URA3*, aunque por otro lado esta es una cepa hiperadherente y expresa varias adhesinas simultáneamente (Martínez-Jiménez *et al.* 2013).

Esto pudiera sugerir que el alelo *Sir3*-CBS138 es de alguna forma ineficiente para el silenciamiento subtelomérico en varias regiones, lo cual podía llevar a la expresión simultánea de varios genes *EPA*. En concordancia con esta hipótesis, la mutante transformada con el plásmido que contiene el alelo *SIR3*-CBS138 no disminuyó el fenotipo hiperadherente de la cepa *sir3* $\Delta$ , lo cual significa que en esa cepa hubo expresión de una o más adhesinas simultáneamente.

En nuestros experimentos de complementación usando las cepas transformadas con las Quimeras 1 y 2 comprobamos que es necesaria la interacción de los 5 polimorfismos presentes en el alelo *Sir3*-MC2 (respecto al alelo *Sir3*-BG14), para obtener una proteína no funcional para silenciar el reportero subtelomérico (Ilustración 12). Sin embargo, al realizar los experimentos de adherencia a células HeLa con estas mismas cepas, obtuvimos que la Quimera 2 no complementó el fondo de la cepa *sir3* $\Delta$  (Ilustración 13). Este resultado es interesante porque la Quimera 2 presenta la misma secuencia amino acídica que el gen *SIR3* de la cepa CBS138, la cual es una cepa hiperadherente que tiene un alelo *SIR3* deficiente en su función de silenciamiento en varias regiones subteloméricas, dado que es hiperadherente y expresa varias adhesinas subteloméricas simultáneamente. En estas construcciones, la única diferencia es que la Quimera 2 se encuentra bajo el promotor y el terminador del alelo *SIR3*-BG14.

Realizamos una comparación de estas regiones de regulación entre los genes *SIR3*-BG14, *SIR3*-CBS138 y *sir3*-MC2 para determinar las diferencias que existen entre ellas (Anexos 11 y 12). En los 530 nucleótidos previos al inicio del marco abierto de lectura de *SIR3* solo se presentan dos cambios en la secuencia de la región 5' en *sir3*-MC2 respecto a las regiones 5' de *SIR3*-BG14 y 5' *SIR3*-CBS138 (G-300T y T-93G). Sin embargo, el análisis de los primeros 730 nucleótidos de la región 3'UTR arrojó que existen muchas más diferencias entre estas secuencias. La region 3'UTR de *sir3*-MC2 es más parecida a la de la cepa CBS138. De la posición +1 al nucleótido +345 son idénticas, mientras

que respecto a la región 3'UTR de *SIR3*-BG14 los cambios aparecen desde la posición +3 (Anexo 12). La región 3'UTR de *sir3*-MC2 (730pb) posee 34 cambios nucleotídicos comparado a la misma región en *SIR3* de las cepas BG14 y CBS138 y además presenta una inserción de cuatro bases y una delección de tres bases nucleotídicas. En algunos casos los cambios se comparten con la región 3'UTR de *SIR3*-CBS138 y en otros casos con la región 3'UTR de *SIR3*-BG14.

Para saber si estos cambios en las regiones regulatorias podrían influir en la expresión de *SIR3* realizamos un ensayo de Western Blot y comprobamos que *sir3*-MC2, *SIR3*-BG14 y *SIR3*-CBS138 se expresan a niveles similares (Anexo 13). Esto nos permite concluir que la proteína Sir3-MC2 no es funcional, pero no debido a su falta de expresión, sino debido a la presencia de 5 polimorfismos. Otra posible causa de la ausencia de actividad de *sir3*-MC2 podría ser que la combinación de sus polimorfismos afecte la formación de homodímeros de Sir3 o la interacción con Sir4-BG14 en las cepas mutantes durante la formación del complejo Sir.

En el caso del aislado clínico MC2 debemos tener en cuenta además la presencia de múltiples polimorfismos en Sir4 (Anexo 5), lo cual podría afectar la interacción con Sir3 durante la formación del complejo Sir como puede suceder en el fondo genético de BG14 *sir3* $\Delta$  complementada con *sir3*-MC2. Este dato sumado a la posible afectación en la formación de homodímeros de *sir3*-MC2 podrían explicar en parte la hiperadherencia mostrada por este aislado clínico. Por otro lado también es probable que en el aislado MC2 y otros aislados clínicos hiperadherentes se expresen simultáneamente adhesinas pertenecientes a otras familias de proteínas además de las adhesinas Epa. Es conocido que otros hongos patógenos poseen repertorios de adhesinas importantes para su virulencia. En *Candida albicans* por ejemplo, las proteínas de la familia Als y Hwp están vinculadas a la adhesión celular. Las proteínas Als3p y Hwp1 son imprescindibles para la correcta formación de biopelículas (Cleary et al. 2011) (Padovan et al. 2009). En *C. glabrata* aún hay desconocimiento acerca del papel que juegan muchas de sus adhesinas

putativas y hay casos reportados donde ocurrió duplicación de múltiples adhesinas de diferentes familias en un periodo relativamente corto de tiempo (Vale-Silva et al 2017). Su pared celular es altamente dinámica y su composición varía de acuerdo a distintos factores como pueden ser la fase de crecimiento o estímulos ambientales (De Groot et al. 2008) (De Groot et al. 2008). En la cepa control BG14 las adhesinas Pwp7 y Aed1 no están reguladas por silenciamiento subtelomérico y median adhesión a células endoteliales (Desai et al. 2011) además de que en fase estacionaria se expresan en mayor grado, y es precisamente esta fase de crecimiento la que más usamos en nuestros experimentos debido a que la cepa BG14 es no adherente en esa fase. Zupancic y colaboradores, 2008, reportaron que Epa1 y Epa7 son capaces de adherirse a células epiteliales y endoteliales, lo cual evidencia que algunas adhesinas tienen un amplio espectro para el reconocimiento de ligandos haciéndolas más eficaces para *C. glabrata*. Quizás adhesinas de las familias Pwp, Awp o de otras familias, sean capaces de unirse a ligandos en células epiteliales y de esta forma contribuir al fenotipo hiperadherente mostrado por los aislados clínicos en este estudio.

### **Minisatelites en el gen *EPA1* de los aislados clínicos presentan polimorfismos**

La presencia de minisatélites en las adhesinas contribuye una mayor longitud y por lo tanto a que estas puedan estar más expuestas, lo que facilita la adhesión de la célula. Hicimos un análisis para determinar la presencia y tamaño de secuencias repetidas en tándem dentro de *EPA1*, y encontramos polimorfismos en el tamaño de los minisatélites. El minisatélite presente en el gen *EPA1* del aislado no adherente MC56 fue el de mayor tamaño (700pb), mientras que el más pequeño (250pb) se encontró en el gen *EPA1* del aislado hiperadherente MC29. Estos resultados indican que en estos aislados clínicos estudiados el tamaño de los minisatélites presentes en *EPA1* no correlaciona con la capacidad de adhesión a células epiteliales.

Al amplificar los respectivos genes *EPA1* de cada aislado clínico se observaron

polimorfismos de tamaño lo cual coincidió con los distintos tamaños de los minisatélites encontrados en cada gen.

### **Polimorfismos en el tamaño y secuencia del Elemento Negativo (EN) asociado a *EPA1* en los aislados clínicos**

Experimentos realizados en nuestro grupo de trabajo evidenciaron que la región mínima del EN que confiere represión al gen *EPA1* es de 200 pb y comienza a una distancia de +300 pb corriente abajo del marco de lectura abierto de este gen.

Nosotros encontramos que los ENs asociados a *EPA1* en los aislados clínicos presentan diferencias de longitud y secuencia (Anexo 6). Por ejemplo los aislados ligeramente adherente (MC65) e hiperadherente (MC2), contienen el EN de mayor longitud debido a la presencia de una inserción de 30 pb. Salvo esta inserción en el EN de estos dos aislados, podemos decir que la secuencia de los ENs en los aislados clínicos estudiados se encuentra muy bien conservada (Anexo 7).

No es posible determinar con estos datos si la longitud de estos ENs influye en una mayor o menor represión de *EPA1*. Aunque *EPA1* media en su mayoría la adherencia a células epiteliales tampoco se puede hacer una correlación entre el grado de adherencia a estas células y el tamaño de los ENs. Serán necesarios estudios futuros de expresión de este gen para evaluar el grado de represión aportado por los ENs de distinta longitud encontrados en los aislados clínicos.

## **12. CONCLUSIONES Y APORTACIONES DEL TRABAJO**

*C. glabrata* ha cobrado gran importancia como microorganismo patógeno en los últimos años debido en parte a la adquisición de resistencia a antimicóticos la cual podría ser el resultado del abuso de estos medicamentos. Actualmente contamos con herramientas moleculares que nos permiten estudiar los

mecanismos de regulación y expresión de genes. Sin embargo, debido a la plasticidad de su genoma aún hay mucho desconocimiento acerca del potencial que poseen los aislados clínicos de este microorganismo.

Este trabajo es un acercamiento al estudio de la regulación de la expresión de adhesinas Epa por medio del complejo Sir en aislados clínicos de *C. glabrata*. La regulación subtelomérica de genes presenta diversas capas de control y aún serán necesarios otros estudios para completar la información que aquí presentamos y explicar la hiperadherencia de estos aislados clínicos en estudio. Sin embargo, hemos podido comprobar que la proteína Sir3 en el aislado clínico MC2 no es funcional y con esto hipotetizamos que esta es una de las causas probables de su fenotipo hiperadherente. A continuación, se detallan las conclusiones de este trabajo:

- Los alelos *SIR2*, *SIR3* y *SIR4* de los aislados clínicos, a excepción del alelo *sir3*-MC2, son funcionales para silenciar un gen reportero *URA3* localizado entre *EPA3* y el telómero en el fondo genético de la cepa BG14.
- El alelo *sir3*-MC2 no es funcional para silenciar genes reporteros *URA3* insertados en al menos 3 telómeros de *C. glabrata*.
- El alelo *sir3*-MC2 no complementa el fenotipo hiperadherente de la cepa BG14 *sir3* $\Delta$ .
- El alelo *sir3*-MC2 es recesivo frente al alelo *SIR3* de la cepa control BG14.
- La interacción de los 5 polimorfismos en el alelo *sir3*-MC2 conllevan a la pérdida de función del mismo.
- Las Quimeras 1 y 2 pueden complementar el fondo genético de la cepa BG14 *sir3* $\Delta$  para silenciar un gen reportero *URA3* pero la Quimera 2 no disminuye los niveles de adherencia de la cepa BG14 *sir3* $\Delta$  en un ensayo de adherencia a células epiteliales.
- Los genes *SIR3*-BG14, *SIR3*-CBS138 y *sir3*-MC2 se expresan en niveles similares.

- Los alelos *SIR4* de los aislados clínicos en estudio presentan múltiples polimorfismos.
- La mayoría de los aislados clínicos presentan los genes *EPA* estudiados a excepción del aislado MC2 y la cepa secuenciada CBS138 que no presentan los genes *EPA4* y *EPA5*, y de los aislados MC65 y MC68 que no presentan el gen *EPA7*.
- Existen diferencias de secuencia entre las adhesinas Epa1, Epa2 y Epa3 de la cepa CBS138 respecto a la cepa BG14.
- El minisatélite presente en el gen *EPA1* de los aislados clínicos muestra polimorfismos de tamaño entre los distintos aislados.
- El Elemento Negativo asociado a *EPA1* muestra polimorfismos de tamaño y secuencia entre los distintos aislados clínicos.
- Existen diferencias de tamaño entre los cromosomas en el cariotipo de los aislados clínicos en estudio.
- No hay diferencias significativas en la capacidad de adhesión al plástico entre los aislados clínicos, tampoco entre las cepas transformadas con una copia extra de *SIR2* en el fondo genético de la cepa BG14, ni entre las cepas transformadas con el alelo *SIR2* de cada aislado clínico en el fondo BG14 *sir2*Δ.

### 13. ANEXOS

**Anexo 1.** Cepas de *C. glabrata* y *Saccharomyces cerevisiae* usadas en este estudio

<b>Transposón</b>			
Tn7		Tn7 R6K $\square$ ori <i>URA3 npt</i> (Km <sup>R</sup> )	(Castaño I., <i>et al.</i> 2003)
<b>Cepas de <i>C. glabrata</i></b>			
<b>Cepa</b>	<b>Parental</b>	<b>Genotipo</b>	
BG14	BG2	<i>ura3Δ::Tn903 G418<sup>R</sup></i>	(Cormack and Falkow, 1999)
CBS138		Aislado clínico de heces fecales (ATCC 2001)	<a href="http://www.genolevures.org/cagl.html">www.genolevures.org/cagl.html</a>
CGM24	BG14	<i>ura3Δ::Tn903 G418<sup>R</sup> sir3Δ</i>	(De las Peñas A., <i>et al.</i> 2003)
CGM3429	MC2	<i>sir3Δ::NAT NAT<sup>R</sup></i> (pLP247/ClaI-SnaBI)	Este trabajo
<b>Mutantes en proteínas del silenciamiento</b>			
<b><i>sir2Δ::hph</i></b>			
CGM252	BG432	<i>ura3Δ::Tn903 G418<sup>R</sup>, sir2Δ::hph Hyg<sup>R</sup></i> (pAP596/Sac I-Kpn I). Tn7 insertado en la región intergénica entre <i>EPA3</i> y el telómero.	(Rosas-Hernández <i>et al.</i> 2008)
<b><i>sir3Δ::hph</i></b>			
CGM289	BG14	<i>ura3Δ::Tn903 G418<sup>R</sup>, sir3Δ::hph Hyg<sup>R</sup></i> (pIC120/Kpn I-Hpa I+T4 DNA polimerasa). Tn7 insertado en la región intergénica entre <i>EPA3</i> y el telómero.	(Rosas-Hernández <i>et al.</i> 2008)
CGM291	BG14	<i>ura3Δ::Tn903 G418<sup>R</sup>, sir3Δ::hph Hyg<sup>R</sup></i> (pIC120/Kpn I-Hpa I+T4 DNA polimerasa). Tn7 insertado en la región intergénica entre <i>PET56</i> y <i>EPA5</i> .	(De las Peñas A., <i>et al.</i> 2003)
CGM301	BG14	<i>ura3Δ::Tn903 G418<sup>R</sup>, sir3Δ::hph Hyg<sup>R</sup></i> (pIC120/Kpn I-Hpa I+T4 DNA polimerasa). Tn7 insertado en la región intergénica entre <i>EPA7</i> y el telómero.	(Castaño I., <i>et al.</i> 2005)
<b><i>sir4Δ::hph</i></b>			
CGM340	BG14	<i>ura3Δ::Tn903 G418<sup>R</sup>, sir4Δ::hph Hyg<sup>R</sup></i> (pAP598 BsgI).	(Juárez Reyes <i>et al.</i> , 2012)

<b>Aislados clínicos de <i>C. glabrata</i></b>		
MC39	Aislado clínico	(Martínez-Jiménez <i>et al.</i> 2013)
MC56	Aislado clínico	(Martínez-Jiménez <i>et al.</i> 2013)
MC25	Aislado clínico	(Martínez-Jiménez <i>et al.</i> 2013)
MC65	Aislado clínico	(Martínez-Jiménez <i>et al.</i> 2013)
MC68	Aislado clínico	(Martínez-Jiménez <i>et al.</i> 2013)
MC29	Aislado clínico	(Martínez-Jiménez <i>et al.</i> 2013)
MC2	Aislado clínico	(Martínez-Jiménez <i>et al.</i> 2013)
<b>Cepas con inserción del transposón Tn7 entre <i>EPA3</i> y el telómero</b>		
<b>Mutantes de <i>C. glabrata</i> complementadas con alelos <i>SIR2</i> de aislados clínicos en el fondo de la cepa BG14 <i>sir2</i>Δ</b>		

CGM2513	CGM252	BG14 pero <i>sir2Δ::hph Hyg<sup>R</sup></i> , <i>URA3</i> entre <i>EPA3</i> y el telómero / pMJ22 (vector)	Este trabajo
CGM 2515	CGM252	BG14 pero <i>sir2Δ::hph Hyg<sup>R</sup></i> , <i>URA3</i> entre <i>EPA3</i> y el telómero / p <i>SIR2</i> -BG14 (pMJ26)	Este trabajo
CGM2517	CGM252	BG14 pero <i>sir2Δ::hph Hyg<sup>R</sup></i> , <i>URA3</i> entre <i>EPA3</i> y el telómero / p <i>SIR2</i> -CBS138 (pMJ24)	Este trabajo
CGM2519	CGM252	BG14 pero <i>sir2Δ::hph Hyg<sup>R</sup></i> , <i>URA3</i> entre <i>EPA3</i> y el telómero / p <i>SIR2</i> -MC39 (pLP69)	Este trabajo
CGM2521	CGM252	BG14 pero <i>sir2Δ::hph Hyg<sup>R</sup></i> , <i>URA3</i> entre <i>EPA3</i> y el telómero / p <i>SIR2</i> -MC56 (pLP73)	Este trabajo
CGM2523	CGM252	BG14 pero <i>sir2Δ::hph Hyg<sup>R</sup></i> , <i>URA3</i> entre <i>EPA3</i> y el telómero / p <i>SIR2</i> -MC25 (pLP70)	Este trabajo
CGM2525	CGM252	BG14 pero <i>sir2Δ::hph Hyg<sup>R</sup></i> , <i>URA3</i> entre <i>EPA3</i> y el telómero / p <i>SIR2</i> -MC65 (pLP75)	Este trabajo
CGM2608	CGM252	BG14 pero <i>sir2Δ::hph Hyg<sup>R</sup></i> , <i>URA3</i> entre <i>EPA3</i> y el telómero / p <i>SIR2</i> -MC68 (pLP79)	Este trabajo
CGM2529	CGM252	BG14 pero <i>sir2Δ::hph Hyg<sup>R</sup></i> , <i>URA3</i> entre <i>EPA3</i> y el telómero / p <i>SIR2</i> -MC29 (pLP77)	Este trabajo
CGM2606	CGM252	BG14 pero <i>sir2Δ::hph Hyg<sup>R</sup></i> , <i>URA3</i> entre <i>EPA3</i> y el telómero / p <i>SIR2</i> -MC2 (pLP81)	Este trabajo
<b>Mutantes de <i>C. glabrata</i> complementadas con alelos <i>SIR2</i> de aislados clínicos en el fondo de la cepa BG14</b>			

CGM2535	BG14	BG14 / pMJ22 (vector)	Este trabajo
CGM2537	BG14	BG14 / pSIR2-BG14 (pMJ26)	Este trabajo
CGM2539	BG14	BG14 / pSIR2-CBS138 (pMJ24)	Este trabajo
CGM2541	BG14	BG14 / pSIR2-MC39 (pLP69)	Este trabajo
CGM2545	BG14	BG14 / pSIR2-MC25 (pLP70)	Este trabajo
CGM2547	BG14	BG14 / pSIR2-MC65 (pLP75)	Este trabajo
CGM2549	BG14	BG14 / pSIR2-MC68 (pLP79)	Este trabajo
CGM2551	BG14	BG14 / pSIR2-MC29 (pLP77)	Este trabajo
CGM2553	BG14	BG14 / pSIR2-MC2 (pLP81)	Este trabajo
<b>Cepas con inserción del transposón Tn7 entre EPA3 y el telómero</b>			
<b>Mutantes de <i>C. glabrata</i> complementadas con alelos SIR3 de aislados clínicos en el fondo genético BG14 sir3Δ</b>			

CGM2770	CGM289	BG14 pero <i>sir3Δ::hph</i> Hyg <sup>R</sup> , <i>URA3</i> entre <i>EPA3</i> y el telómero / pMJ22 (vector)	Este trabajo
CGM2772	CGM289	BG14 pero <i>sir3Δ::hph</i> Hyg <sup>R</sup> , <i>URA3</i> entre <i>EPA3</i> y el telómero / pSIR3-BG14 (pLP189)	Este trabajo
CGM3078	CGM289	BG14 pero <i>sir3Δ::hph</i> Hyg <sup>R</sup> , <i>URA3</i> entre <i>EPA3</i> y el telómero / pSIR3-MC39 (pLP191)	Este trabajo
CGM2778	CGM289	BG14 but <i>sir3Δ::hph</i> Hyg <sup>R</sup> , <i>URA3</i> entre <i>EPA3</i> y el telómero / pSIR3-MC25 (pLP199)	Este trabajo
CGM3080	CGM289	BG14 but <i>sir3Δ::hph</i> Hyg <sup>R</sup> , <i>URA3</i> entre <i>EPA3</i> y el telómero / pSIR3-MC65 (pLP195)	Este trabajo
CGM2782	CGM289	BG14 but <i>sir3Δ::hph</i> Hyg <sup>R</sup> , <i>URA3</i> entre <i>EPA3</i> y el telómero / pSIR3-MC68 (pLP197)	Este trabajo
CGM2784	CGM289	BG14 but <i>sir3Δ::hph</i> Hyg <sup>R</sup> , <i>URA3</i> entre <i>EPA3</i> y el telómero / pSIR3-MC29 (pLP200)	Este trabajo
CGM2787	CGM289	BG14 but <i>sir3Δ::hph</i> Hyg <sup>R</sup> , <i>URA3</i> entre <i>EPA3</i> y el telómero / p <i>sir3</i> -MC2 (pLP202)	Este trabajo
CGM2788	CGM289	BG14 but <i>sir3Δ::hph</i> Hyg <sup>R</sup> , <i>URA3</i> entre <i>EPA3</i> y el telómero / pSIR3-CBS138 (pLP210)	Este trabajo
<b>Cepas con inserción del transposón Tn7 entre <i>PET56</i> y <i>EPA5</i></b>			
<b>Mutantes de <i>C. glabrata</i> complementadas con alelos <i>SIR3</i> de aislados clínicos en el fondo genético BG14 <i>sir3Δ</i></b>			

CGM3105	CGM291	BG14 pero <i>sir3Δ::hph</i> Hyg <sup>R</sup> , <i>URA3</i> entre <i>PET56</i> y <i>EPA5</i> / pMJ22 (vector)	Este trabajo
CGM3121	CGM291	BG14 pero <i>sir3Δ::hph</i> Hyg <sup>R</sup> , <i>URA3</i> entre <i>PET56</i> y <i>EPA5</i> / pSIR3-BG14 (pLP189)	Este trabajo
CGM3103	CGM291	BG14 pero <i>sir3Δ::hph</i> Hyg <sup>R</sup> , <i>URA3</i> entre <i>PET56</i> y <i>EPA5</i> / pSIR3-MC2 (pLP202)	Este trabajo
CGM3119	CGM291	BG14 pero <i>sir3Δ::hph</i> Hyg <sup>R</sup> , <i>URA3</i> entre <i>PET56</i> y <i>EPA5</i> / pSIR3-CBS138 (pLP210)	Este trabajo
<b>Cepas con inserción del transposón Tn7 entre <i>EPA7</i> y el telómero</b>			
<b>Mutantes de <i>C. glabrata</i> complementadas con alelos <i>SIR3</i> de aislados clínicos en el fondo genético BG14 <i>sir3Δ</i></b>			
CGM3109	CGM301	BG14 pero <i>sir3Δ::hph</i> Hyg <sup>R</sup> , <i>URA3</i> entre <i>EPA7</i> y el telómero / pMJ22 (vector)	Este trabajo
CGM3117	CGM301	BG14 pero <i>sir3Δ::hph</i> Hyg <sup>R</sup> , <i>URA3</i> entre <i>EPA7</i> y el telómero / pSIR3-BG14 (pLP189)	Este trabajo
CGM3107	CGM301	BG14 pero <i>sir3Δ::hph</i> Hyg <sup>R</sup> , <i>URA3</i> entre <i>EPA7</i> y el telómero / pSIR3-MC2 (pLP202)	Este trabajo
CGM3115	CGM301	BG14 pero <i>sir3Δ::hph</i> Hyg <sup>R</sup> , <i>URA3</i> entre <i>EPA7</i> y el telómero / pSIR3-CBS138 (pLP210)	Este trabajo
<b>Mutantes de <i>C. glabrata</i> complementadas con alelos <i>SIR3</i> de aislados clínicos en el fondo genético BG14 <i>sir3Δ</i></b>			
CGM3142	BG676	BG14 pero <i>sir3Δ</i> / pMJ22 (vector)	Este trabajo
CGM3136	CGM24	BG14 pero <i>sir3Δ</i> / p <i>sir3</i> -MC2 (pLP202)	Este trabajo
CGM3140	CGM24	BG14 pero <i>sir3Δ</i> / pSIR3-BG14 (pLP189)	Este trabajo
CGM3138	CGM24	BG14 pero <i>sir3Δ</i> / pSIR3-CBS138 (pLP210)	Este trabajo
<b>Mutantes de <i>C. glabrata</i> complementadas con alelos <i>SIR3</i> de aislados clínicos en el fondo genético de la cepa BG14</b>			

CGM3421	BG14	BG14 / pMJ22 (vector)	Este trabajo
CGM3423	BG14	BG14 / pSIR3-BG14 (pLP189)	Este trabajo
CGM3425	BG14	BG14 / pSIR3-MC2 (pLP202)	Este trabajo
CGM3427	BG14	BG14 / pSIR3-CBS138 (pLP210)	Este trabajo
<b>Mutantes de <i>C. glabrata</i> complementadas con alelos SIR3 de aislados clínicos en el fondo genético del aislado MC2</b>			
CGM3200	MC2	MC2 / pMJ22 (vector)	Este trabajo
CGM3202	MC2	MC2 / pSIR3-BG14 (pLP189)	Este trabajo
CGM3204	MC2	MC2 / pSIR3-MC2 (pLP202)	Este trabajo
CGM3243	MC2	MC2 / pSIR3-CBS138 (pLP210)	Este trabajo
<b>Cepas con inserción del transposón Tn7 entre EPA3 y el telómero</b>			
<b>Mutantes de <i>C. glabrata</i> complementadas con alelos SIR4 de aislados clínicos en el fondo genético BG14 sir4<math>\Delta</math></b>			
CGM3044	CGM340	BG14 pero sir4 $\Delta$ ::hph Hyg <sup>R</sup> , URA3 entre EPA3 y el telómero / pMJ22 (vector)	Este trabajo
CGM3046	CGM340	BG14 pero sir4 $\Delta$ ::hph Hyg <sup>R</sup> , URA3 entre EPA3 y el telómero / pSIR4-BG14 (pLP219)	Este trabajo
CGM3064	CGM340	BG14 pero sir4 $\Delta$ ::hph Hyg <sup>R</sup> , URA3 entre EPA3 y el telómero / pSIR4-MC65 (pLP223)	Este trabajo
CGM3066	CGM340	BG14 pero sir4 $\Delta$ ::hph Hyg <sup>R</sup> , URA3 entre EPA3 y el telómero / pSIR4-MC29 (pLP225)	Este trabajo
CGM3071	CGM340	BG14 pero sir4 $\Delta$ ::hph Hyg <sup>R</sup> , URA3 entre EPA3 y el telómero / pSIR4-MC2 (pLP227)	Este trabajo
CGM3048	CGM340	BG14 pero sir4 $\Delta$ ::hph Hyg <sup>R</sup> , URA3 entre EPA3 y el telómero / pSIR4-CBS138 (pLP221)	Este trabajo
<b>Cepas con inserción del transposón Tn7 entre EPA3 y el telómero</b>			
<b>Mutantes de <i>C. glabrata</i> complementadas con Quimeras de sir3-MC2 en el fondo genético BG14 sir3<math>\Delta</math></b>			

CGM3182	CGM289	BG14 pero <i>sir3Δ::hph</i> Hyg <sup>R</sup> , <i>URA3</i> entre <i>EPA3</i> y el telómero / <i>pSIR3-Quimera 1</i> (pLP238)	Este trabajo
CGM3186	CGM289	BG14 pero <i>sir3Δ::hph</i> Hyg <sup>R</sup> , <i>URA3</i> entre <i>EPA3</i> y el telómero / <i>pSIR3-Quimera 2</i> (pLP240)	Este trabajo
<b>Mutantes de <i>C. glabrata</i> complementadas con Quimeras de <i>sir3-MC2</i> en el fondo genético BG14 <i>sir3Δ</i></b>			
CGM3743	CGM24	BG14 pero <i>sir3Δ</i> / <i>pSIR3-Quimera 1</i> (pLP238)	Este trabajo
CGM3782	CGM24	BG14 pero <i>sir3Δ</i> / <i>pSIR3-Quimera 2</i> (pLP240)	Este trabajo
<b>Mutantes de <i>C. glabrata</i> con construcciones <i>SIR3::FLAG</i></b>			
CGM957	BG14	BG14 pero <i>SIR3::FLAG::hph</i> - pJV22 / <i>BsrGI-HpaI</i> Hyg <sup>R</sup>	Colección del laboratorio
CGM958	BG14	BG14 pero <i>SIR3::FLAG::hph</i> - pJV22 / <i>BsrGI-HpaI</i> Hyg <sup>R</sup>	Colección del laboratorio
CGM1107	BG14	BG14 pero pJV22 / <i>BsrGI-HpaI</i> . Transformada con pMZ18 ( <i>SIR3::FLAG::FRT</i> ) Hyg <sup>S</sup>	Colección del laboratorio
CGM3752	CBS138	CBS138 pero <i>SIR3::FLAG</i> - pJV22 / <i>BstEII-SpeI</i> Hyg <sup>R</sup>	Este trabajo
CGM3755	CBS138	CBS138 pero <i>SIR3::FLAG</i> - pJV22 / <i>BstEII-SpeI</i> Hyg <sup>R</sup>	Este trabajo
CGM3780	MC2	MC2 pero <i>SIR3::FLAG</i> – pCM1 / <i>BstEII-SpeI</i> Hyg <sup>R</sup>	Este trabajo
CGM3781	MC2	MC2 pero <i>SIR3-FLAG::hph</i> (pCM1 / <i>BstEII-SpeI</i> ) Hyg <sup>R</sup>	Este trabajo
<b>Mutantes de <i>S. cerevisiae</i> con alelos <i>EPA1</i> de aislados clínicos</b>			
L238	BY4742	<i>his3Δ1 leu2Δ lys2Δ ura3Δ</i> / pBC169 (vector)	Este trabajo

L199	BY4742	<i>his3Δ1 leu2Δ lys2Δ ura3Δ</i> / pEPA1-CBS138 (pLP83)	Este trabajo
L201	BY4742	<i>his3Δ1 leu2Δ lys2Δ ura3Δ</i> / pEPA1-MC25 (pLP85)	Este trabajo
L203	BY4742	<i>his3Δ1 leu2Δ lys2Δ ura3Δ</i> / pEPA1-BG14 (pLP87)	Este trabajo
L205	BY4742	<i>his3Δ1 leu2Δ lys2Δ ura3Δ</i> / pEPA1-MC39 (pLP89)	Este trabajo
L207	BY4742	<i>his3Δ1 leu2Δ lys2Δ ura3Δ</i> / pEPA1-MC56 (pLP91)	Este trabajo
L209	BY4742	<i>his3Δ1 leu2Δ lys2Δ ura3Δ</i> / pEPA1-MC2 (pLP93)	Este trabajo
L211	BY4742	<i>his3Δ1 leu2Δ lys2Δ ura3Δ</i> / pEPA1-MC29 (pLP113)	Este trabajo
L213	BY4742	<i>his3Δ1 leu2Δ lys2Δ ura3Δ</i> / pEPA1-MC65 (pLP115)	Este trabajo
L215	BY4742	<i>his3Δ1 leu2Δ lys2Δ ura3Δ</i> / pEPA1-MC68 (pLP117)	Este trabajo

**Anexo 2.** Cepas de *Escherichia coli* y plásmidos usados en este trabajo.

Cepa		Genotipo		Referencia
DH10		F <sup>-</sup> <i>mcrA</i> Δ( <i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i> ) □80 <i>lacZ</i> Δ <i>M15</i> Δ <i>lacX74</i> <i>deoR</i> <i>recA1</i> <i>endA1</i> <i>araD139</i> Δ( <i>ara,leu</i> )7697 <i>galU</i> <i>galK</i> □ <sup>-</sup> <i>rpsL</i> <i>nupG</i>		(Calvin and Hanawalt 1988)
Vectores de clonación				
Cepa	Plásmido	Genotipo		
1771	pMB11	Vector de clonación para productos de PCR Cm <sup>R</sup> , <i>sacB</i> <sup>+</sup> , Sac <sup>S</sup>		(Gallegos-García et al. 2012)
2650	pMJ22	Vector de clonación replicativo en <i>C. glabrata</i> Ap <sup>R</sup> , Nat <sup>R</sup>		(Martínez-Jiménez et al. 2013)
2231	pGE36	Vector integrativo para etiquetar con el epítipo FLAG el extremo C-terminal. Hyg <sup>R</sup>		(Yanez-Carrillo et al., 2014)
Plásmidos episomales para genes <i>SIR2</i> en <i>Escherichia coli</i>				
3419	pLP55	pMB11	Fragmento de 3.5kb clonado en el vector de clonación pMB11 digerido con <i>Stu</i> I, que contiene el gen <i>SIR2</i> amplificado con los oligonucleótidos 523Fw y 524Rv. El ADN molde proviene del aislado MC25.Cm <sup>R</sup>	Este trabajo
3423	pLP59	pMB11	Fragmento de 3.5kb clonado en el vector de clonación pMB11 digerido con <i>Stu</i> I, que contiene el gen <i>SIR2</i> amplificado con los oligonucleótidos 523Fw y 524Rv. El ADN molde proviene del aislado MC65.Cm <sup>R</sup>	Este trabajo

3427	pLP61	pMB11	Fragmento de 3.5kb clonado en el vector de clonación pMB11 digerido con <i>Stul</i> , que contiene el gen <i>SIR2</i> amplificado con los oligonucleótidos 523Fw y 524Rv. El ADN molde proviene del aislado MC39.Cm <sup>R</sup>	Este trabajo
3429	pLP63	pMB11	Fragmento de 3.5kb clonado en el vector de clonación pMB11 digerido con <i>Stul</i> , que contiene el gen <i>SIR2</i> amplificado con los oligonucleótidos 523Fw y 524Rv. El ADN molde proviene del aislado MC68.Cm <sup>R</sup>	Este trabajo
3437	pLP65	pMB11	Fragmento de 3.5kb clonado en el vector de clonación pMB11 digerido con <i>Stul</i> , que contiene el gen <i>SIR2</i> amplificado con los oligonucleótidos 523Fw y 524Rv. El ADN molde proviene del aislado MC2.Cm <sup>R</sup>	Este trabajo
3438	pLP66	pMB11	Fragmento de 3.5kb clonado en el vector de clonación pMB11 digerido con <i>Stul</i> , que contiene el gen <i>SIR2</i> amplificado con los oligonucleótidos 523Fw y 524Rv. El ADN molde proviene del aislado MC29.Cm <sup>R</sup>	Este trabajo

2715	pMJ26	pMJ22	Vector de clonación replicativo que contiene a <i>SIR2</i> -BG14. El fragmento de PCR de 3.5kb digerido con <i>KpNI/MfeI</i> fue clonado en el vector pMJ22 digerido con <i>KpNI/EcoRI</i> . El ADN de la cepa BG14 fue usado como molde para la amplificación de <i>SIR2</i> con los oligonucleótidos 523Fw y 524Rv. Ap <sup>R</sup> , Nat <sup>R</sup>	Colección del laboratorio
2709	pMJ24	pMJ22	Vector de clonación replicativo que contiene a <i>SIR2</i> -CBS138. El fragmento de PCR de 3.5kb digerido con <i>KpNI/MfeI</i> fue clonado en el vector pMJ22 digerido con <i>KpNI/EcoRI</i> . El ADN de la cepa CBS138 fue usado como molde para la amplificación de <i>SIR2</i> con los oligonucleótidos 523Fw y 524Rv. Ap <sup>R</sup> , Nat <sup>R</sup>	Colección del laboratorio
3443	pLP69	pMJ22	Un fragmento de 3 kb que contiene al gen <i>SIR2</i> -MC39 proveniente del plásmido pLP61 digerido con <i>KpNI</i> y <i>MfeI</i> y extremos romos rellenados con Klenow fue clonado en el vector replicativo pMJ22 digerido previamente con <i>EcoRV</i> . Ap <sup>R</sup> , Nat <sup>R</sup>	Este trabajo

3460	pLP70	pMJ22	Un fragmento de 3 kb que contiene al gen <i>SIR2-MC25</i> proveniente del plásmido pLP55 digerido con <i>KpI</i> y <i>MfeI</i> y extremos romos rellenados con Klenow fue clonado en el vector replicativo pMJ22 digerido previamente con <i>EcoRV</i> . Ap <sup>R</sup> , Nat <sup>R</sup>	Este trabajo
3466	pLP75	pMJ22	Un fragmento de 3 kb que contiene al gen <i>SIR2-MC65</i> proveniente del plásmido pLP59 digerido con <i>KpI</i> y <i>MfeI</i> y extremos romos rellenados con Klenow fue clonado en el vector replicativo pMJ22 digerido previamente con <i>EcoRV</i> . Ap <sup>R</sup> , Nat <sup>R</sup>	Este trabajo
3575	pLP77	pMJ22	Un fragmento de 3 kb que contiene al gen <i>SIR2-MC29</i> proveniente del plásmido pLP66 digerido con <i>KpI</i> y <i>MfeI</i> y extremos romos rellenados con Klenow fue clonado en el vector replicativo pMJ22 digerido previamente con <i>EcoRV</i> . Ap <sup>R</sup> , Nat <sup>R</sup>	Este trabajo
3577	pLP79	pMJ22	Un fragmento de 3 kb que contiene al gen <i>SIR2-MC68</i> proveniente del plásmido pLP63 digerido con <i>KpI</i> y <i>MfeI</i> y extremos romos rellenados con Klenow fue clonado en el vector replicativo pMJ22 digerido previamente con <i>EcoRV</i> . Ap <sup>R</sup> , Nat <sup>R</sup>	Este trabajo

3579	pLP81	pMJ22	Un fragmento de 3 kb que contiene al gen <i>SIR2-MC2</i> proveniente del plásmido pLP68 digerido con <i>KpNI</i> y <i>MfeI</i> y extremos romos rellenados con Klenow fue clonado en el vector replicativo pMJ22 digerido previamente con <i>EcoRV</i> . Ap <sup>R</sup> , Nat <sup>R</sup>	Este trabajo
Plásmidos intermedios y replicativos para genes <i>SIR3</i>				
3798	pLP135	pMB11	Un fragmento de PCR de 2.8kb que contiene al gen <i>SIR3-A</i> amplificado con los oligonucleótidos 2178Fw y 2122Rv, fue clonado en el vector pMB11 digerido con <i>StuI</i> . El ADN molde proviene de la cepa BG14. Cm <sup>R</sup>	Este trabajo
3802	pLP139	pMB11	Un fragmento de PCR de 2.8kb que contiene al gen <i>SIR3-A</i> amplificado con los oligonucleótidos 2178Fw y 2122Rv, fue clonado en el vector pMB11 digerido con <i>StuI</i> . El ADN molde proviene del aislado MC39. Cm <sup>R</sup>	Este trabajo
3804	pLP141	pMB11	Un fragmento de PCR de 2.8kb que contiene al gen <i>SIR3-A</i> amplificado con los oligonucleótidos 2178Fw y 2122Rv, fue clonado en el vector pMB11 digerido con <i>StuI</i> . El ADN molde proviene del aislado MC25. Cm <sup>R</sup>	Este trabajo

3806	pLP143	pMB11	Un fragmento de PCR de 2.8kb que contiene al gen <i>SIR3-A</i> amplificado con los oligonucleótidos 2178Fw y 2122Rv, fue clonado en el vector pMB11 digerido con <i>Stul</i> . El ADN molde proviene del aislado MC65. Cm <sup>R</sup>	Este trabajo
3808	pLP145	pMB11	Un fragmento de PCR de 2.8kb que contiene al gen <i>SIR3-A</i> amplificado con los oligonucleótidos 2178Fw y 2122Rv, fue clonado en el vector pMB11 digerido con <i>Stul</i> . El ADN molde proviene del aislado MC68. Cm <sup>R</sup>	Este trabajo
3810	pLP147	pMB11	Un fragmento de PCR de 2.8kb que contiene al gen <i>SIR3-A</i> amplificado con los oligonucleótidos 2178Fw y 2122Rv, fue clonado en el vector pMB11 digerido con <i>Stul</i> . El ADN molde proviene del aislado MC29. Cm <sup>R</sup>	Este trabajo
3813	pLP150	pMB11	Un fragmento de PCR de 2.8kb que contiene al gen <i>SIR3-A</i> amplificado con los oligonucleótidos 2178Fw y 2122Rv, fue clonado en el vector pMB11 digerido con <i>Stul</i> . El ADN molde proviene del aislado MC2. Cm <sup>R</sup>	Este trabajo

3819	pLP156	pMB11	Un fragmento de PCR de 2.8kb que contiene al gen <i>SIR3-A</i> amplificado con los oligonucleótidos 2178Fw y 2122Rv, fue clonado en el vector pMB11 digerido con <i>Stul</i> . El ADN molde proviene de la cepa CBS138. Cm <sup>R</sup>	Este trabajo
3850	pLP158	pMB11	Un fragmento de PCR de 2.4kb que contiene al gen <i>SIR3-B</i> amplificado con los oligonucleótidos 2124Fw y 2123Rv, fue clonado en el vector pMB11 digerido con <i>Stul</i> . El ADN molde proviene de la cepa BG14. Cm <sup>R</sup>	Este trabajo
3852	pLP160	pMB11	Un fragmento de PCR de 2.4kb que contiene al gen <i>SIR3-B</i> amplificado con los oligonucleótidos 2124Fw y 2123Rv, fue clonado en el vector pMB11 digerido con <i>Stul</i> . El ADN molde proviene del aislado MC65. Cm <sup>R</sup>	Este trabajo
3853	pLP161	pMB11	Un fragmento de PCR de 2.4kb que contiene al gen <i>SIR3-B</i> amplificado con los oligonucleótidos 2124Fw y 2123Rv, fue clonado en el vector pMB11 digerido con <i>Stul</i> . El ADN molde proviene del aislado MC68. Cm <sup>R</sup>	Este trabajo

3855	pLP163	pMB11	Un fragmento de PCR de 2.4kb que contiene al gen <i>SIR3-B</i> amplificado con los oligonucleótidos 2124Fw y 2123Rv, fue clonado en el vector pMB11 digerido con <i>Stul</i> . El ADN molde proviene del aislado MC29. Cm <sup>R</sup>	Este trabajo
3857	pLP165	pMB11	Un fragmento de PCR de 2.4kb que contiene al gen <i>SIR3-B</i> amplificado con los oligonucleótidos 2124Fw y 2123Rv, fue clonado en el vector pMB11 digerido con <i>Stul</i> . El ADN molde proviene de la cepa CBS138. Cm <sup>R</sup>	Este trabajo
3859	pLP167	pMB11	Un fragmento de PCR de 2.4kb que contiene al gen <i>SIR3-B</i> amplificado con los oligonucleótidos 2124Fw y 2123Rv, fue clonado en el vector pMB11 digerido con <i>Stul</i> . El ADN molde proviene del aislado MC2. Cm <sup>R</sup>	Este trabajo
3861	pLP169	pMB11	Un fragmento de PCR de 2.4kb que contiene al gen <i>SIR3-B</i> amplificado con los oligonucleótidos 2124Fw y 2123Rv, fue clonado en el vector pMB11 digerido con <i>Stul</i> . El ADN molde proviene del aislado MC39. Cm <sup>R</sup>	Este trabajo

3815	pLP152	pMB11	Un fragmento de PCR de 2.4kb que contiene al gen <i>SIR3-B</i> amplificado con los oligonucleótidos 2124Fw y 2123Rv, fue clonado en el vector pMB11 digerido con <i>StuI</i> . El ADN molde proviene del aislado MC56. Cm <sup>R</sup>	Este trabajo
3817	pLP154	pMB11	Un fragmento de PCR de 2.4kb que contiene al gen <i>SIR3-B</i> amplificado con los oligonucleótidos 2124Fw y 2123Rv, fue clonado en el vector pMB11 digerido con <i>StuI</i> . El ADN molde proviene del aislado MC25. Cm <sup>R</sup>	Este trabajo
3865	pLP171	pMJ22	Un fragmento digerido con <i>KpnI/Spel</i> de 2.8kb proveniente del plásmido pLP135 ( <i>SIR3-A</i> de la cepa BG14) fue clonado en el vector replicativo pMJ22 digerido con <i>KpnI/Spel</i> . Ap <sup>R</sup> , Nat <sup>R</sup>	Este trabajo
3867	pLP173	pMJ22	Un fragmento digerido con <i>KpnI/Spel</i> de 2.8kb proveniente del plásmido pLP139 ( <i>SIR3-A</i> del aislado MC39) fue clonado en el vector replicativo pMJ22 digerido con <i>KpnI/Spel</i> . Ap <sup>R</sup> , Nat <sup>R</sup>	Este trabajo
3871	pLP177	pMJ22	Un fragmento digerido con <i>KpnI/Spel</i> de 2.8kb proveniente del plásmido pLP141 ( <i>SIR3-A</i> del aislado MC25) fue clonado en el vector replicativo pMJ22 digerido con <i>KpnI/Spel</i> . Ap <sup>R</sup> , Nat <sup>R</sup>	Este trabajo

3873	pLP179	pMJ22	Un fragmento digerido con <i>KpnI/Spel</i> de 2.8kb proveniente del plásmido pLP143 ( <i>SIR3-A</i> del aislado MC65) fue clonado en el vector replicativo pMJ22 digerido con <i>KpnI/Spel</i> . Ap <sup>R</sup> , Nat <sup>R</sup>	Este trabajo
3875	pLP181	pMJ22	Un fragmento digerido con <i>KpnI/Spel</i> de 2.8kb proveniente del plásmido pLP145 ( <i>SIR3-A</i> del aislado MC68) fue clonado en el vector replicativo pMJ22 digerido con <i>KpnI/Spel</i> . Ap <sup>R</sup> , Nat <sup>R</sup>	Este trabajo
3877	pLP183	pMJ22	Un fragmento digerido con <i>KpnI/Spel</i> de 2.8kb proveniente del plásmido pLP147 ( <i>SIR3-A</i> del aislado MC29) fue clonado en el vector replicativo pMJ22 digerido con <i>KpnI/Spel</i> . Ap <sup>R</sup> , Nat <sup>R</sup>	Este trabajo
3879	pLP185	pMJ22	Un fragmento digerido con <i>KpnI/Spel</i> de 2.8kb proveniente del plásmido pLP150 ( <i>SIR3-A</i> del aislado MC2) fue clonado en el vector replicativo pMJ22 digerido con <i>KpnI/Spel</i> . Ap <sup>R</sup> , Nat <sup>R</sup>	Este trabajo
3881	pLP187	pMJ22	Un fragmento digerido con <i>KpnI/Spel</i> de 2.8kb proveniente del plásmido pLP156 ( <i>SIR3-A</i> de la cepa CBS138) fue clonado en el vector replicativo pMJ22 digerido con <i>KpnI/Spel</i> . Ap <sup>R</sup> , Nat <sup>R</sup>	Este trabajo

3893	pLP189	pLP171	Un fragmento de 2.4kb digerido con <i>SpeI/SacI</i> y proveniente del plásmido pLP158 ( <i>SIR3-B</i> de la cepa BG14) fue clonado en el vector replicativo pLP171 previamente digerido con <i>SpeI/SacI</i> para reconstituir al gen <i>SIR3</i> . Ap <sup>R</sup> , Nat <sup>R</sup>	Este trabajo
3895	pLP191	pLP173	Un fragmento de 2.4kb digerido con <i>SpeI/SacI</i> y proveniente del plásmido pLP169 ( <i>SIR3-B</i> del aislado MC39) fue clonado en el vector replicativo pLP173 previamente digerido con <i>SpeI/SacI</i> para reconstituir al gen <i>SIR3</i> . Ap <sup>R</sup> , Nat <sup>R</sup>	Este trabajo
3899	pLP195	pLP179	Un fragmento de 2.4kb digerido con <i>SpeI/SacI</i> y proveniente del plásmido pLP160 ( <i>SIR3-B</i> del aislado MC65) fue clonado en el vector replicativo pLP179 previamente digerido con <i>SpeI/SacI</i> para reconstituir al gen <i>SIR3</i> . Ap <sup>R</sup> , Nat <sup>R</sup>	Este trabajo
3901	pLP197	pLP181	Un fragmento de 2.4kb digerido con <i>SpeI/SacI</i> y proveniente del plásmido pLP161 ( <i>SIR3-B</i> del aislado MC68) fue clonado en el vector replicativo pLP181 previamente digerido con <i>SpeI/SacI</i> para reconstituir al gen <i>SIR3</i> . Ap <sup>R</sup> , Nat <sup>R</sup>	Este trabajo

3903	pLP199	pLP177	Un fragmento de 2.4kb digerido con <i>SpeI/SacI</i> y proveniente del plásmido pLP154 ( <i>SIR3-B</i> del aislado MC25) fue clonado en el vector replicativo pLP177 previamente digerido con <i>SpeI/SacI</i> para reconstituir al gen <i>SIR3</i> . Ap <sup>R</sup> , Nat <sup>R</sup>	Este trabajo
3904	pLP200	pLP183	Un fragmento de 2.4kb digerido con <i>SpeI/SacI</i> y proveniente del plásmido pLP163 ( <i>SIR3-B</i> del aislado MC29) fue clonado en el vector replicativo pLP183 previamente digerido con <i>SpeI/SacI</i> para reconstituir al gen <i>SIR3</i> . Ap <sup>R</sup> , Nat <sup>R</sup>	Este trabajo
3906	pLP202	pLP185	Un fragmento de 2.4kb digerido con <i>SpeI/SacI</i> y proveniente del plásmido pLP167 ( <i>SIR3-B</i> del aislado MC2) fue clonado en el vector replicativo pLP185 previamente digerido con <i>SpeI/SacI</i> para reconstituir al gen <i>SIR3</i> . Ap <sup>R</sup> , Nat <sup>R</sup>	Este trabajo
3908	pLP204	pLP187	Un fragmento de 2.4kb digerido con <i>SpeI/SacI</i> y proveniente del plásmido pLP165 ( <i>SIR3-B</i> de la cepa CBS138) fue clonado en el vector replicativo pLP187 previamente digerido con <i>SpeI/SacI</i> para reconstituir al gen <i>SIR3</i> . Ap <sup>R</sup> , Nat <sup>R</sup>	Este trabajo
Plásmidos episomales para genes <i>SIR4</i>				

4065	pLP212	pMB11	Un fragmento de 5.6kb que contiene al gen <i>SIR4</i> amplificado con los oligonucleótidos 2191Fw y 2192Rv fue clonado en el vector pMB11 digerido con <i>StuI</i> . El ADN molde proviene de la cepa BG14. Cm <sup>R</sup>	Este trabajo
4067	pLP214	pMB11	Un fragmento de 5.6kb que contiene al gen <i>SIR4</i> amplificado con los oligonucleótidos 2191Fw y 2192Rv fue clonado en el vector pMB11 digerido con <i>StuI</i> . El ADN molde proviene del aislado MC65. Cm <sup>R</sup>	Este trabajo
4069	pLP216	pMB11	Un fragmento de 5.6kb que contiene al gen <i>SIR4</i> amplificado con los oligonucleótidos 2191Fw y 2192Rv fue clonado en el vector pMB11 digerido con <i>StuI</i> . El ADN molde proviene del aislado MC29. Cm <sup>R</sup>	Este trabajo
4072	pLP218	pMB11	Un fragmento de 5.6kb que contiene al gen <i>SIR4</i> amplificado con los oligonucleótidos 2191Fw y 2192Rv fue clonado en el vector pMB11 digerido con <i>StuI</i> . El ADN molde proviene de la cepa CBS138. Cm <sup>R</sup>	Este trabajo
4120	pLP224	pMB11	Un fragmento de 5.6kb que contiene al gen <i>SIR4</i> amplificado con los oligonucleótidos 2191Fw y 2192Rv fue clonado en el vector pMB11 digerido con <i>StuI</i> . El ADN molde proviene del aislado MC2. Cm <sup>R</sup>	Este trabajo

4097	pLP219	pMJ22	Un fragmento <i>Sna</i> BI/ <i>Xba</i> I de 5.6kb proveniente del plásmido pLP212 ( <i>SIR4</i> -BG14) fue clonado en el vector replicativo pMJ22 digerido con <i>Eco</i> RV/ <i>Xba</i> I. Ap <sup>R</sup> , Nat <sup>R</sup>	Este trabajo
4099	pLP221	pMJ22	Un fragmento <i>Sna</i> BI/ <i>Xba</i> I de 5.6kb proveniente del plásmido pLP218 ( <i>SIR4</i> -CBS138) fue clonado en el vector replicativo pMJ22 digerido con <i>Eco</i> RV/ <i>Xba</i> I. Ap <sup>R</sup> , Nat <sup>R</sup>	Este trabajo
4115	pLP223	pMJ22	Un fragmento <i>Sna</i> BI/ <i>Xba</i> I de 5.6kb proveniente del plásmido pLP214 ( <i>SIR4</i> -MC65) fue clonado en el vector replicativo pMJ22 digerido con <i>Eco</i> RV/ <i>Xba</i> I. Ap <sup>R</sup> , Nat <sup>R</sup>	Este trabajo
4125	pLP225	pMJ22	Un fragmento <i>Sna</i> BI/ <i>Xba</i> I de 5.6kb proveniente del plásmido pLP216 ( <i>SIR4</i> -MC29) fue clonado en el vector replicativo pMJ22 digerido con <i>Eco</i> RV/ <i>Xba</i> I. Ap <sup>R</sup> , Nat <sup>R</sup>	Este trabajo
4145	pLP227	pMJ22	Un fragmento <i>Sna</i> BI/ <i>Xba</i> I de 5.6kb proveniente del plásmido pLP224 ( <i>SIR4</i> -MC2) fue clonado en el vector replicativo pMJ22 digerido con <i>Eco</i> RV/ <i>Xba</i> I. Ap <sup>R</sup> , Nat <sup>R</sup>	Este trabajo
Plásmidos episomales para quimeras del gen <i>SIR3</i> en <i>Escherichia coli</i>				

4185	pLP238	pLP189	Vector de clonación replicativo en <i>C. glabrata</i> digerido con <i>SpeI</i> / <i>Bam</i> HI para clonar un fragmento compatible del gen <i>sir3</i> -MC2 de 1.3 kb extraído de pLP202. Previamente, pLP202 fue digerido con <i>SpeI</i> / <i>Bam</i> HI. Ap <sup>R</sup> , Nat <sup>R</sup>	Este trabajo
4193	pLP240	pLP189	Vector de clonación replicativo en <i>C. glabrata</i> digerido con <i>XhoI</i> / <i>SpeI</i> para clonar un fragmento compatible del gen <i>sir3</i> -MC2 de 1.2 kb extraído de pLP202. Previamente, pLP202 fue digerido con <i>XhoI</i> / <i>SpeI</i> . Ap <sup>R</sup> , Nat <sup>R</sup>	Este trabajo
Plásmidos episomales para gen <i>EPA1</i> en <i>Saccharomyces cerevisiae</i>				
3602	pLP83	pBC169	Vector de clonación replicativo en <i>S. cerevisiae</i> digerido con <i>EcoRI</i> / <i>XhoI</i> para clonar un producto de PCR de 3.1 kb que contiene al gen <i>EPA1</i> amplificado con los oligonucleótidos 1905Fw ( <i>EcoRI</i> ) y 1906Rv ( <i>XhoI</i> ). El ADN molde proviene de la cepa CBS138. Ap <sup>R</sup>	Este trabajo

3604	pLP85	pBC169	Vector de clonación replicativo en <i>S. cerevisiae</i> digerido con <i>EcoRI</i> / <i>XhoI</i> para clonar un producto de PCR de 3.1 kb que contiene al gen <i>EPA1</i> amplificado con los oligonucleótidos 1905Fw ( <i>EcoRI</i> ) y 1906Rv ( <i>XhoI</i> ). El ADN molde proviene de la cepa MC25. Ap <sup>R</sup>	Este trabajo
3606	pLP87	pBC169	Vector de clonación replicativo en <i>S. cerevisiae</i> digerido con <i>EcoRI</i> / <i>XhoI</i> para clonar un producto de PCR de 3.1 kb que contiene al gen <i>EPA1</i> amplificado con los oligonucleótidos 1905Fw ( <i>EcoRI</i> ) y 1906Rv ( <i>XhoI</i> ). El ADN molde proviene de la cepa BG14. Ap <sup>R</sup>	Este trabajo
3608	pLP89	pBC169	Vector de clonación replicativo en <i>S. cerevisiae</i> digerido con <i>EcoRI</i> / <i>XhoI</i> para clonar un producto de PCR de 3.1 kb que contiene al gen <i>EPA1</i> amplificado con los oligonucleótidos 1905Fw ( <i>EcoRI</i> ) y 1906Rv ( <i>XhoI</i> ). El ADN molde proviene de la cepa MC39. Ap <sup>R</sup>	Este trabajo

3610	pLP91	pBC169	Vector de clonación replicativo en <i>S. cerevisiae</i> digerido con <i>EcoRI</i> / <i>XhoI</i> para clonar un producto de PCR de 3.1 kb que contiene al gen <i>EPA1</i> amplificado con los oligonucleótidos 1905Fw ( <i>EcoRI</i> ) y 1906Rv ( <i>XhoI</i> ). El ADN molde proviene de la cepa MC56. Ap <sup>R</sup>	Este trabajo
3612	pLP93	pBC169	Vector de clonación replicativo en <i>S. cerevisiae</i> digerido con <i>EcoRI</i> / <i>XhoI</i> para clonar un producto de PCR de 3.1 kb que contiene al gen <i>EPA1</i> amplificado con los oligonucleótidos 1905Fw ( <i>EcoRI</i> ) y 1906Rv ( <i>XhoI</i> ). El ADN molde proviene de la cepa MC2. Ap <sup>R</sup>	Este trabajo
3734	pLP113	pBC169	Vector de clonación replicativo en <i>S. cerevisiae</i> digerido con <i>EcoRI</i> / <i>XhoI</i> para clonar un producto de PCR de 3.1 kb que contiene al gen <i>EPA1</i> amplificado con los oligonucleótidos 1905Fw ( <i>EcoRI</i> ) y 1906Rv ( <i>XhoI</i> ). El ADN molde proviene de la cepa MC29. Ap <sup>R</sup>	Este trabajo

3736	pLP115	pBC169	Vector de clonación replicativo en <i>S. cerevisiae</i> digerido con <i>EcoRI</i> / <i>XhoI</i> para clonar un producto de PCR de 3.1 kb que contiene al gen <i>EPA1</i> amplificado con los oligonucleótidos 1905Fw ( <i>EcoRI</i> ) y 1906Rv ( <i>XhoI</i> ). El ADN molde proviene de la cepa MC65. Ap <sup>R</sup>	Este trabajo
3738	pLP117	pBC169	Vector de clonación replicativo en <i>S. cerevisiae</i> digerido con <i>EcoRI</i> / <i>XhoI</i> para clonar un producto de PCR de 3.1 kb que contiene al gen <i>EPA1</i> amplificado con los oligonucleótidos 1905Fw ( <i>EcoRI</i> ) y 1906Rv ( <i>XhoI</i> ). El ADN molde proviene de la cepa MC68. Ap <sup>R</sup>	Este trabajo
Construcciones con región intergénica entre <i>EPA1</i> y <i>EPA2</i> , que contiene el Elemento Negativo (NE)				
3780	pLP119	pMB11	Vector de clonación de productos de PCR digerido con <i>XhoI</i> para clonar un fragmento de 3.1 kb amplificado con los oligonucleótidos 2056Fw ( <i>XhoI</i> ) y 2067Rv ( <i>XhoI</i> ). El ADN molde proviene de la cepa MC2. Cm <sup>R</sup>	Este trabajo

3782	pLP121	pMB11	Vector de clonación de productos de PCR digerido con <i>Xho</i> I para clonar un fragmento de 3.1 kb amplificado con los oligonucleótidos 2056Fw ( <i>Xho</i> I) y 2067Rv ( <i>Xho</i> I). El ADN molde proviene de la cepa MC65. Cm <sup>R</sup>	Este trabajo
3784	pLP123	pMB11	Vector de clonación de productos de PCR digerido con <i>Xho</i> I para clonar un fragmento de 3.1 kb amplificado con los oligonucleótidos 2056Fw ( <i>Xho</i> I) y 2067Rv ( <i>Xho</i> I). El ADN molde proviene de la cepa MC29. Cm <sup>R</sup>	Este trabajo
3786	pLP125	pMB11	Vector de clonación de productos de PCR digerido con <i>Xho</i> I para clonar un fragmento de 3.1 kb amplificado con los oligonucleótidos 2056Fw ( <i>Xho</i> I) y 2067Rv ( <i>Xho</i> I). El ADN molde proviene de la cepa MC25. Cm <sup>R</sup>	Este trabajo
3788	pLP127	pMB11	Vector de clonación de productos de PCR digerido con <i>Xho</i> I para clonar un fragmento de 3.1 kb amplificado con los oligonucleótidos 2056Fw ( <i>Xho</i> I) y 2067Rv ( <i>Xho</i> I). El ADN molde proviene de la cepa MC56. Cm <sup>R</sup>	Este trabajo
3790	pLP129	pMB11	Vector de clonación de productos de PCR digerido con <i>Xho</i> I para clonar un fragmento de 3.1 kb amplificado con los oligonucleótidos 2056Fw ( <i>Xho</i> I) y 2067Rv ( <i>Xho</i> I). El ADN molde proviene de la cepa MC39. Cm <sup>R</sup>	Este trabajo

3792	pLP131	pMB11	Vector de clonación de productos de PCR digerido con <i>Xho</i> I para clonar un fragmento de 3.1 kb amplificado con los oligonucleótidos 2056Fw ( <i>Xho</i> I) y 2067Rv ( <i>Xho</i> I). El ADN molde proviene de la cepa MC68. Cm <sup>R</sup>	Este trabajo
3796	pLP133	pMB11	Vector de clonación de productos de PCR digerido con <i>Xho</i> I para clonar un fragmento de 3.1 kb amplificado con los oligonucleótidos 2056Fw ( <i>Xho</i> I) y 2067Rv ( <i>Xho</i> I). El ADN molde proviene de la cepa CBS138. Cm <sup>R</sup>	Este trabajo
3798	pLP135	pMB11	Vector de clonación de productos de PCR digerido con <i>Xho</i> I para clonar un fragmento de 3.1 kb amplificado con los oligonucleótidos 2056Fw ( <i>Xho</i> I) y 2067Rv ( <i>Xho</i> I). El ADN molde proviene de la cepa BG14. Cm <sup>R</sup>	Este trabajo
3949	pLP205	pAP385	Vector de clonación replicativo en <i>C. glabrata</i> digerido con <i>Xho</i> I para clonar un producto de PCR de 3Kb que contiene la región intergénica entre <i>EPA1</i> y <i>EPA2</i> , amplificado con los oligonucleótidos 2056Fw ( <i>Xho</i> I) y 2067Rv ( <i>Xho</i> I). El ADN molde proviene de la cepa CBS138. Ap <sup>R</sup> , URA3 <sup>+</sup>	Este trabajo

3979	pLP207	pAP385	Vector de clonación replicativo en <i>C. glabrata</i> digerido con <i>XhoI</i> para clonar un producto de PCR de 3Kb que contiene la región intergénica entre <i>EPA1</i> y <i>EPA2</i> , amplificado con los oligonucleótidos 2056Fw ( <i>XhoI</i> ) y 2067Rv ( <i>XhoI</i> ). El ADN molde proviene de la cepa MC25. Ap <sup>R</sup> , <i>URA3</i> <sup>+</sup>	Este trabajo
3987	pLP209	pAP385	Vector de clonación replicativo en <i>C. glabrata</i> digerido con <i>XhoI</i> para clonar un producto de PCR de 3Kb que contiene la región intergénica entre <i>EPA1</i> y <i>EPA2</i> , amplificado con los oligonucleótidos 2056Fw ( <i>XhoI</i> ) y 2067Rv ( <i>XhoI</i> ). El ADN molde proviene de la cepa MC2. Ap <sup>R</sup> , <i>URA3</i> <sup>+</sup>	Este trabajo
Plásmidos integrativos				
2362	pJV18	pGE36	Un fragmento de 0.998 kb <i>HindIII-KpnI</i> que contenía la region 3'UTR de <i>SIR3-BG14</i> proveniente del vector pAP726 fue clonado en pGE36 previamente digerido con <i>HindIII-KpnI</i> . Hyg <sup>R</sup> , Ap <sup>R</sup>	Colección del laboratorio
2397	pJV22	pJV18	Vector etiquetado <i>SIR3-BG14-FLAG</i>  Un fragmento de 1.3 kb del marco abierto de lectura de la región 3' <i>SIR3-BG14</i> derivado del vector pAP724 fue clonado en el vector integrativo pJV18 previamente digerido con <i>SpeI/BamHI</i> . Hyg <sup>R</sup> , Ap <sup>R</sup> , <i>URA3</i> <sup>+</sup>	Colección del laboratorio

4342	pCM1	pJV18	<p>Vector etiquetado <i>sir3</i>-MC2-FLAG</p> <p>Un fragmento de 1.3 kb del marco abierto de lectura de la región 3' <i>sir3</i>-BG14 amplificado del aislado clínico MC2 (oligonucleotidos 397 y 398) fue clonado en el vector integrativo pJV18 previamente digerido con <i>SpeI/BamHI</i>. Hyg<sup>R</sup>, Ap<sup>R</sup>, <i>URA3</i><sup>+</sup></p>	Este trabajo
------	------	-------	--	--------------

**Anexo 3.** Oligonucleótidos usados en este trabajo.

Número	Región o gen	Secuencia	Sitio de restricción
<b>Oligos para SIR2</b>			
523	SIR2@992 Fw	AACCGCTGAAATTATTAGAGCCAC G	
524	SIR2@+982 Rv	TTGGGCAGAGGTGTTCAACTCTAG ACC	
<b>Oligos para SIR3</b>			
54	SIR3@943 Fw	GCAGCCACTGCACAAGAATC	
55	SIR3@4298 Rv	AGGCAGCTCGCCAGAATCCCATT C	
108	SIR3@18 Fw	GACCTGGAAGGATGGCAGATAAT C	
109	SIR3@324 Rv	GGGCTTGAACTCCTTGTAGTAGTC	
369	SIR3@3264 Rv	TTCGGTGAGACACGATTG	
395	SIR3@+1bp <i>HindIII</i> Fw	AAA <b>AAGCTT</b> TTCATCTTCTTTTCTTG	<i>HindIII</i>
396	SIR3@+996 bp <i>KpnI</i> Rv	GCG <b>GGTACCT</b> TCTGAATGATGCTG TGTGG	<i>KpnI</i>
397	SIR3@1889 <i>SpeI</i> Fw	ACC <b>ACTAGTGA</b> ATCCCTAATTCAA TG	<i>SpeI</i>
398	SIR3@3264 <i>BglII</i> Rv	GCG <b>AGATCT</b> TTTTCGGTGAGACAC GATTGG	<i>BglII</i>
1103	SIR3@3089 Fw	GATGTGGCTGGACGTCTTC	
1159	SIR3@1453 Fw	CAGAAGCCTTAAAATACAAAGC	
1265	SIR3@617 Fw	GCTGAAGAATTTAACAGTCAACG	
2122	SIR3-A @1898( <i>SpeI</i> ) Rv	GATTC <b>ACTAGTGG</b> TACATTTCCGT AATTTC	<i>SpeI</i>

2123	<i>SIR3-B@4298</i> <i>Sacl</i> Rv	GGTT <b>GAGCTC</b> AGGCAGCTCG	<i>Sacl</i>
2124	<i>SIR3-B</i> <i>@1883(Spel)</i> Fw	TAC <b>CACTAGT</b> GAATCCCTAATTCA ATGTATG	<i>Spel</i>
2178	<i>SIR3-A@-943</i> <i>Kpnl</i> Fw	GAAG <b>GTACCG</b> CAGCCACTGCACA AG	<i>Kpnl</i>
<b>Oligos para <i>SIR4</i></b>			
86	<i>SIR4@140</i> Fw	TAGTGA <b>ACTAGT</b> TAGTCCAATG	
87	<i>SIR4@465</i> Rv	CGTAGTATCCTGTTCAAGC	
525	<i>SIR4@-1012</i> Fw	GCAGCTTACACTAAAGTCACGT	
526	<i>SIR4@+982</i> Rv	ACAACCAACTCAAACAAGTACCTA CCG	
2129	<i>SIR4@1094</i> Rv	GCATCTTG <b>CCTAGG</b> ATAGGAACTG	
2132	<i>SIR4@-67</i> Fw	GCCATTCCACCAAGCTCCGATAC	
2133	<i>SIR4@521</i> Fw	CGGGGATAGCAATTTCCAAAACC	
2134	<i>SIR4@1107</i> Fw	CAGGGTAATACTAGAACGGGAGG TTC	
2135	<i>SIR4@1667</i> Fw	GGAAATTGAAAACAAATCCAATGT TCCTG	
2136	<i>SIR4@2244</i> Fw	GAACCACATACTGCTAAAGATGTT GAAC	
2137	<i>SIR4@2812</i> Fw	CAGACGAGGACTCTGATATTGAAT TATCTTC	
2139	<i>SIR4@3361</i> Fw	CCCAATGGTTAAACCACCTTCGAT C	
2140	<i>SIR4@3897</i> Fw	GCCACAAACCCGATCGAATTAGAA TCTATTC	
2191	<i>SIR4@-497</i> <i>SnaBI</i> Fw	GAAT <b>ACGTAGT</b> ACCTTTGTCGCAA TAGGC	<i>SnaBI</i>

2192	<i>SIR4</i> @+786 <i>Xba</i> I Rv	CAGT <b>CTAGAG</b> CCAAACAAGTGTCT TACCTGTGG	<i>Xba</i> I
<b>Oligonucleótidos para amplificar <i>EPA1</i></b>			
1905	<i>EPA1</i> @1pb Fw	AGT <b>GAATTC</b> AAAATGATTTTAAATC CAGCTC	<i>Eco</i> RI
1906	<i>EPA1</i> @3105pb Rv	AGTTG <b>CTCGAG</b> TTAGGTCCCTATG TTCATCAC	<i>Xho</i> I
<b>Oligonucleótidos para amplificar el minisatelite presente en <i>EPA1</i></b>			
1786	<i>EPA1</i> @1687pb Fw	CTAATTCGAATAATCACTGGAGC	
1904	<i>EPA1</i> @2177pb Rv	CTGCTAGCCGATTTATTATTTC	
2059	<i>EPA1</i> @1459pb Fw	CGACTTCAATGCATACTTCCTCCG	
2060	<i>EPA1</i> @2242pb Rv	GGGTGCTATGTACCTTGCACATG	
<b>Oligonucleótidos para amplificar región 3'UTR <i>EPA1</i></b>			
2056	<i>EPA1</i> @3078pb Fw	GAC <b>CTCGAG</b> AATAAGTGATGAAC ATAGGG	<i>Xho</i> I
2067	<i>EPA1</i> @+2974pb Rv	TGGTACTT <b>CTCGAG</b> TCCCACCAGT TGG	<i>Xho</i> I
<b>Oligonucleótidos para secuenciar</b>			
604	<i>sacB</i> @181 Fw	AAAAATATCAAGTTCCTGAATTCTG	
605	<i>sacB</i> @322 Rv	CAAAGACGATGTGGTAGCC	

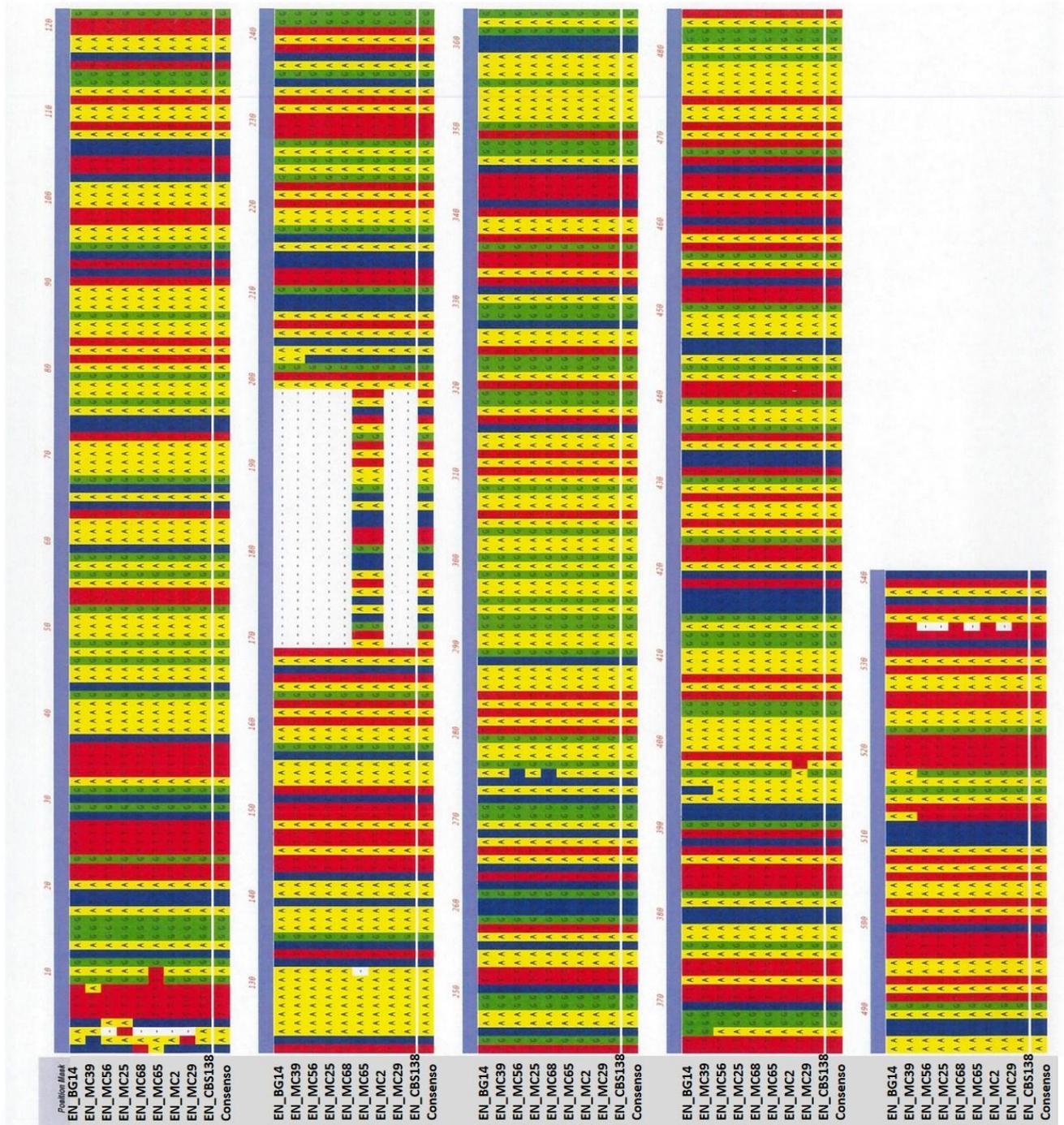
<b>Oligos para diagnosticar <i>SIR3-Flag::hph</i> en cromosoma</b>			
15	<i>hph</i> @-368pb Rv	CGATAAGAGGCCACGTGCTTTATG	
16	<i>hph</i> @+404pb Fw	AGAAATACGCACGAACACGATATA GAGG	

Algunos oligonucleótidos tienen sitios de restricción, los cuales están marcados en negritas. Los sitios de restricción entre paréntesis son sitios naturales en la secuencia de *C. glabrata*. Todos los oligonucleótidos están en la dirección 5'-3'.





## Anexo 6. Alineamiento del Elemento Negativo asociado a *EPA1* en los aislados clínicos



**Anexo 7.** El Elemento Negativo asociado a *EPA1* se encuentra conservado entre los aislados clínicos.

	<b>% Identidad respecto a EN_BG14</b>
EN_MC39	99.6
EN_MC56	98.2
EN_MC25	98.4
EN_MC65	92
EN_MC68	98.4
EN_MC29	97.8
EN_MC2	92.7
EN_CBS138	99







### Formatted Alignments

```

                20                                40                                60                                80
5 SIR3 BG14  CGGCCTTGTCAGCGATAATTGTATGGTGAAGATTGGCAATTCGGAGTATAAGAACACCAATGTGGAACCATCTGGCCAGC
5 SIR3 CBS138 CGGCCTTGTCAGCGATAAATGTATGGTAAAGATTGGCAATTCGGAGTATAAGAACACCAATGTGGAACCATCTGGCCAGC
5 SIR3 MC2    CGGCCTTGTCAGCGATAAATGTATGGTAAAGATTGGCAATTCGGAGTATAAGAACACCAATGTGGAACCATCTGGCCAGC
                CGGCCTTGTCAGCGATAATTGTATGGTAAAGATTGGCAATTCGGAGTATAAGAACACCAATGTGGAACCATCTGGCCAGC

                100                            120                            140                            160
5 SIR3 BG14  TACAGAATAGCCATAAGGGTACATATAACCGGCAATGGGCGACCTATGGCCATCAACACAGAGGTGAAGTACTAGCTTGGCTT
5 SIR3 CBS138 TACAGAATAGCCATAAGGGTACATATAACCGGCAATGGGCGTCTATGGCCATCAACACAGAGGTGAAGTACTAGCTTGGCTT
5 SIR3 MC2    TACAGAATAGCCATAAGGGTACATATAACCGGCAATGGGCGTCTATGGCCATCAACACAGAGGTGAAGTACTAGCTTGGCTT
                TACAGAATAGCCATAAGGGTACATATAACCGGCAATGGGCGTCTATGGCCATCAACACAGAGGTGAAGTACTAGCTTGGCTT

                180                            200                            220                            240
5 SIR3 BG14  ATCCGAATTGCCTCCGCACTCTATTTTTATCGATTTTTCAAGCAATTTCTTGTGGTAAGGTCACTTTTAACTGAAAA
5 SIR3 CBS138 ATCCGAATTGCCTCCGCACTCTATTTTTATCGATTTTTCAAGCAATTTCTTGTGGTAAGGTCACTTTTAACTGAAAA
5 SIR3 MC2    ATCCGAATTGCCTCCGCACTCTATTTTTATCGATTTTTCAAGCAATTTCTGTTGGTAAGGTCACTTTTAACTGAAAA
                ATCCGAATTGCCTCCGCACTCTATTTTTATCGATTTTTCAAGCAATTTCTTGTGGTAAGGTCACTTTTAACTGAAAA

                260                            280                            300                            320
5 SIR3 BG14  TTTTCAGAAATTTTTGCGCAACAAGAAATTTGATTGCAGCCCATCATTGAAAACCGATCAATTGTTGACGTGTACTAGGG
5 SIR3 CBS138 TTTTCAGAAATTTTTGCGCAACAAGAAATTTGATTGCAGCCCATCATTGAAAACCGATCAATTGTTGACGTGTACTAGGG
5 SIR3 MC2    TTTTCAGAAATTTTTGCGCAACAAGAAATTTGATTGCAGCCCATCATTGAAAACCGATCAATTGTTGACGTGTACTAGGG
                TTTTCAGAAATTTTTTTGCGCAACAAGAAATTTGATTGCAGCCCATCATTGAAAACCGATCAATTGTTGACGTGTACTAGGG

                340                            360                            380                            400
5 SIR3 BG14  GACTGCGTGGTAATTGGAGCCCATAAAGCACAGGTGTAGACGGGGACCATCGGCGGCGCATTGATCTTATCAATTGCTCG
5 SIR3 CBS138 GACTGCGTGGTAATTGGAGCCCATAAAGCACAGGTGTAGACGGGGACCATCGGCGGCGCATTGATCTTATCAATTGCTCG
5 SIR3 MC2    GACTGCGTGGTAATTGGAGCCCATAAAGCACAGGTGTAGACGGGGACCATCGGCGGCGCATTGATCTTATCAATTGCTCG
                GACTGCGTGGTAATTGGAGCCCATAAAGCACAGGTGTAGACGGGGACCATCGGCGGCGCATTGATCTTATCAATTGCTCG

                420                            440                            460                            480
5 SIR3 BG14  ATATAGGGAGACAGGCCTGCAAATTAGGAATTTGATTGGATCAATTGACCTGGAAAGAGGACAAAAGTTGGTGCTCACGA
5 SIR3 CBS138 ATATAGGGAGACAGGCCTGCAAATTAGGAATTTGATTGGATCAATTGACCTGGAAAGAGGACAAAAGTTGGTGCTCACGA
5 SIR3 MC2    ATATAGGGAGACAGGCCTGCAAATTAGGAATTTGATTGGATCAATTGACCTGGAAAGAGGACAAAAGTTGGTGCTCACGA
                ATATAGGGAGACAGGCCTGCAAATTAGGAATTTGATTGGATCAATTGACCTGGAAAGAGGACAAAAGTTGGTGCTCACGA

                500                                520
5 SIR3 BG14  TTTATTTTGTGAAATTTGGGGCAATCTGGGAAGGTTTCGGATTAAGTAAGAGG
5 SIR3 CBS138 TTTATTTTGTGAAATTTGGGGCAATCTGGGAAGGTTTCGGATTAAGTAAGAGG
5 SIR3 MC2    TTTATTTTGTGAAATTTGGGGCAATCTGGGAAGGTTTCGGATTAAGTAAGAGG
                TTTATTTTGTGAAATTTGGGGCAATCTGGGAAGGTTTCGGATTAAGTAAGAGG

```

**Anexo 12.** Alineamiento de las regiones 3'UTR de los genes *SIR3* en las cepas BG14, CBS138 y el aislado clínico MC2.

### Formatted Alignments

```

3utr SIR3 BG14   AAAGTGCTTTTCATCTTCCTTTCTTGATTCTCTTCTACTAATACATTTTTTCAATTTTGTGTTTGGCTAATAACTCTAATATAT
3utr SIR3 CBS138 AAAAGCTTTTCATCTTCCTTTCTTGATTCTCCTCTACTAATACATTTTTTCAATTTTGTGTTTGGCTAATAACTCTAATATAT
3utr sir3 MC2    AAAAGCTTTTCATCTTCCTTTCTTGATTCTCCTCTACTAATACATTTTTTCAATTTTGTGTTTGGCTAATAACTCTAATATAT
                20                40                60                80

3utr SIR3 BG14   AGGAATAAAAAAAAAAATAACTACATCATTGACAAGTCTCATCTCCTCTTATACCGTAGATAGTTTATAATGCATGTGCCA
3utr SIR3 CBS138 AGTAATAAAAAAAAAAATAACTACATCATTGACAAGTCTCATCTCCTCTTATACCGTAGTTAGTTTATAATGCATGTGTCA
3utr sir3 MC2    AGTAATAAAAAAAAAAATAACTACATCATTGACAAGTCTCATCTCCTCTTATACCGTAGTTAGTTTATAATGCATGTGTCA
                100               120               140               160

3utr SIR3 BG14   ATACAACCTCAGCACCCAACATCACCGCTGTTCCACATATGGCGCCAATACCCAGCTATAATACAACCTTATGTATGGT
3utr SIR3 CBS138 ATACAACCTCAGCACCCAACATCACCGCTGTTCCACATATGGCGCCAATACCCAGCTATAATACAACCTTATGTATGGT
3utr sir3 MC2    ATACAACCTCAGCACCCAACATCACCGCTGTTCCACATATGGCGCCAATACCCAGCTATAATACAACCTTATGTATGGT
                180               200               220               240

3utr SIR3 BG14   AAAGATCATCGCCATTACCACAGAATGGACGTCCC GCGGTTACCGACACGCCTCTTTGACACTCAAAAATGACGTCATTG
3utr SIR3 CBS138 AAAGATCATCGCCATTACCACAGAATGGACGTCCC GCGGTTACCGACACGCCTCTTTGACACTCAAAAATGACGTCATTG
3utr sir3 MC2    AAAGATCATCGCCATTACCACAGAATGGACGTCCC GCGGTTACCGACACGCCTCTTTGACACTCAAAAATGACGTCATTG
                260               280               300               320

3utr SIR3 BG14   GCAAGCTGTATTTCCGCGTCCATTGTGTCAGCCTC - - - CGCCCCA - ATGTCCACCCAGCTGAAATCCAAGT - - CTC TAC
3utr SIR3 CBS138 GCAAGCTGTATTTCCGCGTCCATTGTGTCAGCCTC - - - CCCCCC C ATGTCCACCCAGCTGAAATCCAAGAGGCTATAC
3utr sir3 MC2    GCAAGCTGTATTTCCGCGTCCATTGTGTCAGCCTCTTCCCCCCCCCAATGTCCACCCAGCTGAAATCCAAGT - - CTC TAC
                340               360               380               400

3utr SIR3 BG14   ACCAATCCAGTGGAGGAGCTTCTGCTGCGCGTGGTGTATCTGGAAGCAGGATGTTTGTCTTTGACACCACAAGTATG TGTG
3utr SIR3 CBS138 ACCAATCCAGTGGAGGAGCTTCTGCTGCGCGTGGTGTATCTGGAAGCAGGATGTTTGTCTTTGACACCACAAGTATATGTG
3utr sir3 MC2    ACCAATCCAGTGGAGGAGCTTCTGCTGCGCGTGGTGTATCTGGAAGCAGGATGTTTGTCTTTGACACCACAAGTATATGTG
                420               440               460               480

3utr SIR3 BG14   CACTTTAGTGATGGAGCCGCTTTTACCTGATCGGGTAAGTAAGTTCAGGGTGGAAGTTGGGAAGGTCAATGGTAGTGTG
3utr SIR3 CBS138 CACTTTAGTGATGGAGCCGCTTTTACCTGATCGGGTAAGTAAGTTCAGGGTGGAAGTTGGGAAGGTCAATGGTAGTGTG
3utr sir3 MC2    CACTTTAGTGATGGAGCCGCTTTTACCTGATCGGGTAAGTAAGTTCAGGGTGGAAGTAAGTTCAGGGTGGAAGTTGGGAAGGTCAATGGTAGTGTG
                500               520               540               560

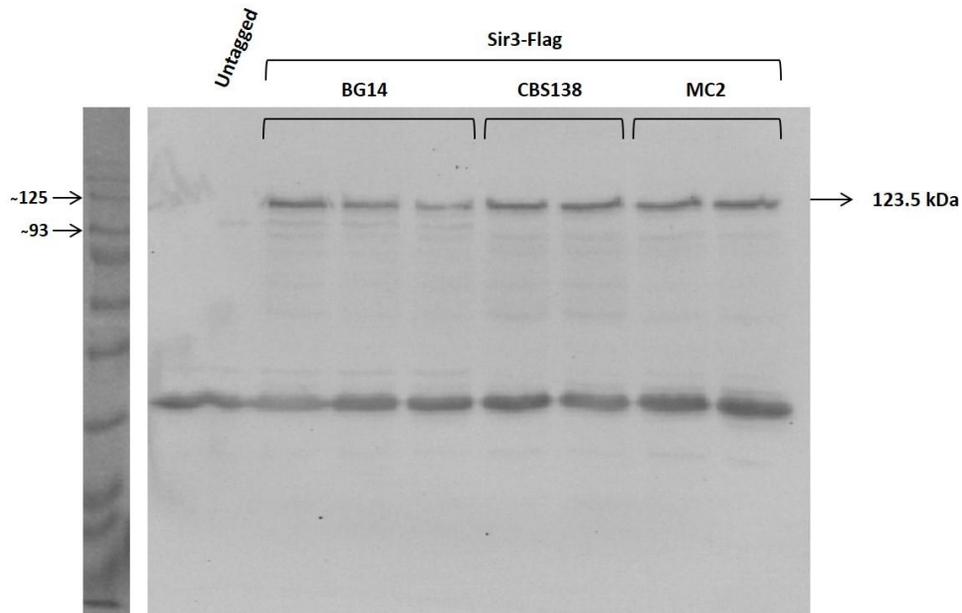
3utr SIR3 BG14   TGGGGGGAAGGGAGACAATATGTA AAAAGTATGTTTACACGAATAGATACACTGTTAACCATGCGGCTCTAATACGTATGT
3utr SIR3 CBS138 TGGGGGGA TGGGAGACAATATGTA AAAAGTATGTTTACACGAATAGATACACTGTTAACCATGCGGCTCTAATACGTATGT
3utr sir3 MC2    TGGGGG - AAGGGAGACAATATGTA AAAAGTATGTT CACACGAATAGATACACTGTTAACCATGCGGCTCTAATACGTATGT
                580               600               620               640

3utr SIR3 BG14   AGGTATTTCCACTCTGCAGTTGTTCTGAAAAGCAAATTTTCCTTTAAAAACAATCATGTGATGCAACGTCACAGATGTTT
3utr SIR3 CBS138 AGGGATTTCCACTCTGCAGTTGTTCTGAAAAGCAAATTTTCCT C TAAAAACAATCATGTGATGCAACGTCACAGATGTTT
3utr sir3 MC2    AGGGATTT C GACTCTGCTGTTGTTCTGAAAAGCAAATTTTCCTTTAAAAACAATCATGTGATGTAACGTCACAATGAAA
                660               680               700               720

3utr SIR3 BG14   AAGTTAGAAGTGGAAA
3utr SIR3 CBS138 AAGTTAGAAGTGG
3utr sir3 MC2    TGGACCTTTT TGG
                AAGTTAGAAGTGGAAA

```

**Anexo 13.** El gen *sir3*-MC2 se expresa a niveles similares a los genes *SIR3*-BG14 y *SIR3*-CBS138.



**Anexo 14.** Ficha bibliográfica del artículo publicado.

1. Osney Leiva-Peláez, Guadalupe Gutiérrez-Escobedo, Eunice López-Fuentes, José Cruz-Mora, Alejandro De Las Peñas, Irene Castaño. 2018. **“Molecular characterization of the silencing complex SIR in Candida glabrata hyperadherent clinical isolates”**. Fungal Genetics and Biology. Vol. 118: 21–31. doi: [10.1016/j.fgb.2018.05.005](https://doi.org/10.1016/j.fgb.2018.05.005).

DOI: <https://doi.org/10.1016/j.fgb.2018.05.005>

#### 14. REFERENCIAS

- Aguirre J, Ríos-Momberg M, Hewitt D, Hansberg W (2005) Reactive oxygen species and development in microbial eukaryotes. *Trends Microbiol* 13:111–118. doi: 10.1016/j.tim.2005.01.007
- Ahmad KM, Ishchuk OP, Hellborg L, et al (2013) Small chromosomes among Danish *Candida glabrata* isolates originated through different mechanisms. *Antonie van Leeuwenhoek, Int J Gen Mol Microbiol* 104:111–122. doi: 10.1007/s10482-013-9931-3
- Ahmad KM, Kokošar J, Guo X, et al (2014) Genome structure and dynamics of the yeast pathogen *Candida glabrata*. *FEMS Yeast Res* 14:529–535. doi: 10.1111/1567-1364.12145
- Behrouzi R, Lu C, Currie M, et al (2016) Heterochromatin assembly by interrupted Sir3 bridges across neighboring nucleosomes. *Elife* 5:1–28. doi: 10.7554/eLife.17556
- Bell SP, Mitchell J, Leber J, et al (1995) The multidomain structure of Orc1 p reveals similarity to regulators of DNA replication and transcriptional silencing. *Cell* 83:563–568. doi: 10.1016/0092-8674(95)90096-9
- Brachmann CB, Sherman JM, Devine SE, et al (1995) The SIR2 gene family, conserved from bacteria to humans, functions in silencing, cell cycle progression, and chromosome stability. *Genes Dev* 9:2888–2902. doi: 10.1101/gad.9.23.2888
- Calvin NM, Hanawalt PC (1988) High-efficiency transformation of bacterial cells by electroporation. *J Bacteriol* 170:2796–2801.
- Castaño I, Kaur R, Pan S, et al (2003) Tn7-based genome-wide random insertional mutagenesis of *Candida glabrata*. *Genome Res* 13:905–915. doi: 10.1101/gr.848203
- Castaño I, Pan SJ, Zupancic M, et al (2005) Telomere length control and transcriptional regulation of subtelomeric adhesins in *Candida glabrata*. *Mol*

- Microbiol 55:1246–1258. doi: 10.1111/j.1365-2958.2004.04465.x
- Chang JF, Hall BE, Tanny JC, et al (2003) Structure of the coiled-coil dimerization motif of Sir4 and its interaction with Sir3. *Structure* 11:637–649. doi: 10.1016/S0969-2126(03)00093-5
- Cleary IA, Reinhard SM, Lindsay Miller C, et al (2011) *Candida albicans* adhesin Als3p is dispensable for virulence in the mouse model of disseminated candidiasis. *Microbiology* 157:1806–1815. doi: 10.1099/mic.0.046326-0
- Cleveland AA, Harrison LH, Farley MM, et al (2015) Declining incidence of candidemia and the shifting epidemiology of *Candida* resistance in two US metropolitan areas, 2008-2013: Results from population-based surveillance. *PLoS One* 10:2008–2013. doi: 10.1371/journal.pone.0120452
- Cockell M, Palladino F, Laroche T, et al (1995) The carboxy termini of Sir4 and RAP1 affect Sir3 localization: Evidence for a multicomponent complex required for yeast telomeric silencing. *J Cell Biol* 129:909–924. doi: 10.1083/jcb.129.4.909
- Connelly JJ, Li Z, Xu R, Sternglanz R (2006) Structure and Function of the *Saccharomyces cerevisiae* Sir3 BAH Domain. *Society* 26:3256–3265. doi: 10.1128/MCB.26.8.3256
- Cormack BP (1999) An Adhesin of the Yeast Pathogen *Candida glabrata* Mediating Adherence to Human Epithelial Cells. *Science* (80- ) 285:578–582. doi: 10.1126/science.285.5427.578
- Cormack BP, Falkow S (1999) Efficient homologous and illegitimate recombination in the opportunistic yeast pathogen *Candida glabrata*. *Genetics* 151:979–987.
- Cormack BP, Ghori N, Falkow S (1999) An adhesin of the yeast pathogen *Candida glabrata* mediating adherence to human epithelial cells. *Science* 285:578–582. doi: 10.1126/science.285.5427.578
- Cuellar-Cruz M, Briones-Martin-del-Campo M, Cañas-Villamar I, et al (2008) High

resistance to oxidative stress in the fungal pathogen *Candida glabrata* is mediated by a single catalase, Cta1p, and is controlled by the transcription factors Yap1p, Skn7p, Msn2p, and Msn4p. *Eukaryot Cell* 7:814–825. doi: 10.1128/EC.00011-08

D'Enfert C, Janbon G (2015) Biofilm formation in *Candida glabrata*: What have we learnt from functional genomics approaches? *FEMS Yeast Res* 16:1–13. doi: 10.1093/femsyr/fov111

Daniel J. Diekema, Shawn A. Messer, Richard J. Hollis, Linda Boyken, Shailesh Tendolkar, Jennifer Kroeger, Ronald N. Jones MAP (2009) A global evaluation of voriconazole act...cent clinical isolates of *Candida* spp.pdf. *Diagn Microbiol Infect Dis* 63:233–236. doi: 10.1016/j.diagmicrobio.2008.11.001

de Groot PWJ, Bader O, de Boer AD, et al (2013) Adhesins in human fungal pathogens: Glue with plenty of stick. *Eukaryot Cell* 12:470–481. doi: 10.1128/EC.00364-12

De Groot PWJ, Kraneveld EA, Qing YY, et al (2008) The cell wall of the human pathogen *Candida glabrata*: Differential incorporation of novel adhesin-like wall proteins. *Eukaryot Cell* 7:1951–1964. doi: 10.1128/EC.00284-08

De Las Peñas A, Juárez-Cepeda J, López-Fuentes E, et al (2015) Local and regional chromatin silencing in *Candida glabrata*: Consequences for adhesion and the response to stress. *FEMS Yeast Res* 15:1–9. doi: 10.1093/femsyr/fov056

De Las Peñas A, Pan SJ, Castaño I, et al (2003) Virulence-related surface glycoproteins in the yeast pathogen *Candida glabrata* are encoded in subtelomeric clusters and subject to RAP1- and SIR-dependent transcriptional silencing. *Genes Dev* 17:2245–2258. doi: 10.1101/gad.1121003

Desai C, Mavrianos J, Chauhan N (2011) *Candida glabrata* Pwp7p and Aed1p are required for adherence to human endothelial cells. *FEMS Yeast Res* 11:595–601. doi: 10.1111/j.1567-1364.2011.00743.x

- Diekema D, Arbefeville S, Boyken L, et al (2012) The changing epidemiology of healthcare-associated candidemia over three decades ☆. *Diagn Microbiol Infect Dis* 73:45–48. doi: 10.1016/j.diagmicrobio.2012.02.001
- Domergue R (2005) Nicotinic Acid Limitation Regulates Silencing of Candida Adhesins During UTI. *Science* (80- ) 308:866–870. doi: 10.1126/science.1108640
- Donlan RM, Costerton JW (2002) Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clin Microbiol Rev* 15:167–19. doi: 10.1128/CMR.15.2.167
- Ehrentraut S, Hassler M, Oppikofer M, et al (2011) Structural basis for the role of the Sir3 AAA + domain in silencing: Interaction with Sir4 and unmethylated histone H3K79. *Genes Dev* 25:1835–1846. doi: 10.1101/gad.17175111
- EI-Kirat-Chatel S, Beaussart A, Derclaye S, et al (2015) Force Nanoscopy of Hydrophobic Interactions in the Fungal Pathogen *Candida glabrata*. *ACS Nano* 9:1648–1655. doi: 10.1021/nn506370f [doi]
- Fan Z, Yu H, Guo Q, et al (2016) Identification and characterization of an anti-oxidative stress-associated mutant of *Aspergillus fumigatus* transformed by *Agrobacterium tumefaciens*. *Mol Med Rep* 13:2367–2376. doi: 10.3892/mmr.2016.4839
- Frye RA (2000) Phylogenetic Classification of Prokaryotic and Eukaryotic Sir2-like Proteins. *Biochem Biophys Res Commun* 273:793–798. doi: 10.1006/bbrc.2000.3000
- Gallegos-García V, Pan SJ, Juárez-Cepeda J, et al (2012) A novel downstream regulatory element cooperates with the silencing machinery to repress EPA1 expression in *Candida glabrata*. *Genetics* 190:1285–1297. doi: 10.1534/genetics.111.138099
- Gomez Molero Emilia, D. de boer Albert, L. Dekker Henk et al. (2015) Proteomic

analysis of hyperadhesive *Candida glabrata* clinical isolates reveals a core wall proteome and differential incorporation of adhesins. *FEMS Microbiol Rev.* doi: 10.1093/femsyr/fov098

Gottschling DE, Aparicio OM, Billington BL, Zakian VA (1990) Position effect at *S. cerevisiae* telomeres: Reversible repression of Pol II transcription. *Cell* 63:751–762. doi: 10.1016/0092-8674(90)90141-Z

Gravel S., Larrivee M. LP and WRJ (1998) Yeast Ku as a Regulator of Chromosomal DNA End Structure. *Science* (80- ) 280:741–744. doi: 10.1126/science.280.5364.741

Guinea J (2014) Global trends in the distribution of *Candida* species causing candidemia. *Clin Microbiol Infect* 20:5–10. doi: 10.1111/1469-0691.12539

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

Hall-Stoodley L, Stoodley P (2009) Evolving concepts in biofilm infections. *Cell Microbiol* 11:1034–1043. doi: 10.1111/j.1462-5822.2009.01323.x

Hasan R, Leroy C, Isnard A, et al (2002) The control of the yeast H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> response by the Msn2 / 4 transcription factors. *Mol Microbiol* 45:233–241.

Hsu HC, Wang CL, Wang M, et al (2013) Structural basis for allosteric stimulation of Sir2 activity by sir4 binding. *Genes Dev* 27:64–73. doi: 10.1101/gad.208140.112

Iraqi I, Garcia-Sanchez S, Aubert S, et al (2005) The Yak1p kinase controls expression of adhesins and biofilm formation in *Candida glabrata* in a Sir4p-dependent pathway. *Mol Microbiol* 55:1259–1271. doi: 10.1111/j.1365-2958.2004.04475.x

J. Villalobos Vindas; JA. Castro Cordero; A. Avilés Montoya; M. Peláez Gil; T. Somogyi Perez; L. Sandoval Carpio (2016) Epidemiología de la candidemia

en el Hospital México. *Acta méd costarric* 58:15–21.

Jin Y, Yip HK, Samaranayake YH, et al (2003) Biofilm-Forming Ability of *Candida albicans* Is Unlikely To Contribute to High Levels of Oral Yeast Carriage in Cases of Human Immunodeficiency Virus Infection Biofilm-Forming Ability of *Candida albicans* Is Unlikely To Contribute to High Levels of Oral Yea. *J Clin Microbiol* 41:2961–2967. doi: 10.1128/JCM.41.7.2961

Jong HS, Myung JC, Jeong WS, et al (2007) Changes in karyotype and azole susceptibility of sequential bloodstream isolates from patients with *Candida glabrata* candidemia. *J Clin Microbiol* 45:2385–2391. doi: 10.1128/JCM.00381-07

Kaur R, Domergue R, Zupancic ML, Cormack BP (2005) A yeast by any other name: *Candida glabrata* and its interaction with the host. *Curr Opin Microbiol* 8:378–384. doi: 10.1016/j.mib.2005.06.012

Kaur R, Ma B, Cormack BP (2007) A family of glycosylphosphatidylinositol-linked aspartyl proteases is required for virulence of *Candida glabrata*. *Proc Natl Acad Sci* 104:7628–7633. doi: 10.1073/pnas.0611195104

Kellis M, Birren BW, Lander ES (2004) Proof and evolutionary analysis of ancient genome duplication in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Nature* 428:617–624. doi: 10.1038/nature02424

Klempp-Selb B, Rimek D, Kappe R (2000) Karyotyping of *Candida albicans* and *Candida glabrata* from patients with *Candida* sepsis Karyotypisierung von *Candida albicans* und *Candida glabrata* von Patienten mit *Candida*-Sepsis. *Mycoses* 43:159–163.

Kolpakov R, Bana G, Kucherov G (2003) mreps: Efficient and flexible detection of tandem repeats in DNA. *Nucleic Acids Res* 31:3672–3678. doi: 10.1093/nar/gkg617

Kraneveld, E. A., de Soet J. J., Deng D. M., Dekker H. L., de Koster C. G., Klis F.

- M., Crielaard W. de GPWJ (2011) Identification and Differential Gene Expression of Adhesin-Like Wall Proteins in *Candida glabrata* Biofilms. *Mycopathologia* 415–427. doi: 10.1007/s11046-011-9446-2
- Kraneveld EA, de Soet JJ, Deng DM, et al (2011) Identification and Differential Gene Expression of Adhesin-Like Wall Proteins in *Candida glabrata* Biofilms. *Mycopathologia* 172:415–427. doi: 10.1007/s11046-011-9446-2
- Kucharíková S, Neirinck B, Sharma N, et al (2015) In vivo *Candida glabrata* biofilm development on foreign bodies in a rat subcutaneous model. *J Antimicrob Chemother* 70:846–856. doi: 10.1093/jac/dku447
- Kuge S, Jones N (1994) YAP1 dependent activation of TRX2 is essential for the response of *Saccharomyces cerevisiae* to oxidative stress by hydroperoxides. *EMBO J* 13:655–64.
- Leiva-peláez O, Gutiérrez-escobedo G, López-fuentes E (2018) Molecular characterization of the Silencing complex SIR in *Candida glabrata* hyperadherent clinical isolates. *Fungal Genet Biol* 118:21–31. doi: 10.1016/j.fgb.2018.05.005
- Liou GG, Tanny JC, Kruger RG, et al (2005) Assembly of the SIR complex and its regulation by O-acetyl-ADP-ribose, a product of NAD-dependent histone deacetylation. *Cell* 121:515–527. doi: 10.1016/j.cell.2005.03.035
- Longtine MS, Wilson NM, Petracek ME, Berman J (1989) A yeast Telomere Binding Activity binds to two related telomere sequence motifs and is indistinguishable from RAP1. *Curr Genet* 16:225–239. doi: 10.1007/BF00422108
- Ma B, Pan S-J, Domergue R, et al (2009) High-affinity transporters for NAD<sup>+</sup> precursors in *Candida glabrata* are regulated by Hst1 and induced in response to niacin limitation. *Mol Cell Biol* 29:4067–4079. doi: 10.1128/MCB.01461-08
- Mansour MK, Levitz SM (2002) Interactions of fungi with phagocytes. *Curr Opin*

Microbiol 5:359–365. doi: 10.1016/S1369-5274(02)00342-9

Marshall C Walters, Roe F, Bugnicourt A, et al (2003) Contributions of Antibiotic Penetration, Oxygen Limitation. *Antimicrob Agents Chemother* 47:317–323. doi: 10.1128/AAC.47.1.317

Martínez-Jiménez V, Ramírez-Zavaleta CY, Orta-Zavalza E, et al (2013) Sir3 Polymorphisms in *Candida glabrata* Clinical Isolates. *Mycopathologia* 175:207–219. doi: 10.1007/s11046-013-9627-2

Mishra K, Shore D (1999) Yeast Ku protein plays a direct role in telomeric silencing and counteracts inhibition by Rif proteins. *Curr Biol* 9:1123–1126. doi: 10.1016/S0960-9822(99)80483-7

Morgan BA, Banks GR, Toone WM, et al (1997) The Skn7 response regulator controls gene expression in the oxidative stress response of the budding yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO J* 16:1035–44. doi: 10.1093/emboj/16.5.1035

Muller H, Thierry A, Coppée JY, et al (2009) Genomic polymorphism in the population of *Candida glabrata*: Gene copy-number variation and chromosomal translocations. *Fungal Genet Biol* 46:264–276. doi: 10.1016/j.fgb.2008.11.006

Nakagawa Y, Kanbe T, Mizuguchi I (2003) Disruption of the human pathogenic yeast *Candida albicans* catalase gene decreases survival in mouse-model infection and elevates susceptibility to higher temperature and to detergents. *Microbiol Immunol* 47:395–403. doi: 10.1111/j.1348-0421.2003.tb03376.x

Nicholls S, Straffon M, Enjalbert B, et al (2004) Msn2- and Msn4-Like Transcription Factors Play No Obvious Roles in the Stress Responses of the Fungal Pathogen *Candida albicans* Msn2- and Msn4-Like Transcription Factors Play No Obvious Roles in the Stress Responses of the Fungal Pathogen *Candida albicans*. *Eukaryot Cell* 3:1111–1123. doi: 10.1128/EC.3.5.1111

- Nucci M, Queiroz-Telles F, Alvarado-Matute T, et al (2013) Epidemiology of Candidemia in Latin America: A Laboratory-Based Survey. *PLoS One*. doi: 10.1371/journal.pone.0059373
- Onishi M, Liou GG, Buchberger JR, et al (2007) Role of the Conserved Sir3-BAH Domain in Nucleosome Binding and Silent Chromatin Assembly. *Mol Cell* 28:1015–1028. doi: 10.1016/j.molcel.2007.12.004
- Oppikofer M, Kueng S, Keusch JJ, et al (2013) Dimerization of Sir3 via its C-terminal winged helix domain is essential for yeast heterochromatin formation. *EMBO J* 32:437–49. doi: 10.1038/emboj.2012.343
- Orta-Zavalza, Emmanuel, Guerrero-Serrano Gehenna, Gutierrez-Escobedo Guadalupe, Cañas-Villamar Israel, Juárez-Cepeda Jacqueline CI and DLPA (2013) Local silencing controls the oxidative stress response and the multidrug resistance in *Candida glabrata*.pdf. *Mol Microbiol* 88:1135–1148. doi: 10.1111/mmi.12247
- Padovan ACB, Chaves GM, Colombo AL, Briones MRS (2009) A novel allele of HWP1, isolated from a clinical strain of *Candida albicans* with defective hyphal growth and biofilm formation, has deletions of Gln/Pro and Ser/Thr repeats involved in cellular adhesion. *Med Mycol* 47:824–835. doi: 10.3109/13693780802669574
- Pappas PG, Kauffman CA, Andes DR, et al (2015) Clinical Practice Guideline for the Management of Candidiasis: 2016 Update by the Infectious Diseases Society of America. *Clin Infect Dis* 62:e1–e50. doi: 10.1093/cid/civ933
- Perlin DS (2009) Resistance to echinocandin-class antifungal drugs. *Public Health* 10:121–130. doi: 10.1016/j.drug.2007.04.002.Resistance
- Pfaller MA (2012) Antifungal drug resistance: Mechanisms, epidemiology, and consequences for treatment. *Am J Med* 125:S3–S13. doi: 10.1016/j.amjmed.2011.11.001

- Pfaller MA, Messer SA, Boyken L, et al (2004) Geographic variation in the susceptibilities of invasive isolates of *Candida glabrata* to seven systemically active antifungal agents: A global assessment from the ARTEMIS antifungal surveillance program conducted in 2001 and 2002. *J Clin Microbiol* 42:3142–3146. doi: 10.1128/JCM.42.7.3142-3146.2004
- Pfaller MA, Messer SA, Rhomberg PR, Castanheira M (2017) CD101, a long-acting echinocandin, and comparator antifungal agents tested against a global collection of invasive fungal isolates in the SENTRY 2015 Antifungal Surveillance Program. *Int J Antimicrob Agents* 50:352–358. doi: 10.1016/j.ijantimicag.2017.03.028
- Pfaller MA, Moet GJ, Messer SA, et al (2011) Geographic variations in species distribution and echinocandin and azole antifungal resistance rates among *Candida* bloodstream infection isolates: Report from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (2008 to 2009). *J Clin Microbiol* 49:396–399. doi: 10.1128/JCM.01398-10
- Poláková S, Blume C, Zárate JA, et al (2009) Formation of new chromosomes as a virulence mechanism in yeast *Candida glabrata*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106:2688–2693. doi: 10.1073/pnas.0809793106
- Richard G-F, Kerrest A, Dujon B (2008) Comparative genomics and molecular dynamics of DNA repeats in eukaryotes. *Microbiol Mol Biol Rev* 72:686–727. doi: 10.1128/MMBR.00011-08
- Robledo-Márquez K, Gutiérrez-Escobedo G, Yáñez-Carrillo P, et al (2016) *Candida glabrata* encodes a longer variant of the mating type (MAT) alpha2 gene in the mating type-like MTL3 locus, which can form homodimers. *FEMS Yeast Res* 16:1–12. doi: 10.1093/femsyr/fow082
- Rosas-Hernández LL, Juárez-Reyes A, Arroyo-Helguera OE, et al (2008) yKu70/yKu80 and Rif1 regulate silencing differentially at telomeres in *Candida glabrata*. *Eukaryot Cell* 7:2168–2178. doi: 10.1128/EC.00228-08

- Roy R, Meier B, McAinsh AD, et al (2004) Separation-of-function Mutants of Yeast Ku80 Reveal a Yku80p-Sir4p Interaction Involved in Telomeric Silencing. *J Biol Chem* 279:86–94. doi: 10.1074/jbc.M306841200
- Sampath V, Yuan P, Wang IX, et al (2009) Mutational analysis of the Sir3 BAH domain reveals multiple points of interaction with nucleosomes. *Mol Cell Biol* 29:2532–45. doi: 10.1128/MCB.01682-08
- Tekaia F, Dujon B, Richard GF (2013) Detection and characterization of megasatellites in orthologous and nonorthologous genes of 21 fungal genomes. *Eukaryot Cell* 12:794–803. doi: 10.1128/EC.00001-13
- Thierry A, Bouchier C, Dujon B, Richard GF (2008) Megasatellites: A peculiar class of giant minisatellites in genes involved in cell adhesion and pathogenicity in *Candida glabrata*. *Nucleic Acids Res* 36:5970–5982. doi: 10.1093/nar/gkn594
- Thurlow LR, Hanke ML, Fritz T, et al (2012) *Staphylococcus aureus* biofilms prevent macrophage phagocytosis and attenuate inflammation in vivo. *J Immunol* 186:6585–6596. doi: 10.4049/jimmunol.1002794.
- Tsukamoto Y, Kato J, Ikeda H (1997) Silencing factors participate in DNA repair and recombination in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nature* 388:900–903. doi: 10.1038/42288
- Vale-Silva, Luis, Beaudoin Emmanuel, Trand Van Du SD (2017) Comparative Genomics of Two Sequential *Candida glabrata* Clinical Isolates. *G3 & Genes|Genomes|Genetics* 7:2413–2426. doi: 10.1534/g3.117.042887/-/DC1.1
- Wang SS, Zakian VA (1990) Sequencing of *Saccharomyces* telomeres cloned using T4 DNA polymerase reveals two domains. *Mol Cell Biol* 10:4415–9. doi: 10.1128/MCB.10.8.4415.Updated
- White TC, Marr KA, Bowden RA (1998) Clinical, cellular, and molecular factors that contribute to antifungal drug resistance. *Clin Microbiol Rev* 11:382–402.
- Wilson M (2001) Bacterial biofilms and human disease. *Sci Prog* 84:235–254. doi:

10.3184/003685001783238998

Zupancic ML, Frieman M, Smith D, et al (2008) Glycan microarray analysis of *Candida glabrata* adhesin ligand specificity. *Mol Microbiol* 68:547–559. doi: 10.1111/j.1365-2958.2008.06184.x