



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

**POSGRADO EN CIENCIAS EN BIOLOGIA MOLECULAR**  
**Análisis de las secuencias que regulan el procesamiento**  
**del transcrito del gen *a1* de *Candida glabrata***

Tesis que presenta

**Alba Saucedo Fuentes**

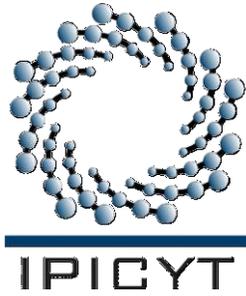
Para obtener el grado de

**Maestro(a) en Ciencias en Biología Molecular**

**Director de la Tesis:**

**Dra. Irene Beatriz Castaño Navarro**

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



## Constancia de aprobación de la tesis

La tesis “**Análisis de las secuencias que regulan el procesamiento del transcrito del gen *a1* de *Candida glabrata***” presentada para obtener el Grado de de Maestro(a) en Ciencias en Biología Molecular fue elaborada por **Alba Saucedo Fuentes** y aprobada el **01 de Noviembre de 2011** por los suscritos, designados por el Colegio de Profesores de la División de Biología Molecular del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C.

---

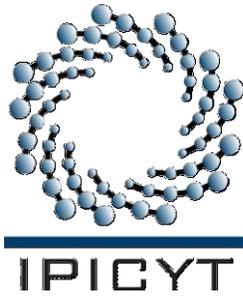
Dra. Irene Beatriz Castaño Navarro

---

Dra. Margarita Rodríguez y Domínguez Kessler

---

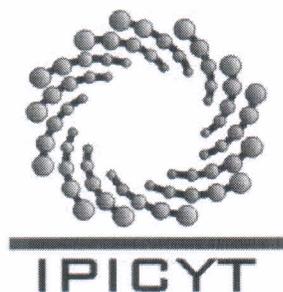
Dr. Samuel Lara González



## **Créditos Institucionales**

Esta tesis fue elaborada en el Laboratorio de Microbiología Molecular de la División de Biología Molecular del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C., bajo la dirección de la Dra. Irene Castaño Navarro, apoyada por el proyecto No. CB-2005-48304.

Durante la realización del trabajo el autor recibió una beca académica del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (No. de registro 230936) y del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A. C.



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

## Acta de Examen de Grado

El Secretario Académico del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C., certifica que en el Acta 089 del Libro Primero de Actas de Exámenes de Grado del Programa de Maestría en Ciencias en Biología Molecular en la opción de Biología Molecular está asentado lo siguiente:

En la ciudad de San Luis Potosí a los 22 días del mes de noviembre del año 2011, se reunió a las 18:00 horas en las instalaciones del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C., el Jurado integrado por:

<b>Dr. Samuel Lara González</b>	<b>Presidente</b>	<b>IPICYT</b>
<b>Dra. Margarita Rodríguez y Domínguez Kessler</b>	<b>Secretario</b>	<b>UASLP</b>
<b>Dra. Irene Beatriz Castaño Navarro</b>	<b>Sinodal</b>	<b>IPICYT</b>

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

**MAESTRA EN CIENCIAS EN BIOLOGÍA MOLECULAR**

sustentó la C.

**Alba Saucedo Fuentes**

sobre la Tesis intitulada:

*Análisis de las secuencias que regulan el procesamiento del transcrito del gen *al* de *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 20:30 horas, procediendo a la firma del Acta los integrantes del Jurado. Dando fe 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 22 días del mes de noviembre de 2011.

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

**Dr. Marcial Bonilla Marín**  
Secretario Académico



# Dedicatoria

A Natalia Maruri

# Agradecimientos

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología

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

A la Dra. Irene Castaño por la dirección en este trabajo.

A la Dra. Margarita Rodríguez y Domínguez Kessler y al Dr. Samuel Lara por las aportaciones en el escrito.

# Contenido

Constancia de aprobación de la tesis	ii
Créditos institucionales	iii
Acta de examen	iv
Dedicatorias	v
Agradecimientos	vi
Contenido	vii
Lista de tablas	ix
Lista de figuras	x
Abreviaturas	xi
Resumen	xii
Abstract	xiii
<b>1. Resumen</b>	<b>1</b>
<b>2. Introducción</b>	<b>2</b>
<b>3. Resultados</b>	<b>5</b>
<i>La proteína <b>a1</b> se ubica en el núcleo.</i>	<b>8</b>
<i>La distancia entre el ORF del gen <b>a1</b> y la secuencia flanqueante 3' es importante para el procesamiento del transcrito primario del gen <b>a1</b></i>	<b>12</b>

<i>La expresión de la fusión traduccional <b>a1</b>::GFP MTL1 de manera extracromosomal requiere de secuencias importantes presentes en el cromosoma necesarias para el procesamiento del mensajero <b>a1</b></i>	12
<i>El transcrito <b>a1</b> del locus MTL2 se procesa en muy poca cantidad</i>	13
<b>4.DISCUSION</b>	18
<b>5.Materiales y métodos</b>	25
<b>6. Referencias</b>	30
<b>7. Datos suplementarios</b>	32

## Lista de Tablas

<b>Tabla 1.</b> Fluorescencia emitida por la proteína <b>a1::GFP</b> a partir de las fusiones <b>a1::GFP</b> con secuencias flanqueantes 5' y 3' de los <i>loci</i> <i>MTL1</i> y <i>MTL2</i> integradas al cromosoma y episomales.	17
<b>Tabla 2.</b> Oligonucleótidos utilizados en este estudio.	33
<b>Tabla 3.</b> Plásmidos utilizados y generados en este estudio.	34
<b>Tabla 4.</b> Cepas utilizadas y generadas en este estudio.	36

## Lista de figuras

<u>Figura 1</u>	Regiones idénticas entre <b>a1</b> en <i>MTL1</i> y <b>a1</b> en <i>MTL2</i> . El <i>ORF</i> del gen <b>a1</b> en <i>MTL1</i> es idéntico al de <i>MTL2</i> .	6
<u>Figura 2</u>	Esquema de integración de las fusiones traduccionales <b>a1::GFP</b> en los <i>loci MTL1</i> y <i>MTL2</i> .	7
<u>Figura 3</u>	Esquema de las fusiones traduccionales de expresión extracromosomales <b>a1::GFP</b> <i>MTL1</i> y <b>a1::GFP</b> <i>MTL2</i> .	9
<u>Figura 4</u>	La proteína <b>a1</b> colocaliza con el núcleo cuando el gen se transcribe a partir del <i>locus MTL1</i> .	10
<u>Figura 5</u>	Es detectable la proteína <b>a1</b> cuando la transcripción se efectúa a partir del <i>locus MTL1</i> .	11
<u>Figura 6</u>	La secuencia flanqueante 3' es determinante importante para el procesamiento completo del RNAm del gen <b>a1</b> .	14
<u>Figura 7</u>	La fase logarítmica de crecimiento en medio mínimo, representa un ambiente propicio para procesar eficientemente la fusión traduccional a partir de <i>MTL1</i> .	16
<u>Figura 8</u>	Las secuencias clonadas, que flanquean la fusión traduccional <b>a1::GFP</b> en el plásmido replicativo,	16
<u>Figura 9</u>	Existen señales desconocidas en que determinan el procesamiento del RNA mensajero <b>a1</b> .	24

## Abreviaturas

(por sus siglas en inglés)

<b>CAA</b>	<u>C</u> asamino <u>A</u> acids
<b>FRT</b>	<u>F</u> lp <u>R</u> ecombination <u>T</u> argets
<b>GFP</b>	<u>G</u> reen <u>F</u> luorescent <u>P</u> rotein
<b>hph</b>	hygromycin <u>p</u> hosphotransferase
<b>MTL</b>	<u>m</u> ating type- <u>l</u> ike locus
<b>ORF</b>	<u>O</u> pen <u>R</u> eading <u>F</u> rame
<b>PGK1</b>	3- <u>P</u> hospho <u>G</u> lycerate <u>K</u> inase
<b>RFU</b>	<u>R</u> elative <u>F</u> luorescence <u>U</u> nits
<b>UTR</b>	<u>U</u> ntranslated <u>R</u> egion
<b>YPD</b>	<u>Y</u> east extract- <u>P</u> eptone- <u>D</u> extrose
<b>5'ss</b>	5' <u>S</u> plice <u>S</u> ite
<b>3'ss</b>	3' <u>S</u> plice <u>S</u> ite

## Resumen

### “Análisis de las secuencias que regulan el procesamiento del transcrito del gen *a1* de *Candida glabrata*. “

*Candida glabrata* posee tres loci *MTL* que codifican genes ortólogos a los que confieren identidad celular sexual en *Saccharomyces cerevisiae*. Los loci *MTL* y los ortólogos de *S. cerevisiae* (*MAT*, *HML* y *HMR*) codifican los genes *a1*,  $\alpha 1$  y  $\alpha 2$  que dan lugar a proteínas con actividad de factores transcripcionales. En *S. cerevisiae* y *C. glabrata* el gen *a1* posee dos intrones que se escinden del transcrito primario para dar lugar al producto protéico. En nuestro laboratorio determinamos que en *C. glabrata*, el procesamiento parcial y completo del transcrito solo ocurre cuando este se origina a partir del locus *MTL1*, pero no cuando se transcribe a partir de *MTL2*, aún cuando ambos *ORFs* del gen *a1* son idénticos. En este trabajo analizamos la participación de las secuencias flanqueantes del gen *a1* en el procesamiento diferencial del transcrito en *C. glabrata*, mediante fusiones traduccionales del gen *a1* de *MTL1* con la proteína GFP, y flanqueado con las secuencias al 5' y al 3' provenientes de *MTL1* o de *MTL2*. Encontramos que se detecta una mayor producción de fluorescencia cuando la fusión *a1::GFP* está flanqueada por las secuencias propias de *MTL1* que cuando está flanqueada por las de *MTL2*. Lo que sugiere que el gen *a1* expresado a partir de *MTL2* no está silenciado y no se procesa posiblemente debido a una estructura más compacta de la cromatina en este locus.

PALABRAS CLAVE: *Candida glabrata*, gen *a1*, procesamiento alternativo, secuencias flanqueantes 5' y 3', *MTL1*, *MTL2*.

## Abstract

### “Analysis of the role of the sequences flanking the *a1* gene in the processing control of the *a1* transcript in *C. glabrata*.”

*Candida glabrata* contains three mating type-like loci (*MTL*), which contain orthologous genes to those that confer sexual cell-type identity in *Saccharomyces cerevisiae*. The three *MTL* loci, like the orthologous loci in *S. cerevisiae* *MAT*, *HML* and *HMR*, contain the *a1*,  $\alpha 1$  and  $\alpha 2$  genes that encode transcription factors. The *a1* gene in both species contains two introns that have to be spliced out from the primary transcript in order to produce a functional *a1* protein. We found that *C. glabrata* partial and complete processing of the primary *a1* transcript, only occurs when it is transcribed from *MTL1 locus*, but not from *MTL2*, even though both *ORFs* are identical. In this paper we analyzed the participation of the sequences flanking the *a1* gene in the differential processing of the *a1* transcript in *C. glabrata*. To this end we constructed translational fusions of the *a1* gene (from *MTL1*) with GFP and flanked by 5' and 3' *MTL1* or *MTL2* sequences. We found that fluorescence of GFP is increased significantly when the fusion is flanked by sequences from the *MTL1* locus compared to when the fusion is flanked by *MTL2* sequences. Our data suggests that *a1* gene from *MTL2* is not silenced and not processed possibly because of a more compact chromatin structure at this locus.

Key words: *Candida glabrata*, *a1* gene, differential processing, flanking 5' and 3' sequences, *MTL1*, *MTL2*.

# Análisis de las secuencias que regulan el procesamiento del transcrito del gen *a1* de *Candida glabrata*.

ALBA SAUCEDO FUENTES, IRENE CASTAÑO \*

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

\* Autor de correspondencia: icastano@ipicyt.edu.mx, Fax: (52) 444-834-2039

## Resumen

*Candida glabrata* posee tres loci *MTL* que codifican genes ortólogos a los que confieren identidad celular sexual en *Saccharomyces cerevisiae*. Los loci *MTL* y los ortólogos de *S. cerevisiae* (*MAT*, *HML* y *HMR*) codifican los genes *a1*,  $\alpha 1$  y  $\alpha 2$  que dan lugar a proteínas con actividad de factores transcripcionales. En *S. cerevisiae* y *C. glabrata* el gen *a1* posee dos intrones que se escinden del transcrito primario para dar lugar al producto protéico. En nuestro laboratorio determinamos que en *C. glabrata*, el procesamiento parcial y completo del transcrito solo ocurre cuando este se origina a partir del locus *MTL1*, pero no cuando se transcribe a partir de *MTL2*, aún cuando ambos *ORFs* del gen *a1* son idénticos. En este trabajo analizamos la participación de las secuencias flanqueantes del gen *a1* en el procesamiento diferencial del transcrito en *C. glabrata*, mediante fusiones traduccionales del gen *a1* de *MTL1* con la proteína GFP, y flanqueado con las secuencias al 5' y al 3' provenientes de *MTL1* o de *MTL2*. Encontramos que se detecta una mayor producción de fluorescencia cuando la fusión *a1::GFP* está flanqueada por las secuencias propias de *MTL1* que cuando está flanqueada por las de *MTL2*. Lo que sugiere que el gen *a1* expresado a partir de *MTL2* no está silenciado y no se procesa posiblemente debido a una estructura más compacta de la cromatina en este locus.

**PALABRAS CLAVE:** *Candida glabrata*, gen *a1*, procesamiento alternativo, secuencias flanqueantes 5' y 3', *MTL1*, *MTL2*.

## Introducción

*Candida glabrata* es la segunda especie más frecuente del género *Candida* que forma parte de la flora normal humana, solo después de *C. albicans* (Fidel, et al., 1999). Esta levadura es filogenéticamente más cercana a *S. cerevisiae*, pero comparte características similares a *C. albicans* entre las que destaca su capacidad patogénica (Barns, et al., 1991). *C. glabrata* es el comensal más prevalente en adultos mayores (Lockhart, et al., 1999). Además del estado inmunocomprometido del hospedero, la evolución de una infección por *C. glabrata* se debe en cierta medida a su resistencia innata a los azoles (Fortun, et al., 1997). En condiciones de crecimiento limitado de nutrientes por tiempos prolongados, *C. glabrata* lleva a cabo una transición de la forma de levadura a pseudohifa (Csank & Haynes, 2000). *C. glabrata*, *S. cerevisiae*, y *C. albicans* se clasifican de acuerdo con el tipo de genes de apareamiento expresados en determinada condición y estadio celular. La levadura modelo *S. cerevisiae* posee genes de apareamiento en los loci *HML*, *HMR* y *MAT*. Los dos primeros están silenciados, mientras que el locus *MAT* se encuentra transcripcionalmente activo. El locus *MAT* puede expresar información tipo **a** (genotipo *MATa*), es decir, se expresa el gen **a1** o bien se expresa información  $\alpha$  contenida en los genes  $\alpha1$  y  $\alpha2$  (genotipo *MAT $\alpha$* ). Sin embargo, no expresa información **a** e información  $\alpha$  al mismo tiempo. Una levadura *MATa* puede aparearse con una levadura *MAT $\alpha$* . Al igual que *S. cerevisiae*, *C. albicans* y *C. glabrata* poseen genes ortólogos a los genes del locus *MAT*, y están codificados en los loci denominados *MTL* por sus siglas en inglés mating type-like locus. Debido a su naturaleza diploide, solo las levaduras homocigotas de *C. albicans* *MTLa* o *MTL $\alpha$* , pueden aparearse in vivo (Hull, et al., 2000) e in vitro (Magee & Magee, 2000). En *C. glabrata* se han identificado tres loci *MTL*: donde *MTL1* puede contener información tipo **a** o tipo  $\alpha$  según la cepa analizada, *MTL2* generalmente contiene información tipo **a** y el locus *MTL3* de tipo  $\alpha$ . Dentro de su locus correspondiente, los genes de apareamiento están separados por una región promotora intergénica compartida (Srikantha, et al., 2003). El gen **a1** de *S. cerevisiae* posee dos intrones; de éstos, el intrón localizado

cerca de la secuencia que codifica la región carboxilo terminal puede ser escindido o bien ser retenido dentro de la secuencia del transcrito y dar como producto dos variantes de procesamiento alternativo, la primera codifica para la proteína **a1** mientras que la segunda origina una versión más corta de **a1** ya que dentro de la secuencia del intrón se localizan codones de paro. Sin embargo, mediante el empleo de fusiones traduccionales para evaluar el silenciamiento del *locus MAT* y el transcrito del gen **a1**, se ha demostrado que sólo el transcrito del gen **a1** generado por el procesamiento de ambos intrones (procesado completamente) da lugar a una proteína con actividad funcional (Ner & Smith, 1989). En células diploides la proteína **a1** de *S. cerevisiae* forma un heterodímero junto con  $\alpha 2$ . Este heterodímero posee actividad represora sobre la expresión de genes que determinan la identidad de tipo sexual celular. Anteriormente en nuestro grupo se evaluó el grado de silenciamiento a lo largo de las regiones cromosómicas *MTL2* y *MTL3* de *C. glabrata* mediante inserciones del gen reportero *URA3*. El locus *MTL2* es activo transcripcionalmente lo que difiere del locus ortólogo *HMR* de *S. cerevisiae*. El locus *MTL3* está mayoritariamente silenciado (Ramirez-Zavaleta, *et al.*, 2010). Así mismo se generó una batería de mutantes nulas sencillas, dobles y una triple mutante nula de cada locus *MTL*, para analizar el nivel de expresión, mediante RT-PCR del gen **a1** a partir de los loci *MTL1* y *MTL2*. Se determinó que *C. glabrata* expresa un transcrito no procesado del gen **a1** cuando la transcripción se origina del locus *MTL2*, mientras que se procesa de manera parcial y completa cuando se transcribe a partir del locus *MTL1*. El procesamiento diferencial del transcrito del gen **a1** sucede a pesar de que ambos genes son idénticos en sus *ORFs* y 500 pb en la region 5' flanqueante (excepto por dos cambios en la posición -375 y -360). Hacia la region 3' flanqueante ambas secuencias son idénticas hasta 370 pb río abajo a partir del codón de paro (Ramirez-Zavaleta, *et al.*, 2010).

Alrededor de 1% de los genes de *C. glabrata* contienen intrones. En *S. cerevisiae* el 5% del total de los genes también poseen intrones. En las levaduras, la mayoría de genes que contienen intrones, poseen solo uno. Estos genes interrumpidos por intrones tienden a ser altamente expresados y regulados.

Los intrones de levaduras son cortos, el de mayor longitud contiene 1,002 nucleótidos. De los intrones presentes en levaduras, los presentes en genes para proteínas ribosomales son más largos que aquellos que se encuentran en genes que codifican para proteínas no ribosomales. Los genes que contienen intrones ocupan un tercio de la transcripción celular total; tan solo 102 de los 139 genes que codifican para proteínas ribosomales (RPGs) contienen intrones (Pleiss, *et al.*, 2007).

Respecto a las secuencias que conforman a los intrones de levaduras, se puede decir que están muy conservadas, estas son: El branch point, los sitios de splicing al 5' y 3' o 5'ss y 3'ss y regiones ricas en polipirimidina (Schwartz, *et al.*, 2008).

El posicionamiento de nucleosomas y modificación de histonas mediados por la RNA polimerasa II parecen ser determinantes en la remoción y procesamiento alternativo de intrones. La ocupación de nucleosomas a lo largo de los exones es mayor respecto a la de los intrones (Andersson, *et al.*, 2009).

Las modificaciones postraduccionales como acetilación, metilación, fosforilación y ubiquitinación en los extremos amino-terminal de las histonas se presentan preferentemente en los nucleosomas presentes en los exones y los bordes exón-intrón que en los de los intrones. La trimetilación H3K4 es determinante en el procesamiento alternativo (Schwartz & Ast, 2010). La asociación del snRNA U1 y de los factores reguladores de procesamiento alternativo de la familia de proteínas SR, es dependiente de cambios en la estructura de la cromatina (Schwartz, *et al.*, 2009). Dichos mecanismos podrían ser dirigidos por información contenida a lo largo de la secuencia del DNA que flanquea el transcrito **a1** en *MTL1* y no para el que proviene de *MTL2*. Mediante fusiones traduccionales del gen **a1** con la proteína verde fluorescente GFP, analizamos la posible participación de las secuencias o regiones flanqueantes al gen **a1**, al 5' y al 3' o RFL 5' y RFL3', tanto de *MTL1* como *MTL2*, en el procesamiento del pre-RNA<sub>m</sub> de **a1**. El transcrito del gen **a1** se procesa completamente a partir del *locus MTL1* y es clara la detección de la proteína **a1::GFP** en el núcleo celular tanto en fase estacionaria de

crecimiento en medio rico YPD como durante la fase logarítmica en medio mínimo. A partir del locus *MTL2* no detectamos claramente procesamiento del transcrito *a1* indirectamente mediante la localización celular la proteína *a1::GFP*.

## Resultados

Anteriormente en nuestro grupo de trabajo, mediante RT-PCR, observamos procesamiento parcial y completo del transcrito del gen *a1* a partir del locus *MTL1* y una falta de procesamiento a partir de *MTL2*, durante la fase estacionaria de crecimiento en medio rico YPD (Ramirez-Zavaleta, *et al.*, 2010) .

Las secuencias flanqueantes al 5' y 3' del *ORF* del gen *a1* en los *loci MTL1* y *MTL2*, pueden estar determinando el procesamiento diferencial del transcrito primario *a1*, es decir; que estas secuencias flanqueantes, contengan elementos que dirijan la remoción de ambos intrones del RNA mensajero transcrito a partir del *locus MTL1* y participen o influyan en la falta de procesamiento del RNA mensajero del mismo gen transcrito a partir del *locus MTL2*.

Mediante fusiones traduccionales en el extremo carboxilo-terminal del *ORF* del gen *a1* de *MTL1* con el *ORF* que codifica para la proteína GFP o verde fluorescente, flanqueadas por las secuencias al 5' y 3' provenientes de *MTL1* o *MTL2*, estudiamos la influencia de estas secuencias flanqueantes en el procesamiento diferencial del RNA mensajero del gen *a1*, como se describe en los siguientes apartados

La construcción de la fusión *a1::GFP* a partir del locus *MTL1*, consideró a partir de - 641 pb de la secuencia flanqueante 5' hasta 699 pb después del codón de paro (Fig. 2A y Fig. 1 Datos suplementarios). La fusión *a1::GFP* a partir del locus *MTL2* consideró a partir de -637pb de la secuencia flanqueante 5' hasta 481pb después del codón de paro de la secuencia flanqueante 3' (Fig. 2B)

Las fusiones traduccionales se integraron en los *loci MTL1* y *MTL2* en la cepa *mtl(1,2,3)Δ* (CGM531) de *C. glabrata* por doble recombinación homóloga.

Figura 1.

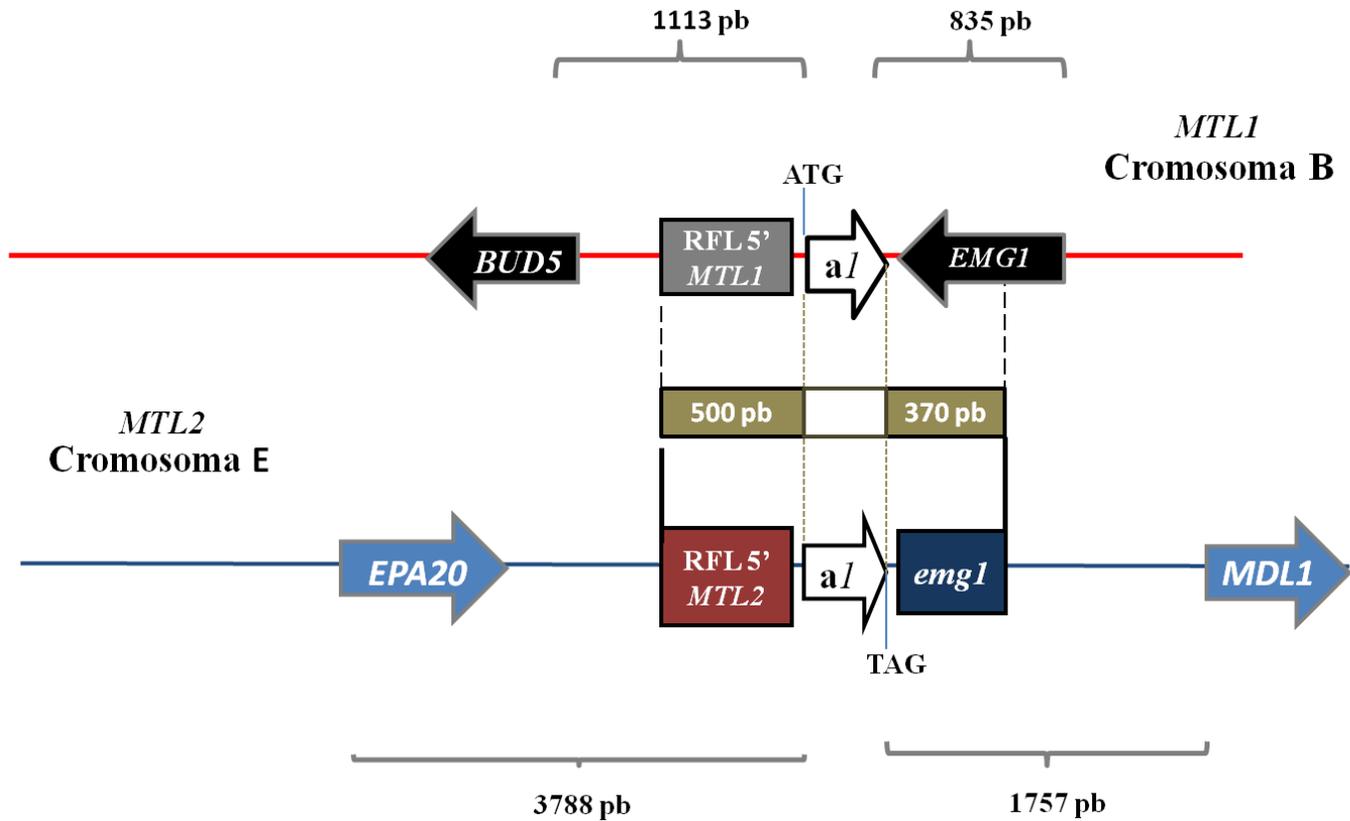


Figura 1. Regiones idénticas entre *a1* en *MTL1* y *a1* en *MTL2*. El ORF del gen *a1* en *MTL1* es idéntico al de *MTL2*. Hay una identidad 500 pb hacia la región flanqueante 5' (RFL 5'), excepto por dos cambios en la posición -375 y -360. Hacia la región flanqueante 3' (RFL 3') ambas secuencias son idénticas hasta 370 pb río abajo a partir del codón de paro y abarcan en *MTL2* la secuencia completa de un fragmento del gen *EMG1* adyacente, mientras que en *MTL1* se abarca parte de la secuencia del mismo gen que se encuentra completo en este locus. El esquema de la región *MTL1* se invirtió con respecto a la orientación real en el cromosoma B para poder mostrar directamente las regiones homólogas en la misma orientación relativa.

**Figura 2.**

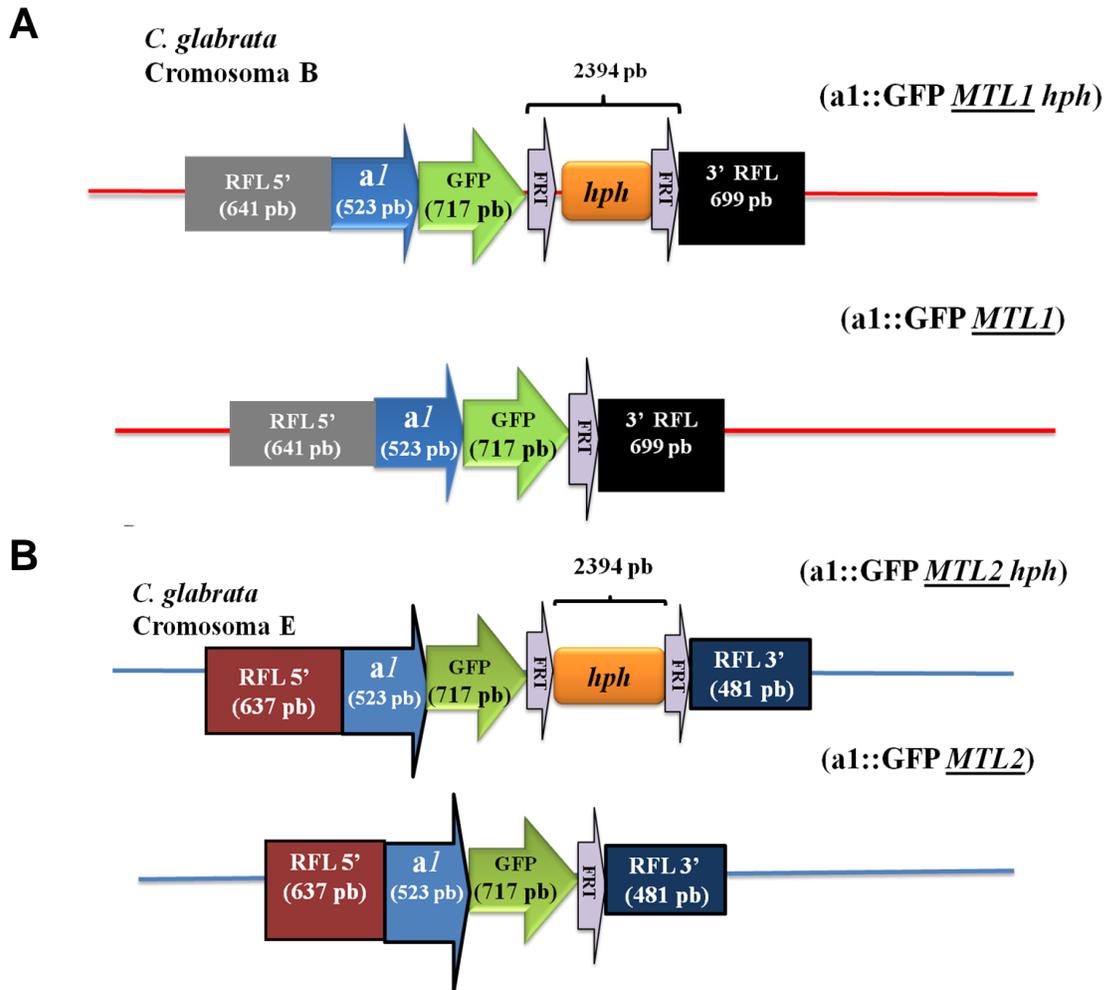


Figura2. Esquema de integración de las fusiones traduccionales *a1::GFP* en los *loci MTL1* y *MTL2*.

- A) Por doble recombinación homóloga se integró la fusión traduccional *a1::GFP MTL1 hph* en el *locus MTL1* del cromosoma B de *C. glabrata* (cepa CGM1144 ). Al escindir el cassette de resistencia (*hph*) se generan cepas *a1::GFP MTL1* integrantes de la fusión traduccional *a1::GFP* (cepa CGM 1366).
- B) De la misma manera se integró la fusión *a1::GFP MTL2 hph* en el *locus MTL2* cromosoma E (cepa CGM 1364) . La escisión de *hph*, coloca, a la fusión traduccional *a1::GFP MTL2*, cerca de su RFL3' (cepa CGM 1366).

Además ambas fusiones traduccionales **a1::GFP** flanqueadas por las secuencias 5' y 3' provenientes de *MTL1* o *MTL2* se clonaron en el vector replicativo *CEN/ARS* y se transformaron por separado en el fondo de la cepa CGM531 (Fig 3 y Tabla 3 Datos suplementarios).

*La proteína a1 se ubica en el núcleo.*

Las cepas de *C. glabrata* que contienen las fusiones **a1::GFP** flanqueadas por las secuencias al 5' y 3' provenientes de *MTL1* o *MTL2* fueron analizadas mediante microscopía de fluorescencia. Cuando el transcrito se genera en el locus *MTL1*, la proteína **a1** se localiza en el núcleo, indicando procesamiento completo del mensajero a partir del locus *MTL1* (Fig 4A). La fluorescencia observada en la cepa con la fusión flanqueada por las secuencia al 5' y 3' a partir de *MTL2* es difusa y distribuida en toda la célula (Fig 4B).

Incluso la cepa parental *mtl(1,2,3)Δ* CGM531 y la cepa CGM514 (CGM1/pMC14 GFP::3' UTR) o control negativo de emisión de GFP (vector sin promotor), muestran una señal fluorescente detectable aún sin contener la fusión **a1::GFP** en el genoma (dato no mostrado); en cambio, el control positivo que consiste en la cepa parental transformada con un plásmido que contiene GFP que se transcribe a partir de un promotor fuerte ( $P_{CTA1}$ ), emite una fluorescencia muy elevada, estos valores son: 12,232 RFU en fase logarítmica y 7,556 RFU durante la fase estacionaria en medio rico YPD y de 10,416 RFU durante la fase logarítmica y 6426 RFU durante la fase estacionaria cuando el cultivo se lleva a cabo en medio mínimo.

Figura 3.

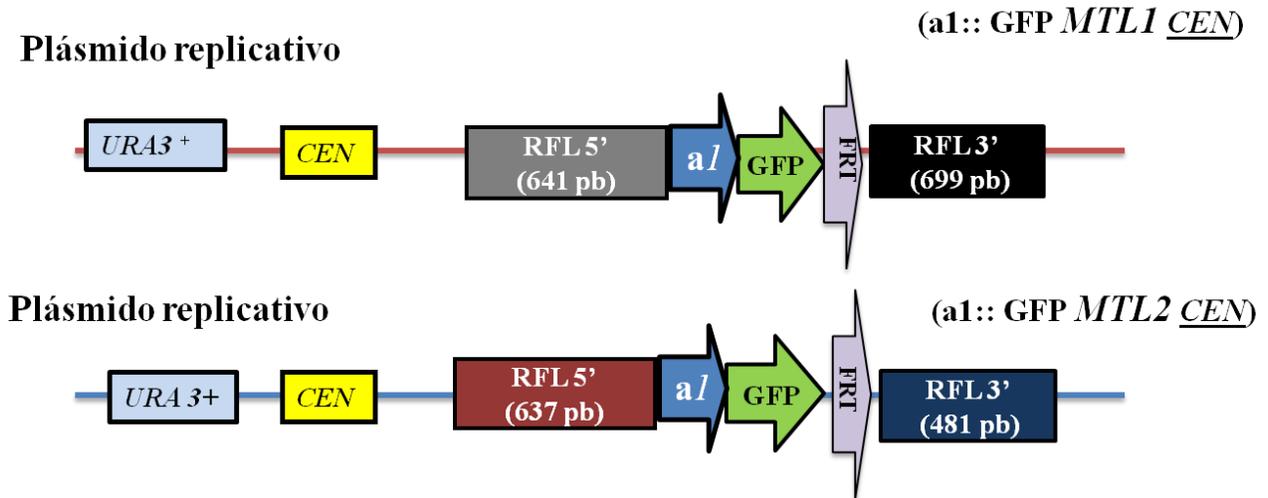


Figura 3. Esquema de las fusiones traduccionales de expresión extracromosomales *a1::GFP MTL1* y *a1::GFP MTL2*. Ambas fusiones traduccionales *a1::GFP MTL1* y *a1::GFP MTL2*, fueron subclonadas en el plásmido replicativo *CEN/ARS pRB2.0* para estudiar el procesamiento alternativo fuera del contexto cromosómico.

Figura 4.

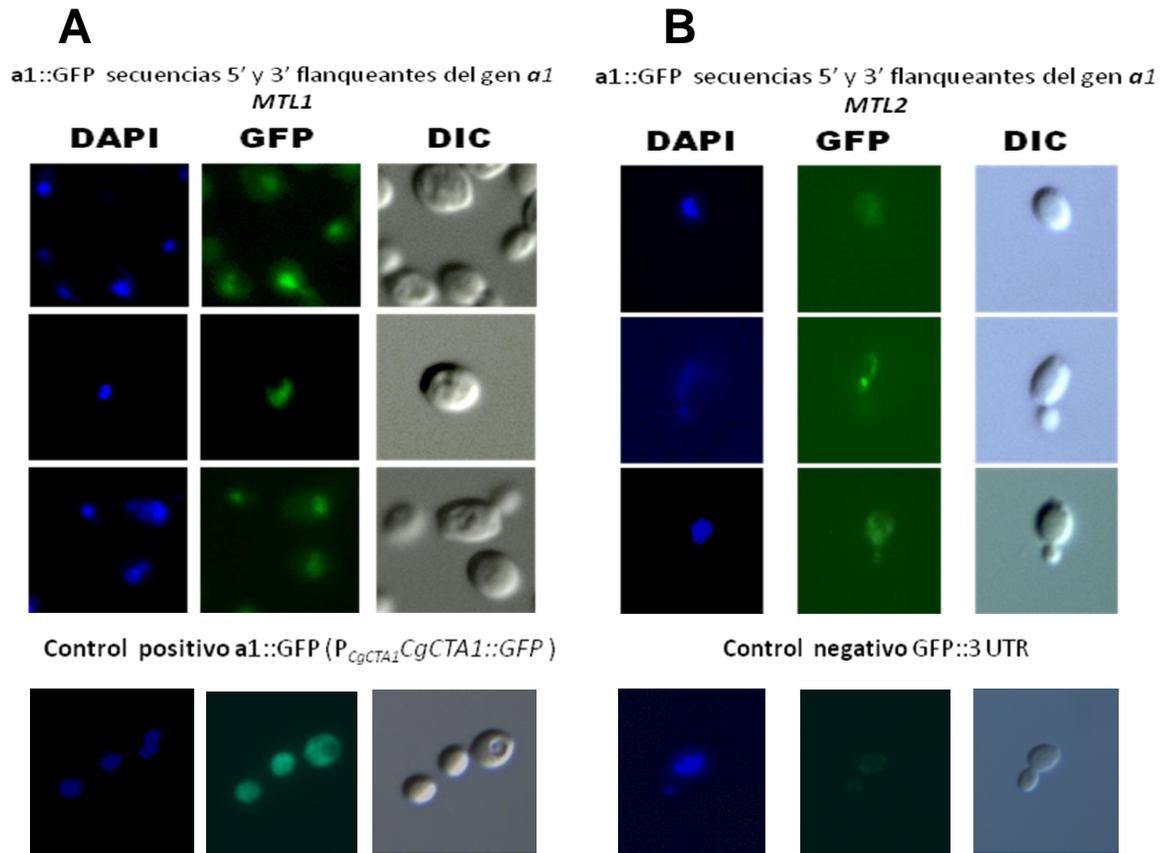


Figura 4. La proteína **a1** colocaliza con el núcleo cuando el gen se transcribe a partir del *locus MTL1*.

- A) Se muestran tres campos diferentes de la misma cepa, la proteína **a1** se localiza en el núcleo en la cepa CGM1298 (**a1**::GFP-*MTL1*), esto indica que hay un procesamiento completo del mensajero a partir del *locus MTL1*.
- B) Se muestran tres campos diferentes de la misma cepa, existe poca emisión de fluorescencia cuando la fusión **a1**::GFP se transcribe a partir del *locus MTL2*. Esta pequeña señal de fluorescencia parece no localizar con el núcleo y podría ser una auto-fluorescencia intrínseca de nuestra cepa de *C. glabrata* la cual muestra esta pequeña señal detectable aún sin contener la fusión **a1**::GFP en el genoma y sin teñir (Dato no mostrado).

**Figura 5.**

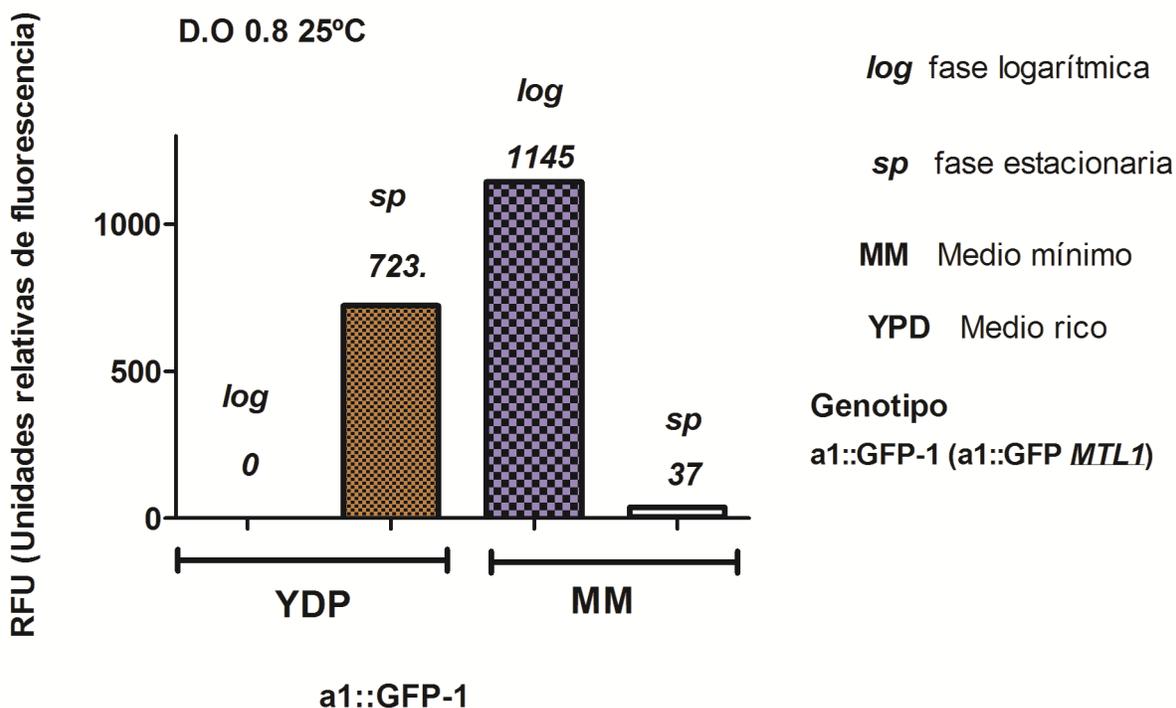


Figura 5. La proteína **a1** es detectable cuando la transcripción se efectúa a partir del locus *MTL1*. En una densidad celular correspondiente a 0.8, se detecta mayor emisión de GFP en fase logarítmica que en fase estacionaria en la cepa que contiene la fusión **a1::GFP** en *MTL1* (CGM1298). Esta emisión confirma la presencia del transcrito completamente procesado visto mediante RT-PCR (datos no mostrados y Ramirez-Zavaleta et al., 2010). La células correspondientes a la cepas del control positivo (plásmido que expresa GFP a partir del promotor de *CTA1*) emite 12232 RFU en medio rico YPD en fase logarítmica y 7556 RFU en fase estacionaria, en medio mínimo en fase logarítmica se detectan 10416 RFU y durante la fase estacionaria en medio mínimo 6426 RFU. Como control negativo se utilizó la cepa parental (*mtl(1,2,3)*Δ o CGM531) que emite cierta auto-fluorescencia (~2000 RFUs). La autofluorescencia emitida por la cepa parental se le restó a todas las mediciones de las demás cepas que contienen las fusiones. Todas las gráficas representan las medias obtenidas de más de tres cuantificaciones experimentales.

Cuantificamos la fluorescencia emitida por el número de células equivalente a una densidad óptica de 0.8 a 600 nm. Se cultivaron en medio rico YPD y medio mínimo las cepas que contienen las fusiones traduccionales integradas al cromosoma en *MTL1* y *MTL2*. Aquellas que contienen las fusiones en el plásmido *CEN/ARS* se cultivaron sólo en medio mínimo. Un mayor número de unidades relativas de fluorescencia (RFU) fueron detectadas en la fase logarítmica de crecimiento en medio mínimo en la cepa con la fusión *a1::GFP-1* o *a1::GFP MTL1* (Fig. 5). Tomamos como control positivo de emisión de fluorescencia a la cepa CGM473 (GCM1/pMC18) que contiene el gen GFP que se transcribe a partir del promotor fuerte de *CTA1* y como control negativo la emisión de autofluorescencia de la cepa parental CGM531 *mtl(1,2,3)Δ* (Tabla 3 Datos suplementarios). Todas las gráficas representan medias obtenidas de tres o más cuantificaciones realizadas.

*La distancia entre el ORF del gen a1 y la secuencia flanqueante 3' es importante para el procesamiento del transcrito primario del gen a1*

Comparamos la fluorescencia de la cepa con la fusión *a1::GFP MTL1 hph* y la fluorescencia de la cepa con la fusión *a1::GFP MTL1*, ambas cultivadas en medio rico YPD hasta fase estacionaria (Fig 6). El cassette de resistencia a higromicina o *hph* de la fusión *a1::GFP MTL1 hph* (Fig 2A) consiste de : 3' UTR del gen *CTA1*, el promotor del gen *PGK1*, el gen *hph* y el 3' UTR del gen *HIS3*. Determinamos que en fase estacionaria la cercanía de la secuencia flanqueante 3' permite un mayor procesamiento del transcrito *a1*. En fase logarítmica alejar la secuencia flanqueante 3' permite un mayor procesamiento del transcrito *a1* (Tabla 1).

*La expresión de la fusión traduccional a1::GFP MTL1 de manera extracromosomal requiere de secuencias importantes presentes en el cromosoma necesarias para el procesamiento del mensajero a1*

Transformamos las fusiones *a1::GFP MTL1 CEN* y *a1::GFP MTL2 CEN* en la cepa parental CGM531 (*mtl(1,2,3)Δ*). La fluorescencias emitida por la proteína *a1::GFP* a partir de las fusiones traduccionales *a1::GFP MTL1 CEN* y *a1::GFP MTL2 CEN* corresponde a la misma emisión de nuestro control negativo de fluorescencia.

Este resultado puede deberse a la falta de un elemento o secuencia no incluida en las secuencias flanqueantes ya sea al 5' o 3', que puede participar en conjunto con la maquinaria de splicing en el procesamiento del RNA mensajero **a1** y cuya participación puede estar presente cuando se realiza el experimento a partir de las fusiones traduccionales integradas en el cromosoma. La expresión episomal disminuye significativamente el procesamiento del transcrito del gen **a1** de manera que no se detecta fluorescencia a partir del plasmido. (Fig 8 A y Fig 8B).

*El transcrito **a1** del locus **MTL2** se procesa en muy poca cantidad*

La detección casi nula de fluorescencia de la proteína **a1** por parte de las cepas que contienen la fusión **a1::GFP** en **MTL2** integrada al cromosoma o fuera de este contexto, se debe al procesamiento menos eficiente del mensajero de la fusión **a1::GFP** en **MTL2** (Fig 7). La auto-fluorescencia intrínseca en la cepa parental *mtl(1,2,3) $\Delta$*  (CGM531) impide discernir, mediante microscopía de fluorescencia, una colocalización nuclear de la proteína **a1::GFP** en las cepas que contienen la fusión traduccional en **MTL2**.

Figura 6.

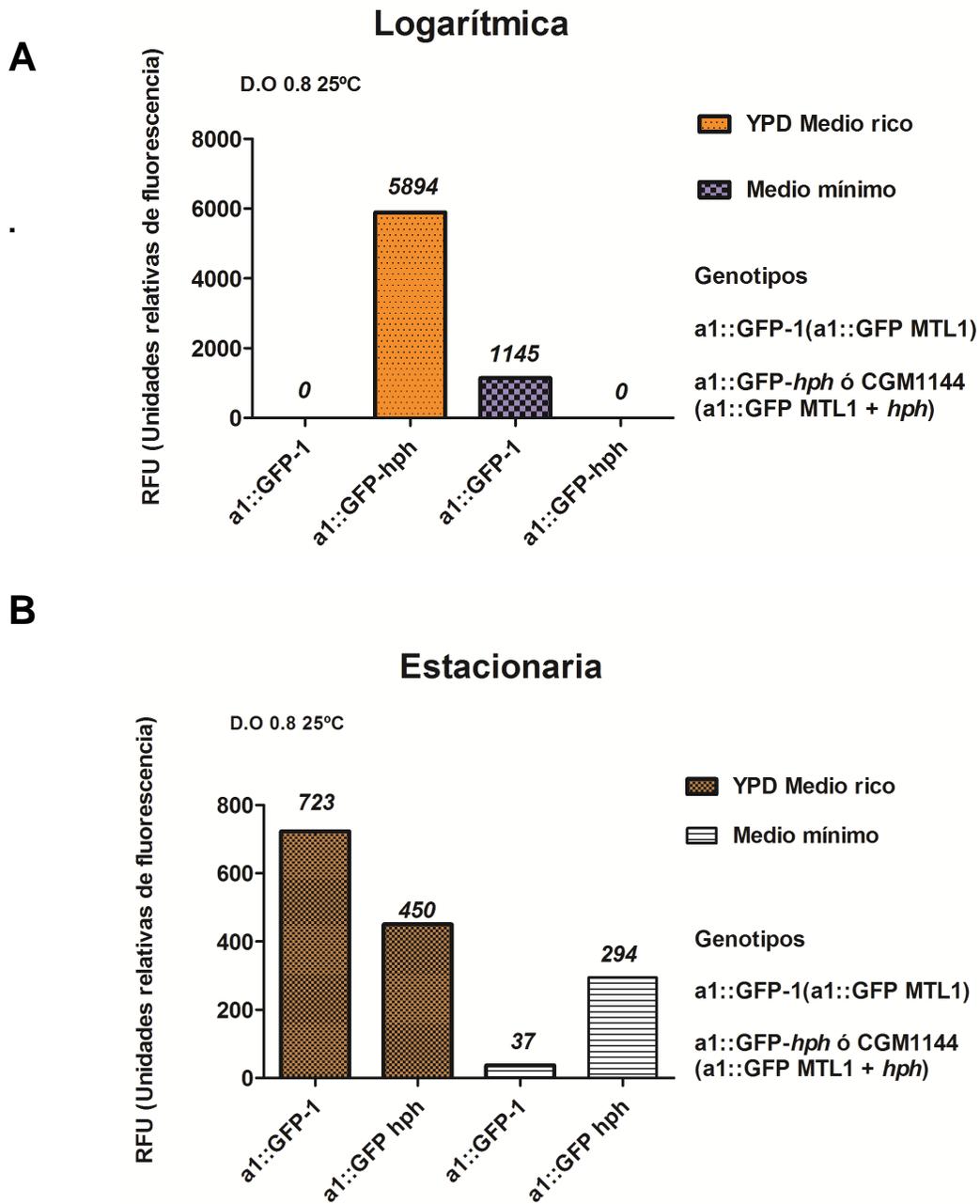
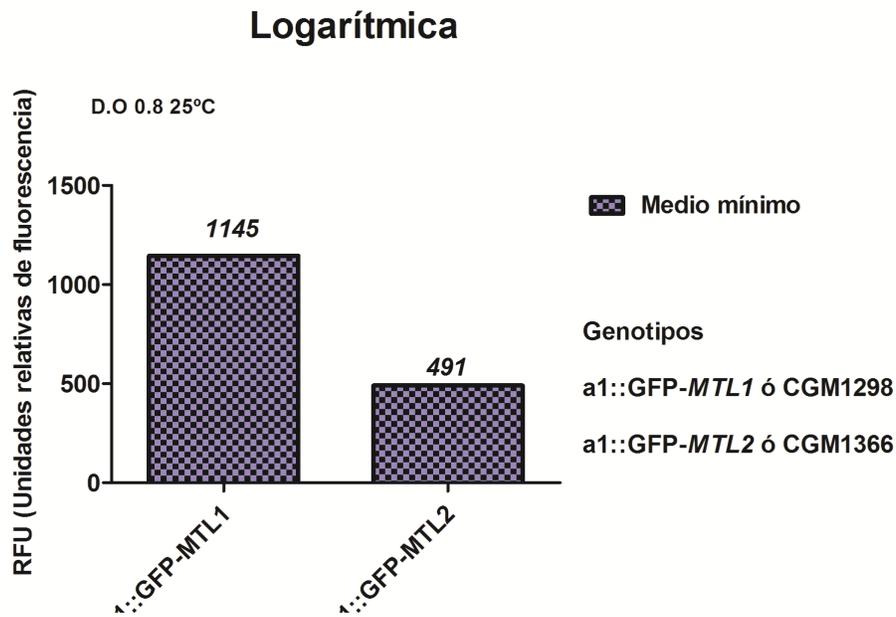


Figura 6. La secuencia flanqueante 3' es determinante importante para el procesamiento completo del RNAm del gen *a1*. La cepa *a1::GFP-hph* (CGM 1144) que contiene el gen de resistencia a higromicina (Fig 2A) fue incluida en la cuantificación de fluorescencia como control para evaluar la influencia de la cercanía de la secuencia 3' flanqueante en el procesamiento del transcrito *a1*. En fase estacionaria en medio rico YPD la cercanía de la secuencia 3' permite un mayor procesamiento del transcrito *a1*.

Figura 7.

**A**



**B**

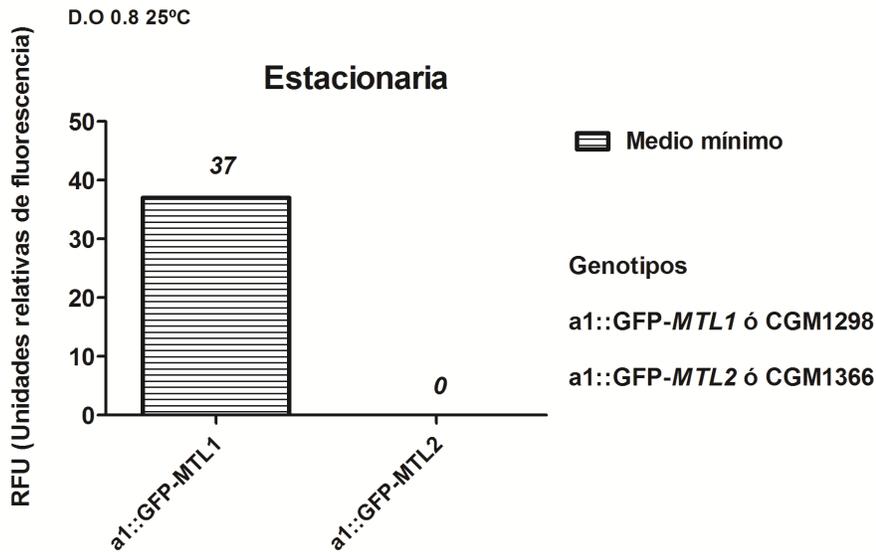


Figura 7. La fase logarítmica de crecimiento en medio mínimo, representa un ambiente propicio para procesar eficientemente la fusión traduccional a partir de *MTL1*.

La fusión tradicional *a1::GFP* en *MTL1* emite mayor fluorescencia en fase logarítmica en medio mínimo comparada con una menor fluorescencia detectada a partir de la fusión insertada en *MTL2*. Esta podría tratarse en parte, de auto-fluorescencia propia de la célula.

Figura 8.

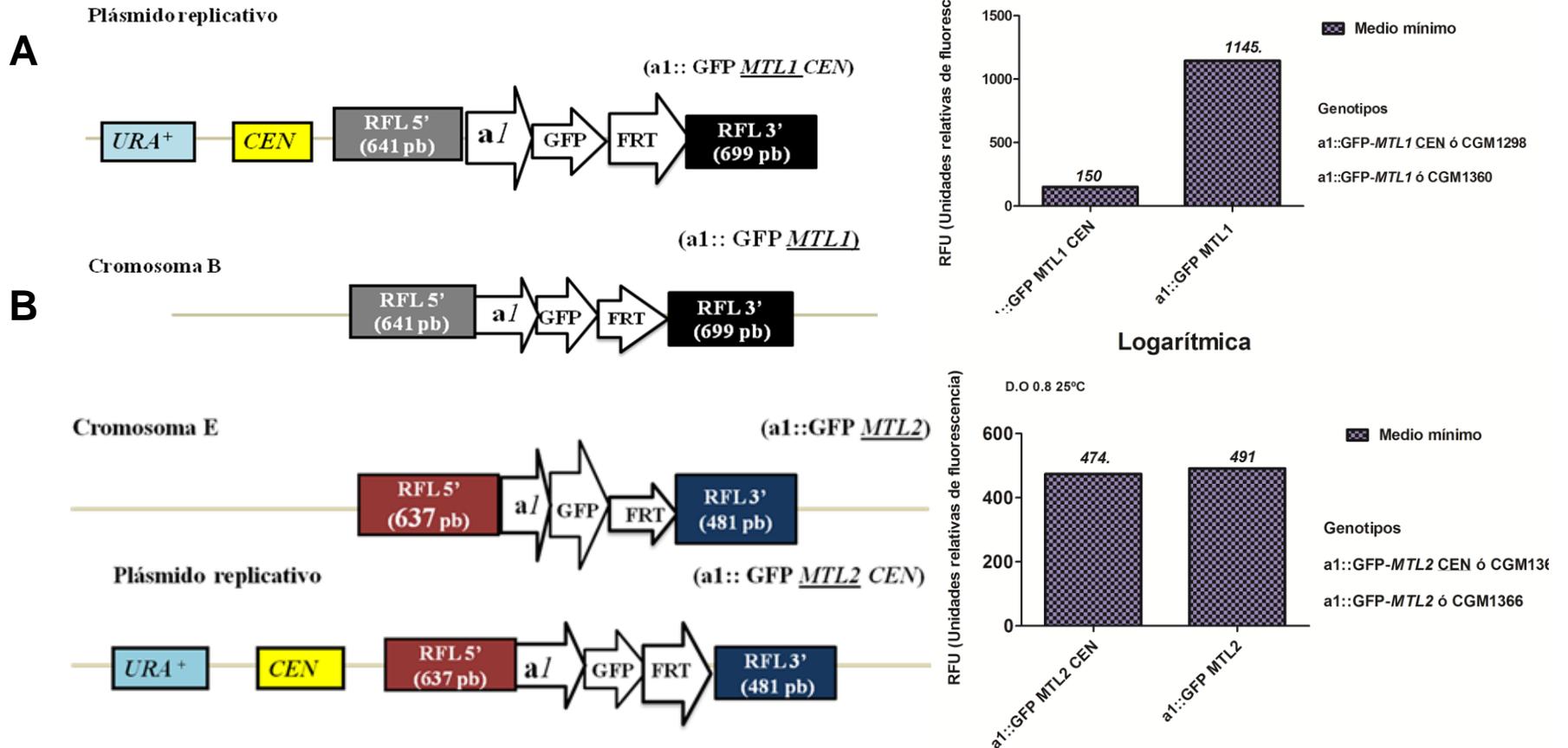


Figura 8. Las secuencias clonadas, que flanquean la fusión traduccional *a1::GFP* en el plásmido replicativo, no son suficientes para promover el procesamiento eficiente del transcrito *a1*. La fusión traduccional *a1::GFP* en el contexto cromosómico provee de las señales necesarias para llevar a cabo el procesamiento total del mensajero *a1* de *MTL1*, sin embargo, al colocar la fusión de manera episomal el procesamiento decae significativamente. La escasa emisión en la señal de GFP a partir de *MTL2* no indica que se lleve a cabo procesamiento del mensajero a partir de este locus. La auto-fluorescencia intrínseca en la cepa parental *mtl(1,2,3)Δ* (CGM531) impide discernir, mediante microscopía de fluorescencia, una posible localización nuclear de la proteína *a1::GFP* en las cepas que contienen la fusión traduccional en *MTL2*.

En la siguiente tabla se resumen las unidades relativas de fluorescencia emitidas por la proteína **a1::GFP** a partir de las fusiones traduccionales **a1::GFP** integradas en los *loci MTL1* y *MTL2* (**a1::GFP MTL1** y **a1::GFP MTL2** ) además de la fluorescencia emitida por la cepa que contiene la fusión **a1::GFP-hph** donde la secuencia 3' se encuentra alejada por el cassette *hph*, así como de las cepas que portan las fusiones traduccionales **a1::GFP** expresadas a partir del plásmido episomal CEN/ARS (**a1::GFP MTL1 CEN** y **a1::GFP MTL2 CEN**).

**Tabla 1.** Fluorescencia emitida por la proteína de fusión **a1::GFP** a partir de las cepas que contienen integrada la fusión **a1::GFP** ya sea en el *locus MTL1* o en *MTL2* integradas al cromosoma y episomales.

<b>Cepa</b>	<b>RFU (Unidades relativas de fluorescencia)</b>			
	<b>Medio rico YPD</b>		<b>MM ó Medio Mínimo</b>	
<b>Genotipo</b>	Fase logarímicamente (log)	Fase estacionaria (sp)	Fase logarímicamente (log)	Fase estacionaria (sp)
<b>a1::GFP MTL1</b>	*ND	723	1145	37
<b>a1::GFP-hph</b>	5894	450	ND	294
<b>a1::GFP MTL2</b>			491	ND
<b>a1::GFP MTL1 CEN</b>			150	
<b>a1::GFP MTL2 CEN</b>			474	

\*ND:No detectable

## DISCUSIÓN

El locus *MTL2* de *C. glabrata* generalmente contiene información tipo **a**, que consiste en el gen **a1** que posee dos intrones. Además, entre el 20 y el 50% de los aislados clínicos de *C. glabrata* tienen una copia idéntica del mismo gen **a1** en el locus *MTL1*.

El RNA mensajero del gen **a1** en *C. glabrata*, se procesa parcial y totalmente cuando se transcribe a partir del locus *MTL1*, pero no cuando se transcribe a partir de *MTL2*. Aún cuando los *ORFs* del gen **a1** en *MTL1* y *MTL2* son idénticos, no es posible detectar procesamiento del transcrito primario del gen **a1** a partir del locus *MTL2*. La presencia de codones de paro dentro de los dos intrones que posee el gen **a1**, hace necesaria su escisión total para obtener el producto proteico completo. Las secuencias al 5' y 3' del *ORF a1* provenientes de *MTL1* o *MTL2*, podrían determinar el procesamiento diferencial del transcrito primario del gen **a1**.

Para empezar a entender las bases moleculares por las cuales el transcrito del gen **a1** se procesa diferencialmente cuando la transcripción del gen se origina en el locus *MTL1* o en *MTL2*, construimos fusiones traduccionales del gen **a1** de *MTL1* con la proteína GFP. Estas fusiones se flanquearon por las secuencias al 5' y 3' provenientes de *MTL1* o *MTL2* y se integraron en los loci *MTL1* y *MTL2* en la cepa que no contiene información de apareamiento en ninguno de los tres loci *MTL* (cepa *mtl(1,2,3)*Δ). Las fusiones traduccionales también se subclonaron y expresaron en plásmidos replicativos *CEN/ARS* para estudiar la participación de las regiones flanqueantes y/o la estructura de la cromatina en el procesamiento del transcrito **a1** cuando la transcripción se realiza fuera del contexto cromosómico (en plásmidos replicativos).

Utilizando las fusiones traduccionales: 1) Detectamos fluorescencia a partir de la fusión traduccional flanqueada por las secuencias al 5' y 3' provenientes de *MTL1*, durante la fase estacionaria de crecimiento en medio rico YPD y durante la fase logarítmica de crecimiento en medio mínimo, lo que indica procesamiento del

transcrito **a1** en estas dos condiciones (Fig.5 y Tabla 1). Además la proteína **a1** que se sintetiza a partir de esta fusión, se localiza principalmente en el núcleo (Fig. 4), 2) Detectamos fluorescencia difusa y no colocalizable con el núcleo a partir de la fusión traduccional integrada y flanqueada por las secuencias al 5' y 3' provenientes de *MTL2* (Fig. 7). 3) No detectamos fluorescencia significativa, ni logramos definir la localización de esta pequeña señal, cuando el procesamiento se da a partir de las fusiones traduccionales expresadas episomalmente.

En *S. cerevisiae* la proteína **a1** participa en procesos distintos a solamente mantener y establecer una identidad de tipo celular sexual. La proteína **a1** y **α2** en *S. cerevisiae* forman un heterodímero con actividad represora en la expresión de genes de identidad de tipo celular. Debido a que *C. glabrata* no mantiene una identidad específica de tipo celular (Ramírez-Zavaleta et al., 2010; Mueller et al., 2008) la proteína **a1** detectada y localizada en el núcleo durante la fase estacionaria de crecimiento en medio rico YPD, nos hace suponer que **a1** está participando en procesos celulares distintos al de otorgar una identidad específica de tipo celular sexual.

Los datos obtenidos en este trabajo sugieren que existen señales en el medio de cultivo, así como la fase de crecimiento que influyen en la eficiencia de procesamiento del transcrito del gen **a1** (Fig. 5). Posiblemente, estas señales se transmiten a través de las secuencias localizadas al 3' del *ORF* del gen **a1** (Fig. 6). Además, encontramos que también la estructura de la cromatina (o la eficiencia de la transcripción) se requieren para el procesamiento de este transcrito (Fig. 8).

Mediante la herramienta bioinformática YEASTRACT o Yeast Search for Transcriptional Regulators And Consensus Tracking ([www.yeasttract.com](http://www.yeasttract.com)) basada en información obtenida a partir de la levadura *S. cerevisiae*, buscamos secuencias de unión conservadas para proteínas ortólogas modeladoras de la estructura del DNA y factores moduladores de la transcripción presentes en *C. glabrata*, que estuvieran localizadas en las secuencias flanqueantes 5' y 3' del *ORF* del gen **a1** tanto en *MTL1* como en *MTL2*. En la secuencia flanqueante 5' de

**a1** en ambos *loci*, se presentan probables sitios de unión para la proteína ortóloga a Xbp1 de *S. cerevisiae*: 4 sitios de unión en *MTL1* y uno solo en *MTL2*. Xbp1 funciona como represor transcripcional con afinidad a secuencias promotoras de genes de ciclinas y su expresión es inducida bajo condiciones de estrés y privación de nutrientes durante la mitosis tardía (Mai & Breeden, 1997). La proteína ortóloga putativa a Xbp1 en *C. glabrata* presenta 35% de identidad respecto a Xbp1 de *S. cerevisiae*, esta identidad está conservada en el sitio de unión a DNA. En la secuencia flanqueante 3' en ambos loci encontramos sitios de unión conservados para la proteína ortóloga Ash1 de *S. cerevisiae* que posee actividad de regulador negativo de la transcripción del gen *HO* (Sil & Herskowitz, 1996). A lo largo del *ORF* del gen **a1** tanto en *MTL1* como en *MTL2* existen sitios de unión para las proteínas Ash1, Fkh1 y Fkh2. Estos últimos factores no caracterizados pero presentes en *C. glabrata*, podrían regular la etapa de elongación de ciertos transcritos ya que en *S. cerevisiae* se les ha encontrado que participan en la fosforilación de las serinas 5 y 2 del carboxilo terminal de la RNA polimerasa II (Schwartz, *et al.*, 2009). Existen sitios de unión para Fkh1 y Fkh2 en los tres exones y el segundo intrón del gen **a1** en *MTL1* y *MTL2*. La eficiencia con la que estos componentes actúan podría explicar el procesamiento diferencial del transcrito de **a1** en ambos *loci*.

En *S. cerevisiae* la ruta de control de RNA mensajero o procesamiento alternativo mediante el reconocimiento de codones de paro prematuros o vía Nonsense-mediated decay (NMD) considera la distancia entre un codón de paro y un sitio especial aún no bien ubicado que parece encontrarse en el 3' UTR o en algunos casos estar cerca o hacia el 3' UTR, para marcar y controlar la degradación de transcritos primarios (Metzstein & Krasnow, 2006). De manera interesante, nuestra fusión traduccional **a1::GFP** construida con secuencias flanqueantes a partir del locus *MTL1* de *C. glabrata* en la que se aleja la secuencia flanqueante 3' por 2 kb (Fig. 6A), puede observarse un aumento significativo en la cantidad de transcrito procesado durante la fase logarítmica en medio rico YPD. El procesamiento del transcrito de la fusión **a1::GFP** es totalmente ausente o de nula detección cuando

la misma fusión traduccional tiene la secuencia flanqueante 3' ubicada en su lugar inmediatamente después del *ORF* del gen *a1* tal y como se dispone en el cromosoma de *C. glabrata*. Los componentes principales que participan en la vía NMD en *S. cerevisiae* se encuentran presentes y conservados en *C. glabrata*. En *C. glabrata* la proteína ortóloga a la proteína Upf2 de *S. cerevisiae* es 55% idéntica y 73% similar a Upf2 de *S. cerevisiae* la cual posee actividad de helicasa de RNA. Upf3 conserva 35% de identidad y 50% de similitud respecto a la proteína Upf3 de *S. cerevisiae*, cuya función es dirigir nucleasas y a las enzimas que eliminan el capping 5' de transcritos primarios.

La velocidad de crecimiento vegetativo también determina el procesamiento. En medio mínimo, durante la fase logarítmica donde la tasa de crecimiento es alta, hay señales no determinadas aún, que podrían determinar cambios en la estructura de la cromatina mediante cambios posiblemente en los patrones de acetilación, pero principalmente de metilación en las histonas, este cambio tiene efecto en la llegada, acceso y posicionamiento de la RNA polimerasa en el promotor del gen *a1* del *locus MTL1*. Observamos que alejar la secuencia flanqueante 3' impide el procesamiento del RNA mensajero *a1*. Cuando la secuencia flanqueante 3' está justo cerca al *ORF*, se observa procesamiento alto del RNA mensajero. En la fase logarítmica pero en medio rico YPD, se presenta la dinámica contraria, aquí la cercanía de la secuencia flanqueante 3' impide el procesamiento del transcrito. Aparentemente en medio mínimo la cromatina parece más abierta cuando se aleja la secuencia 3', es decir localmente en el *locus MTL1* y en la vecindad del gen *a1*. Además en el medio mínimo la cromatina parece ser más compacta cuando la secuencia flanqueante 3' se encuentra cerca al *ORF a1* anulando la escisión de ambos intrones.

En fase estacionaria donde el crecimiento es menor, en medio mínimo la lejanía de la secuencia flanqueante 3' mejora el procesamiento del transcrito primario *a1*, mientras que medio rico YPD la cercanía de esta secuencia flanqueante hace posible la escisión de intrones del RNA mensajero *a1*.

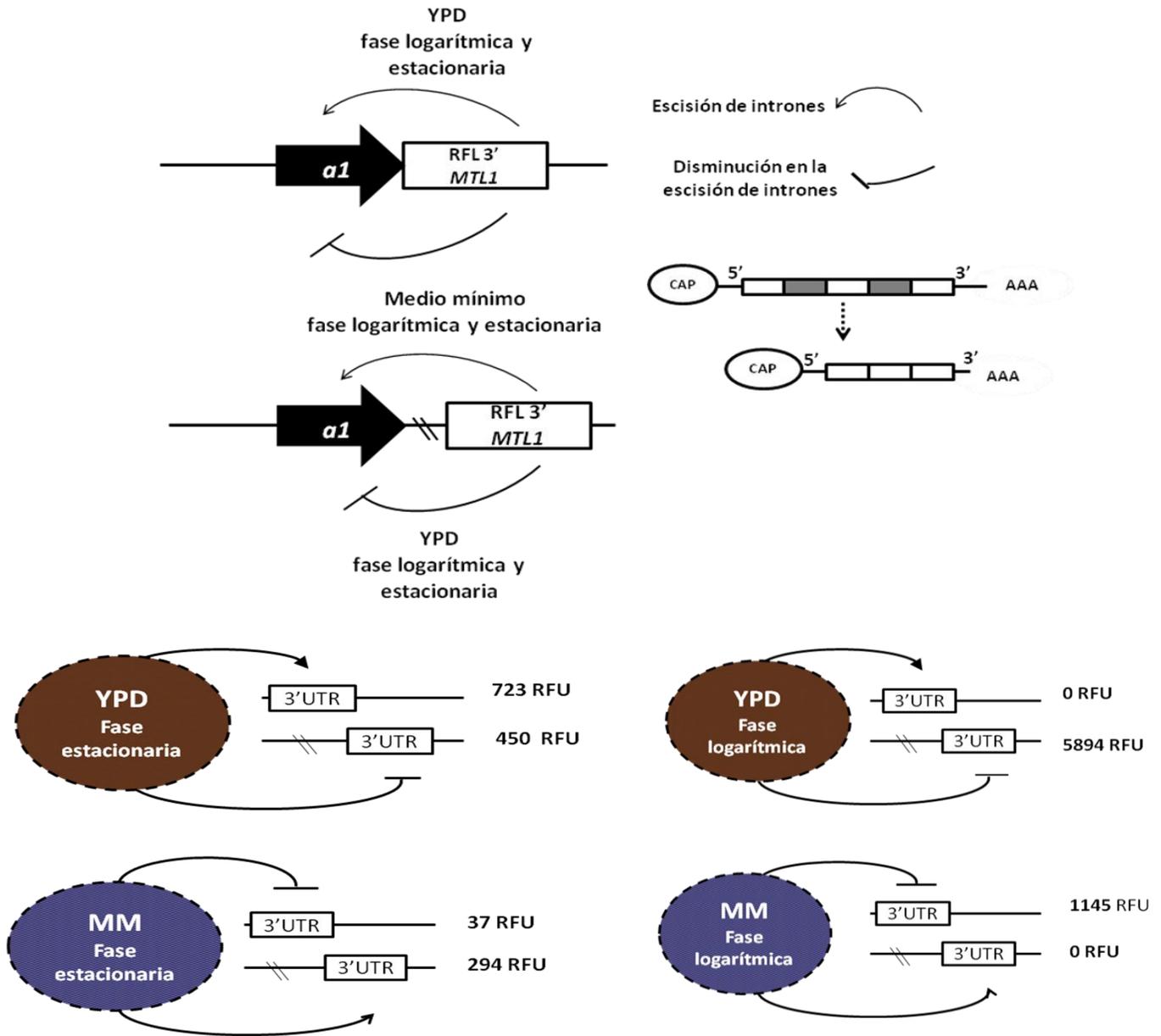
Se podría determinar el nivel y tipo de modificaciones post-traduccionales en las histonas con el fin de establecer si existe una correlación entre los cambios en la estructura de la cromatina y el grado de procesamiento completo del transcrito del gen *a1* en el *locus MTL1*. Esto permitiría correlacionar el acceso de la maquinaria de transcripción con el de los factores que controlan el procesamiento que permiten la elongación de transcrito primario y el ensamblaje de la maquinaria de splicing. Scherrer & Spingola, mencionan que el procesamiento puede ser ineficiente en las levaduras, durante el crecimiento vegetativo debido a que los bordes exón-intrón la mayoría de las veces, son sitios de splicing subóptimos (Scherrer & Spingola, 2006).

El hecho de que el transcrito proveniente de *MTL2* no se procese, de alguna manera compensa la falta de silenciamiento en el *locus MTL2* de *C. glabrata*, el cual, a diferencia de lo que ocurre en *S. cerevisiae*, no está silenciado. Si el transcrito de *a1* se procesara completamente cuando proviene de *MTL2*, esto tendría la consecuencia de que las cepas que contienen información tipo  $\alpha$  en *MTL1*, podrían expresar ambos tipos de información de apareamiento en células haploides (información  $\alpha$  a partir de *MTL1* e información *a* a partir de *MTL2* que es activo transcripcionalmente). Posiblemente se ha seleccionado en *C. glabrata* el mecanismo por el cual no se procesa el transcrito de *a1* procedente de *MTL2*, precisamente para evitar que se expresen ambos tipos de información (característico de células diploides) en células haploides.

Los datos presentados en este trabajo apuntan a que hay probablemente varias señales que producen el procesamiento diferencial del transcrito de *a1*. En el laboratorio continuaremos con estos estudios para encontrar cuales son las señales del medio que disparan un procesamiento eficiente, y cuáles son las secuencias específicas, probablemente localizadas al 3' del *ORF*, así como la estructura de la cromatina que se requiere para procesar completamente el transcrito del gen *a1*.

Para continuar con este trabajo, se propone utilizar una fusión del gen *a1* seguida de tres copias del gen de la proteína verde fluorescente o GFP, que se ha encontrado que en *C. glabrata* aumenta significativamente la señal de fluorescencia por encima de la autofluorescencia intrínseca de la mayoría de las cepas de *C. glabrata*.

## Modelo y resumen de trabajo



**Figura 9.** Existen señales desconocidas en que determinan el procesamiento del RNA mensajero  $\alpha 1$ . Mediante la cuantificación de unidades relativas de fluorescencia o RFU emitidas por la proteína  $\alpha 1::GFP$  generada a partir del RNA mensajero  $\alpha 1::GFP$  con secuencias flanqueantes al 5' y 3' a partir del locus *MTL1* podemos distinguir factores determinantes del procesamiento de intrones del transcrito  $\alpha 1$ : Moléculas aún desconocidas que componen el medio de cultivo que junto con variantes como la velocidad de crecimiento, cercanía y lejanía de la secuencia flanqueante 3' condicionan el procesamiento del RNA mensajero  $\alpha 1$ .

## Materiales y métodos

### Medios de cultivo

Medios de cultivo para *C. glabrata*:

YPD contiene: Extracto de levadura 10 g/L, peptona 20 g/L, uracilo 50 mg/ml, glucosa 2%. Agar YPD: Al YPD líquido se le adiciona 20 g/L de agar. Agar YPG: Extracto de levadura 10 g/L, peptona 20 g/L, uracilo 50 mg/ml, glicerol 3%, agar 20g/L. El medio casaminoácidos (CAA) contiene: base nitrogenada de levadura 1.7 g/L, sulfato de amonio 5 g/L, casaminoácidos 6 g/L y glucosa 2%. Agar CAA: Al medio CAA líquido se le adiciona agar 20 g/L y glucosa 2% (p/v).

*E. coli* se creció en medio Luria-Bertani (LB) que contiene: Extracto de levadura 5 g/L, triptona 10 g/L y NaCl 5g/L. Agar LB: Adicionar 15g/L de agar al LB líquido. Medio SOC: Extracto de levadura 5g/l, triptona 20 g/L, glucosa 0.4 % (p/v), NaCl 10 mM, KCL 2.5 mM, MgSO<sub>4</sub> 10 mM, MgCl<sub>2</sub> 10 mM. Medio LB-carbenicilina: Añadir 1mL de carbenicilina (A.G.Scientific®) a una concentración de 50mg/mL por litro de medio (LB-Cb 50).El medio LB-cloramfenicol-sacarosa contiene: Triptona 10g/L, extracto de levadura 5g/L,NaCl 10g/L y sacarosa 50 g/L. Se añadieron 20 µg/mL de concentración final de cloramfenicol (Cm<sub>20</sub>) para mantener presión de selección plasmídica. Para medio sólido en cajas se agregó agar 15g/L. Todas las construcciones plasmídicas se transformaron en la cepa DH10 por electroporación.

Todos los cultivos, tanto de *E. coli* como de *C. glabrata*, se crecieron a una temperatura de incubación de 30°C.

*Clonación de productos de PCR y construcción de fusiones traduccionales a1::GFP para integración a los loci MTL1 y MTL2*

#### *Fusión traduccional a1::GFP MTL1 :*

El fragmento de 1.2 Kb que contiene el secuencia flanqueante 5' y el ORF del gen *a1* a partir del locus *MTL1* se amplificó con los oligonucleótidos 769 y 771 (Figura 1 y Tabla 1 Material suplementario) usando como molde DNA genómico de la cepa CGM413 (*mtl2Δ*) y clonado en el sitio *StuI* de pMB11 para generar el plásmido pSF1 (Tabla 2 Material suplementario). El fragmento que contiene la secuencia flanqueante 3' del gen *a1* del locus *MTL1* de 699 pb se amplificó con los oligonucleótidos 772 y 773 (Figura 1 y Tabla 1 Material Suplementario) usando como molde DNA genómico de la cepa CGM413 (*mtl2Δ*) y clonado en el sitio *StuI* de pMB11 para generar el plásmido pSF3 (Tabla 2 Material suplementario). pSF1 se cortó con *BamHI* y se recuperó la banda de 1.214 Kb que se clonó en el sitio *BamHI* en el plásmido integrativo pOZ16. Esta clonación dio lugar al plásmido intermediario pSF5 (tabla 2 Material suplementario). pSF3 se digirió con *Hind III* y *Xho I* y se recuperó la banda de 699pb que se clonó en los sitios *Hind III* y *Xho I* de pSF5 para generar la fusión traduccional *a1::GFP* flanqueada por secuencias del locus *MTL1* en el plásmido integrativo pSF8 (Tabla 2 Material suplementario).

#### *Fusión traduccional a1::GFP MTL2 :*

El fragmento de 481 pb que contiene el secuencia flanqueante 3' del gen *a1* del locus *MTL2* se amplificó con los oligonucleótidos 776 y 777 (Figura 1 y Tabla 1 Material Suplementario) usando como molde DNA genómico de la cepa CGM390 (*mtl1Δ*) y clonado en el sitio *StuI* en pMB11 para generar el plásmido pSF11 (Tabla 2 Material suplementario). El fragmento que contiene la secuencia flanqueante 5' del gen *a1* del locus *MTL2* de 637 pb se amplificó con los oligonucleótidos 774 y 775 (Tabla 1 Material Suplementario) usando como molde DNA genómico de la cepa CGM390 (*mtl1Δ*) y clonado en el sitio *StuI* en pMB11 para generar el plásmido pSF13 (Tabla 2 Datos Suplementarios). El fragmento que contiene el *ORF* del gen *a1* de 522pb a partir del locus *MTL1* se amplificó con los oligonucleótidos 330 y 771 (Figura 1 y Tabla 1 Datos Suplementarios) usando como molde DNA genómico de la cepa CGM413 (*mtl2Δ*) y clonado en el sitio *StuI*

en pMB11 para generar el plásmido pSF16 (Tabla 2 Datos Suplementarios). pSF16 se digirió con *Bam*HI y *Xba*I y el fragmento de 522 pb se clonó en los sitios *Bam*HI y *Spe*I del plásmido integrativo pOZ16 generando el plásmido intermediario pSF19 (Tabla 2 Datos Suplementarios). pSF13 se cortó con *Sac*I y *Not*I y se recuperó la banda de 637 pb que se clonó en los sitios *Sac*I y *Not*I de pSF19 para generar el plásmido pSF20 (Tabla 2 Datos Suplementarios). pSF11 se cortó con *Sal*I y *Xho*I y se recuperó la banda de 481 pb que se clonó en el sitio *Sal*I y *Xho*I en pSF20 con lo cual se generó finalmente la fusión traduccional *a1*::GFP flanqueada por secuencias del locus *MTL2* (plásmido integrativo pSF22). Las fusiones traduccionales contenidas en los plásmidos integrativos pSF8 y pSF22, se escindieron mediante la digestión con *Bsg*I (que genera secuencias de *C. glabrata*) y se integraron en el cromosoma de la cepa CGM531 *mtl*(1,2,3) $\Delta$  de *C. glabrata* por doble recombinación homóloga. Se eligieron colonias resistentes a higromicina (*hph*<sup>R</sup>), se extrajo DNA genómico para comprobar la integración de las fusiones traduccionales tanto en *MTL1* como en *MTL2* mediante PCR. Las transformantes correctas se transformaron con el plásmido pMZ18 que codifica para la recombinasa Fip1 que escinde el cassette de higromicina a través del reconocimiento y recombinación de los sitios *FRT*, que flanquean el cassette de resistencia a higromicina. Esta escisión de *hph* coloca la fusión *a1*::GFP contigua a sus respectivas regiones flanqueantes al 3' de los loci *MTL1* o *MTL2*. Se realizó un PCR comprobatorio de escisión del gen *hph* en el cual se espera un fragmento de 3.1 Kb para ambas fusiones *a1*::GFP a partir de los loci *MTL1* y *MTL2*. Tanto las clonas que contienen integradas en el cromosoma las fusiones *a1*::GFP en *MTL1* y *MTL2* con el cassette *hph* (Hyg<sup>R</sup>) como aquellas en donde se hizo la resolución del mismo (Hyg<sup>S</sup>), se utilizaron para ensayar fluorescencia.

*Construcción de las fusiones traduccionales extracromosomales en plásmidos replicativos a1::GFP con regiones flanqueantes de los loci MTL1 y MTL2.*

El plásmido pSF8 que contiene la fusión traduccional *a1*::GFP a partir de *MTL1* fue cortado con *Spe*I y *Xho*I para recuperar el fragmento de 5Kb que contiene la fusión completa y se subclonó en el plásmido *CEN/ARS* pGRB2.0 en los sitios

*SpeI* y *XhoI* generando el plásmido pSF23 (Tabla 2 Datos Suplementarios) . El plásmido pSF22 se digirió con *SacI* y *XhoI* y se recuperó la banda de 4.8 Kb que contiene la fusión completa **a1**::GFP con secuencias flanqueantes de *MTL2* y se subclonó en pGRB2.0 generando el plásmido pSF27 (Tabla 2 Datos suplementarios). Para escindir el cassette de higromicina de 2.3 Kb de pSF23 y pSF27, ambos plásmidos se cortaron con *XbaI*. Para pSF23 se recuperaron y religaron los fragmentos de 5.5 Kb, que comprende el 5' flanqueante y ORF de **a1** en *MTL1* y el fragmento de 1.9 Kb que contiene el 3' flanqueante de **a1** en *MTL1*, dando lugar al plásmido pSF29 (Tabla 2 Material suplementario). De la digestión con *XbaI* de pSF27 se recuperaron y religaron los fragmentos de 6 Kb, que contiene el 5' y 3' flanqueantes del gen **a1** en *MTL2* y el fragmento de 1.2 Kb que contiene la fusión traduccional **a1**::GFP , dando lugar al plásmido pSF35 (Tabla 2 Datos suplementarios). pSF23 y pSF27 se transformaron en las cepas CGM1 (silvestre) y CGM531 *mtl(1,2,3)*Δ. pSF29 y pSF35 fueron transformados solo en el fondo CGM531 *mtl(1,2,3)*Δ (Tabla 3 Material suplementario). Solo las cepas que contiene a las fusiones extracromosomales **a1**::GFP en *MTL1* o *MTL2* Hyg<sup>s</sup> fueron analizadas por fluorescencia.

#### *Ensayos de fluorescencia.*

Las cepas se sembraron a partir del resguardo en glicerol a -80°C en 5 ml de medio mínimo e incubaron a 28°C con agitación continua durante toda una noche. Las cepas auxótrofas de uracilo: Cepas con la fusión traduccional **a1**::GFP ya sea en el *locus MTL1* o *MTL2*, CGM531 *mtl(1,2,3)*Δ y CGM514 (CGM1/pMC14 GFP::3 UTR) (Tabla 3 Material suplementario ), se crecieron con uracilo adicionado al medio mínimo. A partir del cultivo crecido toda una noche, se resembraron las cepas en medio mínimo e incubaron a 25°C por dos días hasta alcanzar fase estacionaria de crecimiento que en medio mínimo corresponde a una O.D<sub>600</sub>= 9. Una vez sincronizadas las levaduras en fase estacionaria de crecimiento se volvieron a inocular las cepas en medio mínimo para inducir fase logarítmica durante cuatro duplicaciones sucesivas a partir de una O.D<sub>600</sub> = 0.0625 hasta alcanzar una O.D<sub>600</sub>= 1 o fase logarítmica. Una vez alcanzada la O.D<sub>600</sub>= 1, se

tomó 1 ml de cultivo de cada cepa tanto en fase estacionaria como logarítmica se centrifugó a 13000 rpm por 1min, se descartó el medio mínimo, se lavaron dos veces y resuspendieron en 1ml de agua MiliQ® estéril. Se tomaron 200 µl de células de cada cepa y se colocaron por separado y sucesivamente en pozos de una placa de 96 el volumen correspondiente a una O.D= 0.8, O.D= 0.4 de células en fase logarítmica de crecimiento y en el pozo contiguo, 200 µl células en fase estacionaria de cada cepa. El resto de las células se reservó para teñir con DAPI y llevar a cabo microscopía de fluorescencia. Una vez ordenadas las muestras se analizaron en el fluorómetro Multimode Analysis Software 3.3.0.9 DTX 880 Beckman Coulter ® y se cuantificó la emisión de GFP de cada cultivo depositado en cada pozo con un haz excitatorio UV de 485 nm. Los valores obtenidos se expresan como unidades relativas de fluorescencia emitidas (RFU). Ya obtenidas las RFU se realizó un análisis estadístico. De las RFU que emitieron las cepas tanto integrantes de la fusión y cepas con las fusiones extracromosomales se obtuvo el promedio de emisión de GFP. La autofluorescencia emitida por la cepa parental se le restó a todas las mediciones de las demás cepas que contienen las fusiones. Todas las gráficas representan las medias obtenidas de más tres cuantificaciones experimentales. Para todos los experimentos, el control positivo fue la fluorescencia emitida por la cepa CGM 473 que posee un plásmido replicativo con la construcción  $P_{CgCTA1}CgCTA1::GFP$  que emite una señal de la proteína GFP de manera constitutiva en toda la célula. Como control negativo de emisión de fluorescencia consideramos las RFU de la cepa CGM 514 ó CGM1/pMC14 GFP::3 UTR, que por carecer de promotor para la transcripción del gen de la proteína GFP, no debería emitir señal alguna (pero emite señal de autofluorescencia). Las cepas generadas y analizadas en este trabajo tienen como fondo genético el correspondiente a la cepa CGM 531 o *mtl(1,2,3)Δ*, nula de información en los *loci* de apareamiento.

## Referencias

Andersson R, Enroth S, Rada-Iglesias A, Wadelius C & Komorowski J (2009) Nucleosomes are well positioned in exons and carry characteristic histone modifications. *Genome Res* **19**: 1732-1741.

Barns SM, Lane DJ, Sogin ML, Bibeau C & Weisburg WG (1991) Evolutionary relationships among pathogenic *Candida* species and relatives. *Journal of bacteriology* **173**: 2250-2255.

Csank C & Haynes K (2000) *Candida glabrata* displays pseudohyphal growth. *FEMS Microbiology Letters* **189**: 115-120.

Fidel PL, Jr., Vazquez JA & Sobel JD (1999) *Candida glabrata*: review of epidemiology, pathogenesis, and clinical disease with comparison to *C. albicans*. *CLINICAL MICROBIOLOGY REVIEWS* **12**: 80-96.

Fortun J, Lopez-San Roman A, Velasco JJ, *et al.* (1997) Selection of *Candida glabrata* strains with reduced susceptibility to azoles in four liver transplant patients with invasive candidiasis. *European journal of clinical microbiology & infectious diseases : official publication of the European Society of Clinical Microbiology* **16**: 314-318.

Hull CM, Raisner RM & Johnson AD (2000) Evidence for mating of the "asexual" yeast *Candida albicans* in a mammalian host. *Science* **289**: 307-310.

Lockhart SR, Joly S, Vargas K, Swails-Wenger J, Enger L & Soll DR (1999) Natural defenses against *Candida* colonization breakdown in the oral cavities of the elderly. *Journal of Dental Research* **78**: 857-868.

Magee BB & Magee PT (2000) Induction of mating in *Candida albicans* by construction of MTL $\alpha$  and MTL $\alpha$  strains. *Science* **289**: 310-313.

Mai B & Breeden L (1997) Xbp1, a stress-induced transcriptional repressor of the *Saccharomyces cerevisiae* Swi4/Mbp1 family. *Mol Cell Biol* **17**: 6491-6501.

Metzstein MM & Krasnow MA (2006) Functions of the nonsense-mediated mRNA decay pathway in *Drosophila* development. *PLoS Genet* **2**: e180.

Ner SS & Smith M (1989) Role of intron splicing in the function of the MAT $\alpha$ 1 gene of *Saccharomyces cerevisiae*. *MOLECULAR AND CELLULAR BIOLOGY* **9**: 4613-4620.

Pleiss JA, Whitworth GB, Bergkessel M & Guthrie C (2007) Transcript specificity in yeast pre-mRNA splicing revealed by mutations in core spliceosomal components. *PLoS biology* **5**: e90.

Ramirez-Zavaleta CY, Salas-Delgado GE, De Las Penas A & Castano I (2010) Subtelomeric silencing of the MTL3 locus of *Candida glabrata* requires  $\gamma$ Ku70,  $\gamma$ Ku80, and Rif1 proteins. *Eukaryotic cell* **9**: 1602-1611.

Scherrer FW, Jr. & Spingola M (2006) A subset of Mer1p-dependent introns requires Bud13p for splicing activation and nuclear retention. *RNA* **12**: 1361-1372.

Schwartz S & Ast G (2010) Chromatin density and splicing destiny: on the cross-talk between chromatin structure and splicing. *EMBO J* **29**: 1629-1636.

Schwartz S, Meshorer E & Ast G (2009) Chromatin organization marks exon-intron structure. *Nature structural & molecular biology* **16**: 990-995.

Schwartz SH, Silva J, Burstein D, Pupko T, Eyras E & Ast G (2008) Large-scale comparative analysis of splicing signals and their corresponding splicing factors in eukaryotes. *Genome Res* **18**: 88-103.

Sil A & Herskowitz I (1996) Identification of asymmetrically localized determinant, Ash1p, required for lineage-specific transcription of the yeast HO gene. *Cell* **84**: 711-722.

Srikantha T, Lachke SA & Soll DR (2003) Three mating type-like loci in *Candida glabrata*. *Eukaryotic cell* **2**: 328-340.

## Datos suplementarios

Figura 1S.

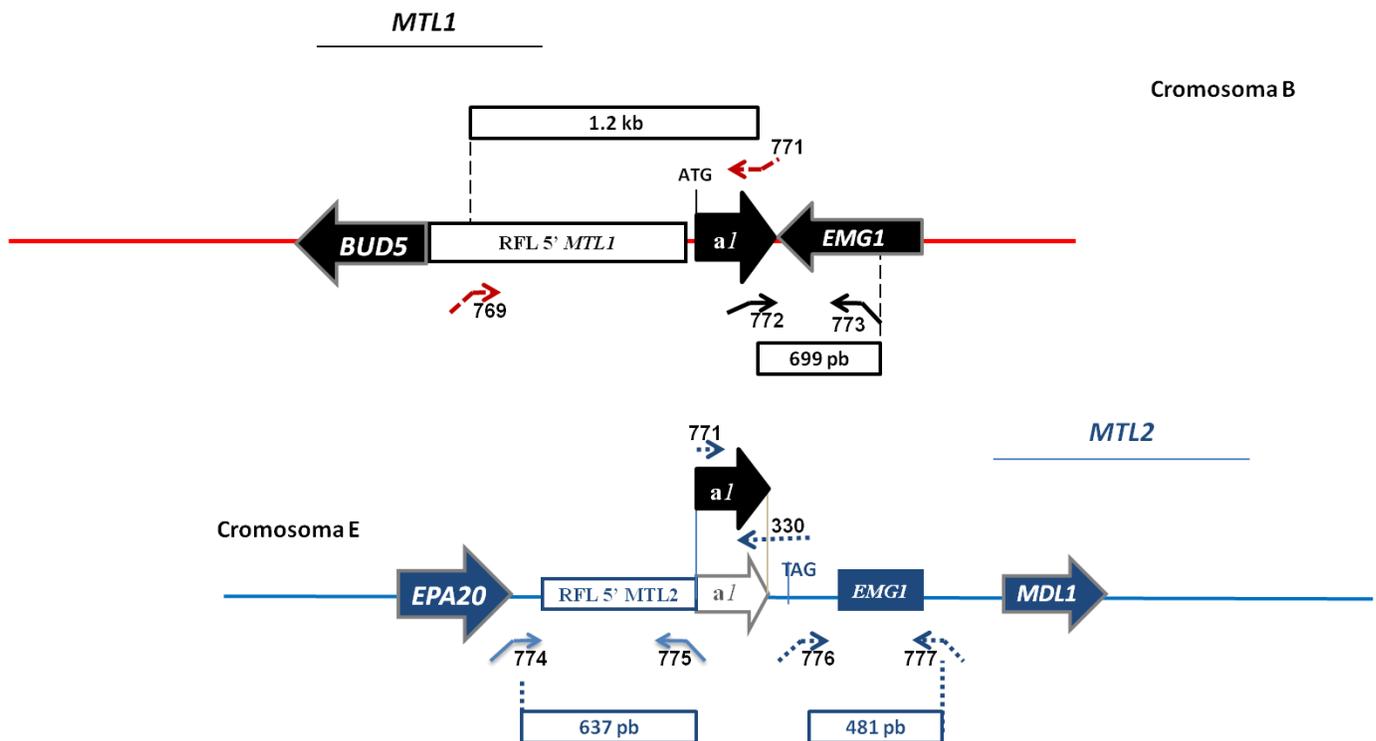


Figura 1S. Sitios de hibridación y fragmentos amplificados para la construcción de las fusiones traducciones *a1::GFP* en los loci *MTL1* y *MTL2*.

**Tabla 2.** Oligonucleótidos utilizados en este estudio.

NUMERO	SECUENCIA (5' a 3')	SITIO DE HIBRIDACIÓN
16	AGAAATACGCACGAACACGATATAGAGG	HIS3 FW-out
147	CACAAGCTTTTATATAATGGCCCATGCGTC	EMG1@670Hind3 Rv MTL1
150	CCGGTACCTTGTGCAGGTTAGTGTGGCACCTAAATG	Epa20@2801 Kpn Bsg Fw MTL2
181	CCTTAGTGATTCATTTGTATCC	699 twd a1
320	CGCTCTAGACTGCTGAACTGTGACGACCATC	EMG1@135XbaFwMTL1
321	CCCGAATTCGCGTCTTTCTGTGATTATGATG	BUD5@-35RI-RvMTL1
329	GCTTCTGCAGTATCTACAATAGATAGAAGG	EMG@-42 Fw (Pst)
330	CCCTCTAGAAAAATGATGACAGTAGACCCAATACAAGATC	a1@nt1 Xba Rv
332	GGGAATTCGTCTTTCTGTGATTATGATGTAAGTTGC	Bud5@-37R1 Rv
409	CGCAGATCTTTATTTGTACAATTCATCCATACC	GFP@ @715bp Bgl II REV
410	GCGGGATCCTAATGTCTAAAGGTGAAGGTGAAGAATTATTC	GFP@1bp BamHI FW
468	GACCCAATACAAGATCTACGC	Fwd @13 A1
469	AGATCTTTTCGATCTCTTGCGC	Rev @283 A1
604	AAAAATATCAAGTTCCTGAATTCG	sacB@181Fw
605	CAAAGACGATGTGGTAGCC	sacB@321pbRev
764	CCCGGATCCGGTGGTGATCTCTTGTGTGG	BUD5@-424BamRvMTL1a
769	CCCGGATCCTTGTGCAGGGTGGTGATCTCTTGTGTGG	BUD5@-424Bam Bsg Rv
770	CCCGGATCCGTAGAGTGACTTCAGATATTGTACAACCTG	alfa2@-424FwBam
771	GCGGATCCAGTCACGATTGTTTAGATCTTTTCGATC	a1@494noTAA-GFP-RV Bam
772	CGCAAGCTTCTATAGTTCCTCCTTACTCTTTTATAG	a1@+1HinFw
773	CGGCTCGAGTTGTGCAGCTGCTGAACTGTGACGACCATC	EMG@135Xho Bsg
774	CGCGAGCTCTTGTGCAGGCTCTTCACTCAACGTACTCC	a1MTL2@-637SacBsgFw
775	CCGCGGCCGCATTATTGATTTGTCTAAAGATTTTGAATAG	a1MTL2@-1NotRv
776	GCGGTGACCTATAGTTCCTCCTTACTCTTTTATAG	a1MTL2@+1SalFw
777	GCGCTCGAGTTGTGCAGCTGATATGATTTGGATATTGAAG	emgMTL2@-144XhoBsg Rv

**Tabla 3.** Plásmidos utilizados y generados en este estudio.

PLÁSMIDO	DESCRIPCIÓN	OLIGONUCLEOTIDOS	REFERENCIA
pGR2.0	CEN/ARS Ura+		colección del laboratorio
pSF3	699 pb hacia 3' después del ATG de <i>a1 MTL1 Stu I</i> pMB11	# 772 (a1MTL1@+HinFw) # 773 (EMG@135MTL1XhoBsgFw)	colección del laboratorio
pSF5	524 pb <i>ORF a1</i> más 666 pb bases río arriba del sitio de inicio de la transcripción de <i>a1 BamHI</i> pOZ16	# 769 (BUD5@-424BamBsgRvMTL1a) # 771 (a1@494noTAA-GFP-RvBam)	colección del laboratorio
pSF8	Fusión <i>a1::GFP</i> para integrar en <i>locus MTL1</i>	# 772 (a1MTL1@+HinFw) # 773 (EMG@135MTL1XhoBsgFw) # 769 (BUD5@-424BamBsgRvMTL1a) # 771	colección del laboratorio
pSF11	481 pb después de ATG de <i>a1 MTL2</i>	# 776 (a1MTL2@+1SalFw ) # 777 (emgMTL2@-144XhoBsgRv)	colección del laboratorio
pSF13	604 pb río arriba del sitio de inicio de la transcripción de <i>a1</i> del <i>locus MTL2</i>	# 774 (a1MTL2@-637SacBsgFw ) #775 (a1MTL2@-1NotRv)	colección del laboratorio
pSF15	gen $\alpha 2$ de 1.386 Kb	# 770 (alfa2@-424FwBam) # 321(BUD5@-35RI-RvMTL1)	colección del laboratorio
pSF16	522 pb gen <i>a1</i> a 494 no TAA	# 771 (a1@494noTAA-GFP-RV Bam) # 330 (a1@nt1 Xba Rv)	colección del laboratorio
pSF19	<i>ORF a1 Spe I-Bam HI</i> pOZ16	# 771 (a1@494noTAA-GFP-RV Bam) # 330 (a1@nt1 Xba Rv)	colección del laboratorio
pSF20	<i>ORF a1 Spe I-Bam HI</i> pOZ16 más 604 pb río arriba del sitio de inicio de la transcripción de <i>a1</i> del <i>locus MTL2</i>	# 774 (a1MTL2@-637SacBsgFw ) # 775 (a1MTL2@-1NotRv) # 771 (a1@494noTAA-GFP-RV Bam) # 330 (a1@nt1 Xba Rv)	colección del laboratorio

<b>pSF22</b>	Fusión <b>a1</b> ::GFP para integrar en <i>locus MTL2</i>	# 777 (emgMTL2@-144XhoBsg Rv) # 774 (a1MTL2@-637SacBsgFw ) # 775 (a1MTL2@-1NotRv) # 771 (a1@494noTAA-GFP-RV Bam) # 330 (a1@nt1 Xba Rv)	colección del laboratorio
<b>pSF23</b>	Fusión <b>a1</b> ::GFP <i>MTL1</i> en pGR2.0	# 773 (EMG@135Xho Bsg ) # 769 (BUD5@-424Bam Bsg Rv)	colección del laboratorio
<b>pSF27</b>	Fusión <b>a1</b> ::GFP <i>MTL2</i> en pGR2.0	# 774 (a1MTL2@-637SacBsgFw ) # 777 (emgMTL2@-144XhoBsg Rv)	colección del laboratorio
<b>pSF29</b>	Fusión <b>a1</b> ::GFP <i>MTL1</i> en pGR2.0 sin <i>hph</i>	# 773 (EMG@135Xho Bsg ) # 769 (BUD5@-424Bam Bsg Rv)	colección del laboratorio
<b>pSF33</b>	<i>ORF GFP</i> pOZ16 en pGR2.0	# 409 GFP@ @715bp Bgl II REV # 410 GFP@1bp BamHI FW	colección del laboratorio
<b>pSF35</b>	Fusión <b>a1</b> ::GFP <i>MTL2</i> en pGR2.0 sin <i>hph</i>	# 774 (a1MTL2@-637SacBsgFw ) # 775 (a1MTL2@-1NotRv)	colección del laboratorio

**Tabla 4.** Cepas de utilizadas y generadas en este estudio.

CEPA	GENOTIPO	FENOTIPO	BIBLIOGRAFÍA
<b>CGM1</b>	BG14, <i>ura3Δ</i> (-85 a +932)::Tn903, derivada del aislado clínico BG2	Kn <sup>r</sup>	<i>Cormack et al.1999</i>
<b>CGM531</b>	<i>mtl</i> (1,2,3) $\Delta$	Ura <sup>-</sup>	<i>Salas, 2008</i>
<b>CGM473</b>	CGM1/pMC18	Ura <sup>+</sup>	<i>Medina,2010</i>
<b>CGM514</b>	CGM1/pMC14 GFP::3 UTR	Ura <sup>+</sup>	<i>Medina,2010</i>
<b>CGM1144</b>	CGM531/pSF8 <i>Bsgl</i>	hph <sup>r</sup>	<i>Este trabajo</i>
<b>CGM1145</b>	CGM531/pSF8 <i>Bsgl</i>	hph <sup>r</sup>	<i>Este trabajo</i>
<b>CGM1296</b>	CGM1145/pMZ18 <i>mtl</i> (1,2,3) $\Delta$ a1::GFP <i>MTL1</i>	hph <sup>s</sup>	<i>Este trabajo</i>
<b>CGM1297</b>	CGM1145/pMZ18 <i>mtl</i> (1,2,3) $\Delta$ a1::GFP <i>MTL1</i>	hph <sup>s</sup>	<i>Este trabajo</i>
<b>CGM1298</b>	CGM1144/pMZ18 <i>mtl</i> (1,2,3) $\Delta$ a1::GFP <i>MTL1</i>	hph <sup>s</sup>	<i>Este trabajo</i>
<b>CGM1299</b>	CGM1144/pMZ18 <i>mtl</i> (1,2,3) $\Delta$ a1::GFP <i>MTL1</i>	hph <sup>s</sup>	<i>Este trabajo</i>
<b>CGM1342</b>	CGM1/pSF23 a1::GFP 5' y 3' flanquantes <i>MTL1</i>	hph <sup>r</sup> Ura <sup>+</sup>	<i>Este trabajo</i>
<b>CGM1343</b>	CGM1/pSF23 a1::GFP 5' y 3' flanquantes <i>MTL1</i>	hph <sup>r</sup> Ura <sup>+</sup>	<i>Este trabajo</i>
<b>CGM1344</b>	CGM1/pSF27 a1::GFP 5' y 3' flanquantes <i>MTL2</i>	hph <sup>r</sup> Ura <sup>+</sup>	<i>Este trabajo</i>
<b>CGM1345</b>	CGM1/pSF27 a1::GFP 5' y 3' flanquantes <i>MTL2</i>	hph <sup>r</sup> Ura <sup>+</sup>	<i>Este trabajo</i>
<b>CGM1346</b>	CGM531/pSF23 a1::GFP 5' y 3' flanquantes <i>MTL1</i>	hph <sup>r</sup> Ura <sup>+</sup>	<i>Este trabajo</i>
<b>CGM1347</b>	CGM531/pSF23 a1::GFP 5' y 3' flanquantes <i>MTL1</i>	hph <sup>r</sup> Ura <sup>+</sup>	<i>Este trabajo</i>
<b>CGM1348</b>	CGM531/pSF27 a1::GFP 5' y 3' flanquantes <i>MTL2</i>	hph <sup>r</sup> Ura <sup>+</sup>	<i>Este trabajo</i>
<b>CGM1349</b>	CGM531/pSF27 a1::GFP 5' y 3' flanquantes <i>MTL2</i>	hph <sup>r</sup> Ura <sup>+</sup>	<i>Este trabajo</i>
<b>CGM1358</b>	CGM531/pSF33 ORF del gen GFP en pGRB2.0 sin 3' UTR	fluorescente <sup>-</sup> , Ura <sup>+</sup>	<i>Este trabajo</i>
<b>CGM1359</b>	CGM531/pSF33 ORF del gen <i>GFP</i> en pGRB2.0 sin 3' UTR	fluorescente <sup>-</sup> , Ura <sup>+</sup>	<i>Este trabajo</i>
<b>CGM1360</b>	CGM531/pSF29 a1::GFP <i>MTL1</i> sin hph	Ura <sup>+</sup>	<i>Este trabajo</i>
<b>CGM1361</b>	CGM531/pSF29 a1::GFP <i>MTL1</i> sin hph	Ura <sup>+</sup>	<i>Este trabajo</i>
<b>CGM1362</b>	CGM531/pSF35 a1::GFP <i>MTL2</i> sin hph	Ura <sup>+</sup>	<i>Este trabajo</i>
<b>CGM1363</b>	CGM531/pSF35 a1::GFP <i>MTL2</i> sin hph	Ura <sup>+</sup>	<i>Este trabajo</i>
<b>CGM1364</b>	CGM531/pSF22 <i>Bsgl</i> I	hph <sup>r</sup>	<i>Este trabajo</i>
<b>CGM1365</b>	CGM531/pSF22 <i>Bsgl</i> I	hph <sup>r</sup>	<i>Este trabajo</i>
<b>CGM1366</b>	CGM1364/pMZ21 <i>mtl</i> (1,2,3) $\Delta$ a1::GFP <i>MTL2</i>	hph <sup>s</sup>	<i>Este trabajo</i>
<b>CGM1367</b>	CGM1364/pMZ21 <i>mtl</i> (1,2,3) $\Delta$ a1::GFP <i>MTL2</i>	hph <sup>s</sup>	<i>Este trabajo</i>
<b>DH10</b>	F- <i>mcrA</i> $\Delta$ ( <i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i> ) $\Phi$ 80dlacZ $\Delta$ M15 $\Delta$ lacX74 deoR recA1 endA1 araD139 $\Delta$ (ara,leu)7697 galU galK $\Delta$ -rpsL nupG	Tc <sup>r</sup> Sm <sup>r</sup>	Calvin N M et al, 1988