



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

**POSGRADO EN CIENCIAS EN BIOLOGIA MOLECULAR**

**Caracterización funcional de Abf1 en diferentes  
procesos metabólicos del ADN en *Candida  
glabrata* (*Nakaseomyces glabratus*)**

Tesis que presenta

**Laura Angélica Vera Salazar**

Para obtener el grado de

**Doctora en Ciencias en Biología Molecular**

Directora de la Tesis:

**Dra. Irene Castaño Navarro**

San Luis Potosí, S.L.P., agosto de 2026



## Constancia de aprobación de la tesis

La tesis **Caracterización funcional de Abf1 en diferentes procesos del ADN en *Candida glabrata* (*Nakaseomyces glabratus*)** presentada para obtener el Grado de Doctora en Ciencias en Biología Molecular fue elaborada por **Laura Angélica Vera Salazar** y aprobada el **12 de agosto de 2026** 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

---

**Dra. Ana Paulina Barba de la Rosa**  
Miembro del Comité Tutorial

---

**Dr. Samuel Lara González**  
Miembro del Comité Tutorial

---

**Dra. Margarita Rodríguez y Domínguez Kessler**  
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.

Este trabajo fue apoyado por el proyecto CF-2019 No. 610281 del Consejo Nacional de Humanidades Ciencia y Tecnología (ahora Secretaría de Ciencias, Humanidades Tecnología e Innovación: SECIHTI) otorgado a la Dra. Irene Castaño.

Este trabajo contó con los apoyos del Laboratorio Nacional de Biotecnología Agrícola, Médica y Ambiental (LANBAMA)

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



## Dedicatorias

A mis padres Juan y Sanjuana, porque este trabajo solo el reflejo de su amor, apoyo y sostén incondicional, esto es posible gracias a ustedes

A mis hermanas, Violeta, Mónica, Brenda, Mayra y Naomi... Son la alegría más grande de mi vida, sin su compañía y motivación no podría haber llegado hasta aquí

A Machaén, por tu paciencia y amor incondicional, por creer en mí y caminar a mi lado en cada paso de este trayecto.

A Isabel por estar en cada momento, te convertiste en mi familia

En memoria de Dulce Rincón, en cada paso de mi vida sé que está presente, al menos en mi corazón...

*Sé el cambio que quieres ver en el mundo.*

Mahatma Gandhi

## **Agradecimientos**

Al Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, por (IPICYT), por el apoyo institucional brindado, por la facilitación del uso de las instalaciones y laboratorios para el desarrollo de este trabajo

A la Secretaría de Ciencia, Humanidades, Tecnología e Innovación por la beca otorgada para el desarrollo de este trabajo durante el programa de estudios de doctorado en Biología Molecular.

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

A la Dra. Irene B. Castaño Navarro no solo por guiarme a lo largo de este trabajo y tiempo compartido sino también por las enseñanzas y conocimiento compartido y por ser un ejemplo como persona y como científica.

Al Dr. Alejandro de las Peñas por los comentarios brindados y apoyo para la realización de este trabajo.

A mi comité tutorial, Dra. Ana Paulina Barba de la Rosa, Dra. Margarita Rodríguez y Domínguez Kessler y Dr. Samuel Lara González por sus observaciones, comentarios y acompañamiento durante el desarrollo del proyecto.

A la Dra. Guadalupe Gutiérrez Escobedo por su invaluable apoyo técnico en el laboratorio, y acertadas más allá de la guía profesional, agradezco su paciencia y calidez brindada.

A Gloria López, por el invaluable e indispensable apoyo que nos brinda en el laboratorio.

Al Laboratorio 6: Laboratorio de Microbiología Molecular perteneciente a la División de Biología Molecular, por haber sido no solo mi espacio de trabajo, sino también un lugar de constante aprendizaje.

A todos mis compañeros y amigos del laboratorio de microbiología molecular por haber hecho de este espacio un segundo hogar. Gracias por su apoyo y conocimientos compartidos; por su compañía en las largas jornadas de discusión y trabajo experimental, sobre todo gracias por las risas y horas de almuerzo compartidas, por su valiosa amistad en este camino. En especial a Alex Juárez, Yazmín Contreras, Lily Díaz y Ana López.

A mis amigos que me acompañaron durante todo este proceso y se convirtieron en mi familia Isabel Osornio, Ares Cuéllar, Leonardo Villalana y Daniel Saldaña por todo el tiempo compartido que hicieron este camino memorable.

# Contenido

|                                                                                                       |      |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------|------|
| Constancia de aprobación de la tesis                                                                  | ii   |
| Créditos institucionales                                                                              | iii  |
| Acta de examen                                                                                        | iv   |
| Dedicatorias                                                                                          | v    |
| Agradecimientos                                                                                       | vi   |
| Lista de tablas                                                                                       | ix   |
| Lista de figuras                                                                                      | x    |
| Anexos                                                                                                | xii  |
| Resumen                                                                                               | xiii |
| Abstract                                                                                              |      |
| I. INTRODUCCIÓN                                                                                       | 1    |
| 1. <i>Candida glabrata</i>                                                                            | 1    |
| 2. Factores de virulencia                                                                             | 1    |
| 2.1 Resistencia a antifúngicos                                                                        | 2    |
| 2.2 Adherencia                                                                                        | 4    |
| 2.3 Plasticidad genómica                                                                              | 6    |
| 3. Abf1 es un factor general de regulación que participa en múltiples procesos del ADN                | 8    |
| 3.1 Abf1 en la replicación del ADN y transcripción génica                                             | 10   |
| 3.2 Participación en el silenciamiento regional                                                       | 13   |
| II. ANTECEDENTES DIRECTOS                                                                             | 14   |
| 1. Abf1 participa en el silenciamiento subtelomérico y en la progresión del ciclo celular             | 14   |
| III. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA                                                                       | 17   |
| IV. HIPÓTESIS                                                                                         | 18   |
| V. OBJETIVO GENERAL                                                                                   | 19   |
| VI. OBJETIVOS ESPECÍFICOS                                                                             | 19   |
| VII MATERIALES Y MÉTODOS                                                                              | 20   |
| 7.1 Medios de cultivo                                                                                 | 20   |
| 7.2 Cepas, oligonucleótidos y plásmidos                                                               | 20   |
| 7.3 Determinación de velocidad de crecimiento                                                         | 21   |
| 7.4 Pérdida de viabilidad por cuentas viables                                                         | 21   |
| 7.5 Determinación de contenido de ADN                                                                 | 22   |
| 7.6 Microscopia de fluorescencia                                                                      | 23   |
| 7.7 Análisis de plásmidos obtenidos de cepas supresoras                                               | 23   |
| 7.8 Ensayo de dilución en gota de fenotipos de complementación heteróloga                             | 24   |
| 7.9 Identificación de sitios putativos de unión para Abf1 en el promotor de <i>QCR8</i> y <i>COX6</i> | 25   |
| 7.10 Ensayos de adhesión a células HeLa                                                               | 25   |
| 7.11 Citometría de flujo                                                                              | 26   |
| VI RESULTADOS                                                                                         | 28   |
| Capítulo 1                                                                                            | 28   |
| 1.1 Antecedentes directos                                                                             | 28   |

|                                                                                                                                                  |    |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 1.2 La depleción de Abf1 causa un tránsito alterado del ciclo célula y segregación aberrante de núcleos, que conlleva a la pérdida de viabilidad |    |
| 1.3 la represión prolongada de Abf1 resulta en la aparición de colonias supresoras                                                               | 32 |
| Capítulo 2                                                                                                                                       | 37 |
| 2.1 Abf1 participates in the response to DNA damage and replicative stress in <i>Candida glabrata</i> ( <i>Nakaseomyces glabratus</i> )          | 37 |
| Capítulo 3                                                                                                                                       | 38 |
| 3.1 Restauración integral del fenotipo silvestre mediante complementación heteróloga del gen <i>ScABF1</i> en <i>C. glabrata</i>                 | 38 |
| 3.2 La sobreexpresión de <i>ABF1</i> y el alelo <i>abf1-43</i> inducen deficiencias en la respiración celular                                    | 40 |
| 3.3 Identificación de sitios de unión putativos para Abf1 en el promotor del gen nuclear de función mitocondria <i>QCR8</i>                      | 43 |
| Capítulo 4 Caracterización del promotor de <i>MT-1</i>                                                                                           | 44 |
| 4.1 La sobreexpresión de Abf1 causa letalidad en medio YNB                                                                                       | 44 |
| 4.2 Las diferencias en los medios por separado no modulan o disminuyen la intensidad de fluorescencia en medio YNB.                              | 46 |
| VII DISCUSIÓN                                                                                                                                    | 51 |
| 8.1 La plasticidad genómica de <i>Candida glabrata</i> le confiere la capacidad de adaptarse y persistir frente a diversos tipos de estrés.      | 51 |
| 8.2 Abf1 está relacionada con la función mitocondrial                                                                                            | 53 |
| VIII CONCLUSIÓN                                                                                                                                  | 56 |
| IX PERSPECTIVAS                                                                                                                                  | 58 |
| Referencias                                                                                                                                      | 59 |

## Lista de tablas

|                                                                                                                             |    |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 1. Porcentaje de homología por región de la proteína abf1 entre ortólogos y con los genes parálogos en <i>N. Castelli</i> . | 10 |
| 2. Tiempo de duplicación de cepas con plásmidos de sobreexpresión en diferentes concentraciones de cobre y medios CAA y YNB | 45 |

## Lista de figuras

|                                                                                                                                          |    |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Fig.1 Ortólogos de Abf1 en hongos ascomicetos                                                                                            | 9  |
| Fig. 2 Relación filogenética de Abf1 entre <i>S. cerevisiae</i> y <i>C. glabrata</i>                                                     | 10 |
| Fig. 3 Participación de Abf1 en la regulación de la expresión de genes meióticos y mitocondriales                                        | 12 |
| Fig. 4 Regulación de la expresión del clúster génico EPA1/2/3 en el telómero E derecho                                                   | 15 |
| Fig. 5 La represión prolongada de <i>ABF1</i> genera mutantes supresoras en la cepa <i>abf1Δ</i>                                         | 29 |
| Fig 6 La represión de Abf1 produce una progresión anormal del ciclo celular.                                                             | 30 |
| Fig. 7 La represión prolongada de <i>ABF1</i> , genera la segregación aberrante de núcleos.                                              | 31 |
| Fig.8 La mutación supresora no se encuentra en el plásmido.                                                                              | 33 |
| Fig.9 Las cepas supresoras no tienen el gen <i>ABF1</i>                                                                                  | 34 |
| Fig. 10 El gen <i>ScABF1</i> ( <i>Saccharomyces cerevisiae</i> ) complementa el crecimiento en fuentes de carbono no fermentables.       | 39 |
| Fig. 11 El gen heterólogo <i>ScABF1</i> complementa el fenotipo de adhesión a células HeLA de la cepa <i>abf1Δ</i> .                     | 40 |
| Fig. 12 El desbalance en la expresión de Abf1 o Abf1-43 causa una deficiencia en la asimilación de fuentes de carbono no fermentables.   | 42 |
| Fig. 13 Expresión de GFP en diferentes medios de cultivo y concentraciones de cobre para evaluación de la actividad del promotor de MT-1 | 46 |
| Fig.14 Efecto del pH en la inducción del promotor de <i>MT-1</i> .                                                                       | 47 |
| Fig. 15 Curvas de crecimiento en medio YNB tamponado adicionado de cobre.                                                                | 48 |
| Fig. 16 Evaluación del efecto de la histidina en combinación con CuSO <sub>4</sub> en la respuesta del promotor <i>MT-1</i>              | 49 |
| Fig. 17 Modulación de la expresión de GFP a bajas concentraciones de cobre en medio YNB.                                                 | 50 |

## Anexos

|                                                                                                                                                                         |    |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 1. Abf1 Is an Essential Protein That Participates in Cell Cycle Progression and Subtelomeric Silencing in <i>Candida glabrata</i>                                       | 65 |
| 2. Abf1 negatively regulates the expression of <i>EPA1</i> and affects adhesion in <i>Candida glabrata</i>                                                              | 67 |
| 3. Artículo de métodos en preparación Controlled-expression BiFC vectors for protein-protein interactions for <i>Nakaceomyces glabratus</i> ( <i>Candida glabrata</i> ) | 68 |
| 4. Información suplementaria                                                                                                                                            | 69 |

## Resumen

### Caracterización funcional de Abf1 en diferentes procesos metabólicos del ADN en *Candida glabrata* (*Nakaseomyces glabratus*)

*Candida glabrata* es un hongo comensal que puede comportarse como patógeno que ha sido clasificado como un agente causante de infección de alto riesgo debido a su resistencia innata y adquirida a antifúngicos y al incremento en su tasa de incidencia. Uno de sus principales factores de virulencia es la adherencia a tejidos epiteliales del hospedero, la cual se debe a la expresión de genes que codifican proteínas de la pared principalmente pertenecientes a la familia Epa. La transcripción de los genes *EPA* está sujeta a una regulación por silenciamiento subtelomérico, mediada por factores como Rap1, yKu70/80 el complejo SIR (Sir2, Sir3 y Sir4) y la proteína Abf1. Abf1 o ARS-Bindig Factor 1, es una proteína que se une en todo el genoma y ha sido ampliamente caracterizada en *S. cerevisiae*. Previamente, en nuestro grupo de investigación, determinamos que *ABF1* es un gen esencial en *C. glabrata*, involucrado tanto en el establecimiento y mantenimiento del silenciamiento subtelomérico como en la regulación del ciclo celular.

En este trabajo, investigamos el papel de Abf1 en la regulación de distintos procesos del ADN. Para ello, analizamos los efectos de la represión de *ABF1* mediante el uso de un promotor condicional que se reprime en presencia de aminoácidos; bajo estas condiciones, identificamos mutaciones supresoras que rescatan la viabilidad celular en ausencia de Abf1 y determinamos que dicha supresión no está asociada al plásmido. Por otro lado, encontramos que la transcripción de *ABF1* se autorregula negativamente y Abf1 forma homodímeros que se localizan en el núcleo. Asimismo, encontramos que Abf1 de *S. cerevisiae* complementa de manera heteróloga a la cepa *abf1*Δ de *C. glabrata*. Finalmente, demostramos que Abf1 es importante para la supervivencia de *C. glabrata* después del daño al ADN por radiación UV y destacamos el papel crucial de la región C-terminal en este proceso. Además, Abf1 es necesario para la asimilación de fuentes de carbono no fermentables.

**PALABRAS CLAVE:** Abf1, Ciclo celular, Daño al ADN, Complementación heteróloga, Abf1-43, disfunción mitocondrial, Sobreexpresión

**Abstract**  
**Functional characterization of Abf1 in different DNA-  
metabolic processes in *Candida glabrata***  
**(*Nakaseomyces glabratus*)**

*Candida glabrata* is a commensal fungus that can behave as a pathogen and has been classified as a high-risk infectious agent due to its innate and acquired resistance to antifungals and the increase in its incidence rate. One of its main virulence factors is adherence to epithelial tissues in the host, which is due to the expression of genes that encode cell wall proteins, mainly belonging to the Epa family. Transcription of the EPA genes is subject to regulation by subtelomeric silencing, mediated by factors such as Rap1, yKu70/80, the SIR complex (Sir2, Sir3 and Sir4), and the Abf1 protein. Abf1, or ARS-Binding Factor 1, is a protein that binds throughout the genome and has been extensively characterized in *S. cerevisiae*. Previously, in our research group, we determined that ABF1 is an essential gene in *C. glabrata*, involved both in the establishment and maintenance of subtelomeric silencing and in the regulation of the cell cycle. In this work, we investigated the role of Abf1 in the regulation of different DNA processes. To this end, we analyzed the effects of ABF1 repression by using a conditional promoter that is repressed in the presence of amino acids; under these conditions, we identified suppressor mutations that rescue cell viability in the absence of Abf1 and determined that this suppression is not associated with the plasmid. On the other hand, we found that ABF1 transcription is negatively autoregulated and that Abf1 forms homodimers that localize to the nucleus. Likewise, we found that *S. cerevisiae* Abf1 heterologously complements the *C. glabrata* *abf1* $\Delta$  strain. Finally, we show that Abf1 is important for the survival of *C. glabrata* after DNA damage caused by UV radiation and we highlight the crucial role of the C-terminal region in this process. In addition, Abf1 is required for the assimilation of non-fermentable carbon sources.

**KEY WORDS** Abf1, Cell Cycle, DNA damage, heterologous complementation, Abf1-43, mitochondria dysfunction, overexpression

## I. INTRODUCCIÓN

### 1. *Candida glabrata*

Las enfermedades nosocomiales causadas por hongos causan alrededor de 2.5 millones de muertes al año (Denning, 2024). Entre los agentes causantes de infecciones en pacientes inmunocomprometidos se encuentra *Candida glabrata*, la mortalidad asociada a este hongo en infecciones de tipo invasiva asciende a 20-50% de los casos reportados (Pfaller et al., 2019). *C. glabrata* se considera la segunda causa de candidiasis después de *Candida albicans*. De acuerdo con la Organización Mundial de la Salud, *C. glabrata* ha sido clasificada entre los patógenos fúngicos de alta prioridad, debido a sus características y factores de virulencia, como su capacidad para colonizar diversos órganos —entre ellos el corazón, el hígado y los riñones— y su potencial para diseminarse hacia el torrente sanguíneo (Fidel et al., 1999; WHO, 2022).

*Candida glabrata*, actualmente denominada *Nakaseomyces glabratus*, presenta una mayor cercanía filogenética con el hongo no patógeno *Saccharomyces cerevisiae* que con otras especies del género *Candida*. Asimismo, se integra en el clado Nakaseomyces, dentro del conjunto de levaduras que surgieron tras el evento de duplicación del genoma completo (Gabaldón et al., 2013).

### 2. Factores de virulencia

*C. glabrata* se encuentra, por lo general, como un microorganismo comensal en individuos sanos; sin embargo, presenta características que le confieren patogenicidad, entre las cuales destaca su capacidad de adherencia a una amplia variedad de superficies abióticas, así como a distintos tejidos dentro de su hospedero (Galocha et al., 2019). Asimismo, es capaz de replicarse en el interior de los macrófagos, interferir con la maduración de los fagolisosomas y modular negativamente la respuesta inmune del hospedero (Johnson et al., 2017; Kasper et al., 2014; Seider et al., 2011).

*C. glabrata* muestra plasticidad genómica, lo que le permite adquirir un amplio espectro de mutaciones asociadas al desarrollo de resistencia a múltiples

antifúngicos, incluidos fármacos de uso clínico frecuente como las equinocandinas y el fluconazol. Al mismo tiempo, *C. glabrata* exhibe una respuesta robusta frente a especies reactivas de oxígeno y a diversas condiciones de estrés ambiental, entre ellas el estrés térmico (Gutiérrez-Escobedo et al., 2020; Healey et al., 2016; Liu et al., 2020; Naskar et al., 2025; Pais et al., 2022; Saijo et al., 2010).

En las secciones siguientes se profundizará en los mecanismos de resistencia a antimicóticos, en la plasticidad genómica y en la capacidad de adherencia a tejidos epiteliales de *C. glabrata*.

## **2.1 Resistencia a antifúngicos**

Existen cuatro clases de antifúngicos utilizados para tratar infecciones por el género *Candida*: los azoles, que inhiben la vía de biosíntesis de ergosterol el cual se une directamente a la enzima lanosterol 14- $\alpha$  desmetilasa, lo que lleva a una acumulación de esteroides tóxicos y estrés de la membrana (Ostrosky-Zeichner et al., 2010). Las equinocandinas, que inhiben a la  $\beta$ 1-3 glucano sintasa, esto provoca debilidad en la pared celular (Perlin et al., 2017). Los polienos que forman poros en la membrana lo que causa lisis osmótica (Rasheed et al., 2020). Por último, la flucitosina, o 5-fluorocitosina 5-FC que es un análogo de bases nucleotídicas que se utiliza en la clínica como un análogo de bases en terapia combinada con otros antifúngicos, su mecanismo de acción inicia cuando entra a la célula a través de la enzima citosina permeasa. Dentro de la célula se convierte en su forma activa 5-fluorouracilo, este se incorpora en la cadena de RNA compitiendo con el uracilo e interrumpiendo la síntesis de ARN, lo que interrumpe la síntesis de proteínas en el hongo. También inhibe la síntesis de ADN, cuando este se convierte en ácido fluorodesoxiuridílico que inhibe a la enzima timidilato sintasa y conlleva daño directo en el ADN. La terapia prolongada únicamente con este fármaco puede llevar a ganancia de resistencia (Edlind & Katiyar, 2010; Houšť et al., 2020). Aunque estas terapias tienen éxito en la mayoría de los pacientes, la resistencia a antifúngicos ha incrementado del 6 al 11 % en aislados clínicos resistentes a fluconazol, y del 2 al 4% en aislados resistentes a equinocandinas en los últimos años, a través de múltiples mecanismos (Astvad et al., 2018; Soriano et al., 2023).

*Candida glabrata* exhibe resistencia inata y adquirida a fluconazol, principalmente por la sobreexpresión de bombas de flujo como Cdr1 y Cdr2. La sobreexpresión de los genes que codifican estas bombas, suele ocurrir por la aparición de mutaciones de ganancia de función del factor de transcripción Pdr1 en dos sitios de la proteína llamados hot-spot 1 y 2 que le confieren la capacidad de unirse constitutivamente a su propio promotor, el cual se autorregula positivamente. La sobreproducción constitutiva de Pdr1 causa la expresión constitutiva de bombas de flujo, expulsando con mayor eficiencia el fluconazol fuera de la célula (Pais et al., 2022; Salazar et al., 2018; Vermitsky & Edlind, 2004).

Por otro lado, se ha encontrado una asociación entre la pérdida de la función mitocondrial que causa el fenotipo “petite” que consiste en la formación de colonias pequeñas y el incremento en la expresión del gen *PDR1* lo cual resulta en resistencia a fluconazol (Ferrari et al., 2011; Siscar-Lewin et al., 2021). Se ha reportado que mutaciones en genes de la vía de reparación de errores de apareamiento de bases (MMR) como *MSH2* también incrementan la resistencia a fármacos como el fluconazol o las equinocandinas. Por otro lado, mutaciones asociadas al gen *RAD6* se relacionan con la adquisición de mutaciones que convergen en resistencia a fluconazol (Healey et al., 2016; Pais et al., 2022).

La resistencia a antifúngicos de la clase de las equinocandinas se ha relacionado con mutaciones en hot-spots (región HS1 y HS2) de los genes *FKS1* o *FKS2* que codifican para proteínas redundantes Fks1 y Fks2 que son subunidades catalíticas de la enzima  $\beta$ -(1,3)-D sintasa, fundamental para la síntesis del polisacárido  $\beta$ -(1,3)-D-glucano, que es el componente principal de la pared celular. En este caso, el cambio de aminoácidos provoca a la pérdida de afinidad por el fármaco, lo que reduce la eficacia de la terapia con esta clase de fármacos.

Adicionalmente a las mutaciones que se describen, se han identificado aislados clínicos resistentes a caspofungina (una equinocandina) que no dependen de estos genes. Estos aislados clínicos contienen mutaciones en el gen *FEN1*, que codifica una elongasa de ácidos grasos importante para la síntesis de esfingolípidos, y pueden conferir resistencia a la caspofungina (Carreté et al., 2019).

## 2.2 Adherencia

La adherencia es una habilidad que les permite a los microorganismos colonizar diferentes superficies, así como tejidos dentro de un hospedero. En hongos como *C. glabrata*, que se encuentran como comensales colonizando mucosas, la capacidad de adhesión toma relevancia (de Groot et al., 2013). Su pared celular contiene proteínas de tipo GPI (ancladas por glicosilfosfatidilinositol), las cuales se localizan en la cara externa de la pared celular, y son responsables de la interacción con el hospedero. Entre estas proteínas de la superficie celular encontramos a las adhesinas de la familia Epa, proteínas GPI modulares, que se anclan a las proteínas de la pared celular y consisten en tres dominios distintos. El primero, en su N-terminal coordina un átomo de calcio que le permite comportarse como lectina y es la región responsable de la unión específica a ligandos, que resulta en el contacto con el tejido del hospedero o con sustratos externos. En la región central se encuentra una región de baja complejidad con repeticiones en tándem de serinas y treoninas con lo cual se proyecta la región N-terminal completamente fuera de la capa de mananos que se encuentra fuera de la pared celular de levaduras. Con ello se logra dar accesibilidad a los ligandos externos. Y en su región C-terminal contiene un extremo temporal hidrofóbico que se reemplaza por un ancla de glicosilfosfatidinositol GPI, que le permite anclarse inicialmente a la membrana plasmática para después procesarse y unirse covalentemente a la pared celular ( $\beta$ -1-6-glucanos (Timmermans et al., 2018).

En la región intermedia de las adhesinas, hay dominio de baja complejidad, enriquecido en residuos de serina y treonina (Ser/Thr), usualmente constituido por secuencias repetidas en tándem y sujetas a polimorfismos (de Groot et al., 2008). Estos polimorfismos pueden originarse por eventos de recombinación o por deslizamiento durante la replicación del ADN, que añaden o eliminan unidades repetidas. A medida que aumenta la longitud de dichas regiones repetidas, se incrementa la capacidad de adherencia; de manera inversa, cuando estas regiones son más cortas, la capacidad de adhesión se reduce (Verstrepen & Fink, 2009).

Dados los polimorfismos y estructuras en tándem de las adhesinas es común encontrar variaciones en el número de repeticiones y la longitud entre ortólogos.

Por ejemplo, en la cepa de referencia CBS138 existen 20 genes que codifican adhesinas, mientras que en la cepa BG2 hay 26 (Xu et al., 2020, 2021). La comparación del genoma reveló que *EPA4* y *EPA5* están ausentes de la cepa CBS138 la identidad entre ortólogos no se da al 100% lo que indica la variedad entre los microsatélites y repeticiones en tándem entre proteínas de adhesión (de Groot et al., 2008; Kaur et al., 2005).

Epa1 es la principal adhesina que media la unión de *C. glabrata* a las células epiteliales del hospedero, además de la interacción con células del sistema inmunitario. La delección de *EPA1* reduce 20 veces la adherencia a células epiteliales en ensayos *in vitro*. El gen *EPA1* se encuentra localizado en un clúster con dos adhesinas más, *EPA2* y *EPA3*, que están muy cercanos al telómero (Castaño et al., 2005; Cormack et al., 1999). En general la mayoría de las adhesinas se codifican en genes ubicados en regiones cercanas a los telómeros; de hecho, el análisis de las secuencias cercanas a los telómeros reveló al menos un gen que codifica una adhesina putativa en cada telómero de la cepa de referencia CBS138 (de Groot et al., 2008).

En general, los genes que codifican adhesinas no se expresan de manera constitutiva *in vitro*; por el contrario, pueden presentar patrones de expresión diferencial, lo que permite a *C. glabrata* adaptarse a distintos nichos dentro del hospedero, así como a diversas superficies abióticas. Como se mencionó previamente, el hecho de que una proporción importante de los genes *EPA* se localice en regiones subteloméricas implica que estos genes están sujetos a regulación mediante mecanismos de silenciamiento subtelomérico (Castaño et al., 2005).

Este silenciamiento está controlado principalmente por el complejo SIR (compuesto por las proteínas Sir2, Sir3 y Sir4), junto con Rif1, Rap1 y las proteínas yKu (Ku70 y Ku80), que pueden extender este efecto hasta aproximadamente 20 kb desde el telómero. No todos los telómeros comparten el mismo mecanismo de regulación; por ejemplo, el telómero derecho E no requiere de Ku70/Ku80 para mantener silenciado el clúster *EPA1 EPA2* y *EPA3*. Además, en este contexto hemos encontrado la participación del factor de unión al ADN Abf1 en el

establecimiento y mantenimiento del silenciamiento de este clúster subtelomérico (Castaño et al., 2005; De Las Peñas et al., 2003; Hernández-Hernández et al., 2021; Juárez-Reyes et al., 2012; López-Fuentes et al., 2018).

En el caso de *EPA6* y *EPA7*, se ha descrito que la delección de los genes *SIR3* o de *RIF1* incrementa la adhesión debido a la des represión transcripcional de *EPA1*. Asimismo, se ha demostrado que *EPA6* se activa durante infecciones del tracto urinario en condiciones de deficiencia de ácido nicotínico, precursor de NAD<sup>+</sup>, necesario para la actividad de Sir2. La consecuente falta de activación de Sir2 conduce a la des represión de *EPA6* (Castaño et al., 2005).

Otros ejemplos de regulación diferentes a silenciamiento subtelomérico incluyen la activación de *EPA2* por los factores de transcripción Skn7 y Yap1, en respuesta a estrés oxidante. *EPA1*, *EPA3*, *EPA7* y *EPA22* durante la formación de biopelículas, así como la inducción de *EPA2* en respuesta a estrés osmótico o a la privación de glucosa (Juárez-Cepeda et al., 2015; Kraneveld et al., 2011).

### **2.3 Plasticidad genómica**

*Candida glabrata* tiene una respuesta al daño del ADN por agentes alquilantes diferente de la de *S. cerevisiae*, la cual, a diferencia de *C. glabrata*, se caracteriza por la ausencia de arresto celular en la fase S del ciclo celular. Esta ausencia de arresto en *C. glabrata* conduce a una pérdida de viabilidad celular cuando se enfrenta a este agente. Sin embargo, el análisis de la respuesta transcripcional indica que las vías de reparación del ADN se activan de manera diferencial. Por ejemplo, la vía de reparación de errores de apareamiento de bases (MMR, por sus siglas en inglés, DNA mismatch repair) permanece inactiva, mientras que la vía dependiente de *RAD6* se activa en presencia de agentes alquilantes. Adicionalmente, otros genes como *HOP2*, asociados típicamente a la meiosis en *S. cerevisiae*, se expresan en *C. glabrata* en presencia de agentes alquilantes como MMS (Metil metano sulfonato) pese a no haberse descrito funciones meióticas en esta especie, lo que sugiere que podrían tener un papel frente a daño severo del ADN o interferir con la segregación de cromosomas. (Shor et al., 2020).

Esta situación se relaciona con la notable plasticidad genómica de *C. glabrata*. Las mutaciones en componentes de las vías de *RAD6* o MMR incrementan la tasa de mutación, lo que puede conducir a ganancias de función asociadas con la resistencia a antifúngicos. En particular, la proteína *MSH2* es necesaria para la correcta localización de Sir2 y para el mantenimiento de la herencia epigenética del silenciamiento en regiones subteloméricas (Healey et al., 2016; Liu et al., 2020; Pais et al., 2022). La tasa elevada de recambio de microsatélites en las proteínas de pared de la familia Epa, observada tanto entre aislados clínicos obtenidos de distintos momentos de la infección como en cepas sometidas a evolución en laboratorio, se asocia a grandes re-arreglos cromosómicos y a variaciones en el número de genes *EPA* (Pais et al., 2022).

La plasticidad genómica podría conferir una ventaja adaptativa a *C. glabrata* frente a ambientes extremos, facilitando su capacidad de colonizar y prosperar durante un evento infeccioso, en el cual se ve sometida simultáneamente a la presión selectiva de antifúngicos, a la respuesta del sistema inmunitario del hospedero y a un suministro limitado de nutrientes (Carreté et al., 2019; Maestre-Reyna et al., 2012; Verstrepen & Fink, 2009).

El conjunto de características y atributos de *C. glabrata* que le permiten adaptarse y sobrevivir dentro del hospedero, no solo dependen de su plasticidad genómica, sino también de la regulación transcripcional de múltiples genes (genes para adhesinas, factores de transcripción, bombas de flujo, entre otros), y organización de la cromatina, proceso en el que se ve involucrada la secuencia de replicación autónoma (ARS). Abf1 (ARS Binding Factor 1) es un factor general de regulación que participa en múltiples procesos celulares que se han estudiado en *S. cerevisiae*.

Abf1 junto con Rap1 y Reb1 se integra en un grupo de factores de transcripción conocidos como factores generales de regulación (GRFs), caracterizados por unirse a varios sitios de unión al ADN, distribuidos a lo largo del genoma, son además muy abundantes, tienen una naturaleza multifuncional y son esenciales para la viabilidad celular. Estos factores desempeñan funciones que abarcan desde el remodelamiento de la cromatina y la regulación de la expresión

génica, hasta la participación en procesos de replicación y silenciamiento génico. Además, actúan como elementos delimitadores en regiones cromosómicas, restringiendo la propagación de estados específicos de la cromatina a lo largo del genoma (Bosio et al., 2017; Challal et al., 2018a; Fourel et al., 2002; Ganapathi et al., 2011; Schlecht et al., 2008)

### **3. Abf1 es un factor general de regulación que participa en múltiples procesos del ADN**

En *S. cerevisiae*, Abf1 es una proteína esencial de unión al ADN, codificada en el gen *ABF1*, el cual se encuentra en el cromosoma XI. La proteína tiene una longitud de 731 aa con un peso molecular de 80 kDa, su estructura cuenta con dos regiones de unión al ADN en su N terminal y una región C- terminal importante para el funcionamiento de la proteína. El dominio de unión a ADN en la región N-terminal está conformado por una región dedo de zinc atípico con tres histidinas y tres cisteínas, y una región de reconocimiento y unión al ADN específica. Ambas son necesarias para la unión específica y estable con el ADN. En su región C-terminal se encuentran los motivos CS1 y CS2 (C-terminal Sequence), ambos esenciales para las funciones atribuidas a Abf1. (Cho et al., 1995; Miyake et al., 2002).

El gen *ABF1* que codifica para la proteína Abf1 en *C. glabrata* tiene una longitud de 480 aa en la cepa BG2 y de 479 aa en la cepa CBS138. Abf1 de *C. glabrata* (CgAbf1) tiene una homología de 63.87% con la proteína completa de *S. cerevisiae* (ScAbf1), pero la región del dedo de zinc presenta una homología de 92.31% y la región de unión al ADN de 64.1%. En la región terminal, CgAbf1 conserva la secuencia CS2 con un 86.67% de identidad (Hernández-Hernández et al., 2021; Vera-Salazar et al., 2025). La Fig 1 muestra los ortólogos de Abf1

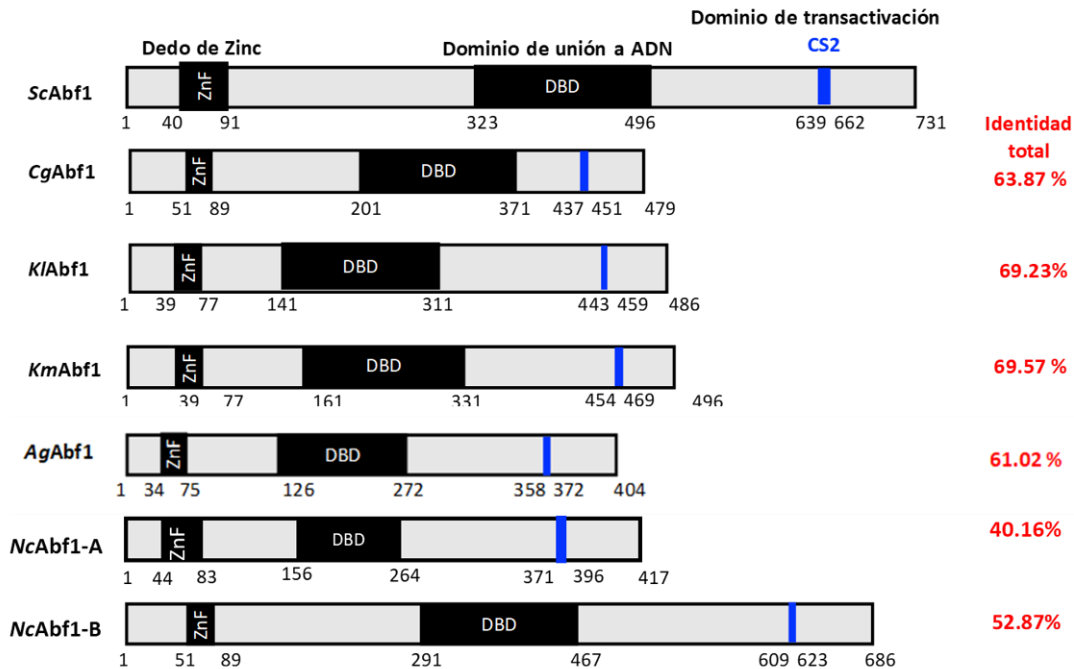


Fig. 1 Esquema de la estructura primaria y los dominios de Abf1 de *Saccharomyces cerevisiae* así como de sus ortólogos en los hongos que lo poseen. Los dominios son: el dedo de Zinc (ZnF), dominio de unión a ADN (DBD) y de la región CS2Sc: *Saccharomyces cerevisiae*, Cg: *Candida glabrata*, Kl: *Kluyveromyces lactis*, Km: *Kluyveromyces marxianus*, Ab: *Ashbya gossypii*, Nc: *Naumovozyma Castelli*. En rojo el porcentaje de identidad obtenido por alineamiento de secuencias de aminoácidos en NCBI BLASTp con la matriz BLOSUM62.

De forma interesante el gen *ABF1* en *C. glabrata* no conserva la sintenia con su ortólogo en *S. cerevisiae*, pero si con *Naumovozyma castelli*, un hongo que divergió de los linajes de *C. glabrata*. *N. castelli* conserva dos genes parálogos de *ABF1*, uno de ellos *NcABF1 B* es sinténico con *C. glabrata*, y se agrupa en la misma rama que *CgABF1* mientras que el segundo, *NcABF1A* es sinténico con *S. cerevisiae* Fig 2. En su secuencia de aminoácidos ambos conservan las tres regiones importantes para sus funciones con respecto a *ScAbf1* Con una alta homología. Tabla 1

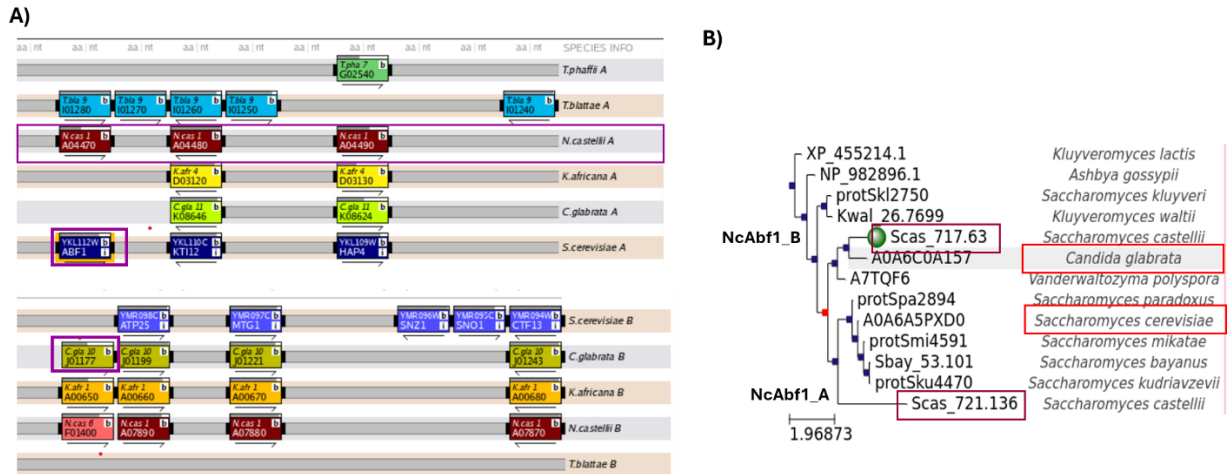


Fig. 2 Sintenia y relación filogenética de ABF1 entre *S. cerevisiae* y *C. glabrata*, A) Tomado de yeast genome browser, organización genómica de ABF1 en *C. glabrata*, *N. castellii* y *S. cerevisiae*. B) tomado de phylome, agrupación de los ortólogos en diferentes especies donde se encuentra la proteína Abf1.

Tabla 1. Porcentaje de homología por región de la proteína Abf1 entre ortólogos y con los genes parálogos en *Nakaseomyces castellii*.

| Identidad <sup>a</sup> | Dedo de Zinc | Dominio de unión a ADN | CS2   |
|------------------------|--------------|------------------------|-------|
| ScAbf1                 | 100          | 100                    | 100   |
| CgAbf1                 | 92.31        | 64.1                   | 86.67 |
| NcAbf1-A               | 71.43        | 52.17                  | 50    |
| NcAbf1-B               | 83.3         | 56.66                  | 93.33 |

Se alinearon las regiones indicadas como Dedo de Zinc, Dominio de unión a ADN y CS2, con el número de aa indicado en la Fig 1. El alineamiento se llevó a cabo en BLASTp de NCBI con la matriz BLOSUM62.

<sup>a</sup>: ScAbf1 is Abf1 from *S. cerevisiae*, CgAbf1 is Abf1 from *Candida glabrata*; NcAbf1 is Abf1 from *Nakaseomyces castellii*.

### 3.1 El papel de Abf1 en la replicación del ADN y transcripción génica.

Abf1 es una proteína multifuncional que se describió inicialmente gracias a su frecuencia de unión a secuencias de replicación autónoma, que funcionan como orígenes de replicación en levaduras. La secuencia consenso ARS se encuentra múltiples veces a lo largo de todo el genoma. Es una secuencia rica en A-T, que pueden tener dos elementos: el Elemento A que tiene la secuencia consenso para

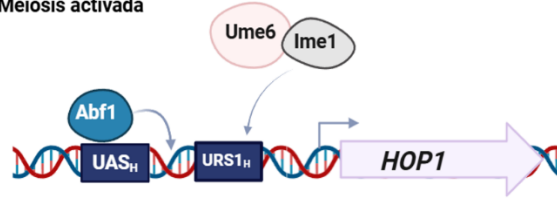
la unión del complejo ORC (Origin of Replication Complex) y generalmente está presente en todas las secuencias ARS; y el Elemento B que se compone de las partes 1, 2 y 3 que son importantes para su actividad como origen de replicación. No todas las secuencias ARS tienen todas las secuencias B, y en muchas secuencias ARS existen sitios de unión para Abf1 en el elemento B3. Sin embargo, hay secuencias ARS, como ARS1 que sí poseen las tres partes del elemento B (Marahrens & Stillman, 1992; Stinchcomb et al., 1979). Para que Abf1 lleve a cabo su función en la replicación del ADN, es indispensable el dominio, así como la unión correcta y el reconocimiento de las secuencias ARS (Miyake et al., 2002).

De forma interesante, durante la replicación del ADN se inhibe la transcripción para evitar desbalances en la expresión génica debido a un aumento de la dosis génica. Sin embargo, Abf1 se mantiene unido a los promotores de sus genes blanco recién replicados, pero sin que se una la RNA Pol II a ellos, probablemente por cambios en la conformación de la cromatina (Bar-Ziv et al., 2020).

Además de su participación en la replicación, Abf1 que regula la expresión génica a lo largo del genoma. En un microarreglo donde se evaluó una mutante termosensible, *abf1-1*, para la expresión de 6024 genes, se encontró un cambio en la regulación de alrededor de 86 genes, tanto en los que aumentaron como en los que redujeron su expresión. Dentro de los genes que aumentaron su expresión se encontró al propio *ABF1*, lo que sugiere que está sujeto a autorregulación negativa (Miyake et al., 2004). Los genes cuya transcripción se afecta en la cepa *abf1-1*, son genes de la vía de asimilación de carbohidratos como *COX6* o *QCR8*, de la vía de biogénesis de ribosomas como el gen *RPS28A*, genes meióticos como *HOP1* entre otros Fig. 3 (De Winde & Grivell, 1992; Gailus-Durner et al., 1996; Miyake et al., 2004; Silve et al., 1992; Wright & Poyton, 1990; Yarragudi et al., 2007).

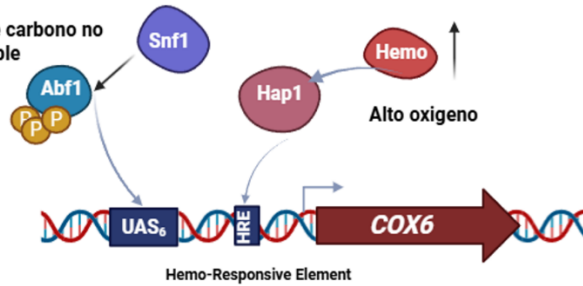
A)

Meiosis activada



B)

Fuente de carbono no fermentable



C)

Represión por glucosa

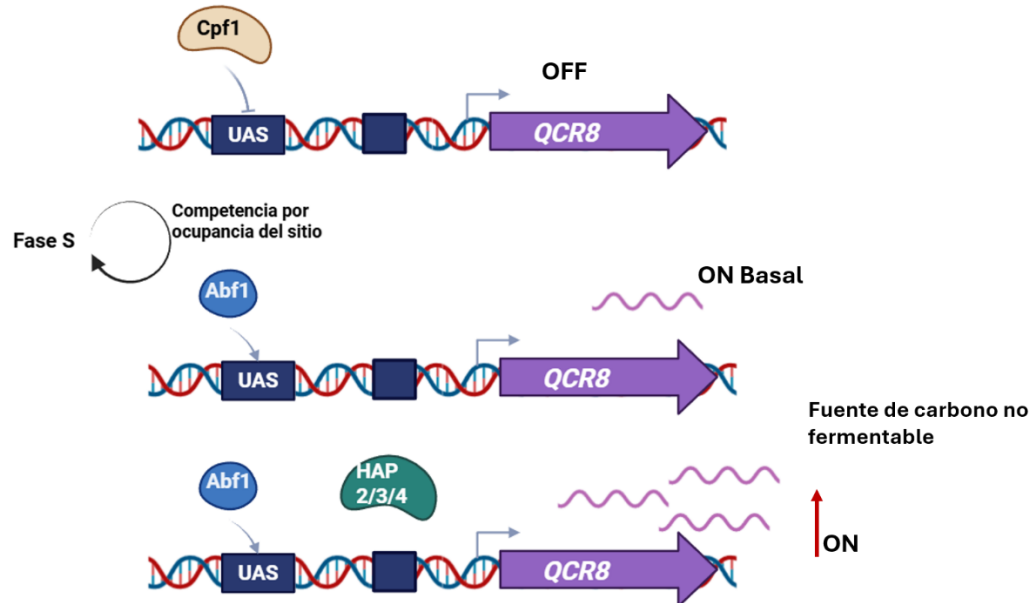


Fig. 3. Participación de Abf1 de *S. cerevisiae* en la regulación de la expresión de genes meióticos y mitocondriales: A) Regulación de la expresión de *HOP1* en la meiosis, en la región promotora de *HOP1* Abf1 se une en una región río arriba de UASH. Actúa como regulador positivo cuando Ume6, en complejo con Ime1, se unen en su sitio URS1 por la señal de activación de la meiosis B) Regulación de la expresión de *COX6*: en la región UAS6 existe un sitio de unión que funciona dependiendo del estado de fosforilación de Abf1, donde actúa como regulador positivo de la expresión de *COX6* por liberación de la represión catabólica, por fuente de carbono. C) Regulación de la expresión de *QCR8*, en la región río arriba se encuentra un sitio que se superpone con el sitio de Cpf1. Existe competencia por el sitio, donde Cpf1 solo puede intercambiarse con Abf1 cuando pasa por fase S del ciclo celular. Abf1 actúa como regulador positivo, una vez que se une a su sitio mantiene la expresión basal y la expresión óptima cuando se libera de la represión catabólica por glucosa.

Por otro lado, muchos promotores eucariotas presentan bidireccionalidad, es decir, algunos eventos de inicio de la transcripción pueden ocurrir en sitios crípticos que pueden encontrarse en la cadena complementaria a la codificante, o sitios río arriba y abajo del sitio de inicio canónico, que son inaccesibles para la RNA pol II. Abf1, junto con otros factores generales de regulación (GRFs) al ser secuestrados de su sitio de unión por la técnica anchor away, promueve inicios de transcripción ectópicos, lo que genera transcritos diversos, muchos no funcionales (Challal et al., 2018b).

### **3.2 Participación en el silenciamiento regional**

En *S. cerevisiae* se ha descrito el silenciamiento de los loci crípticos de apareamiento *HML* (Hidden Mating Type Left) y *HMR* (Hidden Mating Type Right). Estos loci se encuentran flanqueados por elementos silenciadores a la izquierda y a la derecha cada locus y poseen los elementos E e I. Los elementos del silenciador E son esenciales para el silenciamiento, pero los del elemento I son ligeramente menos importantes para la actividad de silenciamiento. Dentro del elemento E del locus *HMR* se encuentra un sitio de unión para Abf1 y otro para Rap, ambos importantes para mantener el silenciamiento, pero en diferente medida.

También se ha demostrado la actividad de Abf1 en la reparación del ADN mediante el mecanismo de escisión de nucleótido. Cuando se evaluó en el contexto del silenciador *I* en el locus *HML*, se encontró que es necesario que se una Abf1 en su sitio para promover la eliminación de foto-productos producidos por luz UV en la región específica. Además, Abf1 forma un complejo estable con las proteínas Rad7 y Rad16 que forman parte de este sistema, y es necesaria para el funcionamiento del complejo en la eliminación de foto productos.

Dada la similitud en las secuencias de las proteínas de *C. glabrata*, *S. cerevisiae* y otros hongos, algunas de las funciones podrían compartirse entre los ortólogos de Abf1 en otras especies como en *C. glabrata*.

## II. ANTECEDENTES DIRECTOS

### 2.1 Abf1 participa en el silenciamiento subtelomérico y en la progresión del ciclo celular.

En *C. glabrata* se ha estudiado el silenciamiento de algunos genes que codifican adhesinas (localizados cerca del telómero derecho del cromosoma E [ $E_R$ ]), cuya expresión representa uno de los principales factores de patogenicidad y generalmente se encuentran sujetas a silenciamiento subtelomérico. Para llevar a cabo el silenciamiento de regiones subteloméricas, se requiere de la participación de múltiples factores e incluyen secuencias en *cis*. Una de estas es el protosilenciador Sil2126 ubicado entre el gen *EPA3* y el telómero E-R, en el que se identificaron sitios putativos de unión de Abf1 y Rap1. Al realizar eliminaciones internas de los sitios de unión tanto para Rap1 como para Abf1 en la secuencia de Sil2126 colocado a 32 kb río arriba de su sitio original seguido del gen reportero *URA3*, se encontró que se pierde el silenciamiento del reportero, mientras que eliminar uno de ellos, ya sea el sitio de unión de Abf1 o el de Rap1, solo disminuye el silenciamiento más no lo elimina completamente. Además, se analizó el enriquecimiento de Abf1 en la secuencia de Sil2126 por medio de Chip-qPCR y se encontró que Abf1 se une tanto a Sil2126 como al Elemento Negativo (EN), que es otra secuencia de actuación en *cis* que media la represión del gen *EPA1*, además Abf1 también se une a otros sitios a lo largo de esta región subtelomérica Fig. 4. Por otro lado, la delección de los últimos 43 aa en la región C-terminal de Abf1 se induce la expresión de *EPA1* y esto conlleva a un aumento en la capacidad de adherencia evaluado en células HeLa con respecto a la cepa parental (Hernández-Hernández et al., 2024; López-Fuentes et al., 2018).

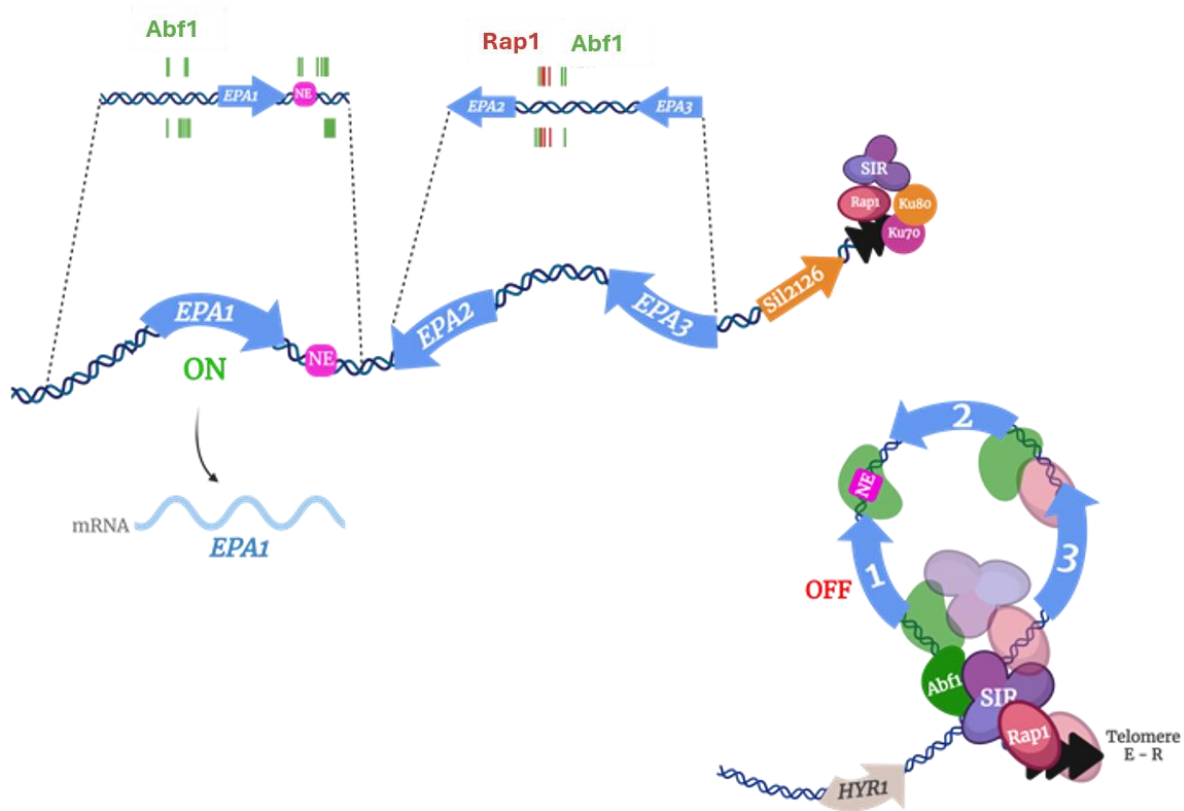


Fig. 4 Regulación de la expresión del clúster génico. *EPA1/2/3* en el telómero E derecho. En este proceso participan el complejo SIR, compuesto por Sir2, Sir3 y Sir4, así como los factores yKu70/80, Rap1 y Abf1. Estos elementos se unen a distintas regiones en *cis*, entre ellas la secuencia *sil2126*, el elemento regulador negativo NE y diversos sitios de unión distribuidos a lo largo de la región subteloamérica, lo que permite la propagación del silenciamiento transcripcional hasta aproximadamente 20 kb desde el telómero. En esta figura se ilustra uno de los posibles estados de la cromatina en dicha región. Tomado de (Hernández-Hernández et al. 2024).

Mediante un ensayo de pérdida de plásmido se determinó que *ABF1* es un gen esencial para *C. glabrata*, que contiene el gen *ABF1* junto con su región regulatoria, el cual complementa la delección de *ABF1* en su locus nativo. Tras pases consecutivos en medios carentes de presión de selección, el plásmido no se perdió en la cepa mutante, mientras que, en la cepa parental, que conserva el gen *ABF1* en su locus cromosómico nativo, se observó su pérdida con una frecuencia del 83%. Este resultado indica la esencialidad de las funciones desempeñadas por Abf1 para la viabilidad de *C. glabrata* (Hernández-Hernández et al., 2021).

Asimismo, se evaluó el tránsito del ciclo celular de *C. glabrata* bajo condiciones de sobreexpresión de *ABF1*. En estas condiciones se observó una

segregación aberrante de los núcleos, así como un retraso en la fase S del ciclo celular, aunque sin llegar a un arresto completo del ciclo. Con el propósito de profundizar en las funciones que desempeña Abf1 en *C. glabrata*, en este estudio, determinamos el efecto de su sobreexpresión sobre el crecimiento, su regulación en función del progreso del ciclo celular y la respuesta frente al daño en el ADN inducido por diferentes agentes, así como su propia regulación transcripcional y la formación de homodímeros.

### III. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

*Candida glabrata* es un hongo comensal que forma parte de la microbiota intestinal, oral y genitourinaria de individuos sanos y que ha adquirido una creciente relevancia como patógeno oportunista, particularmente en pacientes con estancias intrahospitalarias prolongadas y/o con sistema inmune comprometido. Ha sido clasificada por la Organización Mundial de la Salud como patógeno fúngico de alta prioridad debido a su capacidad para originar infecciones invasivas y desarrollar resistencia a diversos agentes antifúngicos.

Su virulencia se asocia a múltiples mecanismos que favorecen su adaptación al hospedero y al ambiente hospitalario. Entre estos, la capacidad de adherencia a tejidos y a superficies abióticas constituye un factor determinante para el establecimiento y la persistencia de la infección. Dichos procesos dependen de una regulación fina y compleja de la expresión génica en las levaduras. En el control de la adherencia participan múltiples factores y elementos en *cis*, entre los cuales destaca la proteína Abf1, involucrada en el establecimiento del silenciamiento subtelomérico.

En el hongo filogenéticamente relacionado *S. cerevisiae*, Abf1 cumple funciones esenciales, incluyendo la participación en la replicación del ADN, la organización de la cromatina y el mantenimiento de la estabilidad genómica, las cuales convergen funcionalmente con su papel en el silenciamiento, en este caso de los loci de apareamiento *HMR* y *HML*. Sin embargo, el conocimiento sobre su ortólogo en *C. glabrata* es aún limitado.

Las funciones descritas para Abf1 en *S. cerevisiae*, y que potencialmente podrían estar conservadas en *C. glabrata*, sugieren que esta proteína podría estar relacionada con la adaptación y la virulencia de este hongo patógeno oportunista. Por lo tanto, resulta necesario caracterizar de manera integral las funciones que desempeña en *C. glabrata* más allá de su participación en el silenciamiento subtelomérico, incluyendo la elucidación de su papel en la regulación génica y en la determinación de rasgos fenotípicos implicados en la supervivencia de *C. glabrata*.

#### **IV. HIPÓTESIS**

En el hongo patógeno oportunista *Candida glabrata*, Abf1 es una proteína esencial con un papel crucial en la supervivencia al daño al ADN la reparación del daño y en la regulación de genes de diversas vías metabólicas.

## V. OBJETIVO GENERAL

Caracterizar la regulación de la expresión del gen *ABF1* e identificar algunos de los procesos metabólicos del ADN en los que participa Abf1 en *C. glabrata*.

## V. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Evaluar los mecanismos de regulación de la expresión del gen *ABF1*.
- Determinar el efecto de la represión y la sobreexpresión de *ABF1* sobre la viabilidad de *Candida glabrata*.
- Analizar la participación de *ABF1* en la regulación y la progresión del ciclo celular.
- Determinar si la proteína Abf1 forma homodímeros y establecer su localización subcelular.
- Evaluar la respuesta de mutantes de *ABF1* (tanto en condiciones de sobreexpresión como en el alelo *abf1-43*) frente al daño al ADN.
- Analizar el comportamiento del alelo *abf1-43* en presencia de distintas fuentes de carbono.
- Determinar si el ortólogo *ScABF1* es capaz de complementar la delección de *CgABF1*.
- Realizar la caracterización de la expresión del promotor *MT-1*.

## VII. MATERIALES Y METODOS

### 7.1 Medios de cultivo

Los medios de cultivo para *C. glabrata* que se usaron en este trabajo fueron YPD (extracto de levadura Fisher 10 g/L, Bacto peptona Gibco 10 g/L, glucosa 2%). CAA (Casaminoácidos: Base nitrogenada de levadura 1.7 g/L, sulfato de amonio 5 g/L, y casaminoácidos 6 g/L, glucosa 2%) y YNB (base nitrogenada de levadura 1.7 g/L, sulfato de amonio 5g/L, Glucosa 2%). Cuando se requirió se suplementó el medio con uracilo 25 mg/L o con nourseotricina a 100 µg/mL. Adicionalmente en los medios CAA y YNB suplementados con nourseotricina se sustituyó el sulfato de amonio por glutamato de sodio a 1 g/L. Para los medios sólidos se añadió 2% de agar. Para preparar medio con ácido 5-fluoroótico (5-FOA Toronto Research 351 Chemicals), se añadió 0.9 g/L de este compuesto y 25 mg/L uracilo al medio mínimo. El 5-FOA es un compuesto que resulta tóxico en cepas que expresan el gen *URA3*. Cuando fue necesario, se añadió 0.2 mM de los aminoácidos metionina y cisteína (M+C), o sulfato de cobre (CuSO<sub>4</sub>) en diferentes concentraciones o histidina 50 mg/L, según el experimento. En el caso necesario se ajustó el pH de los medios con HCl o NaOH, y se tamponaron con MOPS 1M.

Las cepas de *Escherichia coli* se crecieron en medio LB, que contiene 5g/L de extracto de levadura, 10g/L de Triptona, 5g/L de NaCl. Todas las construcciones en plásmidos se introdujeron a *E. coli* por electroporación y se seleccionaron en medio LB suplementado con 100 µg/mL de carbenicilina (Invitrogen TM), en medio solido LB con 1.5% de agar.

Todos los medios se esterilizaron en autoclave a 15lb de presión y 121°C por 15 minutos, en caso necesario, se esterilizaron por filtración al vacío.

### 7.2 Cepas, oligonucleótidos y plásmidos

Todas las cepas plásmidos y oligonucleótidos usados en este estudio se encuentran enlistados en las tablas S1, S2 y S3 en la sección anexa.

### 7.3 Determinación de la velocidad de crecimiento

Cada una de las cepas se cultivaron a partir de los resguardos en glicerol a -80°C hasta alcanzar la fase estacionaria (48 h en incubación con agitación en roller a 30°C) en los medios correspondientes. Una vez en fase estacionaria cada cultivo se ajustó a OD<sub>600</sub> de 0.01 en 300µL del medio correspondiente y se colocaron por duplicado en una placa de 100 pozos. El cultivo se realizó a 30°C en agitación constante y, según la cepa, se dejó de 24 a 48 horas. El crecimiento se registró por medio de lecturas de densidad óptica a una longitud de onda de 600 nm, cada 15 minutos utilizando el equipo Bioscreen C. El tiempo de duplicación se calculó de acuerdo con lo descrito por (Gutiérrez-Escobedo et al. 2013). Se realizaron tres réplicas biológicas de cada experimento.

### 7.4 Pérdida de viabilidad por cuentas viables

Para determinar el momento del cultivo en que ocurre la muerte celular de *C. glabrata* en ausencia de Abf1, utilizamos la cepa que lleva el plásmido pRep, que contiene el gen *ABF1* cuya expresión es reprimible por la presencia de amino ácidos y realizamos un ensayo de viabilidad a diferentes tiempos después de la represión de *ABF1*. Partimos de un cultivo en fase estacionaria de 48 h de la cepa mutante nula complementada con el pRep (*abf1Δ/pP<sub>MET3</sub>::Flag-ABF1*), ajustamos la densidad óptica (OD<sub>600</sub>) a 0.1, en medio ON (medio mínimo) y medio OFF (medio mínimo más 0.2 mM de M+C). Se tomaron lecturas de OD<sub>600</sub> en el espectrofotómetro de luz visible UV-1700 PharmaSpect cada hora durante seis horas seguidas, tomando muestras durante las primeras seis horas en un primer experimento y después de las segundas seis horas en otro.

Además de las lecturas, cada hora se tomaron muestras para realizar diluciones logarítmicas y obtener cuentas viables en cada punto de tiempo en medio mínimo sólido. Todos los experimentos se realizaron por triplicado. El número de unidades formadoras de colonias (CFU) se obtuvo multiplicando el número de colonias en cada caja por el factor de dilución y el volumen que se plateó correspondiente a 1 mL de la dilución como se muestra en la formula:

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

Donde

CFU: es el número de unidades formadoras de colonias contadas por caja

V: Volumen en microlitos inoculados en la caja de medio solido

FD: es el factor de dilución de la caja

## 7.5 Determinación de contenido de ADN

Para determinar la progresión del ciclo celular de *C. glabrata* en ausencia de Abf1, realizamos un experimento para determinar el contenido de ADN mediante tinción del ADN con Sytox Green (invitrogen) por citometría de flujo a lo largo de una curva de crecimiento. Para ello se emplearon las siguientes cepas: la cepa mutante nula con el vector que complementa la mutación nula con el gen silvestre (*abf1Δ/pP<sub>ABF1</sub>::ABF1*), la cepa mutante nula con expresión reprimible de *ABF1* (*abf1Δ/pP<sub>MET3</sub>::Flag-ABF1*), en medio ON (medio mínimo) y medio OFF (medio mínimo + 0.2 mM de M+C). el experimento inició con cultivos de 48 h en fase estacionaria, ajustamos densidad óptica a 0.5 y tomamos muestras cada 3 horas por 9 horas, para analizar la progresión del ciclo celular. Seguimos el protocolo de fijación y tinción con Sytox green estandarizado en el laboratorio de microbiología molecular. De las poblaciones celulares en medios ON y OFF tomamos  $1 \times 10^7$  células en cada punto de tiempo, centrifugamos y suspendimos las células en 450  $\mu$ L de agua estéril y añadimos lentamente etanol frio y dejamos incubando a temperatura ambiente por una hora o a 4°C toda la noche. Lavamos la suspensión celular en 1 mL de TRIS-HCl 50mM. Para eliminar el RNA incubamos en solución con RNAsa (2mg/mL) por dos horas a 37°C. Posteriormente tratamos con solución de proteinasa K (5mg/mL) durante 20 a 45 minutos a 37°C y lavamos las células con 1 mL de TRIS-HCL 50mM pH8. En este punto las almacenamos por un día a 4°C para llevar a cabo la medición las teñimos con Sytox green (1  $\mu$ L en 4mL de TRIS HCl 50mM) y las analizamos por citometría de flujo en el citómetro BD FACS Calibur. Los datos obtenidos analizamos los datos en el programa Flowjo, donde analizamos los histogramas generados.

## 7.6 Microscopia de fluorescencia

Para visualizar la morfología y la integridad de los núcleos realizamos microscopia de fluorescencia, utilizamos cultivos en fase estacionaria (48 horas) y ajustamos la OD<sub>600</sub> a 0.5 y tomamos muestras a 3h y 6h de incubación en medios ON y OFF. Lavamos las células y las fijamos con paraformaldehído al 4% durante 15 min, posteriormente hicimos un lavado adicional y resuspendimos en H<sub>2</sub>O miliQ estéril. Para visualizar los núcleos teñimos los con 1 µL de la solución de DAPI (0.2 mg/mL) a 1 mL de cada suspensión celular con densidad óptica de 1. Las suspensiones celulares las analizamos en el microscopio de fluorescencia Axio Imager2. Las imágenes obtenidas se analizaron en el programa ZEISS ZEN.

## 7.7 Análisis de los plásmidos obtenidos de las cepas supresoras.

Analizamos colonias resultantes de la represión prolongada de Abf1. Con el objetivo de detectar si hubo una inserción del gen *ABF1* por recombinación no homologa o si hubo mutaciones en el plásmido.

Primero analizamos si se había insertado el gen en alguna región del genoma, para lo cual realizamos diagnósticos por PCR de las colonias que aislamos del experimento de supresión. Detectamos primero si corresponden a cepas de *C. glabrata* (y no a una contaminación) usando oligonucleótidos específicos para *SIR3* (#108 Fw/ #109 Rv) y *SIR4* (#86/ #87) además, detectamos la delección del gen *ABF1*, con oligonucleótidos que flanquean la región donde ocurrió la delección de este gen (#3117 /#1835), también detectamos la presencia del gen de *ABF1* con oligonucleótidos internos al gen (#2577/#2579) y por último detección del casete de resistencia a NAT que se encuentra en el plásmido (#466/#467). Para las reacciones utilizamos a la Dreamgreen Taq polimerasa, y ajustamos la molaridad para los parámetros de trabajo de esta polimerasa. Para la reacción de la detección de delección de *ABF1* modificamos la temperatura de extensión a 68°C en lugar de 72°C.

Para analizar si ocurrió alguna mutación en el plásmido que llevan estas colonias supresoras, aislamos el plásmido de las células que sobrevivieron a la

represión en medio OFF (*abf1Δ*/pP<sub>MET3</sub>::Flag-*ABF1*). El plásmido obtenido mediante el protocolo de smash and grab, lo retransformamos en *E. coli* DH10 para resguardarlos. Analizamos la estructura general de estos plásmidos mediante PCR y restricción enzimática con las enzimas *Bam*HI, *Sac*I y *Cla*I y secuenciamos la región del promotor para localizar cambios puntuales en la secuencia que pudieran ser responsables de que el plásmido se volviera no reprimible por M+C. Además, retransformamos estos plásmidos recuperados (que inicialmente llamamos plásmidos supresores [pSup]) en la cepa de *C. glabrata* mutante nula (*abf1Δ*/pP<sub>ABF1</sub>::*ABF1.URA3*) para realizar el experimento de intercambio del plásmido que complementa la mutación nula en *ABF1*. La cepa obtenida, que contiene tanto pSup como el plásmido con *ABF1* silvestre que complementa la mutación nula (*abf1Δ*), se seleccionó en medio mínimo con Nourseotricina (marcador de selección del plásmido supresor) y con 5-FOA para obtener la cepa que solo contiene el plásmido supresor recuperado de las cepas supervivientes en medio OFF. Estas cepas se resguardaron en glicerol al 15% a -80°C. Para concluir evaluamos el crecimiento en medio líquido con los aminoácidos M+C 0.2mM.

### **7.8 Ensayo de dilución en gota de fenotipos de complementación heteróloga**

Para determinar que fenotipos de la cepa *abf1Δ* de *Candida glabrata*, se complementan por el alelo de *ABF1* de *Saccharomyces cerevisiae* (*ScABF1*), las cepas que expresan el gen de *ScABF1* a partir del promotor de *C. glabrata* se analizaron por un ensayo de dilución en gota con las siguientes cepas la cepa parental (*ABF1*<sup>+</sup>), la cepa con el alelo trunco *abf1-43*(delección de los últimos 43 residuos de la región C-terminal), la cepa heteróloga en la que el alelo de *ABF1* de *S. cerevisiae* se integró en el locus nativo de *ABF1* de *C. glabrata* (*abf1Δ*::*ScABF1*), y la cepa heteróloga que expresa *ScABF1* a partir de un plásmido dirigido por el promotor de *ABF1* de *C. glabrata* (*abf1Δ*/p*ScABF1*). Adicionalmente incluimos las cepas *abf1Δ* que contienen las construcciones de sobreexpresión (pOE::*ABF1* and pOE::*abf1-43*), ambos bajo el control del promotor *MT-1* inducible por cobre, con la finalidad de evaluar el efecto de la sobreexpresión del alelo silvestre y trunco en combinación con diferentes condiciones de estrés.

Todas las cepas inicialmente se crecieron en sus medios correspondientes hasta fase estacionaria (48 h). Para la sobreexpresión las células se diluyeron en medio mínimo YNB a  $OD_{600} = 1$ , al mismo tiempo fueron diluidas en medio YNB con  $1 \mu M$  de  $CuSO_4$  a la misma densidad óptica y se incubaron por 5h en estas condiciones. Posteriormente, las células se ajustaron nuevamente a  $OD_{600}=1$  en agua estéril y colocadas en una placa de 96 pozos para realizar cinco diluciones seriales base 10, hasta obtener una unidad formadora de colonia en la última gota de cada cepa. Aproximadamente  $3 \mu L$  de cada dilución se colocaron en cajas con los siguientes medios: YPD (como control de crecimiento), YPG que contiene 3% v/v de glicerol como fuente de carbono no fermentable, y YPE que contiene 3% v/v de etanol también como fuente de carbono no fermentable. Adicionalmente utilizamos cajas de YPD con 0.02% de cloruro de 2,3,5-trifeniltetrazolio (TTC) para medir la actividad mitocondrial, ya que al reducirse con moléculas como  $NADH^+$  forma 1,3,5-trifenilformazán el cual es un compuesto insoluble color rojo que se precipita dando coloración rosada a roja como resultado de la función mitocondrial. Incubamos las placas por 48 h y 72 h según se requirió

### **7.9 Identificación de sitios putativos de unión para *ABF1* en el promotor de *QCR8* y *COX6*.**

Debido a que en *S. cerevisiae*, *ABF1* puede regular la expresión de genes relacionados al metabolismo de carbohidratos como *QCR8* (CAGL0I06270g) y *COX6* (CAGL0J00429g), realizamos un análisis de sitios putativos de unión de Abf1 al promotor de estos genes. Tomamos la secuencia de estos genes con 1000 pb río arriba y abajo, lo analizamos en el software FIMO del site MEME, donde introducimos el sitio consenso de unión de para *ABF1* de *C. glabrata*, para localizar sitios putativos de unión de Abf1 en estos genes en cada una de las secuencias, con los datos obtenidos hicimos una representación gráfica.

### **7.10 Ensayos de adhesión a células HeLa**

Uno de los factores de virulencia en *C. glabrata* es la adhesión a células epiteliales mediado por proteínas de la familia Epa principalmente, y se regulan por silenciamiento subtelomérico, en el que participa *ABF1* por lo que evaluamos la

funcionalidad del alelo heterólogo de *S. cerevisiae* en *C. glabrata*, Evaluamos la capacidad de adherencia de las siguientes cepas: la cepa parental (*ABF1*<sup>+</sup>), la cepa con el alelo trunco *abf1-43*, la cepa heteróloga en la que el alelo de *ABF1* de *S. cerevisiae* se integró en el locus nativo de *ABF1* de *C. glabrata* (*abf1Δ::ScABF1*), y la cepa heteróloga que expresa *ScABF1* a partir de un plásmido episomal dirigido por el promotor de *ABF1* de *C. glabrata* (*abf1Δ/pScABF1*). Enfrentamos estas cepas a una monocapa de células HeLa fijadas a una placa de poliestireno. Utilizamos un cultivo en fase estacionaria, el cual lavamos y ajustamos a  $1 \times 10^6$  células por ml en solución de HSSB suplementada con 5 mM de  $\text{CaCl}_2$ , añadimos un ml de la suspensión de cada cepa a una caja de 24 pozos con células HeLa previamente fijadas y lavadas con solución HSSB y utilizamos tres pozos por cepa. Centrifugamos la placa de 24 pozos con la suspensión celular de *C. glabrata* a 1000 rpm 1 min, incubamos por 1 h a 30°C. Posteriormente, lavamos la caja para eliminar las células no adheridas, con PBS 3 lavados, para finalizar añadimos 500 μl de PBS-Tritón 0.5% + 10mM EDTA para lisar las células Hela y despegar las células y levaduras adheridas para recuperar las células de *C. glabrata* que se adhirieron. A partir de las suspensiones celulares recuperadas de cada pozo, realizamos tres diluciones base 10 y sembramos en cajas de YPD 200 μL de cada dilución y 100 μL de las células input ajustadas inicialmente e incubamos por 48 h a 30°C, realizamos el conteo de UFC en cada placa. El porcentaje de adherencia se calculó como él (promedio de CFUS en triplicado de pozos con Hela / CFUs en Input) \*100

### 7.11 Citometría de flujo

Para la caracterización de promotores en *C. glabrata* utilizamos metodología por citometría de flujo a través de fusiones transcripcionales de los promotores de interés con GFP. En este caso caracterizamos la actividad del promotor del gen *MT-1* que es una metalotioneína y responde fuertemente a la presencia de cobre en distintos medios.

Construimos una fusión transcripcional del promotor *MT-1* con GFP, y lo transformamos en la cepa parental BG14. Como control positivo, utilizamos la fusión del promotor *PGK1* con GFP (promotor fuerte constitutivo), y como control negativo esta construcción, pero sin promotor, ambos en la cepa parental.

Utilizamos un cultivo en fase estacionaria de 48 h que diluimos en el medio correspondiente a una OD<sub>600</sub> de 0.5. Evaluamos concentraciones de 0.3  $\mu$ M, 0.6  $\mu$ M, 1  $\mu$ M, 25  $\mu$ M, 50  $\mu$ M, 75  $\mu$ M y 100  $\mu$ M de CuSO<sub>4</sub>, y condiciones de pH en las que ajustamos pH a 6.5, 4.5 y 5.5 en los medios como CAA YPD y YNB. En el caso necesario tamponamos los medios con MOPS 1 M. Tomamos lecturas en el citómetro FACS Calibur BD, ajustamos los parámetros de medición en FSC y SSC para determinar el tamaño y complejidad interna o granularidad de la célula, en un rango que corresponde a *C. glabrata*. Además, la detección de la fluorescencia por el detector FL1-H se ajustó en escala logarítmica base 10, en 10 para nuestro cero de fluorescencia con el control negativo, a partir de aquí el desplazamiento de la población por FL1-H representa la intensidad de fluorescencia en una longitud de onda que va de 500-565 nm. Tomamos mediciones cada hora de las cepas correspondientes, durante 5h en cada experimento para detectar la intensidad de fluorescencia que refleja la actividad del promotor en diferentes condiciones. Tomamos la media geométrica de la población en cada punto de tiempo y graficamos con este dato. Realizamos tres replicas biológicas por cepa y condición.

## VI RESULTADOS

### Capítulo 1

#### 1.1 Antecedentes directos

#### 1.2 La depleción de *Abf1* causa un tránsito alterado del ciclo celular y una segregación aberrante de los núcleos, lo que conlleva a la pérdida de viabilidad.

Previamente demostramos que *ABF1* es un gen esencial para *C. glabrata*, puesto que en la cepa *abf1*Δ no puede perder el plásmido replicativo que complementa con el gen *ABF1*+ dirigido por su propio promotor. En cambio, en este mismo experimento, la cepa parental que contiene el gen *ABF1*+ en su lugar nativo del cromosoma, sí puede perder el plásmido con *ABF1*+ (Hernández-Hernández et al., 2021)

Por esta razón, decidimos desarrollar herramientas genéticas que nos permitieron evaluar los procesos metabólicos del ADN en los que participa *ABF1*. Diseñamos un plásmido en el que controlamos la expresión de *ABF1* con el promotor del gen *MET3*, el cual responde a los aminoácidos metionina (M) y cisteína (C) con los cuales se reprime su expresión (pRep). Por otro lado, construimos un plásmido para sobreexpresar *ABF1* (pOE), en el cual la transcripción del gen *ABF1* ocurre a partir del promotor del gen *MT-1* que codifica a una metalotioneína y que en presencia de cobre (Cu<sup>++</sup>) activa fuertemente la transcripción del promotor (Hernández-Hernández et al., 2021).

Utilizamos el promotor de *MET3* para apagar la expresión de *ABF1* (pRep), y con esto corroborar la esencialidad del gen. Además, evaluamos si hay pérdida de viabilidad y cuando ocurre ésta después de apagar el promotor, es decir, en ausencia de *Abf1*. Usamos la cepa con una mutación nula del gen *ABF1* complementada con este plásmido (*abf1*Δ/pRep). En esta cepa, en condiciones de crecimiento en medio mínimo sin amino ácidos, el gen *ABF1* se expresa de manera constitutiva a un nivel relativamente bajo. En cambio, el promotor se reprime en presencia de metionina y cisteína (M+C) en el medio.

En condiciones de represión (medio M+C), donde se depleta Abf1, la cepa no puede crecer (Hernández-Hernández et al., 2021). Para determinar si la ausencia de Abf1 causa letalidad, calculamos la viabilidad de esta *abf1Δ*/pRep ( $pP_{MET3}::\text{Flag-ABF1.NAT}$ ) cultivada tanto en medio donde hay expresión de *ABF1* (medio ON: YNB medio mínimo sin aminoácidos), como en medio en el que se reprime la expresión de *ABF1* (medio OFF: YNB + 0.2mM M + 0.2mM C).

Las células con el plásmido pRep se cultivaron en medio ON, se ajustó la OD cultivo en los medios ON y OFF tomamos lecturas de OD<sub>600</sub>, realizamos diluciones logarítmicas seriadas y plateamos en cajas con medio ON para recuperar las células que sobreviven a la represión y calculamos las cuentas viables (unidades formadoras de colonias o UFCs).

El experimento se dividió en 2 fases, en la primera fase medimos las primeras 6 h, y 24 h, en la segunda fase medimos desde el tiempo 7h y cada hora hasta 12 h, 24 h y 48 h. A partir de 7 h en medio OFF observamos una disminución de las UFCs de  $1.1 \times 10^6$  UFC/ml al inicio del experimento,  $5.3 \times 10^5$  UFC/mL a las 12h y  $1.3 \times 10^5$  UFC/ml después de 24h de cultivo en medio OFF. En cambio, el cultivo en el medio ON (condiciones de expresión de *ABF1*), las células continuaron creciendo: de  $2.2 \times 10^6$  UFC/mL al inicio, incrementó a  $3.5 \times 10^7$  UFC después de 7h y a  $1.12 \times 10^8$  UFC después de 12h, valor que es similar al de un cultivo saturado a las 24h ( $1.5 \times 10^8$ ).

Aunque en el medio OFF observamos un pequeño aumento de la población en las primeras horas de crecimiento (de  $\sim 1.1 \times 10^6$  UFC/ml a  $3.7 \times 10^6$  UFC/mL), a partir de las primeras 7 h, se empieza a observar muerte celular (Fig. 5 Modificado de Hernández-Hernández et al., 2021). Esto puede deberse a que algunas moléculas de la proteína permanecen funcionales antes de agotarse por la represión.

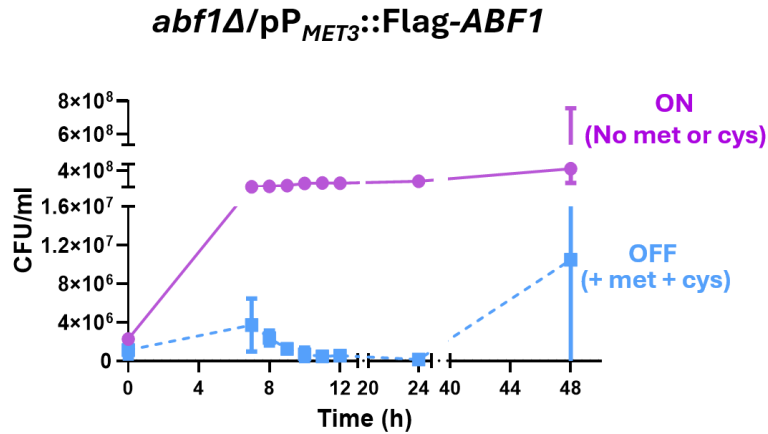


Fig. 5 La represión prolongada de *ABF1* genera mutantes supresoras en la cepa *abf1Δ*. Cultivos de fase estacionaria de la cepa *abf1Δ/pP<sub>MET3</sub>::ABF1.NAT* en medio ON (medio mínimo YNB) se subcultivaron en medio OFF (medio mínimo + 0.2 mM met y cis) y medio ON. Posteriormente se tomaron muestras después de 7 - 12h, 24h y 48 h y se platearon en medio sólido ON. Se contaron las unidades formadoras de colonias (CFUs) y se graficaron respecto al tiempo. Modificado de Hernández-Hernández et al. (2021).

Abf1, es una proteína que participa en múltiples procesos del ADN, en *S. cerevisiae* se ha reportado en la replicación. Nos interesó estudiar si este proceso se afecta a través del transcurso del ciclo celular, a través de la medición del contenido de ADN por citometría de flujo en condiciones de represión de la expresión de *ABF1*. Utilizamos cultivos en fase estacionaria de las cepas parental *ABF1*<sup>+</sup>, *abf1Δ/pRep* (*pP<sub>MET3</sub>::Flag-ABF1.NAT*), y *abf1Δ/pWT* (*pP<sub>ABF1</sub>::ABF1*), y las diluimos a una OD<sub>600</sub> 0.5 en medios ON y OFF y tomamos muestras de cada uno después de 6 h y 9 h de crecimiento para determinar el contenido de ADN. Ajustamos los parámetros de medición a 200 unidades relativas de fluorescencia (URF) corresponde a 1C (un complemento genético haploide), y 400 URF a 2C (dos complementos genéticos), que corresponden a las etapas G1 y G2 del ciclo celular respectivamente. En las tres cepas utilizadas observamos acumulación de las células en fase G1 al tiempo cero del experimento (cultivo en fase estacionaria). En medio ON, que permite la expresión de Abf1 en la mutante *abf1Δ/pRep* a 6h y 9h hay tránsito por las diferentes fases del ciclo al igual que en la cepa parental. En medio OFF la mayor parte de la población de las células de esta cepa se acumulan en la fase G2 a las 6h, y después de 9h las células logran sobrepasar el arresto en G2 y continúan el ciclo celular para dividirse, algunas células contienen mayor cantidad de ADN (600 URF y 800 URF),

después de la duplicación del ADN en la fase S. En cambio, en ambos medios la cepa *abf1Δ*/pWT tiene un tránsito a través del ciclo celular similar a la cepa parental Fig 6. (Modificado de Hernandez-Hernandez, et al 2021).

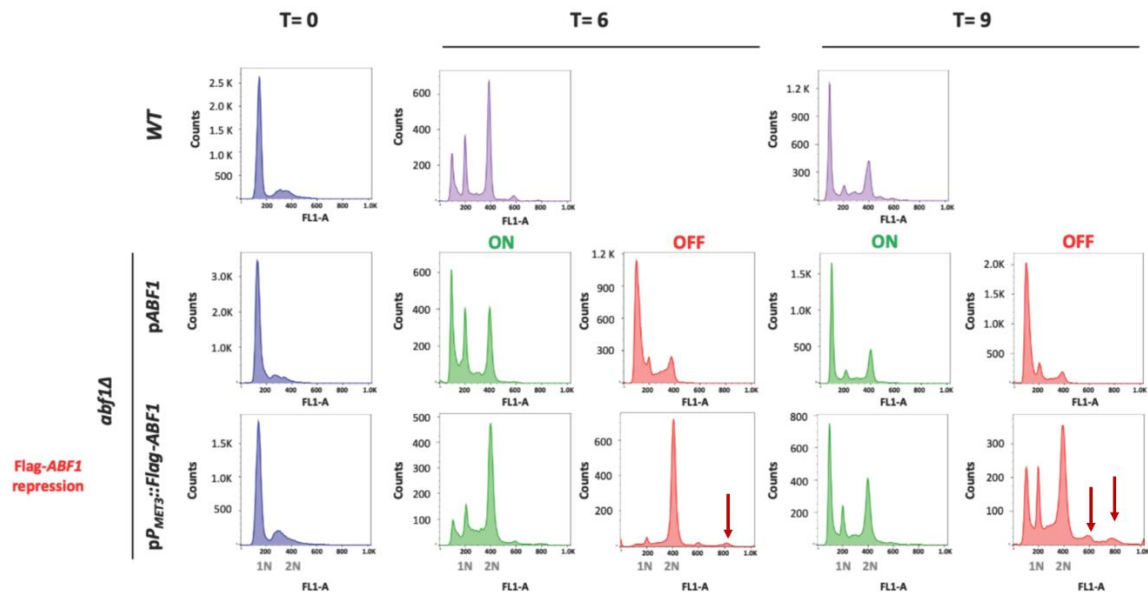


Fig. 6. La represión de Abf1 produce una progresión anormal del ciclo celular. La represión de Abf1 produce una progresión anormal del ciclo celular. Las cepas *ABF1*<sup>+</sup>/Vector vacío (parental), la cepa *abf1Δ*/p*ABF1*::*ABF1* (p*ABF1*) y la cepa *abf1Δ*/p*MET3*::*ABF1*.NAT (pRep) se crecieron en medios ON y OFF y se tomaron muestras a las 6h y 9h. Después de fijarse y teñirse con Sitox green, se cuantificó el contenido de ADN por citometría de flujo. El contenido de ADN 1N (fase del ciclo celular G1) corresponde a 200 URF y 2N (fase G2) a 400 URF. La región intermedia corresponde a la fase S. Los histogramas en color verde corresponden al medio ON y en rojo al medio OFF. (Modificado de Hernández-Hernández., et al. 2021)

La depleción de Abf1 condujo a pérdida de viabilidad, además de una progresión aberrante del ciclo celular, por lo que fue de nuestro interés observar la morfología de los núcleos, utilizando microscopia de fluorescencia. En la cepa *abf1Δ*/pRep, teñimos el ADN con DAPI de células cultivadas 3 y 6 h en medios ON y OFF. Transcurrido este tiempo, las células en medio ON presentan una morfología nuclear normal, con núcleos bien definidos y tinción del ADN mitocondrial en algunas células. En medio OFF a partir de las 6 h de incubación, se observa que algunas células tienen más de un foco de fluorescencia (más de un núcleo) en una sola célula (Figs. 7 A y 7B)

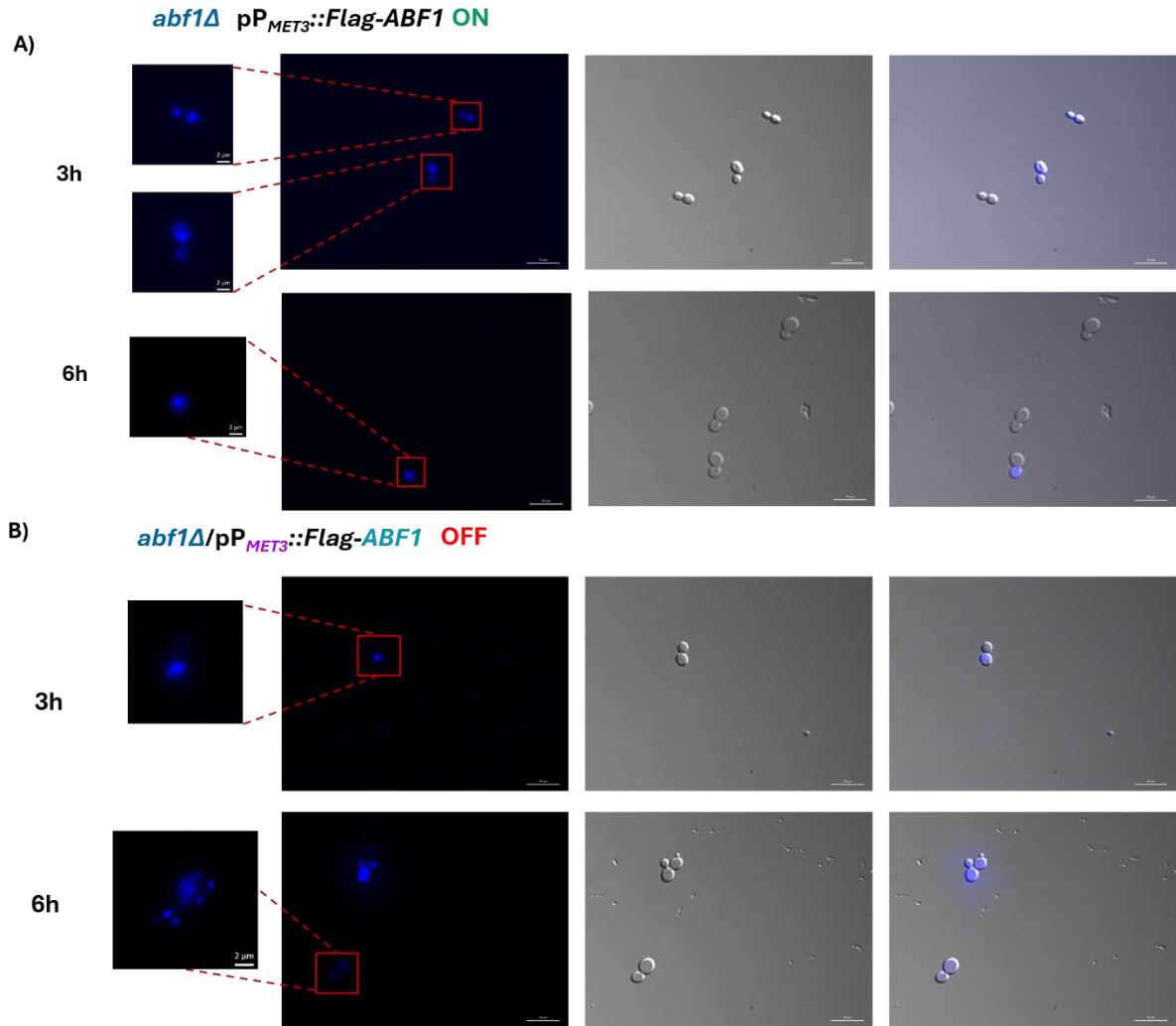


Fig. 7. La represión prolongada de *ABF1*, genera la segregación aberrante de núcleos. La cepa *abf1Δ*/pP<sub>MET3</sub>::*ABF1*.NAT (pRep), se cultivó en medio ON (A) y OFF (B), durante 3 h y 6 h, posteriormente se fijaron y tiñieron con DAPI (0.2 mg/mL) en un mL de suspensión celular a una densidad óptica OD<sub>600</sub> de 1 y se observaron al microscopio de fluorescencia.

### 1.3 La represión prolongada de Abf1 resulta en la aparición de colonias supresoras.

En la Fig. 5 presentamos la pérdida de viabilidad de *C. glabrata* cuando se depleta Abf1 por la represión de su expresión con M+C del plásmido pRep. Las cuentas viables en medio ON sólido de la cepa *abf1Δ*/pRep que provienen del crecimiento en medio OFF después de 24h disminuye de  $1.1 \times 10^6$  UFC a  $1.3 \times 10^5$  UFC/mL. Sin embargo, a las 48 h en medio OFF, las UFCs aumentan a  $1.04 \times 10^7$  UFC/mL, lo que sugiere que a partir de las 24 h surgieron mutantes supresoras que pueden crecer en medio OFF. De este experimento tomamos una alícuota y las plateamos en

medio OFF sólido. Los resultados muestran que del cultivo provenientes de medio OFF se obtuvieron  $5.3 \times 10^3$  UFC/ml a las 24 h en placa de medio OFF también (datos no mostrados). En cambio, no obtuvimos células viables en medio OFF del cultivo proveniente del medio ON líquido, lo que indica que hubo una represión estable de Abf1 en esta construcción en medio sólido OFF.

Recuperamos 3 colonias independientes que crecieron en medio sólido OFF que corresponden a cepas supresoras de la letalidad causada por la ausencia de Abf1. Para determinar si una mutación en el plásmido es la responsable de conferir la capacidad de crecer en el medio OFF de la cepa *abf1Δ*/pREP, recuperamos el plásmido de cada una de las 3 colonias supresoras (llamados pSup1, pSup2 y pSup3) y los analizamos inicialmente por patrones de restricción, los cuales no tienen modificaciones detectables del plásmido original de la cepa *abf1Δ*/pREP. Además, transformamos cada plásmido pSup en células de la cepa *abf1Δ* transformada con un plásmido que contiene *ABF1* dirigido por su propio promotor (pWT), y realizamos un ensayo de pérdida de plásmido para este último plásmido. De esta manera obtuvimos cepas *abf1Δ*/pSup, (pP<sub>MET3</sub>::Flag-*ABF1*.NAT) 1, 2 y 3. Estas cepas se comportaron de manera muy similar a la cepa parental (*abf1Δ*/pREP) cultivada en medio OFF (es decir no crecen en medio OFF y después de una incubación prolongada la viabilidad empieza a disminuir fuertemente). Lo que indica que la mutación supresora que aparece en esta cepa a las 24 y 48 h, no se encuentra en el plásmido (Fig 8).

Para determinar si lo que obtuvimos en las colonias supresoras fue una mutación en el plásmido o si este se había insertado en el genoma en alguna región al azar, analizamos las colonias supresoras, resultantes de 48 h de cultivo en condiciones de represión, aislamos y purificamos una colonia, realizamos un experimento de pérdida del plásmido pRep (pP<sub>MET3</sub>::Flag-*ABF1*.NAT), y aislamos dos colonias que habían perdido el plásmido (seleccionando colonias que perdieron el marcador de selección del plásmido pRep (NAT). La pérdida del plásmido sugiere que se perdió el gen *ABF1* una vez que ocurrió una mutación supresora en algún *locus* del genoma. Otra posibilidad es que se hubiera insertado solamente el gen *ABF1* de nuevo en el genoma por recombinación.

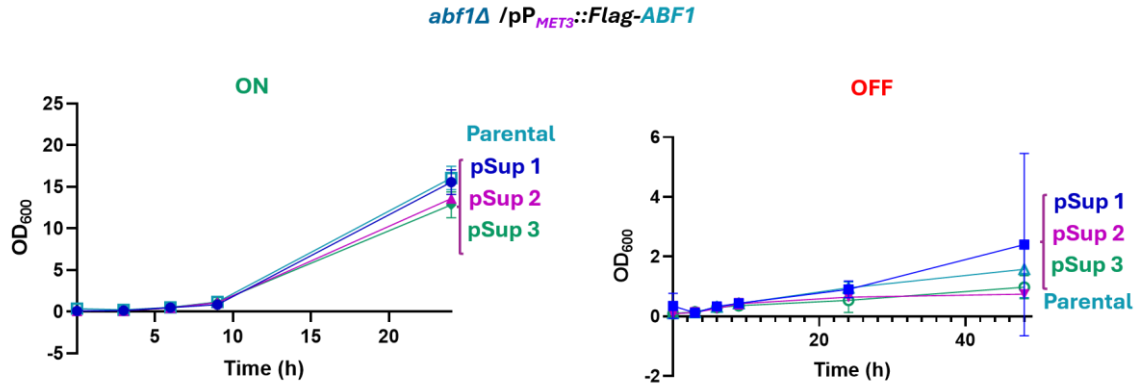


Fig. 8. La mutación supresora no se encuentra en el plásmido. Las cepas *abf1Δ* transformadas con los plásmidos supresores pSup1, pSup2 y pSup3, se obtuvieron retransformando la cepa *abf1Δ*/pP<sub>ABF1</sub>::*ABF1* con los plásmidos Sup provenientes de las colonias supresoras. Después de cultivos repetidos en medio no selectivo obtuvimos colonias que perdieron el plásmido pP<sub>ABF1</sub>::*ABF1* y retuvieron los plásmidos pSup1, pSup2 o pSup3. La Fig. muestra el crecimiento de las cepas con los plásmidos Sup en medio ON y OFF hasta 24 h.

También descartamos que se tratara de una contaminación amplificando fragmentos de los genes *SIR3* y *SIR4* mediante PCR y confirmamos que la estructura del locus de *abf1Δ* fuera correcta, utilizando oligonucleótidos internos del gen *ABF1* (para determinar su ausencia), detección del casete de selección con resistencia a NAT, así como la confirmación de que la delección de *ABF1* se encuentra en su locus nativo y las secuencias flanqueantes no tuvieron cambios (Fig 9). Encontramos que todas las colonias supresoras son *C. glabrata* puesto que todas son positivas para *SIR3* y *SIR4*. Además, en ninguna de las colonias supresoras se detecta el gen de *ABF1*, solo en la cepa silvestre (*ABF1*<sup>+</sup>). Además, cuando diagnosticamos la delección del gen por PCR con oligonucleótidos que flanquean río arriba y río debajo de la región de recombinación que se usó para eliminar el gen, en la cepa *ABF1*<sup>+</sup> se amplifica un fragmento de mayor tamaño (4kb) mientras que la delección se amplifica un fragmento más pequeño (2.5 kb) (Fig 9B).

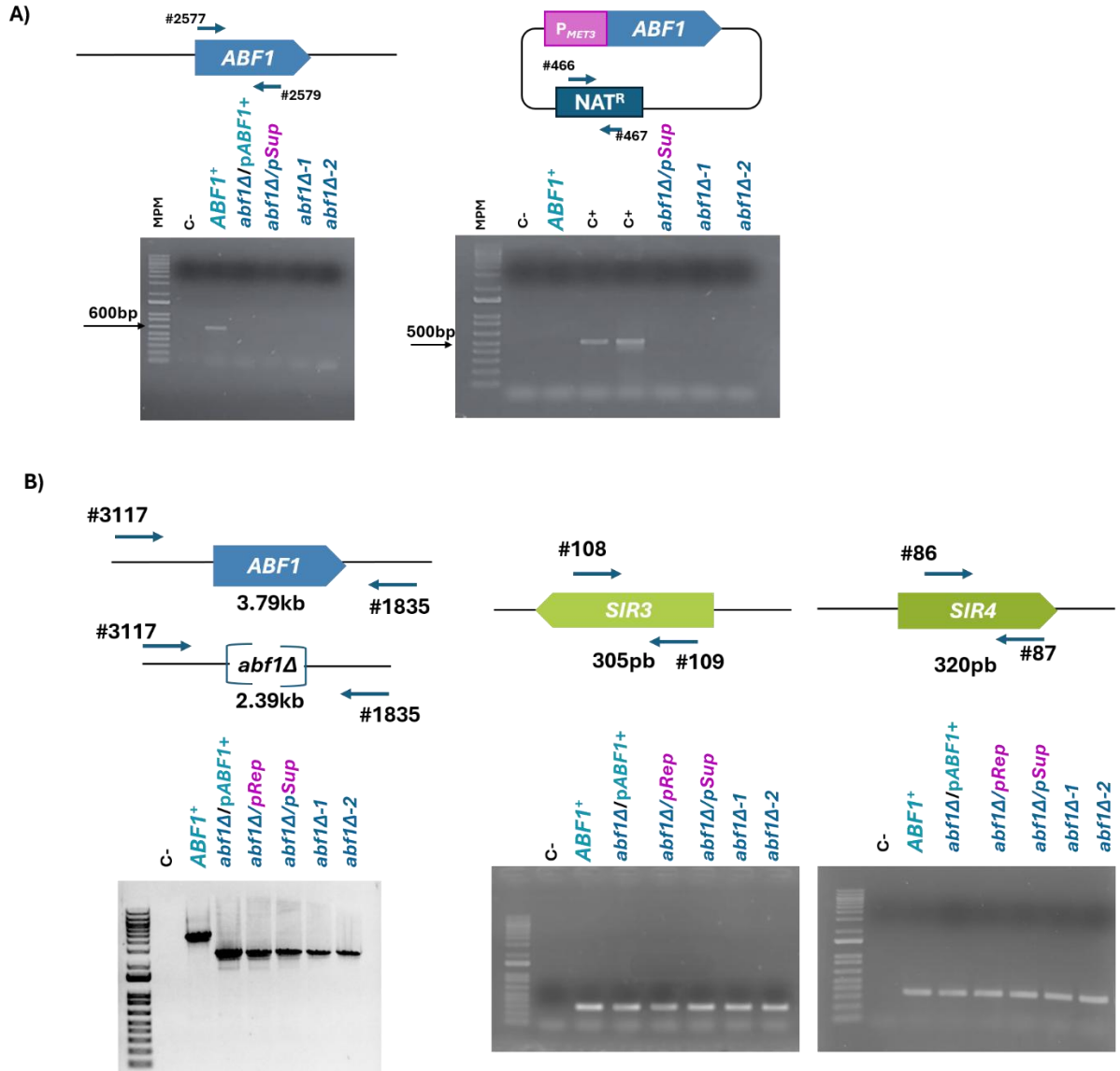


Fig. 9. Las cepas supresoras no tienen el gen *ABF1* integrado. Diagnóstico por PCR de las cepas supresoras, y controles: *ABF1*<sup>+</sup> (BG14), *abf1Δ/pP<sub>ABF1</sub>::ABF1*, *abf1Δ/pP<sub>MET3</sub>::ABF1.NAT*. Aislamos una colonia supresora proveniente del experimento de la represión de *ABF1* (col4: *abf1Δ/pSup*) a la cual indujimos la pérdida de plásmido. A dos colonias curadas del plásmido (*abf1Δ-1*, *abf1Δ-2*), diagnosticamos por PCR la detección del gen *ABF1* o deleción (*abf1Δ*, ausencia de amplificación) (#2577/#2579), del marcador de selección NAT (#466 y 467) (A) y amplificación de la mutación nula *abf1Δ::FRT* (#3117/#1835). Además, corroboramos que son cepas de *C. glabrata* detectando *SIR3* y *SIR4* (#108/#109 y #86/#87) (B).

Estos datos indican que las cepas *abf1Δ* supresoras que aislamos después de 48 h de depleción de *ABF1*, efectivamente carecen del plásmido que contiene *ABF1*, y en términos generales, las supresoras no tienen *ABF1* insertado en algún lugar del genoma. Entonces las células que crecieron corresponden a supresoras

del gen *ABF1*, que pueden sobrevivir mediante algún mecanismo que aún queda por explorar.

## Capítulo 2

### **2.1 Abf1 participates in the response to DNA damage and replicative stress in *Candida glabrata* (*Nakaseomyces glabratus*)**

(Vera-Salazar et al., 2025)

Trabajo publicado



Contents lists available at ScienceDirect

## Fungal Genetics and Biology

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/yfgbi](http://www.elsevier.com/locate/yfgbi)Abf1 participates in the response to DNA damage and replicative stress in *Candida glabrata* (*Nakaseomyces glabratus*)Laura Angélica Vera-Salazar, Grecia Hernández-Hernández, Guadalupe Gutiérrez-Escobedo, Alejandro De Las Peñas, Irene Castaño<sup>\*</sup>, Irene Castaño

IPICYT, División de Biología Molecular, Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, Camino a la Presa San José No. 2055, Col. Lomas 4a Sección, San Luis Potosí, CP 78216, México

## ARTICLE INFO

## Keywords:

Replicative stress  
UV light-induced DNA damage  
Abf1-43  
DNA damage response  
*Candida glabrata*

## ABSTRACT

ARS binding factor 1 (Abf1) is a DNA-binding protein found in various fungal species. In the opportunistic pathogenic fungus *Candida glabrata* (*Nakaseomyces glabratus*), Abf1 (CgAbf1) is encoded by the *ABF1* gene. Our research has demonstrated that CgAbf1 is essential for the viability of *C. glabrata* and is involved in the subtelomeric silencing of several *EPA* genes, which encode adhesins that mediate adhesion to epithelial cells, underscoring its significance as a virulence factor in this pathogen. Our previous findings established that both the depletion and overexpression of CgAbf1 result in growth defects and induce a delay in cell cycle progression. In this work, we wanted to determine if CgAbf1 is involved in the response to replicative and DNA damage stresses. We analyzed the CgAbf1 protein levels under these conditions and the activity of the CgAbf1 promoter and found that CgAbf1 negatively regulates its own transcription. A Bimolecular Fluorescence Complementation assay showed that CgAbf1 localizes to the nucleus and forms homodimers. We also found that CgAbf1 is involved in the survival to DNA damage caused by UV light and we demonstrated that *Saccharomyces cerevisiae* Abf1 (ScAbf1) can complement the lethality of the *C. glabrata* *abf1Δ* strain.

## 1. Introduction

In recent years, fungal pathogens have increased their prevalence of intrahospital infections. *Candida glabrata* (*Nakaseomyces glabratus*) is part of the microbiota of the mucosal surfaces of healthy individuals. However, *C. glabrata* is associated with an increase in morbidity due to an increase in nosocomial infections, particularly in immunosuppressed patients where it is responsible for at least 30 % of bloodstream infections (candidemias) and the second most common pathogen that causes candidemia (Andes et al., 2016; Astvad et al., 2018). *C. glabrata* possesses several virulence factors one of which is the ability to adhere to epithelial and endothelial cells as well as abiotic surfaces. This trait allows the colonization and invasion of the host and is mediated by cell wall proteins, primarily the *Epa* (Epithelial Adhesion) family of proteins, encoded by the *EPA* family of genes. *Candida glabrata* contains 81 adhesin-like encoding genes (Xu et al., 2021). In the BG2 strain of *C. glabrata*, the main adhesin is *Epa1*, encoded by the *EPA1* gene, which is responsible for 95 % of adherence to epithelial cells in vitro (Castaño

et al., 2005; Cormack et al., 1999). The majority of the *EPA* genes are encoded in subtelomeric regions, which are generally negatively regulated by chromatin-based subtelomeric silencing mediated and established by silencing proteins like Rap1, CgAbf1, and the SIR complex (Sir2, Sir3 and Sir4). Sir2 is a histone deacetylase that recruits Sir3 and Sir4 to establish silencing of the region (Hernández-Hernández et al., 2021, 2024; López-Fuentes et al., 2018; Moretti et al., 1994).

CgAbf1 is a DNA binding protein essential for the growth of *C. glabrata*, which is involved in different processes of DNA metabolism (Hernández-Hernández et al., 2021). Abf1 has been studied in more detail in the non-pathogenic fungus *Saccharomyces cerevisiae*, closely related to *C. glabrata*. The *S. cerevisiae* ortholog of Abf1 (ScAbf1) belongs to the group of general regulatory factors and regulates the expression of multiple genes involved in different functions such as silencing of *HMR* and *HML* loci, DNA replication and DNA repair (Eisenberg et al., 1988; Fourel et al., 2002; Miyake et al., 2002, 2004). The C-terminal end of ScAbf1 (from amino acids 624 to 662) is required for most of these functions. In particular, two subregions within Abf1's C-terminus, CS1

<sup>\*</sup> Corresponding author at: IPICYT, Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, División de Biología Molecular, Camino a la Presa San José 2055, San Luis Potosí, San Luis Potosí 78216, México.

E-mail address: [icastano@ipicyt.edu.mx](mailto:icastano@ipicyt.edu.mx) (I. Castaño).

<https://doi.org/10.1016/j.fgb.2025.104041>

Received 7 July 2025; Received in revised form 16 August 2025; Accepted 24 September 2025

Available online 15 October 2025

1087-1845/© 2025 The Authors. Published by Elsevier Inc. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

## Capítulo 3

### 3.1 Restauración integral del fenotipo silvestre mediante complementación heteróloga del gen *ScABF1* en *C. glabrata*

Anteriormente demostramos que es posible la complementación de la cepa *abf1*Δ de *C. glabrata* con el gen *ScABF1* de *S. cerevisiae*. Realizamos un ensayo de complementación heteróloga en el que introdujimos el gen *ABF1* de *S. cerevisiae* flanqueado por las secuencias intergénicas 5' y 3' del gen *ABF1* de *C. glabrata* en un plásmido replicativo que transformamos en la cepa *abf1*Δ/*pCgABF1* de *C. glabrata*. Después de subcultivar esta cepa con ambos plásmidos sin presión de selección para el plásmido que contiene el gen *CgABF1*, obtuvimos células que perdieron el plásmido del gen *CgABF1* y solamente conservan el plásmido con el gen *ABF1* de *S. cerevisiae* (*pScABF1*). Estos datos implican que el gen *ABF1* heterólogo, puede complementar la ausencia del gen de *C. glabrata*. Para comprobar este resultado, decidimos reemplazar el gen *ABF1* de *C. glabrata* (exclusivamente el ORF) por su ortólogo de *S. cerevisiae* (*ScABF1*) en el locus nativo.

También construimos una cepa de *C. glabrata* en la que intercambiamos el ORF de *ABF1* de *C. glabrata* por el de *S. cerevisiae*, en el locus natural de *CgABF1* bajo la regulación del promotor y del terminador de *C. glabrata*. Caracterizamos algunos de los fenotipos adicionales que podrían complementarse además de la letalidad de las dos cepas con la complementación heteróloga, tanto en el plásmido como en el cromosoma (Capítulo 2). También analizamos el crecimiento en fuentes de carbono no fermentables como etanol y glicerol, y medimos su actividad mitocondrial mediante de la capacidad de reducción del cloruro de trifeníltetrazolio (TTC). El TTC se reduce a través de las enzimas del tipo deshidrogenasa como la enzima succinato deshidrogenasa, utilizando NADH+. De manera que la forma reducida del TTC es un compuesto rojo insoluble que se acumula en las células dando un color rojo a las colonias como resultado de la respiración celular.

Realizamos un ensayo de dilución en gota como control silvestre la cepa *ABF1*<sup>+</sup>, como control negativo la cepa *abf1-43*, como fenotipo de restauración la cepa *abf1*Δ/*pCgABF1*, y las cepas de complementación heteróloga

*abf1Δ/pScABF1*, y la cepa *abf1Δ::ScABF1*, De un cultivo en fase estacionaria (48 h), realizamos un ensayo de crecimiento por goteos en cajas con los medios: YP, con glucosa 2% con o sin TTC 0.02%, etanol 3% o glicerol 3%.

A las 48 h todas las cepas crecieron en medios ricos en glucosa (YPD) o con fuentes no fermentables de carbono: glicerol (YPG) o etanol (YPE), y solamente las cepas *abf1-43* y *abf1Δ/pScABF1* crecieron más lentamente que las demás. Además, todas las cepas son capaces de reducir el TTC y por lo tanto forman colonias rosas. En la cepa *abf1-43* en medio con TTC se observan algunas colonias con sectores rosas y blancos (Fig. 10).

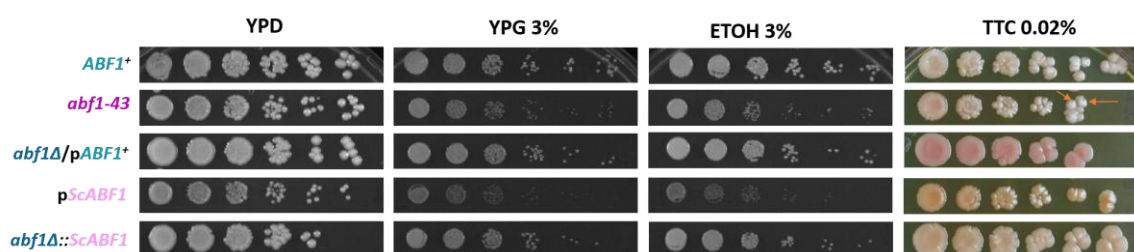


Fig. 10 El gen *ScABF1* (*Saccharomyces cerevisiae*) complementa el crecimiento en fuentes de carbono no fermentables. Las cepas *ABF1+* (BG14 Ura<sup>-</sup>), *abf1-43* (Ura<sup>-</sup> NAT<sup>s</sup>), *abf1Δ/pScABF1* (pP<sub>CgABF1</sub>::*ScABF1*::T<sub>CgABF1</sub>), *abf1Δ::ScABF1* (integración del gen *ScABF1* en el locus de *CgABF1*) se crecieron hasta fase estacionaria (48 h) se ajustaron a OD<sub>600</sub> de 1 y se hicieron diluciones logarítmicas seriadas y ~3 μL se colocaron en medios YPD (medio rico con glucosa), YPG 3% (YP + glicerol al 3%), ETOH 3% (YP + etanol al 3%) y TTC 0.02% (YPD + Cloruro 2,3,5 trifeniltetrazolio) para detectar función mitocondrial. Se tomaron fotografías a las 48 h de crecimiento y a las 72 h para el medio con TTC 0.02%. Las flechas blancas indican colonias blancas y rosas.

La adhesión a tejidos epiteliales es un factor de virulencia que permite colonizar diferentes tejidos del hospedero. Esta está regulada negativamente por silenciamiento subtelomérico, que está mediado por diferentes factores entre los cuales se encuentra *Abf1*. En la mutante *abf1-43*, la capacidad de adherencia incrementa con respecto a la cepa parental (Hernández-Hernández et al., 2024), por ello, decidimos valorar la capacidad de adhesión de estas cepas a células epiteliales HeLa *in vitro*. Para ello, tomamos células de fase estacionaria de las cepas descritas anteriormente y determinamos su capacidad de adhesión *in vitro*. Normalizamos la cepa parental a 1 como control de cepa no adherente. La cepa *abf1-43* presenta una adhesión 1.8 veces mayor que la cepa parental mientras que ambas colonias evaluadas de la complementación heteróloga tienen una capacidad de adhesión muy similar entre sí y ligeramente menor que la cepa parental, con 0.83

y 0.76 respectivamente. Por lo que concluimos que el gen *ScABF1* complementa la capacidad de mantener el silenciamiento subtelomérico de las adhesinas más importantes (Fig. 11).

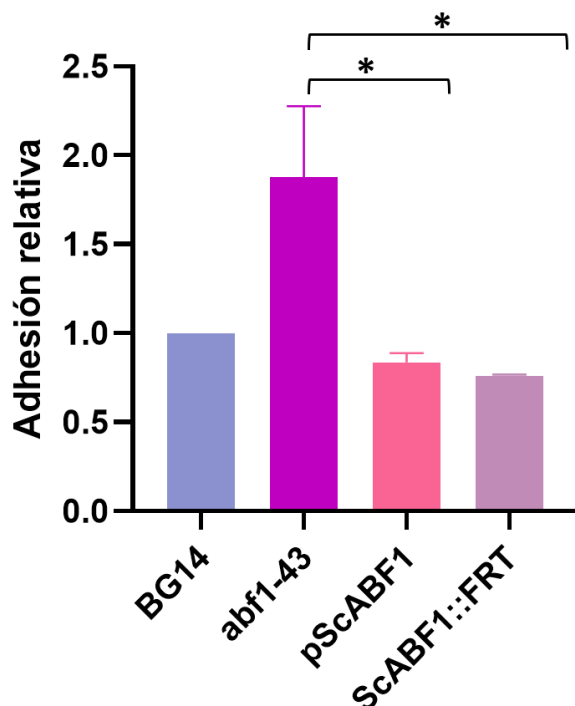


Fig. 11 El gen heterólogo *ScABF1* complementa el fenotipo de adhesión a células HeLA de la cepa *abf1Δ*. Las cepas *ABF1<sup>+</sup>*, *abf1-43*, *abf1Δ/pScABF1*, *abf1Δ::ScABF1*, se crecieron hasta fase estacionaria, se ajustaron a un número de células de  $1 \times 10^6$  células/mL, en solución de HBSS suplementada con  $\text{CaCl}_2$  5mM. Se añadieron 500  $\mu\text{L}$  de cada suspensión celular en una placa de 24 pozos con células HeLA previamente adheridas, y se incubaron en conjunto por 1h. Después de lavar las células que no se adhirieron, se lisaron las células HeLA, y se recuperaron a las células de *C. glabrata*. Se realizaron CFUs para cuantificar la adhesión relativa en comparación con la cepa parental, para este experimento se emplearon dos replicas biológicas, con tres triplicados técnicos, evaluado con un ANOVA de una vía y comparación múltiple de medias

### 3.2 La sobreexpresión de *ABF1* y el alelo *abf1-43* inducen deficiencias en la respiración celular

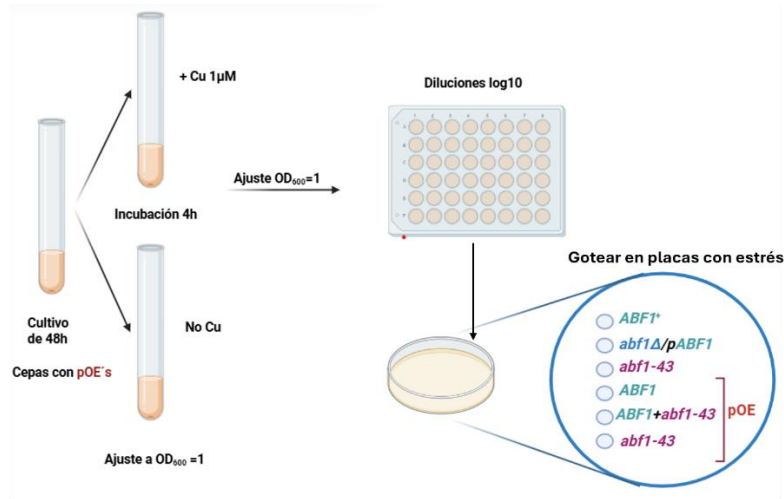
La delección de los últimos 43 aa de Abf1 resulta en una cepa con múltiples deficiencias. Para analizar la interacción funcional entre los alelos silvestre y *abf1-43*, evaluamos la capacidad de asimilación de fuentes de carbono no fermentables en cepas en las que indujimos la sobreexpresión de Abf1 y Abf1-43 y la combinación de ambos alelos. Utilizamos las cepas: *ABF1<sup>+</sup>*, *abf1Δ/pABF1* y las sobreexpresantes *abf1Δ/pOE* (*p<sub>MT-1</sub>::ABF1* y *p<sub>MT-1</sub>::abf1-43*) individualmente y la combinación de ellos. Utilizamos cultivos de fase estacionaria de estas cepas en las que indujimos

o no la sobreexpresión de *ABF1* o *abf1-43* durante 4 h. Posteriormente se inoculó un número igual de células de cada cepa y condición en los medios YPD (medio rico con glucosa), YPG (medio rico con glicerol) y YPE (con etanol) como fuente de carbono y en YPD con TTC para estimar la actividad mitocondrial a través de la reducción de TTC.

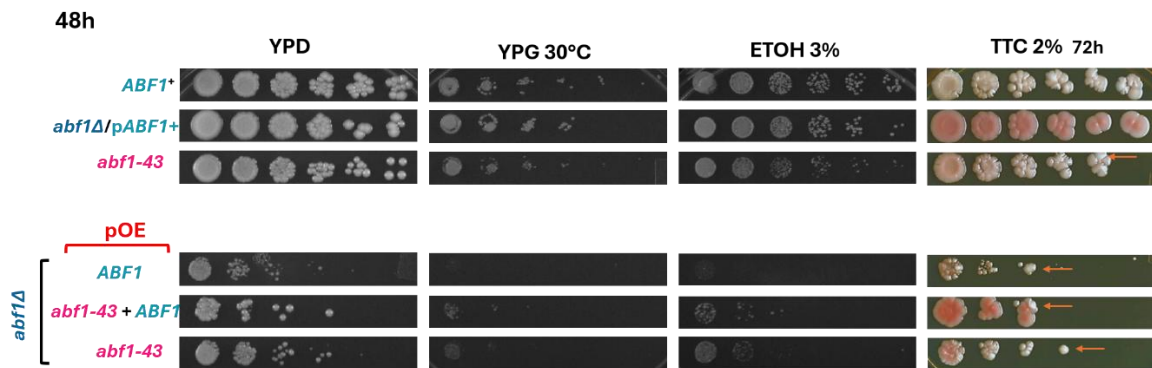
Observamos que la sobreexpresión de *ABF1* así como la de *abf1-43* y la combinación de ambos, reduce significativamente el crecimiento después de 4h de inducción. El defecto en el crecimiento se ve aún más pronunciado cuando las células se cultivan en fuentes de carbono no fermentables (YPG y YPE). A las 48 h no hay crecimiento de las cepas que sobreexpresan cualquiera de los alelos de *Abf1* o la combinación de ambos, comparado con las cepas control; y a las 72 h se observa mejor crecimiento que a las 48 h, pero mucho menor que el de las cepas control (Fig.12C).

En cuanto a la funcionalidad de la mitocondria medida por la reducción de TTC, observamos que en las cepas que sobreexpresan cualquiera de las versiones de *Abf1* muestran colonias en las que coexisten células que generan un sector de la colonia rojo y otros sectores blancos (mosaicos de colores blanco y rojo), lo que sugiere una segregación inestable de la capacidad respiratoria (Fig. 12B).

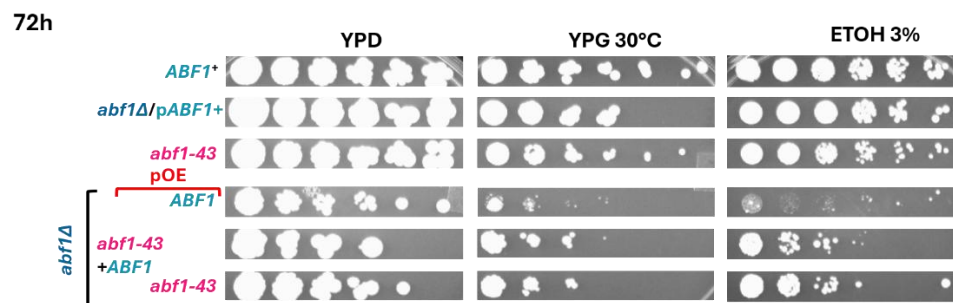
A)



B)



C)



D)

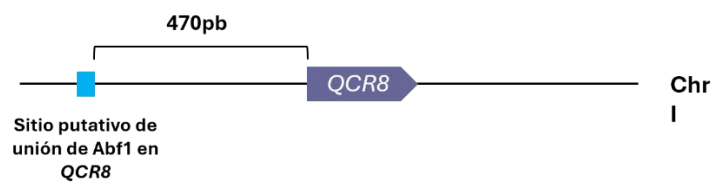


Fig. 12 El desbalance en la expresión de Abf1 o Abf1-43 provoca una deficiencia en la asimilación de fuentes de carbono no fermentables. A) Esquema del flujo del experimento. Se utilizaron las cepas *ABF1+* (BG14), *abf1Δ/pABF1*(pP<sub>ABF1</sub>::*ABF1.URA3*), *abf1-43::FRT*, y la cepa *abf1Δ* transformada con pOE-*ABF1* (pP<sub>MT-1</sub>::*ABF1.URA3*), pOE-*abf1-43*, (pP<sub>MT-1</sub>::*abf1-43.NAT*), y con ambos a la vez. Células de fase estacionaria de cada una de las versiones de sobreexpresión, se ajustaron a una OD<sub>600</sub> de 1, en medio mínimo con o sin CuSO<sub>4</sub> 1 μM, e incubaron durante 4 h. Posteriormente se lavaron y ajustaron a OD<sub>600</sub> de 1, y se distribuyeron en una placa de 96 pozos en conjunto con células de fase estacionaria de las cepas control. Se realizaron diluciones log<sub>10</sub>, y se gotearon en cajas con diferentes medios YPD, YPG, ETOH, y TTC 0.02% B) Goteos después de 48 h de crecimiento, en medios YPD, YPG y ETOH de las cepas descritas (A), y después de 72 h en cajas de TTC 0.02%. C) Fotografías después de 72 h de cultivo en las mismas cajas de (A) excepto TTC 0.02%. D) Ubicación del sitio putativo de unión de Abf1 en la región regulatoria de *QCR8* de *C. glabrata*. Se utilizaron las matrices de motivos de unión de CgAbf1, en formato MEME, para uso de la suite FIMO de MEME, en las secuencias flanqueantes 1 kb río arriba y río abajo.

### 3.3 Identificación de sitios de unión putativos para Abf1 en el promotor del gen nuclear de función mitocondrial *QCR8*

En la levadura *S. cerevisiae*, Abf1 regula la expresión de genes del metabolismo de carbohidratos como *COX6* y *QCR8*, que forman parte de la cadena de transporte de electrones, la etapa final de la respiración celular. Al realizar un análisis bioinformático utilizando la secuencia consenso de unión de Abf1 en *C. glabrata*, no encontramos sitios putativos de unión de Abf1 en la región intergénica al 5' de *COX6* de *C. glabrata*, que, aunque es sinténico su regulación puede ser distinta en *C. glabrata*. En cambio, para el gen *QCR8* sí encontramos un sitio de unión con un q-value de 0.127 (rango deseado q-value ≤ 0.01) y p-value de 6.59x10<sup>-5</sup> (rango deseado p-value < 10<sup>-4</sup>) a 530 pb río arriba del marco de lectura de *QCR8*, de una longitud de 15 pb que alinea con la secuencia ACGTATCAATAATAA. En el contexto genómico de *QCR8* se conserva la sinténia con respecto al gen de *S. cerevisiae*, por lo que su regulación podría estar conservada (Fig. 12D).

## Capítulo 4 Caracterización del promotor de *MT-1*

### 4.1 La sobreexpresión de Abf1 causa letalidad en medio YNB

Previamente mostramos la pérdida de viabilidad de *C. glabrata* debida a la sobreexpresión de Abf1 en el medio mínimo YNB, sin embargo, no hay pérdida de viabilidad cuando la sobreexpresión se induce en otros medios como CAA. Para la sobreexpresión de Abf1 utilizamos el promotor del gen *MT-1* que codifica una metalotioneína encargada de la detoxificación y resistencia a cobre y se induce en respuesta a la presencia de cobre en el medio. Para caracterizar mejor las condiciones de sobreexpresión producida por la inducción del promotor del gen *MT-1*, construimos el plásmido pOE: pP<sub>MT-1</sub>::*ABF1.URA3*, y lo transformamos en las cepas *abf1*Δ y la parental *ABF1*+ que corresponden a las cepas *ABF1*+ /pOE y *abf1*Δ /pOE. Con ellas evaluamos el crecimiento en medio CAA y YNB con diferentes concentraciones de cobre

Observamos que desde la concentración más baja de cobre utilizada en medio mínimo YNB, las cepas que sobreexpresan Abf1 pierden viabilidad (no detectamos crecimiento). En cambio, cuando las cepas sobreexpresantes se cultivan en medio CAA (medio completo sintético), éstas crecen, con un tiempo de duplicación similar a las cepas que no sobreexpresan Abf1, incluso en la concentración mas alta de cobre donde el tiempo máximo de duplicación es de 70 min para la cepa que sobreexpresa Abf1 (Tabla 2).

Tabla 2. Tiempo de duplicación de cepas con plásmidos de sobreexpresión en diferentes concentraciones de cobre y medios CAA y YNB

|     |                     | Tiempo de duplicación (min)                |                    |                                   |                                               |                             |
|-----|---------------------|--------------------------------------------|--------------------|-----------------------------------|-----------------------------------------------|-----------------------------|
|     | $\mu\text{M}$<br>Cu | <i>ABF1</i> <sup>+</sup><br>/p <i>ABF1</i> | <i>abf1Δ</i> /pPOE | <i>ABF1</i> <sup>+</sup><br>/pPOE | <i>ABF1</i> <sup>+</sup> /<br>Vector<br>vacío | <i>abf1Δ</i> /p <i>ABF1</i> |
| CAA | 0                   | 65±0                                       | 72±4               | 66±4                              | 65±3                                          | 63±6                        |
|     | 25                  | 60±3                                       | 69±7               | 64±5                              | 60±3                                          | 62±0                        |
|     | 50                  | 62±2                                       | 72±6               | 68±4                              | 64±2                                          | 61±0                        |
|     | 75                  | 67±7                                       | 73±7               | 71±6                              | 67±5                                          | 62±1                        |
|     | 100                 | 65±2                                       | 72±4               | 70±3                              | 67±2                                          | 65±2                        |
| YNB | 0                   | 82±1                                       | 93±4               | 85±7                              | 89±7                                          | 82±6                        |
|     | 25                  | 91±9                                       | NC <sup>a</sup>    | NC                                | 91±4                                          | 85±0                        |
|     | 50                  | 88±4                                       | NC                 | NC                                | 94±5                                          | 88±3                        |
|     | 75                  | 91±9                                       | NC                 | NC                                | 96±5                                          | 89±2                        |
|     | 100                 | 124±3                                      | NC                 | NC                                | 127±5                                         | 123±14                      |

<sup>a</sup> NC significa que no hubo crecimiento.

Cultivos de fase estacionaria de las cepas *ABF1*<sup>+</sup>/p*ABF1::ABF1* (p*ABF1*), *ABF1*<sup>+</sup>/vector vacío, *ABF1*<sup>+</sup>/pOE (p*MT-1::ABF1.URA3*) *abf1Δ*/p*ABF1*, *abf1Δ*/pOE, se ajustaron a OD<sub>600</sub> de 0.01, en los medios CAA y YNB, con concentraciones de CuSO<sub>4</sub>, de 25 mM, 50 mM, 75 mM, 100 mM, se incubaron en el aparato BioscreenC por 48 h con agitación constante a 30°C y se calculó el tiempo de duplicación de tres replicas biológicas independientes.

El nivel de expresión del promotor de *MT-1* medido mediante la intensidad de fluorescencia de GFP por citometría de flujo, a partir de una fusión transcripcional con GFP (p*MT-1::GFP*), indica que en medio YPD no hay diferencia en la actividad del promotor entre las 4 concentraciones de cobre utilizadas y el punto máximo de fluorescencia después de 5 h es de 74.1 unidades relativas de fluorescencia (URF). En medio CAA hay más variación entre las concentraciones utilizadas: a 50  $\mu\text{M}$ , 75  $\mu\text{M}$ , y 100  $\mu\text{M}$ , existe una inducción similar con una fluorescencia de 106.5 URF después de 5 h de inducción, y en 25  $\mu\text{M}$  de cobre la inducción máxima es de 37 URF. En cambio, en medio YNB a cualquier concentración de cobre la actividad del promotor es mucho mayor que en los otros medios, a 25  $\mu\text{M}$  de cobre alcanza 279

URF mientras que a 100  $\mu\text{M}$  alcanza cerca de 350 URF transcurridas 5 h de inducción (Fig 13).

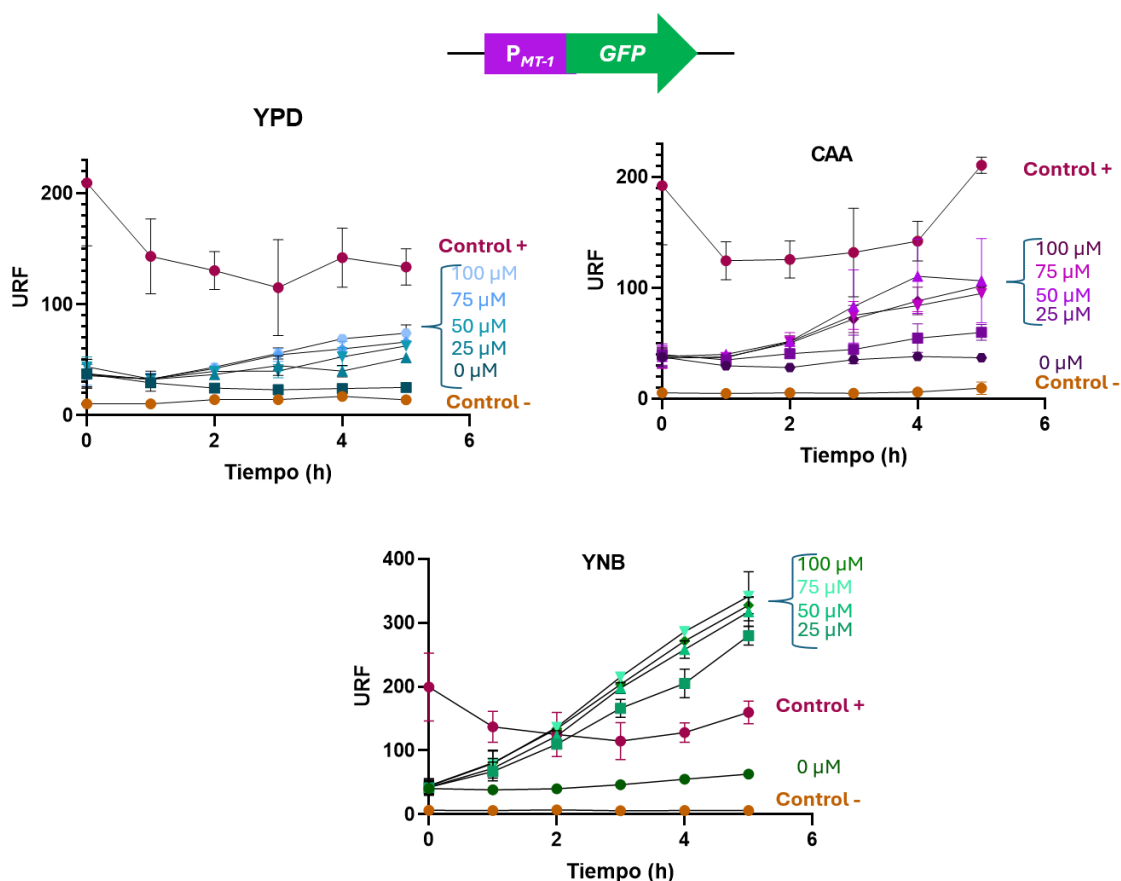


Fig. 13 Expresión de GFP en diferentes medios de cultivo y concentraciones de cobre para evaluación de la actividad del promotor de *MT-1* en la cepa parental: WT/ $pP_{MT-1}::GFP$ . Como control negativo utilizamos la cepa parental con un plásmido con GFP sin promotor, y como control positivo WT/ $pP_{PGK1}::GFP$ . Se ajustaron las células a  $OD_{600}$  de 0.5 en los medios correspondientes, YPD, YNB y CAA con concentraciones de cobre de 25  $\mu\text{M}$ , 75  $\mu\text{M}$ , 50  $\mu\text{M}$  y 100  $\mu\text{M}$ . Se tomaron lecturas por citometría de flujo de la intensidad de fluorescencia cada hora durante 5h, el tiempo cero corresponde a fase estacionaria.

#### 4.2 Las diferencias en los medios por separado no modulan o disminuyen la intensidad de fluorescencia en el medio YNB.

Dado que la diferencia en la expresión de GFP entre YNB y CAA es 2.5 a 3 veces mayor en YNB, consideramos que una de las características que pueden influir en la biodisponibilidad del cobre es el pH. El medio YPD tiene un pH de 6.5, CAA de pH 5.5 y YNB de 4.5. Modificamos el pH de cada uno y evaluamos la actividad del promotor mediante la intensidad de fluorescencia del pH mas ácido (4.5) y el mas alto (6.5) de células en fase estacionaria y a las 5 h de inducción del

promotor por adición de 50  $\mu\text{M}$  de  $\text{CuSO}_4$  (Fig 14). En YPD en ambas condiciones (tanto acidificado como en su pH normal), el nivel de inducción del promotor es igual (en ambos casos alcanza aproximadamente 115 URF). En CAA a pH 4.5 el nivel de expresión fue mayor que en el pH de 6.5 (208.5 URF vs 89 URF) a 5 h de inducción. Y en YNB a pH 6.5 disminuyó notablemente la actividad de GFP, comparada con su nivel a pH 4.5 (143.37 URF vs 556.39 URF), lo que indica que el pH sí modifica el nivel de expresión en CAA y YNB pero no en YPD.

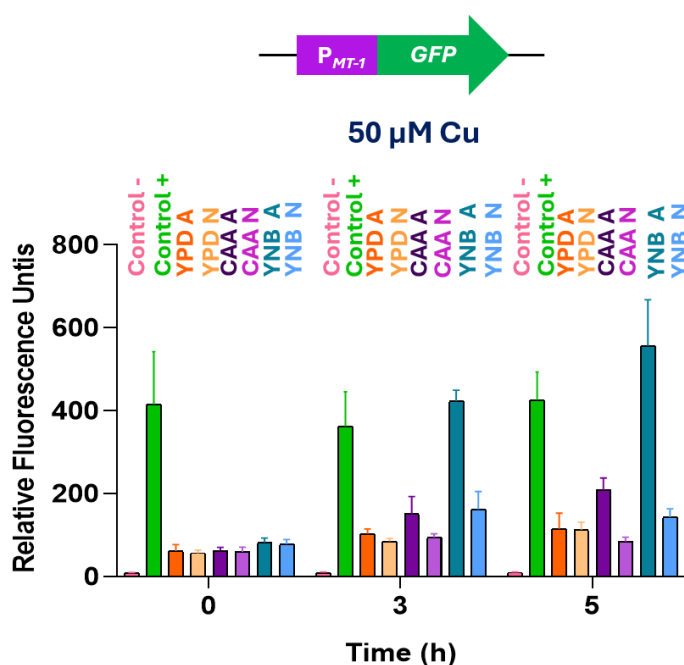


Fig. 14 Efecto del pH en la inducción del promotor de *MT-1*. Realizamos un ajuste del pH de los medios CAA, YPD y YNB a pH 6.5 (N) o pH 4.5 (A). Utilizamos la cepa WT/ $p_{MT-1}::GFP$ , como control negativo la cepa parental con un plásmido con GFP sin promotor, y como control positivo (WT/ $p_{PGK1}::GFP$ ) y las ajustamos a  $OD_{600}$  de 0.5, y tomamos lecturas de la intensidad de la fluorescencia, cada hora por 5 h. El tiempo cero, corresponde a la fase estacionaria, y se muestran 3 h y 5 h.  $n = 3$  Two-way ANOVA, prueba de Tukey.

Para determinar si con el nivel de inducción del promotor en medio YNB con el pH ajustado y mantenido (tamponado) a pH 6.5 es suficiente para causar letalidad, utilizamos las cepas de sobreexpresión: *abf1Δ*/pOE y *ABF1+*/pOE, comparadas con la cepa *abf1Δ*/pWT y *ABF1+*/pEV (vector vacío) y evaluamos el crecimiento en medio líquido.

Como esperábamos, las curvas de crecimiento obtenidas en medio YNB revelan que no hubo crecimiento de las cepas que sobre expresan *ABF1* en estas

condiciones. Sin embargo, también observamos que el ajuste del pH del medio, en el cual no hay una inducción tan fuerte del promotor y por lo tanto una sobreexpresión más moderada de *ABF1*, no se recupera la viabilidad (Fig. 15), es decir, no hay crecimiento en las cepas que sobre expresan *ABF1*, aunque esta sobreexpresión sea moderada (143 RFU en medio YNB neutro vs 556 RFU en YNB acidificado).

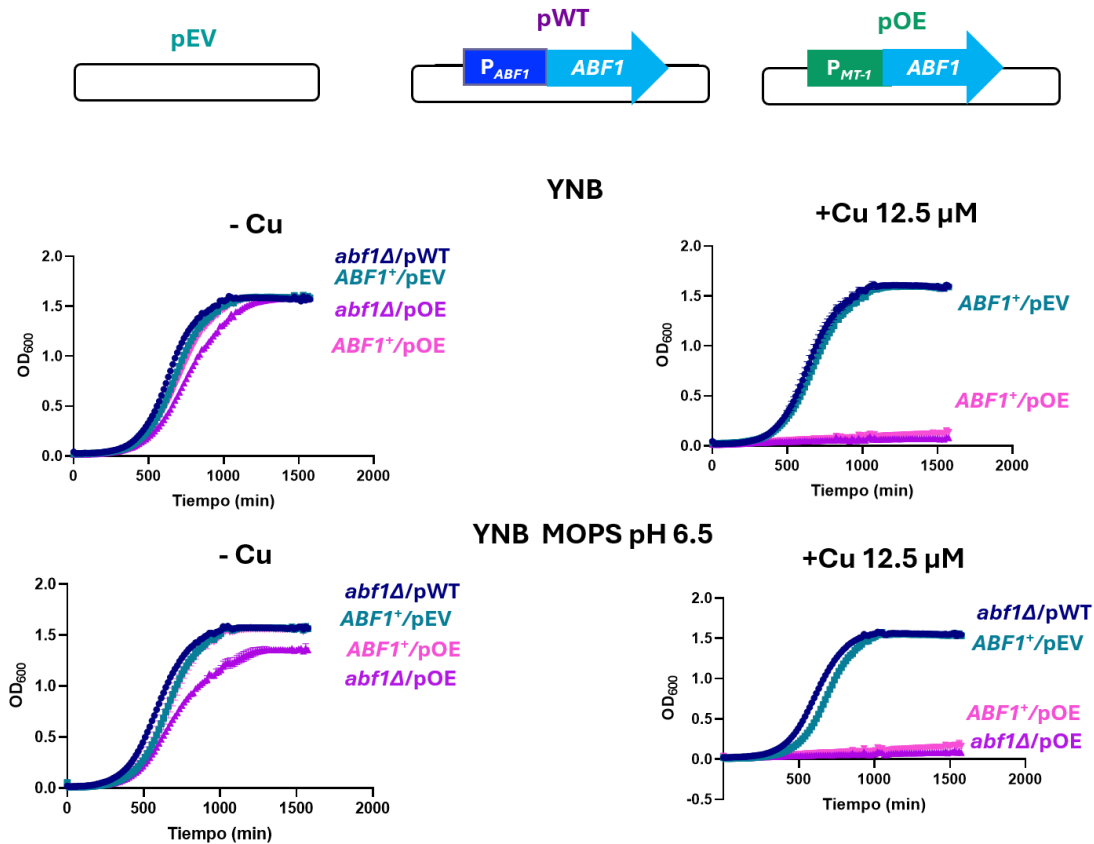


Fig. 15 Curvas de crecimiento en medio YNB tamponado con de cobre añadido. Utilizamos las cepas BG14/vector vacío, BG14/pOE *ABF1*, *abf1Δ/pWT* *abf1Δ/* pOE. El pH del medio YNB se ajustó a 6.5, y se tamponó con MOPS, y se agregó o no 12.5 μM Cu. Adicionalmente utilizamos YNB sin ajuste de pH con o sin 1.25 μM Cu. Las células de fase estacionaria se ajustaron a una  $OD_{600}$  de 0.01 en los medios correspondientes y se incubaron en el equipo BioscreenC durante 48 h con agitación y a 30 °C y tomamos lectura de  $OD_{600}$  cada 15 min.

El aminoácido histidina se ha reportado como quelante de cobre lo que podría disminuir su biodisponibilidad en el medio. Evaluamos entonces la expresión del promotor por medio de la intensidad de fluorescencia de GFP en presencia de histidina añadida. Para este experimento utilizamos concentraciones menores de

cobre (6 y 12  $\mu\text{M}$ ) en medio YNB y encontramos que no hay un cambio en la expresión del promotor cuando combinamos cobre con histidina. En ambos casos la inducción máxima a las 5 h sobrepasa 300 URF (Fig. 16).

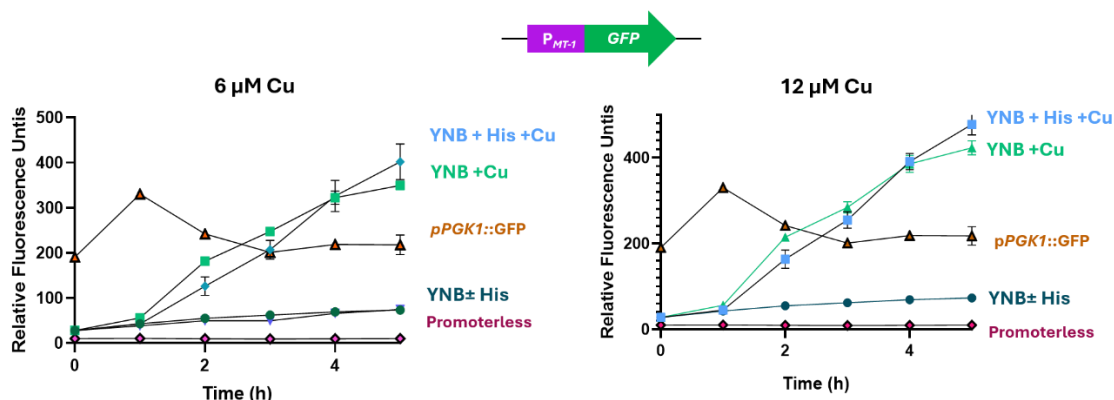


Fig. 16 Evaluación del efecto de la histidina en combinación con  $\text{CuSO}_4$  en la respuesta del promotor *MT-1* usando las cepas: WT/ $pP_{MT-1}::\text{GFP}$ , como control negativo la cepa parental sin promotor, y como control positivo WT/ $pP_{PGK1}::\text{GFP}$ . Evaluamos la actividad del promotor *MT-1* en respuesta a la combinación del medio YNB +80 mg/L de L-histidina con o sin cobre 12.5  $\mu\text{M}$  y 6  $\mu\text{M}$ . Se ajustaron células de fase estacionaria a  $\text{OD}_{600}$  de 0.5 en los medios respectivos y se tomaron lecturas de intensidad de fluorescencia por citometría de flujo, cada hora por 5 horas en el equipo BD FACsCalibur.  $n=3$  Two-way ANOVA y Tukey test.

Finalmente investigamos cual es la máxima concentración de  $\text{CuSO}_4$  para inducir el promotor de *MT-1* sin causar letalidad en medio YNB. Realizamos nuevamente un ensayo de citometría de flujo con la fusión transcripcional del promotor *MT-1* con GFP en medio YNB con 0.1, 0.3, 0.6 y 1  $\mu\text{M}$  de  $\text{CuSO}_4$ . y medimos la intensidad de fluorescencia cada hora por cinco horas. Al incrementar la concentración de cobre en concentraciones muy pequeñas, aumenta moderadamente la actividad del promotor. Después de 5 h la intensidad de fluorescencia es de 65.85 URF, 101.76 URF, 148.7 URF y 190.51 URF en cada concentración de cobre respectivamente (Fig. 17). A partir de 1  $\mu\text{M}$  (190.51URF) empieza a haber letalidad.

Con estos datos establecimos que la sobreexpresión de *ABF1* que se obtiene en cultivos en medio YNB con 0.6  $\mu\text{M}$  de  $\text{CuSO}_4$  (equivalente a 143.07 RFUs) aun obtiene perdida de viabilidad, por lo que la sobreexpresión de *ABF1* para evitar pérdida de viabilidad en YNB debe ser menor a este nivel

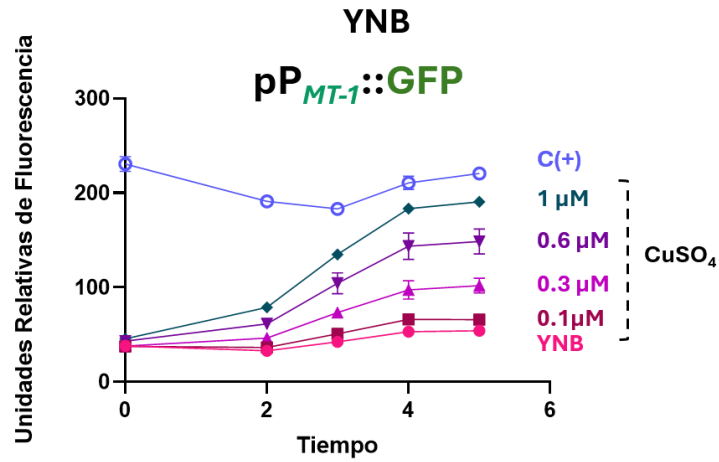


Fig. 17 Modulación de la expresión de GFP a bajas concentraciones de cobre en medio YNB. Evaluamos la cepa WT/pP<sub>MT-1</sub>::GFP, como control negativo la cepa parental con un plásmido con GFP sin promotor, y como control positivo (WT/pP<sub>PGK1</sub>::GFP). Se adicionaron las siguientes concentraciones de CuSO<sub>4</sub>: 0.1, 0.3, 0.6 y 1 μM. Las células se ajustaron a OD<sub>600</sub> de 0.5 en cada medio, en cada medio, y se midió la intensidad de fluorescencia cada hora durante 5 h por citometría de flujo en el equipo BD FACsCalibur.

## VI. DISCUSIÓN

### 8.1 La plasticidad genómica de *Candida glabrata* le confiere la capacidad de adaptarse y persistir frente a diversos tipos de estrés.

La reparación del ADN es crucial para las células, ya que de este proceso depende la integridad del genoma, sin embargo, la inserción de mutaciones también puede llevar a la adquisición de características que les permiten sobrevivir durante un estrés prolongado (Gonçalves et al., 2025).

Un ejemplo de la aparición de mutaciones que contribuye a la supervivencia de *C. glabrata* en ausencia de Abf1 es cuando se depleta a la célula de esta proteína. Abf1 es una proteína esencial para *C. glabrata* que se ha clasificado como un factor general de la regulación junto con Rap1 y Reb1 (Challal et al., 2018b; Fourel et al., 2002). En estudios previos confirmamos su relevancia, mediante un experimento en el cual depletamos a la célula de Abf1 de la siguiente manera: empleamos una cepa mutante nula complementada de manera episomal con el gen *ABF1* bajo el control del promotor *MET3*, el cual se reprime en presencia de metionina y cisteína en el medio de cultivo. En condiciones de represión constante de Abf1 (medio con M y C), encontramos que la cepa disminuye su viabilidad, después de 7h de represión. En estas condiciones, encontramos células con una segregación aberrante de núcleos mediante microscopía de fluorescencia y cuantificamos el contenido de ADN, en las que observamos poblaciones que con mayor intensidad de fluorescencia; esto se relacionó con un mayor contenido de ADN (Hernández-Hernández et al., 2021). De manera interesante, después de 24h en condiciones de represión constante de la expresión de *ABF1*, encontramos células que pudieron crecer en este medio. Los análisis posteriores sugieren que estas células son supresoras estables de la delección de *ABF1*.

Además, *C. glabrata* tiene una respuesta diferente al daño al ADN producido por metil metanosulfonato (MMS). En el caso de *C. glabrata*, la exposición a MMS no induce un arresto en la fase S del ciclo celular y además presenta segregación aberrante de núcleos y una alta pérdida de viabilidad; a diferencia de lo que ocurre en el caso de *S. cerevisiae* en donde se desencadena una cascada de fosforilación

que converge en la hiper-fosforilación de Rad53 que induce el arresto en la fase S para llevar a cabo la reparación del daño y reducir la pérdida de viabilidad.

De manera contrastante, en *S. cerevisiae*, la expresión de componentes de la vía de Mismatch Repair como *MSH2* se regula ligeramente a la alta, pero en *C. glabrata* no se induce esta vía mientras que genes de la vía activada por escisión de nucleótido incrementan su expresión (*RAD7*, *RAD16*) en *C. glabrata* pero no en *S. cerevisiae*. Abf1 se regula ligeramente a la baja tanto en *C. glabrata* como en *S. cerevisiae* en respuesta a daño por MMS (Shor et al., 2020).

Adicionalmente, el análisis de la respuesta transcripcional de *S. cerevisiae* bajo exposición a MMS reveló cambios en la expresión de genes meióticos como *HOP1* y *HOP2*. *HOP1* es un gen que se regula por Abf1, el sitio UAS<sub>H</sub> en su región promotora coincide con el motivo de unión de Abf1 el cual funciona como activador transcripcional (Gailus-Durner et al., 1996). *C. glabrata* no realiza meiosis, pero mantiene *HOP1* y *HOP2*, y *HOP1* también se ve inducido en respuesta a MMS.

En el caso de daño al DNA producido por luz UV o bien durante estrés replicativo mediado por HU, esperábamos una inducción de la transcripción de *ABF1* ya que Abf1 podría participar en la reparación del ADN. Sin embargo, observamos una baja inducción de Abf1.

Es interesante el hecho de que el género *Hanseniaspora* perdió algunos genes involucrados en procesos de mantenimiento de los cromosomas, lo que sugiere que esta laxitud en vías de reparación del ADN o vías de regulación es parte clave de la supervivencia durante la exposición a distintos tipos de estrés (Gonçalves et al., 2025; Shor et al., 2020).

Un ejemplo de ello es la adquisición de mutaciones en genes como *PDR1* o los genes *FKS1* y *FKS2*, blanco de fármacos terapéuticos para los cuales se desarrolla resistencia en aislados clínicos. La aparición de estas mutaciones se ha asociado con mutaciones en los genes *MSH2* o *RAD6* que causan un incremento en la tasa de mutaciones en estas cepas y conducen a la resistencia a fluconazol o equinocandinas (Healey et al., 2016; Pais et al., 2022).

Además, *MSH2* también está involucrado en la ocupancia de la maquinaria de silenciamiento en *S. cerevisiae* aunque no de Abf1 ya que esta proteína pierde

su ocupancia durante el daño al ADN pues se ha visto su participación en la vía NER (Liu et al., 2020). En conjunto estos datos nos indican que Abf1 se requiere para la supervivencia, y en periodos prolongados de represión, podría asociarse a fallos en sistemas de reparación. Además del complejo NER, Abf1 participa en el sistema de mismatch repair y en la expresión de genes de la meiosis como *HOP1*. Este último conserva sintenia y sitios putativos de unión de Abf1 en *C. glabrata* y, aunque su papel aún no se ha determinado en este hongo, Hop1 podría interferir con la estabilidad genómica en respuesta a estrés prolongado como durante la ausencia de Abf1. Aún es necesario realizar experimentos para investigar esta posibilidad.

## **8.2 Abf1 está relacionada con la función mitocondrial**

La región del C terminal de Abf1 (los últimos 43 amino ácidos de la proteína) contiene el región efectora de la mayoría de las funciones que se asocian a esta proteína. En *C. glabrata* la delección de los últimos 43 aa del C-terminal resulta en la reducción del silenciamiento subtelomérico y la des represión parcial del gen *EPA1*, lo que indica que esta región es importante para la regulación de la estructura de cromatina en la región subtelomérica. Adicionalmente, la cepa que lleva la delección del C-terminal de Abf1 es más sensible al daño del ADN inducido por luz UV, lo que sugiere que este dominio es necesario para responder y reparar eficientemente el daño del ADN (Hernández-Hernández et al., 2024; Vera-Salazar et al., 2025).

Además, recientemente demostramos que la sobreexpresión del alelo abf1-43, altera el crecimiento en medios de cultivo con fuentes de carbono no fermentables como el glicerol. En este sentido, Abf1 participa en la regulación de la expresión de genes que codifican proteínas con función en la mitocondria. Por ejemplo, en *S. cerevisiae*, Abf1 se ha descrito como regulador de la transcripción del gen *COX6* (que codifica para la subunidad 6 del citocromo c oxidasa que pertenece al complejo IV de la cadena de transporte de electrones), el cual se reprime en presencia de altas concentraciones de glucosa, debido a la represión catabólica del carbono. En condiciones de baja glucosa, esta represión se libera mediante de la acción de las proteínas Snf1 y Ssn6. Ssn6 es necesaria para la

fosforilación de Abf1. Cuando Abf1 está fosforilado, se une a la región UAS<sub>6</sub> del promotor de COX6, lo que resulta en la desrepresión de COX6. En cambio, si Abf1 no está fosforilado ocurre una represión de COX6, ya que Abf1 no se une a la región UAS<sub>6</sub> (Trawick et al., 1992). Por otro lado, Abf1 regula la expresión del gen *QCR8*, que codifica para la subunidad VIII de la Ubiquinol citocromo-c reductasa (Complejo III), que forma parte de la cadena de transporte de electrones en la membrana interna de la mitocondria. La expresión de *QCR8* en *S. cerevisiae* está controlada principalmente por el complejo Hap2/3/4/5, y la región de regulación tiene una UAS río arriba con sitios de unión sobrelapantes de *ABF1* y *CPF1* (codifica para un factor de transcripción que se une a promotores *MET* y a los centrómeros). En este contexto Abf1 funciona como un activador transcripcional durante la represión catabólica por glucosa y la desrepresión mediada por fuentes de carbono no fermentables, para una respuesta eficiente ante cambios de fuente de carbono ya que en ausencia de Abf1 el cambio a un medio con etanol como fuente de carbono hace que el crecimiento sea mucho más lento que en la cepa parental (De Winde & Grivell, 1992).

Aunque únicamente la delección de la región C-terminal de Abf1 in *C. glabrata* no afecta el crecimiento en glicerol o etanol bajo condiciones normales de expresión, la sobreexpresión de este alelo genera un defecto pronunciado en el crecimiento, lo que sugiere un desbalance en la regulación causada por un exceso de este alelo. Consistente con esto, en un análisis de la función mitocondrial en células *abf1-43* y células sobreexpresantes de este alelo trunco mediante la reducción de TTC, observamos un fenotipo en el que en una colonia hay una mezcla de células rojas (reducción de TTC y respiración activa) y blancas (sin actividad de reducción de TTC y disfunción mitocondrial), lo que indicaría una respuesta diferencial mitocondrial en una sola población.

Evaluamos la existencia de sitios putativos de unión de Abf1 en el promotor de COX6 de *C. glabrata*, y no encontramos ningún sitio putativo de unión. En cambio, dentro de la región intergénica río arriba de *QCR8*, que sí conserva la sintenia con *S. cerevisiae*, encontramos un sitio putativo de unión de Abf1, que, de unirse a este sitio, la falla en la regulación de este complejo puede resultar en un

funcionamiento mitocondrial defectuoso y las implicaciones que esto tiene en *C. glabrata* como en la correlación del fenotipo petite con la resistencia a antifúngicos como fluconazol.

Experimentos previos de nuestro laboratorio (Juárez-Reyes et al., datos no publicados) indican que la cepa *abf1-43* exhibe mayor resistencia a fluconazol en comparación con la cepa silvestre. Esta resistencia puede deberse a múltiples factores, como mencionamos anteriormente, aunque queda por corroborar la participación de Abf1 en la regulación de la expresión de genes con función mitocondrial y su relación con la resistencia a antifúngicos. (Ferrari et al., 2011; Siscar-Lewin et al., 2021).

En conjunto, estas evidencias sugieren que la sobreexpresión de Abf1 o *Abf1-43* induce inestabilidad o daño mitocondrial bajo las condiciones estudiadas, lo que resulta en un incremento en la resistencia a fluconazol. Aún no se ha estudiado cuál es la participación (si es que existe) de Abf1 en la regulación de la biogénesis mitocondrial en *C. glabrata*.

## VIII CONCLUSIÓN

A partir de los datos presentados en este trabajo, concluimos que *ABF1* en *Candida glabrata* es un gen esencial que participa en múltiples procesos asociados al ADN. Observamos que su represión prolongada conduce a una pérdida de viabilidad celular y, simultáneamente, a la aparición de células supresoras de la letalidad causada por la delección de *ABF1*. La supresión no se debe a elementos presentes en el plásmido y sugiere un mecanismo de compensación en *C. glabrata*.

Por otra parte, la expresión de *ABF1* se encuentra sometida a una regulación muy precisa y requiere niveles de expresión finamente controlados, dado que el gen se autorregula negativamente. De forma análoga a otros factores de transcripción, Abf1 forma dímeros que se localizan en el núcleo. Estos datos indican que CgAbf1 se comporta como factor general de regulación como su contraparte en *S. cerevisiae*.

La delección de los últimos 43 aminoácidos de Abf1 genera una variante deficiente en la respuesta al daño del ADN inducido por radiación UV. Además, la sobreexpresión de este alelo trunco también se asocia a un defecto de crecimiento en fuentes de carbono no fermentables, lo que sugiere una posible implicación en la regulación de la expresión de genes nucleares con función mitocondrial. Fenotipos de disfunción mitocondrial se asocian con fenotipos de resistencia a antifúngicos, como el fluconazol, por lo que esta región podría impactar también procesos de adquisición de resistencia.

La complementación heteróloga con el gen *ScABF1* restauró el fenotipo letal asociado a la delección de *CgAbf1* cuando se expresó a partir de un plásmido, aunque con un patrón de crecimiento lento. Sin embargo, cuando *ScABF1* se integró en el genoma se recuperó completamente el fenotipo de crecimiento parental. Ambas versiones muestran un crecimiento comparable al de la cepa parental en fuentes de carbono no fermentables y restauran el fenotipo de adherencia, al

presentar niveles de adherencia similares a los de la cepa parental. Aunque no presentan sintenia, conservan funcionalidad evolutiva entre ortólogos a pesar de su contexto genómico.

## IX PERSPECTIVAS

Este trabajo plantea diversas interrogantes que permanecen abiertos, entre ellos:

1. La caracterización del mecanismo mediante el cual se confiere supresión de *abf1* $\Delta$  en *C. glabrata*, que permite rescatar la pérdida de viabilidad incluso en ausencia de Abf1.
2. La identificación de posibles genes y mutaciones o eventos de sobreexpresión que podrían compensar funcionalmente la actividad de Abf1
3. Investigar cómo se regula la respuesta al daño inducido por luz UV en *C. glabrata* mediante Abf1 y su interacción con otras proteínas involucradas en la reparación del ADN.
4. Determinar cómo intervienen los genes meióticos conservados, que podrían explicar la segregación aberrante de núcleos y la desestabilización genómica, dado que también podrían estar sujetos a la regulación por Abf1.
5. Dilucidar la relación entre Abf1 y la función mitocondrial así como su efecto sobre la resistencia a antifúngicos, posiblemente a través de la regulación de genes nucleares con función mitocondrial, como *QCR8*.

## REFERENCIAS

- Astvad, K. M. T., Johansen, H. K., Røder, B. L., Rosenvinge, F. S., Knudsen, J. D., Lemming, L., Schønheyder, H. C., Hare, R. K., Kristensen, L., Nielsen, L., Gertsen, J. B., Dzajic, E., Pedersen, M., Østergård, C., Olesen, B., Søndergaard, T. S., & Arendrup, M. C. (2018). Update from a 12-Year Nationwide Fungemia Surveillance: Increasing Intrinsic and Acquired Resistance Causes Concern. *Journal of Clinical Microbiology*, 56(4). <https://doi.org/10.1128/JCM.01564-17>
- Bar-Ziv, R., Brodsky, S., Chapal, M., & Barkai, N. (2020). Transcription Factor Binding to Replicated DNA. *Cell Reports*, 30(12), 3989-3995.e4. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2020.02.114>
- Bosio, M. C., Fermi, B., & Dieci, G. (2017). Transcriptional control of yeast ribosome biogenesis: A multifaceted role for general regulatory factors. *Transcription*, 8(4), 254–260. <https://doi.org/10.1080/21541264.2017.1317378>
- Carreté, L., Ksiezopolska, E., Gómez-Molero, E., Angoulvant, A., Bader, O., Fairhead, C., & Gabaldón, T. (2019). Genome Comparisons of *Candida glabrata* Serial Clinical Isolates Reveal Patterns of Genetic Variation in Infecting Clonal Populations. *Frontiers in Microbiology*, 10. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00112>
- Castaño, I., Pan, S., Zupancic, M., Hennequin, C., Dujon, B., & Cormack, B. P. (2005). Telomere length control and transcriptional regulation of subtelomeric adhesins in *Candida glabrata*. *Molecular Microbiology*, 55(4), 1246–1258. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2004.04465.x>
- Challal, D., Barucco, M., Kubik, S., Feuerbach, F., Candelli, T., Geoffroy, H., Benaksas, C., Shore, D., & Libri, D. (2018a). General Regulatory Factors Control the Fidelity of Transcription by Restricting Non-coding and Ectopic Initiation. *Molecular Cell*, 72(6). <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2018.11.037>
- Challal, D., Barucco, M., Kubik, S., Feuerbach, F., Candelli, T., Geoffroy, H., Benaksas, C., Shore, D., & Libri, D. (2018b). General Regulatory Factors Control the Fidelity of Transcription by Restricting Non-coding and Ectopic Initiation. *Molecular Cell*, 72(6), 955-969.e7. <https://doi.org/10.1016/J.MOLCEL.2018.11.037>
- Cho, G., Kim, J., Mo Rho, H., & Jung, G. (1995). Structure-function analysis of the DNA binding domain of *Saccharomyces cerevisiae* ABF1. *Nucleic Acids Research*, 23(15), 2980–2987. <https://doi.org/10.1093/nar/23.15.2980>
- Cormack, B. P., Ghorri, N., & Falkow, S. (1999). An Adhesin of the Yeast Pathogen *Candida glabrata* Mediating Adherence to Human Epithelial Cells. *Science*, 285(5427), 578–582. <https://doi.org/10.1126/science.285.5427.578>
- de Groot, P. W. J., Bader, O., de Boer, A. D., Weig, M., & Chauhan, N. (2013). Adhesins in Human Fungal Pathogens: Glue with Plenty of Stick. *Eukaryotic Cell*, 12(4), 470–481. <https://doi.org/10.1128/EC.00364-12>
- de Groot, P. W. J., Kraneveld, E. A., Yin, Q. Y., Dekker, H. L., Groß, U., Crielaard, W., de Koster, C. G., Bader, O., Klis, F. M., & Weig, M. (2008). The Cell Wall of the Human Pathogen *Candida glabrata*: Differential Incorporation of Novel Adhesin-Like Wall Proteins. *Eukaryotic Cell*, 7(11), 1951–1964. <https://doi.org/10.1128/EC.00284-08>

- De Las Peñas, A., Pan, S.-J., Castaño, I., Alder, J., Cregg, R., & Cormack, B. P. (2003). Virulence-related surface glycoproteins in the yeast pathogen *Candida glabrata* are encoded in subtelomeric clusters and subject to *RAP1* - and *SIR* - dependent transcriptional silencing. *Genes & Development*, 17(18), 2245–2258. <https://doi.org/10.1101/gad.1121003>
- De Winde, J. H., & Grivell, L. A. (1992). Global Regulation of Mitochondrial Biogenesis in *Saccharomyces cerevisiae* : ABF1 and CPF1 Play Opposite Roles in Regulating Expression of the *QCR8* Gene, Which Encodes Subunit VIII of the Mitochondrial Ubiquinol-Cytochrome *c* Oxidoreductase. *Molecular and Cellular Biology*, 12(6), 2872–2883. <https://doi.org/10.1128/mcb.12.6.2872-2883.1992>
- Denning, D. W. (2024). Global incidence and mortality of severe fungal disease. *The Lancet Infectious Diseases*, 24(7), e428–e438. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(23\)00692-8](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(23)00692-8)
- Edlind, T. D., & Katiyar, S. K. (2010). Mutational analysis of flucytosine resistance in *Candida glabrata*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 54(11), 4733–4738. <https://doi.org/10.1128/AAC.00605-10>
- Ferrari, S., Sanguinetti, M., De Bernardis, F., Torelli, R., Posteraro, B., Vandeputte, P., & Sanglard, D. (2011). Loss of Mitochondrial Functions Associated with Azole Resistance in *Candida glabrata* Results in Enhanced Virulence in Mice. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 55(5), 1852–1860. <https://doi.org/10.1128/AAC.01271-10>
- Fidel, P. L., Vazquez, J. A., & Sobel, J. D. (1999). *Candida glabrata* : Review of Epidemiology, Pathogenesis, and Clinical Disease with Comparison to *C. albicans*. *Clinical Microbiology Reviews*, 12(1), 80–96. <https://doi.org/10.1128/CMR.12.1.80>
- Fourel, G., Miyake, T., Defossez, P. A., Li, R., & Gilson, É. (2002). General Regulatory Factors (GRFs) as genome partitioners. *Journal of Biological Chemistry*, 277(44). <https://doi.org/10.1074/jbc.M202578200>
- Gabaldón, T., Martin, T., Marcet-Houben, M., Durrens, P., Bolotin-Fukuhara, M., Lespinet, O., Arnaise, S., Boissard, S., Aguilera, G., Atanasova, R., Bouchier, C., Couloux, A., Creno, S., Almeida Cruz, J., Devillers, H., Enache-Angoulvant, A., Guitard, J., Jaouen, L., Ma, L., ... Fairhead, C. (2013). Comparative genomics of emerging pathogens in the *Candida glabrata* clade. *BMC Genomics*, 14(1), 623. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-14-623>
- Gailus-Durner, V., Xie, J., Chintamaneni, C., & Vershon, A. K. (1996). Participation of the Yeast Activator Abf1 in Meiosis-Specific Expression of the *HOP1* Gene. *Molecular and Cellular Biology*, 16(6), 2777–2786. <https://doi.org/10.1128/MCB.16.6.2777>
- Galocha, M., Pais, P., Cavalheiro, M., Pereira, D., Viana, R., & Teixeira, M. C. (2019). Divergent Approaches to Virulence in *C. albicans* and *C. glabrata*: Two Sides of the Same Coin. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(9), 2345. <https://doi.org/10.3390/ijms20092345>
- Ganapathi, M., Palumbo, M. J., Ansari, S. A., He, Q., Tsui, K., Nislow, C., & Morse, R. H. (2011). Extensive role of the general regulatory factors, Abf1 and Rap1, in determining genome-wide chromatin structure in budding yeast. *Nucleic Acids Research*, 39(6), 2032–2044. <https://doi.org/10.1093/nar/gkq1161>

- Gonçalves, C., Steenwyk, J. L., Rinker, D. C., Opulente, D. A., LaBella, A. L., Harrison, M.-C., Wolters, J. F., Zhou, X., Shen, X.-X., Covo, S., Groenewald, M., Hittinger, C. T., & Rokas, A. (2025). Stable Hypermutators Revealed by the Genomic Landscape of Genes Involved in Genome Stability Among Yeast Species. *Molecular Biology and Evolution*, 42(11).  
<https://doi.org/10.1093/molbev/msaf285>
- Gutiérrez-Escobedo, G., Hernández-Carreón, O., Morales-Rojano, B., Revuelta-Rodríguez, B., Vázquez-Franco, N., Castaño, I., & De Las Peñas, A. (2020). *Candida glabrata* peroxiredoxins, Tsa1 and Tsa2, and sulfiredoxin, Srx1, protect against oxidative damage and are necessary for virulence. *Fungal Genetics and Biology*, 135, 103287. <https://doi.org/10.1016/j.fgb.2019.103287>
- Healey, K. R., Zhao, Y., Perez, W. B., Lockhart, S. R., Sobel, J. D., Farmakiotis, D., Kontoyiannis, D. P., Sanglard, D., Taj-Aldeen, S. J., Alexander, B. D., Jimenez-Ortigosa, C., Shor, E., & Perlin, D. S. (2016). Prevalent mutator genotype identified in fungal pathogen *Candida glabrata* promotes multi-drug resistance. *Nature Communications*, 7(1), 11128.  
<https://doi.org/10.1038/ncomms11128>
- Hernández-Hernández, G., Vera-Salazar, L. A., Castanedo, L., López-Fuentes, E., Gutiérrez-Escobedo, G., De Las Peñas, A., & Castaño, I. (2021). Abf1 is an essential protein that participates in cell cycle progression and subtelomeric silencing in *Candida glabrata*. *Journal of Fungi*, 7(12).  
<https://doi.org/10.3390/jof7121005>
- Hernández-Hernández, G., Vera-Salazar, L. A., Gutiérrez-Escobedo, G., Gómez-Hernández, N., Leiva-Peláez, O., De Las Peñas, A., & Castaño, I. (2024). Abf1 negatively regulates the expression of EPA1 and affects adhesion in *Candida glabrata*. *Journal of Medical Microbiology*, 73(10).  
<https://doi.org/10.1099/jmm.0.001905>
- Houšť, J., Spížek, J., & Havlíček, V. (2020). Antifungal Drugs. *Metabolites*, 10(3), 106. <https://doi.org/10.3390/metabo10030106>
- Johnson, C. J., Kernien, J. F., Hoyer, A. R., & Nett, J. E. (2017). Mechanisms involved in the triggering of neutrophil extracellular traps (NETs) by *Candida glabrata* during planktonic and biofilm growth. *Scientific Reports*, 7(1), 13065.  
<https://doi.org/10.1038/s41598-017-13588-6>
- Juárez-Cepeda, J., Orta-Zavalza, E., Cañas-Villamar, I., Arreola-Gómez, J., Pérez-Cornejo, G. P., Hernández-Carballo, C. Y., Gutiérrez-Escobedo, G., Castaño, I., & De Las Peñas, A. (2015). The EPA2 adhesin encoding gene is responsive to oxidative stress in the opportunistic fungal pathogen *Candida glabrata*. *Current Genetics*, 61(4), 529–544. <https://doi.org/10.1007/s00294-015-0473-2>
- Juárez-Reyes, A., Ramírez-Zavaleta, C. Y., Medina-Sánchez, L., de Las Peñas, A., & Castaño, I. (2012). A protosilencer of subtelomeric gene expression in *Candida glabrata* with unique properties. *Genetics*, 190(1).  
<https://doi.org/10.1534/genetics.111.135251>
- Kasper, L., Seider, K., Gerwien, F., Allert, S., Brunke, S., Schwarzmüller, T., Ames, L., Zubiria-Barrera, C., Mansour, M. K., Becken, U., Barz, D., Vyas, J. M., Reiling, N., Haas, A., Haynes, K., Kuchler, K., & Hube, B. (2014). Identification of *Candida glabrata* Genes Involved in pH Modulation and Modification of the

- Phagosomal Environment in Macrophages. *PLoS ONE*, 9(5), e96015.  
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0096015>
- Kaur, R., Domergue, R., Zupancic, M. L., & Cormack, B. P. (2005). A yeast by any other name: *Candida glabrata* and its interaction with the host. *Current Opinion in Microbiology*, 8(4), 378–384.  
<https://doi.org/10.1016/j.mib.2005.06.012>
- Kraneveld, E. A., de Soet, J. J., Deng, D. M., Dekker, H. L., de Koster, C. G., Klis, F. M., Crielaard, W., & de Groot, P. W. J. (2011). Identification and Differential Gene Expression of Adhesin-Like Wall Proteins in *Candida glabrata* Biofilms. *Mycopathologia*, 172(6), 415–427. <https://doi.org/10.1007/s11046-011-9446-2>
- Liu, Q., Zhu, X., Lindström, M., Shi, Y., Zheng, J., Hao, X., Gustafsson, C. M., & Liu, B. (2020). Yeast mismatch repair components are required for stable inheritance of gene silencing. *PLOS Genetics*, 16(5), e1008798.  
<https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1008798>
- López-Fuentes, E., Hernández-Hernández, G., Castanedo, L., Gutiérrez-Escobedo, G., Oktaba, K., De las Peñas, A., & Castaño, I. (2018). Chromatin loop formation induced by a subtelomeric protosilencer represses EPA genes in *Candida glabrata*. *Genetics*, 210(1).  
<https://doi.org/10.1534/genetics.118.301202>
- Maestre-Reyna, M., Diderrich, R., Veelders, M. S., Eulenburg, G., Kalugin, V., Brückner, S., Keller, P., Rupp, S., Mösch, H.-U., & Essen, L.-O. (2012). Structural basis for promiscuity and specificity during *Candida glabrata* invasion of host epithelia. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109(42), 16864–16869. <https://doi.org/10.1073/pnas.1207653109>
- Marahrens, Y., & Stillman, B. (1992). A yeast chromosomal origin of DNA replication defined by multiple functional elements. *Science*, 255(5046).  
<https://doi.org/10.1126/science.1536007>
- Miyake, T., Loch, C. M., & Li, R. (2002). Identification of a Multifunctional Domain in Autonomously Replicating Sequence-Binding Factor 1 Required for Transcriptional Activation, DNA Replication, and Gene Silencing. *Molecular and Cellular Biology*, 22(2). <https://doi.org/10.1128/mcb.22.2.505-516.2002>
- Miyake, T., Reese, J., Loch, C. M., Auble, D. T., & Li, R. (2004). Genome-wide Analysis of ARS (Autonomously Replicating Sequence) Binding Factor 1 (Abf1p)-mediated Transcriptional Regulation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Biological Chemistry*, 279(33), 34865–34872.  
<https://doi.org/10.1074/jbc.M405156200>
- Naskar, S., Prajapati, A., & Kaur, R. (2025). Antifungal drug resistance in *Candida glabrata* : role of cellular signaling and gene regulatory networks. *FEMS Yeast Research*, 25. <https://doi.org/10.1093/femsyr/foaf025>
- Ostrosky-Zeichner, L., Casadevall, A., Galgiani, J. N., Odds, F. C., & Rex, J. H. (2010). An insight into the antifungal pipeline: selected new molecules and beyond. *Nature Reviews Drug Discovery*, 9(9), 719–727.  
<https://doi.org/10.1038/nrd3074>
- Pais, P., Galocha, M., Takahashi-Nakaguchi, A., Chibana, H., & Teixeira, M. C. (2022). Multiple genome analysis of *Candida glabrata* clinical isolates renders new insights into genetic diversity and drug resistance determinants. *Microbial Cell*, 9(11), 174–189. <https://doi.org/10.15698/mic2022.11.786>

- Perlin, D. S., Rautemaa-Richardson, R., & Alastruey-Izquierdo, A. (2017). The global problem of antifungal resistance: prevalence, mechanisms, and management. *The Lancet Infectious Diseases*, 17(12), e383–e392. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(17\)30316-X](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(17)30316-X)
- Pfaller, M. A., Diekema, D. J., Turnidge, J. D., Castanheira, M., & Jones, R. N. (2019). Twenty Years of the SENTRY Antifungal Surveillance Program: Results for *Candida* Species From 1997–2016. *Open Forum Infectious Diseases*, 6(Supplement\_1), S79–S94. <https://doi.org/10.1093/ofid/ofy358>
- Rasheed, M., Battu, A., & Kaur, R. (2020). Host–pathogen interaction in *Candida glabrata* infection: current knowledge and implications for antifungal therapy. *Expert Review of Anti-Infective Therapy*, 18(11), 1093–1103. <https://doi.org/10.1080/14787210.2020.1792773>
- Saijo, T., Miyazaki, T., Izumikawa, K., Mihara, T., Takazono, T., Kosai, K., Imamura, Y., Seki, M., Kakeya, H., Yamamoto, Y., Yanagihara, K., & Kohno, S. (2010). Skn7p Is Involved in Oxidative Stress Response and Virulence of *Candida glabrata*. *Mycopathologia*, 169(2), 81–90. <https://doi.org/10.1007/s11046-009-9233-5>
- Salazar, S. B., Wang, C., Münsterkötter, M., Okamoto, M., Takahashi-Nakaguchi, A., Chibana, H., Lopes, M. M., Guldener, U., Butler, G., & Mira, N. P. (2018). Comparative genomic and transcriptomic analyses unveil novel features of azole resistance and adaptation to the human host in *Candida glabrata*. *FEMS Yeast Research*, 18(1). <https://doi.org/10.1093/femsyr/fox079>
- Schlecht, U., Erb, I., Demougin, P., Robine, N., Borde, V., Nimwegen, E. van, Nicolas, A., & Primig, M. (2008). Genome-wide Expression Profiling, In Vivo DNA Binding Analysis, and Probabilistic Motif Prediction Reveal Novel Abf1 Target Genes during Fermentation, Respiration, and Sporulation in Yeast. *Molecular Biology of the Cell*, 19(5), 2193–2207. <https://doi.org/10.1091/mbc.e07-12-1242>
- Seider, K., Brunke, S., Schild, L., Jablonowski, N., Wilson, D., Majer, O., Barz, D., Haas, A., Kuchler, K., Schaller, M., & Hube, B. (2011). The Facultative Intracellular Pathogen *Candida glabrata* Subverts Macrophage Cytokine Production and Phagolysosome Maturation. *The Journal of Immunology*, 187(6), 3072–3086. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1003730>
- Shor, E., Garcia-Rubio, R., Degregorio, L., & Perlin, D. S. (2020). A noncanonical dna damage checkpoint response in a major fungal pathogen. *MBio*, 11(6). <https://doi.org/10.1128/mBio.03044-20>
- Silve, S., Rhode, P. R., Coll, B., Campbell, J., & Poyton, R. O. (1992). ABF1 Is a Phosphoprotein and Plays a Role in Carbon Source Control of COX6 Transcription in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular and Cellular Biology*, 12(9), 4197–4208. <https://doi.org/10.1128/mcb.12.9.4197-4208.1992>
- Siscar-Lewin, S., Gabaldón, T., Aldejohann, A. M., Kurzai, O., Hube, B., & Brunke, S. (2021). Transient Mitochondria Dysfunction Confers Fungal Cross-Resistance against Phagocytic Killing and Fluconazole. *MBio*, 12(3). <https://doi.org/10.1128/mBio.01128-21>
- Soriano, A., Honore, P. M., Puerta-Alcalde, P., Garcia-Vidal, C., Pagotto, A., Gonçalves-Bradley, D. C., & Verweij, P. E. (2023). Invasive candidiasis: current clinical challenges and unmet needs in adult populations. *Journal of*

- Antimicrobial Chemotherapy*, 78(7), 1569–1585.  
<https://doi.org/10.1093/jac/dkad139>
- Stinchcomb, D. T., Struhl, K., & Davis, R. W. (1979). Isolation and characterisation of a yeast chromosomal replicator. *Nature*, 282(5734), 39–43.  
<https://doi.org/10.1038/282039a0>
- Timmermans, B., De Las Peñas, A., Castaño, I., & Van Dijck, P. (2018). Adhesins in *Candida glabrata*. *Journal of Fungi*, 4(2), 60.  
<https://doi.org/10.3390/jof4020060>
- Trawick, J. D., Kraut, N., Simon, F. R., & Poyton, R. O. (1992). Regulation of Yeast COX6 by the General Transcription Factor ABF1 and Separate HAP2- and Heme-Responsive Elements. *Molecular and Cellular Biology*, 12(5), 2302–2314. <https://doi.org/10.1128/mcb.12.5.2302-2314.1992>
- Vera-Salazar, L. A., Hernández-Hernández, G., Gutiérrez-Escobedo, G., Peñas, A. D. Las, Castaño, I., & Castaño, I. (2025). Abf1 participates in the response to DNA damage and replicative stress in *Candida glabrata* (*Nakaseomyces glabratus*). *Fungal Genetics and Biology*, 181, 104041.  
<https://doi.org/10.1016/j.fgb.2025.104041>
- Vermitsky, J.-P., & Edlind, T. D. (2004). Azole Resistance in *Candida glabrata* : Coordinate Upregulation of Multidrug Transporters and Evidence for a Pdr1-Like Transcription Factor. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 48(10), 3773–3781. <https://doi.org/10.1128/AAC.48.10.3773-3781.2004>
- Verstrepen, K. J., & Fink, G. R. (2009). Genetic and Epigenetic Mechanisms Underlying Cell-Surface Variability in Protozoa and Fungi. *Annual Review of Genetics*, 43(1), 1–24. <https://doi.org/10.1146/annurev-genet-102108-134156>
- WHO Fungal Priority Pathogens List to Guide Research, Development and Public Health Action. (2022). World Health Organization.
- Wright, R. M., & Poyton, R. O. (1990). Release of Two *Saccharomyces cerevisiae* Cytochrome Genes, COX6 and CYC1, from Glucose Repression Requires the SNF1 and SSN6 Gene Products. *Molecular and Cellular Biology*, 10(3), 1297–1300. <https://doi.org/10.1128/mcb.10.3.1297-1300.1990>
- Xu, Z., Green, B., Benoit, N., Schatz, M., Wheelan, S., & Cormack, B. (2020). De novo genome assembly of *Candida glabrata* reveals cell wall protein complement and structure of dispersed tandem repeat arrays. *Molecular Microbiology*, 113(6), 1209–1224. <https://doi.org/10.1111/mmi.14488>
- Xu, Z., Green, B., Benoit, N., Sobel, J. D., Schatz, M. C., Wheelan, S., & Cormack, B. P. (2021). Cell wall protein variation, break-induced replication, and subtelomere dynamics in *Candida glabrata*. *Molecular Microbiology*, 116(1), 260–276. <https://doi.org/10.1111/mmi.14707>
- Yarragudi, A., Parfrey, L. W., & Morse, R. H. (2007). Genome-wide analysis of transcriptional dependence and probable target sites for Abf1 and Rap1 in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nucleic Acids Research*, 35(1).  
<https://doi.org/10.1093/nar/gkl1059>

## **ANEXOS**

### **ANEXO 1**

**Abf1 Is an Essential Protein That Participates in Cell Cycle Progression and Subtelomeric Silencing in *Candida glabrata***

Article

# Abf1 Is an Essential Protein That Participates in Cell Cycle Progression and Subtelomeric Silencing in *Candida glabrata*

Grecia Hernández-Hernández <sup>1</sup>, Laura A. Vera-Salazar <sup>1</sup>, Leonardo Castaneda <sup>2</sup>, Eunice López-Fuentes <sup>3</sup> ,  
Guadalupe Gutiérrez-Escobedo <sup>1</sup> , Alejandro De Las Peñas <sup>1</sup>  and Irene Castaño <sup>1,\*</sup> 

- <sup>1</sup> División de Biología Molecular, Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica (IPICYT), Camino a la Presa San José No. 2055 Col. Lomas 4 Sección, San Luis Potosí CP 78233, Mexico; gracia.hernandez@ipicyt.edu.mx (G.H.-H.); laura.vera@ipicyt.edu.mx (L.A.V.-S.); maria.gutierrez@ipicyt.edu.mx (G.G.-E.); cano@ipicyt.edu.mx (A.D.L.P.)
- <sup>2</sup> Department of Plant Physiology, Faculty of Biology and Biotechnology, Ruhr University Bochum, Universitätsstrasse, 150 ND3/30, D-44801 Bochum, Germany; castaneda.leonardo@gmail.com
- <sup>3</sup> Division of Hematology and Oncology, Department of Pediatrics, University of California, San Francisco, CA 94158, USA; eunice.lopezfuentes@ucsf.edu
- \* Correspondence: icastano@ipicyt.edu.mx; Tel.: +52-444-834-2038



**Citation:** Hernández-Hernández, G.; Vera-Salazar, L.A.; Castaneda, L.; López-Fuentes, E.; Gutiérrez-Escobedo, G.; De Las Peñas, A.; Castaño, I. Abf1 Is an Essential Protein That Participates in Cell Cycle Progression and Subtelomeric Silencing in *Candida glabrata*. *J. Fungi* **2021**, *7*, 1005. <https://doi.org/10.3390/jof7121005>

Academic Editors: Germán Larriba and Toni Ciudad

Received: 19 October 2021

Accepted: 12 November 2021

Published: 25 November 2021

**Publisher's Note:** MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright © 2021 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

**Abstract:** Accurate DNA replication and segregation is key to reproduction and cell viability in all organisms. Autonomously replicating sequence-binding factor 1 (Abf1) is a multifunctional protein that has essential roles in replication, transcription, and regional silencing in the model yeast *Saccharomyces cerevisiae*. In the opportunistic pathogenic fungus *Candida glabrata*, which is closely related to *S. cerevisiae*, these processes are important for survival within the host, for example, the regulation of transcription of virulence-related genes like those involved in adherence. Here, we describe that *CgABF1* is an essential gene required for cell viability and silencing near the telomeres, where many adhesin-encoding genes reside. *CgABF1* mediated subtelomeric silencing depends on the 43 C-terminal amino acids. We also found that abnormal expression, depletion, or overexpression of Abf1, results in defects in nuclear morphology, nuclear segregation, and transit through the cell cycle. In the absence of *ABF1*, cells are arrested in G2 but start cycling again after 9 h, coinciding with the loss of cell viability and the appearance of cells with higher DNA content. Overexpression of *CgABF1* causes defects in nuclear segregation and cell cycle progression. We suggest that these effects could be due to the deregulation of DNA replication.

**Keywords:** *Candida glabrata*; Abf1; DNA replication; cell cycle; subtelomeric silencing

## 1. Introduction

Chromatin structure in eukaryotes plays a crucial role in DNA metabolism, such as DNA replication, activation, and repression of transcription, and regional silencing, among others. Each process requires different proteins and the *cis*-acting DNA sequences to which they bind, favoring protein-protein interactions that shape different chromatin structures necessary to trigger specific metabolic functions. In *Saccharomyces cerevisiae* the proteins ScAbf1 and ScRap1 have been shown to be required for all these processes and, because they perform multiple metabolic functions, they are known as General Regulatory Factors, or GRFs [1–3]. ScAbf1 is a sequence-specific DNA-binding protein for which there are many recognition sites (~181) throughout the genome, including promoters of genes activated (50) or repressed (36) by ScAbf1, the silent mating-type loci (*HML* and *HMR*), the region X of many yeast telomeres and sites known as ARS (Autonomous Replication Sequences), which confer stability and the ability to replicate, to plasmids [4–6]. Many ARSs indeed function as origins of replication in the chromosomes and are recognized by ScAbf1. One special case is the sequences that function as ARSs present in the silent mating-type *loci*, *HMR* and *HML*. These *loci* are each flanked by *cis*-acting elements called silencers (*E* and *I*) that are

## **ANEXO 2**

**Abf1 negatively regulates the expression of *EPA1* and affects adhesion in *Candida glabrata***

**Grecia Hernández-Hernández<sup>1</sup>, Laura A. Vera-Salazar<sup>1</sup>, Guadalupe Gutiérrez-Escobedo<sup>1</sup>, Nicolás Gómez-Hernández<sup>1</sup>, Osney Leiva-Peláez<sup>1</sup>, Alejandro De Las Peñas<sup>1</sup> and Irene Castaño<sup>1</sup>**

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

**Published: 03 October 2024 <https://doi.org/10.1099/jmm.0.001905>**

## ANEXO 3

### En preparación

#### **Controlled-expression BiFC vectors for protein-protein interactions for *Nakaceomyces glabratus* (*Candida glabrata*)**

Guadalupe Gutierrez-Escobedo<sup>1</sup>, Laura Vera-Salazar<sup>1</sup>, Araceli Patrón-Soberano<sup>1</sup>, Karina Robledo-Marquez<sup>1</sup>, Alejandro de Las Peñas<sup>1</sup>, and Irene Castaño<sup>1</sup>.

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

Corresponding author. E-mail: [icastano@ipicyt.edu.mx](mailto:icastano@ipicyt.edu.mx) Tel (52) 4448342038

**ANEXO 4 Información suplementaria**  
**Tabla S1. Cepas de *C. glabrata* utilizadas**

| Cepa                                        | Parental | Genotipo relevante                                                                                    | Referencia                                 |
|---------------------------------------------|----------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------|
| BG14                                        | BG2      | <i>ura3Δ</i> (-85 a +932)::Tn903NeoR                                                                  | Fidel et al., 1996<br>Comark, Falkow, 1999 |
| CGM3113                                     | CGM3068  | <i>abf1-43</i> ::FRT                                                                                  | Hernandez-Hernandez et al., 2021           |
| CGM3585                                     | CGM2746  | <i>abf1Δ</i> ::FRT/pCI12(pP <sub>ABF1</sub> :: <i>ABF1</i> )                                          | Hernandez-Hernandez et al., 2021           |
| CGM3588                                     | CGM2746  | <i>abf1Δ</i> ::FRT/pGH8 (pP <sub>MT-1</sub> ::c-Myc- <i>ABF1</i> )                                    | Hernandez-Hernandez et al., 2021           |
| <b>Análisis del promotor de <i>ABF1</i></b> |          |                                                                                                       |                                            |
| CGM514                                      | BG14     | BG14/pMC14 (GFP::TCTA1)                                                                               | Vidal Aguilar., Tesis de maestría., 2016   |
| CGM4035                                     | BG14     | pGRB2.3 (pP <sub>PGK1</sub> ::GFP)                                                                    | Colección del laboratorio                  |
| CGM5042                                     | BG14     | BG14/ pVS38 (pP <sub>ABF1</sub> ::GFP)                                                                | Este trabajo                               |
| CGM5044                                     | CGM3588  | <i>abf1Δ</i> ::FRT/pGH8 (pP <sub>MT-1</sub> ::c-Myc- <i>ABF1</i> ) + pVS38 (pP <sub>ABF1</sub> ::GFP) | Este trabajo                               |
| CGM5046                                     | CGM3874  | <i>abf1Δ</i> ::FRT/pVS1 (pP <sub>MET3</sub> ::Flag- <i>ABF1</i> ) + pVS38(pP <sub>ABF1</sub> ::GFP)   | Este trabajo                               |
| CGM5210                                     | CGM3113  | <i>abf1-43</i> ::FRT/pVS38 (pP <sub>ABF1</sub> ::GFP)                                                 | Este trabajo                               |
| <b>Análisis BiFC</b>                        |          |                                                                                                       |                                            |

|                                                                   |         |                                                                                                                               |                                  |
|-------------------------------------------------------------------|---------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------|
| CGM3868                                                           | CGM3642 | <i>tsa2Δtsa1Δ</i> /pGE194+pGE244                                                                                              | Colección del laboratorio        |
| CGM4073                                                           | BG14    | BG14/pGE236 (pP <sub>MT-1</sub> ::VN. <i>URA3</i> ) + pRM142 (pP <sub>MT-1</sub> ::VC.NAT)                                    | Colección del laboratorio        |
| CGM4750                                                           | 4125    | WT pGE248 (pP <sub>MT-1</sub> ::VC- <i>TRR1</i> ) + pVS12 (P <sub>MT-1</sub> ::VN- <i>ABF1</i> )                              | Este trabajo                     |
| CGM4807                                                           | 4696    | <i>abf1Δ</i> ::FRT / pVS12 (pP <sub>MT-1</sub> ::VN- <i>ABF1.URA3</i> ) pVS15 (pP <sub>MT-1</sub> ::VC- <i>ABF1.NAT</i> )     | Este trabajo                     |
| CGM4810                                                           | 4696    | <i>abf1Δ</i> ::FRT /pVS23 (pP <sub>MT-1</sub> ::VC- <i>abf1-43.NAT</i> ) + pVS12 (pP <sub>MT-1</sub> ::VN- <i>ABF1.URA3</i> ) | Este trabajo                     |
| CGM4823                                                           | BG14    | BG14/pVS16 (pP <sub>MT-1</sub> ::VN- <i>ABF1.NAT</i> )+ pVS12 (pP <sub>MT-1</sub> ::VN- <i>ABF1.URA3</i> )                    | Este trabajo                     |
| CGM4825                                                           | BG14    | BG14/pVS12(pP <sub>MT-1</sub> ::VN- <i>ABF1.URA3</i> ) pVS15 (pP <sub>MT-1</sub> ::VC- <i>ABF1.NAT</i> )                      | Este trabajo                     |
| <b>Complementación heteróloga</b>                                 |         |                                                                                                                               |                                  |
| CGM2391                                                           | BG14    | BG14/pCI12 (pP <sub>ABF1</sub> :: <i>ABF1</i> ::T <sub>ABF1</sub> )                                                           | Hernandez-Hernandez et al., 2021 |
| CGM5118                                                           | CGM3585 | pVS43(pP <sub>ABF1</sub> :: <i>ScABF1</i> ::T <sub>ABF1</sub> )                                                               | Este trabajo                     |
| CGM5212                                                           | CGM5118 | <i>abf1Δ</i> /pVS43 (pP <sub>ABF1</sub> :: <i>ScABF1</i> ::T <sub>ABF1</sub> )                                                | Este trabajo                     |
| CGM5779                                                           | CGM3585 | <i>abf1Δ</i> /pVS45 AflII/Spel integrativo pP <sub>ABF1</sub> :: <i>ScABF1</i> ::NAT::T <sub>ABF1</sub> )                     | Vera-Salazar et al., 2025        |
| CGM5929                                                           | CGM5779 | <i>abf1Δ</i> :: <i>ScABF1</i> ::FTR                                                                                           | Vera-Salazar et al., 2025        |
| <b>Western blot</b>                                               |         |                                                                                                                               |                                  |
| CGM3111                                                           | CGM2415 | <i>RAP1</i> ::FRT::Flag                                                                                                       | Colección de laboratorio         |
| CGM5156                                                           | BG14    | BG14/pVS36 integrativo (P <sub>ABF1</sub> :: <i>FlagABF1</i> ::T <sub>CAT1</sub> ::NAT::FRT::T <sub>ABF1</sub> )              | Este trabajo                     |
| <b>Represión <i>ABF1</i> (promotor reprimible de <i>MET3</i>)</b> |         |                                                                                                                               |                                  |

|         |         |                                                                                                                      |                                         |
|---------|---------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------|
| CGM3874 | CGM3838 | <i>abf1Δ::FRT/pVS1 (pP<sub>MET3</sub>::Flag-ABF1)</i>                                                                | Hernandez-Hernandez et al, 2021         |
| CGM3842 | BG14    | BG14 / pVS1 (pP <sub>MET3</sub> :: <i>Flag-ABF1</i> . NAT)                                                           | Hernandez-Hernandez et al., 2021        |
| CGM3883 | BG14    | BG14 / pRM153 (pP <sub>MET3</sub> ::Flag)                                                                            | Hernandez-Hernandez et al., 2021        |
| CGM4279 | CGM3584 | <i>abfΔ::FRT /pCI12 (pP<sub>ABF1</sub>::ABF1::T<sub>ABF1</sub>) + pVS9 (pP<sub>MET3</sub>::Flag-ABF1. NAT) pSup1</i> | Vera Salazar., tesis de maestría., 2021 |
| CGM4280 | CGM3584 | <i>abfΔ::FRT/pCI12 (pP<sub>ABF1</sub>::ABF1::T<sub>ABF1</sub>) + pVS10 (pP<sub>MET3</sub>::Flag-ABF1. NAT) pSup2</i> | Vera Salazar., tesis de maestría., 2021 |
| CGM4284 | CGM4279 | <i>abf1Δ::FRT /pVS9 (pP<sub>MET3</sub>::Flag-ABF1. NAT)</i>                                                          | Vera Salazar., tesis de maestría., 2021 |
| CGM4287 | CGM4280 | <i>abf1Δ::FRT /pVS10 (pP<sub>MET3</sub>::Flag-ABF1. NAT)</i>                                                         | Vera Salazar., tesis de maestría., 2021 |
| CGM4375 | CGM3874 | CGM3585/pVS1(pP <sub>MET3</sub> ::Flag-ABF1. NAT) supresora 5                                                        | Vera Salazar., tesis de maestría., 2021 |
| CGM4379 | CGM4375 | <i>abf1Δ::FRT</i><br>Supresora 5 sin pvs1                                                                            | Vera Salazar., tesis de maestría., 2021 |

|                                                               |         |                                                                                |                                                   |
|---------------------------------------------------------------|---------|--------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------|
| CGM4380                                                       | CGM4375 | <i>abf1Δ::FRT</i><br>Supresora 5 sin pvs1 col 2                                | Vera Salazar.,<br>tesis de<br>maestría.,<br>2021  |
| <b>Cepas de sobreexpresión de <i>ABF1</i></b>                 |         |                                                                                |                                                   |
| CGM4378                                                       | CGM4113 | <i>abf1ΔFRT/pGE238 (pP<sub>MT1</sub>::Flag-<i>ABF1.URA3</i>)</i>               | Colección de<br>laboratorio                       |
| CGM4391                                                       | BG14    | BG14( pGE238) (pP <sub>MT1</sub> ::Flag- <i>ABF1.URA3</i> )                    | Colección de<br>laboratorio                       |
| CGM4393                                                       | BG14    | BG14( pGE208) (pP <sub>MT1</sub> . <i>URA3</i> )                               | Colección de<br>laboratorio                       |
| <b>Caracterización del promotor <i>MT-1</i> y <i>MET3</i></b> |         |                                                                                |                                                   |
| CGM473                                                        | BG14    | BG14/pMC18 (P <sub>CTA1</sub> ::GFP)                                           | Colección de<br>laboratorio                       |
| CGM518                                                        | BG14    | BG14/pGRB2.0(CEN/ARS)                                                          | Colección de<br>laboratorio                       |
| CGM2853                                                       | CGM531  | <i>mtl1Δ mtl2Δ mtl3Δ/ pVA80(pCU-<br/>pP<sub>MT1</sub>::GFP. URA3)</i>          | Vidal Aguilar.,<br>Tesis de<br>Maestría.,<br>2016 |
| CGM2858                                                       | CGM531  | <i>mtl1Δ mtl2Δ mtl3Δ/ pVA78<br/>(pP<sub>MET3</sub>::GFP::T<sub>HIS3</sub>)</i> | Colección de<br>laboratorio                       |
| CGM2951                                                       | CGM531  | CGM531/pVA98 (pCU P <sub>MT1</sub> )                                           | Vidal Aguilar.,<br>Tesis de<br>Maestría.,<br>2016 |
| GM4035                                                        | BG14    | BG14/pGRB2.3(pP <sub>PGK1</sub> ::GFP. <i>URA3</i> )                           | Colección de<br>laboratorio                       |

**Tabla S2 Plásmidos utilizados en este trabajo**

| Plásmido | Cepa <i>E. coli</i> | Genotipo relevante | Referencia |
|----------|---------------------|--------------------|------------|
|----------|---------------------|--------------------|------------|

|                                          |      |                                                                                                                                                                                                                      |                                               |
|------------------------------------------|------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------|
| pYC44                                    | 2944 | T <sub>CAT1</sub> ::FRT::NAT-CASETE::FRT vector<br>recipiente integrativo Fragmento de<br>325pb 3'UTR de CTA1 amplificado de<br>pOZ12 con #351/#465 clonado en<br>pYC40 con <i>BamHI/Bgl2</i>                        | Yañez-Carrillo et<br>al., 2015                |
| pVA98                                    | 4025 | pP <sub>MT-1.T<sub>HIS3</sub></sub> Fragmento de 947 pb del<br>promotor MT1 obtenido por digestion de<br>pRM136 con <i>XbaI/SacI</i> clonado en<br>pVA76 digerido con <i>XbaI/SacI</i>                               | colección del<br>laboratorio                  |
| PGRB2.3                                  | 1452 | yEGFP se clono en el vetor 2.2 bajo el<br>control del promotor pP <sub>PGK1</sub> ::yEGFP                                                                                                                            | Zordan et al., 2013                           |
| pMJ22                                    | 2650 | Vector recipiente replicativo Cassete<br>NATMx obtenido de pAP701 digerido<br>con <i>SacI</i> tratado con T4 DNA pol y<br>digerido con KpnI clonado en pAP379<br>digerido con PmlI KpnI                              | Yañez-Carrillo et<br>al., 2015                |
| pRM153                                   | 4163 | Vector recipiente etiqueta fkaglinker N<br>terminal Fragmento Flag-linker<br>(SpeI/EcoRI).(oligonucleotidos 2340 y<br>2341) clonado en pCN(SpeI/EcoRI)<br>NatR, AmpR, CgCEN/ARS) P <sub>MET3</sub> ::Flag-<br>linker | Colección del<br>laboratorio                  |
| pCI12                                    | 3370 | Vector replicativo URA+<br>(pP <sub>ABF1</sub> ::ABF1::TABF1)                                                                                                                                                        | Hernandez-<br>Hernandez et al<br>2021         |
| <b>Represión de la expresión de ABF1</b> |      |                                                                                                                                                                                                                      |                                               |
| pVS1                                     | 4379 | pP <sub>MET3</sub> ::Flag-ABF1.NAT Fragmento de<br>1.44 Kb ABF1 liberado de pGH5 con<br><i>ClaI</i> y clonado en pRM153 digerido con<br><i>ClaI</i>                                                                  | Vera-Salazar.,<br>Tesis de<br>maestría., 2021 |
| pVS9                                     | 4513 | psup1 plasmido recuperado por Smash<br>and grab 1 (pVS1)                                                                                                                                                             | Vera-Salazar.,<br>Tesis de<br>maestría., 2021 |

|                               |      |                                                                                                                                                                   |                                            |
|-------------------------------|------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------|
| pVS10                         | 4514 | pVSsup2 plasmido recuperado por Smash and grab 2 (pVS1)                                                                                                           | Vera-Salazar.,<br>Tesis de maestría., 2021 |
| pVS11                         | 4515 | pVSsup3 plasmido recuperado por Smash and grab 3 (pVS1)                                                                                                           | Vera-Salazar.,<br>Tesis de maestría., 2021 |
| <b>Sobreexpresion de ABF1</b> |      |                                                                                                                                                                   |                                            |
| pGH8                          | 4236 | pP <sub>MT-1</sub> ::Myc-ABF1. NAT Fragmento de ABF1 liberado de pGH5 clonado en pGH3 digerido con <i>ClaI</i>                                                    | Hernandez-Hernandez et al.,2021            |
| pGE238                        | 4456 | pP <sub>MT-1</sub> ::Flag-ABF1.URA3 Vector replicativo Fragmento de 2024 pb obtenido por digestion SpeI/KpnI de pVS1 y clonado en pVA98 digerido SpeI/KpnI        | colección del laboratorio                  |
| pGE208                        | 4422 | pP <sub>MT-1</sub> ::Flag Vector recipiente replicativo Fragmento de 941 ob obtenido por digestion XbaI/SacI de pRM136 clonado en pGE204 digerido con XbaI/SacI   | colección del laboratorio                  |
| <b>BIFC</b>                   |      |                                                                                                                                                                   |                                            |
| pRM142                        | 3887 | pP <sub>MT-1</sub> ::VCL.NAT promotor <i>MT1</i> obtenido por PCR clonado en pRM90 SacI/XbaI                                                                      | colección del laboratorio                  |
| pRM144                        | 3889 | pP <sub>MT-1</sub> ::VNL .NAT promotor <i>MT1</i> obtenido por PCR clonado en pRM101 SacI/XbaI                                                                    | colección del laboratorio                  |
| pRM165                        | 4204 | pP <sub>MT-1</sub> ::VCL .URA3 promotor <i>MT1</i> obtenido por PCR clonado en pRM103 SacI/XbaI                                                                   | colección del laboratorio                  |
| pGE194                        | 4388 | pP <sub>MT-1</sub> VC::TSA2 Fragmento obtenido por PCR de <i>TSA2</i> digerido con XbaI y parcialmente dogerido con <i>ClaI</i> cloado en pRM142 SpeI <i>ClaI</i> | colección del laboratorio                  |

|                                   |      |                                                                                                                                                                                        |                           |
|-----------------------------------|------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------|
| pGE236                            | 4454 | pP <sub>MT-1</sub> ::VN .URA3 fragmento de 1028 pb obtenido por digestión de pRM144 con <i>Xba</i> I/ <i>Kpn</i> I clonado en pVA98 <i>Xba</i> I/ <i>Kpn</i> I                         | colección del laboratorio |
| pGE244                            | 4462 | pP <sub>MT-1</sub> ::VN-TSA1.URA3 fragmento de 588pb obtenido por digestion de pGE133 con <i>Cl</i> aI/ <i>Xho</i> I clonado en pGE236 con <i>Cl</i> aI/ <i>Xho</i> I                  | colección del laboratorio |
| pGE248                            | 4466 | pP <sub>MT-1</sub> ::VC-TRR1 .NAT fragmento de 972pb obtenido por PCR 2410/2411 digerido con <i>Cl</i> aI/ <i>Xho</i> I y conado en pRM142 digerido con <i>Cl</i> aI/ <i>Xho</i> I     | colección del laboratorio |
| pVS12                             | 4581 | pP <sub>MT1</sub> ::VN::ABF1.URA3 Fragmento de ABF1 1.4Kb liberado de pGH5 con <i>Cl</i> aI y clonado en pGE236                                                                        | Este trabajo              |
| pVS15                             | 4584 | pP <sub>MT1</sub> ::VC::ABF1.NAT Fragmento de ABF1 1.4Kb de ABF1 liberado de pGH5 con <i>Cl</i> aI y clonado en pRM142                                                                 | Este trabajo              |
| pVS16                             | 4585 | pP <sub>MT1</sub> ::VN::ABF1.NAT Fragmento de ABF1 1.4Kb de ABF1 liberado de pGH5 con <i>Cl</i> aI y clonado en pRM144                                                                 | Este trabajo              |
| pVS20                             | 4600 | pP <sub>MT1</sub> ::VC::Abf1-43.URA3 Fragmento de abf1-43 1.3 Kb obtenido por PCR y clonado con <i>Bam</i> HI y <i>Cl</i> aI en pGE236                                                 | Este trabajo              |
| pVS23                             | 4899 | pP <sub>MT1</sub> ::VC::Abf1-43.NAT Fragmento de abf1-43 1.3 Kb obtenido por PCR y clonado con <i>Bam</i> HI y <i>Cl</i> aI en pGE144                                                  | Este trabajo              |
| <b>Complementacion heteróloga</b> |      |                                                                                                                                                                                        |                           |
| pVS40                             | 4578 | Fragmento de 1240 pb de P <sub>CgABF1</sub> amplificada con los oligos #3227/#3228, digerido con <i>Kpn</i> I/ <i>Xho</i> I y clonada en pMJ22 digerido con <i>Xho</i> I/ <i>Kpn</i> I | Este trabajo              |

|                                                     |      |                                                                                                                                                                                                           |              |
|-----------------------------------------------------|------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------|
| pVS41                                               | 4770 | Fragmento de 2199pb amplificado de S288c con los oligos 3173/3174 digerido con <i>XhoI</i> y <i>BamHI</i> y clonado en pVS41 digerido con <i>XhoI/BamHI</i>                                               | Este trabajo |
| PVS43                                               | 4774 | pP <sub>ABF1</sub> ::ScABF1::T <sub>ABF1</sub> Fragmento de 957pB obtenido por PCR con los oligos #3175Fw/ #3176Rv digerido con <i>BamHI/SacI</i> clonado en pVS41 digerido con <i>BamHI/SacI</i>         | Este trabajo |
| pVS45                                               | 4920 | Fragmento obtenido por PCR de pVS43 de la región P <sub>ABF1</sub> ::ScABF1 obtenido con <i>EagI/BamHI</i> de pVS43 clonado en pVS26 <i>EagI/BamHI</i>                                                    | este trabajo |
| <b>Expresión del promotor de ABF1</b>               |      |                                                                                                                                                                                                           |              |
| pVS38                                               | 4755 | pP <sub>ABF1</sub> ::GFP Fragmento de 1240pb de la región intergenica de ABF1 río arriba amplificado con #1589Fw/#3226Rv Digerido con <i>SacI/BamHI</i> clonado en pGRB2.3 Digerido con <i>SacI/BamHI</i> | Este trabajo |
| <b>Integración etiqueta flag en N-terminal ABF1</b> |      |                                                                                                                                                                                                           |              |
| pVS24                                               | 4629 | Fragmento de 1240 pb amplificado con 1589/2900 de BG14 digerido con <i>SacI SmaI</i> , clonado en pGE240 digerido con <i>SpeI</i> tratado con T4 pol y digerido con <i>SacI</i> .                         | Este trabajo |
| pVS26                                               | 4640 | Fragmento de 750pb del 3UTR de ABF1 obtenido de pCI9 con <i>XhoI/KpnI</i> clonado en pYC44 digerido con <i>XhoI/KpnI</i>                                                                                  | Este trabajo |

|                                          |      |                                                                                                                                                                                                                                                              |                              |
|------------------------------------------|------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------|
| PVS36                                    | 4685 | pP <sub>ABF1</sub> :: <i>FlagABF1</i> ::NATCassete<br>FRT::T <sub>ABF1</sub> ) integrativo Fragmento de<br>2842pb amplificado con #1589Fw<br>/#2899Rv a partir de pVS24 digerido con<br><i>SacI/BamHI</i> clonado en pVS26 digerido<br>con <i>SacI/BamHI</i> | Este trabajo                 |
| <b>Análisis del promotor <i>MT-1</i></b> |      |                                                                                                                                                                                                                                                              |                              |
| pVA80                                    | 3990 | pP <sub>MT-1</sub> ::GFP<br>Fragmento de 947 pb del promotor <i>MT1</i><br>obtenido por digestion de pRM136 con<br><i>XbaI/SacI</i> clonado en pGRB2.3 digerido<br>con <i>XbaI/SacI</i>                                                                      | colección del<br>laboratorio |

**Tabla S3 oligonucleótidos empleados en este trabajo**

| No                           | Secuencia 5'-3'             | Sitios<br>añadidos | Sitio de<br>hibridación  |
|------------------------------|-----------------------------|--------------------|--------------------------|
| <b>Oligos de diagnóstico</b> |                             |                    |                          |
| 14                           | ATATGTTGTGTGGAATTGTGAGCGGA  | Ninguno            | Diagnostic<br>primer     |
| 86                           | TAGTGAAGTAGTTAGTCCAATG      | Ninguno            | SIR4 INT @<br>144 Fw     |
| 87                           | CGTAGTATCCTGTTCAAGC         | Ninguno            | SIR4 INT<br>@464 Rv      |
| 106                          | TTTACCGTAAGTAGCATCACCTTCACC | Ninguno            | GFP@123 Rv               |
| 108                          | GACCTGGAAGGATGGCAGATAATC    | Ninguno            | SIR3 INT @<br>18 Fw      |
| 109                          | GGGCTTGAAGCTCCTTGTAGTAGTC   | Ninguno            | SIR3 INT<br>@323 Rv      |
| 466                          | CCAGTGTCCCGGGGGACGCCG       | Ninguno            | Nat-MX4 @40<br>Fw        |
| 467                          | CGCCTGCCGCTCGCCGTCCGA       | Ninguno            | Nat-MX4 @<br>606Rv       |
| 569                          | TACAAAGCTTGTTACCATCGGAAGC   | Ninguno            | NAT-FRT@-<br>551 Rv      |
| 1096                         | GCTTGCCTCGTCCCCG            | Ninguno            | NAT-FRT@-<br>391         |
| 1097                         | CATGTCGACCAGTACTGACA        | Ninguno            | NAT-<br>FRT@+11Sal<br>Fw |
| <b>Diagnóstico de ABF1</b>   |                             |                    |                          |

|                                                                    |                                                       |              |                             |
|--------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------|--------------|-----------------------------|
| 1835                                                               | CTCTGACTCCTCATCCTTAACC                                | Ninguno      | ABF1@<br>+1015 Rv           |
| 2577                                                               | CAGTCGCGTTGCCCTATTAT                                  | Ninguno      | ABF1@ 165<br>Fw             |
| 2578                                                               | TACTC GAGCTTGTGGTCGTG                                 | Ninguno      | ABF1@374Rv                  |
| 2579                                                               | CTCTGAACTTGGGCACATCA                                  | Ninguno      | ABF1 @796<br>Rv             |
| 2962                                                               | CAGCACCGGCTTTTGACTTC                                  | Ninguno      | ABF1@-612<br>Fw             |
| 2964                                                               | ATAGCCATTTCCGCCAGTCC                                  | Ninguno      | ABF1@-364<br>Fw             |
| 2968                                                               | CTGATCTAGGAGAATACGCTC                                 | Ninguno      | ABF1@<br>+190Fw             |
| 2970                                                               | CAACAAGGCACTAACAACAAGC                                | Ninguno      | ABF1@+587F<br>w             |
| 2971                                                               | TCACTGAGAGGCCCGAATTTT                                 | Ninguno      | ABF1 @ +695<br>Rv           |
| 3117                                                               | GCTGGAGAGCACAGAGCTGTTCTTTG                            | Ninguno      | ABF1@-1438<br>Fw            |
| <b>Complementation heteróloga</b>                                  |                                                       |              |                             |
| 1589                                                               | CTT <b>GAGCTC</b> GATTGTTGTGTAGGCAATATCATA<br>GC      | <i>SacI</i>  | ABF1@-1240                  |
| 2899                                                               | TCT <b>GGATCC</b> TATTGTCCTCTTAATTCAGGGTT<br>G        | <i>BamHI</i> | ABF1@1440<br>BamHI Rv       |
| 2900                                                               | CCT <b>CCCGGG</b> CGTTGTTTGTGTTCTCGTTGGCG             | <i>SmaI</i>  | ABF1@-<br>1SmaIRv           |
| 3173                                                               | CCT <b>CTCGAG</b> AAAATGGACAAATTAGTCGTGAAT<br>TATTATG | <i>XhoI</i>  | ScABF1@ 1<br>XhoI Fw        |
| 3174                                                               | CTT <b>GGATCC</b> CATTTGACCTCTTAATTCTGG               | <i>BamHI</i> | ScABF1@<br>2196 BamHI<br>Rv |
| 3175                                                               | CTC <b>GGATCC</b> ACTTAAATGCGTAGCTCCAATTAT<br>TAAAATG | <i>BamHI</i> | ABF1@+1<br>BamHI Fw         |
| 3176                                                               | CTT <b>GAGCTC</b> TCTTTTCGCCGCCAACTTAAGC              | <i>SacI</i>  | ABf1@+760<br>SacI Rv        |
| 3226                                                               | CCT <b>GGATCC</b> CGTTGTTTGTGTTCTCGTTGGCG             | <i>BamHI</i> | ABF1@+1<br>BamHI Rv         |
| 3227                                                               | CCT <b>CTCGAG</b> CGTTGTTTGTGTTCTCGTTGGCG             | <i>XhoI</i>  | ABF1@-<br>1XhoI Rv          |
| 3228                                                               | CTT <b>GGTACC</b> ATTGTTGTGTAGGCAATATCATAG<br>C       | <i>KpnI</i>  | ABF1@-1240<br>KpnI Fw       |
| 3432                                                               | CCGGACGACACCAATGACAAAG                                | None         | ScABF1@422<br>Fw            |
| 3433                                                               | GTGAGTGGGAGGAAATGTGC                                  | None         | ScABF1@888<br>Rv            |
| <b>Oligonucleótidos con sitios añadidos para plásmidos de ABF1</b> |                                                       |              |                             |
| 2273                                                               | TCTGGATCCAAAATGGATGACGGTATGATTCT<br>G                 | <i>BamHI</i> | ABF1@ 1<br>BamHI Rv         |
| 3038                                                               | GTT <b>ATCGA</b> TTTAGACTTCACGAGGAAGCTTGTC<br>GTC     | <i>Clal</i>  | ABF1 @1321<br>Rv Clal       |

