



TRABAJO FIN DE GRADO

Grado en Biotecnología

CARACTERIZACIÓN FUNCIONAL MEDIANTE CRISPR-CAS9 DE CRZ1 EN LA VÍA CALMODULINA- CALCINEURINA EN *Candida auris* PARA EL DESARROLLO DE DIANAS TERAPÉUTICAS

Autor: Enrique Alan Ortiz Pajor

Villaviciosa de Odón, *Julio 2026*

ANEXO IX

Título del Trabajo: Caracterización funcional mediante CRISPR-Cas9 de *CRZ1* en la vía calmodulina-calcineurina en *Candida auris* para el desarrollo de dianas terapéuticas.

Este trabajo ha sido realizado en el Hospital Veterinario de la Universidad Europea de Madrid, dentro del grupo de investigación BIOGLOB, en los laboratorios de microbiología y biología molecular, donde se llevó a cabo el trabajo experimental de técnicas microbiológicas y de biología molecular. También se desarrollaron estrategias de edición genética mediante CRISPR-Cas9 en la Universidad Complutense.



Tutor de la universidad: Claudia M Parra-Giraldo

Tutores externos: Elvira Román González y Alejandro Sanz Rodriguez.

Información del centro donde se ha realizado el proyecto

El presente Trabajo de Fin de Grado se ha desarrollado en colaboración entre el Hospital Veterinario de la Universidad Europea y la Universidad Complutense, ambos centros ubicados en Madrid, España.

Por un lado, el trabajo experimental relacionado con técnicas microbiológicas y técnicas de biología molecular se ha llevado a cabo en el Hospital Veterinario de la Universidad Europea de Madrid. El Hospital Veterinario es una institución de carácter académica y clínica orientada a la formación práctica de estudiantes, así como al desarrollo de actividades asistenciales e investigadoras en el ámbito de las ciencias veterinarias y biomédicas. En el área de laboratorio se han realizado diferentes metodologías de extracción y análisis de ácidos nucleicos, así como técnicas de PCR y qPCR orientadas al estudio de microorganismos patógenos.

Por otro lado, las estrategias de edición genética se han desarrollado en la Universidad Complutense de Madrid, una institución académica de referencia en el ámbito de investigación científica, donde disponen de la infraestructura y el conocimiento especializados necesarios para aplicar herramientas avanzadas de ingeniería genética, como el sistema CRISPR. En este entorno se han abordado los estudios dirigidos a la modificación genética y caracterización funcional de genes de interés.

La colaboración entre ambas instituciones ha permitido integrar diferentes enfoques experimentales, facilitando el desarrollo de un estudio completo centrado en el análisis de la señalización en la vía calmodulina/calcineurina en *Candida auris*, así como en su implicación de mecanismos en adaptación y resistencia a diferentes fármacos antifúngicos.

Índice

Información del centro donde se ha realizado el proyecto	3
Resumen.....	5
Introducción	5
Marco global de infecciones fúngicas.....	5
Candida auris como emergencia	6
Resistencia antifúngica y necesidad de nuevas dianas.....	6
La vía calmodulina-calcineurina	6
Papel del factor de transcripción CRZ1	7
Uso de CRISPR-Cas9 para edición genética	7
Sistema de edición mediante CRISPR-Cas9.....	8
Relevancia y enfoque de sostenibilidad.....	8
Objetivos.....	9
Materiales y métodos	10
Análisis bioinformático conservación de CRZ1	10
Obtención de secuencias.....	10
Traducción de secuencias	11
Control de calidad.....	11
Alineamiento múltiple de secuencia.....	11
Cálculo de matrices de identidad.....	11
Predicción estructural y análisis de dominios proteicos.....	12
Conservación por residuo y análisis estructural	12
Reproducibilidad	12
Microorganismos y medios de cultivos.....	12
Microorganismos empleados y tratamiento (condiciones de crecimiento y almacenamiento)	12
Medios de cultivo empleados	12
Extracción de ADN plasmídico.....	14
Plásmidos y oligonucleótidos empleados	14
Transformación.....	18
Edición génica de C. auris mediante CRISPR-Cas9	19
Sistema CRISPR-Cas9 basado en HIS1 (HIS-FLP).....	19
Generación del cassette de expresión del ARNg.....	19
Transformación y selección.....	19
Eliminación del cassette CRISPR.....	20
Sistema clásico de delección (NO CRISPR)	20
Resultados y discusión	21
Análisis bioinformáticos	21
Conclusiones.....	31
Bibliografía	32
Anexos	36

Resumen

Candida auris es un patógeno fúngico emergente y multirresistente, clasificado por la OMS como una prioridad crítica y con tasas de mortalidad que pueden alcanzar el 30-60%, frente al cual urge identificar nuevas dianas terapéuticas. La vía de señalización calmodulina-calcineurina y su efector, el factor de transcripción Crz1, regulan la termotolerancia, la integridad de la pared celular y la resistencia a antifúngicos, lo que convierte a *CRZI* en una diana de interés. Este Trabajo de Fin de Grado tuvo como objetivo caracterizar funcionalmente *CRZI* en *C. auris* mediante edición génica con CRISPR-Cas9 y evaluar, mediante análisis bioinformático, su conservación evolutiva y su potencial como diana terapéutica. Para ello se compararon secuencias de *CRZI* de trece especies fúngicas a nivel nucleotídico y proteico, realizando alineamientos múltiples, reconstrucción filogenética, matrices de identidad, análisis del dominio de dedos de zinc mediante logo de secuencia y proyección de la conservación por residuo sobre el modelo estructural AlphaFold. En paralelo, se abordó experimentalmente la delección de *CRZI* mediante un sistema clásico de recombinación homóloga y la preparación del sistema CRISPR-Cas9. El análisis reveló que Crz1 presenta una organización modular, el dominio de unión a ADN de tipo C2H2 está totalmente conservado entre los cinco clados de *C. auris* (100%) y se mantiene conservado a escala pan-fúngica (70-93%), mientras que el resto de la proteína diverge. La parte experimental permitió optimizar las condiciones de amplificación de los componentes del cassette y verificar los plásmidos, quedando pendiente la obtención de los mutantes. En conjunto, el trabajo respalda a *CRZI* y a la vía calmodulina-calcineurina como una diana antifúngica prometedora y potencialmente de amplio espectro.

Palabras clave: *Candida auris*; *CRZI*; calmodulina-calcineurina; dedos de zinc C2H2; resistencia antifúngica; CRISPR-Cas9; conservación evolutiva; diana terapéutica

Introducción

Marco global de infecciones fúngicas

Las infecciones fúngicas invasivas están teniendo cada vez más peso en la salud global debido al incremento de casos a lo largo de estas últimas décadas. Las patologías que producen las infecciones fúngicas normalmente afectan a pacientes inmunocomprometidos u hospitalizados, presentando un alto índice de morbilidad y mortalidad. El auge de este tipo procesos infecciosos por hongos en parte es debido al incremento de uso de terapias inmunosupresoras, trasplantes y tratamientos oncológicos, donde en este tipo de tratamientos se produce una supresión del sistema inmune siendo más fácil la infección por hongos. Uno de los patógenos más importantes en este proceso de infección micótica son las especies relacionadas con el género *Candida*, responsables de una parte significativa de casos de infecciones nosocomiales, incluyendo candidemia e infecciones sistémicas graves. Muchas de las especies de este género han sido estudiadas en profundidad debido a su capacidad de establecerse en tejidos humanos

y causar afecciones en huéspedes inmunocomprometidos (Seidel et al., 2024; Jenks et al., 2026).

***Candida auris* como emergencia**

Dentro del género *Candida*, se encuentra *Candida auris*, un patógeno fúngico con gran interés clínico. Esta levadura fue descrita por primera vez en 2009 (Satoh et al., 2009), en una infección de oído de un paciente japonés provocando una otitis. A partir de este primer brote, *C. auris* se ha expandido globalmente a lo largo de estos años, detectándose en numerosos países y causando brotes hospitalarios (Lee et al., 2011; Lockhart et al., 2017) difíciles de contener. Una propiedad que la caracteriza respecto a otras especies de su mismo género es su gran capacidad de adherirse y persistir en diferentes entornos (Piedrahita et al., 2017; Bing et al., 2023), como las superficies hospitalarias o la piel humana, además de ser capaz de transmitirse entre los pacientes en ámbitos sanitarios. La combinación de estas características tan únicas de *C. auris* desemboca en un patógeno que causa infecciones con tasas de mortalidad que pueden alcanzar un 30-60%, siendo reconocido como un importante problema para la salud pública en todo el mundo. Su impacto clínico y su resistencia a diferentes antifúngicos ha provocado que la OMS (Organización Mundial de la Salud) (World Health Organization, 2022) clasifique a *C. auris* como un patógeno fúngico de prioridad crítica (Satoh et al., 2009; Lockhart et al., 2017; Jenks et al., 2026).

Resistencia antifúngica y necesidad de nuevas dianas

Al caracterizar *C. auris* se descubrió su gran resistencia a diferentes tipos de antifúngicos tales como azoles, polienos y en algunos casos equinocandinas (Lockhart et al., 2017; Fakhim et al., 2017). Esta característica tan diferencial es un desafío ya que limita las opciones terapéuticas disponibles y dificulta el tratamiento de micosis producidas por *C. auris*. El interés por descubrir nuevas dianas terapéuticas relacionadas con los mecanismos de virulencia y adaptación al estrés en este patógeno está en pleno crecimiento (Muñoz et al., 2018). Es por eso por lo que, entender las vías de señalización celular que regulan las respuestas al estrés y la resistencia a distintos fármacos antifúngicos es clave para comprender el funcionamiento de *C. auris* y poder desarrollar nuevas estrategias terapéuticas (Lockhart et al., 2017; Fakhim et al., 2017; Muñoz et al., 2018).

La vía calmodulina-calcineurina

Una de las vías de señalización micóticas más importantes que producen patogenicidad es la vía de señalización dependiente de calcio mediada por la calcineurina (Cha et al., 2025). La calcineurina es una fosfatasa dependiente de calcio/calmodulina que se encuentra conservada en organismos eucariotas, ya que interviene en varios procesos celulares incluyendo la respuesta al estrés, la integridad de la pared celular y la adaptación a condiciones ambientales adversas. En algunos hongos patógenos como *Candida albicans* y *Cryptococcus neoformans* esta vía tiene un papel crucial en la virulencia y la susceptibilidad a los antifúngicos. Por otro lado, en *C. auris* hay estudios recientes que apuntan que la vía calcineurina regula procesos que son clave como la termotolerancia, la integridad de la membrana celular o la resistencia a

diferentes tipos de antifúngicos (Cha et al., 2025). Es por eso por lo que, según estos estudios, esta vía podría ser una diana prometedora a la hora de desarrollar nuevos tratamientos antifúngicos (Cha et al., 2025).

Papel del factor de transcripción *CRZ1*

En la vía calcineurina-calmodulina, se encuentra el factor de transcripción Crz1, siendo uno de los principales reguladores transcripcionales de esta vía resumida en la *Figura 1*. *CRZ1* pertenece a la familia de los factores de transcripción con dedos de zinc de tipo C2H2, el tipo de dominio de unión a ADN más extendido en eucariotas (Najafabadi et al., 2015); cada dedo coordina un ion de zinc (Zn^{2+}) a través de dos cisteínas y dos histidinas, lo que estabiliza una estructura compacta cuya hélice α se inserta en el surco mayor del ADN para reconocer secuencias específicas en los promotores de sus genes diana. Este factor de transcripción es activado por una desfosforilación mediada por calcineurina, una vez activado, *CRZ1* se transloca al núcleo y media la expresión de genes involucrados en la homeostasis del calcio, la síntesis de la pared celular y la respuesta a diferentes tipos de estrés celular (Cha et al., 2025). Diversos estudios han demostrado que la eliminación o alteración de este factor en distintas especies fúngicas ha provocado dificultades en estos microorganismos para adaptarse a diferentes condiciones de estrés ambiental y ha provocado cambios en la susceptibilidad a ciertos fármacos antifúngicos (Cha et al., 2025), lo que sugiere que este factor desempeña un papel clave en la fisiología y patología de los hongos. Sin embargo, el papel que tiene *CRZ1* en *C. auris* no está caracterizado del todo (Cha et al., 2025).

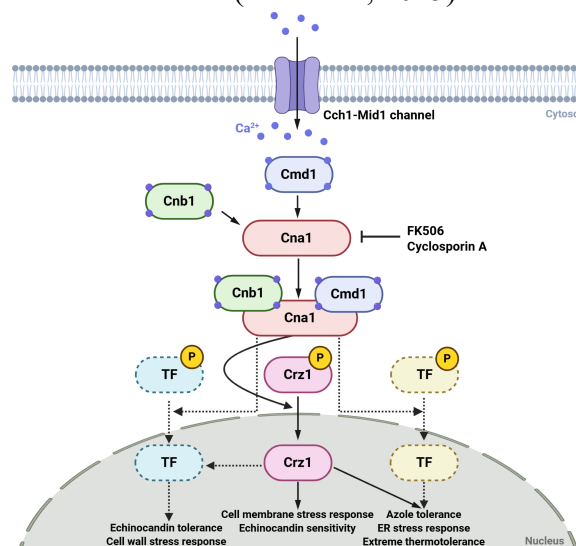


Figura 1. Vía de señalización mediada por calcineurina que regula la resistencia y virulencia en *Candida auris*. La entrada de Ca^{2+} mediante el canal Cch1-Mid1 desencadena la activación del complejo calcineurina (Cna1) en presencia de los cofactores Cnb1 y Cmd1, lo que facilita la desfosforilación y translocación nuclear de Crz1. Este factor de transcripción, junto con otros factores de transcripción, controla la expresión de genes responsables de la tolerancia a azoles, respuestas al estrés del retículo endoplásmico, integridad de la pared celular y extrema termotolerancia. La ciclosporina A y FK506 actúan como inhibidores específicos de calcineurina. Adaptado de Cha et al., (2025).

Uso de CRISPR-Cas9 para edición genética

Muchos avances tecnológicos desarrollados durante estos últimos años han permitido usar herramientas de edición genética como CRISPR-Cas9. Este sistema de edición genética ha

revolucionado el estudio funcional de diversos genes en multitud de organismos (Doudna & Charpentier, 2014). CRISPR-Cas9 es una herramienta que permite inducir mutaciones o incluso delecionar genes de manera específica facilitando así la caracterización de su función fisiológica. El uso de esta herramienta en diversos hongos ha permitido desarrollar sistemas eficientes y reciclables de edición genética que permiten diseñar mutantes de manera rápida y precisa (Nguyen et al., 2017), así como sistemas de integración transitoria que mejoran la eficiencia de la edición sin necesidad de integración estable (Min et al., 2016). El uso de estas herramientas ha permitido identificar genes relacionados con mecanismos de virulencia, resistencia a antifúngicos y adaptaciones al huésped, aportando información relevante para el desarrollo de nuevas dianas farmacológicas (Doudna & Charpentier, 2014; Min et al., 2016; Nguyen et al., 2017).

Sistema de edición mediante CRISPR-Cas9

Tras la consolidación de la tecnología CRISPR-Cas9 como herramienta de edición genética en hongos patógenos, distintos trabajos han optimizado su uso en levaduras no modelo. En ese sentido, el sistema descrito por Nguyen et al. (2017) en *C. albicans* constituye la base de muchas de las adaptaciones actuales a *C. auris*, permitiendo una edición eficiente mediante Cas9 y ARNg expresados de forma modular (Nguyen et al., 2017; Sofras et al., 2025)

En este trabajo se emplea como estrategia principal el sistema HIS-FLP, una herramienta adaptada a *C. auris* en la que Cas9 se expresa bajo el promotor de *CauENO1* y el ARNg bajo *SNR52*, integrándose en el locus de HIS1. Este sistema incluye además selección con nourseotricina (NAT1) y escisión del cassette mediante recombinasa FLP, facilitando la obtención de mutantes sin marcador (Nguyen et al., 2017; Sofras et al., 2025).

Caracterizar funcionalmente el gen *CRZI* en *C. auris* mediante la tecnología CRISPR-Cas9 es crucial para averiguar el papel que desempeña en la respuesta al estrés para desarrollar nuevas dianas terapéuticas y tratar de combatir infecciones causadas por este patógeno emergente.

Relevancia y enfoque de sostenibilidad

Este trabajo se enmarca en el Objetivo de desarrollo Sostenible 3 (Salud y bienestar) y, en particular, en su meta de combatir la resistencia a los antimicrobianos (RAM), reconocida por la OMS (World Health Organization, 2022) como una de las principales amenazas para la salud pública mundial. La inclusión de *C. auris* en la lista de patógenos fúngicos de prioridad crítica de la OMS (World Health Organization, 2022) subraya la urgencia de desarrollar nuevas estrategias terapéuticas; en este sentido, la identificación y validación de dianas como *CRZI* y la vía calmodulina- calcineurina contribuye a la búsqueda de antifúngicos frente a un patógeno multirresistente. Asimismo, el trabajo se relaciona con el ODS 9 (Industria, innovación e infraestructura), por el empleo de herramientas biotecnológicas avanzadas (edición génica CRISPR-Cas9 y análisis bioinformático), y con el ODS 17 (Alianzas), al desarrollarse mediante la colaboración entre instituciones académicas y sanitarias.

Objetivos

El objetivo general de este Trabajo de Fin de Grado es el desarrollo de cepas mutantes de *C. auris* más susceptibles al fluconazol mediante el uso del sistema de edición de CRISPR-Cas9. Este enfoque se dirige hacia el estudio de genes implicados en la resistencia a antifúngicos, con el fin de contribuir a la comprensión de los mecanismos de susceptibilidad y potenciales estrategias terapéuticas frente a este patógeno.

De forma complementaria, se plantea un estudio bioinformático del gen *CRZ1*, con el objetivo de analizar su grado de conservación a nivel genético y proteico, entre diferentes especies fúngicas. Este análisis permitirá evaluar el potencial de *CRZ1* como diana terapéutica, así como determinar si estas dianas presentan un carácter de amplio espectro o si por el contrario son específicas para determinadas especies, en función de su grado de conservación evolutiva.

Para alcanzar estos objetivos generales, se han establecido los siguientes objetivos específicos:

- Identificar regiones conservadas del dominio C2H2 de Crz1, implicadas en regular termotolerancia, integridad de pared celular y resistencia a antifúngicos mediante análisis filogenético, conservación por residuo y modelado estructural.
- Diseñar y optimizar ARN guía (ARNg) específicos dirigidos a *CRZ1* en *Candida auris*, evaluando su eficiencia y especificidad mediante herramientas bioinformáticas (*CHOPCHOP*, *CRISPOR*).
- Generar y validar los cassettes moleculares para dos estrategias complementarias, el uso de CRISPR-Cas9 con sistema HIS-FLP, y el uso de recombinación homóloga clásica con marcador de nourseotricina (NAT1).
- Generar mutantes $\Delta crz1$ en *C. auris* con el fin de evaluar su implicación en la susceptibilidad a antifúngicos.
- Valorar el potencial de Crz1 como diana terapéutica antifúngica integrando la evidencia bioinformática y del desarrollo de herramientas experimentales para su caracterización funcional.

Materiales y métodos

Análisis bioinformático conservación de *CRZ1*

Obtención de secuencias

Las secuencias nucleotídicas y proteicas del gen *CRZ1* se obtuvieron a partir de bases de datos públicas como el *National Center Biotechnology Information*, *Candida Genome Database*, *Saccharomyces Genome Database* y *Uniprot*. Se identificaron y seleccionaron los genes ortólogos de *CRZ1* en distintas especies fúngicas relevantes, todas ellas representadas en la *Tabla 1*.

Tabla 1. Microorganismos incluidos en el análisis bioinformático: especie, cepa/aislado, clado o grupo y localización génica de *CRZ1*.

Nº	Especie	Cepa/Aislado	Clado/Grupo	Localización genética de <i>CRZ1</i>
1	<i>C. auris</i>	B8441	Clado I	Cromosoma 3
2	<i>C. auris</i>	B11220	Clado II	Cromosoma 3
3	<i>C. auris</i>	B12037	Clado III	Cromosoma 3
4	<i>C. auris</i>	B11244	Clado IV	Cromosoma 3
5	<i>C. auris</i>	IFRC2087	Clado V	Cromosoma 3
6	<i>C. albicans</i>	SC5314	Cepa de referencia	Cromosoma 3
7	<i>C. glabrata</i>	CBS138	—	Cromosoma M
8	<i>C. parapsilosis</i>	CDC317	Complejo parapsilosis	Contig/Contiguo
9	<i>C. dubliniensis</i>	CD36	—	Cromosoma 3
10	<i>C. metapsilosis</i>	BP57	—	Desconocido
11	<i>C. orthopsilosis</i>	Co 90-125	—	Cromosoma 3

12	<i>Aspergillus fumigatus</i>	Af293	Outgroup	Cromosoma 1
13	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	S288C	Levadura modelo	Cromosoma 14

Traducción de secuencias

Las secuencias de nucleótidos se tradujeron a proteína aplicando el código genético nuclear alternativo de levaduras (Ohama et al., 1993; Santos & Tuite, 1995) en el que el codón CUG se traduce como serina en las especies del clado CTG (*C. auris*, *C. albicans*, *C. dubliniensis*, *C. parapsilosis*, *C. orthopsilosis* y *C. metapsilosis*) y el código estándar a *C. glabrata* y *S. cerevisiae*. La traducción se verificó comprobando la integridad del marco abierto de lectura (ausencia de codones de terminación externos).

Control de calidad

Antes del análisis comparativo, la orientación de los marcos de lectura se verificó con *NCBI ORFfinder* y la identidad taxonómica de cada secuencia mediante *BLAST* (Altschul et al., 1990) frente a la base de datos no redundante. El nivel de análisis (nucleotídico o proteico) se decidió evaluando la saturación de la señal a partir de la matriz de distancias.

Alineamiento múltiple de secuencia

Una vez identificado en qué parte del genoma se encuentra este gen en cada uno de los microorganismos, se realizó un alineamiento múltiple de secuencias. Este alineamiento se hizo utilizando el software MAFFT (*Multiple Aligment using Fast Fourier Transform*) (Katoh & Standley, 2013), empleando el algoritmo L-INS-i, indicado para conjuntos reducidos de secuencias homólogas.

Cálculo de matrices de identidad

A partir de los alineamientos se calcularon las matrices de identidad de aminoácidos por pares (matriz de sustitución BLOSUM62), de forma independiente para la proteína Crz1 completa y para el dominio de dedos de zinc C2H2 (residuos 437-524 según la numeración de *C. auris*), con el fin de comparar la conservación global frente a la del dominio funcional.

Análisis filogenético

El árbol filogenético se reconstruyó en MEGA (Stecher et al., 2025) a partir del alineamiento proteico mediante el método *Neighbor-Joining* (o Máxima Verosimilitud) empleando el modelo de sustitución JTT y evaluando el soporte de los nodos mediante bootstrap. Se enraizó con *A. fumigatus* como grupo externo. Las distancias evolutivas entre clados de *C. auris* se estimaron con el modelo de Máxima Verosimilitud Compuesta (*Maximum Composite Likelihood*).

Logo de secuencia del dominio C2H2

La conservación posición a posición del dominio C2H2 se representó mediante un logo de secuencia generado con WebLogo 3 (Crooks et al., 2004), a partir del recorte del alineamiento correspondiente a los tres dedos de zinc, expresando la altura de cada residuo en bits de información.

Predicción estructural y análisis de dominios proteicos

Las estructuras tridimensionales fueron obtenidas mediante herramientas de predicción *in silico* como AlphaFold (Jumper et al., 2021; Varadi et al., 2022) y bases de datos proteicas como Protein Data Bank.

Las estructuras predichas se visualizaron y analizaron utilizando el software de modelado molecular llamado PyMOL (versión 3.1.8) (Schrödinger, 2024), esto permitió examinar la organización tridimensional de la proteína.

Conservación por residuo y análisis estructural

El modelo estructural tridimensional de Crz1 de *C. auris* se obtuvo de la base de datos de AlphaFold (UniProt A0A2H0ZWD0), considerando los valores de confianza pLDDT por residuo. La conservación evolutiva por residuo se calculó con el servidor ConSurf (Ashkenazy et al., 2016), que asigna a cada posición un grado de conservación en una escala de 1 (variable) a 9 (conservado); dichos grados se proyectaron sobre la estructura y se visualizaron en PyMOL (v3.1.8). Se identificaron los residuos coordinadores del Zn^{2+} (cisteínas e histidinas) y se compararon los grados medios de conservación del dominio C2H2 frente al resto de la proteína.

Reproducibilidad

En todos los análisis se documentaron las herramientas y versiones empleadas (MAFFT, MEGA, Jalview, WebLogo 3, ConSurf, AlphaFold y PyMOL v3.1.8), los parámetros no predeterminados, las bases de datos y los identificadores de las secuencias, con el fin de garantizar la reproducibilidad.

Microorganismos y medios de cultivos

Microorganismos empleados y tratamiento (condiciones de crecimiento y almacenamiento)

En este trabajo se empleó la cepa de referencia de *C. auris* del clado I (clado europeo) y la bacteria *Escherichia coli*, utilizada en el clonaje y la propagación de los plásmidos: Ambos microorganismos se cultivaron de forma rutinaria en medios ricos, YPD para la levadura y LB para la bacteria, en formato sólido y líquido, a 37°C, los cultivos líquidos disponían de una agitación a 160 rpm. El crecimiento se siguió midiendo la densidad óptica a 600 nm utilizando un espectrofotómetro Beckman DU 640. Para su conservación se mantuvieron a corto plazo a 4 °C y a largo plazo a -80 °C en glicerol al 40 % (v/v) en *C. auris* y al 15% en *E. coli*. El manejo y conservación de las cepas se basaron en el protocolo descrito (Sanz Rodríguez, 2021).

Medios de cultivo empleados

La composición de los medios empleados se recogen en la *Tabla 2*. Todos se prepararon con agua purificada y se esterilizaron en autoclave antes de su uso. Los medios sólidos se obtuvieron añadiendo agar al medio líquido correspondiente. Cuando fue necesario, se suplementaron con los agentes de selección pertinentes (nourseotricina para las cepas de *C. auris* y ampicilina para *E. coli*) (Sanz Rodríguez, 2021).

Tabla 2. Medios de cultivo empleados, su composición y utilidad en el trabajo.

Medio de cultivo	Composición	Utilidad en el trabajo	Casa comercial	Referencia
YPD (Yeast extract Peptone Dextrose)	2% peptona 2% glucosa 1% extracto de levadura	Medio completo para el crecimiento de levaduras. Se añadió nourseotricina (200 µg/ml) para la selección de transformantes	Pronadisa	(Sherman et al., 1986)
Medio mínimo His-	2% glucosa 0,5% SO ₄ (NH ₄) ₂ 0,19% mezcla de aminoácidos 0,17% bases nitrogenadas, sin histidina	Medio selectivo para transformantes de <i>C. auris</i> portadores del marcador de selección NAT1.	Merck	(Sherman et al., 1986)
LB (Luria Bertani)	1% bactotripton; 0,5% extracto de levadura 0,5% NaCl	Medio rico para el crecimiento de bacterias. Se añadió ampicilina (100 µg/ml) para la selección de transformantes portadores del gen de resistencia al antibiótico correspondiente. Se añadió IPTG (20 mM) y X-gal (40 mM) para la selección de transformantes portadores de vectores derivados del pGEM®-T	Oxoid	(Sherman et al., F 1986)

Extracción de ADN Genómico

El ADN genómico de *C. auris* se extrajo a partir de cultivos en fase de crecimiento logarítmico mediante un protocolo basado en la formación de esferoplastos y precipitación alcohólica. Se recogieron 1,5 mL de cultivo y se centrifugaron a 5000 rpms durante 3 minutos, retirando el sobrenadante con bomba de vacío. El sedimento celular se resuspendió en una mezcla de digestión de la pared compuesta por 128µL de EDTA 0,5M (pH 7,4), 0,9 µL de β-mercaptoetanol, 511µL de sorbitol 1M y 5µL de zimoliasa (10mg/mL), se incubó en agitación durante 1 hora a 37°C para favorecer la digestión enzimática de la pared celular. A continuación, las muestras se centrifugaron 5 minutos a 5000 rpm y se retiró el sobrenadante con bomba de vacío.

Los esferoplastos obtenidos se lisaron resuspendiéndolos en 640µL de tampón TE y 32µL de SDS al 10%, mezclando con suavidad e incubando 30 minutos a 65°C con agitación a 700 rpm.

Las proteínas y el SDS se precipitaron mediante la adición de 160µL de acetato potásico 5 M, con aparición de un precipitado blanco característico, seguida de una incubación de 1 hora en hielo y centrifugación durante 30 minutos a 13000 rpm y se retiraron los restos de líquido con bomba de vacío. Finalmente, el sedimento de ADN se secó a temperatura ambiente y se resuspendió con 30-50µL de agua ultrapura (Mili-Q).

Extracción de ADN plasmídico

La extracción del ADN plasmídico de *E. coli* se realizó utilizando el kit comercial NZYMiniprep (Nzytech) o, de forma alternativa, por el método de lisis alcalina (Sambrook et al., 1989). En ambos procedimientos las células se lisaron con SDS (Dodecilsulfato sódico) en condiciones alcalinas. A continuación los restos celulares y las proteínas se precipitaron con sales de potasio, el ADN plasmídico queda en solución se recupera por precipitación con etanol o isopropanol y se resuspendió en agua o tampón. La manipulación general del ADN, la electroforesis en gel de agarosa, PCR y cuantificación se realizó siguiendo los procedimientos estándar (Sambrook et al., 1989) y, en su caso, las indicaciones de las casas comerciales. El protocolo se adaptó al descrito por Birnboim y Doly (1979), empleando acetato sódico 3M en la precipitación.

Las transformaciones de *E. coli* se llevaron a cabo siguiendo el protocolo Hanahan (Hanahan, 1983), según el cual se fuerza la incorporación de ADN exógeno en células competentes mediante un choque térmico a 42 ° C (Sanz Rodríguez, 2021).

Plásmidos y oligonucleótidos empleados

Durante el desarrollo del presente trabajo se utilizaron una serie de plásmidos y oligonucleótidos, representados en la *Tabla 3* y *Tabla 4* respectivamente. Los constructos de los plásmidos utilizados en este trabajo están representados en el apartado de *Anexos* (incluyendo las siguientes figuras: *Figura 1A*, *Figura 1A.1*, *Figura 1A.2*, *Figura 2A*, *Figura 2A.1*) de este trabajo.

Tabla 3. Plásmidos y sistemas de edición utilizados, con sus características principales y función.

Plásmido / Sistema	Características principales	Función
pADH99Cau	Expresión de Cas9 bajo promotor <i>CauENO1</i> , FLP recombinasa, marcador NAT1 parcial y región <i>HIS1</i>	Expresión de Cas9 e integración genómica
pADH100Cau	<i>Scaffold</i> ARNg, promotor <i>CauSNR52</i> , marcador NAT1 parcial y región <i>HIS1</i>	Expresión del ARNg y recombinación
Sistema HIS-FLP	Sistema CRISPR-Cas9 basado en integración en <i>HIS1</i> y excisión mediante FLP	Deleción génica en <i>Candida auris</i> .
pV1025	Contiene marcador NAT1 y regiones homólogas para recombinación	Sistema clásico de deleción sin CRISPR
Cassette de donación de ADN	Regiones homólogas 5' y 3' de <i>CRZ1</i> + marcador de selección	Recombinación homóloga y deleción de <i>CRZ1</i>

Tabla 4. Oligonucleótidos empleados en el trabajo, con su secuencia (5'→3') y función.

Oligonucleótidos	Secuencia (5'→3')	Función
AHO1096	GAC GGC ACG GCC ACG CGT TTA AAC CGC C	Cebador universal directo utilizado en la obtención de los fragmentos A y C del sistema HIS-FLP
pADH100_Cau_fgmA_R	CTG TTT TCT GCT GAG GGA GTC GAA C	Cebador reverso para obtención del fragmento A del sistema HIS-FLP
pADH100Cau_fgmB_R	TGA GCG AGG AGT TTA AAC CCA GC	Cebador reverso para obtención del fragmento B del sistema HIS-FLP

pAD100Cau_fmC_R	AGC AAA CGT AAC GAC GCG	Cebador reverso para obtención del fragmento C del sistema HIS-FLP
gRNA579F_CRZ1	ACT CCC TCA GCA GAA AAC AAA TGT CCG CTG TAC CAC CAA GTT TTA GAG CTA GAA ATA G	Cebador directo para obtención del fragmento B del sistema HIS-FLP, incluye la guía específica para CRISPR
CRZ1_del_fw	GAC AGG TAT TGT CCC CTT ACC AGT TTC CCA CCA AGA CCA ATT TCA AAA GAT AAA GTT AAC CAC ATC AAG CAC AAC AAT AGT TGC ATT GGA GTA CCA AGA GCA TTA CAA GTA GTC ACG TAT GTA ACG TTT CAA ACT ATT CAC GAA AGT TTT TTT TTT T	Cebadores directo y reverso para la amplificación de la región 5' y 3' para integrar el gen <i>CRZ1</i> en el genoma de <i>C. auris</i> una vez deleccionado
CRZ1_del_rev	AAA AAA AAA AAA AAC TTT CGT GAA TAG TTT GAA ACG TTA CAT ACG TGA CTA CTT GTA ATG CTC TTG GTA CTC CAA TGC AAC TAT TGT TGT GCT TGA TGT GGT TAA CTT TAT CTT TTG AAA TTG GTC TTG GTG GGA AAC TGG TAA GGG GAC AAT ACA CTG T C	
B13498	CCG GAG AGA AAA TTG GAT TT	Cebadores directo y reverso para la amplificación de la región 5' de <i>CRZ1</i> en el sistema clásico de delección (sin CRISPR)
B13499	TTC AGA TCC ACT AGT TCT AGT TCA CGA CGT TCA GAG ACA T	
B13500	TTT CCA GAA TTT CAC TCT TAC CAT CTC GCC ACC AGA CTA G	Cebadores directo y reverso para la amplificación de la región 3' del gen <i>CRZ1</i> en el sistema clásico de delección (sin CRISPR)
B13501	TCT TGT ATT GAT GAA AGC CA	
B13502	GTG CAT GAA AAC ACA GAT CAC	Cebador externo de uso para el diagnóstico de integración 5'. Se

		utiliza para demostrar que el cassette se ha integrado en el locus correcto
B13503	TCT CCA ATG CGA TGT CGA AG	Cebador externo de uso para el diagnóstico de integración 3'. Se utiliza para demostrar que el cassette se ha integrado en el locus correcto
B11105	CCA TTG ACT AAG GTT TTC C	Cebador directo de amplificación de parte de la región de NAT1 y de la región 3' de <i>CRZI</i> en el sistema clásico de delección (sin CRISPR)
B11106	TTC AGT AGC CAA ACC CAT C	Cebador reverso de amplificación de parte de la región de NAT1 y de la región 5' de <i>CRZI</i> en el sistema clásico de delección (sin CRISPR)
B11107	TCA GTG GCA AAT CCT AAC C	Cebador interno NAT1, usado para comprobar su integración en 5'.
B11108	AGA GAA AAT ACC CGT GAC G	Cebador interno NAT1, usado para comprobar su integración en 3'.
B11103	CTA GAA CTA GTG GAT CTG AA	Cebadores directo y reverso para la amplificación del marcador de NAT1 presente en el vector pV1025
B11104	TAA GAG TGA AAT TCT GGA AA	

PCR

La amplificación de los distintos fragmentos de interés se realizó mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), técnica que permite amplificar de forma exponencial una región específica de ADN a partir de un par de cebadores que flanquean la secuencia diana. Cada ciclo consta de tres etapas: una desnaturalización a 95 °C, en la que las dos hebras del ADN se separan; una hibridación a una temperatura dependiente de la T_m de los cebadores, en la que estos se unen a sus secuencias complementarias; y una extensión de 72°C. La repetición sucesiva de estos ciclos genera un número exponencial de copias del fragmento de interés.

Como ADN molde se emplearon el ADN genómico de *C. auris*, y ADN plasmídico de los vectores utilizados (pV1025, pADH99Cau, pADH100Cau). Se utilizaron dos polimerasas distintas, la Taq polimerasa y la Phusion y sus respectivos tampones de PCR para desarrollar las distintas pruebas. Las condiciones de reacción y el perfil de ciclado se ajustaron en cada caso en función del fragmento amplificado.

Las reacciones de PCR se llevaron a cabo en un termociclador de VWR International.

Electroforesis en gel de agarosa

Los fragmentos amplificados por PCR fueron analizados por electroforesis de agarosa con el objetivo de comprobar una correcta amplificación de la zona de interés

Para ello se preparó un gel de agarosa a un 0.8-2% disuelto en un tampón de electroforesis TAE (Tris Acetato-EDTA). Una vez solidificado el gel, las muestras fueron mezcladas con el tampón de carga que incluía el Gel Red y fueron depositadas en los pocillos del gel.

Además de cargar las muestras, también se cargó el marcador de peso molecular 1Kb Plus DNA lo que permitió estimar los tamaños de amplificación procedentes de la PCR.

La electroforesis se realizó con un voltaje constante de 100 mV durante aproximadamente 1 hora y 30 minutos. Las muestras de ADN se visualizaron utilizando Gel Red ® como agente intercalante de ADN y, tras la tinción, se sometieron a la exposición de luz ultravioleta en un transiluminador con una cámara incorporada.

Una vez identificados los fragmentos de interés se procedió a la purificación usando el kit NucleoSpin Gel and PCR Clean-up (Macherey-Nagel, Düren, Alemania). Una vez purificado, se conservaron los fragmentos a -20°C.

La electroforesis en gel de agarosa se realizó utilizando un sistema de electroforesis de Bio-Rad.

Transformación

Las transformaciones de *E. coli* se llevaron a cabo siguiendo el protocolo Hanahan (Hanahan, 1983), según el cual se fuerza la incorporación de ADN exógeno en células competentes mediante un choque térmico a 42°C. En el caso de *C. auris*, para la integración de las construcciones genéticas se siguió el procedimiento desarrollado por Köhler y colaboradores (Köhler & Fink, 1996), el cual se basa en la alteración química de la pared celular usando acetato de litio 1 M pH=7,5 DTT 1 M y tampón TE 10x seguido de un choque eléctrico mediante electroporación, lo que genera poros que facilitan la entrada del ADN.

Diseño de los ARN guía (ARNg) para CRISPR-Cas9

El diseño de los ARN guía dirigidos a *CRZI* se realizó con las herramientas bioinformáticas *CHOPCHOP* (Labun et al., 2019) y *CRISPOR* (Concordet & Haeussler, 2018). Como secuencia de referencia se empleó la región codificante de *CRZI* de *C. auris* obtenida de

Candida Genome Database, y como genoma para el análisis de dianas específicas, el genoma de referencia de *C. auris* (cepa B8441). Se identificaron protoespaciadores de 20 nucleótidos adyacentes a un motivo PAM (5'NGG-3'), reconocido por la nucleasa SpCas9. Para cada candidato se evaluaron las puntuaciones de eficiencia de corte, la especificidad y el número de posibles dianas específicas (*off-targets*) según el número y la posición de los desapareamientos, el contenido en G+C y la localización dentro del gen. Se priorizaron las guías con mayor eficiencia predicha y menor probabilidad de unión inespecífica, seleccionando preferentemente aquellas cuyo sitio de corte se situaba en la región central del gen para favorecer la obtención de mutantes funcionales tras la reparación por unión de extremos no homólogos (NHEDJ). A partir de las guías seleccionadas, ambas herramientas generaron de forma automática los oligonucleótidos necesarios para construir los ARNg y los cebadores de validación por PCR.

Edición génica de *C. auris* mediante CRISPR-Cas9

Sistema CRISPR-Cas9 basado en HIS1 (HIS-FLP)

Para deletar el gen *CRZ1* en *C. auris* se empleó el sistema CRISPR-Cas9 usando los plásmidos pADH99Cau y pADH100Cau (Ennis et al., 2021), derivados del sistema descrito originalmente en *C. albicans* (Nguyen et al., 2017)

El plásmido pADH99Cau contiene la secuencia codificante de Cas9, sintetizado bajo el control del promotor *CauENO1*, la primera parte del marcador NAT1, también contiene la secuencia para una recombinasa FLP específica del sitio de unión y una región homóloga *upstream* del locus *HIS1*, lo que permite integrarse en el genoma de *C. auris*. Por otro lado, el plásmido pADH100Cau incluye la segunda mitad del marcador de resistencia a NAT1, el promotor *CauSNR52*, el *scaffold* del ARNg y la región homóloga *downstream* de *HIS1*.

Generación del cassette de expresión del ARNg

El cassette de expresión construido específicamente dirigido a *CRZ1* se generó mediante tres PCRs:

- Fragmento A: Amplificado a partir de pADH100Cau utilizando los nucleótidos AHO1096 y pADH100_Cau_fgmA_R.
- Fragmento B: Amplificado a partir de pADH100Cau utilizando un primer *forward* específico que incorpora la secuencia guía (gARN_CRZ1) y un primer *reverse* pADH100_Cau_fgMB_R.
- Fragmento C: Generado mediante PCR de fusión utilizando los fragmentos A y B como molde los oligonucleótidos AHO1096 y pADH100_Cau_fgMC_R, obteniéndose el cassette completo de expresión de ARNg.

Transformación y selección

Las células de *C. auris* fueron transformadas por electroporación utilizando el protocolo mencionado anteriormente utilizando:

- 2µg de pADH99Cau previamente linealizado con la enzima MssI y purificado en gel.
- 2µg del fragmento C (cassette del ARNg)

- 3µg de ADN donador

Para seleccionar los transformantes se utilizó el medio YPD con NAT1, seleccionando las colonias resistentes.

Eliminación del cassette CRISPR

Para eliminar el cassette, las colonias seleccionadas se cultivaron en medio YPD para inducir la expresión de la enzima FLP recombinasa necesaria para la deleción. Posteriormente, se confirmó la escisión del marcador mediante la selección de colonias sensibles a nourseotricina.

Sistema clásico de deleción (NO CRISPR)

Como alternativa al sistema CRISPR-Cas9, se empleó un método clásico de deleción génica basado en recombinación homóloga donde se utilizó el plásmido pV1025 como molde para la amplificación del marcador de resistencia a NAT1

Generación del cassette de deleción

El cassette de deleción se generó mediante PCR de fusión. Para ello, se amplificaron las regiones homólogas 5' y 3' del gen *CRZI*, correspondientes a las secuencias flanqueantes necesarias para dirigir la integración por recombinación homóloga en el locus de interés.

De manera independiente se amplificó a partir del plásmido pV1025 el marcador de resistencia a NAT1, utilizando oligonucleótidos diseñados con regiones solapantes complementarias a los extremos de las regiones 5' y 3' de *CRZI*.

Posteriormente, los fragmentos obtenidos fueron fusionados mediante una segunda PCR, generando un único cassette lineal compuesto por la región 5' de *CRZI*, el marcador NAT1 y la región homóloga 3'. Este fragmento permite interrumpir de manera permanente el gen *CRZI* en las colonias transformantes.

Transformación y selección

El cassette de deleción purificado se utilizó para transformar las células de *C. auris* utilizando el protocolo mencionado anteriormente. La selección de transformantes se realizó en medio YPD suplementado con nourseotricina.

Las colonias resistentes obtenidas fueron verificadas mediante crecimiento en presencia de SDS al 1%, tratando de evaluar diferentes variaciones fenotípicas asociadas a la deleción de *CRZI*. Finalmente, la correcta integración del cassette y la deleción del gen se confirmaron mediante PCR.

Esta técnica no permite la eliminación del cassette.

Resultados y discusión

Análisis bioinformáticos

Obtención y control de calidad de las secuencias.

Se recuperaron los ortólogos de *CRZ1*, de trece secuencias fúngicas (cinco clados de *C. auris*, *C. albicans*, *C. dubliniensis*, *C. parapsilosis*, *C. orthopsilosis*, *C. metapsilosis*, *Nakaseomyces* (*C. glabrata*, *S. cerevisiae* y *A. fumigatus* como grupo externo). El control de calidad de las secuencias previas al análisis reveló y corrigió dos incidencias relevantes: en primer lugar, las distancias nucleótidos entre especies alcanzaban valores de saturación elevados, con ordenamientos incompatibles con la filogenia conocida, por lo que el análisis interespecie se efectuó a nivel proteico. Y en segundo lugar la secuencia de *C. metapsilosis* estaba depositada en la hebra complementaria y se reorientó a su marco de lectura codificante. Se aplicó el código genético alternativo CUG-Ser a las especies del clado CTG (*C. auris*, *C. albicans*, *C. dubliniensis*, *C. parapsilosis*) y el estándar a *C. glabrata*, *S. cerevisiae*.

Conservación intraespecie

La conservación de Crz1 se concentra en los dominios de unión a ADN, donde *CRZ1* reconoce el ADN mediante tres dedos de zinc C2H2 descritos en la introducción. La comparación interespecie reveló un patrón marcadamente modular representado en la *Figura 2*. La identidad de Crz1 cayó hasta el 50-52% entre las especies del clado CTG, y hasta el 34-39% en *C. glabrata*, *S. cerevisiae* y *A. fumigatus*. El dominio C2H2 en cambio, se mantuvo entre el 70-93% en todo el rango filogenético (92-93% para *C. parapsilosis*, 76% en *C. albicans*, *C. dubliniensis* y *A. fumigatus*; 75% en *S. cerevisiae*; 70% en *C. glabrata*). La matriz de identidades por pares del dominio en la *Figura 3* muestra que su conservación se mantiene incluso entre especies más alejadas, mientras que el resto de la proteína diverge. La conservación, por tanto, no es uniforme a lo largo de Crz1 sino que se concentra en la región que une al ADN, como cabe esperar en un dominio sometido a una fuerte presión selectiva.

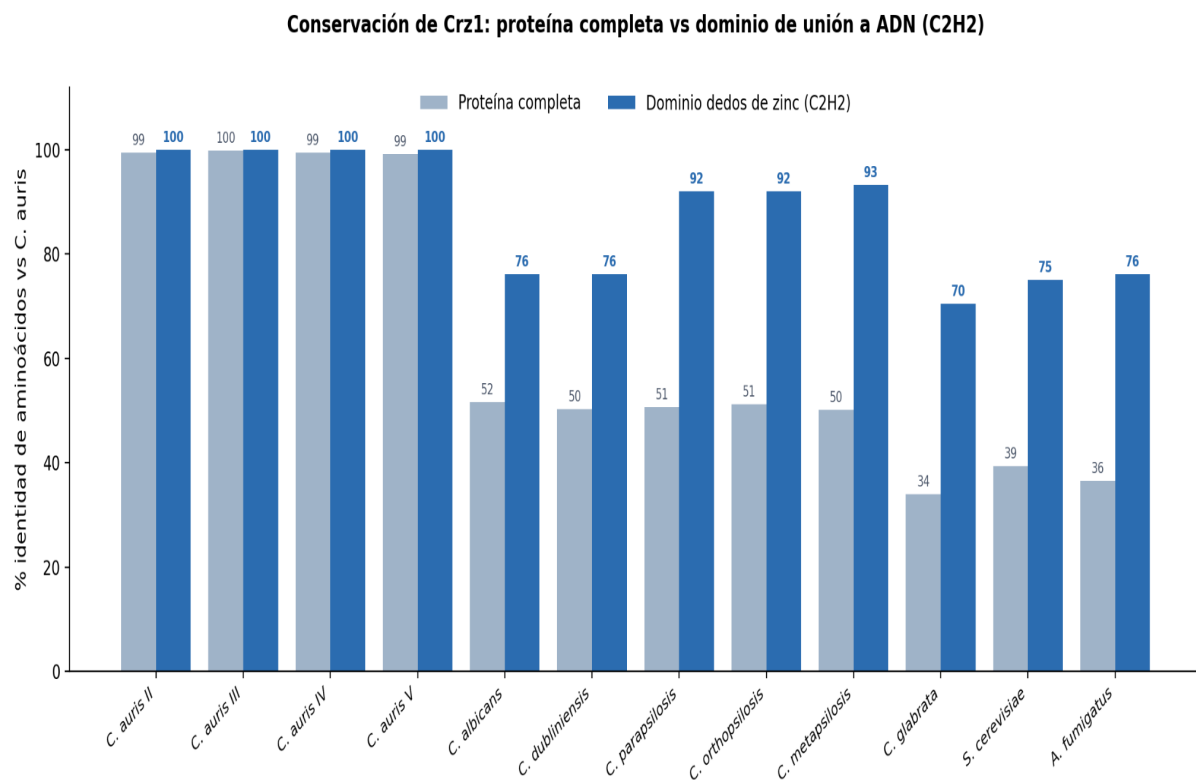


Figura 2. Conservación de Crz1: comparación de la identidad de aminoácidos de la proteína completa frente al dominio de dedos de zinc C2H2, tomando *C. auris* como referencia.

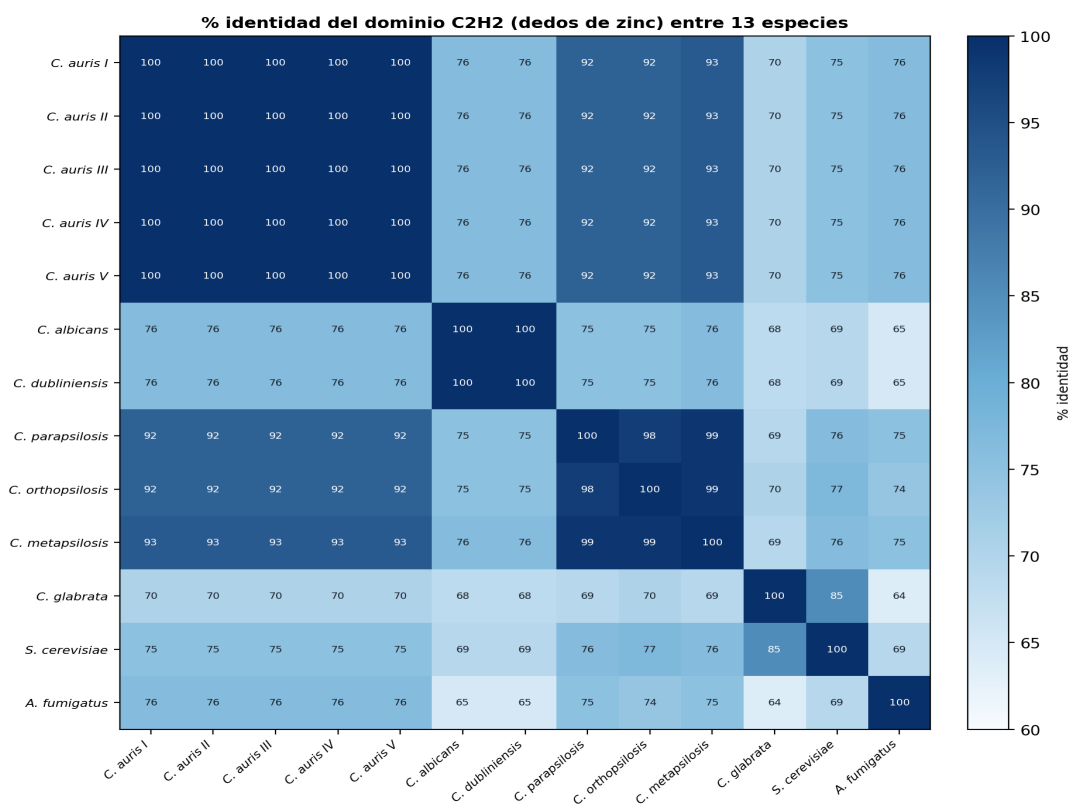


Figura 3. Matriz de identidad de aminoácidos del dominio C2H2 (dedos de zinc) entre las trece especies analizadas. La escala de color indica el porcentaje de identidad por pares.

Residuos funcionalmente restringidos y conservación estructural.

El logo de secuencias del dominio C2H2 representada en la *Figura 4*, mostró la invariancia de las cisteínas e histidinas coordinadoras del Zn^{2+} en los tres dedos (motivo C-X₂-C.... H-X₃-H) y de los residuos del plegamiento $\alpha\beta\beta$ (RSHLRTH, CGKAF y RKRHE). La proyección de la conservación por residuo sobre el modelo de AlphaFold de Crz1 de *C. auris*, localizó las posiciones más conservadas en el dominio C2H2 (grado medio 7,82/9) frente a un grado medio de 4,40/9 en el resto de la proteína, mayoritariamente desestructurada. Los residuos directamente implicados en la coordinación del metal y el reconocimiento del ADN son, por tanto, los más invariantes del conjunto como se aprecia en la *Figura 5*.

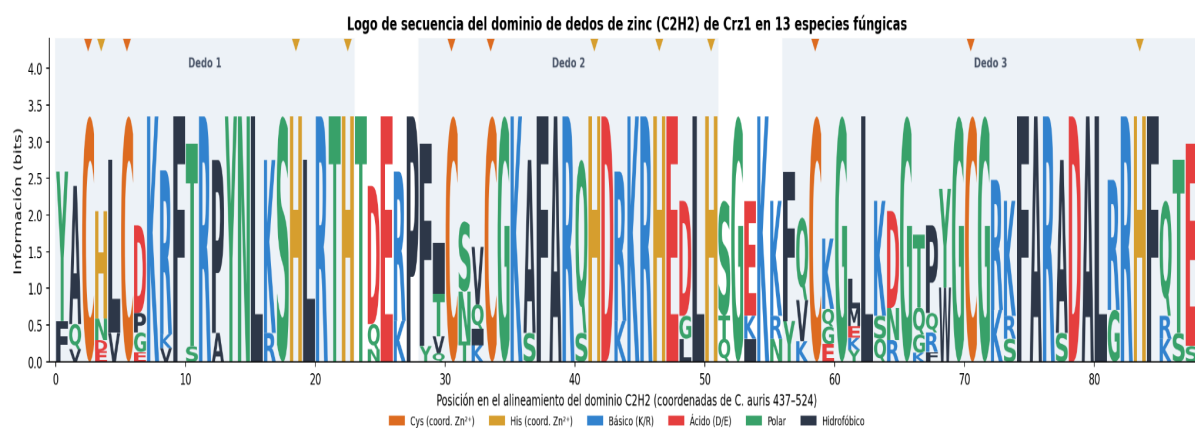


Figura 4. Logo de secuencia del dominio C2H2 de Crz1 obtenido del alineamiento de las trece especies. La altura de cada residuo es proporcional a su grado de conservación.

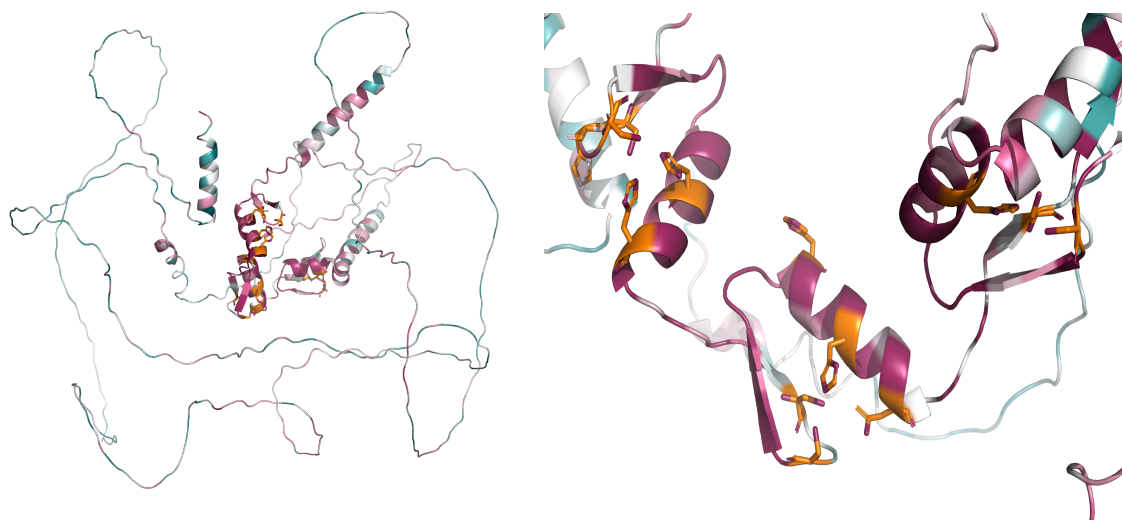


Figura 5. Conservación evolutiva por residuo de Crz1 de *C. auris* proyectada sobre su modelo estructural de AlphaFold (UniProt A0A2H0ZWD0), calculada con ConSurf. Escala de 1 (variable, turquesa) a 9 (conservado, granate).

Reconstrucción filogenética

El gen *CRZ1* está fijado en *C. auris*. Los cinco clados de *C. auris* mostraron una identidad de la proteína Crz1 completa del 99-100% y del 100% en los dominios de dedos de zinc, en concordancia con las distancias mínimas evolutivas obtenidas (0,0006-0,014 sustituciones por sitio; *Figura 6*). Este resultado indica que *CRZ1* se encuentra prácticamente invariante dentro de la especie, de modo que las regiones diana y las guías de dicción diseñadas sobre este gen son aplicables con independencia del clado.

El árbol (Neighbor-joining sobre el alineamiento proteico enraizado en *A. fumigatus*) representado en la *Figura 6*, recuperó una topología congruente con la topología conocida, los cinco clados de *C. auris* formaron un grupo compacto, *C. parapsilosis* se agrupó con *C. orthopsilosis* y *C. metapsilosis*. Mientras que *C. albicans* y *C. dubliniensis* aparecieron como especies hermanas y *C. glabrata* se agrupó con *S. cerevisiae*, separadas del clado CTG. Esta congruencia valida la correcta asignación de ortología de todas las secuencias, incluida la de *C. parapsilosis* cuyo gen no aparece anotado como *CRZ1*, pero conserva la estructura completa de los tres dedos de zinc.

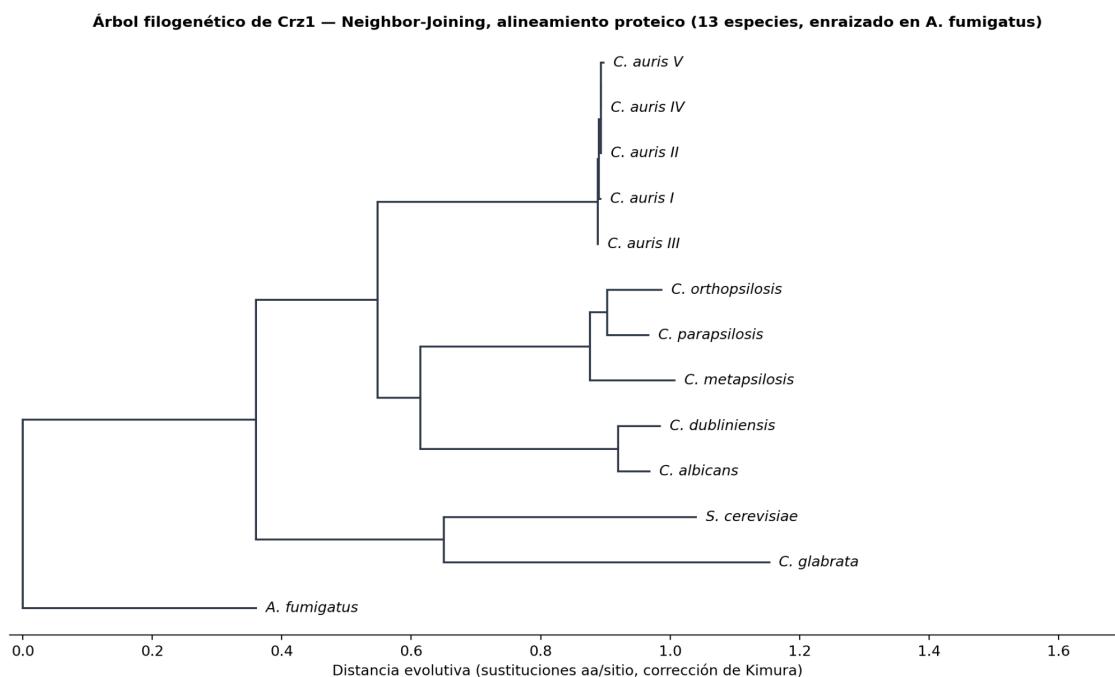


Figura 6. Árbol filogenético del factor de transcripción Crz1 en trece especies fúngicas. Reconstrucción por Neighbor-Joining a partir del alineamiento proteico (MAFFT, L-INS-i), enraizada en *Aspergillus fumigatus* como grupo externo. La longitud de las ramas representa la distancia evolutiva (sustituciones de aminoácidos por sitio, corrección de Kimura).

El conjunto de resultados describe a Crz1 como una proteína de organización modular, en la que un dominio de unión a ADN de tipo C2H2 fuertemente conservado se inserta en regiones de baja complejidad y escasa conservación. Esta arquitectura es coherente con la naturaleza de Crz1 como factor de transcripción en la vía calcineurina, conservada en eucariotas (Thewes, 2014; Karababa et al., 2006) y tiene consecuencias directas para su evaluación como diana terapéutica. La conservación del dominio C2H2 desde los clados de *C. auris* hasta *A. fumigatus*, sin descender del 70%, indica que la vía calcineurina-Crz1 constituye un nodo común a nivel fúngico, convirtiéndolo en un candidato atractivo para el uso de antifúngicos de amplio

espectro, en línea con el papel central de la vía descrita en *C. auris* (Cha et al., 2025) y con la validación de Crz1 como diana en *C. glabrata* resistente a equinocandinas mediante CRISPR (Ceballos-Garzón et al., 2022a).

No obstante, la propia conservación que respalda el amplio espectro impone una limitación crítica de selectividad. El plegamiento C2H2 es la clase de dominio de unión a ADN más abundante del proteoma humano (Najafabadi et al., 2015), y la actividad fosfatasa de la calcineurina está muy conservada en el ser humano, razón por la cual el inhibidor FK506/tacrolimus se usa como inmunosupresor y no como antifúngico (Juvvadi et al., 2017). En consecuencia, dirigir un fármaco directamente contra el dominio C2H2 conservado o contra la actividad catalítica de la calcineurina comprometería a la toxicidad sobre el hospedador. Nuestros resultados sugieren que la alternativa terapéutica selectiva no reside en el dominio conservado, sino en la interfaz de acoplamiento dada entre la calcineurina y la proteína Crz1 preservando la calcineurina humana, esta es la estrategia que persigue el desarrollo de análogos de FK506 no inmunosupresores y selectivos para hongos (Gobeil et al., 2021).

Estos resultados obtenidos *in silico* conviene leerlos junto a los datos funcionales, porque la delección de *CRZ1* no equivale a inhibir la calcineurina. En *C. albicans*, Crz1 no resulta imprescindible para la tolerar azoles, lo que indica que la calcineurina actúa también a través de efectores independientes de Crz1 (Karababa et al., 2006); y en *C. auris* la pérdida de *CRZ1* se ha asociado incluso a un aumento de la resistencia a equinocandinas (Cha et al., 2025). Por tanto, el valor de Crz1 como diana, depende del contexto farmacológico, la vía calcineurina-Crz1 no es esencial para la viabilidad sino que regula la respuesta al estrés que permite a *C. auris* tolerar los antifúngicos, es por eso que su bloqueo en monoterapia es poco eficaz, pero combinado con azoles se suprime esa tolerancia y resensibiliza al patógeno frente a ellos. La conservación intraespecie absoluta del dominio C2H2 entre los cinco clados de *C. auris* refuerza el abordaje de cualquier tipo de estrategia diagnóstica, de edición o terapéutica basada en este gen, siendo transferible a cualquiera de los linajes circulantes del patógeno actuales, un aspecto relevante dada la expansión global del mismo (Lockhart et al., 2017; Muñoz et al., 2018).

Los hallazgos se respaldan con estudios en *C. glabrata* (Ceballos-Garzón et al., 2022b), un análisis proteómico mostró que Crz1 se activa bajo estrés por equinocandinas y el estudio con CRISPR confirmó que Crz1 es necesario para la resistencia en esa especie (Ceballos-Garzón et al., 2022a). Un matiz crítico emerge en *C. auris*, la delección de *CRZ1* se asocia a una mayor resistencia a equinocandinas marcando un fenotipo opuesto, sugiriendo que el papel de Crz1 de dependiente de especie. Esto refuerza la necesidad de validación experimental específica en *C. auris*.

Entre las limitaciones del estudio destaca su naturaleza *in silico*, que requiere de validación experimental (intentando abordarlo de manera experimental generando los mutantes *crz1Δ*); el uso de un único ortólogo representativo por especie; la dependencia de la fiabilidad de los modelo de AlphaFold, que debe ponderarse mediante los valores pLDDT (especialmente bajos en las regiones N-terminales desordenadas); y la saturación de la señal filogenética

nucleotídica, que motivó el cambio al análisis proteico. Como líneas futuras se propone la validación funcional de los mutantes frente a panales de antifúngico y combinaciones terapéuticas, el modelado del complejo calcineurina-Crz1 y el cribado virtual de moléculas dirigidas a la interfaz PxlxlT y la ampliación a un mayor número de aislados clínicos.

Diseño de los ARN guía dirigidos a *CRZ1*

El diseño de los ARN guía se realizó con las herramientas bioinformáticas *CHOPCHOP* y *CRISPOR*, empleando como referencia la región codificante de *CRZ1* de *C. auris*. Ambas plataformas identificaron los protoespaciadores de 20 nucleótidos adyacentes a un motivo PAM (5'-NGG-3') reconocido por la SpCas9 y proporcionaron, para candidato, un conjunto de parámetros que permitieron jerarquizar las guías, la puntuación de especificidad y el número de dianas específicas (*off-targets*) clasificadas según el número y la posición de los desapareamientos respecto al genoma de referencia, el contenido en G+C, la autocomplementariedad de la secuencia y su localización dentro del gen. Sobre estos criterios se priorizaron las guías con mayor eficiencia predicha, menor probabilidad de unión inespecífica y un sitio de corte situado en la región central del gen, de modo que favorece la generación de mutantes funcionales tras la reparación por unión de extremos no homólogos (NHEJ).

CHOPCHOP y *CRISPOR* coincidieron en gran medida en las regiones diana, lo que refuerza la fiabilidad de las guías seleccionadas, ya que cada plataforma funciona con algoritmos de predicción distintos. Matizar que las puntuaciones de eficiencia y predicción depende de la puntuación de eficiencia y la predicción de off-targets dependen de lo completo que esté el genoma de referencia de *C. auris*, por lo que son estimaciones *in silico* que quedan pendientes de comprobar de manera experimental. Las guías diseñadas podrían ser aplicables a cualquiera de las variantes de *C. auris* independientemente de su clado (demostrado en el análisis bioinformático), esto aporta robustez y transferibilidad a la estrategia de edición.

Ensayos experimentales

Las amplificaciones que se describen a continuación (Figuras 7-9) corresponden a la construcción del cassette de delección del sistema clásico por recombinación homóloga, método no CRISPR. Consiste en la obtención de los extremos de homología 5' y 3' de *CRZ1* y su fusión con el marcador NAT1, para obtener el cassette genético completo antes de transformar.

Amplificación de regiones upstream y downstream de *CRZ1*

En la primera reacción de PCR se intentaron amplificar simultáneamente los extremos 5' y 3' de *CRZ1*, siguiendo las condiciones por defecto de la PCR. En estas condiciones sólo se obtuvo el fragmento 3', visible como una única banda, como se aprecia en el gel correspondiente a la Figura 7. El fragmento corresponde a las 900 pares de bases según marcador de peso molecular, sin amplificación del extremo 5'. Con el fin de amplificar el extremo 5', se repitió la reacción manteniendo los mismo reactivos y perfil de ciclado, pero reduciendo la temperatura de hibridación de 50°C a 45°C. Esta modificación permitió la amplificación de

ambos fragmentos correspondiente a los extremos 5' y 3' de *CRZI* del tamaño esperado, además de obtener menos productos inespecíficos, como se aprecia en la *Figura 7*.

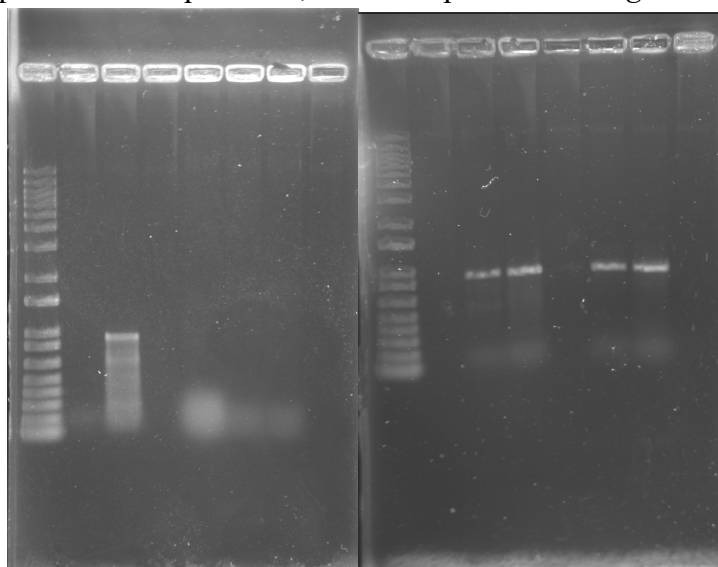


Figura 7. Electroforesis en geles de agarosa para amplificar por PCR de los brazos de homología 5' y 3' de *CRZI*, el primer gel (izquierda) corresponde a un primer intento, temperatura de hibridación 50 °). Solo se obtuvo el fragmento 3' (~900 pb). El segundo gel (derecha) tiene el mismo fin que el de la izquierda, la diferencia fue la reducción de la temperatura de hibridación a 45 °C; se observan ambos fragmentos del tamaño esperado.

Obtención de solapantes 5' y 3'

Para la amplificación de los fragmentos solapantes 5' y 3' de *CRZI* se llevó a cabo un protocolo de PCR anidada consistente en dos rondas de amplificación sucesivas.

Primera ronda de amplificación

En esta PCR se favorece la hibridación de las zonas solapantes, el vector que contiene el marcador de selección NAT1 porta una región de 20 pares de bases en cada extremo que hibrida con las secuencias 5' y 3' de *CRZI*.

Segunda ronda de amplificación

Tras la finalización de la primera PCR, se procedió con la PCR completa añadiendo los *primers* específicos para cada región (5' *CRZI* y 3' *CRZI*) junto al cebador específico de marcador de selección para amplificar las regiones de interés usando los productos hibridados de la previa PCR.

En el primer gel se siguieron las condiciones estándar y no hubo producto de PCR, en el segundo gel correspondiente a la *Figura 8*, se cargaron productos cuya PCR fue modificada respecto al protocolo estándar, se modificaron las temperaturas de hibridación y el tiempo de extensión en las dos rondas de PCR. Se utilizaron varias diluciones de las muestras de ADN molde y únicamente hubo amplificación en la muestra original sin diluir del extremo 5', el amplicón contiene un tamaño de banda de 1744 pares de bases, correspondiendo al tamaño esperado. En cambio en las demás diluciones de 5' y 3' no hubo producto de PCR.

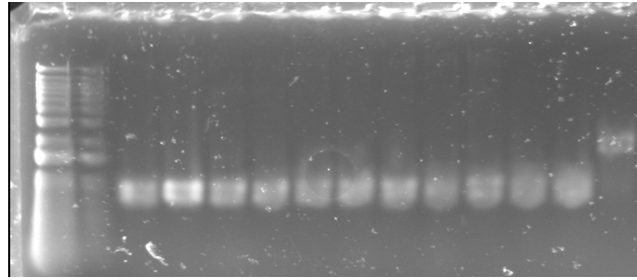


Figura 8. PCR de fusión solapante para el ensamblaje del cassette de delección: fragmentos solapantes 5', el producto de la PCR fue cargado en el pocillo de la derecha del todo, las demás muestras son productos de PCR correspondientes a experimentos ajenos al trabajo.

Amplificación del marcador de selección NAT1 (pV1025) y amplificación del extremo 3'solapante

La *Figura 9* corresponde a una PCR usada para amplificar la región 3'solapante, cambiando las condiciones estándar. Las bandas que aparecen no corresponden al amplicón ya que no se encuentran en el tamaño de banda esperado. Los dos pocillos de la derecha corresponden al amplicón del vector pV1025 que contiene el marcador NAT1 que se encuentra en el tamaño esperado del producto de PCR.

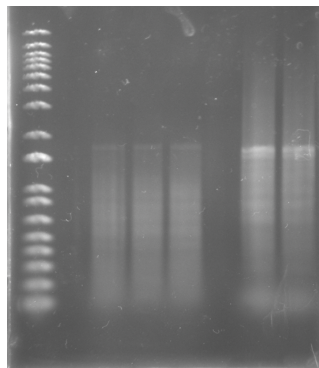


Figura 9. PCR de fusión solapante para el ensamblaje del cassette de delección: fragmento 3'solapante. El producto de PCR fue cargado en los pocillos 3,4 y 5, teniendo en cuenta que el marcador de peso molecular fue cargado en el pocillo 1. Este gel también incluye productos de amplificación por PCR del marcador de resistencia a nourseotricina (NAT1) a partir del plásmido pV1025, las muestras fueron cargadas en los últimos dos pocillos.

Las figuras representadas a continuación (*Figura 10* y *Figura 11*) corresponden al sistema CRISPR-Cas9 (HIS-FLP). Consiste en la obtención de los fragmentos A, B y C para obtener el cassette genético completo de CRISPR y dirigir la delección a *CRZ1*.

Verificación de plásmidos del sistema CRISPR-Cas9

Para obtener los fragmentos A y B del método de CRISPR, también se trabajaron PCRs en condiciones estándar ajustando las temperaturas de hibridación a los oligonucleótidos usados en cada caso. En estas primeras pruebas no se obtuvo ningún amplicón, por tanto, se verificó la integridad de los plásmidos del sistema mediante una digestión con enzimas de restricción.

La *Figura 10* corresponde a la digestión de los vectores comerciales adjuntados en el anexo que contienen la maquinaria necesaria para realizar la edición genética en *C. auris*. En este caso el primer pocillo corresponde al vector pADH99, tratado con la enzima MssI provocando dos fragmentos de 1500 pares de bases y 10000 pares de bases. Por otro lado, en el segundo

carril se aprecian varias bandas que corresponden con productos de digestión del vector pADH100 provocados por HindIII., dando como resultado fragmentos de 400, 500, 1500 y 2500 pares de bases.

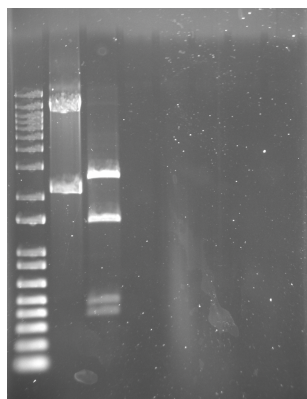


Figura 10. Verificación de los plásmidos del sistema CRISPR-Cas9 mediante digestión con enzimas de restricción. Carril 1, marcador de peso molecular; carril 2, pADH99Cau digerido con MseI (linearización); carril 3, pADH100Cau digerido con HindIII.

Para las siguientes pruebas se utilizó la polimerasa Phusion y se modificaron varios parámetros de la PCR, se aumentó el tiempo de extensión, y se disminuyó la temperatura de hibridación. En este caso como aparece en la *Figura 11*, se obtuvieron los fragmentos A para las diferentes diluciones de ADN molde que fueron cargadas. Lo mismo ocurrió con el fragmento B donde ajustando los parámetros de la PCR a la polimerasa Phusion, se obtuvieron los amplicones correspondientes al fragmento B para las diferentes diluciones del ADN molde.

Para la obtención del fragmento C se utilizaron de molde tanto el fragmento A como el B obtenidos en las PCRs previas. En este caso se utilizaron condiciones estándar y no se obtuvo amplificación del último fragmento necesario antes de realizar la transformación.

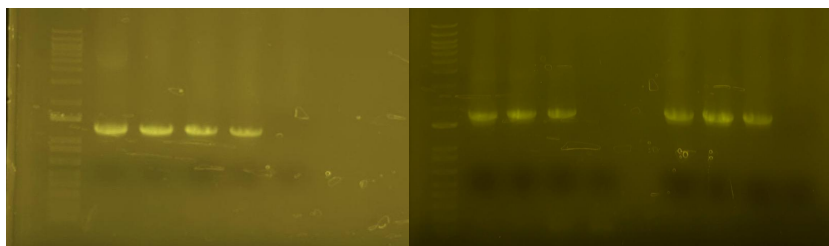


Figura 11. Electroforesis en gel de agarosa de la amplificación por PCR de los fragmentos A y B del cassette de expresión del ARN guía (sistema HIS-FLP). El primer gel (izquierda) corresponde a la amplificación del fragmento A y el gel de la derecha corresponde a la amplificación del fragmento B. Ambos gels contienen diferentes diluciones del ADN molde.

En conjunto, los resultados obtenidos señalan que el paso crítico y limitante del trabajo experimental fue la PCR de fusión solapante, empleada tanto en la construcción del cassette del ARN guía (sistema CRISPR) como en el ensamblaje del cassette de delección (sistema NO CRISPR). A diferencia de una PCR convencional, en la PCR solapante el resultado depende de las amplificaciones previas, y sobre todo depende de la proporción en la que llegan los fragmentos que deben hibridar. En el caso que uno de ellos está subrepresentado o presente un bajo rendimiento como ocurrió con la región *upstream* 5' de *CRZ1* antes de optimizar la

temperatura de hibridación, la fusión puede fallar, y ocasionando la no obtención del constructo completo.

Esto indica que el protocolo debe optimizarse y adaptarse específicamente a este tipo de condiciones. Una estrategia a seguir sería purificar y cuantificar cada fragmento por separado y combinarlos en cantidades equimolares antes de la reacción de fusión, de modo que todos los moldes participen en proporciones equivalentes y se favorezca la hibridación de las zonas solapantes. También se podrían ajustar condiciones tales como la temperatura de hibridación de los extremos solapantes (como se hizo para el brazo 5'), el número de ciclos o el uso de PCR *touchdown*.

Todas estas mejoras permitiría obtener de forma reproducible los constructos finales, el cassette del ARN guía y el cassette de delección necesarios para transformar y obtener las cepas mutantes $\Delta crz1$. Estas cepas forman parte del objetivo experimental principal del proyecto, se podría validar funcionalmente en el laboratorio el papel de *CRZ1* en la respuesta al estrés y la susceptibilidad predicha de manera bioinformática, y por cómo se describe en la bibliografía (Cha et al., 2025).

Si el sistema HIS-FLP no resultará eficiente, se podrían usar otras estrategias alternativas de edición mediante CRISPR-Cas9 adaptadas a *C. auris*. Una de esas alternativas sería el sistema LEUpOUT, derivado del método descrito por Nguyen et al. (2017), basado en el ensamblaje por PCR del cassette del ARNg, permitiendo la selección por auxotrofia mediante el marcador LEU2, contando con la ventaja de poder reciclar el marcador y permitir ediciones sucesivas. El sistema clásico de delección por recombinación homóloga con marcador NAT1 (Sambrook & Russell, 2001) podría utilizarse como control comparativo de la eficiencia de edición entre los distintos sistemas. La disponibilidad de varias opciones de edición con ventajas y limitaciones distintas entre ellos y recientemente comparados en *C. auris* (Sofras et al., 2025) aporta flexibilidad para sortear las posibles dificultades de edición generadas en esta especie. En el presente trabajo, el sistema LEUpOUT no llegó a abordarse experimentalmente y queda planteado como una vía alternativa para la continuación del proyecto.

La elección de *CRZ1* como diana experimental se apoya directamente en el análisis de conservación: la similitud entre los cinco clados de *C. auris* garantiza que la estrategia de edición es válida para cualquier aislado, y su función como efector terminal de la vía calcineurina explica el interés de obtener mutantes deficiente en este gen. Visto así, las dificultades técnicas encontradas en la construcción de los cassettes no cuestionan la idoneidad de la diana, sino únicamente la eficiencia del procedimiento. La obtención de mutantes de $\Delta crz1$ permitiría contrastar experimentalmente las predicciones derivadas de la conservación y el papel descrito para la vía calcineurina-Crz1 (Cha et al., 2025).

Conclusiones

El factor de transcripción Crz1 de *Candida auris* presenta una organización modular, en la que un dominio de unión a ADN de tipo C2H2 está altamente conservado y se inserta en regiones de baja complejidad y escasa conservación, lo que refleja una presión selectiva purificadora dirigida al dominio funcional. Los residuos coordinadores de Zn^{2+} (Cys, His) y de reconocimiento de ADN son invariantes a escala pan-fúngica.

CRZI está prácticamente fijado dentro de la especie: entre los cinco clados de *C. auris* la identidad es del 99-100% en la proteína completa y del 100% en el dominio de dedos de zinc, por lo que cualquier estrategia diagnóstica, de edición o terapéutica basada en este gen sería aplicable independientemente del clado al que pertenezca.

A escala interespecie, los dedos de zinc de tipo C2H2 mantiene un 70-93% de conservación (desde *C. auris* hasta *A. fumigatus*), posicionando a Crz1 como una diana potencial de amplio espectro. Sin embargo, la abundancia del plegamiento C2H2 en el proteoma humano y la conservación de la calcineurina en células del hospedador limitan la selectividad. La ventana terapéutica reside en la interfaz fúngico-específica de acoplamiento calcineurina-Crz1, no en el propio dominio.

Experimentalmente, se diseñaron ARNg específicos (*CHOPCHOP*, *CRISPOR*), se optimizaron dos estrategias complementarias de edición (HIS-FLP y recombinación homóloga clásica) y se identificó la PCR de fusión solapante como paso crítico. Las condiciones fueron optimizadas y los plásmidos se verificaron, quedando pendiente el ensamblaje final de constructos y obtención de mutantes $\Delta crz1$.

En conjunto, el trabajo proporciona evidencia bioinformática sólida y herramientas experimentales validadas que respaldan a *CRZI* y a la vía calmodulina-calcineurina como diana antifúngica prometedora frente a *C. auris*. La conservación intraespecie garantiza la aplicabilidad pan-clado, la conservación inter-especie sugiere amplio espectro y la interfaz fúngico-específica ofrece selectividad. La obtención de mutantes $\Delta crz1$ permitirá completar la caracterización funcional.

Bibliografía

- Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W., & Lipman, D. J. (1990). Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology*, 215(3), 403–410.
- Ashkenazy, H., Abadi, S., Martz, E., Chay, O., Mayrose, I., Pupko, T., & Ben-Tal, N. (2016). ConSurf 2016: an improved methodology to estimate and visualize evolutionary conservation in macromolecules. *Nucleic Acids Research*, 44(W1), W344–W350.
- Bing, J., Guan, Z., Zheng, T., Zhang, Z., Fan, S., Ennis, C. L., Nobile, C. J., & Huang, G. (2023). Clinical isolates of *Candida auris* with enhanced adherence and biofilm formation due to genomic amplification of *ALS4*. *PLoS Pathogens*, 19(3), e1011239.
- Birnboim, H. C., & Doly, J. (1979). A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Research*, 7(6), 1513–1523.
- Ceballos-Garzón, A., Roman, E., Pla, J., Pagniez, F., Amado, D., Alméciga-Díaz, C. J., Le Pape, P., & Parra-Giraldo, C. M. (2022a). CRISPR-Cas9 approach confirms calcineurin-responsive zinc finger 1 (Crz1) transcription factor as a promising therapeutic target in echinocandin-resistant *Candida glabrata*. *PLoS One*, 17(3), e0265777.
- Ceballos-Garzón, A., Monteoliva, L., Gil, C., Álvarez-Moreno, C., Vega-Vela, N. E., Engelthaler, D. M., Bowers, J., Le Pape, P., & Parra-Giraldo, C. M. (2022b). Genotypic, proteomic, and phenotypic approaches to decipher the response to caspofungin and calcineurin inhibitors in clinical isolates of echinocandin-resistant *Candida glabrata*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 77(3), 585–597.
- Cha, H., Won, D., Kang, S., Kim, E.-S., Lee, K.-A., Lee, W.-J., Lee, K.-T., & Bahn, Y.-S. (2025). The calcineurin pathway regulates extreme thermotolerance, cell membrane and wall integrity, antifungal resistance, and virulence in *Candida auris*. *PLoS Pathogens*, 21(7), e1013363.
- Concordet, J.-P., & Haeussler, M. (2018). CRISPOR: intuitive guide selection for CRISPR/Cas9 genome editing experiments and screens. *Nucleic Acids Research*, 46(W1), W242–W245.
- Crooks, G. E., Hon, G., Chandonia, J.-M., & Brenner, S. E. (2004). WebLogo: a sequence logo generator. *Genome Research*, 14(6), 1188–1190.
- Doudna, J. A., & Charpentier, E. (2014). The new frontier of genome engineering with CRISPR-Cas9. *Science*, 346(6213), 1258096.
- Ennis, C. L., Hernday, A. D., & Nobile, C. J. (2021). A markerless CRISPR-mediated system for genome editing in *Candida auris* reveals a conserved role for Cas5 in the caspofungin response. *Microbiology Spectrum*, 9(3), e01820-21.

- Fakhim, H., Chowdhary, A., Prakash, A., Vaezi, A., Dannaoui, E., Meis, J. F., & Badali, H. (2017). In vitro interactions of echinocandins with triazoles against multidrug-resistant *Candida auris*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 61(11), e01056-17.
- Gobeil, S. M. C., Bobay, B. G., Juvvadi, P. R., . (2021). Leveraging fungal and human calcineurin-inhibitor structures, biophysical data, and dynamics to design selective and nonimmunosuppressive FK506 analogs. *mBio*, 12(6), e03000-21.
- Hanahan, D. (1983). Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Journal of Molecular Biology*, 166(4), 557–580.
- Jenks, J. D., Tobin, E. H., & Zahra, F. (2026). *Candida auris*. En *StatPearls*. StatPearls Publishing.
- Jumper, J., Evans, R., Pritzel, A., Green, T., Figurnov, M., Ronneberger, O., ... Hassabis, D. (2021). Highly accurate protein structure prediction with AlphaFold. *Nature*, 596(7873), 583–589.
- Juvvadi, P. R., Lee, S. C., Heitman, J., & Steinbach, W. J. (2017). Calcineurin in fungal virulence and drug resistance: Prospects for harnessing targeted inhibition of calcineurin for an antifungal therapeutic approach. *Virulence*, 8(2), 186–197.
- Karababa, M., Valentino, E., Pardini, G., Coste, A. T., Bille, J., & Sanglard, D. (2006). *CRZ1*, a target of the calcineurin pathway in *Candida albicans*. *Molecular Microbiology*, 59(5), 1429–1451.
- Katoh, K., & Standley, D. M. (2013). MAFFT multiple sequence alignment software version 7: improvements in performance and usability. *Molecular Biology and Evolution*, 30(4), 772–780.
- Köhler, J. R., & Fink, G. R. (1996). *Candida albicans* strains heterozygous and homozygous for mutations in mitogen-activated protein kinase signaling components have defects in hyphal development. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 93(23), 13223–13228.
- Labun, K., Montague, T. G., Krause, M., Torres Cleuren, Y. N., Tjeldnes, H., & Valen, E. (2019). CHOPCHOP v3: expanding the CRISPR web toolbox beyond genome editing. *Nucleic Acids Research*, 47(W1), W171–W174.
- Lee, W. G., Shin, J. H., Uh, Y., Kang, M. G., Kim, S. H., Park, K. H., & Jang, H. C. (2011). First three reported cases of nosocomial fungemia caused by *Candida auris*. *Journal of Clinical Microbiology*, 49(9), 3139–3142.
- Lockhart, S. R., Etienne, K. A., Vallabhaneni, S., Farooqi, J., Chowdhary, A., Govender, N. P., ... Litvintseva, A. P. (2017). Simultaneous emergence of multidrug-resistant *Candida*

auris on 3 continents confirmed by whole-genome sequencing and epidemiological analyses. *Clinical Infectious Diseases*, 64(2), 134–140.

Min, K., Ichikawa, Y., Woolford, C. A., & Mitchell, A. P. (2016). *Candida albicans* gene deletion with a transient CRISPR-Cas9 system. *mSphere*, 1(6), e00130-16.

Muñoz, J. F., Gade, L., Chow, N. A., Loparev, V. N., Juieng, P., Berkow, E. L., ... Cuomo, C. A. (2018). Genomic insights into multidrug-resistance, mating and virulence in *Candida auris* and related emerging species. *Nature Communications*, 9(1), 5346.

Najafabadi, H. S., Mnaimneh, S., Schmitges, F. W., Garton, M., Lam, K. N., Yang, A., ... Hughes, T. R. (2015). C2H2 zinc finger proteins greatly expand the human regulatory lexicon. *Nature Biotechnology*, 33(5), 555–562.

Nguyen, N., Quail, M. M. F., & Hernday, A. D. (2017). An efficient, rapid, and recyclable system for CRISPR-mediated genome editing in *Candida albicans*. *mSphere*, 2(2), e00149-17.

Ohama, T., Suzuki, T., Mori, M., Osawa, S., Ueda, T., Watanabe, K., & Nakase, T. (1993). Non-universal decoding of the leucine codon CUG in several *Candida* species. *Nucleic Acids Research*, 21(17), 4039–4045.

Piedrahita, C. T., Cadnum, J. L., Jencson, A. L., Shaikh, A. A., Ghannoum, M. A., & Donskey, C. J. (2017). Environmental surfaces in healthcare facilities are a potential source for transmission of *Candida auris* and other *Candida* species. *Infection Control & Hospital Epidemiology*, 38(9), 1107–1109.

Sambrook, J., Fritsch, E. F., & Maniatis, T. (1989). *Molecular cloning: A laboratory manual* (2.^a ed.). Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Sambrook, J., & Russell, D. W. (2001). *Molecular cloning: A laboratory manual* (3.^a ed.). Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Santos, M. A. S., & Tuite, M. F. (1995). The CUG codon is decoded in vivo as serine and not leucine in *Candida albicans*. *Nucleic Acids Research*, 23(9), 1481–1486.

Sanz Rodríguez, A. (2021). *Obtención de un mutante condicional en la subunidad PRE1 del proteasoma de Candida albicans mediante la metodología CRISPR* [Trabajo de Fin de Grado, Universidad Complutense de Madrid].

Satoh, K., Makimura, K., Hasumi, Y., Nishiyama, Y., Uchida, K., & Yamaguchi, H. (2009). *Candida auris* sp. nov., a novel ascomycetous yeast isolated from the external ear canal of an inpatient in a Japanese hospital. *Microbiology and Immunology*, 53(1), 41–44.

Schrödinger, LLC. (2024). *The PyMOL Molecular Graphics System* (Versión 3.1.8) [software].

Seidel, D., Wurster, S., Jenks, J. D., Sati, H., Gangneux, J.-P., Egger, M., ... Kontoyiannis, D. P. (2024). Impact of climate change and natural disasters on fungal infections. *The Lancet Microbe*, 5(6), e594–e605.

Sherman, F., Fink, G. R., & Hicks, J. B. (1986). *Methods in yeast genetics: A laboratory course manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Sofras, D., Carolus, H., Subotić, A., Lobo Romero, C., Ennis, C. L., Hernday, A. D., Nobile, C. J., Rybak, J. M., & Van Dijck, P. (2025). A comparative evaluation of CRISPR-Cas9 allele editing systems in *Candida auris*: challenging research in a challenging bug. *bioRxiv*.

Stecher, G., Suleski, M., Tao, Q., Tamura, K., & Kumar, S. (2025). MEGA 12: Cross-platform release for macOS and Linux operating systems. *Journal of Molecular Evolution*.

Thewes, S. (2014). Calcineurin-Crz1 signaling in lower eukaryotes. *Eukaryotic Cell*, 13(6), 694–705.

Varadi, M., Anyango, S., Deshpande, M., Nair, S., Natassia, C., Yordanova, G., ... Velankar, S. (2022). AlphaFold Protein Structure Database: massively expanding the structural coverage of protein-sequence space with high-accuracy models. *Nucleic Acids Research*, 50(D1), D439–D444.

World Health Organization. (2022). *WHO fungal priority pathogens list to guide research, development and public health action*. World Health Organization.

Anexos

Plásmidos correspondientes al método CRISPR, HIS-FLP.

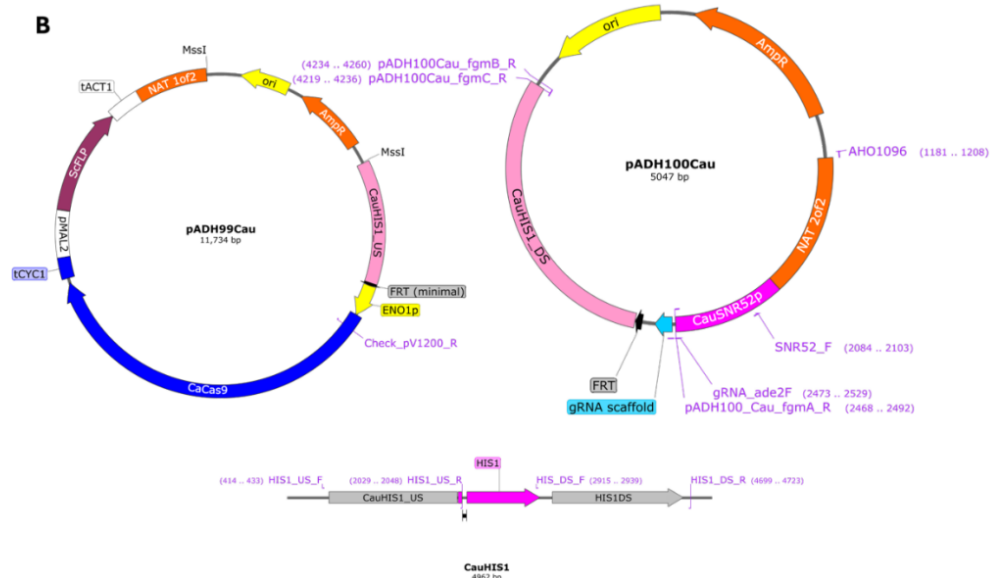


Figura A1. Sistema de edición CRISPR-Cas9 HIS-FLP empleado en *Candida auris*. Se muestran los plásmidos pADH99Cau que aporta la nucleasa Cas9 (promotor CauENO1), la recombinasa FLP, la primera mitad del marcador de resistencia a nourseotricina (NAT1) y la región homóloga *upstream* de HIS1 y pADH100Cau y la segunda mitad de NAT1, promotor *CauSNR52*, *scaffold* del ARN guía y región homóloga *downstream* de HIS1, junto con el cassette de expresión del ARNg (fragmentos A, B y C). Elaboración mediante Vector NTI.

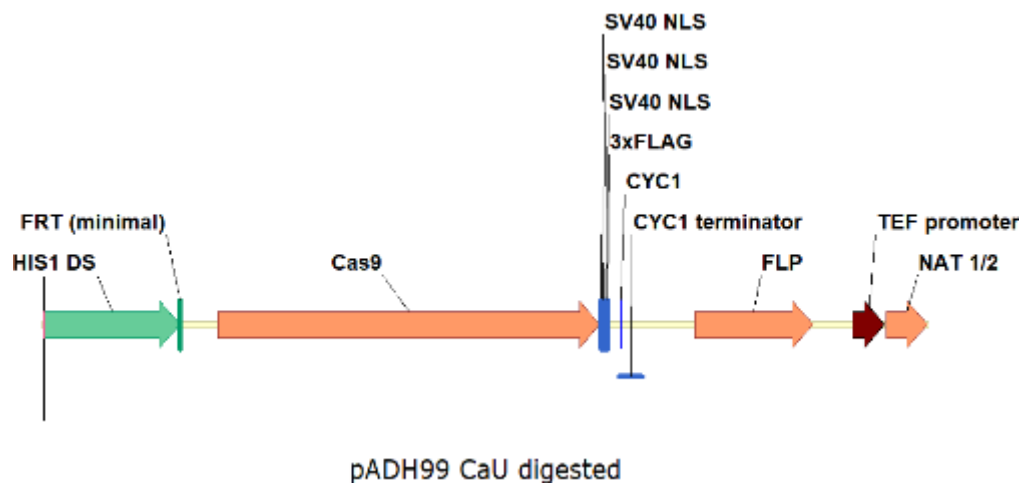


Figura A1.1. Linealización del plásmido pADH99Cau procedente del sistema de edición CRISPR-Cas9 HIS-FLP.

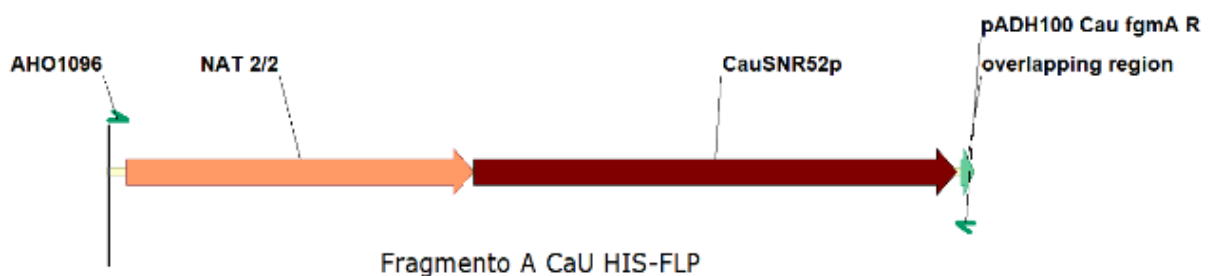


Figura A1.2. Linealización del plásmido pADH100Cau correspondiente al fragmento A, procedente del sistema de edición CRISPR-Cas9 HIS-FLP.

