

IPICYT

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

POSGRADO EN CIENCIAS EN BIOLOGIA MOLECULAR

**“Generación de versiones etiquetadas de las proteínas
Ku70 y Ku80 de *Candida glabrata* para el estudio de su
localización a lo largo del telómero derecho del
cromosoma E.”**

Tesis que presenta

Luis Medina Sánchez

Para obtener el grado de

Maestro en Ciencias en Biología Molecular

Director de la Tesis:

Dra. Irene Castaño Navarro

San Luis Potosí, S.L.P., Julio de 2011



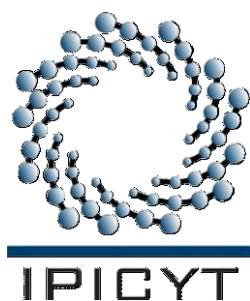
Constancia de aprobación de la tesis

La tesis "**Generación de versiones etiquetadas de las proteínas Ku70 y Ku80 de *Candida glabrata* para el estudio de su localización a lo largo del telómero derecho del cromosoma E**" presentada para obtener el Grado de de Maestro en Ciencias en Biología Molecular fue elaborada por **Luis Medina Sánchez** y aprobada el **15 de Julio de 2011** 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 Castaño Navarro
(Director de la tesis)

Dr. Ángel Gabriel Alpuche Solís
(Miembro del Comité Tutorial)

Dr. Sergio Casas Flores
(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 Castaño Navarro, apoyada por el proyecto No. CB-2005-48304.

Durante la realización del trabajo el autor recibió una beca académica del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (No. de registro 288402) y del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A. C.



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

Acta de Examen de Grado

El Secretario Académico del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C., certifica que en el Acta 086 del Libro Primero de Actas de Exámenes de Grado del Programa de Maestría en Ciencias en Biología Molecular está asentado lo siguiente:

En la ciudad de San Luis Potosí a los 11 días del mes de agosto del año 2011, se reunió a las 12:00 horas en las instalaciones del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C., el Jurado integrado por:

Dra. Irene Beatriz Castaño Navarro	Presidenta	IPICYT
Dr. Ángel Gabriel Alpuche Solís	Secretario	IPICYT
Dr. J. Sergio Casas Flores	Sinodal	IPICYT

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

MAESTRO EN CIENCIAS EN BIOLOGÍA MOLECULAR

sustentó el C.

Luis Medina Sánchez

sobre la Tesis intitulada:

Generación de versiones etiquetadas de las proteínas Ku70 y Ku80 de Candida glabrata para el estudio de su localización a lo largo del telómero derecho del cromosoma E.

que se desarrolló bajo la dirección de

Dra. Irene Beatriz Castaño Navarro


El Jurado, después de deliberar, determinó

APROBARLO

Dándose por terminado el acto a las 13:45 horas, procediendo a la firma del Acta los integrantes del Jurado. Dando fe el Secretario Académico del Instituto.

A petición del interesado y para los fines que al mismo convengan, se extiende el presente documento en la ciudad de San Luis Potosí, S.L.P., México, a los 11 días del mes de agosto de 2011.


Mtra. Ivonne Lizette Cuevas Vélez
Jefa del Departamento del Posgrado


Dr. Marcia Bonilla Marín
Secretario Académico



Dedicatorias

Para mis padres, Martha Sánchez y Juan Medina.

A mis hermanos, Laura y Juanma.

A mi familia.

Para mis amigos , a quienes he conocido en el camino.

A Berenice Vásquez.

“Los grandes trabajos no son hechos por la fuerza, sino por la perseverancia.”

-Samuel Johnson -

Agradecimientos

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

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología.

A la Dra. Irene Castaño por la excelente dirección en este trabajo. Por su constante ayuda, apoyo y por ser un ejemplo como investigadora.

Al Dr. Alejandro De las Peñas por su asesoría.

Al Dr. Ángel Alpuche y al Dr. Sergio Casas por sus aportaciones y discusión en este escrito.

A todos mis compañeros y amigos del laboratorio 6 de Microbiología Molecular, por estar siempre dispuestos a ofrecerme sus ideas y consejos día a día en el laboratorio, y por todos los momentos que convivimos fuera de éste.

Contenido

Constancia de aprobación de la tesis	ii
Créditos institucionales	iii
Acta de examen	iv
Dedicatorias	v
Agradecimientos	vi
Contenido	vii
Lista de tablas	ix
Lista de figuras	x
Abreviaturas	xi
Resumen	xii
Abstract	xiii
1. Resumen	3
2. Introducción	4
3. Resultados	
3.1 Construcción en plásmidos para generar fusiones traduccionales de las proteínas Ku70 y Ku80 con diferentes etiquetas en el extremo carboxilo-terminal.	6
3.2 Análisis de funcionalidad de las proteínas etiquetadas	
3.2.1 Las proteínas etiquetadas son funcionales para el silenciamiento en el telómero del cromosoma I-R.	8
3.2.2 Las versiones etiquetadas de las proteínas Ku son funcionales para el silenciamiento de las regiones subteloméricas de varios telómeros de <i>C. glabrata</i> .	
3.3 Inmunodetección de las proteínas etiquetadas (Ku70::FLAG, Ku70::c-Myc, Ku80::FLAG y Ku70::c-Myc)	10

3.4 Co-inmunoprecipitación de las proteínas Ku70 y Ku80 de <i>Candida glabrata</i> .	13
4. Discusión	15
5. Materiales y Métodos	21
6. Bibliografía	26
7. Datos suplementarios	
7.1 Tablas	29
7.2 Figuras suplementarias	39

Lista de tablas

1. Cepas utilizadas y generadas en este estudio.	29
2. Plásmidos utilizados y generadas en este estudio.	32
3. Oligonucleótidos utilizados en este estudio.	37

Lista de figuras

1a. Representación esquemática de las distintas fusiones traduccionales generadas con diversos epítomos.	7
1b. Eliminación del cassette de resistencia a higromicina e incorporación del terminador nativo.	7
2. Análisis de la funcionalidad de las proteínas Ku70 y Ku80 etiquetadas, mediante la expresión del gen reportero <i>URA3</i> en diferentes medios de crecimiento.	9
3. Ensayo de adherencia de cepas etiquetadas a células HeLa.	11
4. Inmunodetección por Western blot de las proteínas etiquetadas con los epítomos c-Myc y FLAG.	12
5. Co-inmunoprecipitación de las proteínas Ku70 y Ku80 de <i>Candida glabrata</i> .	14

Lista de figuras suplementarias

6. Alineamiento de aminoácidos de las proteínas Ku70 de <i>C. glabrata</i> y <i>S. cerevisiae</i> .	39
7. Alineamiento de aminoácidos de las proteínas Ku80 de <i>C. glabrata</i> y <i>S. cerevisiae</i> .	40

Abreviaturas (Por sus siglas en inglés)

CAA	<u>C</u> asaamino <u>A</u> acids
ChIP	<u>C</u> hromatin <u>I</u> mmuno <u>P</u> recipitation
CoIP	<u>C</u> o- <u>I</u> mmuno <u>P</u> recipitation
EPA	<u>E</u> pithelial <u>A</u> dhesin
FRT	<u>F</u> lp <u>R</u> ecombination <u>T</u> argets
GFP	<u>G</u> reen <u>F</u> luorescent <u>P</u> rotein.
HA	<u>H</u> emagglutinin protein
hph	hygromycin phosphotransferase
HRP	<u>H</u> orse <u>R</u> adish <u>P</u> eroxidase
IP	<u>I</u> mmuno <u>P</u> recipitation
ORF	<u>O</u> pen <u>R</u> eading <u>F</u> rame
PCR	<u>P</u> olymerase <u>C</u> hain <u>R</u> eaction
PGK1	3- <u>P</u> hospho <u>G</u> lycerate <u>K</u> inase
RAP1	<u>R</u> epressor/ <u>A</u> ctivator <u>P</u> rotein
SIR	<u>S</u> ilent <u>I</u> nformation <u>R</u> egulator
UTR	<u>U</u> ntranslated <u>R</u> egion
YPD	<u>Y</u> east extract- <u>P</u> eptone- <u>D</u> extrose
5-FOA	<u>5</u> <u>F</u> luoroorotic <u>A</u> cid

Resumen

“Generación de versiones etiquetadas de las proteínas Ku70 y Ku80 de *Candida glabrata* para el estudio de su localización a lo largo del telómero derecho del cromosoma E.”

Las principales proteínas de adhesión del patógeno oportunista *Candida glabrata*, están codificadas por la familia de genes *EPA*, los cuales se localizan principalmente en regiones subteloméricas. Estas zonas están sujetas a silenciamiento transcripcional. Varias proteínas participan en esta regulación como son las proteínas Sir, Rap1, Rif1, Ku70 y Ku80. Estudios realizados en nuestro laboratorio, han demostrado que las proteínas Ku no se requieren significativamente para el silenciamiento de la región subtelomérica del brazo derecho del cromosoma E, donde se encuentra el gen *EPA1*. Este resultado es novedoso porque es el primero en demostrar que un telómero no depende por completo de las proteínas Ku. Datos no publicados de nuestro laboratorio sugieren que a pesar de no ser necesarias para el silenciamiento, estas proteínas se unen al telómero y la región subtelomérica.

El objetivo de este trabajo es construir cepas de *C. glabrata* que contengan versiones etiquetadas funcionales de las proteínas Ku70 y Ku80 de esta levadura para posteriormente analizar primero, la posible interacción entre ellas y segundo la interacción *in situ* con el ADN a lo largo de la región subtelomérica del brazo derecho del cromosoma E mediante ensayos de inmunoprecipitación de la cromatina (ChIP).

PALABRAS CLAVE: *Candida glabrata*, adhesinas, heterodímero Ku, silenciamiento subtelomérico, epítomos.

Abstract

"Construction of tagged versions of Ku70 and Ku80 proteins in *Candida glabrata* to study its localization along the right telomere of chromosome E."

The majority of the cell adhesion proteins in the opportunistic fungal pathogen *Candida glabrata*, are encoded by the *EPA* family of adhesins, and are localized at subtelomeric regions. These regions are subject to chromatin-based subtelomeric silencing in which several proteins participate, such as the Sir proteins, Rap1, Rif1 and the yKu70 and yKu80 proteins. We have previously shown that silencing at the right telomere of chromosome E, where *EPA1* resides, does not require the Ku proteins. This result is surprising because this is the first example of Ku-independent silencing of a subtelomeric region. We also have data that suggests that the Ku proteins are probably bound to this telomere and the subtelomeric region, even though they are not required for subtelomeric silencing. In this work we constructed *C. glabrata* strains that contain tagged, functional versions of Ku70 and Ku80. We found that these proteins interact with each other. We will next determine whether there is interaction between these proteins and the DNA along the right telomere of chromosome E by chromatin immunoprecipitation experiments (ChIP).

KEYWORDS: *Candida glabrata*, adhesins, Ku heterodimer, subtelomeric silencing, epitopes.

1 **Generación de versiones etiquetadas de las proteínas Ku70 y Ku80 de**
2 ***Candida glabrata* para el estudio de su localización a lo largo del telómero**
3 **derecho del cromosoma E.**

4
5 **Luis Medina Sánchez, María G. Gutiérrez Escobar, Emmanuel Orta-Zavalza**
6 **Alejandro De Las Peñas e Irene Castaño*.**

7
8 IPICYT. Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica. Camino a la
9 Presa San José #2055 Lomas 4a sección. San Luis Potosí, SLP, México.

10
11 * Autor de correspondencia: icastano@ipicyt.edu.mx, Fax: (52) 444-834-2010

12
13 **Resumen**

14 Las principales proteínas de adhesión del patógeno oportunista *Candida glabrata*,
15 están codificadas por la familia de genes *EPA*, los cuales se localizan
16 principalmente en regiones subteloméricas, las cuales están sujetas a
17 silenciamiento transcripcional. Varias proteínas participan en esta regulación como
18 son las proteínas Sir, Rap1, Rif1, Ku70 y Ku80. Estudios realizados en nuestro
19 laboratorio, han demostrado que las proteínas Ku no se requieren
20 significativamente para el silenciamiento de la región subtelomérica del brazo
21 derecho del cromosoma E, donde se encuentra localizado el gen *EPA1*. Este
22 resultado es novedoso porque es el primero en demostrar que un telómero no
23 depende por completo de las proteínas Ku. Datos genéticos no publicados de
24 nuestro laboratorio sugieren que a pesar de no ser necesarias para el
25 silenciamiento, estas proteínas se unen al telómero y la región subtelomérica.

26 El objetivo de este trabajo es construir cepas de *C. glabrata* que contengan
27 versiones etiquetadas funcionales de las proteínas Ku70 y Ku80 de esta levadura,
28 para posteriormente analizar primero, la posible interacción entre ellas y la
29 interacción *in situ* con el ADN a lo largo de la región subtelomérica del brazo
30 derecho del cromosoma E mediante ensayos de inmunoprecipitación de la
31 cromatina (ChIP).

32 PALABRAS CLAVE: *Candida glabrata*, heterodímero Ku70/Ku80, silenciamiento
33 subtelomérico, epítomos.

34

35

36

37

38

39

40

41

42

43

44

45

46

47

48

49

50

51

52

53

54 **Introducción**

55 *Candida glabrata* es una levadura haploide, no dimórfica, la cual se identifica como
56 un hongo patógeno oportunista, que normalmente se encuentra como comensal
57 en las mucosas de individuos sanos, sin embargo, en individuos cuyo sistema
58 inmunológico se encuentra atenuado, puede invadir tejidos y causar
59 enfermedades.

60 Uno de varios factores de virulencia que se han identificado en este hongo, es la
61 capacidad que presenta para adherirse con avidéz a células epiteliales de
62 mamíferos *in vitro*. Esta interacción *in vitro* depende de la adhesina Epa1
63 codificada por el gen *EPA1* (Comarck *et al.*, 1999).

64

65 Actualmente se sabe que el genoma de *C. glabrata* contiene más de 20 genes
66 parálogos a *EPA1* (según la cepa), algunos de los cuales se ha demostrado que
67 codifican también para adhesinas funcionales (De Las Penas *et al.*, 2003; Castano
68 *et al.*, 2005). Un aspecto interesante al respecto, es que la mayoría de estos
69 genes se encuentran localizados en regiones subteloméricas de los cromosomas y
70 éstos se encuentran regulados de manera negativa mediante un sistema de
71 silenciamiento conocido como TPE (de sus siglas en Inglés, Telomere Position
72 Effect) (Ottaviani *et al.*, 2008). En este silenciamiento subtelomérico se sabe que
73 participan una serie de proteínas tales como Sir2, Sir3, Sir4, Rap1, Ku70, Ku80 y
74 Rif1. Estas proteínas se identificaron primero en *S. cerevisiae* (Rusche *et al.*,
75 2003; Blander y Guarente, 2004), la cual es una levadura estrechamente
76 relacionada filogenéticamente con *Candida glabrata* (Dujon *et al.*, 2004).

77 En *C. glabrata* también se ha descrito que estas proteínas participan en el
78 silenciamiento subtelomérico, aunque existen algunas diferencias. Por ejemplo
79 Rif1 tiene un papel positivo en el silenciamiento subtelomérico en *C. glabrata*,
80 mientras que en *S. cerevisiae* tiene una función negativa (Hardy *et al.*, 1992;
81 Wotton y Shore, 1997; Hediger *et al.*, 2002; Castano *et al.*, 2005).

82

83 Las proteínas Ku70 y Ku80 juegan un papel importante como reguladores
84 positivos del silenciamiento subtelomérico en *C. glabrata*. Probablemente el

85 mecanismo del silenciamiento sea similar al descrito para las proteínas ortólogas
86 en *S. cerevisiae*, donde Ku70 y Ku80 se unen a los extremos del telómero y
87 favorecen la interacción entre Sir3/Sir4 con la proteína Rap1. Sin embargo,
88 mediante estudios realizados en nuestro laboratorio, se encontró que en el
89 telómero del cromosoma E en donde se encuentran los genes *EPA1*, *EPA2* y
90 *EPA3*, las proteínas Ku70/Ku80 no son tan importantes para el silenciamiento de
91 estas regiones (Rosas-Hernández *et al.*, 2008). Estos experimentos se realizaron
92 analizando la expresión de un gen reportero *URA3* insertado en varias posiciones
93 a lo largo de la región subtelomérica y por RT-PCR de los genes *EPA1*, *EPA2* y
94 *EPA3*. Este resultado es novedoso ya que es el primero en donde se observa que
95 un telómero no depende completamente de la actividad de Ku70/Ku80. Datos de
96 nuestro laboratorio indican que estas proteínas probablemente se unen a este
97 telómero, pero no se requieren para el silenciamiento, posiblemente porque este
98 telómero posee un elemento en *cis* entre el gen *EPA3* y el telómero, el cual tiene
99 actividad de proto-silenciador (A. Juárez-Reyes *et al.*, manuscrito sometido).

100

101 El objetivo de esta tesis es construir cepas de *C. glabrata* que contengan
102 versiones etiquetadas y funcionales de cada una de las proteínas Ku. Inicialmente
103 demostramos que las versiones etiquetadas son funcionales respecto a la
104 capacidad de mediar silenciamiento de varios genes *EPA* localizados en varios
105 telómeros, y también respecto a la capacidad para silenciar un gen reportero
106 insertado cerca del telómero derecho del cromosoma I.

107 Además, determinamos por ensayos de co-inmunoprecipitación que en *C.*
108 *glabrata*, al igual que en *S. cerevisiae*, las proteínas Ku70 y Ku80 interaccionan
109 físicamente.

110 Posteriormente se analizará si existe interacción de estas proteínas con el ADN en
111 diferentes regiones a largo de la región subtelomérica del brazo derecho del
112 cromosoma E de *Candida glabrata* por medio de ensayos de inmunoprecipitación
113 de la cromatina (ChIP).

114

115

116 **Resultados**

117

118 *Construcciones para generar fusiones traduccionales de las proteínas Ku70 y*
119 *Ku80 con diferentes etiquetas en el extremo carboxilo-terminal.*

120

121 Para realizar las versiones etiquetadas, la región carboxilo-terminal del ORF de los
122 genes *HDF1* y *HDF2* (genes que codifican para las proteínas Ku70 y Ku80
123 respectivamente) y la región 3' no traducida (3' UTR) de cada uno de los genes se
124 subclonaron en sitios específicos, en los plásmidos integrativos que contienen los
125 distintos epítomos (ver Materiales y Métodos). En total, realizamos fusiones de
126 cada uno de los extremos 3' de los genes que codifican para las proteínas Ku70 y
127 Ku80 de *Candida glabrata*, cada una con distintos epítomos (HA, FLAG, GFP y c-
128 Myc) respectivamente (un total de 7 construcciones) (Fig. 1A).

129 Posteriormente, los vectores se digirieron en sitios específicos para dejar extremos
130 homólogos al genoma de *C. glabrata* y favorecer la doble recombinación
131 homóloga. La integración de los plásmidos en el cromosoma de *C. glabrata*, se
132 realizó en un paso por doble recombinación homóloga, seleccionando las colonias
133 transformantes resistentes a higromicina que es la resistencia que confiere el
134 cassette *hph* insertado río abajo de la fusión traduccional. Posteriormente, el
135 reemplazo correcto se comprobó por PCR, utilizando parejas de oligonucleótidos
136 específicos, uno de los cuales hibrida dentro de la construcción, y el otro en las
137 regiones endógenas de *HDF1* y *HDF2* pero que no se encuentran presentes en el
138 plásmido (Fig. 1B)

139

140 *Análisis de funcionalidad de las proteínas etiquetadas*

141

142 Realizamos dos ensayos: el primero determina si las proteínas Ku70 y Ku80
143 etiquetadas son funcionales para silenciar el gen reportero *URA3* cerca del
144 telómero I_R. El segundo ensayo determina si las proteínas etiquetadas son
145 funcionales para establecer el silenciamiento de varias adhesinas localizadas en
146 varios telómeros de *C. glabrata*.

147 **Figura 1.**

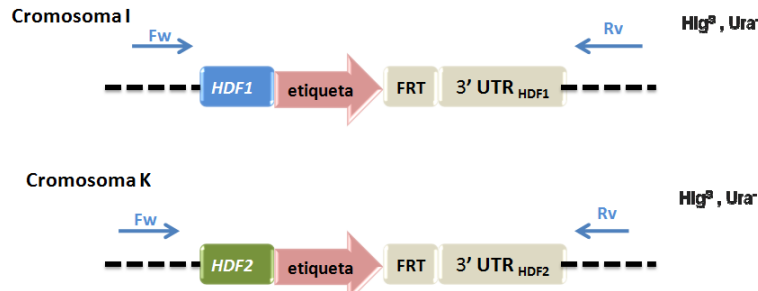
148 **A**



149

150

151 **B**



152

153

- 154 A) Representación esquemática de las distintas fusiones traduccionales generadas con
155 diversos epítomos. El extremo terminal del ORF sin codón de paro, tanto de *HDF1* y *HDF2*
156 (genes que codifican para las proteínas Ku70 y Ku80), y sus respectivos terminadores
157 (3'UTR), fueron subclonados en sitios específicos en los distintos vectores que contienen
158 cada epítipo (HA, FLAG, GFP y c-Myc).
- 159 B) Eliminación del cassette de resistencia a higromicina e incorporación del terminador
160 nativo. Las cepas con las proteínas etiquetadas de Ku70 y Ku80 se transformaron con el
161 vector pMZ18, que codifica para la recombinasa FLP1p de *S. cerevisiae*. Tras la inducción
162 de la expresión de FLP1 con medio fresco (YPD) en fase logarítmica, se escindió el
163 cassette de resistencia al antibiótico higromicina y la cepa que resulta tiene el terminador
164 nativo del gen inmediatamente después de la etiqueta y el sitio de recombinación FRT de
165 35 pb. Además se muestra la ubicación de los oligonucleótidos para comprobar la
166 eliminación del cassette de resistencia.

167

168

169

170 1) *Las proteínas etiquetadas son funcionales para el silenciamiento en el telómero*
171 *del cromosoma I-R*

172

173 Se realizó un ensayo de funcionalidad de las proteínas etiquetadas por medio de
174 la introducción de estas construcciones en cepas que contienen el gen reportero
175 *URA3* en la región subtelomérica del telómero derecho del cromosoma I, el cual
176 depende totalmente de las proteínas Ku70 y Ku80 para mantener el silenciamiento
177 (Rosas-Hernández *et al.*, 2008). Para ello, se analizó la expresión/silenciamiento
178 del gen reportero *URA3* mediante ensayos de crecimiento en cajas con distintos
179 medios. Si las proteínas etiquetadas son funcionales, se espera que el gen
180 reportero *URA3* se mantenga silenciado y las células puedan crecer en medio con
181 5-FOA. Por el contrario, si las fusiones no son funcionales, habrá expresión de
182 *URA3* y las células no podrán crecer en este medio.

183 Casi todas las cepas que contienen las fusiones analizadas (Ku70::HA,
184 Ku70::FLAG, Ku70::GFP, Ku80::HA, Ku80::FLAG y Ku80::c-Myc) excepto la cepa
185 con la fusión Ku70::c-Myc, se comportan como la cepa parental en el medio 5-
186 FOA. Estos datos nos indican que la mayoría de las fusiones son funcionales y no
187 alteran la actividad de las proteínas medidas por este ensayo, lo que reporta la
188 capacidad de las proteínas Ku etiquetadas para silenciar el gen reportero *URA3*
189 insertado en la región subtelomérica del lado derecho del cromosoma I. Por otra
190 parte, la fusión Ku70::c-Myc claramente perdió su actividad (Fig. 2).

191

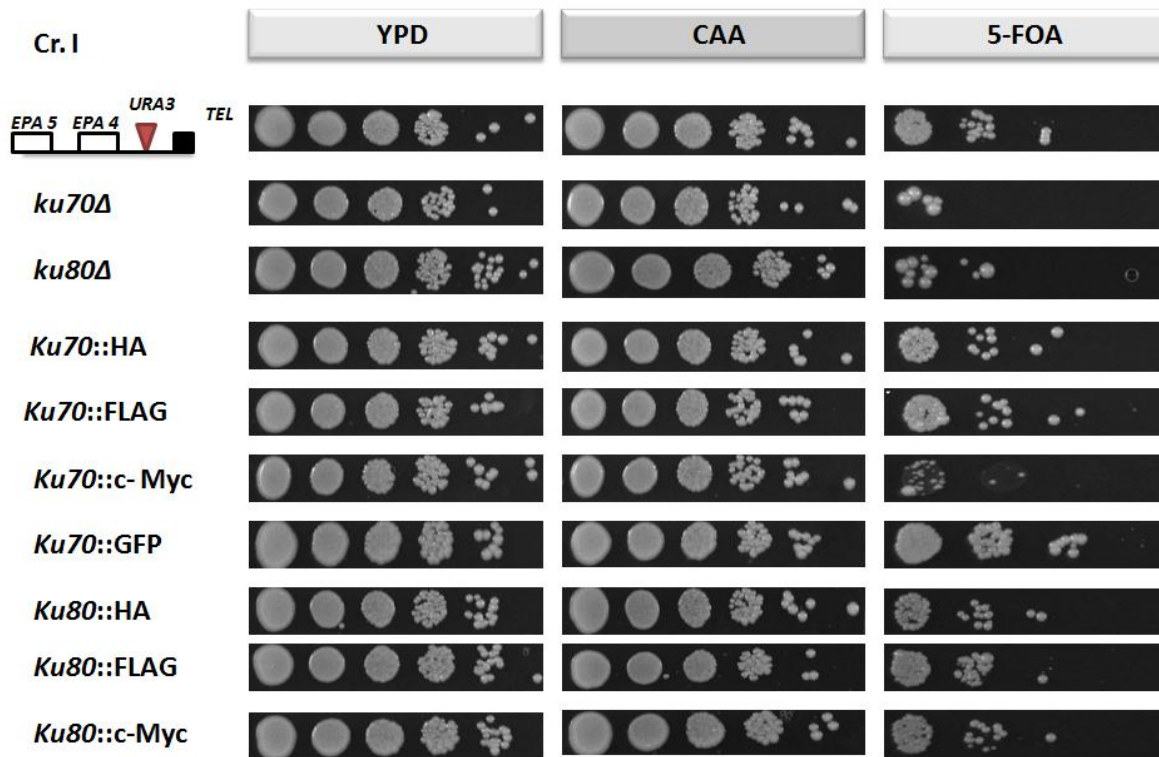
192 2) *Las versiones etiquetadas de las proteínas Ku son funcionales para el*
193 *silenciamiento de las regiones subteloméricas de varios telómeros de C. glabrata.*

194

195 Realizamos un ensayo cualitativo de adherencia *in vitro* de cultivos de *C.glabrata*
196 en fase estacionaria a células HeLa. En estas condiciones, *C. glabrata* no expresa
197 los genes *EPA* (en particular *EPA1*, *EPA6* y *EPA7* que codifican para las
198 adhesinas más importantes *in vitro*) ya que se encuentran silenciados y por lo
199 tanto, las células no presentan la capacidad de adherencia a células epiteliales en
200 cultivo. Cualquier mutación en las proteínas que participan en el silenciamiento

201 **Figura 2.**

202



203

204

205 Análisis de la funcionalidad de las proteínas Ku70 y Ku80 etiquetadas, mediante la expresión del
206 gen reportero *URA3* en diferentes medios de crecimiento.

207 En YPD, se aprecia la cuenta viable; en CAA (sin uracilo, -URA) se observa la población de células
208 que expresan *URA3*, y en medio 5-FOA, se presentan aquellas células que no expresan *URA3*. La
209 primera fila corresponde a la cepa parental con la inserción del gen reportero que está silenciado,
210 mientras que en las mutaciones *ku70Δ* y *ku80Δ*, el gen reportero se expresa y las células no
211 pueden formar colonias en presencia de 5-FOA. El triángulo rojo invertido representa la inserción
212 del gen reportero en el cromosoma.

213

214

215

216

217

218

219

220 subtelmérico, elimina este efecto y promueve la expresión de genes
221 subtelméricos (Ottaviani *et al.*, 2007).

222 Por lo tanto, si las células de las cepas que contienen las diferentes versiones
223 etiquetadas de las proteínas Ku, crecidas hasta la fase estacionaria muestran un
224 fenotipo de hiperadherencia, indicaría que las fusiones no son funcionales, debido
225 a que el silenciamiento subtelmérico se eliminaría, y este fenómeno permitiría la
226 expresión de los genes *EPA*. Para estos ensayos, se incluyó un control de una
227 cepa no adherente (cepa silvestre en fase estacionaria) y dos controles de cepas
228 hiperadherentes (cepas *hdf1Δ* y *hdf2Δ*), las cuales expresan genes *EPA*.

229 El cultivo de la cepa silvestre (CGM1) presentó muy pocas células adheridas a las
230 células HeLa. Por el contrario, las cepas hiperadherentes *hdf1Δ* y *hdf2Δ*, muestran
231 un notable aumento en el número de levaduras adheridas a las células HeLa. Las
232 cepas Ku70::HA, Ku70::FLAG, Ku70::GFP, Ku80::HA y Ku80::FLAG se comportan
233 como la cepa silvestre, es decir, no adherente lo cual sugiere que estas fusiones
234 son funcionales respecto al silenciamiento de varios telómeros de *C. glabrata* (Fig.
235 3). Las cepas Ku70::c-Myc y Ku80::c-Myc no se han probado en este ensayo.

236

237 *Inmunodetección de las proteínas etiquetadas (Ku70::FLAG, Ku70::c-Myc,*
238 *Ku80::FLAG y Ku70::c-Myc)*

239

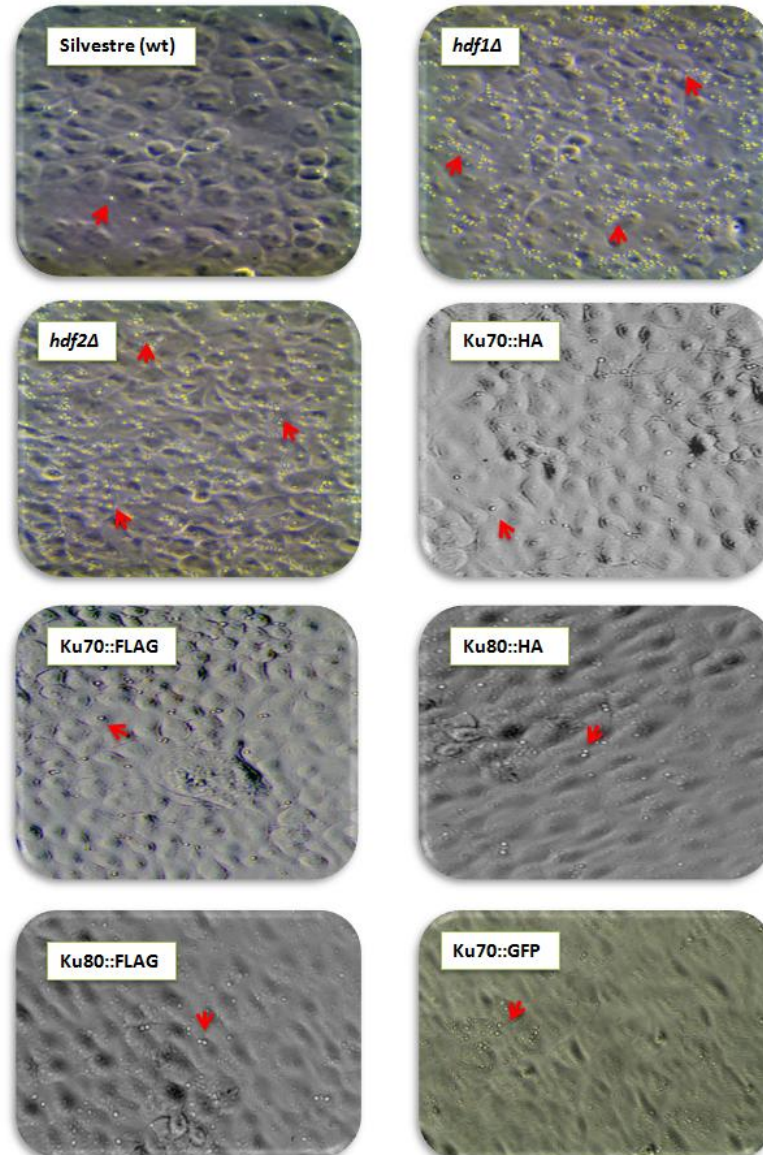
240 Con el propósito de determinar si las fusiones analizadas pueden ser
241 inmunodetectadas, realizamos varios ensayos independientes de Western blot,
242 utilizando los anticuerpos (anti-FLAG y anti-c-Myc) y se utilizó un anticuerpo
243 secundario policlonal unido a la peroxidasa de rábano HRP (Anti-mouse IgG-
244 HRP). Posteriormente, el ensayo se reveló mediante una reacción de
245 quimioluminiscencia. Se inmunodetectó a las proteínas Ku70::FLAG, Ku70::c-Myc,
246 Ku80::FLAG y Ku70::c-Myc, en cepas sencillas con una sola proteína etiquetada;
247 así como en cepas con las proteínas Ku70 y Ku80 marcadas con distintos
248 epítomos (ejemplo, Ku70::FLAG / Ku80::c-Myc) (Fig. 4). Las fusiones con los
249 epítomos GFP y HA, no nos fue posible detectarlas por Western blot.

250

251 **Figura 3.**

252

253



254

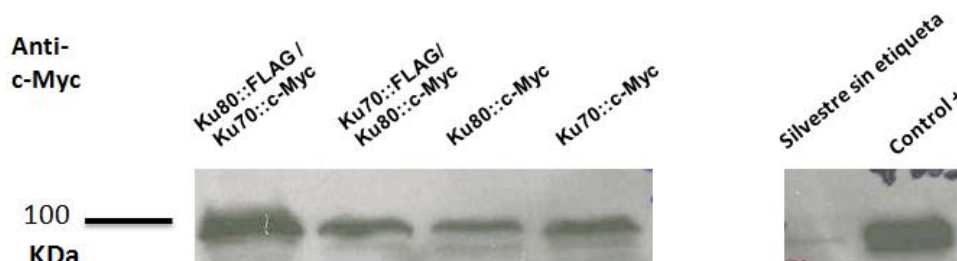
255 Ensayo de adherencia de cepas portadoras de las proteínas Ku70 y Ku80 etiquetadas a células
256 HeLa. En la figura se muestra el control de baja adherencia, cepa silvestre (wt) y de
257 hiperadherencia *hdf1Δ* y *hdf2Δ*, así como cepas de Ku70 y Ku80 etiquetadas con distintos epítomos
258 (FLAG, HA y GFP). Las células de *C. glabrata* se observan como pequeños puntos refringentes
259 sobre el césped de células HeLa. Las flechas señalan la localización de algunas células de *C.*
260 *glabrata* adheridas.

261

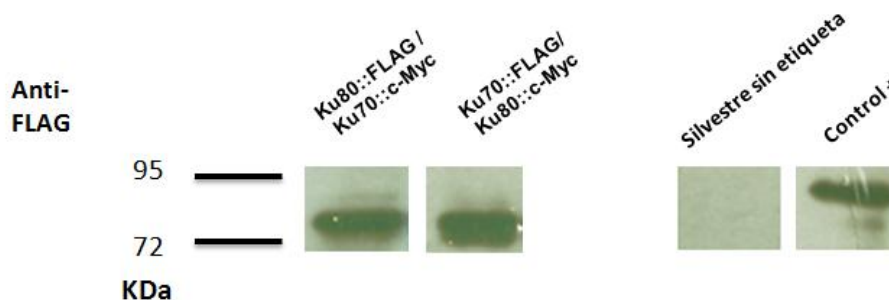
262 **Figura 4.**

263

A



B



264

265 Inmunodetección por Western blot de las proteínas Ku70 y Ku80 etiquetadas con los epítomos c-
266 Myc y FLAG.

267 En los incisos A y B, se muestran dos experimentos independientes. A) El Western blot se realizó
268 con anticuerpo anti-c-Myc, y se muestra la detección de las proteínas Ku70::c-Myc y Ku80::c-Myc
269 (pesos moleculares de 93 y 92 kDa. respectivamente), en cepas con proteínas marcadas con dos
270 epítomos distintos (Ku80::FLAG / Ku70::c-Myc y Ku70::FLAG / Ku80::c-Myc) y en cepas sencillas
271 (Ku80::c-Myc y Ku70::c-Myc). B) El Western blot se realizó con anticuerpo anti-FLAG, y se muestra
272 la detección de las proteínas Ku70::FLAG y Ku80::FLAG (pesos moleculares de 74 y 72 kDa.
273 respectivamente) en cepas con proteínas marcadas con dos epítomos. Como controles se
274 incluyeron a la cepa silvestre CGM1 (cepa no etiquetada) y a una cepa utilizada como control
275 positivo (Sum1::c-Myc/Hst1::FLAG) con pesos moleculares de 97 kDa y 93 kDa respectivamente.
276 Las muestras se analizaron en geles de poliacrilamida SDS-Page al 12% (anti- c-Myc) (A) y al 7%
277 (anti-FLAG) (B).

278

279 *Co-inmunoprecipitación de las proteínas Ku70 y Ku80 de Candida glabrata*

280

281 Para investigar si las proteínas Ku70 y Ku80 de *C. glabrata* interaccionan entre sí,
282 como sucede en *S. cerevisiae*, realizamos ensayos de co-inmunoprecipitación
283 (Co-IP). Para realizar estos ensayos, se extrajeron extractos de proteína celular de
284 cepas que contienen las proteínas Ku70 y Ku80 marcadas con distintos epítomos
285 (ejemplo, cepa Ku70::FLAG/ Ku80::c-Myc y viceversa). También se obtuvo un
286 extracto de la cepa silvestre (wt) que tiene las versiones de Ku70 y Ku80 no
287 etiquetadas. Para la precipitación se utilizaron perlas cubiertas con el anticuerpo
288 anti- c-Myc inmovilizado. Posteriormente, se utilizó el anticuerpo primario anti-
289 FLAG y un anticuerpo secundario policlonal unido a HRP (Anti-mouse IgG-HRP)
290 para confirmar la co-inmunoprecipitación por Western blot.

291 La figura 5 muestra el resultado obtenido en estos ensayos en donde se
292 demuestra que las proteínas Ku70 y Ku80 de *Candida glabrata* interaccionan entre
293 sí.

294

295

296

297

298

299

300

301

302

303

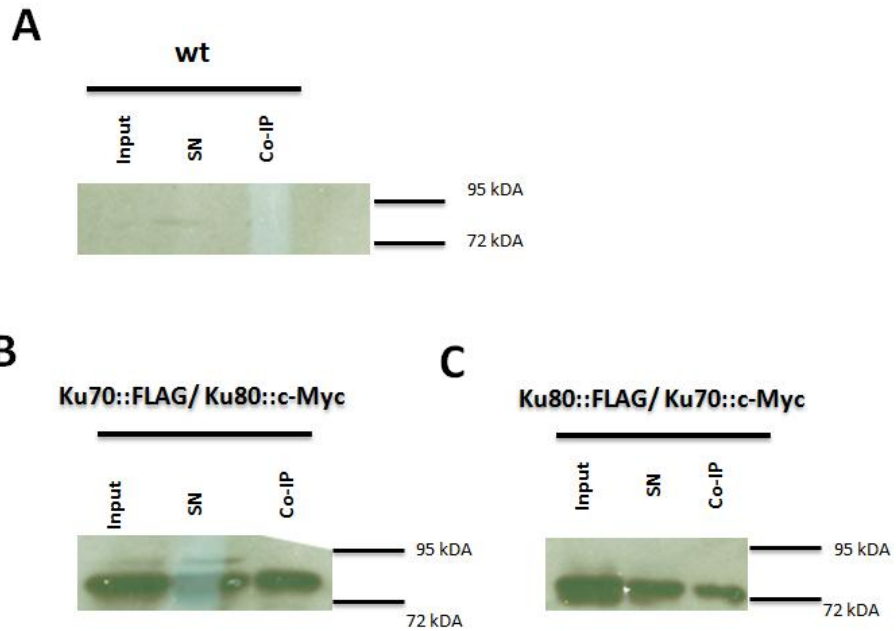
304

305

306 **Figura 5.**

307

IP: anti-c-Myc
Western: anti-Flag



308

309 Co-immunoprecipitación de las proteínas Ku70 y Ku80 de *Candida glabrata*. Para realizar este
310 ensayo se inmunoprecipitó con perlas de agarosa acopladas con el anticuerpo anti-c-Myc.
311 Posteriormente utilizamos el anticuerpo anti-FLAG para confirmar la co-immunoprecipitación por
312 Western blot. A) La cepa silvestre (wt). B) Cepa que contiene las proteínas Ku70 y Ku80 marcadas
313 con distintos epítomos (Ku70::FLAG/ Ku80::c-Myc). C) Cepa que contiene las proteínas Ku70 y
314 Ku80 marcadas con distintos epítomos (Ku80::FLAG/ Ku70::c-Myc). Input= extracto proteico total,
315 SN= sobrenadante, Co-IP= co-immunoprecipitación. Tamaños esperados de las proteínas
316 etiquetadas con el epítomo FLAG. Ku70::FLAG = 74 kDA, Ku80::FLAG = 73 kDA.

317

318

319

320

321 **DISCUSIÓN**

322

323 En el patógeno oportunista *Candida glabrata*, las proteínas de adhesión son
324 codificadas por una familia de genes (*EPA*), que se localizan principalmente en las
325 regiones subteloméricas. Estas zonas se encuentran sujetas a silenciamiento
326 transcripcional mediado por varias proteínas, entre las que se encuentran las
327 proteínas Ku70 y Ku80.

328

329 *Las proteínas de fusión Ku70::HA, Ku70::FLAG, Ku70::GFP, Ku80::HA,*
330 *Ku80::FLAG y Ku80::c-Myc son funcionales para el silenciamiento del gen*
331 *reportero URA3 insertado en telómero I_R.*

332

333 Realizamos un ensayo de funcionalidad de las proteínas etiquetadas con el
334 propósito de determinar si la adición de epítopos a nuestras proteínas de interés
335 compromería la funcionalidad de éstas determinando el grado de silenciamiento
336 del gen reportero *URA3* insertado a 900 pb. del telómero derecho del cromosoma
337 I, el cual depende totalmente de las proteínas Ku para el silenciamiento.
338 Normalmente *URA3* insertado en este telómero se encuentra reprimido por la
339 maquinaria del silenciamiento subtelomérico, mientras que en una cepa mutante
340 en cualquier gen que codifica para las proteínas del silenciamiento, resulta en
341 expresión del gen reportero (Rosas-Hernández *et al.*, 2008). Los resultados
342 muestran que todas las fusiones analizadas son funcionales excepto Ku70::c-Myc
343 cuando se analizan para la capacidad de silenciar el reportero *URA3* insertado a
344 900 pb del telómero derecho del cromosoma I.

345 Por otra parte, la fusión Ku70::c-Myc claramente perdió su actividad; esta pérdida
346 de función pudiese deberse a dos motivos:

347

348 1.- La agregación de la etiqueta no permite que la proteína se pliegue a su
349 conformación activa.

350 2.- La agregación de la etiqueta pudiese interferir para que la proteína Ku70 no
351 interactúe con las proteínas involucradas en el silenciamiento subtelomérico,
352 afectando ese fenómeno.

353

354 Sin embargo, la etiqueta si se puede detectar por Western blot como se muestra
355 en las Figs. 4 y 5.

356 Por otra parte, una posible explicación al hecho de que la fusión Ku80::c-Myc, no
357 perdió su funcionalidad a diferencia de Ku70::c-myc, es la siguiente: A pesar de
358 que ambas fusiones comparten el mismo epítipo (100 pares de bases de
359 longitud), posiblemente este epítipo pudo haberse plegado de una manera distinta
360 en la fusión Ku80:c-Myc para quedar finalmente en una orientación la cual no
361 comprometió su funcionalidad, a diferencia de la fusión Ku70:c.Myc.

362

363 *Las proteínas de fusión Ku70::HA, Ku70::FLAG, Ku70::GFP, Ku80::HA,*
364 *Ku80::FLAG y Ku80::c-Myc son funcionales para el silenciamiento de varios*
365 *telómeros determinado a través de ensayos de adherencia a células HeLa.*

366

367 En un segundo ensayo con un enfoque distinto al anterior evaluamos la
368 funcionalidad de las proteínas etiquetadas. Evaluando la capacidad de adherencia
369 *in vitro* a células HeLa de cultivos de cepas en fase estacionaria que contienen las
370 distintas proteínas etiquetadas. Es necesario destacar que cualquier mutación en
371 las proteínas del complejo Sir, elimina el silenciamiento subtelomérico y promueve
372 la expresión de varios genes subteloméricos (Gottschling, 1992) entre los cuales
373 se encuentran la mayoría de los miembros de la familia *EPA*.

374 *C. glabrata* es capaz de adherirse a células epiteliales *in vitro*, y se adhiere
375 principalmente a través de Epa1 (Cormack *et al.*, 1999). La cepa silvestre de *C.*
376 *glabrata* no es adherente en fase estacionaria porque no se expresan las
377 principales adhesinas Epa1, Epa6 y Epa7 (De las Peñas *et al.*, 2003; Castano *et*
378 *al.*, 2005). Si un cultivo de células de *C. glabrata* etiquetadas con los distintos
379 epítopos en fase estacionaria muestra un fenotipo de hiperadherencia, indicaría

380 que las fusiones no son funcionales, debido a que el silenciamiento subtelomérico
381 se eliminaría, y este fenómeno permitiría la expresión de los genes.

382 Los experimentos muestran que las cepas Ku70::HA, Ku70::FLAG, Ku70::GFP,
383 Ku80:: HA, Ku80::FLAG y Ku80::c-Myc se comportan como la cepa silvestre
384 (CGM1) no adherente lo cual sugiere que estas fusiones son funcionales para
385 inducir silenciamiento en varios telómeros de *C. glabrata*. Aun nos falta evaluar la
386 cepa que contiene la fusión Ku70:: c-Myc por medio del ensayo de adherencia a
387 células HeLa, , lo cual en caso de dar un fenotipo hiperadherente nos confirmaría
388 los resultados del ensayo de silenciamiento con el gen reportero *URA3*.

389

390 *Detección de las proteínas etiquetadas con los distintos epítomos por análisis de*
391 *Western blot.*

392

393 La utilización de proteínas etiquetadas es un método de ADN recombinante para
394 hacer un producto génico inmunoreactivo mediante la utilización de un anticuerpo
395 específico. Con el propósito de determinar si las proteínas fusionadas generadas
396 en este trabajo se pueden inmunodetectar, realizamos ensayos de Western blot.
397 Mediante esta técnica logramos detectar a las siguientes proteínas: Ku70-FLAG
398 (74 kDa), Ku70-c-Myc (93 kDa), Ku80-FLAG (74 kDa) y Ku80-c-Myc (92 kDa).

399 Los vectores utilizados en este trabajo fueron diseñados para que el epítomo se
400 añadiera al extremo c-terminal con el propósito de asegurar que sólo las proteínas
401 quiméricas completamente sintetizadas sean las que se detecten para nuestros
402 fines. Se ha demostrado que las regiones terminales parecen ser favorables para
403 el etiquetado, debido a que aumentan la probabilidad de que el epítomo se
404 encuentre en el exterior del polipéptido plegado sin comprometer la función; sin
405 embargo muchas proteínas tienen una función crítica en su secuencia terminal
406 (Jarvik y Telmer, 1998). Además, las regiones hidrofóbicas de las proteínas, como
407 los dominios transmembranales o los núcleos hidrofóbicos, no son un buen lugar
408 para etiquetar, al igual que aquellas regiones altamente conservadas, porque
409 probablemente son sensibles a alteraciones en la secuencia primaria.

410 Los resultados por Western blot son alentadores debido a que es posible realizar
411 futuros experimentos de inmunoprecipitación de la cromatina (ChIP) para
412 determinar los sitios de interacción del heterodímero Ku con el DNA en el brazo
413 derecho del cromosoma E de *C. glabrata glabrata* (y en cualquier otra región
414 subtelomérica). Utilizando las versiones fusionadas de Ku70 y Ku80, y con
415 experimentos de ChIP, nos permitirán determinar si las proteínas Ku interaccionan
416 con el ADN a lo largo del brazo derecho del cromosoma E en regiones
417 particulares. Esto sería interesante porque en este telómero, se ha demostrado
418 que el heterodímero Ku70/Ku80 no se requiere de manera importante en el
419 silenciamiento de estas regiones (Rosas-Hernández *et al.*, 2008); sin embargo,
420 datos generados de nuestro laboratorio (A. Juárez-Reyes *et al.*, sometido; V.
421 Gallegos *et al.*, datos no publicados) sugieren que las proteínas Ku sí se unen a
422 ciertas regiones intergénicas en este telómero. Por otro lado, se ha identificado un
423 elemento en cis localizado al 5' de *EPA3* que cumple funciones sobrelapadas con
424 las proteínas Ku. Además existe otra región intergénica entre *EPA1* y *EPA2* cuya
425 función requiere de las proteínas Ku. Por esta razón es interesante determinar
426 el/los sitios de interacción de estas proteínas con el ADN a lo largo del brazo
427 derecho del cromosoma E. Adicionalmente, con las proteínas de fusión
428 construidas en este trabajo, podremos determinar si las proteínas Ku se unen a
429 otros telómeros o cualquier otras regiones del genoma de *C. glabrata*.

430

431 *Las proteínas Ku70 y Ku80 interaccionan entre sí en C. glabrata*

432

433 Ku es un complejo proteico presente desde bacterias hasta mamíferos (Downs y
434 Jackson, 2004). Este complejo está formado por las subunidades Ku70 y Ku80. De
435 manera notable, la familia de proteínas Ku muestra un bajo grado de similitud con
436 respecto a la secuencia de aminoácidos entre todos sus miembros, pero el
437 reconocimiento de ortólogos se facilita por la identificación de dominios y motivos
438 estructurales conservados (Gell y Jackson, 1999). Como un ejemplo de esto, se
439 muestra el alineamiento de la secuencia de aminoácidos de las proteínas Ku70 y
440 Ku80 de *C. glabrata* comparado con el modelo biológico *S. cerevisiae*. A pesar de

441 que ambas levaduras están relacionadas filogenéticamente, se observa un bajo
442 grado de similitud en secuencia entre sus proteínas (Figs. 6 y 7, datos
443 suplementarios).

444

445 Diversos estudios en diferentes organismos han demostrado que el heterodímero
446 Ku es altamente estable y es probablemente la forma funcional más común. En *S.*
447 *cerevisiae*, se ha demostrado que no existe diferencia entre el fenotipo de una
448 cepa que contiene una mutación nula de una de las dos subunidades de Ku y el
449 de otra cepa que carece de ambas subunidades. Estos resultados sugieren que la
450 forma funcional primaria de estas subunidades, es un heterodímero (Downs y
451 Jackson, 2004). En el presente trabajo hemos demostrado la existencia de una
452 interacción entre las proteínas Ku70 y Ku80 de *C. glabrata* mediante ensayos de
453 Co-inmunoprecipitación, lo que sugiere la existencia de la forma heterodimérica.

454 Además, de manera análoga a los datos de *S. cerevisiae*, datos de nuestro
455 laboratorio muestran que para varios fenotipos probados, las cepas mutantes
456 sencillas se comportan igual que la mutante que carece de ambas subunidades de
457 Ku (A. Juárez-Reyes *et al.*, sometido).

458

459 Ahora sabemos que el heterodímero Ku es multi-funcional puesto que además de
460 su función en la reparación de cortes de doble cadena del ADN, mediante la vía
461 NHEJ (del inglés, Non-Homologous End Joining) (Daley *et al.*, 2005) éste se
462 encuentra involucrado en otros procesos celulares tales como el mantenimiento de
463 telómeros, el silenciamiento de genes subteloméricos (TPE, del inglés, Telomere
464 Position Effect) y su organización espacial en el núcleo (Downs y Jackson, 2004;
465 Fisher y Zakian, 2005).

466 En *S. cerevisiae*, la delección de cualquiera de las subunidades de este complejo
467 origina un incremento en la sensibilidad a algunos agentes que inducen daños al
468 ADN. Además, las mutantes en el complejo Ku de *S. cerevisiae* exhiben
469 termosensibilidad a 37°C, aunque no mueren inmediatamente (Dudasova *et al.*,
470 2004). Otro fenotipo destacable de las mutantes en Ku es que sufren un dramático
471 acortamiento en la longitud de los telómeros, lo que indica que el complejo Ku

472 juega un papel crucial en el mantenimiento de estas estructuras en la célula. Estos
473 mismos fenotipos mostrados por deleciones de Ku (termosensibilidad, decremento
474 de los niveles de TPE, acortamiento de los telómeros) se han observado en *C.*
475 *glabrata* (Castano *et al.*, 2005; Rosas-Hernández *et al.*, 2008; A. Juárez-Reyes *et*
476 *al.*, sometido).

477 Los datos recopilados en este trabajo y los previos generados en nuestro grupo
478 (*Rosas-Hernández et al.*, 2008; A. Juárez *et al.*, sometido) sugieren que, al igual
479 que en otras especies estudiadas, el complejo Ku de *C. glabrata* realiza diferentes
480 actividades que parecen conservadas entre diversos organismos. Aunque de
481 manera sorprendente, existen ejemplos de la existencia de variaciones respecto a
482 la estructura y regulación de Ku a través de la evolución (Downs y Jackson, 2004).

483

484

485

486

487

488

489

490

491

492

493

494

495

496

497

498

499

500

501

502

503 **Materiales y Métodos**

504

505 *Cepas, plásmidos y oligonucleótidos*

506

507 Todas las cepas, plásmidos y oligonucleótidos utilizados en este trabajo se
508 muestran en la Tablas 1, 2 y 3, respectivamente, en la sección de datos
509 suplementarios.

510

511 *Medios de crecimiento*

512

513 Las células de levadura se cultivaron en medio estándar como se describe
514 previamente en (Sherman *et al.*, 1986). Para los medios sólidos se añadió agar
515 bacteriológico a una concentración final de 2% (w/v). El medio sintético completo
516 (SC) contiene 1.7 g/L de base nitrogenada de levadura [sin (NH₄)₂SO₄ ni
517 aminoácidos], 5 g/L (NH₄)₂SO₄, 0,6% casaminoácidos, y 2% de glucosa. El medio
518 YPD (del Inglés Yeast extract-Peptone-Dextrose), contiene 10g/L de extracto de
519 levadura, 20g/L de peptona, 2% (p/v) de glucosa y es complementado con 25mg/L
520 de uracilo (Sigma Aldrich®). Cuando fue requerido, cajas de YPD se
521 suplementaron con higromicina (A. G. Scientific®) a una concentración final de
522 400µg/mL. Para determinar la resistencia al ácido 5-Fluoroorótico (5-FOA) se
523 suplementó con uracilo 50mg/L y ácido-5-fluorótico 0,9g/L (Toronto Research
524 Chemicals®) a las cajas SC (cajas 5-FOA).

525 Para el crecimiento bacteriano se utilizó el medio Luria-Bertani (LB), como se
526 describe en (Ausubel *et al.*, 2001). Para el medio LB sólido, se añadió agar
527 bacteriológico a una concentración final de 1.5% (p/v). Este medio contiene
528 extracto de levadura 5 g/L, triptona 10 g/L y NaCl 5 g/L. En la mayoría de los
529 casos se suplementó con carbenicilina (A.G. Scientific®) a una concentración final
530 de 50 µg/mL (Lb-Cb⁵⁰). Todos los plásmidos se introdujeron en la cepa DH10B
531 mediante electroporación.

532

533

534 *Construcción de las fusiones traduccionales.*

535

536 Se construyeron diferentes plásmidos que contienen el extremo C-terminal de las
537 proteínas Ku70 o Ku80, fusionados a distintos epítomos (HA, FLAG, c-Myc y GFP).
538 Primeramente, se clonó en el vector p-GEM® la región terminal del 3' del ORF de
539 *HDF1* y *HDF2* y la región 3' no traducida (3'UTR) de cada uno de estos genes.
540 Cada uno de estos fragmentos se subclonaron en sitios específicos, en los
541 plásmidos que contienen los epítomos GFP (pOZ18), HA (pGE33), FLAG (pGE36)
542 y c-Myc (pOZ18). De esta manera, se construyeron los vectores que contienen el
543 fragmento 3'ORF y el 3'UTR de *HDF1* fusionados con GFP (pMS19), HA (pMS15)
544 , FLAG (pMS17) y c-Myc (pMS29). De igual manera se obtuvieron los vectores
545 para el 3'ORF y el 3'UTR de *HDF2* con HA (pMS19), FLAG (pMS21) y c-Myc
546 (pMS31). Todas las construcciones se introdujeron en el genoma de *C. glabrata*
547 mediante recombinación homóloga en su respectivo *locus* por el método de
548 reemplazo génico en un solo paso, como se describe en (De las Peñas *et al.*,
549 2003; Castaño *et al.*, 2005). Finalmente, se comprobó la correcta inserción y
550 orientación de las secuencias insertadas mediante PCR.

551

552 *Ensayos de expresión del gen reportero URA3 (ensayos de sensibilidad a 5-FOA).*

553

554 Para determinar si las proteínas Ku70 y Ku80 etiquetadas son funcionales para
555 silenciar el gen reportero *URA3* cerca del telómero I_R, el cual depende totalmente
556 de ambas proteínas para mantener el silenciamiento, se realizaron ensayos de
557 crecimiento en medio 5-FOA, como se describe previamente (Rosas *et al.*, 2008).
558 Las cepas transformantes fueron crecidas hasta fase estacionaria durante 48
559 horas a 30°C. Los cultivos se ajustaron a una densidad óptica a 600 nm
560 (OD₆₀₀)=1 con agua destilada y se hicieron diluciones logarítmicas seriadas en
561 agua estéril (10⁻¹ – 10⁻⁵) en multiplacas de 96 pozos. Finalmente, se gotearon por
562 duplicado en tres diferentes medios sólidos de crecimiento: YPD, CAA (sin uracilo)
563 y 5-FOA.

564

565 *Ensayos de adherencia a células HeLa.*

566

567 Se pusieron a crecer las células de *C.glabrata* en medio YPD durante 48 horas a
568 30 °C en agitación constante. Posteriormente, se midió la densidad óptica a 600
569 nm de cada uno de los cultivos para ajustar con agua destilada cada cultivo a una
570 OD_{600nm}= 1.

571 Se utilizó una caja de cultivo de 24 pozos con células HeLa previamente adheridas
572 en cada uno de los pozos a las cuales se les adicionó 1 mL de la solución HSSB
573 [Hanks Salt Solution Balanced, 34 mM NaCl, 1.34 mM KCl (Fisher Scientific®),
574 202 µM MgSO₄•7H₂O (Caledon®), 86 µM Na₂HPO₄•2H₂O (Fisher BioReagents®),
575 110 µM KH₂PO₄ (Fisher BioReagents®), 5 mM CaCl₂] para favorecer la
576 adherencia.

577 Posteriormente, se agregó 1 mL. de cada uno de los cultivos en OD₆₀₀ nm= 1
578 previamente preparados. La placa de pozos se incubó durante 1.5 horas a
579 temperatura ambiente. Al término de la incubación se decantó manualmente, se
580 dejó reposar por unos 5 minutos y se añadió 1 mL. de agua destilada; finalmente,
581 se tomaron fotografías en el microscopio de cada uno de los pozos con el objetivo
582 seco de 40X.

583 *Preparación de extractos de levadura y análisis por Western blot.*

584

585 Células de levadura se crecieron hasta alcanzar una OD₆₀₀ de 1. Posteriormente,
586 las células se colectaron mediante centrifugación rápida en frío. El pellet se lavó y
587 se resuspendió en buffer de lisis (Tris 50mM, EDTA 5mM, NaCl 250mM, 0.1% de
588 NP-40 Fluka® Biochemika). Se le adicionó inhibidores de proteasas [C.b.p.
589 volumen deseado, 1 tab/100 mL (Sigma Fast®) AEBSF 2mM, EDTA 1mM,
590 Bestatin 130µM, E-64 14 µM, Leupeptin 1 µM, Aprotinin 0.3 µM], ditiotritol 1.5 mM
591 (PlusOne DTT, Amersham Biosciences®) y Complete® 1X. A la suspensión se le
592 añadió un volumen igual de perlas de zirconio [0,5 mm Zircornial Silica Beads
593 (BioSpec Products Inc.®)] y las células se rompieron utilizando el vórtex. Las
594 perlas y los restos celulares se removieron por centrifugación a 15000g por 30
595 min. a 4°C. La concentración de las proteínas de los extractos celulares se midió

596 a una OD₂₈₀. Posteriormente, se llevó a cabo las electroforesis de los extractos
597 celulares en geles de poliacrilamida (7% SDS-PAGE), en un sistema de
598 electroforesis (BioRad®); se cargaron 100 µg de proteína/µL en cada uno de los
599 carriles disueltos en buffer de carga que contiene [TRIS-HCl 125 mM pH=6.8 (IBI
600 Scientific®), glicerol 20%, SDS 4% (Ultra invitrogen®), β-mercaptoetanol 0.2%
601 (Fisher Scientific®), azul de bromofenol 0,001% (Fisher Biotech®) y agua mQ
602 c.b.p. 100 mL]. Después de la electroforesis, las proteínas se transfirieron a
603 membranas de nitrocelulosa (PoliVinilDenediFloride, Sequi-blot PVDF 0.2 µm,
604 BioRad®) a través de un sistema electroforético, durante 12 horas a 90 mA y 4°C.
605 Al término de la transferencia la membrana se lavó varias veces con Buffer Tris-
606 Salino-Tween (TTBS 1X) [Tris-HCl 20 mM (IBI Scientific®), NaCl 0.5 M, Tween
607 0.05% (USB®), Leche en polvo 0,1% (Svelty Nestle®) y Agua c.b.p. 400 mL. Las
608 membranas transferidas fueron bloqueadas mediante incubación con la solución
609 bloqueadora (TBS 1X-leche 3%) [Tris-HCl 20 mM (IBI Scientific®), NaCl 0,5 M,
610 Leche en polvo 3% (Svelty Nestle®) Tween 0.2% (USB®) y Agua c.b.p. 25 mL]
611 con agitación moderada y constante durante 1.5 h a temperatura ambiente.
612 Luego, se lavó la membrana varias veces con Buffer Tris-Salino-Tween-leche
613 0.1% (TTBS 1X-leche 0,1%). Se utilizaron los anticuerpos anti-FLAG [Monoclonal
614 Antibody Anti-FLAG M2, mouse IgG1 isotype, Sigma®] a una concentración de 2.5
615 µg/mL y anti-c-Myc [Monoclonal Antibody Anti-c-Myc M2, mouse IgG1 isotype,
616 Millipore®] a 1 µg/mL. La membrana fue lavada varias veces con TTBS 1X-leche
617 0.1% al término de la incubación, y esta se incubó con el anticuerpo secundario,
618 [Anticuerpo policlonal, NIF825 Peroxidase labelled Anti-mouse IgG – HRP,
619 Amersham®] dilución 1:5000 durante 1.5 horas a temperatura ambiente. La señal
620 inmunoreactiva se obtuvo utilizando quimioluminiscencia [(Pierce® ECL Western
621 blotting substrate (Thermo Scientific®)], seguido por una exposición a películas
622 autorradiográficas [Kodak®, Sigma Aldrich® (BioMax Chemiluminescence, light
623 film)].

624

625

626

627 *Co-inmunoprecipitación.*

628

629 Los lisados fueron clarificados con Sefarosa acoplada a proteína G (Sigma®
630 P3296), y se mezclaron por inversión por 30 min a 4°C. Para inmunoprecipitar las
631 versiones etiquetadas de Ku70 y Ku80 se usaron perlas de agarosa anti-c-Myc
632 que fueron incubadas con los extractos proteicos correspondientes, suspendidos
633 en amortiguador de fosfatos (NaCl 137 mM, KCl 2.7 mM, Na₂HPO₄ 4.3 mM,
634 KH₂PO₄ 1.4 mM), durante 1 hora y media a 4°C.

635 Los precipitados se recuperaron por centrifugación (15 000 rpm por 1 min. a 4°C) y
636 se lavaron varias veces con el amortiguador de fosfatos. Posteriormente, los
637 precipitados se eluyeron con SDS 2X en un gel de acrilamida-SDS al 7% (con los
638 sobrenadantes además de los extractos proteicos totales), y se transfirieron a una
639 membrana de nitrocelulosa (PoliVinilDenediFloride, Sequi-blot PVDF 0.2 µm,
640 BioRad®). Finalmente, se utilizaron métodos estándar de inmunodetección y de
641 quimioluminiscencia, utilizando un anticuerpo monoclonal anti-FLAG [Monoclonal
642 Antibody Anti-FLAG M2, mouse IgG1 isotype, Sigma®] para detectar la co-
643 inmunoprecipitación.

644

645

646

647

648

649

650

651

652

653

654

655

656

657

658 **Bibliografía**

659

660 Ausubel, F., R. Brent, R. E. Kingston, D. D. Moore, J. G. Seidman, J. A. Smith, and
661 K. Struhl (ed.). (2001). *Current Protocols in Molecular Biology*. Wiley & Sons, Inc.,
662 New York, NY.

663

664 Blander, G. and Guarente, L. (2004) The Sir2 family of protein deacetylases. *Annu*
665 *Rev Biochem*, 73: 417-435.

666

667 Calvin, N. M., and Hanawalt P. C. (1988) High-efficiency transformation of bacterial
668 cells by electroporation. *J Bacteriol* 170: 2796-2801.

669

670 Castaño I., Pan S. J, Zupancic M, Hennequin C, Dujon B, and Cormack B. P.
671 (2005). Telomere length control and transcriptional regulation of subtelomeric
672 adhesins in *Candida glabrata*. *Mol. Microbiol* 55:1246–1258.

673

674 Cormack, B.P., Ghori, N. and Falkow, S. (1999) An adhesin of the yeast pathogen
675 *Candida glabrata* mediating adherence to human epithelial cells. *Science*, 285:
676 578-582.

677

678 Cormack BP, Falkow S.(1999). Efficient homologous and illegitimate recombination
679 in the opportunistic yeast pathogen *Candida glabrata*. *Genetics* 151: 979–987.

680

681 De Las Peñas, A., Pan S. J., Castano I., Alder J., Cregg R., and Cormack B. P.
682 (2003). Virulence-related surface glycoproteins in the yeast pathogen *Candida*
683 *glabrata* are encoded in subtelomeric clusters and subject to RAP1- and SIR-
684 dependent transcriptional silencing. *Genes Dev.* 17:2245–2258.

685

686 Daley, J.M., P.L Palmbo, D. Wu and T.E Wilson. (2005). Nonhomologous end
687 joining in yeast. *Annu Rev Genet* 39: 431-451.

688

689 Downs JA, Jackson SP (2004). A means to a DNA end: the many roles of Ku. *Nat*
690 *Rev Mol Cell Biol* 5: 367–378
691

692 Dujon, B., Sherman, D., Fischer, G., Durrens, P., Casaregola, S., Lafontaine, *et al.*,
693 (2004) Genome evolution in yeasts. *Nature* 430: 35-44.
694

695 Fisher, T.S. and Zakian V.A (2005) Ku: a multifunctional protein involved in
696 telomere maintenance. *DNA Repair (Amst)* 4: 1215-1226.
697

698 Gell, D. and Jackson, S. P. (1999) Mapping of protein–protein interactions within
699 the DNA-dependent protein kinase complex. *Nucl. Acids Res* 27: 3494–3502.
700

701 Gottschling, D.E. (1992) Telomere-proximal DNA in *Saccharomyces cerevisiae* is
702 refractory to methyltransferase activity in vivo. *Proc.Natl. Acad. Sci.* 89: 4062–
703 4065.
704

705 Hardy, C. F., Sussel L., and Shore D. (1992). A RAP1-interacting protein involved
706 in transcriptional silencing and telomere length regulation. *Genes Dev.* 6:801–814.
707

708 Hediger, F., Neumann, F.R., Van Houwe, G., Dubrana, K. and Gasser, S.M. (2002)
709 Live imaging of telomeres: yKu and Sir proteins define redundant telomere-
710 anchoring pathways in yeast. *Curr Biol*, 12:2076-2089.
711

712 Jarvik, J. W. and Telmer C. A. (1998) Epitope tagging. *Annu Rev Genet* 32: 601-
713 618.
714

715 Ottaviani A, Gilson E, Magdinier F. (2008) Telomeric position effect: From the
716 yeast paradigm to human pathologies? *Biochimie* 90: 93–107.
717

718 Rosas-Hernandez, L.L., Juarez-Reyes, A., Arroyo-Helguera, O.E., De Las Penas,
719 A., Pan, S.J., Cormack, B.P., and Castano, I. (2008) yKu70/yKu80 and Rif1

720 regulate silencing differentially at telomeres in *Candida glabrata*. *Eukaryot Cell* 7:
721 2168-2178.

722

723 Rusche, L.N., Kirchmaier, A.L. and Rine, J. (2003) The establishment, inheritance,
724 and function of silenced chromatin in *Saccharomyces cerevisiae*. *Annu Rev*
725 *Biochem* 72: 481-516.

726

727 Sherman F., Fink G. R., and Hicks J. B. (1986). *Methods in Yeast Genetics*. Cold
728 Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.

729

730 Wotton, D. and Shore, D. (1997) A novel Rap1p-interacting factor, Rif2p,
731 cooperates with Rif1p to regulate telomere length in *Saccharomyces cerevisiae*.
732 *Genes Dev* 11: 748-760.

733

734

735

736

737

738

739

740

741

742

743

744

745

746

747

748

749

750

751 **Datos suplementarios**

752

753 **Tabla 1.** Cepas utilizadas y generadas en este estudio.

754

755

756 **Cepas utilizadas**

CEPA	GENOTIPO RELEVANTE	FENOTIPO	BIBLIOGRAFÍA
CGM1	<i>ura3Δ::Tn903 G418^R</i>	Ura ⁻	(Cormack and Falkow, 1999)
CGM160	<i>ura3Δ::Tn903 G418^R</i> Tn ⁷ en la región intergénica entre <i>EPA4</i> y el telómero. (paP471/ApaLI-XbaI)	Ura ⁻	(De Las Peñas <i>et al.</i> , 2003)

757

758 **Cepas generadas de *Candida glabrata***

CEPA	GENOTIPO RELEVANTE	FENOTIPO	BIBLIOGRAFÍA
CGM1196 Ku70::HA	CGM1 <i>ura3Δ::Tn903 G418^R</i> <i>pMS15/ KpnI-SpeI</i> <i>HDF1::HA::hph</i>	Ura ⁻ Hyg ^R	Este trabajo
CGM1198 Ku70::FLAG	CGM1 <i>ura3Δ::Tn903 G418^R</i> <i>pMS17/ KpnI-SpeI</i> <i>HDF1::FLAG::hph</i>	Ura ⁻ Hyg ^R	Este trabajo
CGM1200 Ku70::GFP	CGM1 <i>ura3Δ::Tn903 G418^R</i> <i>pMS19/ KpnI-SpeI</i> <i>HDF1::GFP::hph</i>	Ura ⁻ Hyg ^R	Este trabajo
CGM1304 Ku70::c-MYC	CGM1 <i>ura3Δ::Tn903 G418^R</i> <i>pMS27/ KpnI-SpeI</i> <i>HDF1::c-Myc::hph</i>	Ura ⁻ Hyg ^R	Este trabajo
CGM1201 Ku80::HA	CGM1 <i>ura3Δ::Tn903 G418^R</i> <i>pMS21/ KpnI</i>	Ura ⁻ Hyg ^R	Este trabajo

	<i>HDF2::HA::hph</i>		
CGM1203 Ku80::FLAG	CGM1 <i>ura3Δ::Tn903 G418^R</i> pMS23/ <i>KpnI</i> <i>HDF2::FLAG::hph</i>	Ura ⁻ Hyg ^R	Este trabajo
CGM1338 Ku80::c-Myc	CGM1 <i>ura3Δ::Tn903 G418^R</i> pMS31/ <i>KpnI</i> <i>HDF2::c-Myc::hph</i>	Ura ⁻ Hyg ^R	Este trabajo
CGM1305 Ku70::HA	CGM1196 <i>HDF1::HA</i>	Ura ⁻ Hyg ^S	Este trabajo
CGM1307 Ku70::FLAG	CGM1198 <i>HDF1::FLAG</i>	Ura ⁻ Hyg ^S	Este trabajo
CGM1309 Ku70::GFP	CGM1120 <i>HDF1::GFP</i>	Ura ⁻ Hyg ^S	Este trabajo
CGM1311 Ku80::HA	CGM1201 <i>HDF2::HA</i>	Ura ⁻ Hyg ^S	Este trabajo
CGM1313 Ku80::FLAG	CGM1203 <i>HDF2::FLAG</i>	Ura ⁻ Hyg ^S	Este trabajo
CGM1319 Ku70:: FLAG/ Ku80::c-Myc	CGM1307 <i>HDF2::c-</i> <i>Myc::hph</i> pMS31/ <i>KpnI</i>	Ura ⁻ Hyg ^R	Este trabajo
CGM1321 Ku80:: FLAG/ Ku70::c-Myc	CGM1313 <i>HDF1::c-</i> <i>Myc::hph</i> pMS29/ <i>KpnI-SpeI</i>	Ura ⁻ Hyg ^R	Este trabajo
CGM160			
CGM160	<i>ura3Δ::Tn903 G418^R</i> Tn ⁷ en la región intergénica entre <i>EPA4</i> y el telómero. (paP471/ <i>ApaLI-XbaI</i>)	Ura ⁻	(De las Peñas <i>et al.</i> , 2003)
CGM1222	CGM160 <i>HDF1::HA::hph</i>		

Ku70::HA	pMS15/ <i>KpnI-SpeI</i>	Ura ⁻ Hyg ^R	Este trabajo
CGM1224 Ku70::FLAG	CGM160 <i>HDF1::FLAG::hph</i> pMS17/ <i>KpnI-SpeI</i>	Ura ⁻ Hyg ^R	Este trabajo
CGM1226 Ku70::GFP	CGM160 <i>HDF1::GFP::hph</i> pMS19/ <i>KpnI-SpeI</i>	Ura ⁻ Hyg ^R	Este trabajo
CGM1354 Ku70::c-Myc	CGM160 <i>HDF1::c-Myc::hph</i> pMS29/ <i>KpnI-SpeI</i>	Ura Hyg ^R	Este trabajo
CGM1228 Ku80::HA	CGM160 <i>HDF2::HA::hph</i> pMS21/ <i>KpnI</i>	Ura Hyg ^R	Este trabajo
CGM1230 Ku80::FLAG	CGM160 <i>HDF2::FLAG::hph</i> pMS23/ <i>KpnI</i>	Ura ⁻ Hyg ^R	Este trabajo
CGM1356 Ku80:: c-Myc	CGM160 <i>HDF2::c-Myc::hph</i> pMS31/ <i>KpnI</i>	Ura ⁻ Hyg ^R	Este trabajo

759

760 **Cepas utilizadas y generadas de *E. coli***

CEPA	GENOTIPO	USO	REFERENCIA
DH10B	<i>F⁻mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC)</i> <i>Φ80dlacZΔM15ΔlacX74 deoR</i> <i>recA1 endA1 araD139 Δ(ara,</i> <i>leu)7697 galU galK λ⁻rpsL</i> <i>nupG</i>	Células electrocompetentes	(Calvin and Hanawalt, 1988)

761 **Tabla 2.** Plásmidos utilizados y generadas en este estudio.

762

Vectores de clonación		
Plásmido	Descripción	Referencia
pGEM®-T	Vector de clonación. Amp ^R	Promega® No.Cat.: A3600
pOZ16	<p>Vector para crear fusiones traduccionales con <i>GFP</i>. Fragmento <i>BamHI/BglIII</i> de 725 pb (<i>GFP</i>) derivado de pAP742, clonado en pOZ14 digerido con <i>BamHI</i>. Se seleccionó la orientación con el ORF de <i>GFP</i> en dirección 5'- 3'.</p> <p>[<i>GFP::</i>(FRT3'UTR_{CTA1})P_{PGK}::<i>hph</i>::(3'UTR_{HIS3})-FRT]</p> <p><i>URA3 Hyg^R Amp^R</i></p>	Colección del laboratorio
pOZ18	<p>Vector para crear fusiones traduccionales con <i>c-Myc</i>. Fragmento <i>BamHI/BglIII</i> de 559 pb (<i>c-Myc</i>) derivado de pAP760, clonado en pOZ14 digerido con <i>BamHI</i>. Se seleccionó la orientación con el ORF de <i>c-Myc</i> en dirección 5'- 3'.</p> <p>[<i>c-Myc::</i>(FRT3'UTR_{CTA1})P_{PGK}::<i>hph</i>::(3'UTR_{HIS3})-FRT]</p> <p><i>URA3 Hyg^R Amp^R</i></p>	Colección del laboratorio
pGE33	<p>Vector para crear fusiones traduccionales con <i>HA</i>. Fragmento <i>BamHI/BglIII</i> de 110 pb (<i>HA</i>) clonado en pOZ14 digerido con <i>BamHI</i>. Orientación verificada por secuenciación</p> <p>[<i>HA::</i>(FRT-3'UTR_{CTA1})P_{PGK}::<i>hph</i>::(3'UTR_{HIS3})-FRT]</p> <p><i>URA3 Hyg^R Amp^R</i></p>	Colección del laboratorio

pGE36	<p>Vector para crear fusiones traduccionales con <i>FLAG</i>. Fragmento <i>BamHI/BglIII</i> de 110 pb (<i>FLAG</i>) clonado en pOZ14 digerido con <i>BamHI</i>. Orientación verificada por secuenciación [<i>FLAG::(FRT-3'UTR_{CTA1})P_{PGK}::hph::(3'UTR_{HIS3})-FRT</i>] <i>URA3 Hyg^R Amp^R</i></p>	Colección del laboratorio
-------	------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	---------------------------

763

Vectores replicativos		
Plásmido	Descripción	Referencia
pMZ18	<p>Vector replicativo que expresa la recombinasa (ScFlp1p) para la remoción del casete de resistencia a higromicina; [<i>P_{EPA1}::FLP1::(3'UTR_{HIS3}) URA3 Amp^R</i>].</p>	Colección del laboratorio B. Cormack

764

Vectores intermediarios			
Plásmido	Descripción	Resistencia	Referencia
pGE51	Producto de PCR (oligos #376/ #377) de 900 pb. del 3' del ORF <i>HDF1</i> sin codón de paro, clonado en pGEM®-T.	Amp ^R	Colección del laboratorio
pGE53	Producto de PCR (oligos #381/ #382) de 700 pb. del 3' del ORF <i>HDF2</i> sin codón de paro, clonado en pGEM®-T.	Amp ^R	Colección del laboratorio
pAP746	Producto de PCR de 800 pb. del 3' UTR de <i>HDF1</i> , clonado en pGEM®-T.	Amp ^R	Colección

			del laboratorio
pAP752	Producto de PCR de 800 pb. del 3' UTR de <i>HDF2</i> , clonado en pGEM®-T.	Amp ^R	Colección del laboratorio
pMS1	Fragmento <i>SpeI/Bam</i> HI de 900 pb (3' ORF de <i>HDF1</i>) derivado del pGE51, clonado en pGE33 digerido con <i>SpeI/Bam</i> HI.	Amp ^R	Este trabajo
pMS3	Fragmento <i>SpeI/Bam</i> HI de 900 pb (3' ORF de <i>HDF1</i>) derivado del pGE51, clonado en pGE36 digerido con <i>SpeI/Bam</i> HI.	Amp ^R	Este trabajo
pMS5	Fragmento <i>SpeI/Bam</i> HI de 900 pb (3' ORF de <i>HDF1</i>) derivado del pGE51, clonado en pOZ16 digerido con <i>SpeI/Bam</i> HI.	Amp ^R	Este trabajo
pMS7	Fragmento <i>SacI/Bam</i> HI de 700 pb (3' ORF de <i>HDF2</i>) derivado del pGE51, clonado en pGE33 digerido con <i>SacI/Bam</i> HI.	Amp ^R	Este trabajo
pMS9	Fragmento <i>SacI/Bam</i> HI de 700 pb (3' ORF de <i>HDF2</i>) derivado del pGE51, clonado en pGE36 digerido con <i>SacI/Bam</i> HI.	Amp ^R	Este trabajo

pMS11	Fragmento <i>SacI/BamHI</i> de 700 pb (3'ORF de <i>HDF2</i>) derivado del pGE51, clonado en pOZ16 digerido con <i>SacI /BamHI</i> .	Amp ^R	Este trabajo
pMS13	Fragmento <i>SacI/BamHI</i> de 700 pb (3'ORF de <i>HDF2</i>) derivado del pGE51, clonado en pOZ18 digerido con <i>SacI /BamHI</i> .	Amp ^R	Este trabajo
pMS15	Fragmento <i>HindIII/KpnI</i> de 800 pb (3' UTR de <i>HDF1</i>) derivado del pAP746, clonado en pMS1 digerido con <i>HindIII/KpnI</i> .	Amp ^R	Este trabajo
pMS17	Fragmento <i>HindIII/KpnI</i> de 800 pb (3' UTR de <i>HDF1</i>) derivado del pAP746, clonado en pMS3 digerido con <i>HindIII/KpnI</i> .	Amp ^R	Este trabajo
pMS19	Fragmento <i>HindIII/KpnI</i> de 800 pb (3' UTR de <i>HDF1</i>) derivado del pAP746, clonado en pMS5 digerido con <i>HindIII/KpnI</i> .	Amp ^R	Este trabajo
pMS21	Fragmento <i>Sall/ HindIII</i> de 700 pb (3'UTR de <i>HDF2</i>) derivado del pAP752, clonado en pMS7 digerido con <i>Sall/ HindIII</i> .	Amp ^R	Este trabajo

pMS23	Fragmento <i>Sall/ HindIII</i> de 700 pb (3'UTR de <i>HDF2</i>) derivado del pAP752, clonado en pMS9 digerido con <i>Sall/ HindIII</i> .	Amp ^R	Este trabajo
pMS25	Fragmento <i>Sall/ HindIII</i> de 700 pb (3'UTR de <i>HDF2</i>) derivado del pAP752, clonado en pMS11 digerido con <i>Sall/ HindIII</i> .	Amp ^R	Este trabajo
pMS27	Fragmento <i>SpeI/BamHI</i> de 900 pb (3'ORF de <i>HDF1</i>) derivado del pGE51, clonado en pOZ18 digerido con <i>SpeI/BamHI</i> .	Amp ^R	Este trabajo
pMS29	Fragmento <i>HindIII/KpnI</i> de 800 pb (3' UTR de <i>HDF1</i>) derivado del pAP746, clonado en pMS27 digerido con <i>HindIII/KpnI</i> .	Amp ^R	Este trabajo
pMS31	Fragmento <i>Sall/ HindIII</i> de 700 pb (3'UTR de <i>HDF2</i>) derivado del pAP752, clonado en pMS13 digerido con <i>Sall/ HindIII</i> .	Amp ^R	Este trabajo

765

766

767

768

769

770

771

772 **Tabla 3.** Oligonucleótidos utilizados en este estudio.

773

No	Secuencia	Sitios de hibridación
# 15	CGATAAGAGGCCACGTGCTTTATG	PGK1-P Rev-out
#16	AGAAATACGCACGAACACGATATAGAGG	HIS3 Fw-out
# 374	GCGAAGCTTCCCACCTTTCTTTTTTTGATAATTC	HDF1@+1pb <i>HindIII</i> Fw
# 375	TTTGGTACCTATGAAAGAACCAG	HDF1@+839 <i>Kpn</i> Rev
# 379	GCGAAGCTTCAGGTCGTATATATATCATTCTATATATC ATTCTATATAACTC	HDF2@+1pb <i>HindIII</i> Fw
# 380	GTTGGTACCGATTCTATTTGG	HDF2@+837 pb <i>Kpn1</i> Rev
# 376	CAAAC TAGTATATATGAAAACCAGGAAATAAGG	HDF1@927p b <i>Spe1</i> Fw
# 377	CGCGGATCCTTAAGTTTAGTTTAGGCTTTTTTTTCAG	HDF1@2721 pb <i>BamH1</i> Rev
# 382	GCGGGATCCTTGACTCCCCTTCTCTTGCAGG	HDF2@1840 pb <i>BamH1</i> Rev
# 672	CCCGTACTACAAC TAACAATGCAGC	HDF1@+ 972pb Rev
#674	CCGACAACAAGAACAGCACCCCTTGG	HDF2@+986 pb Rev
# 80	CGGAACATATGTTTCGAGGTAC	HDF1int@14 1pb Fw
# 81	GGAATGTTTAGTTTCTTATTCTGATC	HDF1int@44 3pb Rev
# 82	CCTCGTGAACCAACACCGAGACGC	HDF2int@13 4pb Fw
# 83	CGCGAGTCCAGCTCCTCG	HDF2int@43

		0pb Rev
# 355	CGCGAGCTCGAAGGAGATATAAAATGTCAGAG TTGGATTTCCC	HDF1@+1 <i>SacI</i> Fw HIS
# 356	GCGGGATCCGAAGGAGATATAAAATGTCGGAA GCCACATCT	HDF2@1pb <i>BamHI</i> Fw HIS
# 2248	GCCGCTGTATCGGGATCAAC	HDF2@- 1147 Fw
# 408	CGCAGATCTGGCGCGAATTCAGTAGTGATTG	13Myc <i>BglIII</i> Rev

774

775

Alineamiento de secuencias Ku70

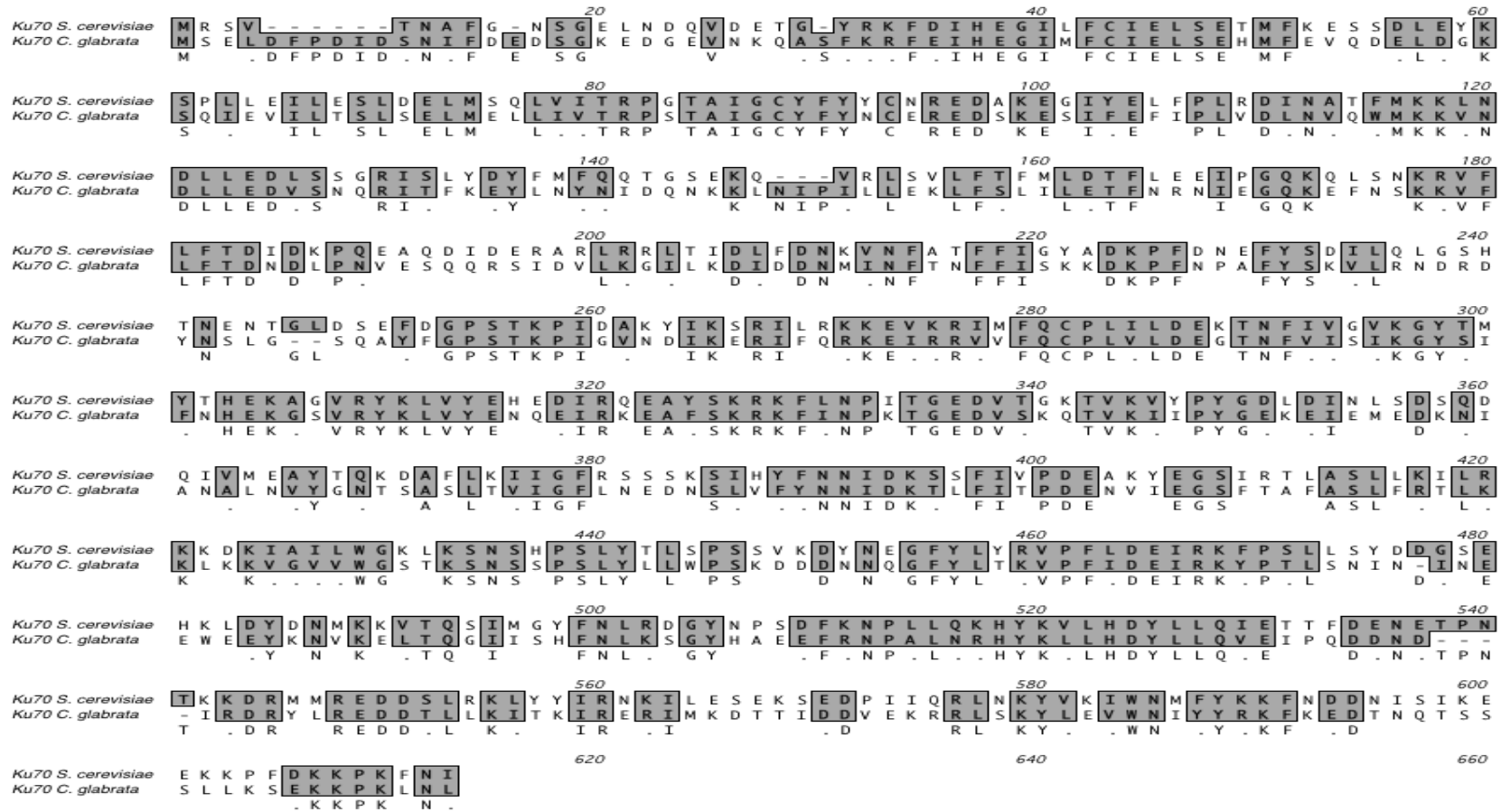


Figura 6. Alineamiento de aminoácidos de las proteínas Ku70 de *C. glabrata* y *S. cerevisiae*. Las proteínas Ku70 de ambas especies son 45.7% similares, comparando toda la extensión proteica.

Alineamiento de secuencias Ku80

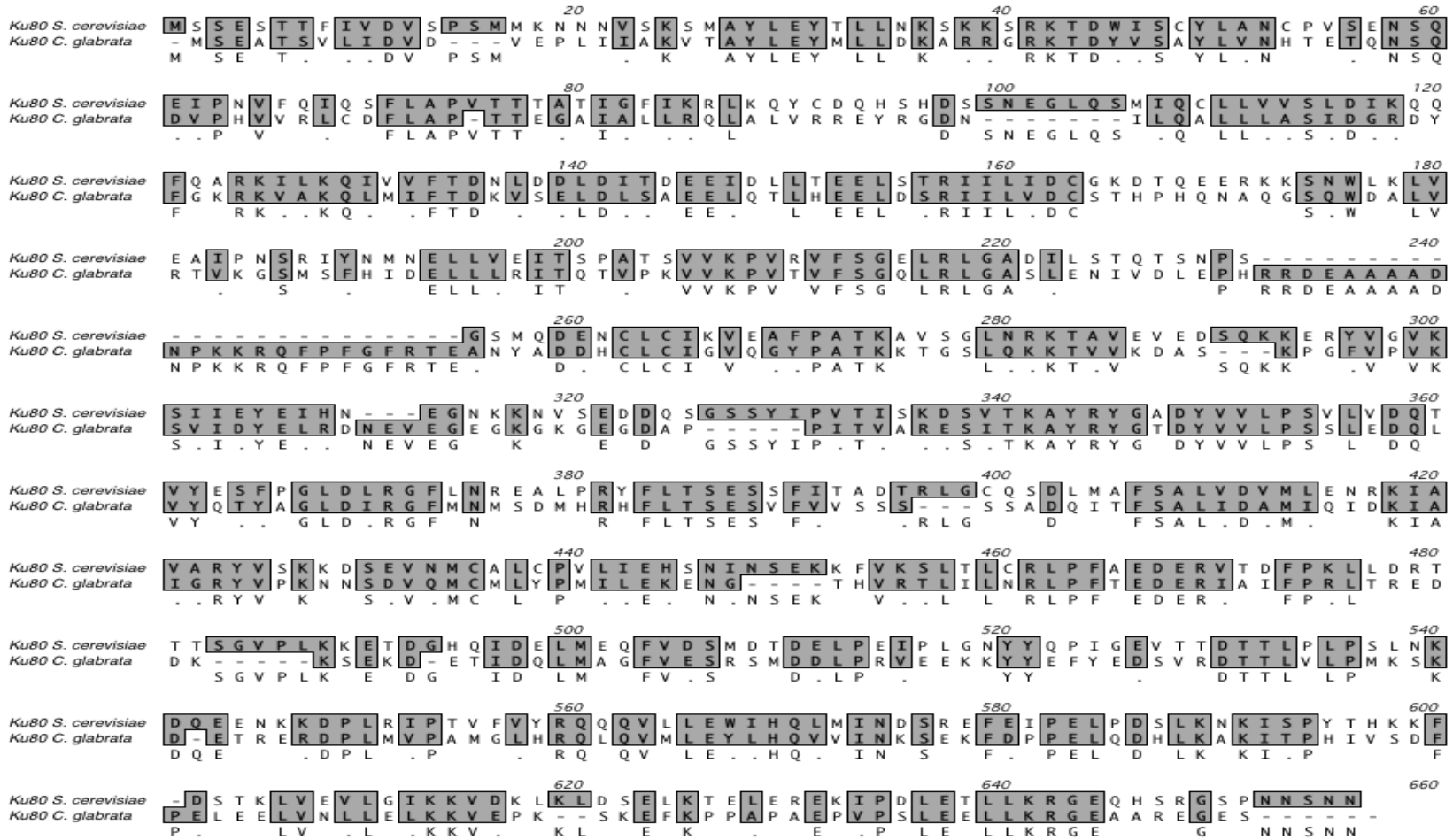


Figura 7. Alineamiento de aminoácidos de las proteínas Ku80 de *C. glabrata* y *S. cerevisiae*. Las proteínas Ku80 de ambas especies son 39.2 % similares, comparando toda la extensión proteica.

