



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

POSGRADO EN CIENCIAS EN BIOLOGÍA MOLECULAR

**Análisis de la estructura de la cromatina subtelomérica
en los *loci* de los genes *EPA1-7* en *Candida glabrata*.**

Tesis que presenta

Lluvia Leticia Rosas Hernández

Para obtener el grado de

Maestra en Ciencias en Biología Molecular

Directora de Tesis

Dra. Irene Castaño Navarro

San Luis Potosí, S. L. P., Julio 2007



Constancia de aprobación de la tesis

La tesis "Análisis de la estructura de la cromatina subtelomérica en los *loci* de los genes *EPA1-7* en *Candida glabrata*." presentada para obtener el grado de Maestra en Ciencias en Biología Molecular fue elaborada por Lluvia Leticia Rosas Hernández y aprobada el 13 de Julio de 2007 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
(Directora de tesis)

Dra. Lina Raquel Riego Ruiz
(Asesora de tesis)

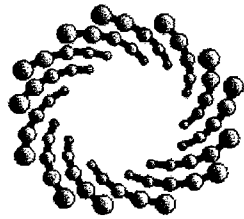
Dr. J. Sergio Casas Flores
(Asesor de tesis)



Créditos Institucionales

Esta tesis fue elaborada en el Laboratorio de Biotecnología Médica y Pecuaria 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. SEP-CB-2005-01-48304 de CONACyT.

Durante la realización del trabajo el autor recibió una beca académica del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología con No. de registro 202394, y del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A. C.



IPICYT

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

Acta de Examen de Grado

El Secretario Académico del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C., certifica que en el Acta 039 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 13 días del mes de julio del año 2007, se reunió a las 11:00 horas en las instalaciones del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C., el Jurado integrado por:

Dra. Lina Raquel Riego Ruiz	Presidenta	IPICYT
Dra. Irene Beatriz Castaño Navarro	Secretaria	IPICYT
Dr. J. Sergio Casas Flores	Sinodal	IPICYT

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

MAESTRA EN CIENCIAS EN BIOLOGÍA MOLECULAR

sustentó la C.

Lluvia Leticia Rosas Hernández

sobre la Tesis intitulada:

Análisis de la Estructura de la Cromatina Subtelomérica en los loci de los Genes EPA1-7 en Candida glabrata

que se desarrolló bajo la dirección de

Dra. Irene Beatriz Castaño Navarro

El Jurado, después de deliberar, determinó

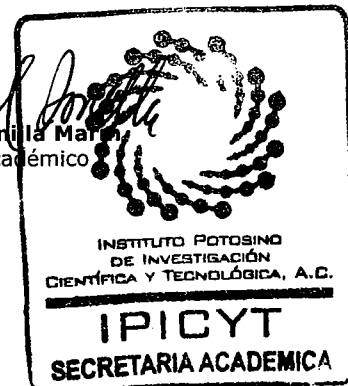
APROBARLA

Dándose por terminado el acto a las 13:00 horas, procediendo a la firma del Acta los integrantes del Jurado. Dando fé el Secretario Académico del Instituto.

A petición de la interesada y para los fines que a la misma convengan, se extiende el presente documento en la ciudad de San Luis Potosí, S.L.P., México, a los 13 días del mes julio de 2007.


Dr. Marcial Borjilla Maldonado
Secretario Académico


L.C.C. Ivonne Lizette Cuevas Velez
Jefa del Departamento de Asuntos Escolares



Para Lilia Hernández,
Alexander Rosas e
Israel Cañas.

*"Cuando una persona desea realmente algo, el universo entero conspira para que pueda realizar su sueño. Basta con aprender a escuchar los dictados del corazón y a descifrar un lenguaje que está más allá de las palabras, el que muestra aquello que los ojos no pueden ver."
Paulo Coelho*

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.

Al Dr. Alejandro De las Peñas por su asesoría.

Al Dr. Rubén López y al Dr. Luis Salazar, por las facilidades otorgadas en su laboratorio.

A la Dra. Lina Riego y al Dr. Sergio Casas por sus aportaciones y discusión en este escrito.

A todos los investigadores del IPICYT, UNAM y de la UAEM que generosamente colaboraron con material y reactivos en los inicios del proyecto.

Y a los que aportaron comentarios valiosos para enriquecer este trabajo.

CONTENIDO

CONSTANCIA DE APROBACIÓN DE LA TESIS	<i>ii</i>
CRÉDITOS INSTITUCIONALES	<i>iii</i>
ACTA DE EXAMEN	<i>iv</i>
DEDICATORIAS	<i>v</i>
AGRADECIMIENTOS	<i>vi</i>
LISTA DE TABLAS Y FIGURAS	<i>ix</i>
ANEXOS	<i>x</i>
ABREVIATURAS	<i>xi</i>
RESUMEN	<i>xii</i>
ABSTRACT	<i>xiii</i>
I. ANTECEDENTES	
• Introducción.	1
• Biología de <i>Candida glabrata</i> .	2
• Genoma de <i>C. glabrata</i> .	2
• <i>Candida glabrata</i> como patógeno oportunista.	3
<i>Epidemiología.</i>	3
<i>Resistencia a fluconazol.</i>	3
<i>Factores de virulencia.</i>	4
• Adherencia a células epiteliales.	5
• Genes <i>EPA</i> .	6
• Silenciamiento subtelomérico.	9
• Regulación de algunos genes <i>EPA</i> en <i>C. glabrata</i> .	13
II. MATERIALES Y MÉTODOS	
• Cepas de <i>C. glabrata</i> .	18
• Plásmidos.	18
• Oligonucleótidos.	18
• Medios de crecimiento.	19
• Transformación para generar mutantes en <i>C. glabrata</i> .	19
• Construcción de cepas mutantes.	20
• Análisis de la estructura genómica de las cepas mutantes.	21
• Análisis de la expresión del gen reportero <i>URA3</i> .	23

III. RESULTADOS	
• Construcción de cepas mutantes en los genes <i>SIR2/3/4</i> , <i>RIF1</i> , <i>HDF1/2</i> y <i>HST1/2</i> .	25
• Análisis de la expresión de genes reporteros <i>URA3</i> .	27
IV. DISCUSIÓN	38
• Sir2p, Sir3p y Sir4p regulan fuertemente la estructura de la cromatina de todas las regiones analizadas cercanas a los genes <i>EPA1-7</i> .	40
• Regulación diferencial en la estructura de la cromatina donde se encuentran los genes <i>EPA1-7</i> .	40
<i>Las proteínas Rif1p.</i>	40
<i>La regulación por Rif1p es diferente entre <u>C. glabrata</u> y <u>S.</u></i> <i>cerevisiae.</i>	41
<i>Las proteínas Ku70/80p.</i>	43
• Hst1p y Hst2p no juegan un papel principal en la regulación de los <i>loci</i> de los genes <i>EPA1-7</i> .	44
• ¿Por qué se regulan diferencialmente los genes <i>EPA</i> ?	45
• Proteínas de superficie codificadas en regiones subteloméricas en otros microorganismos.	46
• Perspectivas.	47
V. CONCLUSIONES	49
VI. REFERENCIAS	50
VII. ANEXOS	55

Lista de Figuras y Tablas

Figura 1. Dendograma de los genes parálogos a <i>EPA1</i> .	7
Figura 2. Mapa estructural de los genes <i>EPA 1-7</i> .	8
Figura 3. Silenciamiento subtelomérico en <i>S. cerevisiae</i> .	13
Figura 4. Estado transcripcional de los <i>loci</i> de los genes <i>EPA1-7</i> y ubicación del gen reportero <i>URA3</i> en cada cepa.	14
Figura 5. Efecto de silenciamiento del gen <i>URA3</i> analizado en un medio con 5-FOA.	15
Figura 6. Niveles de transcripción de los genes <i>EPA1-7</i> en una cepa silvestre y en las cepas <i>rif1</i> Δ , <i>rap1-21</i> y <i>sir3</i> Δ .	16
Figura 7. Mutación por delección/inserción y ubicación de los oligos para comprobar la mutación.	21
Figura 8. Ejemplo del análisis por PCR para comprobar la estructura genómica después de una mutación.	22
Figura 9. Análisis de la expresión del gen reportero <i>URA3</i> en la cepa parental CGM118 y en las mutantes derivadas.	29
Figura 10. Análisis de la expresión del gen reportero <i>URA3</i> en la cepa parental CGM121 y en las mutantes derivadas.	30
Figura 11. Análisis de la expresión del gen reportero <i>URA3</i> en la cepa parental CGM146 y en las mutantes derivadas.	31
Figura 12. Análisis de la expresión del gen reportero <i>URA3</i> en la cepa parental CGM147 y en las mutantes derivadas.	32
Figura 13. Análisis de la expresión del gen reportero <i>URA3</i> en la cepa parental CGM148 y en las mutantes derivadas.	33
Figura 14. Análisis de la expresión del gen reportero <i>URA3</i> en la cepa parental CGM149 y en las mutantes derivadas.	34
Figura 15. Análisis de la expresión del gen reportero <i>URA3</i> en la cepa parental CGM158 y en las mutantes derivadas.	35
Figura 16. Análisis de la expresión del gen reportero <i>URA3</i> en la cepa parental CGM159 y en las mutantes derivadas.	36
Figura 17. Análisis de la expresión del gen reportero <i>URA3</i> en la cepa parental CGM160 y en las mutantes derivadas.	37
Tabla 1. Descripción de las cepas mutantes construidas en este trabajo.	26
Tabla 2. Resumen del grado de dependencia de la estructura silenciosa de la cromatina en las regiones donde se ubican los genes <i>EPA-1-7</i> por las proteínas que intervienen en silenciamiento.	39

Anexos

Tabla 3.	Descripción genotípica y fenotípica de cepas parentales.	55
Tabla 4.	Descripción de todas las cepas analizadas.	56
Tabla 5.	Plásmidos para construir las mutaciones.	60
Tabla 6.	Oligos utilizados para comprobar las construcciones de cada mutación y para la construcción de plásmidos.	62
Figura 18.	Adherencia al vidrio de cepas con mutaciones en genes <i>SIR2/3/4</i> .	64
Figura 19.	Análisis por PCR de todas las cepas construidas en este trabajo.	65
Figura 20.	Análisis de inóculos a los 1, 4 y 8 días de incubación, en cepas parentales y cepas <i>hst1</i> Δ.	73

Abreviaturas

(Por sus siglas en inglés)

Als	<u>A</u> gglutinin- <u>l</u> ike <u>s</u> equence
CAA	<u>C</u> asa <u>a</u> mino <u>A</u> acids
EPA	<u>E</u> pithelial <u>A</u> dhesin
FRT	<u>F</u> lp <u>R</u> ecombination <u>T</u> argets
GPI	<u>G</u> licosyl- <u>P</u> hosphatidyl <u>I</u> nositol
hph	<u>h</u> ygromycin <u>p</u> hosphotransferase
HST	<u>H</u> omologues of <u>S</u> ir <u>T</u> wo
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
RT-PCR	<u>R</u> everse <u>T</u> ranscription- <u>P</u> olymerase <u>C</u> hain <u>R</u> eaction
RAP1	<u>R</u> epressor/ <u>A</u> ctivator <u>P</u> rotein
RIF1	<u>R</u> AP1- <u>I</u> nteracting <u>F</u> actor
SIR	<u>S</u> ilent <u>I</u> nformation <u>R</u> egulator
SGD	<u>S</u> accharomyces <u>G</u> enome <u>D</u> atabase
UTR	<u>U</u> n <u>T</u> ranslated <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> luoro <u>o</u> rotic <u>A</u> cid

Resumen

Análisis de la estructura de la cromatina subtelomérica en los *loci* de los genes *EPA1-7* en *Candida glabrata*.

Candida glabrata es un hongo patógeno oportunista que se adhiere con avidéz a células epiteliales humanas en cultivo, interacción que depende *in vitro* de la adhesina Epa1p. El gen *EPA1* forma parte de una familia grande de genes que codifican proteínas de pared celular con ancla glicosilfosfatidilinositol (GPI). La mayor parte de estos genes se localizan en regiones subteloméricas, lo que tiene como consecuencia una regulación negativa de la transcripción llamada silenciamiento subtelomérico. Nosotros demostramos, con anterioridad, que los genes *EPA1*, *EPA6* y *EPA7* son adhesinas importantes para la virulencia y que están regulados por las proteínas Sir3p, Rif1p y Rap1p, que participan en silenciamiento subtelomérico. El presente trabajo es un análisis sistemático de la estructura de la cromatina en las regiones subteloméricas de los genes *EPA1-7*, para determinar la dependencia de éstas por las proteínas que participan en el silenciamiento. Se realizó monitoreando la expresión de un gen reportero (insertado en diferentes posiciones a lo largo de estas regiones) en cepas de *C. glabrata* que llevan mutaciones nulas en los genes involucrados en silenciamiento. Por primera vez, se analiza la participación de las proteínas Sir2p, Sir4p, Ku70p, Ku80p, Hst1p y Hst2p en la regulación de la estructura de la cromatina en donde se ubican los genes *EPA1-7*. En resumen, demostramos que: 1) las proteínas Sir2p, Sir3p y Sir4p son esenciales para el silenciamiento subtelomérico en las regiones donde se ubican los genes *EPA1-7*; 2) la estructura silenciosa de la cromatina de cada *locus* depende en distinto grado de las proteínas Rif1p, Ku70p y Ku80p; y 3) las proteínas Hst1p y Hst2p, en general, no juegan un papel importante en la regulación por silenciamiento en estos *loci*. Este análisis nos permite concluir que la maquinaria de silenciamiento en *C. glabrata* es análoga a la de *S. cerevisiae*. La mayoría de las proteínas participan de manera similar en el silenciamiento de la cromatina excepto Rif1p, cuya participación en silenciamiento es muy diferente en las dos levaduras.

PALABRAS CLAVE. *Candida glabrata*, genes *EPA*, silenciamiento subtelomérico.

Abstract

Analysis of the subtelomeric chromatin structure of the *EPA1-7 loci* in *Candida glabrata*.

Candida glabrata is an important opportunistic fungal pathogen that adheres avidly to human epithelial cells in culture. This interaction *in vitro* depends on the adhesin Epa1p. *EPA1* is a member of a large family of genes that encode glycosylphosphatidylinositol-anchored cell wall proteins (GPI-CWPs) most of which are localized at subtelomeric *loci*. As a consequence of this localization, most of the *EPA* genes are transcriptionally silenced *in vitro*. We have previously shown that the *EPA1*, *EPA6* and *EPA7* genes encode adhesins important for virulence in *C. glabrata*, and that they are regulated by the silencing proteins Sir3p, Rif1p y Rap1p. This work is a systematic analysis of the chromatin structure at the *EPA1-7* subtelomeric regions, as determined by the expression of a *URA3* reporter gene inserted at various positions throughout these *loci*. We analyzed the dependence of the silent chromatin structure on the proteins that play a role in subtelomeric silencing. We determined for the first time the role that the proteins Sir2p, Sir4p, Ku70p and Ku80p play in the regulation of the chromatin structure at the *EPA1-7* regions. We established that: 1) the Sir2/3/4p proteins are essential for this silent chromatin structure; 2), that the Rif1p, Ku70p y Ku80p proteins regulate differentially the silent chromatin at each region analyzed, and 3) that neither Hst1p or Hst2p play a major role in the regulation of the chromatin structure at the *EPA* genes regions. Finally, we conclude that the subtelomeric silencing works similarly in *C. glabrata* and in *S. cerevisiae*, except for Rif1p, whose role in silencing differs between these two yeasts.

KEY WORDS. *Candida glabrata*, *EPA* genes, subtelomeric silencing.

I. ANTECEDENTES

Introducción

Candida glabrata es la segunda especie de levadura patógena oportunista más prevalente en humanos, después de *Candida albicans*. Ambas especies se han encontrado exclusivamente en asociación con mamíferos. En personas sanas forman parte de la flora normal de la mucosa del tracto gastrointestinal y vaginal (Kaur et al., 2005); sin embargo, en pacientes inmunodeprimidos pueden causar una serie de infecciones tanto sistémicas como en las mucosas. *C. glabrata* es responsable de aproximadamente el 15% de las candidosis hospitalarias alrededor del mundo (Pfaller and Diekema, 2004).

Se conoce relativamente poco acerca de los factores de virulencia que permiten a *C. glabrata* colonizar al huésped y causar infección, a diferencia de *C. albicans* donde se han descrito varias características que se han implicado en su virulencia, como la habilidad para crecer en forma dimórfica, la secreción de hidrolasas, o la capacidad de cambiar la morfología de las colonias (Kaur et al., 2005).

Candida glabrata se adhiere con avidez a células epiteliales humanas cultivadas *in vitro*, lo que se ha propuesto que es una característica importante, como primer paso, para la virulencia. Ésta interacción *in vitro* depende de la adhesina Epa1p (Cormack et al., 1999). El genoma de *C. glabrata* contiene múltiples parálogos de EPA1 que codifican para proteínas de pared celular, la mayoría de los cuales no se expresan *in vitro*. La mayor parte de los genes EPA se encuentran en regiones subteloméricas y, por lo tanto, están sujetos a silenciamiento subtelomérico. Existe evidencia de que este silenciamiento, en algunos genes EPA, depende de las proteínas Sir3p, Rif1p y Rap1p (Castano et al., 2005; De Las Penas et al., 2003). Otras proteínas que participan en silenciamiento subtelomérico en *Saccharomyces cerevisiae*, una levadura muy cercana filogenéticamente a *C. glabrata*, son las proteínas Sir2p y Sir4p (Rusche et al., 2003); Ku70p (codificada por HDF1) y

Ku80p (codificada por *HDF2*) (Downs and Jackson, 2004); y las proteínas homólogas a Sir2p: Hst1p (Brachmann et al., 1995) y Hst2p (Perrod et al., 2001).

Biología de *Candida glabrata*

Candida glabrata es un hongo no dimórfico que crece solamente como levadura, aunque se ha observado que puede formar pseudohifas en respuesta a limitación por nitrógeno, una condición ambiental extrema (Csank and Haynes, 2000). Mide aproximadamente de 1 a 4 μm , es considerablemente más pequeña que *C. albicans*, cuyas medidas son de 4 a 6 μm . Forma colonias de color crema, lisas y brillantes, que son relativamente indistinguibles de otras especies de *Candida*, excepto por el tamaño relativo. *C. glabrata* es distinguible de otras especies de *Candida* por su genoma haploide y la incapacidad de crecer como hifa (Fidel et al., 1999).

La taxonomía de *C. glabrata* es la siguiente: Eucarionte; *Ascomycota*; *Saccharomycotina*; *Saccharomycetes*; *Saccharomycetales*; *mitosporic Saccharomycetales*; *Candida*; *Candida glabrata* (NCBI).

Genoma de *C. glabrata*

El genoma de la cepa CBS138 de *C. glabrata* está totalmente secuenciado, forma parte de la base de datos Genolevures (Genolevures, 2005 a la fecha). Consta de 12.3 Mb organizadas en 13 cromosomas, con un contenido de G+C de 38.8%. Este genoma rico en AT contiene un total de 5283 secuencias codificantes, con un promedio en tamaño de 493 codones cada secuencia. Los genomas de *C. glabrata* y *S. cerevisiae* muestran un alto grado de sintenia, en promedio presentan 65% de identidad en aminoácidos entre proteínas ortólogas (Kaur et al., 2005).

***Candida glabrata* como patógeno oportunista**

Epidemiología

La incidencia de candidosis sistémicas ha aumentado dramáticamente en los últimos 50 años. Especies de *Candida* son la cuarta causa de infecciones de flujo sanguíneo y la tendencia que se percibe es que la incidencia de candidosis sistémicas continúe incrementando. Las infecciones por *Candida* generalmente colonizan tracto gastrointestinal, piel y superficie de las mucosas. Los mayores factores de riesgo en infecciones por hongos son: inmunosupresión, ruptura de barreras anatómicas como la piel y tratamiento con antibióticos. Las infecciones más frecuentes son causadas por *C. albicans*; sin embargo, otros hongos patógenos que han emergido recientemente son especies de levadura como *C. glabrata*, *C. krusei* y *C. tropicalis*. Más del 75% de infecciones por *Candida* en los años 80 eran causadas por *C. albicans*; pero recientemente ésta proporción a disminuido al 60% mientras que infecciones por otras especies de *Candida* han aumentado, específicamente las causadas por *C. glabrata* han incrementado del 2% al 26% (Richardson, 2005).

Resistencia a fluconazol

El incremento en la incidencia de candidosis por *C. glabrata* correlaciona con el aumento en el uso de azoles, especialmente el fluconazol; este agente antifúngico es el más comúnmente usado para tratar infecciones por *Candida*. *C. glabrata* es resistente de manera innata a este antifúngico, y su resistencia se ha visto claramente incrementada con el uso del fluconazol (Hitchcock et al., 1993; Richardson, 2005; Sanglard et al., 2001). Una investigación reciente en México reporta que *C. glabrata*, después de *C. albicans*, es el aislado más frecuente y el más resistente a antifúngicos entre un grupo de pacientes sanos analizados (Sanchez-Vargas et al., 2005).

Factores de virulencia

En *C. albicans* están bien caracterizados varios factores importantes para la virulencia, como son la secreción de aspartil proteinasas extracelulares (SAPs) durante la infección (Naglik et al., 2004) y la secreción de fosfolipasa B, implicada tanto en la difusión del organismo a partir del tracto gastrointestinal como en la diseminación por sangre (Dolan et al., 2004; Ghannoum, 2000). Algunas cepas de *C. glabrata* presentan actividad de fosfolipasa; sin embargo, su papel en virulencia no se ha analizado completamente (Kantarcioglu and Yucel, 2002). Al igual que en *C. albicans*, el genoma de *C. glabrata* codifica para varias aspartil proteasas extracelulares con ancla GPI, las cuales forman una familia de proteínas llamadas Yps (relacionadas con los genes *YPS* (Yapsin) de *S. cerevisiae*). Los genes *YPS* se requieren para la virulencia y para sobrevivir dentro de los macrófagos. Además, son importantes para la integridad de la pared celular, la adherencia a células de mamífero y el re-modelamiento de la pared celular, liberando al medio proteínas con ancla GPI (Kaur et al., 2007).

Otro factor importante para la virulencia de *C. albicans* es la habilidad de crecer en diferentes formas morfológicas (levadura, pseudohifa e hifa) (Whiteway and Oberholzer, 2004). Se ha observado que *C. glabrata* puede formar pseudohifas en respuesta al ayuno de nitrógeno, que es una situación extrema (Csank and Haynes, 2000). El significado de la formación de pseudohifas en *C. glabrata* no se conoce; además, esta forma no se ha encontrado en aislados clínicos.

La capacidad de *C. albicans* de adherirse a tejidos del huésped mediante las proteínas Als (**A**gglutinin-**l**ike **s**equence) se ha identificado como un primer paso importante para la virulencia (Sheppard et al., 2004). Las cepas de *C. glabrata* también tiene la capacidad de adherirse fuertemente a tejidos epiteliales y ésta adherencia está mediada por una familia de proteínas llamadas Epa (Castano et al., 2005; Cormack et al., 1999; De Las Penas et al., 2003). Sin embargo, la

expresión de los genes que codifican estas dos clases de proteínas (Epa y Als), está regulada de manera muy diferente en cada microorganismo (Castaño, 2006b)

Otra característica importante de *C. glabrata* es que presenta una alta capacidad de formar biopelículas en superficies de plástico. Esto representa un problema en medicina cuando se utilizan catéteres, ya que estos pueden servir como portadores de biopelículas de hongos y esto provee un reservorio interno de células resistentes al fármaco. La adhesina que participa principalmente en este fenómeno es Epa6p. Mutaciones en *SIR4*, un regulador negativo del gen *EPA6*, produce la formación de biopelículas con mayor eficiencia, probablemente debido a la sobre expresión de *EPA6* (Iraqi et al., 2005).

Adherencia a células epiteliales

La primera etapa de la infección es la colonización del huésped. La mayor parte del organismo humano está protegido del ambiente por la piel. Así, los límites protectores de regiones como la boca, tracto digestivo, urinario y genital femenino, están constituidos por una monocapa de células epiteliales. Estos epitelios presentan una resistencia activa frente a la colonización y tienen mecanismos para eliminar microorganismos indeseables. Los patógenos que infectan estas superficies poseen medios específicos que evitan procesos de limpieza por parte del huésped. Por ejemplo, aquellos que infectan el tracto urinario resisten a la acción limpiadora de la orina, al adherirse fuertemente al epitelio mediante adhesinas, proteínas que reconocen y se unen a receptores u otras moléculas de la célula huésped (Alberts, 2002). Además, se ha visto que la habilidad de los patógenos para establecer una asociación con superficies del epitelio es muy importante para numerosos microorganismos que colonizan e infectan epitelios. Hay evidencia que apoya el papel de la adherencia en la virulencia de *C. albicans* (Filler and Sheppard, 2006; Sundstrom, 2002). Con respecto a *C. glabrata*, se sabe que se adhiere con avidez a células epiteliales humanas cultivadas *in vitro*, ésta adherencia está mediada por la adhesina Epa1p. La ausencia de ésta

proteína reduce la adherencia *in vitro* en un 95%, pero no muestra fenotipo *in vivo* en modelos murinos de candidosis sistémicas o vaginales; es decir, la cepa que no contiene el gen *EPA1* es igual de virulenta que la cepa silvestre (Cormack et al., 1999). Este resultado se debe a que en *C. glabrata* existe redundancia en el genoma con respecto a las proteínas que codifican adhesinas. Las adhesinas adicionales probablemente compensan la ausencia de *EPA1 in vivo*.

Genes *EPA*

Epa1p, codificada por el gen *EPA1*, es una lectina cuya función es dependiente de Ca^{2+} que reconoce en el huésped glicoconjugados que contienen N-acetil lactosamina (Cormack et al., 1999). Epa1p es miembro de una familia grande de proteínas de pared celular con un ancla glicosilfosfatidilinositol (GPI). La estructura de la proteína cuenta con tres regiones: una secuencia hidrofóbica C-terminal, que es señal para la adición del grupo ancla GPI; la región N-terminal que media interacciones específicas proteína-ligando; y una región central, que consta de tres repeticiones de una secuencia de 40 aminoácidos rica en serinas y treoninas, que es importante para la localización dentro de las diferentes capas de la pared celular. Ésta proteína presenta modificaciones post-traduccionales, el péptido señal C-terminal se corta y se reemplaza por un ancla GPI, la región media de la proteína se glicosila en las posiciones N y O en los residuos de serinas y treoninas. (Frieman et al., 2002). Posteriormente, la proteína se dirige a la membrana plasmática donde se corta el ancla GPI y el resto de la proteína se liga a los β 1-6 glucanos de la pared celular (Lu et al., 1995), de forma que la proteína queda expuesta al ambiente extracelular (Frieman et al., 2002).

El genoma de *C. glabrata* contiene múltiples parálogos de *EPA1* (Figura 1) que codifican para proteínas de pared celular y en conjunto forman la familia de genes *EPA*. Notablemente, los genes *EPA* se encuentran en regiones subteloméricas. Como consecuencia de ésta localización, la mayoría de los genes *EPA* están silenciados transcripcionalmente por la maquinaria análoga a la maquinaria de

silenciamiento de *S. cerevisiae*, que es una regulación basada en cromatina silenciosa.

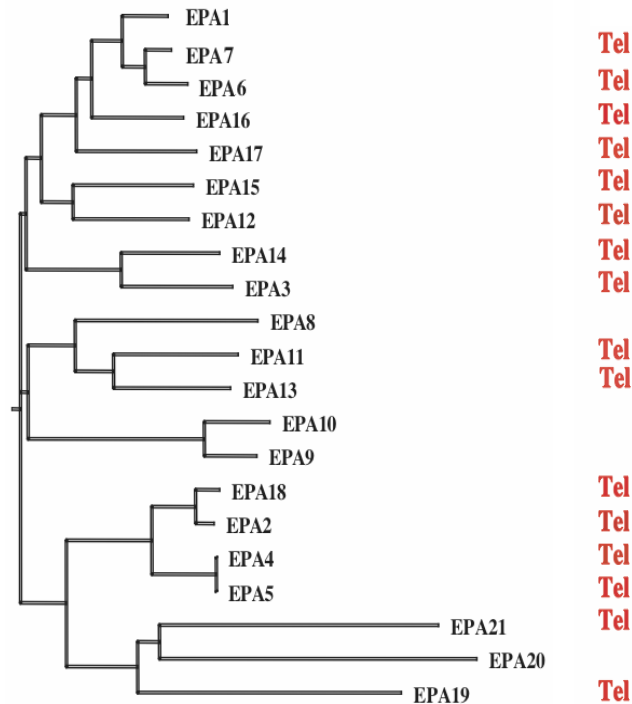


Figura 1. Dendrograma que muestra la relación de las secuencias de los genes parálogos al gen *EPA1*. Estos genes forman una familia que codifican proteínas de pared celular. El dendrograma se construyó a partir de las secuencias de aminoácidos del dominio de unión al ligando N-terminal, de las proteínas Epa, usando la metodología “neighbor-joining”. La mayoría de ellos se encuentran localizados en regiones subtelméricas, marcadas con Tel (Castaño, 2006a).

En el *locus* de *EPA1*, que se encuentra en la región subtelmérica del cromosoma E, se localizan cuatro genes que codifican proteínas de pared celular con ancla GPI llamados *HYR1* (ortólogo del gen *HYR1* de *C. albicans*), *EPA1*, *EPA2* y *EPA3*. Río arriba de estos 4 genes, se encuentra un gen ortólogo al gen *ISC1* (YER019w) de *S. cerevisiae* que codifica para la fosfolipasa C de fosfoesfingolípido-inositol (Figura 2), y a partir de éste, río arriba los genes conservan sintenia con *S. cerevisiae*.

Los genes *EPA4* y *EPA5* son esencialmente idénticos (99% de identidad). Estos genes están presentes en el cromosoma I como secuencias invertidas repetidas. Las secuencias repetidas incluyen una región de 2.8 kb río arriba no codificante, la región codificante y 0.9 kb de la región 3' no codificante. Estos invertidos repetidos

están separados por una secuencia única de 1.8 kb (De Las Penas et al., 2003). Río arriba se encuentra el gen *PET56* (Figura 2), cuyo gen ortólogo en *S. cerevisiae* codifica una ribosa metiltransferasa que modifica nucleótidos en el ARNr 21S de la mitocondria. El fenotipo mutante, presenta deficiencia en el crecimiento en una fuente de carbono no fermentable (SGD project).

Los genes *EPA6* y *EPA7* se encuentran localizados cada uno adyacente a uno de los telómeros del cromosoma C. Estos genes son muy parecidos, tienen un 94% de identidad a lo largo de toda la secuencia genómica codificante. Ambos genes se transcriben hacia su respectivo telómero (Figura 2) (Castano et al., 2005).

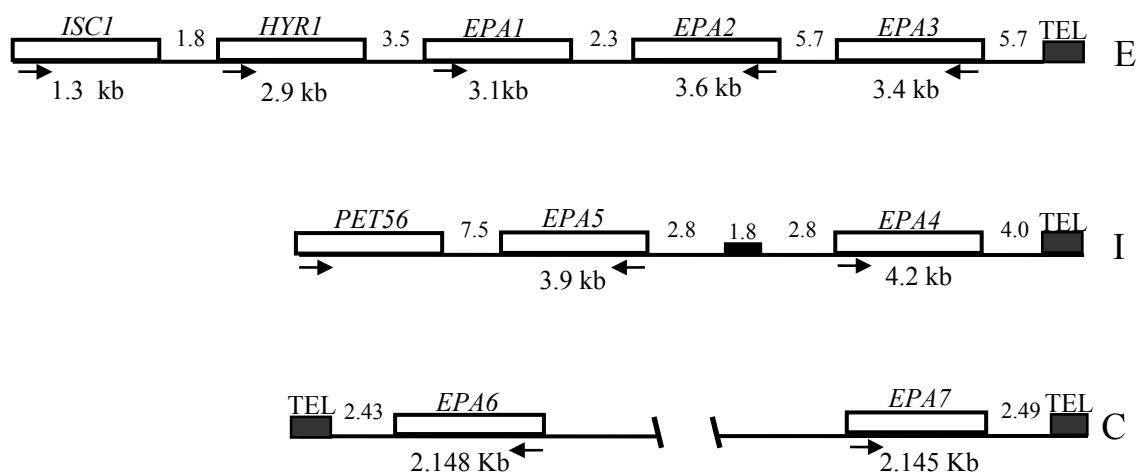


Figura 2. Mapa esquemático de los loci genes *EPA1-7*. Adyacente al telómero, se indica el cromosoma donde se encuentra cada grupo de genes. Los números muestran el tamaño de los genes (debajo de cada rectángulo, que representa un gen) y la distancia intergénica en kb (entre los genes o entre el gen y el telómero). Las flechas indican la dirección de la transcripción.

Este tipo de arreglo en genes de virulencia, está conservado en diferentes organismos. Familias de genes que expresan variantes de proteínas de pared celular se encuentran adyacentes a los telómeros en genomas de microorganismos patógenos y no patógenos. Este ADN subtelomérico está normalmente como heterocromatina, y es un mecanismo de control de genes subteloméricos (Barry et al., 2003; Merrick and Duraisingh, 2006).

Silenciamiento subtelomérico

La localización subtelomérica de algunos de los genes *EPA* tiene implicaciones importantes para su expresión, ya que están regulados negativamente por silenciamiento subtelomérico; de manera que *in vitro* todos los genes *EPA*, excepto *EPA1*, se encuentran silenciados transcripcionalmente por la maquinaria análoga a la maquinaria de silenciamiento de *S. cerevisiae* (Castano et al., 2005; De Las Penas et al., 2003). El silenciamiento involucra la formación de una estructura especializada de cromatina altamente condensada que impide la interacción entre activadores de la traducción o ARN polimerasa con el ADN. Como resultado, se bloquea la expresión de los genes dentro del dominio silenciado (Rusche et al., 2003). La maquinaria de silenciamiento está compuesta por una serie de proteínas tales como: Rap1p, Sir2p, Sir3p, Sir4p, Ku70p, Ku80p y Rif1p.

En *S. cerevisiae*, el gen *RAP1* codifica para una proteína esencial de unión a ADN que participa en diversos procesos. Detecta y controla la longitud de las repeticiones de los telómeros (Shore, 1997) y reprime mediante silenciamiento transcripcional las copias secundarias de los genes de apareamiento (*HML* y *HMR*). La mutante nula en *RAP1* no es viable; no obstante, algunas mutaciones puntuales interrumpen el silenciamiento tanto en los telómeros como en los *loci* de apareamiento silenciosos. Otras mutaciones en este gen o la sobreproducción de la proteína alteran la longitud de los telómeros (Kurtz and Shore, 1991). Otra actividad adicional de Rap1p es activar transcripcionalmente los genes que codifican proteínas ribosomales y enzimas glicolíticas (Lieb et al., 2001). En todos estos procesos, la función esencial de Rap1p es la unión a una secuencia específica de ADN, y esta unión con frecuencia regula la estructura de la cromatina (Konig et al., 1996). El silenciamiento subtelomérico en *S. cerevisiae*, comienza con la unión de Rap1p a secuencias repetidas en los telómeros (regiones libres de histonas) que contienen sitios de unión específicos de Rap1p, en promedio cada 40 pares de bases. Rap1p recluta al complejo de proteínas

Sir3p-Sir4p, para extender el silenciamiento a lo largo de la región subtelomérica (Moretti et al., 1994).

Las proteínas Sir, en *S. cerevisiae*, juegan un papel como proteínas represoras tanto en los loci *HML* y *HMR* como en el silenciamiento de genes ubicados en regiones subteloméricas. Mutaciones en los genes *SIR2*, *SIR3* y *SIR4* tiene como consecuencia la expresión de los genes que se encuentran en estas regiones. Las proteínas Sir se reclutan a través de una serie de interacciones proteína-proteína. Sir1p aumenta la probabilidad de reclutar otras proteínas Sir; pero no se extiende a través de las regiones silenciadas como Sir2p, Sir3p y Sir4p, únicamente se requiere para establecer eficientemente el silenciamiento; sin embargo, no es esencial para mantenerlo. En *C. glabrata* no se encuentra el gen *SIR1*; no obstante, se ha observado que el silenciamiento se puede establecer de manera eficiente en regiones subteloméricas aun en su ausencia. Sir2p es una desacetilasa de histonas cuya función es dependiente de NAD^+ , modifica los tallos de lisinas de los extremos NH_4 terminal de las histonas H3 y H4 para crear sitios de unión de alta afinidad para Sir3p y Sir4p, ya que estas dos proteínas no tienen actividad enzimática identificada; pero juegan un papel estructural en el ensamble de la cromatina silenciosa. Otra actividad de Sir2p es el silenciamiento del locus ADNr. Sir3p y Sir4p forman un complejo que se recluta al telómero por Rap1p. Una vez que el complejo se une a Rap1p, interacciones cooperativas permiten que este complejo se propague a través de la región silenciosa. Sir3p y Sir4p se unen a los tallos de lisinas desacetiladas por Sir2p, en los extremos amino-terminal de las histonas H3 y H4 (Rusche et al., 2003).

Otros genes homólogos a *SIR2*, en *S. cerevisiae*, son *HST1*, *HST2*, *HST3* y *HST4*. Al igual que Sir2p, tienen actividad de desacetilasas dependientes de NAD^+ (Brachmann et al., 1995). Hst1p forma parte de un complejo de proteínas llamado Set3C que incluye actividad de desacetilación de histonas tanto dependiente como independiente de NAD^+ . El complejo Set3C reprime genes tempranos de esporulación. Sin embargo, Hst1p no es un componente esencial para este

complejo (Pijnappel et al., 2001). Ninguna mutación en los genes *HST* es comparable con la mutación en *SIR2*; es decir, la ausencia de *HST1-4* no activa los genes de apareamiento ni genes reporteros encontrados en regiones subteloméricas; sin embargo, al sobreexpresar el gen *HST1* se restaura el silenciamiento en una cepa mutante en *SIR2* (Brachmann et al., 1995). Se ha demostrado que Hst2p tiene una actividad fuerte de desacetilasa de histonas y es más activa que Sir2p en substratos de histonas *in vitro* (Landry et al., 2000). Hst2p es una proteína citoplasmática a diferencia de Hst1p, que solamente se encuentra en el núcleo. Aunque la sobreexpresión de *HST2* no restaura el silenciamiento en una cepa *sir2Δ*, la sobreexpresión de *HST2* influye en los eventos de silenciamiento nuclear dependientes de *SIR2*, desreprimiendo el silenciamiento subtelomérico mientras incrementa la represión en el *locus* ADN_r (Perrod et al., 2001). Poco se conoce de *HST3* y *HST4*, se ha reportado que la doble mutante *hst3Δ hst4Δ* es deficiente en silenciamiento subtelomérico. Estos resultados indican que aunque los genes *HST1-4* no son completamente redundantes con *SIR2*, pueden participar en silenciamiento (Brachmann et al., 1995).

En *S. cerevisiae*, los genes que codifican para las proteínas nucleares Ku70p y Ku80p son *HDF1* y *HDF2*, respectivamente. Estas proteínas están conservadas desde bacterias a eucariontes superiores. Forman un complejo heterodimérico extremadamente estable. Se ha observado que el fenotipo en *S. cerevisiae*, de una cepa donde se han mutado los dos genes *HDF1* y *HDF2* es indistinguible de cepas en las que se ha mutado sólo uno de ellos. Esto refleja que funcionan primordialmente como heterodímero. Estas proteínas se han involucrado principalmente en la reparación de rupturas de doble cadena de ADN, también se ha observado que ayudan a localizar a los télómeros en la periferia nuclear y se requieren para el establecer y mantener el silenciamiento transcripcional en la cromatina subtelomérica. Ku70p y Ku80p se unen a los extremos del télómero y favorecen la interacción del complejo Sir3p-Sir4p con la proteína Rap1p. En una cepa mutante *hdf1Δ*, la mayoría de proteínas Sir2/3/4p son desplazadas del télómero y como consecuencia, se expresan los genes subteloméricos que

permanecían reprimidos por Sir2/3/4p. Se ha observado que Ku70p/Ku80p se unen al ADN de manera independiente de la secuencia (Boulton and Jackson, 1998; Downs and Jackson, 2004; Gasser et al., 2004; Hediger et al., 2002; Mishra and Shore, 1999). Sin embargo, en un artículo reciente donde estudian la unión *in vivo* de Ku70p/Ku80p al promotor de IL-2 en células T, por inmunoprecipitación de la cromatina, se demuestra que Ku70p/Ku80p se unen a secuencias ricas en A-T (Shi et al., 2007).

Rap1p también interactúa, en *S. cerevisiae*, con dos proteínas adicionales Rif1p y Rif2p. Estas proteínas tienen un papel principalmente en la regulación de la longitud de los telómeros. Una cepa mutante nula en *RIF1* tiene los telómeros muy alargados, además se observa un efecto indirecto en el silenciamiento. Este último fenotipo es debido a que al alargarse los telómeros en una cepa *rif1* Δ , las proteínas Rap1p y Sir2/3/4p se reclutan hacia este sitio lo que resulta en la pérdida de silenciamiento, notable en los *loci* de apareamiento *HMR* y *HML*. Es decir, las proteínas Sir2/3/4p se titulan al unirse a telómeros más largos. En esta cepa *rif1* Δ , también se observa un incremento modesto en el silenciamiento de genes reporteros ubicados inmediatamente adyacentes al telómero, probablemente como resultado del incremento en la concentración local de Rap1p-Sir3p/Sir4p en esta región (Wotton and Shore, 1997). Asimismo, se ha demostrado que Rif1p actúa como un regulador negativo del silenciamiento al unirse al carboxilo terminal de Rap1p, lo que a su vez interfiere con la interacción entre el complejo Sir3p/Sir4p y Rap1p (Buck and Shore, 1995).

En resumen, en *S. cerevisiae* Rap1p se une a los telómeros y recluta al complejo Sir3p-Sir4p, el cual a su vez recluta a Sir2p que desacetila las histonas adyacentes para crear sitios de afinidad hacia el complejo Sir3p-Sir4p y que este se extienda en la región subtelomérica, como resultado esta región estará transcripcionalmente reprimida. Ku70p y Ku80p favorecen la interacción del complejo Sir3p-Sir4p con la proteína Rap1p; Rif1p compete con el complejo Sir3p-Sir4p, por la unión a la proteína Rap1p. En una cepa mutante *hdf1* Δ , se pierde

completamente el silenciamiento por Sir2/3/4p. El cual es restaurado en una doble mutante *hdf1Δ rif1Δ* (Figura 3) (Hediger et al., 2002).

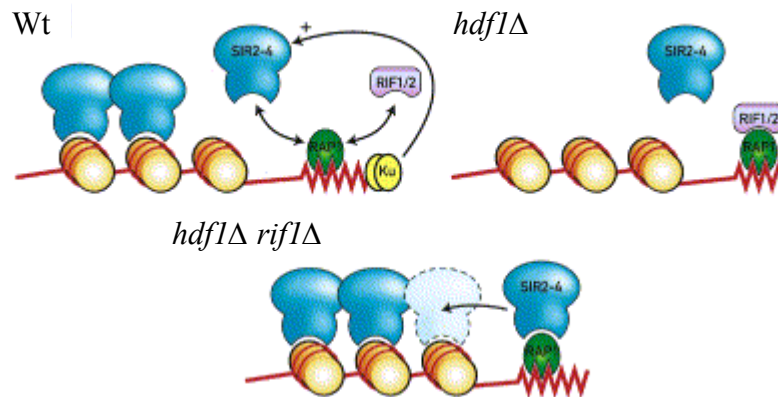


Figura 3. Silenciamiento subtelomérico en *S. cerevisiae*. En una cepa silvestre (Wt, por sus siglas en inglés) las proteínas Ku70p y Ku80p favorecen la interacción entre Rap1p y el complejo Sir3/4p. Rif1p compite con el complejo Sir3/4p por la unión a Rap1p. En una cepa *hdf1Δ* la mayoría de proteínas Sir2/3/4p son desplazadas del telómero y los genes subteloméricos que permanecían reprimidos por las proteínas Sir2/3/4p ahora se pueden expresar. En una cepa *rif1Δ*, Rap1p recluta más eficientemente al complejo Sir3/4p (imagen no mostrada). La pérdida de silenciamiento en una cepa *hdf1Δ* se puede restaurar en una doble mutante *hdf1Δ rif1Δ*, debido a que se elimina el competidor de las proteínas Sir3/4p (Hediger et al., 2002).

En *C. glabrata* existen genes ortólogos a los genes *RAP1*, *SIR2*, *SIR3*, *SIR4*, *HST1*, *HST2*, *HDF1*, *HDF2* y *RIF1*. La función en el silenciamiento subtelomérico que desempeñan las proteínas codificadas por estos genes, es, en esencia, comparable a la función en *S. cerevisiae*.

Regulación de algunos genes EPA en *C. glabrata*

Datos de nuestro laboratorio nos han permitido estudiar el estado transcripcional de las regiones donde se encuentran los genes EPA1-7. Existe evidencia de que al menos 4 telómeros en *C. glabrata*, donde se encuentran éstos genes, están sujetos a silenciamiento. Esto se determinó analizando la expresión o represión de genes reporteros *URA3* insertados en regiones intergénicas de los genes EPA y entre genes EPA y sus telómeros.

Para ello, se utilizaron como cepas silvestres cepas de *C. glabrata* cuyo gen endógeno *URA3* se había eliminado completamente (genotipo *ura3Δ*) y en un

paso posterior, se les insertó el gen *URA3* como reportero de la estructura de la cromatina, utilizando el transposón Tn7-*URA3* modificado (Castano et al., 2003). Las inserciones de *URA3*, dieron lugar a 9 cepas parentales con inserciones únicas: CGM118, CGM121, CGM146, CGM147, CGM148, CGM149, CGM158, CGM159 y CGM160 (Figura 4).

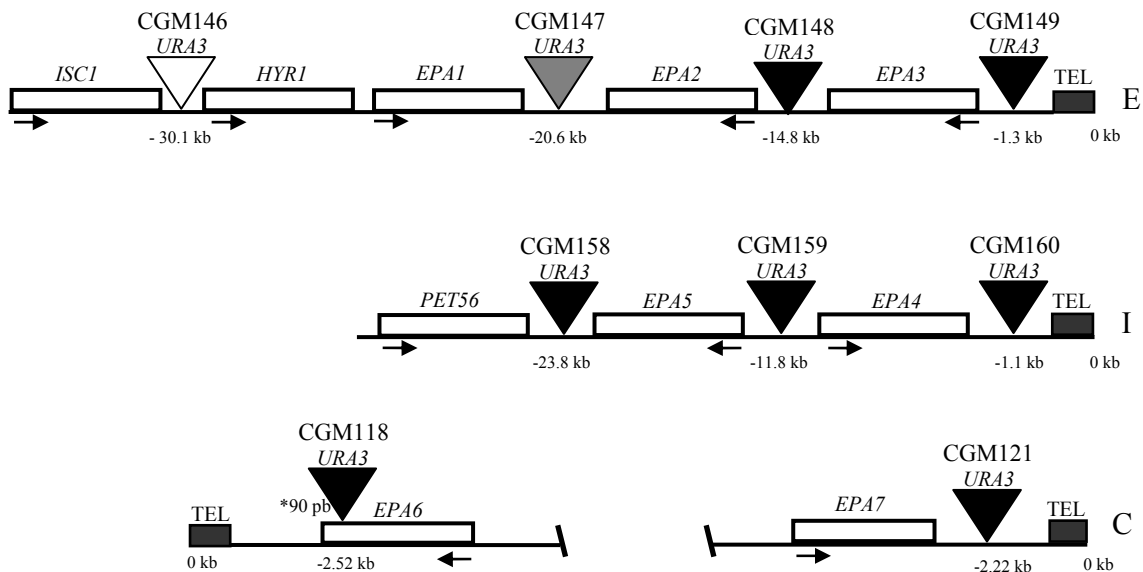


Figura 4. Estado transcripcional de los loci de los genes *EPA1-7* y ubicación del gen reportero *URA3* en cada cepa. Cada triángulo inverso representa la inserción del gen reportero *URA3* en cada locus. Cada uno está marcado con el nombre de la cepa parental que lo contiene, en total son 9 cepas. La distancia de la inserción a partir del telómero se muestra en kb. El color del triángulo representa el grado de silenciamiento del gen *URA3* en las cepas parentales, medido por la habilidad de crecer en medio con 5-FOA. Los triángulos negros indican que el gen *URA3* está silenciado, son cepas 5-FOA^R. El triángulo gris en la cepa CGM147, entre *EPA1* y *EPA2*, indica que la cepa produce un número pequeño de colonias 5-FOA^R; sin embargo, la mayoría de las células de ese cultivo están expresando el gen *URA3* (5-FOA^S). El triángulo blanco, en la cepa CGM146, entre *HYR1* y *EPA1*, denota que el gen *URA3* es transcripcionalmente activo, 5-FOA^S. Las flechas indican la dirección de transcripción. Adyacente a cada telómero se indica el cromosoma donde se encuentra el gen *EPA* o el grupo de genes *EPA*. * 90 pb, indica que el gen reportero *URA3*, en la cepa CGM118, se encuentra a 90 pares de bases del codón de terminación de la transcripción.

El grado de expresión del gen reportero *URA3* se evaluó utilizando un ensayo de crecimiento en medio con 5-FOA (Figura 5). En este ensayo, cepas que expresen el gen *URA3* no pueden crecer en 5-FOA, debido a que forman un producto tóxico a partir de este reactivo y las células mueren. En el cromosoma E se puede observar que el silenciamiento del gen *URA3* se va reduciendo, hasta perderse, al

alejarse el reportero del telómero. En las cepas CGM148 y CGM149 la inserción de *URA3* está completamente silenciada; mientras que en la cepa CGM147 casi todas las células expresan *URA3* (5-FOA^S), pero algunas pocas están silenciadas y producen colonias 5-FOA^R. La inserción de *URA3* en la cepa CGM146 se expresa en todas las células; es decir, ya no está sujeta a silenciamiento subtelomérico. En los cromosomas I y C, las inserciones que llevan las cepas CGM158, CGM159, CGM160, CGM118 y CGM121, se encuentran completamente silenciadas (Castano et al., 2005; De Las Penas et al., 2003).

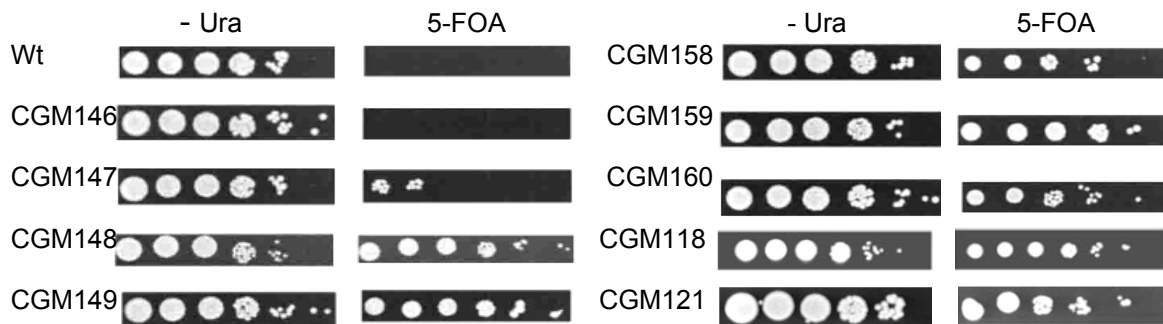


Figura 5. Efecto de silenciamiento del gen *URA3* analizado en un medio con 5-FOA. El análisis consta de las 9 cepas parentales y la Wt, crecidas en un medio sintético completo sin uracilo (- Ura) y en uno con 5-FOA para determinar el grado de silenciamiento del gen reportero *URA3*. Las cepas que expresen el gen *URA3*, no pueden crecer en el medio con 5-FOA, únicamente crecerán si el gen *URA3*, se encuentra bajo silenciamiento (Castano et al., 2005; De Las Penas et al., 2003).

En el año 2005, Castaño y colaboradores identificaron tres mutantes hiperadherentes en *C. glabrata* mediante inserción al azar del transposón Tn7. La primera mutante contenía una inserción larga (de 14 kb) en la región 3' UTR del gen *EPA7*. Ésta inserción alejaba 19 kb al promotor de *EPA7* del telómero, de tal forma que se perdía el silenciamiento subtelomérico, y como resultado *EPA7* podía expresarse y mediar adherencia. Las otras dos mutantes hiperadherentes encontradas, interrumpían los genes *SIR3* y *RIF1*. Determinaron, que tanto este fenotipo hiperadherente como el incremento en la colonización de riñón en un modelo murino, en las cepas mutantes *sir3* Δ y *rif1* Δ , depende principalmente de la desrepresión de *EPA1*, *EPA6* y *EPA7*. Estos y otros experimentos mostraron que

estas tres proteínas codificadas en *C. glabrata* son adhesinas. Por otra parte, comprobaron que el silenciamiento de los genes *EPA1*, *EPA4*, *EPA5*, *EPA6* y *EPA7* en *C. glabrata* está mediado, de manera diferencial por las proteínas Sir3p, Rap1p y Rif1p (Figura 6). Estas proteínas están codificadas por los genes ortólogos *SIR3*, *RAP1* y *RIF1* en *S. cerevisiae*, donde se sabe están implicados en silenciamiento subtelomérico (Castano et al., 2005).

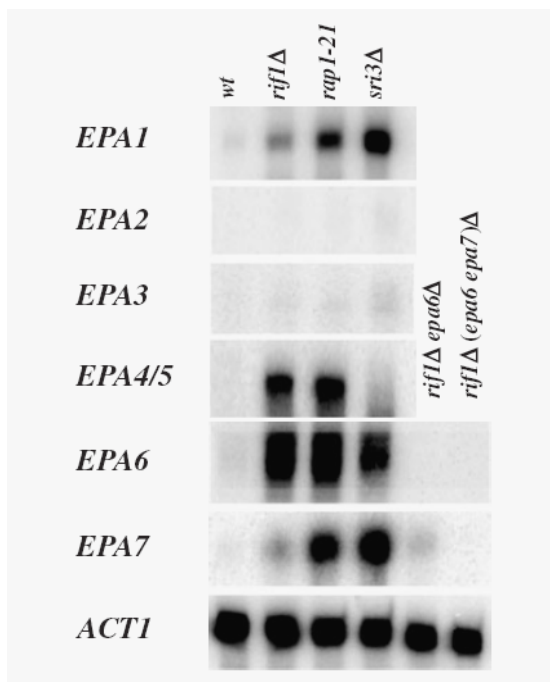


Figura 6. Ensayo de protección a la nucleasa S1, donde se muestran los niveles de transcripción de los genes *EPA1-7* en una cepa silvestre (Wt) y en las cepas *rif1*Δ, *rap1-21* y *sir3*Δ. Se observa que los genes *EPA* no se expresan de manera similar en cada una de las cepas mutantes. Lo que nos indica, que existe una regulación diferencial y que los genes *EPA*, responden en distinto grado a las proteínas Rif1p, Rap1p y Sir3p. Debido a que en este ensayo no es posible distinguir entre *EPA4* y *EPA5*, ya que son esencialmente iguales, fueron tratados como un gen único. La mutación en *rap1-21* es una mutación en la que se eliminaron los últimos 24 aminoácidos del extremo carboxilo terminal de Rap1p, debido a que la mutación nula es letal. El gen de actina se utilizó como control de carga (Castano et al., 2005).

Investigaciones subsecuentes demostraron que una cepa que no contiene los genes *EPA1*, *EPA6* y *EPA7* no coloniza eficientemente el riñón y la vejiga en un modelo de infección de vías urinarias del ratón. Estos datos apuntan la importancia de las adhesinas Epa1p, Epa6p y Epa7p en la virulencia de *C. glabrata*. De manera interesante, se ha determinado que *EPA6* se induce en riñón y vejiga durante una infección de vías urinarias del ratón. En este caso, la señal importante para la desrepresión de *EPA6*, es la deficiencia de niacina o ácido nicotínico en orina (Domergue et al., 2005). El ácido nicotínico (NA) es un precursor de NAD, que a su vez es necesario para la actividad de desacetilasa de histonas de Sir2p. Por esta razón en orina, donde los niveles de NA son bajos, la actividad de Sir2p es menor y produce una inducción de *EPA6*.

En este trabajo analizamos la estructura de la cromatina, en *C. glabrata*, en las regiones subteloméricas donde se encuentran los genes *EPA1-7* y el grado en que dependen las regiones (si es que lo hace) de las proteínas Sir2p, Sir3p, Sir4p, Rif1p, Ku70p, Ku80p, Hst1p y Hst2p, que participan en el silenciamiento en *S. cerevisiae*.

Para ello, utilizamos las cepas parentales CGM118, CGM121, CGM146, CG147, CGM148, CGM149, CGM158, CGM159 y CGM160, descritas anteriormente (Figura 4, pág. 14). A cada una de estas cepas les introdujimos, por transformación basada en acetato de litio, construcciones en plásmidos independientes que, por recombinación homóloga, generan una mutación nula en cada uno de los genes *SIR2*, *SIR3*, *SIR4*, *RIF1*, *HDF1*, *HDF2*, *HST1* y *HST2*. Este método consiste en clonar en un plásmido un fragmento de ADN que contiene aproximadamente 500 pb de las regiones 5' UTR y 3' UTR de cada uno de los genes que se va a eliminar. Estas secuencias se clonan de forma que quedan flanqueando un casete *hph*, dirigido por el promotor PGK1 de *S. cerevisiae*, que confiere resistencia a higromicina. Cada uno de estos plásmidos se transforman en *C. glabrata* y por medio de recombinación homóloga se sustituye el gen silvestre por la construcción del plásmido. De esta manera se eliminaron cada uno de los genes, y el resultado son cepas transformantes Hyg^R ausentes en los genes involucrados en silenciamiento.

La expresión del gen reportero *URA3* se analizó por ensayos de crecimiento en diferentes medios de cultivo: YPD, CAA (sin uracilo) y 5-FOA. El grado de expresión o silenciamiento refleja la actividad transcripcional de cada una de las regiones analizadas, la cual a su vez depende de la estructura de la cromatina en estas regiones. Se determinó, que la regulación de la estructura de la cromatina en las regiones de los genes *EPA1-7* es diferencial y depende en distinto grado de las proteínas involucradas en silenciamiento.

II. MATERIALES Y MÉTODOS

Cepas de *C. glabrata*

Todas las cepas analizadas en este estudio están descritas en la Tabla 4, en anexos.

La cepa silvestre del laboratorio, CGM1, contiene una mutación por delección/inserción en el gen *URA3*. Esta cepa se construyó insertando el transposón Tn903 [Tn903 *npt* (Neo^R G418^R)] que reemplaza el gen *URA3* por el gen *neo* que confiere resistencia a G418 (Cormack and Falkow, 1999).

Las cepas parentales contienen una inserción del transposón Tn7 [Tn7 R6K_γ ori *URA3 npt* (Km^R)] (Castano et al., 2003) en distintas posiciones entre los genes *EPA* y entre los genes *EPA* y sus telómeros. La ubicación del transposón que contiene el gen reportero *URA3* en cada una de las cepas parentales, está señalado en la Figura 4, pág. 14.

A partir de las cepas parentales se construyeron cepas con mutaciones en los genes *SIR2/3/4*, *HDF1/2*, *HST1/2* y *RIF1*. Las cepas de *C. glabrata* que construí para completar la colección de cepas a analizar, están descritas en la Tabla 1, pág. 26.

Plásmidos

Los plásmidos utilizados para construir las mutaciones en los genes involucrados en silenciamiento están descritos en la Tabla 5, en anexos.

Oligonucleótidos

Los oligonucleótidos utilizados para comprobar las mutaciones por

delección/inserción, utilizando la técnica de PCR, y los oligonucleótidos utilizados en la construcción de plásmidos, están descritos en la Tabla 6, en anexos.

Medios de crecimiento

Candida glabrata se cultivó en medio estándar para levadura como se describe en (Sherman, 1986). El medio rico YPD contiene 10 g/L de extracto de levadura, 20 g/L de peptona y 20 g/L glucosa, adicionado con 25 mg/L de uracilo. Cuando se requirió, se suplementó con higromicina a una concentración final de 400 µg/mL. El medio YP-Gly se prepara como el medio YPD excepto que no contiene glucosa, sino glicerol al 3% final, como fuente de carbono. El medio CAA (sin uracilo), contienen 1.7 g/L de base nitrogenada de levadura sin amonio, 5 g/L de sulfato de amonio $[(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4]$, 6 g/L de casaminoácidos y 20 g/L de glucosa. Cuando se requirió, al medio CAA se le adicionó 0.9 g/L de 5-fluorootico (5-FOA) y 50 mg/L de uracilo.

Transformación para generar mutantes en *C. glabrata*

Para la transformación genética de *C. glabrata* se utilizó una modificación del método de transformación con acetato de litio (LiAc) (Gietz et al., 1992). Brevemente, las células se crecieron en YPD a una densidad óptica de 0.6-1.0 OD₆₀₀, se cosecharon y se lavaron con agua estéril. Posteriormente, las células se concentraron 100 veces en LiAc 100 mM y se usaron alícuotas de 50 µL para cada transformación. A cada alícuota de 50 µL de células en suspensión se le adicionó 240 µL de PEG al 50% (PM 4000), 36 µL de LiAc 1 M, 50 µg de ADN de esperma de salmón desnaturalizado por calor, y 3 µL aproximadamente del ADN plasmídico necesario para cada transformación, que se encuentra disuelto en 50 µL de TE 10mM/0.1mM (TE es una mezcla estéril de Tris 10 mM y EDTA 0.1 mM utilizada para conservar el ADN). Ésta mezcla se incubó a 30 °C por 45 min., después se le agregó 43 µL de DMSO, se mezcló e inmediatamente se le dio un choque de calor a 42 °C por 15 min. Por último, las células se centrifugaron, se

resuspendieron en 1 mL de YPD y se incubaron a 30 °C por 4 hrs. Alícuotas de 300 µL de la suspensión de células se platearon en cajas con medio YPD-Hyg. Aproximadamente 12 colonias resistentes a higromicina se estriaron para obtener colonias aisladas y se crecieron en cajas con YPD-Gly para eliminar aquellas que contienen mutaciones que afectan la función mitocondrial, de tal forma que les impide crecer en fuentes de carbono no fermentables.

Construcción de cepas mutantes

Para realizar mutaciones por delección/inserción se utilizaron plásmidos integrativos previamente contruidos, que contienen fragmentos 5' UTR (de 500 pb aprox.) y 3' UTR (de 500 pb aprox.) del gen que se va a reemplazar. Estos fragmentos UTR flanquean un casete que confiere resistencia a higromicina, con el fin de poder seleccionar las clonas transformantes que surgen como resultado de la recombinación homóloga. El contenido del casete *hph*, de 2.012 kb, esta estructurado de la siguiente manera: $P_{PGK1}::hph::3'UTR_{HIS3}$. El gen *hph* se encuentra bajo el promotor *PGK1* de *S. cerevisiae*, y contiene una región de terminación de la transcripción 3' UTR, del gen *HIS3* de *C. glabrata*. El gen *hph* proviene de la bacteria *Klebsiella pneumoniae* y codifica una cinasa (higromicina fosfotransferasa) que inactiva al antibiótico higromicina B a través de su fosforilación, lo que confiere resistencia a higromicina (Gritz and Davies, 1983).

Este plásmido digerido con las enzimas apropiadas para escindir el fragmento completo (5' UTR-casete *hph*-3' UTR), se utilizó para transformar las cepas parentales y obtener cepas mutantes en los genes cuyos productos intervienen en silenciamiento. Cuando el fragmento que contiene el casete de resistencia a higromicina se inserta en el lugar adecuado por doble recombinación homóloga, se reemplaza el gen original silvestre por el fragmento completo construido en el plásmido (Figura 7).

Análisis de la estructura genómica de las cepas mutantes

Para comprobar las mutaciones por delección/inserción en las diferentes cepas, se analizó la estructura genómica de las cepas mutantes por medio de la técnica Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés) utilizando oligonucleótidos específicos.

La ausencia de cada gen se comprobó con oligonucleótidos que hibridan dentro de cada gen que se eliminó (Figura 7, oligonucleótidos **a** y **b**). Con ésta pareja de oligonucleótidos se espera únicamente la amplificación de controles positivos que contienen el gen silvestre. La inserción del casete $P_{PGK1}::hph::3'UTR_{HIS3}$ se comprobó amplificando las uniones 5' y 3' con oligonucleótidos específicos que hibridan dentro del casete *hph* (Figura 7, oligonucleótidos **d** y **e**) y en regiones endógenas de *C. glabrata* que flanquean cada inserción, fuera del fragmento que se utilizó para construir la delección/inserción (Figura 7, oligonucleótidos **c** y **f**).

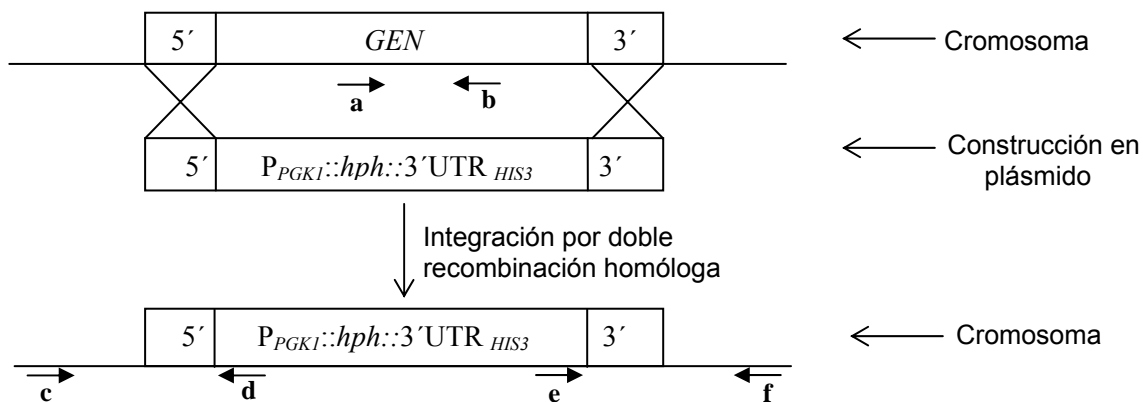


Figura 7. Mutación por delección/inserción y ubicación de los oligonucleótidos para comprobar la mutación. El ADN plasmídico, que contiene la secuencia $P_{PGK1}::hph::3'UTR_{HIS3}$ flanqueada por regiones homólogas 5' UTR y 3' UTR del gen que se va a reemplazar, se inserta por doble recombinación homóloga en el gen endógeno. Como resultado se pierde el gen endógeno y, en este caso, se gana resistencia a higromicina. Se muestra la ubicación de las parejas de oligonucleótidos para comprobar la mutación. Los oligonucleótidos **a** y **b** se utilizaron para comprobar la ausencia del gen endógeno que se eliminó; los oligonucleótidos **c** y **d** para comprobar la inserción en el extremo 5'; y los oligonucleótidos **e** y **f** para comprobar la inserción en el extremo 3'.

En la Figura 8 se muestra un ejemplo del análisis por PCR de una mutación del gen *HST1*. La comprobación por PCR de todas las cepas construidas en este trabajo se encuentra en la Figura 19 en anexos.

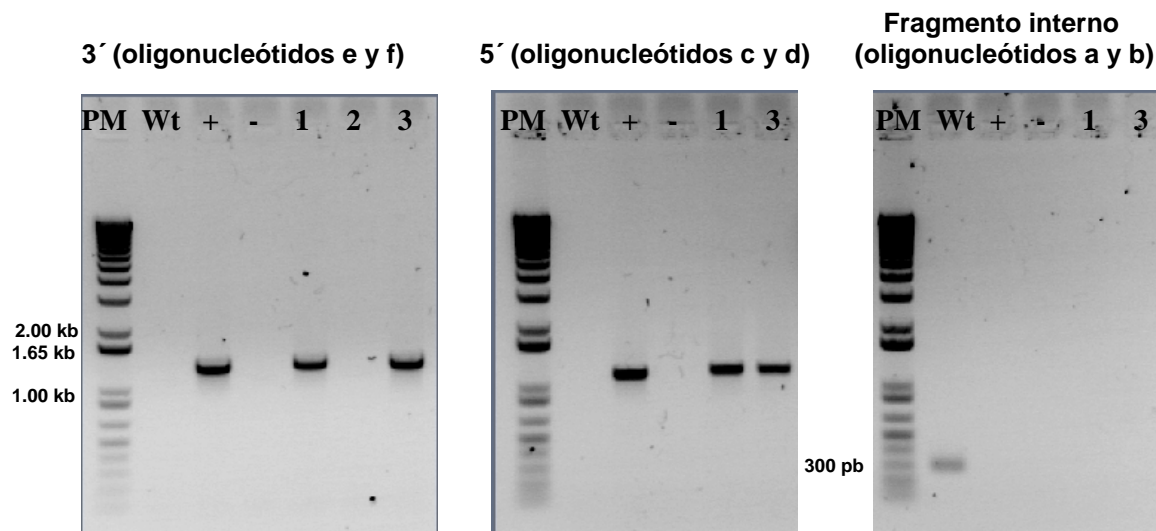


Figura 8. Ejemplo del análisis para comprobar la estructura genómica después de una mutación. El análisis se realiza por medio de la técnica PCR. El ejemplo es para la mutación nula en el gen *HST1* [Cepa CGM148 *hst1* Δ ::*hph* (pAP628/*BseRI*-*BglII*-*StuI*)]. Se espera un fragmento de 1.489 kb. en el extremo 3' con los oligonucleótidos 15/88 (e/f) y de 1.099 kb en la región 5' con los oligonucleótidos 2278/16 (c/d). El fragmento interno amplifica una secuencia de 300 pb dentro gen *HST1*, con los oligonucleótidos 76/77. Como se observa, las únicas clonas positivas son la 1 y 3. Este tipo de análisis se realizó para todas las cepas mutantes (Figura 19, en anexos). Las cepas 1 y 3 son 68 pb más grandes que la cepa control (+) por que contienen secuencias FRT, que flanquean el casete de higromicina para escindir el marcador de selección si se requiere. La cepa Wt es la cepa CGM1, el control positivo (+) es la cepa CGM76 *hst1* Δ , el control negativo (-) contiene todos los componentes de la mezcla de PCR excepto la muestra de ADN.

A lo largo de los experimentos notamos que las cepas mutantes en *sir2* Δ , *sir3* Δ y *sir4* Δ crecidas en medio líquido YPD se adhieren al vidrio de los tubos utilizados, esto se observa como una capa delgada de células que se extiende en las paredes del tubo (Figura 18, en anexos). Ésta adherencia se pierde al agitar el tubo vigorosamente. Este fenotipo de adhesión al vidrio podría ser debido a la expresión de genes *EPA* (adhesinas) como consecuencia de la pérdida de silenciamiento por las proteínas Sir2/3/4p en la región donde se ubican estos genes. Ya se ha reportado que las adhesinas pueden mediar interacciones con superficies abióticas, como el plástico (Iraqi et al., 2005; Kojic and Darouiche, 2004).

Análisis de la expresión del gen reportero *URA3*

Se realizó un ensayo de crecimiento en diferentes medios para analizar la estructura de la cromatina en las regiones subteloméricas de los genes *EPA1-7*, en las cepas parentales y las cepas derivadas de éstas que llevan mutaciones en los genes que intervienen en silenciamiento.

En estos ensayos se observa la expresión o represión del gen reportero *URA3* insertado en diferentes regiones del genoma de *C. glabrata* (Figura 4, pág. 14). Esto refleja la estructura de la cromatina en esa región; es decir si es transcripcionalmente activa o si está reprimida. La expresión del gen reportero *URA3* depende de dos factores: a) de la ubicación que tenga con respecto al telómero. Es decir, reporteros ubicados en regiones lejanas al telómero son activos transcripcionalmente y se expresan, y genes reporteros insertados en regiones subteloméricas permanecerán reprimidos por proteínas que intervienen en silenciamiento subtelomérico. Y, b) si el reportero está ubicado en una región subtelomérica en una cepa mutante en un gen que interviene en el silenciamiento de esta región, es posible que el reportero se exprese.

Para realizar el análisis, las células se crecieron hasta fase estacionaria, se diluyeron a una OD₆₀₀ de 1.0 y se hicieron 5 diluciones seriadas de 10 veces (10^0 - 10^{-5}), posteriormente se colocaron gotas de 5 μ L de cada dilución en tres diferentes medios de crecimiento YPD, CAA (sin uracilo) y 5-FOA. Las cajas se incubaron a 30 °C, por 48 horas.

Las células que expresen el gen reportero *URA3* mueren en el medio con 5-FOA, ya que la enzima Ura3p, que participa en la vía de biosíntesis de uracilo, toma como sustrato el 5-FOA, lo convierte en un producto tóxico y las células mueren. De esta manera, únicamente las células que tengan el gen *URA3* reprimido transcripcionalmente pueden crecer en este medio (fenotipo Ura⁻, 5-FOA^R). En el medio CAA (sin uracilo) se puede observar la población de células que están

expresando el gen *URA3* (fenotipo Ura⁺). En el medio rico YPD se observa la cuenta viable de células, ya que todas las células pueden crecer independientemente de la expresión del gen reportero *URA3*.

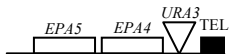
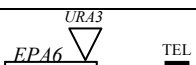

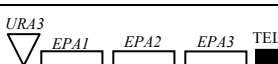


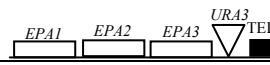



III. RESULTADOS

Construcción de cepas mutantes en los genes *SIR2/3/4*, *RIF1*, *HDF1/2* y *HST1/2*

Para completar el conjunto de cepas necesarias para el análisis de la estructura de la cromatina, en las regiones donde se ubican los genes *EPA1-7*, se requirió la construcción de nuevas cepas. Éstas se realizaron a partir de las cepas parentales CGM118, CGM121, CGM146-149 y CGM158-160 construidas con anterioridad y disponibles en el laboratorio (Tabla 3, en anexos). Las cepas parentales contienen una inserción del gen reportero *URA3* entre los diferentes genes *EPA* y entre genes *EPA* y sus telómeros (Figura 4, pág. 14). Las construcciones de las cepas mutantes nulas en los genes implicados en silenciamiento se realizaron por transformación con plásmidos que llevan las regiones 5' y 3' UTR de cada gen que se va a eliminar, estas regiones flanquean un casete que lleva el gen *hph* que confiere resistencia a higromicina. Este plásmido se digirió con las enzimas de restricción apropiadas para escindir todo el fragmento (5' UTR-casete *hph*-3' UTR), y se utilizó para transformar las cepas parentales y obtener las cepas recombinantes.

En la Tabla 1 se describen las cepas que construí para completar la colección. En resumen, a) construí las ocho mutantes necesarias (*sir2* Δ , *sir3* Δ , *sir4* Δ , *rif1* Δ , *hdf1* Δ , *hdf2* Δ , *hst1* Δ y *hst2* Δ) en cada una de las cepas parentales CGM118, CGM121 y CGM160; b) las mutantes *sir3* Δ y *hst1* Δ en todas las cepas parentales; c) entre otras. Cada mutación se comprobó por medio de la técnica de PCR, como se muestra en las Figuras 7 y 8, pág. 21, 22 (En la Figura 19 en anexos, se muestran todos los análisis por PCR). De cada cepa se aislaron y se almacenaron dos clones, únicamente se muestra una de ellas.

Tabla 1. Descripción de las cepas mutantes construidas en este trabajo.

CEPA	GENOTIPO RELEVANTE	CEPAS PARENTALES CON INSERCIONES DEL GEN URA3
CGM177	CGM160 <i>sir2Δ::hph</i> (pAP596/ <i>SacI-KpnI</i>)	
CGM182	CGM160 <i>hdf1Δ::hph</i> (pAP611/ <i>BcgI</i>)	"
CGM196	CGM160 <i>sir4Δ::hph</i> (pAP598/ <i>BsgI</i>)	"
CGM204	CGM160 <i>hdf2Δ::hph</i> (pAP612/ <i>BcgI</i>)	"
CGM216	CGM160 <i>hst2Δ::hph</i> (pAP633/ <i>BsgI-SacI</i>)	"
CGM219	CGM118 <i>sir2Δ::hph</i> (pAP596/ <i>SacI-KpnI</i>)	
CGM221	CGM118 <i>sir4Δ::hph</i> (pAP598/ <i>BsgI</i>)	"
CGM225	CGM118 <i>hdf1Δ::hph</i> (pAP611/ <i>BcgI</i>)	"
CGM227	CGM118 <i>hdf2Δ::hph</i> (pAP612/ <i>BcgI</i>)	"
CGM231	CGM118 <i>hst2Δ::hph</i> (pAP633/ <i>BsgI-SacI</i>)	"
CGM248	CGM121 <i>sir2Δ::hph</i> (pAP596/ <i>SacI-KpnI</i>)	
CGM250	CGM121 <i>sir4Δ::hph</i> (pAP598/ <i>BsgI</i>)	"
CGM273	CGM121 <i>hst2Δ::hph</i> (pAP633/ <i>BsgI-SacI</i>)	"
CGM275	CGM121 <i>hdf1Δ::hph</i> (pAP611/ <i>BcgI</i>)	"
CGM276	CGM121 <i>hdf2Δ::hph</i> (pAP612/ <i>BcgI</i>)	"
CGM280	CGM146 <i>sir3Δ::hph</i> (pIC120/ <i>KpnI-HpaI</i> +T4 DNA polimerasa*)	
CGM282	CGM147 <i>sir3Δ::hph</i> (pIC120/ <i>KpnI-HpaI</i> +T4 DNA polimerasa)	
CGM287	CGM148 <i>sir3Δ::hph</i> (pIC120/ <i>KpnI-HpaI</i> +T4 DNA polimerasa)	
CGM289	CGM149 <i>sir3Δ::hph</i> (pIC120/ <i>KpnI-HpaI</i> +T4 DNA polimerasa)	
CGM291	CGM158 <i>sir3Δ::hph</i> (pIC120/ <i>KpnI-HpaI</i> +T4 DNA polimerasa)	
CGM293	CGM159 <i>sir3Δ::hph</i> (pIC120/ <i>KpnI-HpaI</i> +T4 DNA polimerasa)	
CGM299	CGM118 <i>sir3Δ::hph</i> (pIC120/ <i>KpnI-HpaI</i> +T4 DNA polimerasa)	

CGM301	CGM121 <i>sir3Δ::hph</i> (pIC120/ <i>KpnI-HpaI</i> +T4 DNA polimerasa)	
CGM303	CGM160 <i>sir3Δ::hph</i> (pIC120/ <i>KpnI-HpaI</i> +T4 DNA polimerasa)	
CGM312	CGM1 <i>sir3Δ::hph</i> (pIC120/ <i>KpnI-HpaI</i> +T4 DNA polimerasa)	Sin inserción del gen <i>URA3</i>
CGM314	CGM1 <i>rif1Δ::hph</i> (pSP166/ <i>BsgI</i>)	Sin inserción del gen <i>URA3</i>
CGM319	CGM160 <i>hst1Δ::hph</i> (pAP628/ <i>BseRI-BglII-StuI</i>)	
CGM320	CGM118 <i>hst1Δ::hph</i> (pAP628/ <i>BseRI-BglII</i>)	
CGM321	CGM121 <i>hst1Δ::hph</i> (pAP628/ <i>BseRI-BglII-StuI</i>)	
CGM325	CGM158 <i>sir2Δ::hph</i> (pAP596/ <i>SacI-KpnI</i>)	
CGM327	CGM159 <i>sir2Δ::hph</i> (pAP596/ <i>SacI-KpnI</i>)	
CGM329	CGM149 <i>hst1Δ::hph</i> (pAP628/ <i>BseRI-BglII-StuI</i>)	
CGM330	CGM158 <i>hst1Δ::hph</i> (pAP628/ <i>BseRI-BglII-StuI</i>)	
CGM332	CGM146 <i>hst1Δ::hph</i> (pAP628/ <i>BseRI-BglII-StuI</i>)	
CGM334	CGM147 <i>hst1Δ::hph</i> (pAP628/ <i>BseRI-BglII-StuI</i>)	
CGM336	CGM159 <i>hst1Δ::hph</i> (pAP628/ <i>BseRI-BglII-StuI</i>)	
CGM338	CGM148 <i>hst1Δ::hph</i> (pAP628/ <i>BseRI-BglII-StuI</i>)	
CGM340	CGM149 <i>sir4Δ::hph</i> (pAP598/ <i>BsgI</i>)	
CGM342	CGM147 <i>hdf2Δ::hph</i> (pAP612/ <i>Bcgl</i>)	

* La T4 DNA polimerasa se utilizó para digerir los extremos salientes 3' de la digestión con *KpnI*, que corresponden al vector y no al ADN de *C. glabrata*, para favorecer la recombinación homóloga.

Análisis de la expresión del gen reportero *URA3*

Realizamos ensayos de crecimiento en tres diferentes medios YPD, CAA (sin uracilo) y 5-FOA, para determinar la expresión o represión del gen reportero *URA3* insertado en diferentes regiones, entre los genes *EPA* y entre los genes *EPA* y sus telómeros (un total de 9 cepas parentales) y para determinar el papel de las

proteínas Sir2p, Sir3p, Sir4p, Rif1p, Ku70p (*HDF1*), Ku80p (*HDF2*), Hst1p y Hst2p en la regulación la estructura de la cromatina en estas regiones.

Un número similar de células de cada cepa (tanto de las cepas parentales como de las cepas derivadas de éstas que llevan mutaciones en los genes *SIR2/3/4*, *RIF1*, *HDF1/2* y *HST1/2*) se gotearon en diluciones seriadas de 10 veces en los tres medios y las cajas se incubaron por 48 horas a 30 °C.

El grado de silenciamiento de los *loci* de los genes *EPA1-7* se determina por la capacidad de la cepa para crecer en un medio con 5-FOA. En este medio únicamente pueden crecer las cepas resistentes a 5-FOA; es decir, las que tengan silenciado el gen reportero *URA3* (la enzima Ura3p convierte al 5-FOA en un producto tóxico). Una mutación que afecte el silenciamiento subtelomérico, puede traer como consecuencia la expresión del gen reportero *URA3*, estas cepas no crecerán en el medio con 5-FOA. En el medio sin uracilo se observa una población de células que expresan el gen reportero *URA3*. Y en el medio con YPD, la cuenta viable.

En total, es un análisis de 81 cepas. En la Tabla 4 del anexo se describe el genotipo relevante de todas las cepas analizadas.

**Parental
CGM118**

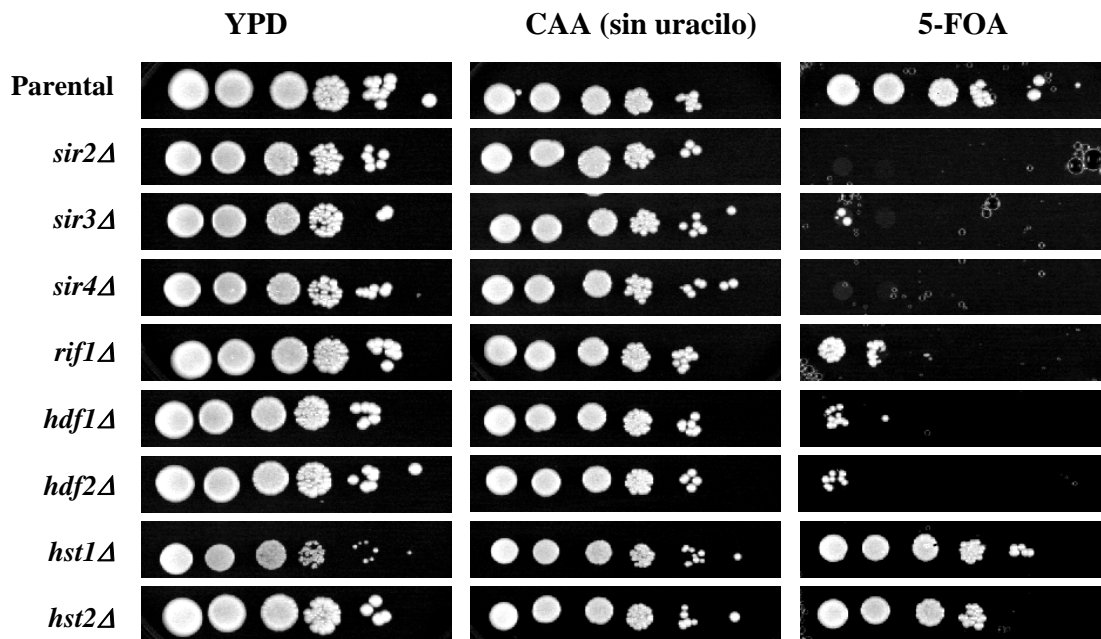
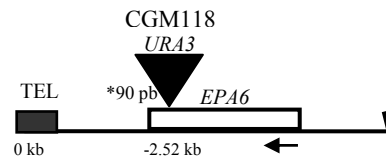


Figura 9. Análisis de la expresión del gen reportero *URA3* en la cepa parental CGM118 y las mutantes derivadas.

La inserción de *URA3* al final del gen *EPA6* está silenciada. Las proteínas Sir2p, Sir3p, Sir4p, Rif1p, Ku70p y Ku80p regulan fuertemente la región analizada, silenciándola (aunque es de notar que solo la ausencia de los genes *SIR2/3/4* y Ku70/80p elimina completamente el silenciamiento). Esto se observa en el medio con 5-FOA, ya que en ausencia de estas proteínas el gen *URA3* se expresa y por lo tanto las cepas con deleciones en los genes que codifican estas proteínas no pueden crecer. Hst1p y Hst2p no tiene ningún efecto en la regulación de esta región, ya que su ausencia no cambia el nivel de crecimiento comparando con la cepa parental.

*90 pb entre el codón de término de *EPA6* y la inserción del gen reportero *URA3*.

**Parental
CGM121**

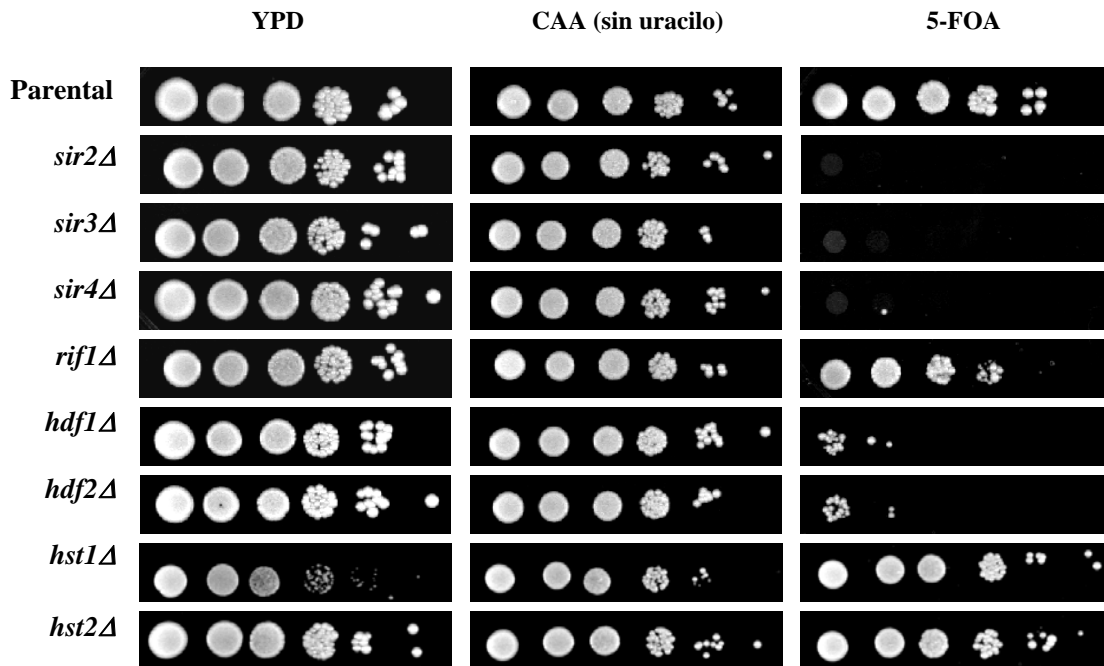
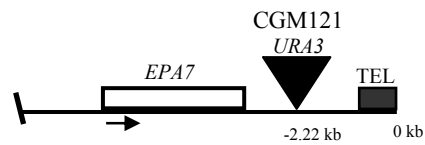


Figura 10. Análisis de la expresión del gen reportero *URA3* en la cepa parental CGM121 y las mutantes derivadas.

La inserción del gen *URA3* entre *EPA7* y el telómero, está silenciada. Las proteínas Sir2p, Sir3p, Sir4p, Ku70p y Ku80p intervienen fuertemente en la represión del gen. En ausencia de los genes que codifican estas proteínas el gen *URA3* se expresa y por lo tanto las cepas con mutaciones en estos genes no pueden crecer o crecen poco en el medio con 5-FOA. La proteína Rif1p interviene moderadamente en la regulación de esta región, ya que una proporción de las células del cultivo están expresando el gen *URA3* y por lo tanto, no pueden crecer en el medio con 5-FOA. Hst1p y Hst2p no intervienen en la regulación de esta región, pues su ausencia no cambia el nivel de crecimiento comparando con la cepa con la parental.

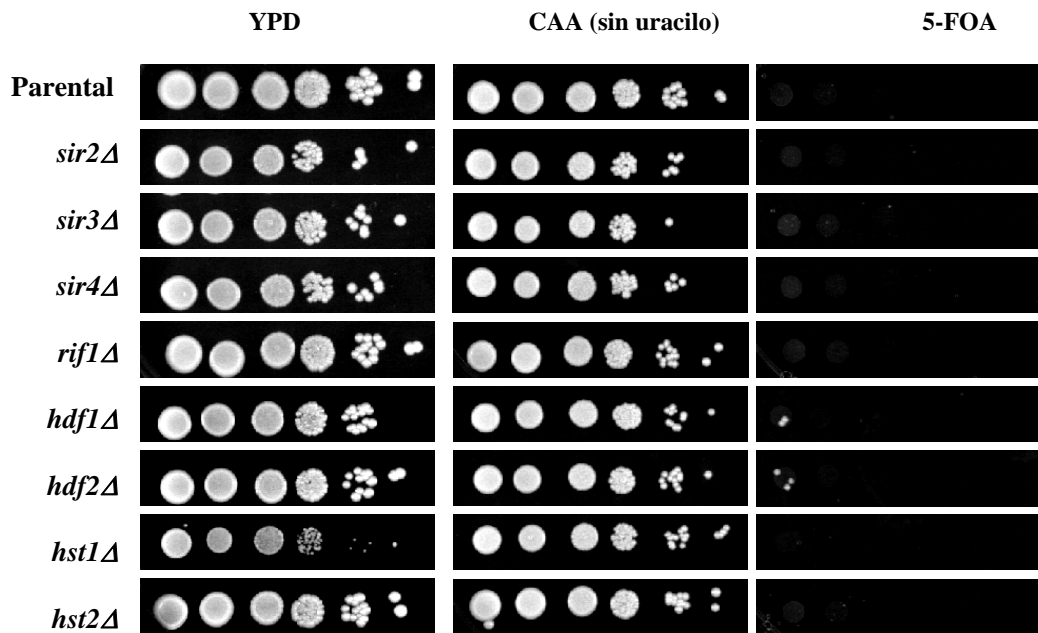
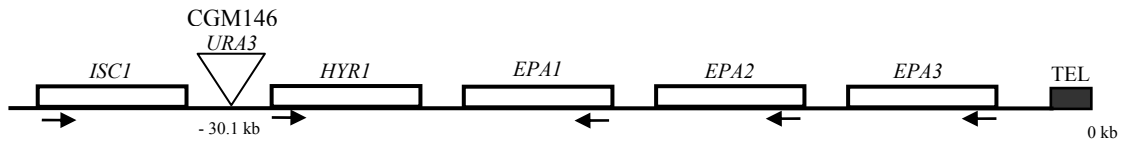
**Parental
CGM146**

Figura 11. Análisis de la expresión del gen reportero *URA3* en la cepa parental CGM146 y las mutantes derivadas.

La inserción del gen *URA3* entre *HYR1* y *EPA1* en la cepa CGM146 se está expresando en todas las células, lo que nos indica que esta región es transcripcionalmente activa; es decir, no está bajo silenciamiento subtelo mérico. Esto se observa en el medio con 5-FOA, ya que la cepa parental no puede crecer, la eliminación de los genes cuyos productos intervienen en silenciamiento subtelo mérico, no tiene efecto en la expresión del gen *URA3* insertado en esta posición.

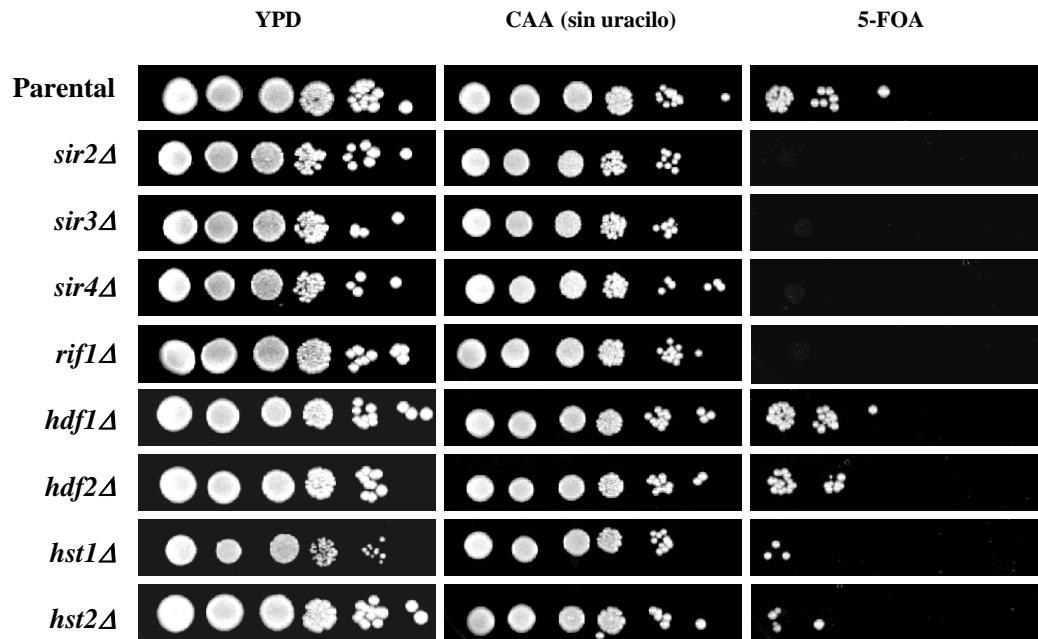
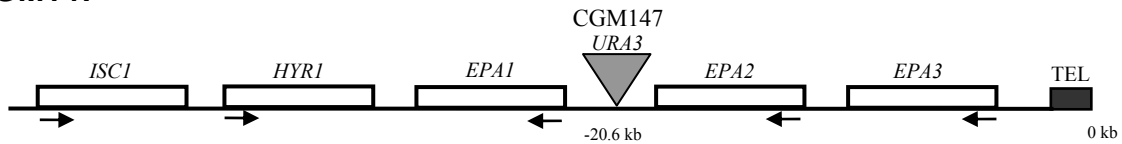
**Parental
CGM147**

Figura 12. Análisis de la expresión del gen reportero *URA3* en la cepa parental CGM147 y las mutantes derivadas.

La inserción del gen *URA3* entre *EPA1* y *EPA2* en la cepa CGM147 se está expresando en la mayoría de las células; sin embargo, se observa una población de células (en el cultivo de la cepa parental) que pueden crecer en el medio con 5-FOA. Esta región es, en términos generales, transcripcionalmente activa aunque hay algunas células en las que el gen *URA3* está silenciado. Este pequeño grado de silenciamiento depende de las proteínas Sir2p, Sir3p, Sir4p y Rif1p y posiblemente también depende de Hst1p (ver también Figura 20, en anexos) y Hst2p. Las proteínas Ku70p y Ku80p no participan en la regulación de esta región.

Parental

CGM148

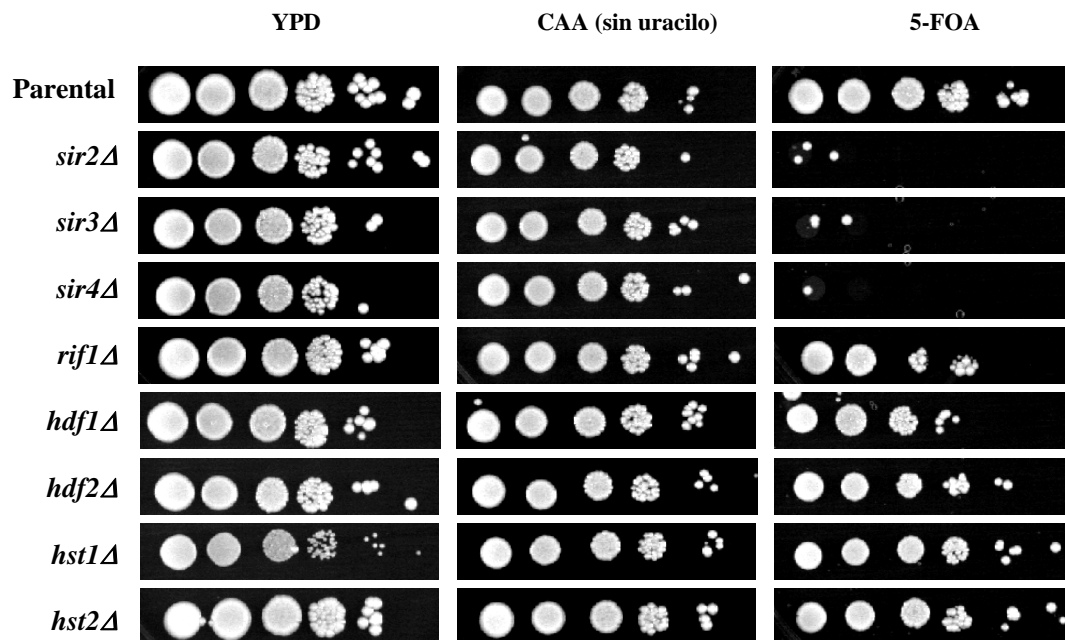
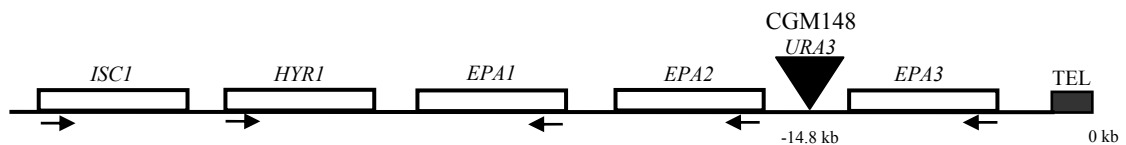


Figura 13. Análisis de la expresión del gen reportero *URA3* en la cepa parental CGM148 y las mutantes derivadas.

La inserción del gen *URA3* entre *EPA2* y *EPA3* en la cepa CGM148 está silenciada y este silenciamiento depende principalmente de las proteínas Sir2p, Sir3p y Sir4p. Esto se observa en el medio con 5-FOA ya que al mutar los genes *SIR2/3/4* el gen *URA3* se expresa y no hay crecimiento en el medio con 5-FOA. Las proteínas Rif1p, Ku70p y Ku80p intervienen moderadamente en la regulación de esta región. Al eliminar los genes *RIF1*, *HDF1* y *HDF2* la mayoría de las células pueden crecer en 5-FOA; sin embargo, unas cuantas células están expresando el gen *URA3*. La expresión de esta región no depende de Hst1p ni de Hst2p.

**Parental
CGM149**

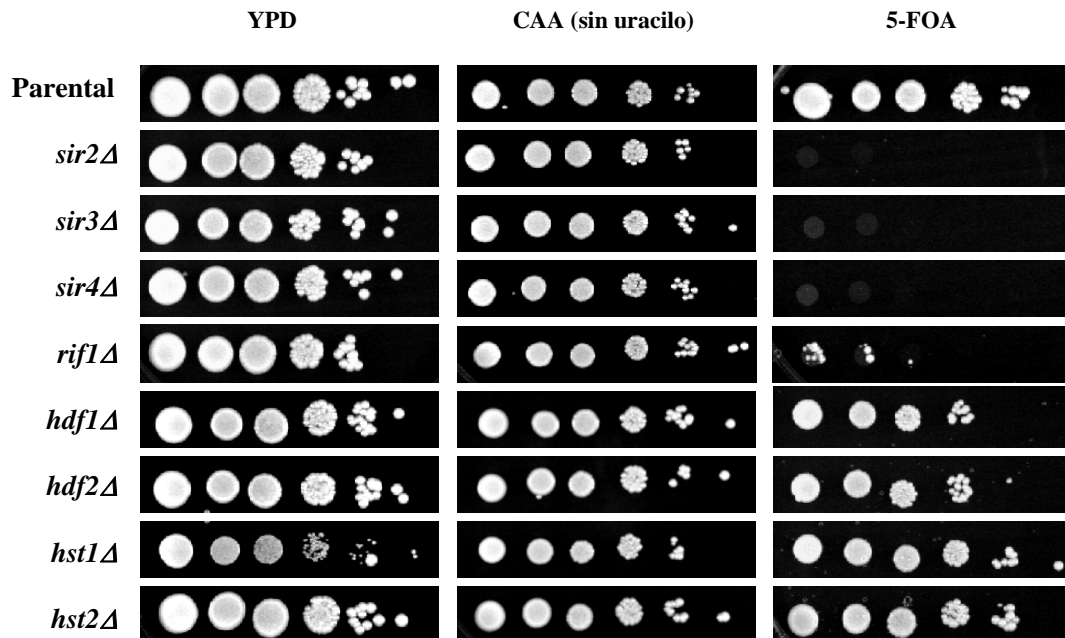
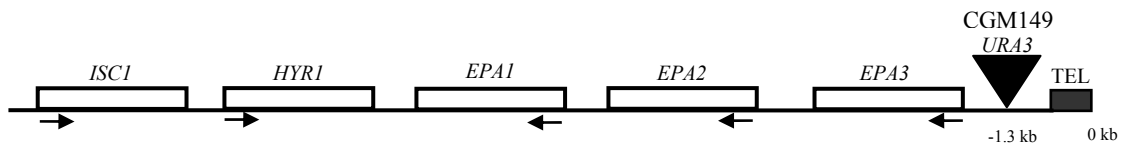


Figura 14. Análisis de la expresión del gen reportero *URA3* en la cepa parental CGM149 y las mutantes derivadas.

La inserción del gen *URA3* entre *EPA3* y el telómero en la cepa CGM149 está silenciada y este silenciamiento depende principalmente de las proteínas Sir2p, Sir3p, Sir4p y Rif1p. Esto se observa en el medio con 5-FOA, donde la mutación de los genes que codifican estas proteínas elimina el crecimiento de las cepas. Las proteínas Ku70p y Ku80p participan en un grado mucho menor ya que una proporción grande de las células del cultivo tienen el gen *URA3* silenciado y pueden crecer en 5-FOA. Hst1p y Hst2p, no intervienen en el silenciamiento del gen *URA3*, en ésta cepa, pues la ausencia de estas proteínas no modifica el crecimiento comparando con la cepa parental.

Parental CGM158

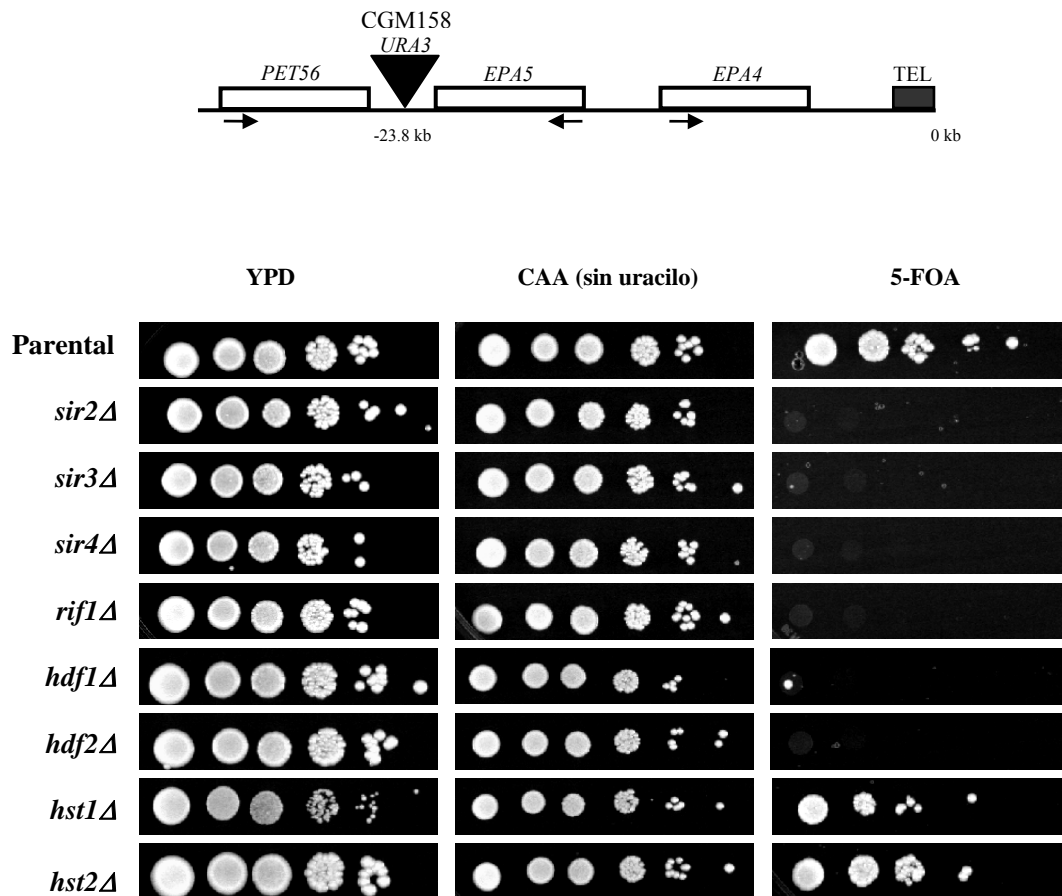


Figura 15. Análisis de la expresión del gen reportero *URA3* en la cepa parental CGM158 y las mutantes derivadas.

La inserción del gen *URA3* entre *PET56* y *EPA5* en la cepa CGM158 está silenciada y este silenciamiento depende fuertemente de las proteínas Sir2p, Sir3p, Sir4p, Rif1p, Ku70p y Ku80p, ya que como se observa en el medio con 5-FOA la ausencia de estas proteínas impide el crecimiento en este medio, debido a la pérdida de silenciamiento del gen *URA3*. La eliminación del gen *HST1* tiene un efecto moderado en el crecimiento de esta cepa (ver también Figura 20, en anexos), esto se observa en el medio con 5-FOA donde la mayoría de células tienen reprimido en gen *URA3*, pero unas cuantas lo están expresando. La proteína Hst2p no interviene en la regulación de la expresión en esta región.

**Parental
CGM159**

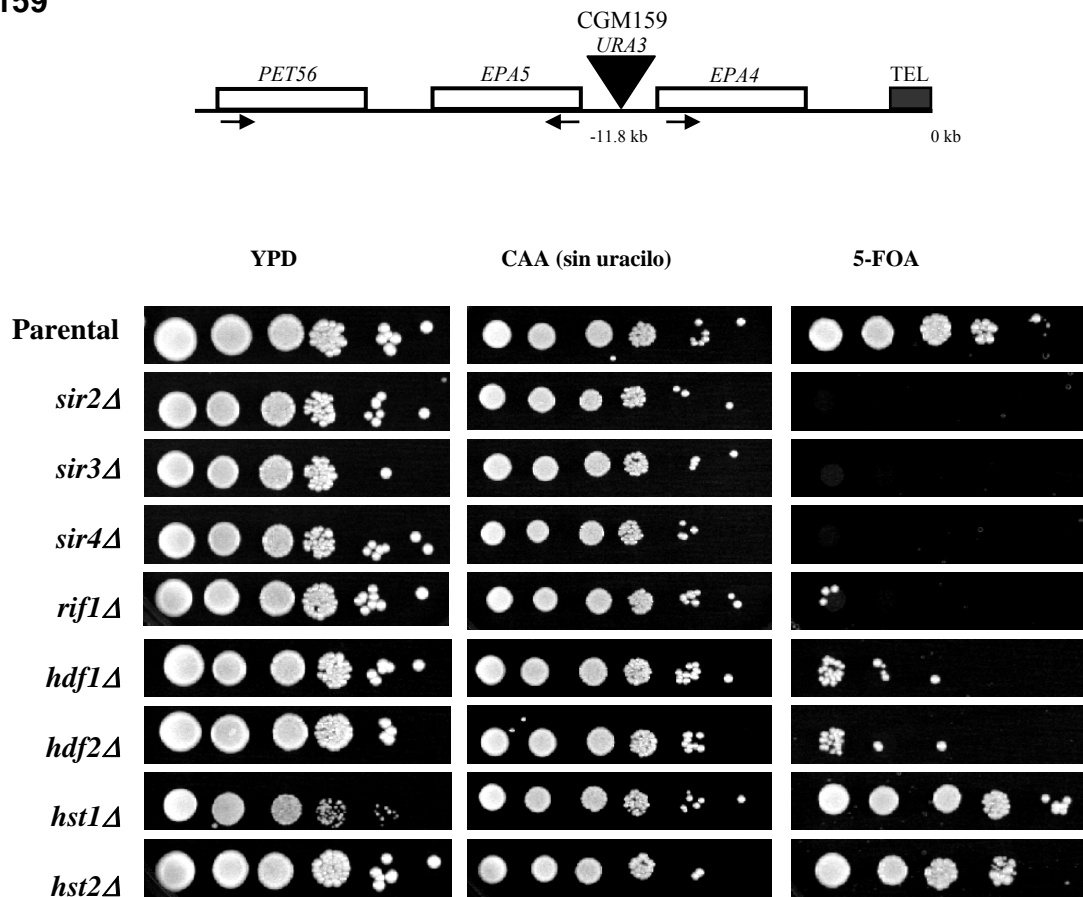


Figura 16. Análisis de la expresión del gen reportero *URA3* en la cepa parental CGM159 y las mutantes derivadas.

La inserción del gen *URA3* entre *EPA5* y *EPA4* en la cepa CGM159 está silenciada y este silenciamiento depende de las proteínas Sir2p, Sir3p, Sir4p, Rif1p, Ku70p y Ku80p, como se puede observar en el medio con 5-FOA. Las cepas mutantes en los genes que codifican estas proteínas expresan el gen reportero *URA3* y en consecuencia no crecen en 5-FOA (en el caso de las cepas que no contienen Ku70p y Ku80p hay sólo unas pocas células del cultivo que no expresan *URA3* y pueden crecer en 5-FOA). Hst1p y Hst2p no intervienen en la expresión del gen *URA3* en esta región, esto se observa en el medio 5-FOA, las cepas que tienen mutaciones en *HST1* y *HST2* crecen bien en este medio, al igual que la cepa parental.

**Parental
CGM160**

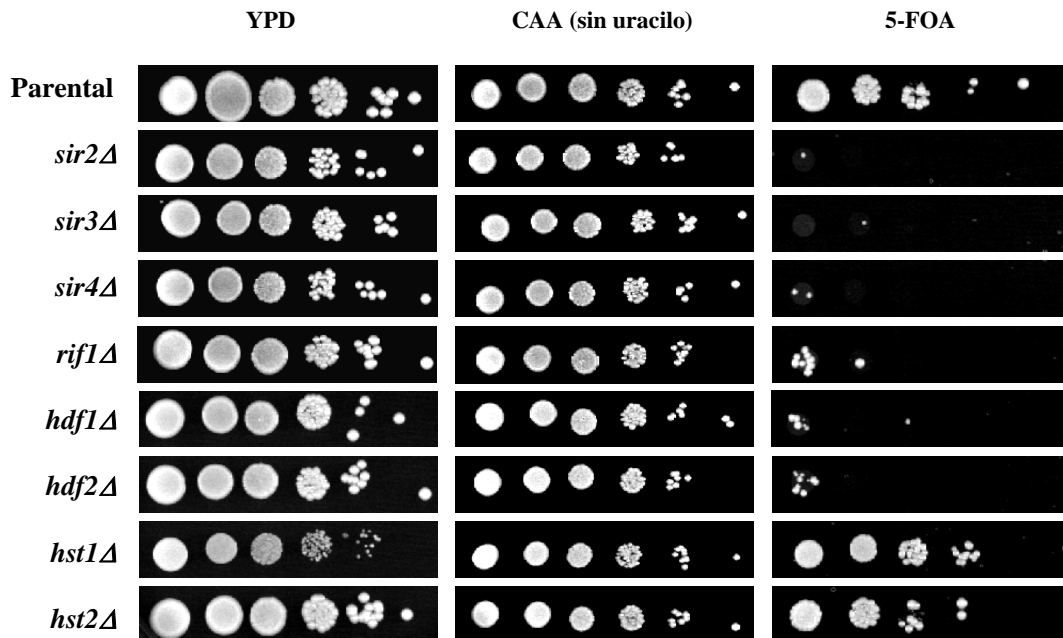
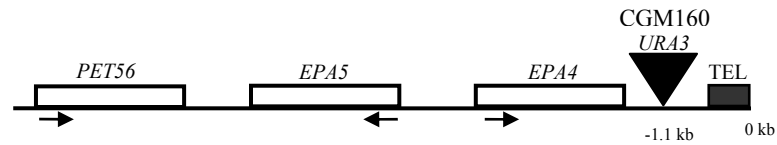


Figura 17. Análisis de la expresión del gen reportero *URA3* en la cepa parental CGM160 y las mutantes derivadas.

La inserción del gen *URA3* entre *EPA4* y el telómero en la cepa CGM160 está silenciada y este silenciamiento depende de las proteínas Sir2p, Sir3p, Sir4p, Rif1p, Ku70p y Ku80p, como se observa en el medio 5-FOA. Al realizar mutaciones nulas en los genes que codifican para estas proteínas las cepas no pueden crecer en 5-FOA, pues la ausencia de éstas tiene como resultado la expresión del gen *URA3*. La expresión del gen reportero no depende de Hst1p ni de Hst2p, pues en las cepas *hst1*Δ y *hst2*Δ no se ve afectado el crecimiento.

IV. DISCUSIÓN

Candida glabrata es un hongo patógeno oportunista que se adhiere con avidéz a células epiteliales humanas cultivadas *in vitro*, interacción que depende de la adhesina Epa1p (Cormack et al., 1999). El genoma de *C. glabrata* contiene múltiples parálogos del gen *EPA1* que se localizan en regiones subteloméricas. Esta ubicación tiene como consecuencia que la mayoría de estos genes se encuentren bajo silenciamiento subtelomérico. Se ha demostrado que los genes *EPA1*, *EPA6* y *EPA7* son adhesinas importantes para la virulencia. En trabajos anteriores se ha analizado la estructura de la cromatina en las regiones donde se encuentran los genes *EPA1-7*. Se ha determinado que estas regiones se encuentran silenciadas y que las proteínas Sir3p, Rif1p y Rap1p participan en esta represión (Castano et al., 2005; De Las Penas et al., 2003).

El presente trabajo es un análisis sistemático de la estructura de la cromatina en las regiones donde se encuentran los genes *EPA1-7* y se explora de qué manera dependen estas regiones por las proteínas que intervienen en el silenciamiento. Por primera vez, se analiza la participación de las proteínas Sir2p, Sir4p, Ku70p, Ku80p, Hst1p y Hst2p en la regulación de la estructura de la cromatina en las regiones donde se ubican los genes *EPA1-7*. Así mismo, se les atribuye una participación a las proteínas Sir2p, Sir4p, Ku70p y Ku80p en la regulación negativa por silenciamiento de la región donde se localizan los genes *EPA1-7*. En resumen (Tabla 2), se observó que las proteínas Sir2/3/4p son esenciales para mantener el silenciamiento subtelomérico en las regiones donde se ubican los genes *EPA1-7*; la estructura silenciosa depende en distinto grado de las proteínas Rif1p, Ku70p y Ku80p; y las proteínas Hst1p y Hst2p no son reguladores principales en la regulación por silenciamiento en los *loci EPA1-7* (únicamente se observó un efecto moderado en las cepas CGM147 *hst1*Δ, CGM147 *hst2*Δ y CGM158 *hst1*Δ). En el análisis comparé las funciones de las proteínas Sir2/3/4p, Ku70/80p, Hst1/2p y Rif1p en *C. glabrata* con los ortólogos de *S. cerevisiae*, debido a que estas dos especies están muy relacionadas filogenéticamente y comparten sintenia entre sus

genes; es decir, la localización de los genes esta conservada en posiciones equivalentes entre las dos especies. Además, *C. glabrata* tiene homólogos en *S. cerevisiae* de esencialmente todos los genes implicados en silenciamiento transcripcional (excepto *SIR1* y *RIF2*).

Tabla 2. Resumen del grado de dependencia de la estructura silenciosa de la cromatina en las regiones donde se ubican los genes *EPA1-7* por las proteínas que intervienen en silenciamiento. Los resultados obtenidos se clasificaron en términos de una regulación fuerte (+), moderada (+/-) o nula (-). La regulación fuerte se refiere a que el total o la mayoría de las células expresan el gen reportero *URA3*, y por lo tanto no crecen en un medio con 5-FOA; el término de regulación moderada se refiere a que la ausencia de la proteína no elimina completamente el silenciamiento y esto se observa porque una porción elevada de células aun pueden crecer en un medio con 5-FOA, y por lo tanto están silenciadas; y regulación nula significa que la proteína no participa en la regulación de la región indicada. La cepa CGM146 está transcripcionalmente activa, y por lo tanto no está regulada por las proteínas analizadas [No aplica (NA)].

Cepa	<i>locus</i> entre:	Sir2/3/4p	Rif1p	Ku70/80p	Hst1p	Hst2p
CGM146	<i>ISC1</i> y <i>HYR1</i>	NA	NA	NA	NA	NA
CGM147	<i>EPA1</i> y <i>EPA2</i>	+	+	-	+/-	+/-
CGM148	<i>EPA2</i> y <i>EPA3</i>	+	+/-	+/-	-	-
CGM149	<i>EPA3</i> y Telómero	+	+	+/-	-	-
CGM158	<i>PET56</i> y <i>EPA5</i>	+	+	+	+/-	-
CGM159	<i>EPA5</i> y <i>EPA4</i>	+	+	+	-	-
CGM160	<i>EPA4</i> y Telómero	+	+	+	-	-
CGM118	<i>EPA6</i> y Telómero	+	+	+	-	-
CGM121	<i>EPA7</i> y Telómero	+	+/-	+	-	-

Sir2p, Sir3p y Sir4p regulan fuertemente la estructura de la cromatina de todas las regiones analizadas cercanas a los genes *EPA1-7*

En *C. glabrata* se observó que todas las cepas *sir2* Δ , *sir3* Δ y *sir4* Δ no crecen en el medio con 5-FOA, debido a la expresión del gen reportero *URA3* como consecuencia de la pérdida de silenciamiento en estas cepas; es decir, la ausencia de las proteínas Sir2p, Sir3p y Sir4p elimina completamente el silenciamiento en todas las regiones analizadas. Estos resultados son lo que esperábamos, debido a que las proteínas Sir2/3/4p, en *S. cerevisiae* son componentes estructurales clave y esenciales para mantener el silenciamiento de la cromatina y sus funciones están muy conservadas desde procariontes hasta eucariontes superiores (Blander and Guarente, 2004; Rusche et al., 2003). Este análisis sugiere que el mecanismo de silenciamiento subtelomérico es similar a lo que sucede en *S. cerevisiae*. Las proteínas Sir2p, Sir3p y Sir4p son esenciales para mantener la estructura de la cromatina silenciada, en las regiones donde se encuentran los genes *EPA1-7* en *C. glabrata*. Al igual que en *S. cerevisiae*, la ausencia de *SIR2* no se compensa por la presencia de sus genes homólogos *HST1-4* (Brachmann et al., 1995).

Regulación diferencial en la estructura de la cromatina donde se encuentran los genes *EPA1-7*

En este trabajo demostramos que la estructura silenciosa de la cromatina donde se ubican los genes *EPA1-7* depende en distinto grado de las proteínas Rif1p, Ku70p y Ku80p, involucradas en silenciamiento.

Las proteínas Rif1p

En el telómero donde se encuentra *EPA1*, Rif1p regula fuertemente las regiones entre *EPA3* y el telómero y entre los genes *EPA1* y *EPA2* (*rif1* Δ Figuras 12 y 14, pág. 32 y 34); sin embargo, la región entre *EPA2* y *EPA3* se regula

moderadamente por Rif1p (*rif1*Δ Figura 13, pág. 33). Probablemente la proteína Rif1p se ensambla como parte de la estructura represiva de la cromatina desde el telómero (donde se une a Rap1p), y la dependencia de la cromatina silenciosa por Rif1p (una vez que se ha establecido), disminuye al alejarse del telómero. La regulación fuerte por Rif1p en la región ínter génica entre *EPA1* y *EPA2* se puede deber a que en esta región se recluta a Rif1p ya sea directamente o mediante Rap1p, como sucede en los *loci* *HML* y *HMR* (Buck and Shore, 1995). Datos de nuestro laboratorio indican que esta región se encuentra un elemento en *cis* que regula negativamente la expresión de *EPA1* (V. Gallegos y A. De las Peñas, datos no publicados), y que recluta a Rif1p, aunado a esto podría haber un silenciador adicional en *cis* que reclute esta proteína.

Rif1p regula fuertemente los *loci* de los genes *EPA4/5* y *EPA6* y moderadamente la región 3' UTR de *EPA7*. Es de notar la diferencia que existe en el grado de regulación entre las regiones de *EPA6* y *EPA7* ya que estos genes son esencialmente idénticos (94% de identidad a lo largo de la región codificante y 97% en las regiones 5' y 3' que lo flanquean). La regulación diferencial de la expresión los genes *EPA6* y *EPA7* se ha demostrado con anterioridad mediante ensayos de protección a la nucleasa S1, donde se observa que la expresión de *EPA6* en una cepa mutante *rif1*Δ es mayor que la de *EPA7* (Figura 6, pág. 16) (Castano et al., 2005). Los resultados de estos análisis son comparables con los análisis de la estructura de la cromatina realizados en este trabajo, en los que se observa de manera similar que el *locus* *EPA6* depende en un grado mucho mayor de Rif1p, comparado con la región 3' UTR del gen *EPA7* (*rif1*Δ Figuras 9 y 10, pág. 29 y 30).

La regulación por Rif1p es diferente entre C. glabrata y S. cerevisiae

En *C. glabrata* y *S. cerevisiae*, si bien en ambos microorganismos Rif1p regula negativamente la longitud de los telómeros, (Castano et al., 2005; Wotton and

Shore, 1997) el papel de Rif1p en la regulación por silenciamiento de las regiones analizadas es distinta.

En *S. cerevisiae*, Rif1p actúa como un regulador negativo del silenciamiento, al unirse a Rap1p e impedir la interacción entre el complejo Sir3p/Sir4p con Rap1p. En una cepa *rif1Δ*, además de que se incrementa la longitud de los telómeros, Rap1p recluta más eficientemente al complejo Sir3/4p (Hediger et al., 2002). Como consecuencia de la mutación, se incrementa el silenciamiento de genes reporteros insertados adyacentes al telómero y se pierde el silenciamiento en los *loci HMR* y *HML* (Wotton and Shore, 1997). Estos resultados sugieren un modelo en cual, en una cepa *rif1Δ*, los telómeros alargados titulan las proteínas Sir2/3/4p de otros sitios cromosomales, reduciendo el silenciamiento en los *loci* secundarios de apareamiento, e incrementando el silenciamiento de genes reporteros insertados adyacente al telómero (debido a un aumento local de las proteínas Sir2/3/4p). En *C. glabrata* hemos observado un fenotipo diferente, aunque también se incrementa la longitud de los telómeros en cepas *rif1Δ* (Castano et al., 2005), se desreprimen los genes *URA3* reporteros que insertamos cerca de los telómeros (análogo a la desrepresión de los *loci HMR* y *HML*). La diferencia en la regulación se puede deber a que los genes *RIF1* en las dos levaduras no son muy parecidos, son 22% idénticos y 18% similares, aunque comparten sintenia (Castano et al., 2005). Este porcentaje bajo de homología no compromete a las dos proteínas a tener la misma función; si bien, el plegamiento de la proteína sería similar. Con los análisis de este trabajo no podemos distinguir si la desrepresión de las regiones subteloméricas de los genes *EPA* en la mutantes *rif1Δ* se debe a que Rif1p juega un papel directamente como regulador positivo (lo que implicaría que Rif1p participa en el establecimiento o mantenimiento de la cromatina silenciosa), o indirectamente, por ejemplo, por titulación de las proteínas Sir2/3/4p a los telómeros alargados, y en este caso habría que proponer que el complejo represivo de proteínas Sir2/3/4p, Rap1p y Rif1p no se extendería hacia las regiones subteloméricas analizadas.

Las proteínas Ku70/80p

En las mutantes *hdf1* Δ y *hdf2* Δ en *C. glabrata* se pierde el silenciamiento completamente en las regiones donde se encuentran los genes *EPA4/EPA5*, *EPA6*, y *EPA7*. Este fenotipo es igual al de las cepas *hdf1* Δ y *hdf2* Δ en *S. cerevisiae* (Hediger et al., 2002). Las proteínas Ku70p y Ku80p en *C. glabrata* juegan un papel como reguladores positivos del silenciamiento, probablemente similar a las proteínas Ku ortólogas en *S. cerevisiae*, que se unen a los extremos del telómero y favorecen la interacción entre el complejo Sir3p/Sir4p con Rap1p. Sin embargo, en el telómero donde se encuentra *EPA1*, a lo largo de todas las regiones analizadas, la mayoría de las células pueden crecer en 5-FOA como lo hace la cepa parental, lo que indica que las proteínas Ku70/Ku80p no se requieren de manera importante en el silenciamiento de estas regiones. Éste resultado es novedoso pues es el primero en donde se observa que un telómero no depende completamente de Ku70p/Ku80p.

En conjunto estos datos indican que al igual que la regulación por Rif1p, la regulación por las proteínas Ku70p y Ku80p es diferencial para las regiones subteloméricas donde se encuentran los genes *EPA*. Datos de nuestro laboratorio (V. Gallegos y A. De las Peñas, datos no publicados) indican que las proteínas Ku70p y Ku80p se reclutan hacia un elemento en *cis*, que se encuentra entre el gen *EPA1* y *EPA2*, y regulan la expresión de *EPA1*. En *C. glabrata* las cepas *hdf1* Δ y *hdf2* Δ tienen el mismo fenotipo, lo que indica que probablemente, al igual que en *S. cerevisiae*, las proteínas Ku70p y Ku80p codificadas por estos genes, respectivamente, actúen como heterodímeros, ya que la ausencia de uno de los genes no se compensa por el otro (fenotipo que observamos en las regiones analizadas aledañas a los genes *EPA4-7*).

Hst1p y Hst2p no juegan un papel principal en la regulación de los *loci* de los genes EPA1-7

En general, las cepas *hst1* Δ y *hst2* Δ no mostraron ningún fenotipo en las regiones analizadas en el medio con 5-FOA. Además, se observó que estos genes no compensan la ausencia de *SIR2*. Estos resultados indican que Hst1p y Hst2p no juegan un papel principal en la regulación por silenciamiento de la cromatina en las regiones cercanas a los genes EPA1-7.

Las únicas regiones que pudieran estar reguladas negativamente por las proteínas Hst analizadas son: 1) la región entre EPA1 y EPA2 (CGM147 *hst1* Δ y CGM147 *hst2* Δ Figura 12, pág. 32), donde se observa un efecto moderado en el crecimiento en 5-FOA al eliminar los genes *HST1* y *HST2*, y 2) la región que se encuentra entre los genes *PET56* y *EPA5* (CGM158 *hst1* Δ Figura 15, pág. 35). En un análisis que realizamos, donde se incubaron por 8 días inóculos de todas las cepas *hst1* Δ citadas en este trabajo observamos que al cuarto y octavo día de incubación en las cepas CGM147 *hst1* Δ y CGM158 *hst1* Δ , una porción menor (que el primer día) de células crece en el medio con 5-FOA. Esto indica que el gen reportero *URA3* se está expresando en la mayoría de las células en los días 4 y 8, probablemente porque Hst1p es necesario para mantener el silenciamiento de estas regiones, aunque solamente en tiempos prolongados de incubación (Figura 20, en anexos). Es posible que Hst1p sea reclutado a estas regiones por un mecanismo independiente del silenciamiento subtelomérico, ya que en particular estas dos regiones son las más alejadas del telómero (a más de 20 kb); sin embargo el silenciamiento que se observa sigue dependiendo fuertemente de las proteínas Sir2/3/4p y Rif1p.

Un fenotipo que notamos en todas las mutantes *hst1* Δ (ya sea en las cepas parentales o en una cepa silvestre) es que estas cepas crecen más lento. Este fenotipo se puede observar en el medio con YPD (cepas *hst1* Δ Figuras 9-17, pág. 29-37). Esta característica no se ha observado en una cepa mutante *hst1* Δ en *S.*

cerevisiae. Aún no hemos investigado con detalle qué genes se regulan por Hst1p en *C. glabrata* que pudieran explicar el fenotipo de crecimiento lento de esta cepa. Se ha identificado mediante un experimento de microarreglo con la cepa *hst1Δ* (B. Cormack y B. Ma, datos no publicados), que en la cepa *hst1Δ* se afecta la expresión de permeasas de aminoácidos. Este dato se puede relacionar con que se sabe que el extracto de levadura (componente esencial en el medio YPD) es limitante en algunos aminoácidos como glutamina y adenina. Hst1p podría controlar bombas de estos aminoácidos.

¿Por qué se regulan diferencialmente los genes *EPA*?

Nuestros análisis muestran que las regiones donde se ubican los genes *EPA* son sensibles de manera diferencial a la pérdida de un componente particular de la maquinaria de silenciamiento. La regulación diferencial de estas regiones, podría implicar que los mismos genes *EPA* se regulan diferencialmente también. Este tipo de regulación indica que existe un sistema regulatorio complejo que controla la expresión individual de los miembros de la familia *EPA*. Puede ser que los genes respondan de manera diferente a señales particulares en el ambiente (Castano et al., 2005).

Aunque las regiones analizadas con el gen reportero *URA3* se regulen diferencialmente, no necesariamente indica que los genes *EPA* que se encuentran cercanos respondan de igual forma a las proteínas regulatorias que participan en silenciamiento, o bien que necesariamente se expresen si se elimina alguna de estas proteínas. Por ejemplo, en la Figura 6 pág. 16, se observa que ni *EPA2* ni *EPA3* se expresan en la cepa *sir3Δ*, a pesar de que el gen reportero *URA3* insertado entre *EPA2* y *EPA3* y entre *EPA3* y el telómero, se expresan completamente en la cepa *sir3Δ* (Figuras 13 y 14, pág. 33 y 34). El análisis descrito en este trabajo nos indica cual es el estado transcripcional de la cromatina en estas regiones subteloméricas, pero probablemente se requieran factores adicionales de control para la regulación de algunos de los genes *EPA*, que

posiblemente sean diferentes para cada uno. En general, se ha visto que los genes involucrados en adhesión no se expresan constitutivamente y que están bajo control transcripcional por varias vías regulatorias; por ejemplo los genes *FLO* en *S. cerevisiae* y los genes *ALS* en *C. albicans*. Los genes involucrados en adhesión son activados por diversos cambios en el ambiente, como por ejemplo, inanición por carbono o nitrógeno, cambios en el pH o en los niveles de etanol. Los cambios entre no adherencia y adherencia probablemente se deben la necesidad de adaptarse al estrés (Verstrepen and Klis, 2006).

Proteínas de superficie codificadas en regiones subteloméricas en otros organismos

Otros patógenos de humanos, además de *C. glabrata*, también codifican para familias grandes de glicoproteínas de superficie organizadas en grupos subteloméricos que funcionan en adhesión y variación antigénica. Muchos de los genes *var* en *Plasmodium falciparum*, que codifican variantes de adhesinas de superficie, están silenciados y organizados en grupos localizados en regiones subteloméricas; análisis realizados indican que el silenciamiento de estas regiones depende de Sir2 (Merrick and Duraisingh, 2006), regulación que se compara con los genes *EPA* en *C. glabrata*. El parásito *Trypanosoma brucei* contiene aproximadamente 1000 genes que codifican para variantes de proteínas de superficie, proceso que requiere el mantenimiento de cientos de genes *vsg* en estado silencioso. Al igual que en *C. glabrata*, únicamente se expresa un sólo gen y los otros permanecen silenciados. Algunos de estos genes *vsg* están localizados adyacentes a los telómeros. La proteína Sir2rp1 (una de las tres proteínas en *T. brucei* relacionadas con Sir2 de *S. cerevisiae*) se requiere para el silenciamiento de genes teloméricos, pero no para la variación antigénica (Alsford et al., 2007). En este microorganismo el papel de Ku70/Ku80p se ha analizado; sin embargo no regula las regiones donde se ubican los genes *vsg* (Barry et al., 2003). En *S. cerevisiae* los genes *FLO* codifican para adhesinas, cuatro de los cinco genes se encuentran en regiones subteloméricas. Se sabe que *FLO11* (no subtelomérico)

esta regulado por las proteínas Sfl1p y Flo8p y por la desacetilasa de histonas Hda1p. *FLO10* también se regula por las mismas proteínas excepto que está regulada por otras desacetilasas (Hst1p y Hst2p), por Ku70/80p y por Sir3p. (Halme et al., 2004). Esta situación es parecida a lo que se observa en *C. glabrata*, donde vemos que los loci de los genes EPA1-7 se regulan de manera específica y no todos dependen de todas las proteínas de implicadas en silenciamiento.

Perspectivas

Para completar el análisis de la estructura de la cromatina donde se ubican los genes EPA1-7, propongo que se realicen los siguientes experimentos.

1) Construcción de dobles mutantes. Para tratar de entender el funcionamiento de la maquinaria de silenciamiento en estas regiones, sería necesario construir dobles mutantes. a) La doble mutante *hdf1Δ hdf2Δ* sería necesaria sobre todo en el locus de EPA1, donde el efecto de las mutantes individuales es muy moderado, ésta doble mutante descartaría la posibilidad de que cada uno de estos genes compensen la ausencia del otro en esta región. b) La doble mutante *rif1Δ hdf1Δ* en *S. cerevisiae* restaura la pérdida de silenciamiento en *hdf1Δ*, sería necesario examinar ésta doble mutante en *C. glabrata* para analizar el papel de Rif1p como regulador. c) Incluir en el análisis las mutantes sencillas y dobles de los genes *HST3* y *HST4*, para descartar la posibilidad de que las proteínas Hst regulen la estructura de la cromatina en estas regiones.

2) Análisis por medio de inmunoprecipitación de la cromatina (ChIP). Propongo que se realicen experimentos de ChIP para comprobar *in situ* tanto las interacciones de los complejos de proteínas (que proponemos juegan un papel en la regulación de la estructura de la cromatina en los loci EPA1-7) con el ADN, como para identificar la distancia hasta la que se extiende el silenciamiento a partir

del telómero. Para comprobar interacciones entre las proteínas se podría utilizar la técnica de dos híbridos.

3) Ensayos por medio de la técnica Transcripción Reversa-Reacción en Cadena de la Polimerasa (RT-PCR, por sus siglas en inglés). Para analizar la expresión de los genes *EPA* en sí, que puede ser diferente de la regulación de las regiones analizadas en este trabajo ya que pueden estar regulados por otras proteínas además de las proteínas de la maquinaria de silenciamiento, propongo determinar la expresión de los genes *EPA1-7*, en cepas silvestres con mutaciones en los genes *SIR2/3/4*, *RIF1*, *HDF1/2*, y *HST1/2*.

V. CONCLUSIONES

- Las proteínas Sir2p, Sir3p y Sir4p son esenciales para mantener la estructura represiva de la cromatina, en las regiones donde se encuentran los genes *EPA1-7*.
- Las proteínas Rif1p y Ku70/80p regulan diferencialmente la estructura de la cromatina en las regiones subteloméricas de los genes *EPA1-7*.
- Hst1p y Hst2p, en general, no juegan un papel principal en la regulación de la cromatina que flanquea a los genes *EPA1-7*.
- Al parecer, la regulación por Rif1p es diferente entre *C. glabrata* y *S. cerevisiae*. Sin embargo, las proteínas Sir2p, Sir3p, Sir4p, Ku70p y Ku80p parecen jugar papeles similares en ambas especies en el silenciamiento de la cromatina en regiones subteloméricas.

VI. REFERENCIAS

- Alberts, B. (2002) *Molecular biology of the cell*. Garland Science, New York.
- Alsford, S., Kawahara, T., Isamah, C. and Horn, D. (2007) A sirtuin in the African trypanosome is involved in both DNA repair and telomeric gene silencing but is not required for antigenic variation. *Mol Microbiol*, **63**, 724-736.
- Barry, J.D., Ginger, M.L., Burton, P. and McCulloch, R. (2003) Why are parasite contingency genes often associated with telomeres? *Int J Parasitol*, **33**, 29-45.
- Blander, G. and Guarente, L. (2004) The Sir2 family of protein deacetylases. *Annu Rev Biochem*, **73**, 417-435.
- Boulton, S.J. and Jackson, S.P. (1998) Components of the Ku-dependent non-homologous end-joining pathway are involved in telomeric length maintenance and telomeric silencing. *Embo J*, **17**, 1819-1828.
- Brachmann, C.B., Sherman, J.M., Devine, S.E., Cameron, E.E., Pillus, L. and Boeke, J.D. (1995) The *SIR2* gene family, conserved from bacteria to humans, functions in silencing, cell cycle progression, and chromosome stability. *Genes Dev*, **9**, 2888-2902.
- Buck, S.W. and Shore, D. (1995) Action of a RAP1 carboxy-terminal silencing domain reveals an underlying competition between HMR and telomeres in yeast. *Genes Dev*, **9**, 370-384.
- Castano, I., Kaur, R., Pan, S., Cregg, R., Penas Ade, L., Guo, N., Biery, M.C., Craig, N.L. and Cormack, B.P. (2003) Tn7-based genome-wide random insertional mutagenesis of *Candida glabrata*. *Genome Res*, **13**, 905-915.
- Castano, I., Pan, S.J., Zupancic, M., Hennequin, C., Dujon, B. and Cormack, B.P. (2005) Telomere length control and transcriptional regulation of subtelomeric adhesins in *Candida glabrata*. *Mol Microbiol*, **55**, 1246-1258.
- Castaño, I., Cormack, B., Peñas, A. (2006a) [Virulencia del hongo patógeno oportunista *Candida glabrata*]. *Rev Latinoam Microbiol*, **48**, 66-69.
- Castaño, I., De Las Peñas, and Cormack B. P. . (2006b) Function and Regulation of Adhesin Gene Families in *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida albicans*, and *Candida glabrata*. In Joseph Heitman, S.G.F., John E. Edwards, Jr., Aaron P. Mitchell (ed.), *Molecular Principles of Fungal Pathogenesis*. ASM Press, Washington, D. C., pp. 163-173.
- Cormack, B.P. and Falkow, S. (1999) Efficient homologous and illegitimate recombination in the opportunistic yeast pathogen *Candida glabrata*. *Genetics*, **151**, 979-987.
- Cormack, B.P., Ghori, N. and Falkow, S. (1999) An adhesin of the yeast pathogen *Candida glabrata* mediating adherence to human epithelial cells. *Science*, **285**, 578-582.
- Csank, C. and Haynes, K. (2000) *Candida glabrata* displays pseudohyphal growth. *FEMS Microbiol Lett*, **189**, 115-120.
- De Las Penas, A., Pan, S.J., Castano, I., Alder, J., Cregg, R. and Cormack, B.P. (2003) Virulence-related surface glycoproteins in the yeast pathogen *Candida glabrata* are encoded in subtelomeric clusters and subject to *RAP1*- and *SIR*-dependent transcriptional silencing. *Genes Dev*, **17**, 2245-2258.

- Dolan, J.W., Bell, A.C., Hube, B., Schaller, M., Warner, T.F. and Balish, E. (2004) *Candida albicans* PLD I activity is required for full virulence. *Med Mycol*, **42**, 439-447.
- Domergue, R., Castano, I., De Las Penas, A., Zupancic, M., Locketell, V., Hebel, J.R., Johnson, D. and Cormack, B.P. (2005) Nicotinic acid limitation regulates silencing of *Candida* adhesins during UTI. *Science*, **308**, 866-870.
- Downs, J.A. and Jackson, S.P. (2004) A means to a DNA end: the many roles of Ku. *Nat Rev Mol Cell Biol*, **5**, 367-378.
- Fidel, P.L., Jr., Vazquez, J.A. and Sobel, J.D. (1999) *Candida glabrata*: review of epidemiology, pathogenesis, and clinical disease with comparison to *C. albicans*. *Clin Microbiol Rev*, **12**, 80-96.
- Filler, S.G. and Sheppard, D.C. (2006) Fungal invasion of normally non-phagocytic host cells. *PLoS Pathog*, **2**, e129.
- Frieman, M.B., McCaffery, J.M. and Cormack, B.P. (2002) Modular domain structure in the *Candida glabrata* adhesin Epa1p, a beta1,6 glucan-cross-linked cell wall protein. *Mol Microbiol*, **46**, 479-492.
- Gasser, S.M., Hediger, F., Taddei, A., Neumann, F.R. and Gartenberg, M.R. (2004) The function of telomere clustering in yeast: the circe effect. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*, **69**, 327-337.
- Ghannoum, M.A. (2000) Potential role of phospholipases in virulence and fungal pathogenesis. *Clin Microbiol Rev*, **13**, 122-143, table of contents.
- Gietz, D., St Jean, A., Woods, R.A. and Schiestl, R.H. (1992) Improved method for high efficiency transformation of intact yeast cells. *Nucleic Acids Res*, **20**, 1425.
- Gritz, L. and Davies, J. (1983) Plasmid-encoded hygromycin B resistance: the sequence of hygromycin B phosphotransferase gene and its expression in *Escherichia coli* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Gene*, **25**, 179-188.
- Halme, A., Bumgarner, S., Styles, C. and Fink, G.R. (2004) Genetic and epigenetic regulation of the FLO gene family generates cell-surface variation in yeast. *Cell*, **116**, 405-415.
- Hediger, F., Neumann, F.R., Van Houwe, G., Dubrana, K. and Gasser, S.M. (2002) Live imaging of telomeres: yKu and Sir proteins define redundant telomere-anchoring pathways in yeast. *Curr Biol*, **12**, 2076-2089.
- Hitchcock, C.A., Pye, G.W., Troke, P.F., Johnson, E.M. and Warnock, D.W. (1993) Fluconazole resistance in *Candida glabrata*. *Antimicrob Agents Chemother*, **37**, 1962-1965.
- Iraqui, I., Garcia-Sanchez, S., Aubert, S., Dromer, F., Ghigo, J.M., d'Enfert, C. and Janbon, G. (2005) The Yak1p kinase controls expression of adhesins and biofilm formation in *Candida glabrata* in a Sir4p-dependent pathway. *Mol Microbiol*, **55**, 1259-1271.
- Kantarcioglu, A.S. and Yucel, A. (2002) Phospholipase and protease activities in clinical *Candida* isolates with reference to the sources of strains. *Mycoses*, **45**, 160-165.
- Kaur, R., Domergue, R., Zupancic, M.L. and Cormack, B.P. (2005) A yeast by any other name: *Candida glabrata* and its interaction with the host. *Curr Opin Microbiol*, **8**, 378-384.

- Kaur, R., Ma, B. and Cormack, B.P. (2007) A family of glycosylphosphatidylinositol-linked aspartyl proteases is required for virulence of *Candida glabrata*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **104**, 7628-7633.
- Kojic, E.M. and Darouiche, R.O. (2004) *Candida* infections of medical devices. *Clin Microbiol Rev*, **17**, 255-267.
- Konig, P., Giraldo, R., Chapman, L. and Rhodes, D. (1996) The crystal structure of the DNA-binding domain of yeast RAP1 in complex with telomeric DNA. *Cell*, **85**, 125-136.
- Kurtz, S. and Shore, D. (1991) RAP1 protein activates and silences transcription of mating-type genes in yeast. *Genes Dev*, **5**, 616-628.
- Landry, J., Sutton, A., Tafrov, S.T., Heller, R.C., Stebbins, J., Pillus, L. and Sternglanz, R. (2000) The silencing protein SIR2 and its homologs are NAD-dependent protein deacetylases. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **97**, 5807-5811.
- Lieb, J.D., Liu, X., Botstein, D. and Brown, P.O. (2001) Promoter-specific binding of Rap1 revealed by genome-wide maps of protein-DNA association. *Nat Genet*, **28**, 327-334.
- Lu, C.F., Montijn, R.C., Brown, J.L., Klis, F., Kurjan, J., Bussey, H. and Lipke, P.N. (1995) Glycosyl phosphatidylinositol-dependent cross-linking of alpha-agglutinin and beta 1,6-glucan in the *Saccharomyces cerevisiae* cell wall. *J Cell Biol*, **128**, 333-340.
- Merrick, C.J. and Duraisingh, M.T. (2006) Heterochromatin-mediated control of virulence gene expression. *Mol Microbiol*, **62**, 612-620.
- Mishra, K. and Shore, D. (1999) Yeast Ku protein plays a direct role in telomeric silencing and counteracts inhibition by rif proteins. *Curr Biol*, **9**, 1123-1126.
- Moretti, P., Freeman, K., Coodly, L. and Shore, D. (1994) Evidence that a complex of SIR proteins interacts with the silencer and telomere-binding protein RAP1. *Genes Dev*, **8**, 2257-2269.
- Naglik, J., Albrecht, A., Bader, O. and Hube, B. (2004) *Candida albicans* proteinases and host/pathogen interactions. *Cell Microbiol*, **6**, 915-926.
- Perrod, S., Cockell, M.M., Laroche, T., Renauld, H., Ducrest, A.L., Bonnard, C. and Gasser, S.M. (2001) A cytosolic NAD-dependent deacetylase, Hst2p, can modulate nucleolar and telomeric silencing in yeast. *Embo J*, **20**, 197-209.
- Pfaller, M.A. and Diekema, D.J. (2004) Twelve years of fluconazole in clinical practice: global trends in species distribution and fluconazole susceptibility of bloodstream isolates of *Candida*. *Clin Microbiol Infect*, **10 Suppl 1**, 11-23.
- Pijnappel, W.W., Schaft, D., Roguev, A., Shevchenko, A., Tekotte, H., Wilm, M., Rigaut, G., Seraphin, B., Aasland, R. and Stewart, A.F. (2001) The *S. cerevisiae* SET3 complex includes two histone deacetylases, Hos2 and Hst1, and is a meiotic-specific repressor of the sporulation gene program. *Genes Dev*, **15**, 2991-3004.
- Richardson, M.D. (2005) Changing patterns and trends in systemic fungal infections. *J Antimicrob Chemother*, **56 Suppl 1**, i5-i11.
- Rusche, L.N., Kirchmaier, A.L. and Rine, J. (2003) The establishment, inheritance, and function of silenced chromatin in *Saccharomyces cerevisiae*. *Annu Rev Biochem*, **72**, 481-516.
- Sanchez-Vargas, L.O., Ortiz-Lopez, N.G., Villar, M., Moragues, M.D., Aguirre, J.M., Cashat-Cruz, M., Lopez-Ribot, J.L., Gaitan-Cepeda, L.A. and Quindos, G.

- (2005) Oral *Candida* isolates colonizing or infecting human immunodeficiency virus-infected and healthy persons in Mexico. *J Clin Microbiol*, **43**, 4159-4162.
- Sanglard, D., Ischer, F. and Bille, J. (2001) Role of ATP-binding-cassette transporter genes in high-frequency acquisition of resistance to azole antifungals in *Candida glabrata*. *Antimicrob Agents Chemother*, **45**, 1174-1183.
- Sheppard, D.C., Yeaman, M.R., Welch, W.H., Phan, Q.T., Fu, Y., Ibrahim, A.S., Filler, S.G., Zhang, M., Waring, A.J. and Edwards, J.E., Jr. (2004) Functional and structural diversity in the Als protein family of *Candida albicans*. *J Biol Chem*, **279**, 30480-30489.
- Sherman, F., Fink, G. R., and Hicks, J. B. (1986) Methods in yeast genetics. *Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY*.
- Shi, L., Qiu, D., Zhao, G., Corthesy, B., Lees-Miller, S., Reeves, W.H. and Kao, P.N. (2007) Dynamic binding of Ku80, Ku70 and NF90 to the IL-2 promoter in vivo in activated T-cells. *Nucleic Acids Res*, **35**, 2302-2310.
- Shore, D. (1997) Telomere length regulation: getting the measure of chromosome ends. *Biol Chem*, **378**, 591-597.
- Sikorski, R.S. and Hieter, P. (1989) A system of shuttle vectors and yeast host strains designed for efficient manipulation of DNA in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*, **122**, 19-27.
- Sundstrom, P. (2002) Adhesion in *Candida* spp. *Cell Microbiol*, **4**, 461-469.
- Verstrepen, K.J. and Klis, F.M. (2006) Flocculation, adhesion and biofilm formation in yeasts. *Mol Microbiol*, **60**, 5-15.
- Whiteway, M. and Oberholzer, U. (2004) *Candida* morphogenesis and host-pathogen interactions. *Curr Opin Microbiol*, **7**, 350-357.
- Wotton, D. and Shore, D. (1997) A novel Rap1p-interacting factor, Rif2p, cooperates with Rif1p to regulate telomere length in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genes Dev*, **11**, 748-760.

REFERENCIAS EN INTERNET

Hong EL, Balakrishnan R, Christie KR, Costanzo MC, Dwight SS, Engel SR, Fisk DG, Hirschman JE, Livstone MS, Nash R, Oughtred R, Park J, Skrzypek M, Starr B, Andrada R, Binkley G, Dong Q, Hitz BC, Miyasato S, Schroeder M, Weng S, Wong ED, Zhu KK, Dolinski K, Botstein D, and Cherry JM.

"Saccharomyces Genome Database" **SGD**

<http://www.yeastgenome.org/>

Souciet Jean-Luc Proyect coordinator (**Genolevures** III 2005 - a la fecha)
Genolevures *Candida glabrata*.

<http://cbi.labri.fr/Genolevures/elt/CAGL>

Nacional Library of Medicine. **NCBI** Nacional Center for Biotechnonology
Information. Taxonomy Browser

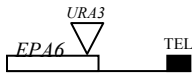
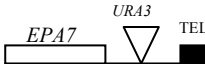

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?id=5478>

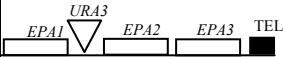
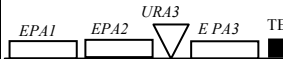
VII. ANEXOS

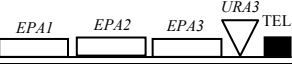
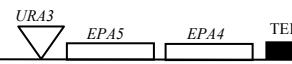
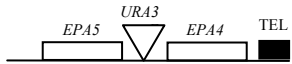
Tabla 3. Descripción genotípica y fenotípica de las cepas parentales. Cada cepa contiene una inserción del gen reportero *URA3*.

Transposones			
Transposón	GENOTIPO RELEVANTE	BIBLIOGRAFÍA	
Tn903	Tn903 <i>npt</i> (Neo ^R G418 ^R)	(Cormack and Falkow, 1999)	
Tn7	Tn7 R6Kγ ori <i>URA3 npt</i> (Km ^R)	(Castano et al., 2003)	
Cepas de <i>Candida glabrata</i>			
CEPA	GENOTIPO RELEVANTE	FENOTIPO	BIBLOGRAFÍA
CGM1	<i>ura3Δ::Tn903</i> G418 ^R	Ura ⁻	(Cormack and Falkow, 1999)
CGM118	<i>ura3Δ::Tn903</i> G418 ^R Tn7 en la región intergénica entre <i>EPA6</i> y el telómero. (pSP121/ <i>EcoRI</i>)	Ura ⁻	(Castano et al., 2005)
CGM121	<i>ura3Δ::Tn903</i> G418 ^R Tn7 en la región intergénica entre <i>EPA7</i> y el telómero. (pIC44/ <i>KpnI-BcgI</i>)	Ura ⁻	(Castano et al., 2005)
CGM146	<i>ura3Δ::Tn903</i> G418 ^R Tn7 en la región intergénica entre <i>ISC1</i> y <i>HYR1</i> (pAP540/ <i>BcgI</i>)	Ura ⁺	(De Las Penas et al., 2003)
CGM147	<i>ura3Δ::Tn903</i> G418 ^R Tn7 en la región intergénica entre <i>EPA1</i> y <i>EPA2</i> (pAP508/ <i>SpeI-BcgI</i>)	Ura ⁺	(De Las Penas et al., 2003)
CGM148	<i>ura3Δ::Tn903</i> G418 ^R Tn7 en la región intergénica entre <i>EPA2</i> y <i>EPA3</i> (pAP559/ <i>BsrG-SphI</i>)	Ura ⁻	(De Las Penas et al., 2003)
CGM149	<i>ura3Δ::Tn903</i> G418 ^R Tn7 en la región intergénica entre <i>EPA3</i> y el telómero. (pAP553/ <i>PstI-EcoRI</i>)	Ura ⁻	(De Las Penas et al., 2003)
CGM158	<i>ura3Δ::Tn903</i> G418 ^R Tn7 en la región intergénica entre <i>PET56</i> y <i>EPA5</i> . (pAP541/ <i>BcgI</i>)	Ura ⁻	(De Las Penas et al., 2003)
CGM159	<i>ura3Δ::Tn903</i> G418 ^R Tn7 en la región intergénica entre <i>EPA5</i> y <i>EPA4n</i> (pAP534/ <i>BcgI</i>)	Ura ⁻	(De Las Penas et al., 2003)
CGM160	<i>ura3Δ::Tn903</i> G418 ^R Tn7 en la región intergénica entre <i>EPA4</i> y el telómero. (pAP471/ <i>ApaLI-XbaI</i>)	Ura ⁻	(De Las Penas et al., 2003)

Tabla 4. Descripción de todas las cepas analizadas. La tabla está organizada en 9 secciones, en cada sección se encuentran las cepas mutantes provenientes de la misma cepa parental.

N°	CEPA	GENOTIPO RELEVANTE	INSERCCIONES DEL GEN <i>URA3</i>
CGM118			
1	CGM118	<i>ura3</i> Δ ::Tn903 G418R Tn7 en la región intergénica entre <i>EPA6</i> y el telómero (pSP121/ <i>EcoRI</i>)	
2	CGM219	CGM118 <i>sir2</i> Δ :: <i>hph</i> (pAP596/ <i>SacI-KpnI</i>)	"
3	CGM299	CGM118 <i>sir3</i> Δ :: <i>hph</i> (pIC120/ <i>KpnI-HpaI</i> +T4 DNA polimerasa)	"
4	CGM221	CGM118 <i>sir4</i> Δ :: <i>hph</i> (pAP598/ <i>BsgI</i>)	"
5	CGM278	CGM118 <i>rif1</i> Δ :: <i>hph</i> (pSP166/ <i>BsgI</i>)	"
6	CGM225	CGM118 <i>hdf1</i> Δ :: <i>hph</i> (pAP611/ <i>BcgI</i>)	"
7	CGM227	CGM118 <i>hdf2</i> Δ :: <i>hph</i> (pAP612/ <i>BcgI</i>)	"
8	CGM320	CGM118 <i>hst1</i> Δ :: <i>hph</i> (pAP628/ <i>BseRI-BglII</i>)	"
9	CGM231	CGM118 <i>hst2</i> Δ :: <i>hph</i> (pAP633/ <i>BsgI-SacI</i>)	"
CGM121			
10	CGM121	<i>ura3</i> Δ ::Tn903 G418R Tn7 en la región intergénica entre <i>EPA7</i> y el telómero (pIC44/ <i>KpnI-BcgI</i>)	
11	CGM248	CGM121 <i>sir2</i> Δ :: <i>hph</i> (pAP596/ <i>SacI-KpnI</i>)	"
12	CGM301	CGM121 <i>sir3</i> Δ :: <i>hph</i> (pIC120/ <i>KpnI-HpaI</i> +T4 DNA polimerasa)	"
13	CGM250	CGM121 <i>sir4</i> Δ :: <i>hph</i> (pAP598/ <i>BsgI</i>)	"
14	CGM268	CGM121 <i>rif1</i> Δ :: <i>hph</i> (pSP166/ <i>BsgI</i>)	"
15	CGM275	CGM121 <i>hdf1</i> Δ :: <i>hph</i> (pAP611/ <i>BcgI</i>)	"
16	CGM276	CGM121 <i>hdf2</i> Δ :: <i>hph</i> (pAP612/ <i>BcgI</i>)	"
17	CGM321	CGM121 <i>hst1</i> Δ :: <i>hph</i> (pAP628/ <i>BseRI-BglII-StuI</i>)	"
18	CGM273	CGM121 <i>hst2</i> Δ :: <i>hph</i> (pAP633/ <i>BsgI-SacI</i>)	"
CGM146			
19	CGM146	<i>ura3</i> Δ ::Tn903 G418R Tn7 en la región intergénica entre <i>ISC1</i> y <i>HYR1</i> (pAP540/ <i>BcgI</i>)	

20	CGM233	CGM146 <i>sir2Δ::hph</i> (pAP596/ <i>SacI-KpnI</i>)	"
21	CGM280	CGM146 <i>sir3Δ::hph</i> (pIC120/ <i>KpnI-HpaI</i> +T4 DNA polimerasa)	"
22	CGM234	CGM146 <i>sir4Δ::hph</i> (pAP598/ <i>BsgI</i>)	"
23	CGM176	CGM146 <i>rif1Δ::hph</i> (pSP166/ <i>BsgI</i>)	"
24	CGM236	CGM146 <i>hdf1Δ::hph</i> (pAP611/ <i>BcgI</i>)	"
25	CGM237	CGM146 <i>hdf2Δ::hph</i> (pAP612/ <i>BcgI</i>)	"
26	CGM332	CGM146 <i>hst1Δ::hph</i> (pAP628/ <i>BseRI-BglII-StuI</i>)	"
27	CGM235	CGM146 <i>hst2Δ::hph</i> (pAP633/ <i>BsgI-SacI</i>)	"
CGM147			
28	CGM147	<i>ura3Δ::Tn903</i> G418R Tn7 en la región intergénica entre <i>EPA1</i> y <i>EPA2</i> (pAP508/ <i>SpeI-BcgI</i>)	
29	CGM238	CGM147 <i>sir2Δ::hph</i> (pAP596/ <i>SacI-KpnI</i>)	"
30	CGM282	CGM147 <i>sir3Δ::hph</i> (pIC120/ <i>KpnI-HpaI</i> +T4 DNA polimerasa)	"
31	CGM239	CGM147 <i>sir4Δ::hph</i> (pAP598/ <i>BsgI</i>)	"
32	CGM192	CGM147 <i>rif1Δ::hph</i> (pSP166/ <i>BsgI</i>)	"
33	CGM241	CGM147 <i>hdf1Δ::hph</i> (pAP611/ <i>BcgI</i>)	"
34	CGM342	CGM147 <i>hdf2Δ::hph</i> (pAP612/ <i>BcgI</i>)	"
35	CGM334	CGM147 <i>hst1Δ::hph</i> (pAP628/ <i>BseRI-BglII-StuI</i>)	"
36	CGM240	CGM147 <i>hst2Δ::hph</i> (pAP633/ <i>BsgI-SacI</i>)	"
CGM148			
37	CGM148	<i>ura3Δ::Tn903</i> G418R Tn7 en la región intergénica entre <i>EPA2</i> y <i>EPA3</i> (pAP559/ <i>BsrG-SphI</i>)	
38	CGM243	CGM148 <i>sir2Δ::hph</i> (pAP596/ <i>SacI-KpnI</i>)	"
39	CGM287	CGM148 <i>sir3Δ::hph</i> (pIC120/ <i>KpnI-HpaI</i> +T4 DNA polimerasa)	"
40	CGM244	CGM148 <i>sir4Δ::hph</i> (pAP598/ <i>BsgI</i>)	"
41	CGM194	CGM148 <i>rif1Δ::hph</i> (pSP166/ <i>BsgI</i>)	"
42	CGM246	CGM148 <i>hdf1Δ::hph</i> (pAP611/ <i>BcgI</i>)	"

43	CGM247	CGM148 <i>hdf2Δ::hph</i> (pAP612/ <i>BcgI</i>)	"
44	CGM338	CGM148 <i>hst1Δ::hph</i> (pAP628/ <i>BseRI-BglII-StuI</i>)	"
45	CGM245	CGM148 <i>hst2Δ::hph</i> (pAP633/ <i>BsgI-SacI</i>)	"
CGM149			
46	CGM149	<i>ura3Δ::Tn903</i> G418R Tn7 en la región intergénica entre <i>EPA3</i> y el telómero (pAP553/ <i>PstI-EcoRI</i>)	
47	CGM252	CGM149 <i>sir2Δ::hph</i> (pAP596/ <i>SacI-KpnI</i>)	"
48	CGM289	CGM149 <i>sir3Δ::hph</i> (pIC120/ <i>KpnI-HpaI</i> +T4 DNA polimerasa)	"
49	CGM340	CGM149 <i>sir4Δ::hph</i> (pAP598/ <i>BsgI</i>)	"
50	CGM200	CGM149 <i>rif1Δ::hph</i> (pSP166/ <i>BsgI</i>)	"
51	CGM254	CGM149 <i>hdf1Δ::hph</i> (pAP611/ <i>BcgI</i>)	"
52	CGM255	CGM149 <i>hdf2Δ::hph</i> (pAP612/ <i>BcgI</i>)	"
53	CGM329	CGM149 <i>hst1Δ::hph</i> (pAP628/ <i>BseRI-BglII-StuI</i>)	"
54	CGM253	CGM149 <i>hst2Δ::hph</i> (pAP633/ <i>BsgI-SacI</i>)	"
GM158			
55	CGM158	<i>ura3Δ::Tn903</i> G418R Tn7 en la región intergénica entre <i>PET56</i> y <i>EPA5</i> (pAP541/ <i>BcgI</i>)	
56	CGM325	CGM158 <i>sir2Δ::hph</i> (pAP596/ <i>SacI-KpnI</i>)	"
57	CGM291	CGM158 <i>sir3Δ::hph</i> (pIC120/ <i>KpnI-HpaI</i> +T4 DNA polimerasa)	"
58	CGM256	CGM158 <i>sir4Δ::hph</i> (pAP598/ <i>BsgI</i>)	"
59	CGM203	CGM158 <i>rif1Δ::hph</i> (pSP166/ <i>BsgI</i>)	"
60	CGM258	CGM158 <i>hdf1Δ::hph</i> (pAP611/ <i>BcgI</i>)	"
61	CGM259	CGM158 <i>hdf2Δ::hph</i> (pAP612/ <i>BcgI</i>)	"
62	CGM330	CGM158 <i>hst1Δ::hph</i> (pAP628/ <i>BseRI-BglII-StuI</i>)	"
63	CGM257	CGM158 <i>hst2Δ::hph</i> (pAP633/ <i>BsgI-SacI</i>)	"
CGM159			
64	CGM159	<i>ura3Δ::Tn903</i> G418R Tn7 en la región intergénica entre <i>EPA5</i> y <i>EPA4</i> (pAP534/ <i>BcgI</i>)	


65	CGM260	CGM159 <i>sir2Δ::hph</i> (pAP596/ <i>SacI-KpnI</i>)	"
66	CGM293	CGM159 <i>sir3Δ::hph</i> (pIC120/ <i>KpnI-HpaI</i> +T4 DNA polimerasa)	"
67	CGM261	CGM159 <i>sir4Δ::hph</i> (pAP598/ <i>BsgI</i>)	"
68	CGM223	CGM159 <i>rif1Δ::hph</i> (pSP166/ <i>BsgI</i>)	"
69	CGM263	CGM159 <i>hdf1Δ::hph</i> (pAP611/ <i>BcgI</i>)	"
70	CGM264	CGM159 <i>hdf2Δ::hph</i> (pAP612/ <i>BcgI</i>)	"
71	CGM336	CGM159 <i>hst1Δ::hph</i> (pAP628/ <i>BseRI-BglII-StuI</i>)	"
72	CGM262	CGM159 <i>hst2Δ::hph</i> (pAP633/ <i>BsgI-SacI</i>)	"
CGM160			
73	CGM160	<i>ura3Δ::Tn903</i> G418R Tn7 en la región intergénica entre <i>EPA4</i> y el telómero (pAP471/ <i>ApaI-XbaI</i>)	
74	CGM177	CGM160 <i>sir2Δ::hph</i> (pAP596/ <i>SacI-KpnI</i>)	"
75	CGM303	CGM160 <i>sir3Δ::hph</i> (pIC120/ <i>KpnI-HpaI</i> +T4 DNA polimerasa)	"
76	CGM196	CGM160 <i>sir4Δ::hph</i> (pAP598/ <i>BsgI</i>)	"
77	CGM270	CGM160 <i>rif1Δ::hph</i> (pSP166/ <i>BsgI</i>)	"
78	CGM182	CGM160 <i>hdf1Δ::hph</i> (pAP611/ <i>BcgI</i>)	"
79	CGM204	CGM160 <i>hdf2Δ::hph</i> (pAP612/ <i>BcgI</i>)	"
80	CGM319	CGM160 <i>hst1Δ::hph</i> (pAP628/ <i>BseRI-BglII-StuI</i>)	"
81	CGM216	CGM160 <i>hst2Δ::hph</i> (pAP633/ <i>BsgI-SacI</i>)	"

Tabla 5. Plásmidos para construir las mutaciones.

PLÁSMIDO	GENOTIPO RELEVANTE	ENZIMAS DE RESTRICCIÓN PARA LIBERAR EL FRAGMENTO	REFERENCIA
Vectores de clonación			
pRS306	Vector de clonación, integrativo. <i>URA3</i> , Ap ^R .		(Sikorski and Hieter, 1989)
pYIplac211	Vector de clonación, integrativo. <i>URA3</i> , Ap ^R .		(Gietz and Sugino, 1988)
pAP573	Fragmento de 2.012 kb con extremos <i>KpnI/SacI</i> , tratado con T4pol, P _{PGK1} :: <i>hph</i> ::3'UTR _{HIS3} confiere resistencia a higromicina, clonado en pRS306 digerido con <i>SmaI</i> . <i>URA3</i> , Ap ^R , Hyg ^R .	(<i>KpnI/SacI</i>)	(Domergue et al., 2005)
pAP585	Secuencia <i>FRT</i> (oligos #2288/#2289) clonado en pAP573 digerido con <i>BamHI</i> . <i>URA3</i> , Ap ^R , Hyg ^R .		(Domergue et al., 2005)
pAP599	Secuencia <i>FRT</i> (oligos #2290/#2291) clonado en pAP585 digerido con <i>HindIII</i> . <i>URA3</i> , Ap ^R , Hyg ^R .	<i>BamHI-HindIII</i>	(Domergue et al., 2005)
Plásmidos para construir deleciones			
pAP596 <i>sir2Δ::hph</i>	pAP573 con los extremos de <i>SIR2</i> , 5' de 0.581 kb (<i>SacI/BamHI</i> -oligos #22050/#2251) y 3' de 0.816 kb (<i>HindIII/KpnI</i> -oligos #2252/#2253) <i>URA3</i> , Ap ^R , Hyg ^R .	<i>SacI-KpnI</i>	(Domergue et al., 2005)
pIC39 vector para <i>sir3Δ::hph</i>	Extremos de <i>SIR3</i> , 5' de 0.551 kb (<i>KpnI/BamHI</i> -oligos #1906/#1907) y 3' de 0.978 kb (<i>BamHI/SacI</i> -oligos #1899/#1900). Clonados en pRS306 digerido con <i>KpnI/SacI</i> . <i>URA3</i> , Ap ^R , Hyg ^R .		(De Las Penas et al., 2003)
pIC120 <i>sir3Δ::hph</i>	Fragmento con extremos <i>BamHI-HindIII</i> y tratado con T4pol, P _{PGK1} :: <i>hph</i> ::3'UTR _{HIS3} flanqueada por sitios <i>FRT</i> . Clonado en pIC39 digerido con <i>BamHI</i> y tratado con T4pol. <i>URA3</i> , Hyg ^R , Ap ^R .	<i>KpnI-HpaI</i> +T4 DNA polimerasa*	Este trabajo
pAP598 <i>sir4Δ::hph</i>	pAP573 con los extremos de <i>SIR4</i> , 5' de 0.904 kb (<i>KpnI+BsgI/HindIII</i> -oligos #2280/#2281) y 3' de 0.894 kb (<i>BamHI/SacI+BsgI</i> -oligos #2283-#2284). <i>URA3</i> , Ap ^R , Hyg ^R .	<i>BsgI</i>	Colección de laboratorio

pSP165 vector para <i>rif1Δ::hph</i>	pYlplac211 con extremos de <i>RIF1</i> , 5' de 0.934 kb (<i>HindIII/XhoI</i> -oligos #2051/#2059) y 3' de 0.884 kb (<i>XhoI/XmaI</i> -oligos #1952#2050). <i>URA3, Ap^R</i> .		Colección de laboratorio
pSP166 <i>rif1Δ::hph</i>	Fragmento <i>P_{PGK1}::hph::3'UTR_{HIS3}</i> de 2.012 kb con extremos <i>SacI KpnI</i> y tratado con T4pol, clonado en pSP165 digerido con <i>XhoI</i> tratado con T4por.	<i>BsgI</i>	Colección de laboratorio
pAP611 <i>hdf1Δ::hph</i> (Ku70p)	pAP573 con los extremos de <i>HDF1</i> , 5' de 0.816 kb (<i>KpnI+BcgI/HindIII</i> -oligos #2238/#2239) y 3' de 0.836 kb (<i>BglII/SacI+BcgI</i> -oligos #2240/#2241) <i>URA3, Ap^R, Hyg^R</i>	<i>BcgI</i>	Colección de laboratorio
pAP612 <i>hdf2Δ::hph</i> (Ku80p)	pAP573 con los extremos de <i>HDF2</i> , 5' de 0.958 kb (<i>KpnI+BcgI/HindIII</i> -oligos #2244/#2245) y 3' de 0.815 kb (<i>BglII/SacI+BcgI</i> -oligos #2246/#2247) <i>URA3, Ap^R, Hyg^R</i>	<i>BcgI</i>	Colección de laboratorio
pAP628 <i>hst1Δ::hph</i>	pAP599 con los extremos de <i>HST1</i> , 5' de 0.922 kb (<i>KpnI/XhoI</i> -oligos #2274/#2275) y 3' de 1.2 kb (<i>SacI/BamHI</i> - oligos #2276/#2277). <i>URA3,</i> <i>Ap^R, Hyg^R</i> .	<i>BseRI/BglII</i>	(Domergue et al., 2005)
pAP633 <i>hst2Δ::hph</i>	pAP599 con los extremos de <i>HST2</i> , 5' de 1.0 kb (oligos <i>KpnI+BsgI/SalI</i> #2256/#2257) y 3' de 0.9 kb (<i>BamHI/SacI+BsgI</i> - oligos #2258/#2259) <i>URA3, Ap^R, Hyg^R</i>	<i>BsgI/SacI</i>	(Domergue et al., 2005)

Tabla 6. Oligonucleótidos utilizados para comprobar las construcciones de cada mutación por medio de la técnica PCR. Y oligonucleótidos utilizados para la construcción de plásmidos. (@=en la posición indicada).

No	SECUENCIA	SITIOS DONDE HIBRIDA
Oligos para comprobar las inserciones en cada extremo		
# 15	CGATAAGAGGCCACGTGCTTTATG	PGK1-P Rev-out
# 16	AGAAATACGCACGAACACGATATAGAGG	HIS3 Fw-out
# 2254	CAACCGCTGAAATTATTAGAGCCACG	SIR2@ -1165 Fw
# 2255	TTGGGCAGAGGTGTTCAACTCTAGACC	SIR2@ +982 Rev
# 54	GCAGCCACTGCACAAGAATC	SIR3@ -943 Fw
# 55	AGGCAGCTCGCCAGAATCCCATTC	SIR3@ +968 Rev
# 2282	GCAGCTTACACTAAAGTCACGT	SIR4@ -1004 Fw
# 2285	ACAACCAACTCAAACAAGTACCTACCG	SIR4@ +1001Rev
#2055	GAGTACGAAGATTGAACATAATTA	RIF1@ -925 Fw
# 56	GGGTCTGACAGCCATCAAGTTAC	RIF1@ +946 Rev
# 2242	AGCGAGGTACGAAGATATAGAACGC	HDF1@ -1034 Fw
# 2243	CCCGTACTACAACATAACAATGCAGCT	HDF1@ +971 Rev
# 2248	AGCCGCTGTATCGGGATCAAC	HDF2@ -1148 Fw
# 2249	CCGACAACAAGAACAGCACCCCTTGG	HDF2@ +988 Rev
# 2278	GTCAAATCTTGACACAGGCAGTGGAG	HST1@ -1080 Fw
# 88	AAGAGCTAAGAGAACTTTGTCCTCCGTC	HST1@ +1306 Rev
# 2260	CCCCTTATTACATAATGGCTGTCTATC	HST2@ -983 Fw
# 2261	GCAAGAGGAAAGGAGAAAATACAGATAGA	HST2@ +959 Rev
Oligos internos para comprobar la ausencia de cada gen		
# 84	GAATGTCAAGGACGGGAAG	SIR2 int@249 Fw
# 85	CAATAGACGAATGGTGAAC	SIR2 int@546 Rv
# 108	GACCTGGAAGGATGGCAGATAATC	SIR3 int@18 Fw
# 109	GGGCTTGAACCTTGTAGTAGTC	SIR3 int@323 Rv
# 86	TAGTGAAGTAGTTAGTCCAATG	SIR4 int@144 Fw
# 87	CGTAGTATCCTGTTCAAGC	SIR4 int@464 Rv
#110	GGGAGTTATCGCACCCAGATATGC	RIF int@305 Fw
#111	GACAAATTTACATTAGCCGCTATTGG	RIF int@605 Rv
# 80	CGGAACATATGTTTCGAGGTAC	HDF1 int@141 Fw
# 81	GGAATGTTTAGTTTCTTATTCTGATC	HDF1 int@443 Rv
# 82	GGAATGTTTAGTTTCTTATTCTGATC	HDF2 int@134 Fw
#83	CGCGAGTCCAGCTCCTCG	HDF2 int@430 Rv
# 76	GAACCCAGAAAATGGAAAG	HST1 int@210 Fw
# 77	GATTAGTTTAACAGCCTC	HST1 int@507 Rv
# 78	GTTGGTGCAGGTATATCAAC	HST2 int@67 Fw
# 79	GCTTCTACCAGATAGTCATC	HST2 int@376 Rv

Oligos utilizados en la construcción de plásmidos		
#2050	CGATATAGAGCTCTACTTACACGCATTACAG	SIR2@-753 SacI Fw
#2051	CGCGGATCCCTCTAAACACTATTGGTAAAAGCTC	SIR2@-172 BamH Rv
#2052	CCCAAGCTTTGGCTAGATATCTCCCCAAAC	SIR2@+1 Hind Fw
#2053	AGTGGGTACCAGACCTTCTATAGTGTTGATTG	SIR2@+820 Kpn Rv
#1906	GGGGTACCGGCCGTGGCCACGGCCTTG	SIR3@-543 Kpn Fw
#1907	CGGGATCCATCCTCTTACTTAATCCGAAAC	SIR3@ 2 BamH Rv
#1899	CGGGATCCAATCGTGTCTCACCG	SIR3@ 3242 BamH Fw
#1900	CCGAGCTCCCAAATGCCCAAATGCCTAGTG	SIR3@+948 SacI Rv
#2280	CGGGGTACCTTGTGCAGATGTGCCGTAGTACCT AAACTTGCCC	SIR4@-904 Kpn BsgI Fw
#2281	CCCAAGCTTTTTTTATTATGAGTACAACAGTAGGT T	SIR4@-1 Hind Rv
#2283	CGCGGATCCATTCTAACTTAATATATATGCCCTA TAATC	SIR4@+1 BamH Fw
#2284	CAAGGAGCTCTTGTGCAGTACAGCAAATATCGAC ATATTAATTCACC	SIR4@+901 SacI BsgI Rv
#2051	CCAAGCTTGAATGGCATCTGCTGTGCAGAGAAA TAC	RIF1@ -835 Hind Fw
#2059	ATCTTGCTCGAGTGGTCTTG	RIF1@ 102 Xho Rv
#1952	TAACCGACTCGAGATAGCCACTTACTGTTAAGAT TTG	RIF1@ 4992 Xho Fw
#2050	TAATGTTCTCCCGGGGCACCAGCAAAGATCGATG TCACC	RIF@+871 Xma I Rv
#2238	CGGGGTACCTTCCGACTTGGTTGCATACGAGCAT GTTTTGCTCGGG	HDF1@-813 Kpn Bcg Fw
#2239	CCCAAGCTTATTCGCTATTTTTCTATTCACAGAG	HDF1@-1 Hind Rv
#2240	GGAAGATCTCCCACTTTCTTTTTTGATAATTC	HDF1@+1 Bgl II Fw
#2241	CAAGGAGCTCCTTCCGATTTGGTTGCTATGAAAGA ACCAGACAGTG	HDF1@+831 SacI Bcg Rv
#2244	CGGGGTACCTTCCGACTACGATGCCATGCTCTCG CTACTACCCC	HDF2@-1058 Kpn Bcg Fw
#2245	CCCAAGCTTAGCCTTTTTCTATGTAGACGC	HDF2@-101 Hind Rv
#2246	CTAGAGATCTCAGGTCGTATATATATCATTCTATA ACTC	HDF2@+1 Bgl II Fw
#2247	CAAGGAGCTCCTTCCGAGTTGGTTGCGATTCTATT TGGGACATTAGATGAG	HDF2@+825 SacI Bcg Rv
#2274	CGGGGTACCGCTAGCGAAGGAGACAGGCACAAT CG	HST1@-979 Kpn Fw
#275	GTTGCTCGAGCTGTCATCTCACCTACAGATATCC GTGG	HST1@-1 Xho Rv
#2276	CAAGGAGCTCTCCTTGTTCCGAAGGTGAAGACTTC G	HST1@+1251 SacI Rv
#2277	CGCGGATCCACCGCTCATTTGTTTTATAATAGAT ATTG	HST1@+1 BamH Fw
#2256	CGGGGTACCTTGTGCAGCAAGATGATAAAAAGTC CAGAACATTC	HST2@-901 Kpn Bcg Fw
#2257	TTAACCTGGTCCGACTATCTTTGGGTTGCGACGC	HST2@-1 Sal Rv
#2258	CGCGGATCCATTTGTTAATCCTAAATGGTATTAT CCGC	HST2@+1 BamH Fw
#2259	CAAGGAGCTCTTGTGCAGTTGGTGCCGAATCTTA CCCAGAAAAG	HST2@+901 SacI Bsg Rv

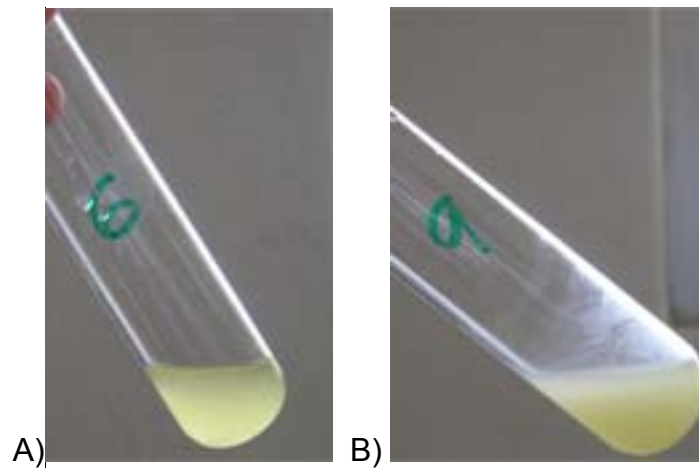


Figura 18. Adherencia al vidrio de cepas mutantes en genes *SIR2/3/4*. Después de transformar las células para construir las mutaciones en los genes *SIR2/3/4*, las células se cultivan a 30 °C por 12 ho aprox. en medio líquido YPD para extraer ADN genómico y comprobar la estructura de las mutaciones. En las clonas positivas para las mutaciones en los tres genes *SIR* se observa una capa de células adheridas al tubo de vidrio. A) Clona negativa #6 de la cepa CGM121 transformada con el plásmido pAP596, para generar una mutación en *SIR2*. B) Clona positiva #9 de la cepa CGM121 transformada con el plásmido pAP596, para generar una mutación en *SIR2*. En las cepas con mutaciones en *SIR3* y *SIR4* se observa el mismo fenotipo (imagen no mostrada).

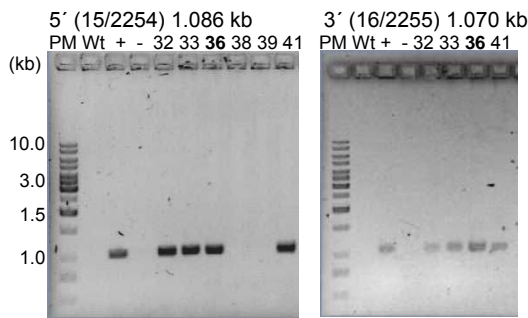
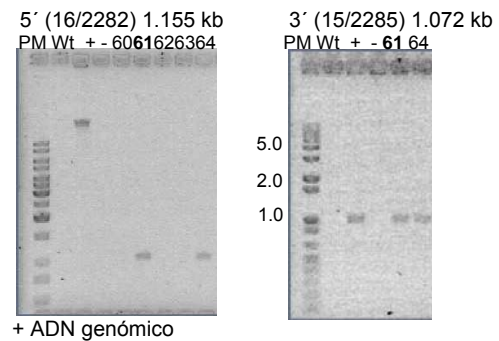
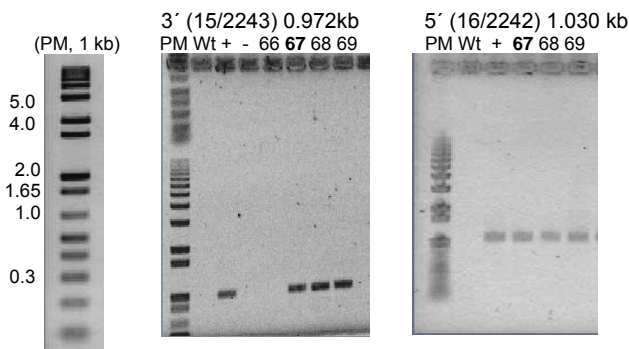
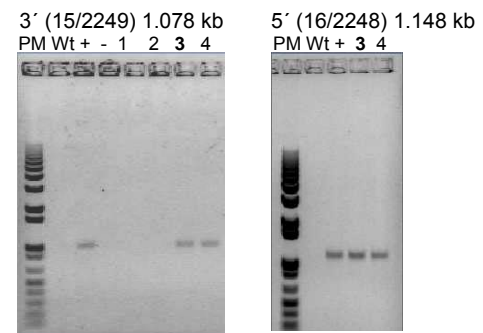
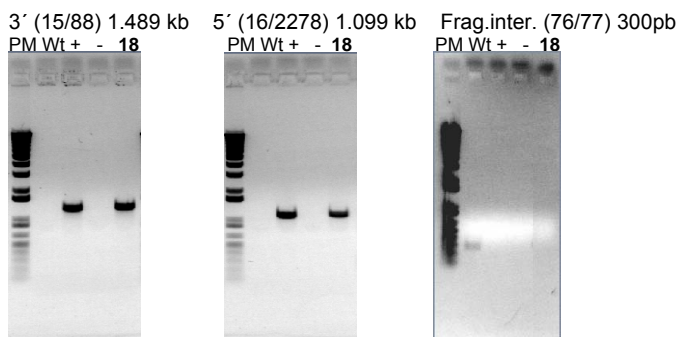
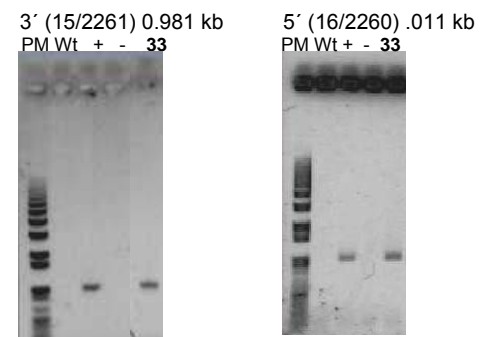
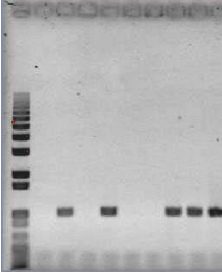
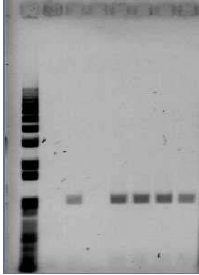
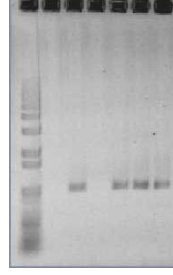
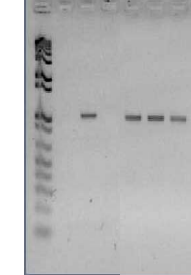
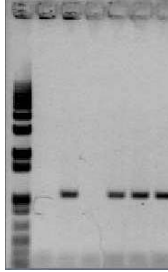
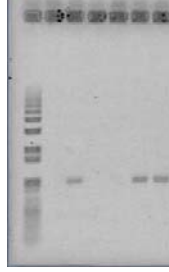
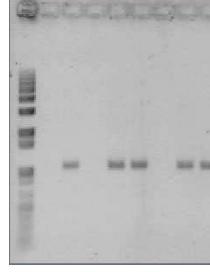
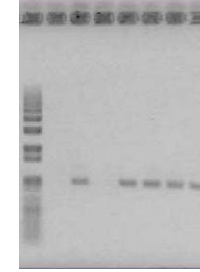
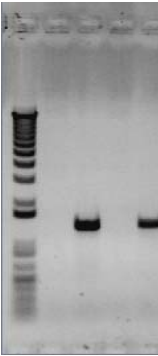
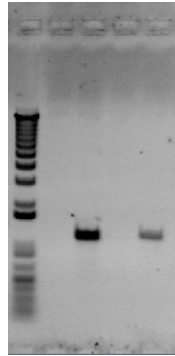
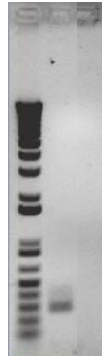
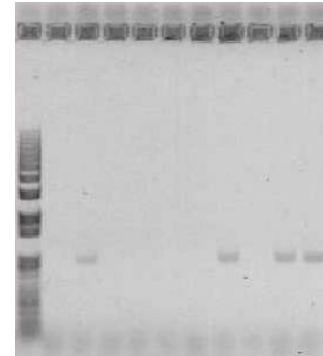
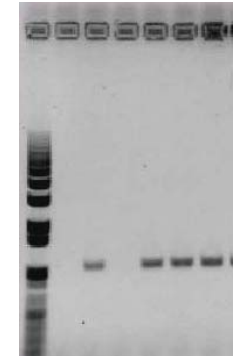
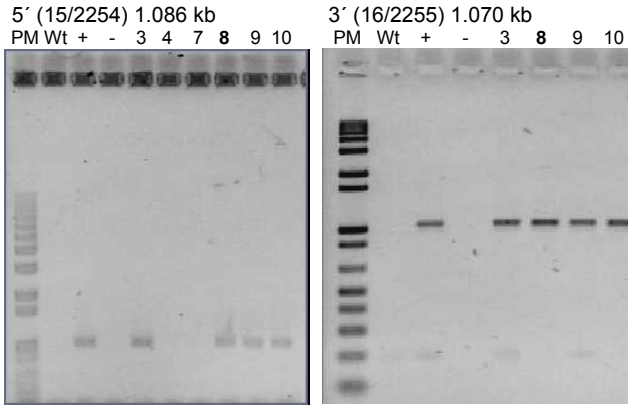
CGM160 (*sir2*, *sir4*, *hdf1*, *hdf2*, *hst1*, *hst2*) Δ **CGM160 *sir2* Δ (+ CGM71 *sir2* Δ)****CGM160 *sir4* Δ (+ CGM261 *sir4* Δ)****CGM160 *hdf1* Δ (+ CGM263 *hdf1* Δ)****CGM160 *hdf2* Δ (+ CGM264 *hdf2* Δ)****CGM160 *hst1* Δ (+ CGM76 *hst1* Δ)****CGM160 *hst2* Δ (+ CGM262 *hst2* Δ)**

Figura 19. Análisis por PCR de todas las cepas construidas en este trabajo. Para comprobar la inserción en el extremo 5' y 3' se utilizaron parejas de oligonucleótidos que hibridan dentro del casete *hph* y fuera del fragmento clonado para construir la inserción, en una región del cromosoma endógeno. Para corroborar la ausencia del gen, se amplifica una región de 300 pb aprox. dentro del gen que se eliminó, se espera únicamente la amplificación de las cepas silvestres. Las cepas *hst1* Δ son 68 pb más grandes que la cepa de control positivo (CGM76 *hst1* Δ) por que contienen secuencias FRT que flanquean el casete de *hph* para escindir el marcador de selección, si se requiere. La cepa Wt es la cepa CGM1, el control positivo se indica como +, y el control negativo (-) contiene todos los componentes de la mezcla de PCR excepto la muestra de ADN. La pareja de oligonucleótidos utilizadas en cada PCR se encuentra entre paréntesis. En algunos casos se muestran las cepas que no son positivas para la mutación.

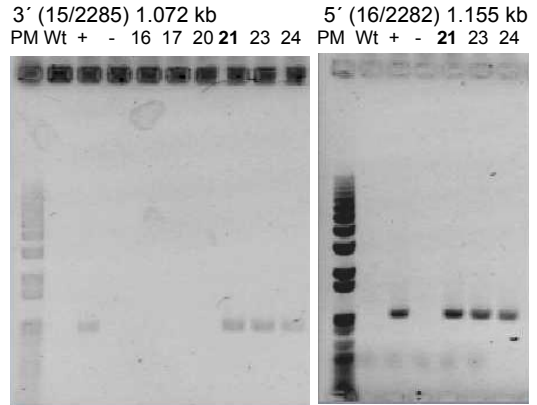
CGM118 (*sir2*, *sir4*, *hdf1*, *hdf2*, *hst1*, *hst2*) Δ **CGM118 *sir2* Δ (+ CGM71 *sir2* Δ)**5' (15/2254) 1.086 kb
PM Wt + - 1 2 3 4 5 63' (16/2255) 1.070 kb
PM Wt + - 1 4 5 6**CGM118 *sir4* Δ (+ CGM261 *sir4* Δ)**3' (15/2285) 1.072 kb
PM Wt + - 13 15 165' (16/2282) 1.155 kb
PM Wt + - 13 15 16**CGM118 *hdf1* Δ (+ CGM263 *hdf1* Δ)**5' (16/2242) 1.030 kb
PM Wt + - 1 2 33' (15/2243) 0.972 kb
PM Wt + - 1 2 3**CGM118 *hdf2* Δ (+ CGM264 *hdf2* Δ)**5' (16/2248) 1.148 kb
PM Wt + - 13 14 15 16 173' (15/2249) 1.078 kb
PM Wt + - 13 14 16 17**CGM118 *hst1* Δ (+ CGM76 *hst1* Δ)**3' (15/88) 1.489 kb
PM Wt + - 315' (16/2278) 1.099 kb
PM Wt + - 31Frag.inter.
(76/77) 300pb
PM Wt 31**CGM118 *hst2* Δ (+ CGM262 *hst2* Δ)**3' (15/2261) 0.981 kb
PM Wt + - 37 38 39 40 41 42 435' (16/2260) 1.011 kb
PM Wt + - 40 42 43**Figura 19.** Análisis por PCR de todas las cepas construidas en este trabajo.

CGM121 (*sir2*, *sir4*, *hdf1*, *hdf2*, *hst1*, *hst2*) Δ

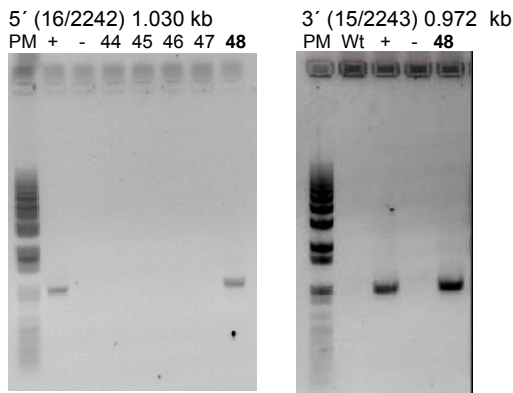
CGM121 *sir2* Δ (+ CGM71 *sir2* Δ)



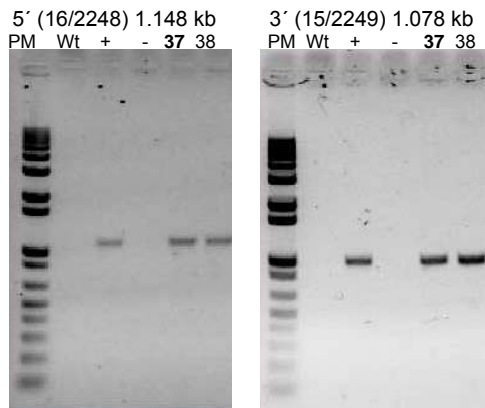
CGM121 *sir4* Δ (+ CGM261 *sir4* Δ)



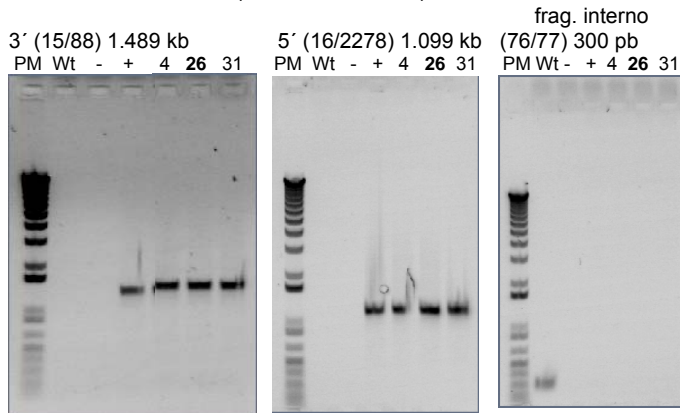
CGM121 *hdf1* Δ (+ CGM263 *hdf1* Δ)



CGM121 *hdf2* Δ (+ CGM264 *hdf2* Δ)



CGM121 *hst1* Δ (+ CGM76 *hst1* Δ)



CGM121 *hst2* Δ (+ CGM262 *hst2* Δ)

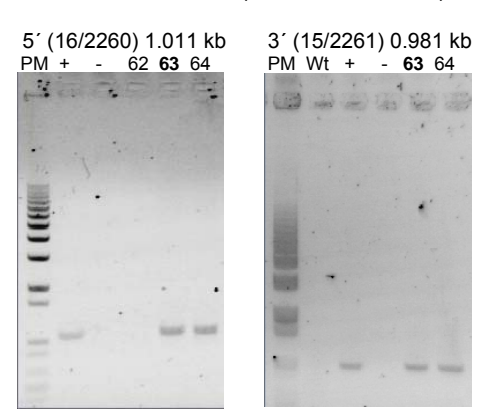
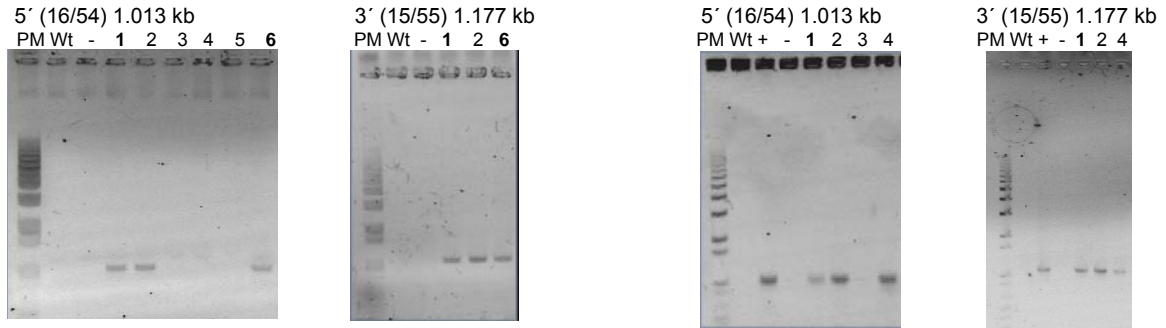
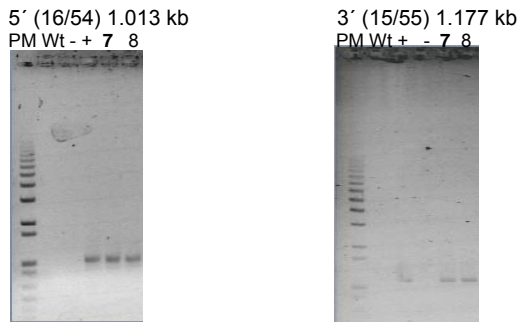
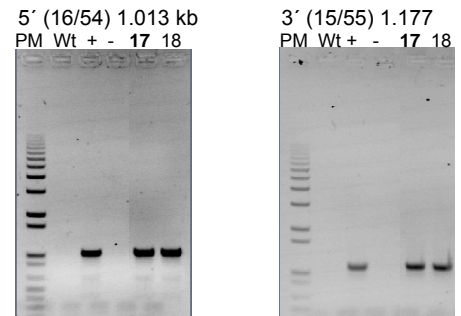
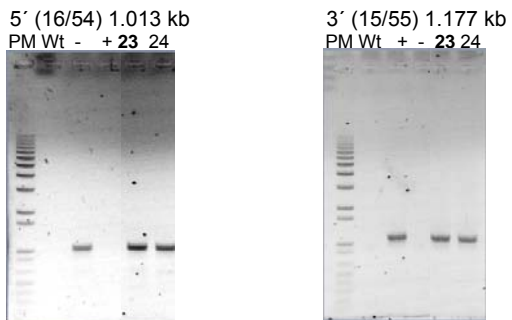
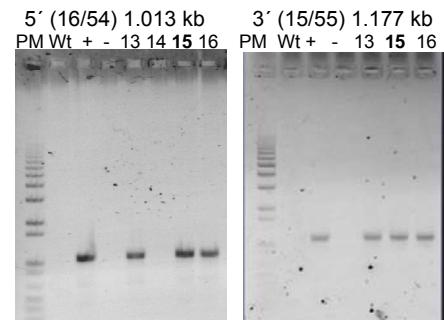
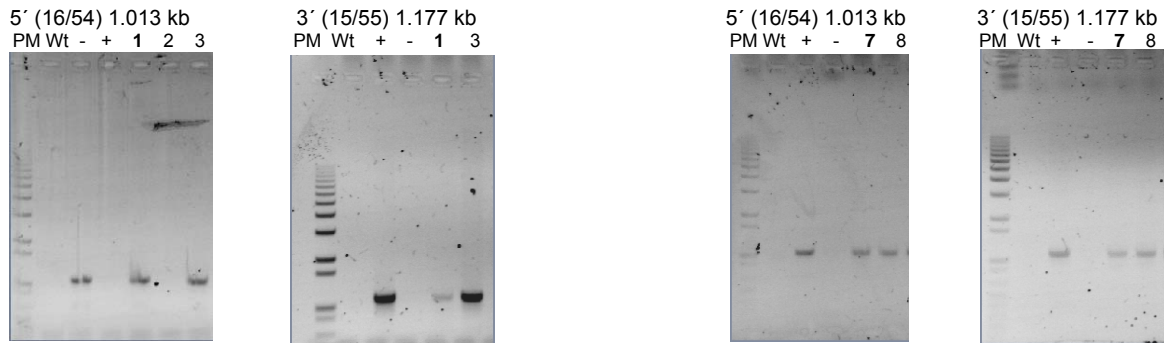


Figura 19. Análisis por PCR de todas las cepas construidas en este trabajo.

Mutaciones en *SIR3*(+ CGM280 *sir3* Δ)CGM146 *sir3* Δ (clonas 1 y 2), CGM147 *sir3* Δ (clonas 3-6) y CGM148 *sir3* Δ (clonas 1-4)CGM149 *sir3* Δ (clonas 7 y 8)CGM158 *sir3* Δ (clonas 17 y 18)CGM159 *sir3* Δ (clonas 23 y 24)CGM160 *sir3* Δ (clonas 13-16)**Figura 19.** Análisis por PCR de todas las cepas construidas en este trabajo.

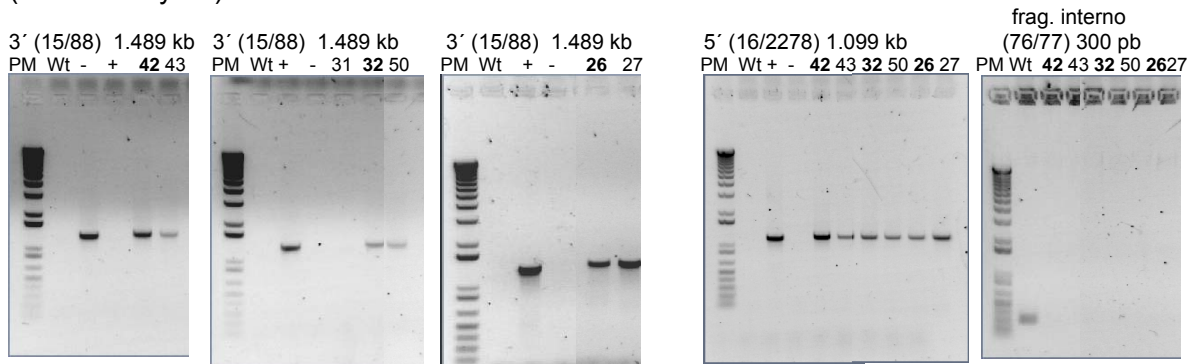
CGM118 *sir3* Δ (clonas 1, 2 y 3)

CGM121 *sir3* Δ (clonas 7 y 8)



Mutaciones en *HST1*

CGM146 *hst1* Δ (Clonas 42 y 43), CGM147 *hst1* Δ (Clonas 31, 32 y 50) y CGM159 *hst1* Δ (Clonas 26 y 27)



CGM149 *hst1* Δ (Clonas 40 y 41) y CGM158 *hst1* Δ (Clonas 13-16).
CGM148 *hst1* Δ (Figura 8, pág. 22)

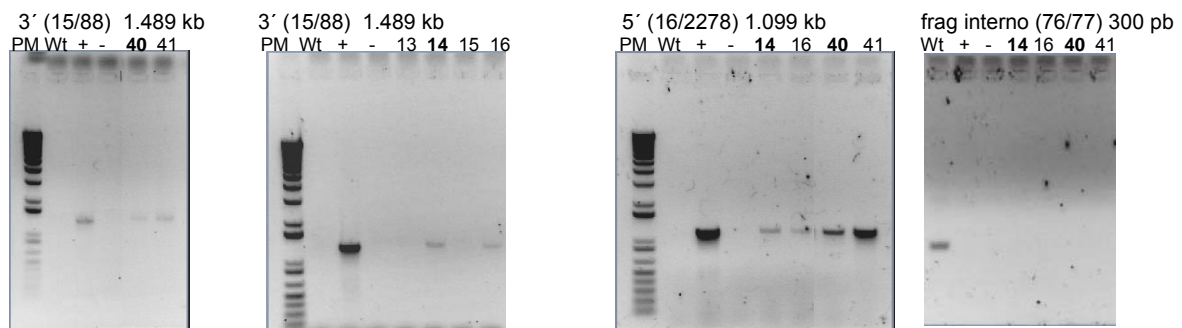
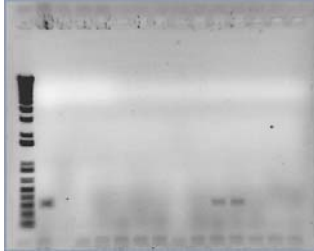


Figura 19. Análisis por PCR de todas las cepas construidas en este trabajo.

PCR con oligonucleótidos internos al gen que se eliminó***SIR2* (84/85) 300 pb**

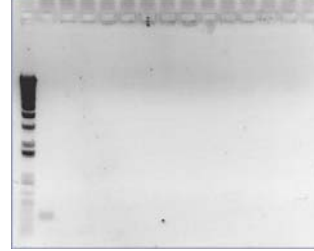
PMWt + - 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15



+ . CGM71 *sir2* Δ
 5. CGM160 *sir2* Δ #36
 6. CGM160 *sir2* Δ #41
 7. CGM118 *sir2* Δ #5
 8. CGM118 *sir2* Δ #6
 9. CGM121 *sir2* Δ #8
 10. CGM121 *sir2* Δ #9
 11. CGM159 *sir2* Δ (Tiene *SIR2**)
 12. CGM158 *sir2* Δ (Tiene *SIR2*)
 13. CGM149 *sir2* Δ
 14. CGM148 *sir2* Δ
 15. CGM147 *sir2* Δ
 CGM146 *sir2* Δ (imagen no mostrada)

***SIR4* (86/87) 300 pb**

PMWt + - 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15



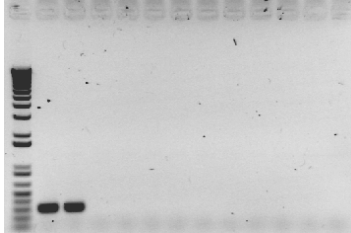
+ . CGM73 *sir4* Δ
 5. CGM160 *sir4* Δ #61
 6. CGM160 *sir4* Δ #64
 7. CGM118 *sir4* Δ #13
 8. CGM118 *sir4* Δ #16
 9. CGM121 *sir4* Δ #21
 10. CGM121 *sir4* Δ #23
 11. CGM146 *sir4* Δ #6
 12. CGM147 *sir4* Δ #9
 13. CGM148 *sir4* Δ #1
 14. CGM158 *sir4* Δ #1
 15. CGM159 *sir4* Δ #1

Ninguna cepa tiene el gen *SIR4*

*Análisis subsecuentes demostraron que, en realidad, esta cepa (CGM159 *sir2* Δ) no tiene fragmento interno. Sin embargo, se construyeron nuevamente las cepas CGM158 *sir2* Δ y CGM159 *sir2* Δ . Las demás cepas no tienen *SIR2*.

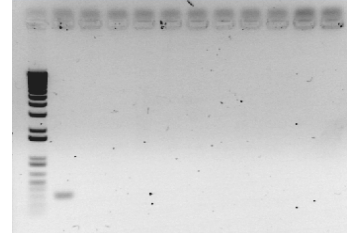
***SIR3* (84/85) 300 pb**

PM Wt + - 5 6 7 8 9 10 11 12 13



+ . CGM337 *hst1* Δ
 5. CGM1 *sir3* Δ #2
 6. CGM1 *sir3* Δ #3
 7. CGM146 *sir3* Δ #1
 8. CGM146 *sir3* Δ #2
 9. CGM147 *sir3* Δ #6
 10. CGM148 *sir3* Δ #1
 11. CGM148 *sir3* Δ #2
 12. CGM149 *sir3* Δ #7
 13. CGM149 *sir3* Δ #8

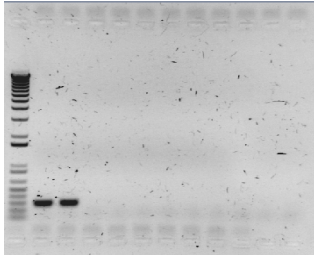
PM Wt 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23



14. CGM158 *sir3* Δ #17
 15. CGM158 *sir3* Δ #18
 16. CGM159 *sir3* Δ #23
 17. CGM159 *sir3* Δ #24
 18. CGM160 *sir3* Δ #15
 19. CGM160 *sir3* Δ #16
 20. CGM118 *sir3* Δ #1
 21. CGM118 *sir3* Δ #3
 22. CGM121 *sir3* Δ #7
 23. CGM121 *sir3* Δ #8

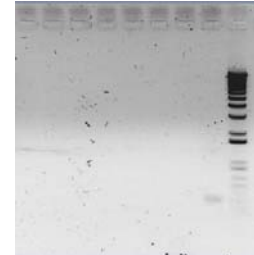
Ninguna cepa tiene el gen *SIR3****RIF1* (84/85) 300 pb**

PM Wt + - 5 6 7 8 9 10 11 12



+ . CGM325 *sir2* Δ
 5. CGM1 *rif1* Δ #9
 6. CGM1 *rif1* Δ #10
 7. CGM160 *rif1* Δ #14
 8. CGM118 *rif1* Δ #22
 9. CGM118 *rif1* Δ #26
 10. CGM121 *rif1* Δ #8
 11. CGM121 *rif1* Δ #10
 12. CGM146 *rif1* Δ #52

13 14 15 16 17 18 19 + PM

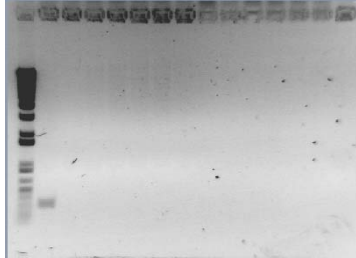


13. CGM147 *rif1* Δ #7
 14. CGM147 *rif1* Δ #9
 15. CGM148 *rif1* Δ #21
 16. CGM149 *rif1* Δ #2
 17. CGM149 *rif1* Δ #4
 18. CGM158 *rif1* Δ #18
 19. CGM159 *rif1* Δ
 + . CGM325 *sir2* Δ

Ninguna cepa tiene el gen *RIF1***Figura 19.** Análisis por PCR de todas las cepas construidas en este trabajo.

HDF1 (80/81) 300 pb

PM Wt - + 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15

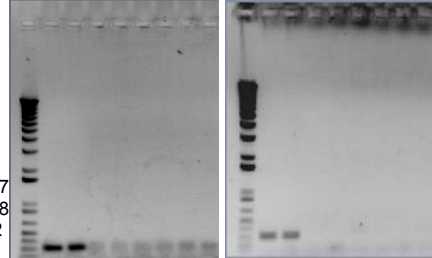


- + CGM78 *hdf1*Δ
- 5. CGM146 *hdf1*Δ
- 6. CGM147 *hdf1*Δ
- 7. CGM148 *hdf1*Δ
- 8. CGM149 *hdf1*Δ
- 9. CGM158 *hdf1*Δ
- 10. CGM159 *hdf1*Δ
- 11. CGM160 *hdf1*Δ #67
- 12. CGM160 *hdf1*Δ #68
- 13. CGM118 *hdf1*Δ #2
- 14. CGM118 *hdf1*Δ #3
- 15. CGM121 *hdf1*Δ #48

Ninguna cepa tiene el gen *HDF1*

HDF2 (82/83) 300 pb

PM Wt 3 + - 6 7 8 9 PM Wt 3 10 11 12 13 14 15

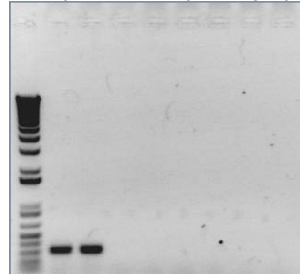


- + CGM79 *hdf2*Δ
- 3. CGM118
- 6. CGM160 *hdf2*Δ#64
- 7. CGM118 *hdf2*Δ#13
- 8. CGM118 *hdf2*Δ#16
- 9. CGM121 *hdf2*Δ #21
- 10. CGM121 *hdf2*Δ #23
- 11. CGM146 *hdf2*Δ #6
- 12. CGM147 *hdf2*Δ #9
- 13. CGM148 *hdf2*Δ #1
- 14. CGM158 *hdf2*Δ #1
- 15. CGM159 *hdf2*Δ #1

Ninguna cepa tiene el gen *HDF2*

HST2 (78/79) 300 pb

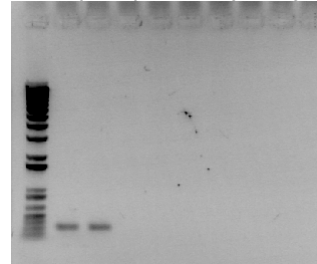
PM Wt + 4 - 6 7 8 9



- + CGM118
- 4. CGM1 *hst2*Δ
- 6. CGM160 *hst2*Δ #33
- 7. CGM118 *hst2*Δ #40
- 8. CGM118 *hst2*Δ #42
- 9. CGM121 *hst2*Δ #63

Ninguna cepa tiene el gen *HST2*

PM Wt + 10 11 12 13 14 15 16

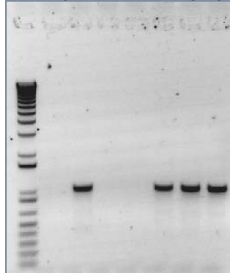


- 10. CGM121 *hst2*Δ #64
- 11. CGM146 *hst2*Δ #1
- 12. CGM147 *hst2*Δ #b
- 13. CGM148 *hst2*Δ #1
- 14. CGM149 *hst2*Δ #1
- 15. CGM158 *hst2*Δ #2
- 16. CGM159 *hst2*Δ #a

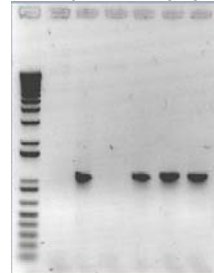
OTRAS CEPAS CONSTRUIDAS

CGM1 *sir3*Δ (clonas 1-5)

5' (16/54) 1.013 kb
PM Wt + - 1 2 3 5

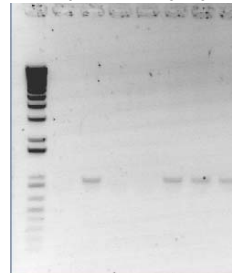


3' (15/55) 1.177 kb
PM Wt + - 2 3 5



CGM1 *rif1*Δ (clonas 7, 9-11)

5' (15/2055) 1.053 kb
PM Wt + - 7 9 10 11



3' (16/56) 0.997 kb
PM Wt + - 9 10 11

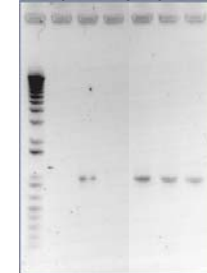
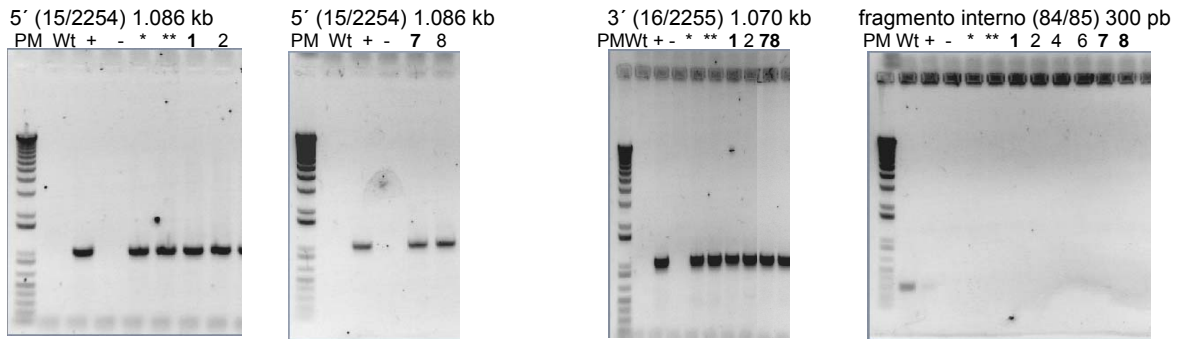


Figura 19. Análisis por PCR de todas las cepas construidas en este trabajo.

CGM158 *sir2* Δ (clonas 1 y 2) y CGM159 *sir2* Δ (clonas 7 y 8)

*CGM1 *sir2* Δ (CGM71), ** CGM260, #4 y #6 son otras clonas positivas CGM158

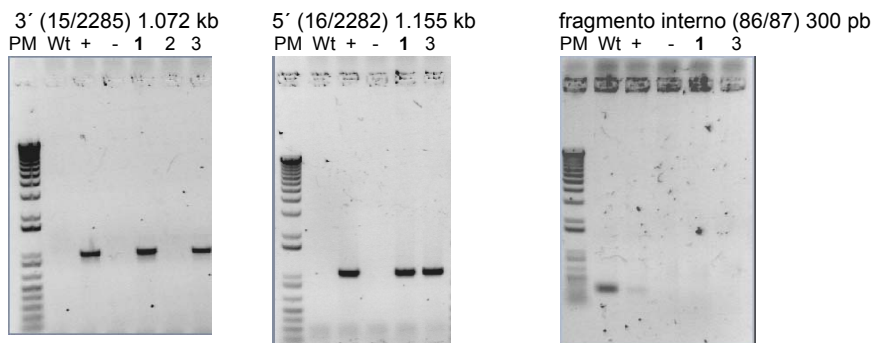
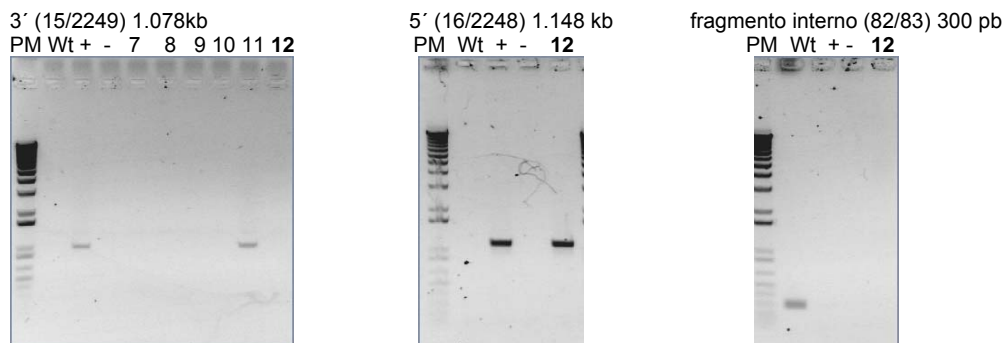
CGM149 *sir4* Δ (clonas 1 y 3)CGM147 *hdf2* Δ (clonas 7-12)

Figura 19. Análisis por PCR de todas las cepas construidas en este trabajo.

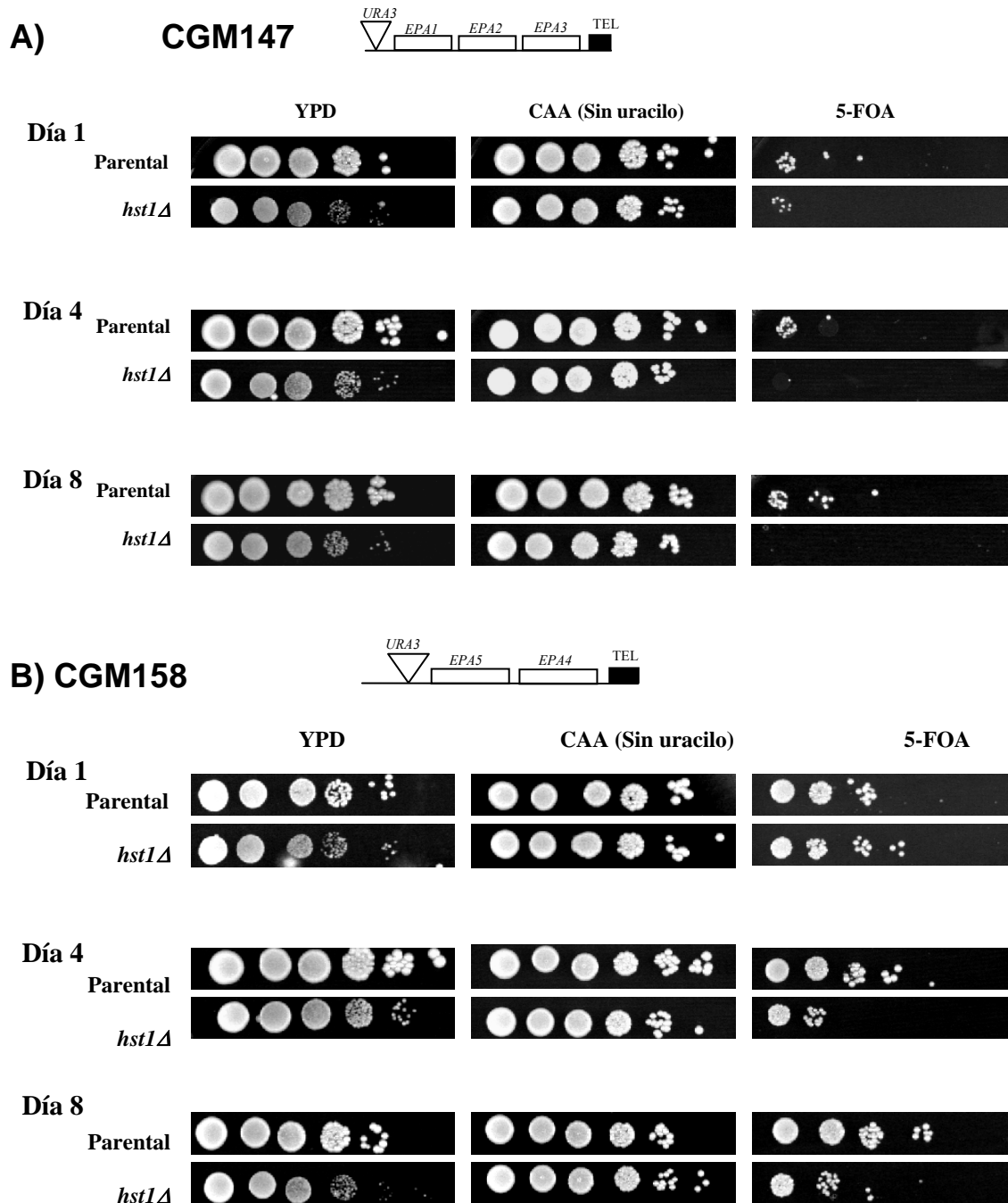


Figura 20. Análisis de inóculos a los 1, 4 y 8 días de incubación, en cepas parentales y cepas *hst1Δ*. Las cepas se mantuvieron en incubación a una temperatura de 30 °C, se tomaron muestras a los días 1, 4 y 8 para realizar goteos en diluciones seriadas de 10 veces en los tres medios de crecimiento: YPD, CAA y 5-FOA; las cajas se incubaron 48 horas. A) Análisis de la expresión del gen reportero *URA3* en la cepa parental CGM147 y CGM147 *hst1Δ* a los días 1, 4 y 8; se observa que el poco crecimiento que se observa en la cepa *hst1Δ* en 5-FOA, desaparece completamente al cuarto y octavo día de incubación. B) Análisis de la expresión del gen reportero *URA3* en la cepa parental CGM158 y CGM158 *hst1Δ* a los días 1, 4 y 8; se observa una menor cantidad de células en la cepa *hst1Δ*, crecida en el medio con 5-FOA, tanto al cuarto y octavo día. Este análisis se realizó para todas las cepas *hst1Δ* citadas en este trabajo, únicamente en estas dos cepas se observó este fenotipo.