



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

**POSGRADO EN CIENCIAS EN BIOLOGIA MOLECULAR**

**Construcción de cepas de *Candida glabrata* con deleciones en  
los *loci MTL* y análisis del estado transcripcional en el *locus*  
*MTL1*. Implicaciones en un posible ciclo sexual.**

Tesis que presenta  
**Griselda Edith Salas Delgado**

Para obtener el grado de  
**Maestra en Ciencias en Biología Molecular**

**Director de Tesis**  
**Dra. Irene Beatriz Castaño Navarro**

**San Luis Potosí, S.L.P., Julio 2008**

## ÍNDICE

Constancia de aprobación de tesis	¡Error! Marcador no definido.
Créditos Institucionales	5
Acta de Examen	6
DEDICATORIAS	7
AGRADECIMIENTOS	8
LISTA DE TABLAS	9
LISTA DE FIGURAS	10
INTRODUCCIÓN	14
MATERIALES Y MÉTODOS	30
Cepas utilizadas y construídas de <i>E. coli</i>	30
Oligonucleótidos utilizados	35
Soluciones	35
Medios utilizados para <i>E. coli</i>	36
Medios utilizados para <i>C. glabrata</i>	36
Transformación en <i>E. coli</i>	37
Transformación en <i>C. glabrata</i>	37
Preservación de plásmidos y cepas	38
Extracción de DNA en <i>E. coli</i>	38
Extracción de DNA genómico en <i>C. glabrata</i>	39
Construcción de plásmidos.	39
Comprobación de clonaciones en <i>E. coli</i>	47
Generación de mutantes sencillas, dobles y triples de los loci <i>MTL</i> en <i>C. glabrata</i>	47
Comprobación de la Delección / inserción de los loci <i>MTL</i> en <i>C. glabrata</i>	49
Determinación de la posición y orientación de las inserciones en el locus <i>MTL1</i>	51
Transformación de las inserciones independientes en el locus <i>MTL1</i> de <i>C. glabrata</i>	52
Expresión del gen reportero <i>URA3</i>	53
Reconstitución del gen <i>URA3</i> en las cepas mutantes	55
RESULTADOS	57

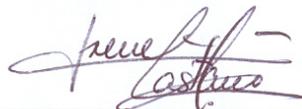
---

<b>La cepa silvestre contiene información tipo “a” en el <i>locus MTL1</i></b>	<b>57</b>
<b>El <i>locus MTL1</i> se encuentra transcripcionalmente activo</b>	<b>59</b>
<b>Cepas con deleciones sencillas, dobles y triples en los <i>loci MTL</i></b>	<b>66</b>
<b>Posible relación entre virulencia y apareamiento</b>	<b>77</b>
<b>DISCUSIÓN</b>	<b>79</b>
<b>REFERENCIAS</b>	<b>86</b>
<b>ANEXOS</b>	<b>88</b>

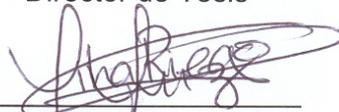


## Constancia de aprobación de la tesis

La tesis “**Construcción de cepas de *Candida glabrata* con deleciones en los loci MTL y análisis del estado transcripcional en el locus MTL1. Implicaciones en un posible ciclo sexual**” presentada para obtener el Grado de de Maestría en Ciencias en Biología Molecular fue elaborada por **Griselda Edith Salas Delgado** y aprobada el **4 de Julio del 2008** 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  
Director de Tesis



Dra. Lina Riego Ruiz  
Asesor de tesis



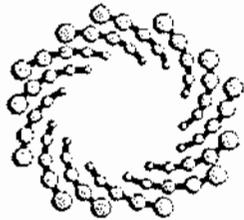
Dr. Gerardo Argüello Astorga  
Asesor de tesis



## **Créditos Institucionales**

Esta tesis fue elaborada en los Laboratorios de **Biotecnología Medica y Pecuaria** y de **Microbiología Molecular** de la División de Biología Molecular del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C., bajo la dirección de la **Dra. Irene Beatriz Castaño Navarro**, apoyada por los proyectos **No. SEP-CB-2005-01-48304 de CONACYT** y **UC-MEXUS-CONACYT grant No. CN-06-53**

Durante la realización del trabajo la autora recibió una beca académica del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología 209281 y del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A. C.



**IPICYT**

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

## Acta de Examen de Grado

El Secretario Académico del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C., certifica que en el Acta 046 del Libro Primero de Actas de Exámenes de Grado del Programa de Maestría en Ciencias en Biología Molecular está asentado lo siguiente:

En la ciudad de San Luis Potosí a los 4 días del mes de julio del año 2008, se reunió a las 10:00 horas en las instalaciones del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C., el Jurado integrado por:

<b>Dr. Gerardo Rafael Argüello Astorga</b>	<b>Presidente</b>	<b>IPICYT</b>
<b>Dra. Irene Beatriz Castaño Navarro</b>	<b>Secretaria</b>	<b>IPICYT</b>
<b>Dra. Lina Raquel Riego Ruiz</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.

**Griselda Edith Salas Delgado**

sobre la Tesis intitulada:

*Construcción de cepas de Candida glabrata con deleciones en los loci MTL y análisis del estado transcripcional en el locus MTL1. Implicaciones en un posible ciclo sexual.*

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 12:00 horas, procediendo a la firma del Acta los integrantes del Jurado. Dando fé el Secretario Académico del Instituto.

A petición de la interesada y para los fines que a la misma convengan, se extiende el presente documento en la ciudad de San Luis Potosí, S.L.P., México, a los 4 días del mes de julio de 2008.

  
**Dr. Marcial Bonilla Martín**  
Secretario Académico

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



## DEDICATORIAS

Dedico este trabajo a mi decisión y entrega hacia una meta que me he propuesto y por la que sigo esforzándome, por la dedicación y tiempo invertidos en una tarea que me apasiona y que me abre las puertas para seguir desarrollándome profesionalmente. Por mi capacidad, que me impulsa a mejorar a cada momento para dar lo mejor de mí y por el compromiso que tengo con las personas, Dra. Irene Castaño Navarro, e instituciones, Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, que me brindaron una excelente preparación, de representarlas dignamente a donde quiera que vaya; me dedico este trabajo.

De igual manera dedico este trabajo a mis hermanos como muestra de sólo un poco de la trascendencia que podemos conseguir al alcanzar cualquier cosa que nos propongamos, porque conozco su capacidad y sé que ellos sobrepasarán mis expectativas. Así mismo esta tesis la dedico a mis padres que siempre están conmigo y por quienes he decidido conseguir un futuro prometedor que me permita ofrecerles lo que se merecen.

Mi tesis de maestría esta dedicada además a Edgar que me ha impulsado siempre a ir por lo que quiero mostrándome la gran capacidad y fuerza que poseo. A mis amigos, que forman parte de mi vida y que me impulsa a seguir adelante: Armando, Marcela y Miguel.

Finalmente dedico este trabajo a la persona más importante y sin la cual no hubiera podido llegar hasta donde estoy, a la Doctora Irene Castaño Navarro quien me ha formado científicamente y quien me brindó esta gran oportunidad de aprender de la investigadora con más éxito y reconocimiento tanto a nivel profesional como personal.

## **AGRADECIMIENTOS**

Agradezco principalmente a mis padres y a mis hermanos por su comprensión y entendimiento ante todos aquellos momentos importantes que me he perdido a su lado y que me perderé para lograr ser una persona exitosa y conseguir lo que quiero, por su apoyo e impulso en cada momento de mi vida.

A Edgar por su impulso y ayuda en mi desarrollo intelectual y personal, agradezco su apoyo para el logro de todas mis metas y cada consejo y aportación a este trabajo. También agradezco el cariño y apoyo de mis amigos Armando, Marcela y Miguel, por compartir conmigo cada momento importante.

Gracias a la Doctora Irene Castaño Navarro por la oportunidad y confianza que me brindó para realizar este trabajo bajo su tutoría. Por su paciencia y apoyo durante el desarrollo de este trabajo, admiro su entusiasmo y entrega a la ciencia que fomentaron en mí a cada momento la satisfacción y gusto por mi trabajo, dándome a la vez una gran visión que influyó en mis metas profesionales.

Al Doctor Alejandro de las Peñas por sus comentarios y consejos a lo largo de este trabajo que me hicieron crecer y formarme con la calidad necesaria para seguir adelante. Le agradezco al Doctor Ángel Alpuche su apoyo y la oportunidad que me brindó al recibirme, permitiéndome así conocer las múltiples opciones que ofrece esta Institución. De igual manera quiero agradecer a los Doctores Gerardo Argüello y Lina Riego por sus aportaciones y apoyo a este trabajo para su desarrollo.

Finalmente quiero agradecer al Doctor López Revilla por su comprensión y por sus consejos en la escritura de este trabajo, así como por la ayuda proporcionada al permitirnos trabajar en su laboratorio.

## LISTA DE TABLAS

<b>Tabla 1</b> Genes involucrados en el proceso de apareamiento en <i>S. cerevisiae</i> ...	<b>25</b>
<b>Tabla 2</b> Genes inducidos por la feromona $\alpha$ en <i>S. cerevisiae</i> y <i>C. albicans</i> ...	<b>27</b>
<b>Tabla 3</b> Cepas utilizadas y construidas en <i>E. coli</i>	<b>30</b>
<b>Tabla 4</b> Cepas utilizadas y construidas en <i>C.glabrata</i>	<b>33</b>
<b>Tabla 5</b> Plásmidos construidos con las inserciones a lo largo del <i>locus MTL1</i>	<b>61</b>
<b>Tabla 6</b> Cepas construidas con las diferentes inserciones en el <i>locus MTL1</i> ...	<b>63</b>
<b>Tabla 7</b> Plásmidos con los fragmentos 5' y 3' del <i>locus MTL1</i> construidos	<b>67</b>
<b>Tabla 8</b> Cepas construidas con las deleciones en los <i>loci MTL</i> y sus genotipos	<b>76</b>
<b>Tabla 9</b> Cepas construidas con las deleciones en los <i>loci MTL</i> reconstituidas	<b>78</b>

---

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b>	
Reproducción sexual y proceso de meiosis	15
<b>Figura 2</b>	
Los <i>loci</i> de apareamiento en <i>S. cerevisiae</i>	17
<b>Figura 3</b>	
<i>Locus MTL</i> de apareamiento de <i>C. albicans</i>	18
<b>Figura 4</b>	
Genes inducidos por la feromona $\alpha$ en <i>C. albicans</i>	21
<b>Figura 5</b>	
Árbol filogenético de DNA ribosomal	22
<b>Figura 6</b>	
Esquema comparativo de los <i>loci</i> de apareamiento de <i>S. cerevisiae</i> , <i>C. albicans</i> y <i>C. glabrata</i>	23
<b>Figura 7</b>	
Vía de señalización ante la feromona $\alpha$ en <i>S. cerevisiae</i> conservada	24
<b>Figura 8</b>	
Proceso de “switch” fenotípico en <i>C. glabrata</i> , 4 diferentes fenotipos	26
<b>Figura 9</b>	
Plásmido pIC122 que contiene el <i>locus MTL1</i>	40
<b>Figura 10</b>	
Imagen de la clonación de los fragmentos 3' y 5' que flanquean el	41
<b>Figura 11</b>	
Plásmido final pSD7 que contiene los fragmentos 3' y 5' que flanquean	43
<b>Figura 12</b>	
Plásmido pIC6, cepa 1374, contiene un Tn7 modificado, con el gen reportero <i>URA3</i> y el gen que confiere resistencia a <i>Kanamicina</i>	44
<b>Figura 13</b>	
Reacciones de transposición para las inserciones del Tn7 en el <i>locus MTL1</i>	46
<b>Figura 14</b>	
Imagen del plásmido pMZ18 que codifica el gen de la proteína FLP	48
<b>Figura 15</b>	
Imagen de las comprobaciones mediante PCR de las deleciones/inserciones	49
<b>Figura 16</b>	
PCR de la eliminación del casete de resistencia a <i>higromicina</i>	50
<b>Figura 17</b>	
Determinación de la posición de las inserciones mediante PCR de colonia	51
<b>Figura 18</b>	
Digestión de los plásmidos obtenidos con <i>Mfe I</i> para transformar	52
<b>Figura 19</b>	
PCR para encontrar colonias con las inserciones en el genoma	53
<b>Figura 20</b>	
Diluciones seriadas de las cepas con las inserciones del gen reportero <i>URA3</i>	54

---

<b>Figura 21</b>	
Reconstitución del gen <i>URA3</i> en las cepas con deleciones de los <i>loci MTL</i> , tamaños de los fragmento de PCR	56
<b>Figura 22</b>	
Información de apareamiento en los diferentes <i>loci MTL</i> de nuestra	58
<b>Figura 23</b>	
Construcción del plásmido pSD10 al eliminar la resistencia a <i>Kanamicina</i>	59
<b>Figura 24</b>	
Inserciones finales que utilizamos para transformar en <i>C. glabrata</i>	60
<b>Figura 25</b>	
Búsqueda de las inserciones en el <i>locus MTL1</i> del genoma de <i>C. glabrata</i>	62
<b>Figura 26</b>	
Estado transcripcional de la cromatina a lo largo del <i>locus MTL1</i> mediante	64
<b>Figura 27</b>	
Comparación entre el estado transcripcional de los <i>loci</i> de apareamiento	66
<b>Figura 28</b>	
Construcción de la primera mutante sencilla en el <i>locus MTL1</i> por doble recombinación homóloga	68
<b>Figura 29</b>	
Delección del <i>locus mtl1<math>\Delta</math></i> y su genotipo con información tipo a del <i>locus MTL2</i>	69
<b>Figura 30</b>	
Eliminación del casete de resistencia a <i>higromicina</i> mediante la recombinasa FLP de la cepa con la delección en el <i>locus MTL1</i>	70
<b>Figura 31</b>	
Doble recombinación homóloga para la delección del <i>locus MTL3</i> en la cepa <i>mtl1<math>\Delta</math></i>	71
<b>Figura 32</b>	
Eliminación del casete de resistencia a higromicina del <i>locus MTL3</i> en la cepa <i>mtl1<math>\Delta</math>,mtl3<math>\Delta</math></i> , y su genotipo	72
<b>Figura 33</b>	
Doble recombinación homóloga para la delección del <i>locus MTL2</i> en la cepa <i>mtl1<math>\Delta</math></i> y eliminación del casete de resistencia a <i>higromicina</i> , <i>mtl1<math>\Delta</math>,mtl2<math>\Delta</math></i>	73
<b>Figura 34</b>	
Genotipo de la cepa doble mutante <i>mtl1<math>\Delta</math>,mtl3<math>\Delta</math></i>	74
<b>Figura 35</b>	
Triple mutante en los <i>loci MTL</i> , <i>mtl1<math>\Delta</math>,mtl2<math>\Delta</math>,mtl3<math>\Delta</math></i>	75

## RESUMEN

### **Construcción de cepas de *Candida glabrata* con deleciones en los loci *MTL* y análisis del estado transcripcional en el locus *MTL1*. Implicaciones en un posible ciclo sexual.**

*C. glabrata* es una levadura haploide, patógena oportunista, considerada asexual; sin embargo, conserva genes ortólogos a los de *Saccharomyces cerevisiae* relacionados con el proceso de apareamiento, meiosis y esporulación. Los genes que controlan el apareamiento se encuentran localizados en los loci *MTL1*, *MTL2* y *MTL3*. *MTL1* y *MTL3* se encuentran en el cromosoma B y *MTL2* en el E. Se cree que *MTL1* es el locus que se expresa y que *MTL2* y *MTL3*, que se encuentran localizados cerca de sus respectivos telómeros, a 11 y 29 Kb de ellos respectivamente, son probablemente silenciosos. Estos loci pueden tener información de tipo “a” o “ $\alpha$ ”, presentando diferentes combinaciones.

Dado que *C. glabrata* posee genes homólogos a los que controlan el apareamiento en *S. cerevisiae*, nos preguntamos si podría desarrollar un proceso de apareamiento bajo ciertas condiciones, o bien si estos genes han sido conservados por su participación como reguladores transcripcionales en otros procesos, tales como la virulencia. *C. albicans*, otro patógeno oportunista relacionado filogenéticamente a *C. glabrata*, responde a la feromona  $\alpha$  activando genes involucrados en virulencia.

En este trabajo clonamos y secuenciamos el locus *MTL1* de *C. glabrata* y determinamos que nuestra cepa silvestre tiene información tipo “a” en este locus. Para determinar si este locus es transcripcionalmente activo realizamos inserciones del gen reportero *URA3* y observamos mediante ensayos de crecimiento en medio YPD, CAA (sin uracilo) y 5-FOA, la expresión del locus

---

*MTL1*. Encontramos que la región del *locus MTL1* se encuentra transcripcionalmente activa, ya que cinco inserciones diferentes del reportero *URA3* a lo largo del *locus*, expresan este gen. Construimos cepas con deleciones sencillas, dobles y triples de cada uno de los *loci MTL*, a las cuales se les reconstituyó el gen *URA3*, que se utilizarán para realizar experimentos de infección sistémica en ratón para conocer si existe una posible relación entre apareamiento y virulencia.

Estas cepas con deleciones sencillas, dobles y triples en los *loci MTL* permitirán conocer la expresión de cada uno de los genes presentes en cada *locus*, y reconstituir cepas que expresen solamente información tipo **a** o bien tipo **α**, lo cual nos permitirá buscar experimentalmente condiciones propicias para que el proceso de apareamiento se lleve a cabo.

## INTRODUCCIÓN

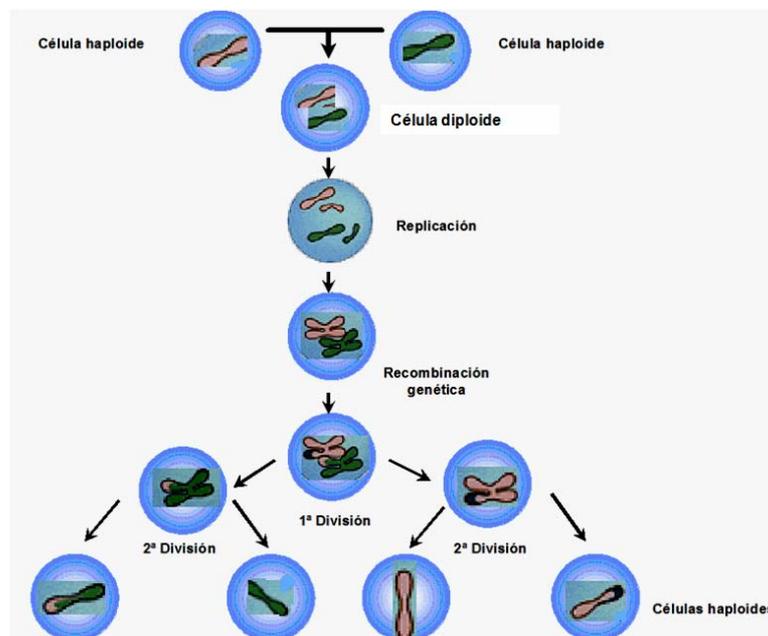
Diversas infecciones oportunistas afectan a pacientes deprimidos inmunológicamente; sin embargo, en los últimos años la incidencia de estas infecciones ha aumentado considerablemente.

Las levaduras del género *Candida* forman parte de la flora normal en humanos, en una relación natural de comensalismo; sin embargo, debido a diversas alteraciones tanto en el sistema inmunológico como en la microflora, se propicia el desarrollo de infecciones oportunistas importantes.

Estas levaduras son responsables de hasta el 15% de todas las infecciones sistémicas hospitalarias, y en los últimos años se han realizado estudios que demuestran que aunque *Candida albicans* sigue siendo la especie más frecuente, los casos causados por otras levaduras como *Candida parapsilosis*, *Candida tropicalis*, *Candida krusei* y *Candida glabrata* han incrementado su frecuencia, y exhiben una mayor resistencia a los antifúngicos considerados hasta hace algunos años de primera elección (Reyna-Figueroa et al., 2007).

Varios hongos patógenos de humanos parecen no tener reproducción sexual, se ha argumentado que esta reproducción podría ser desventajosa para la colonización de tejidos. En *C. albicans* la reproducción sexual origina células tetraploides que posteriormente, por pérdida al azar de cromosomas, generan células diploides nuevamente; sin embargo, esta pérdida al azar puede causar la muerte o deficiencia de la levadura en el proceso de patogenicidad (Bennett et al., 2003).

La reproducción sexual es el proceso por el cual dos células que contienen diferente información genética se unen y recombinan su información, lo que produce progenie genótipicamente diferente que puede adaptarse al ambiente cambiante que la rodea (Fig. 1). Este tipo de reproducción juega un papel crucial en la redistribución de genes, generando diversidad a través de la recombinación genética, lo que permite la evolución de especies y la aparición de variantes beneficiosas mejor adaptadas para sobrevivir.



**Figura 1. Reproducción sexual y proceso de meiosis.** Esquema representativo de la reproducción sexual.

Modificado de [http://www.harlem-school.com/10TH/sci\\_pdf/sci.html](http://www.harlem-school.com/10TH/sci_pdf/sci.html)

Es interesante que diversos hongos patógenos no lleven a cabo el proceso de apareamiento y las poblaciones aisladas son principalmente clonales. De hecho, existen levaduras asexuales como *Candida parapsilosis*, que definitivamente al no requerir de este proceso perdió toda esta maquinaria

.....  
(Heitman *et al.*, capítulo III, 2007). Sin embargo muchos de estos hongos, si bien no presentan aparentemente un ciclo de reproducción sexual, sí han conservado casi todos los genes necesarios para hacerlo. Esto lleva a la pregunta de ¿cómo es que pueden sobrevivir a ambientes cambiantes sin esta recombinación?, y más importante aún, si no requieren de este proceso, ¿por qué conservan toda la maquinaria necesaria para el proceso de apareamiento?

Una posible explicación es que quizás los genes que participan en este proceso de apareamiento jueguen un papel adicional al de simplemente proveer un mecanismo de recombinación genética en la población y por este motivo sea indispensable su conservación para la sobrevivencia de la levadura.

En el caso de *C. glabrata* y *C. albicans*, levaduras patógenas oportunistas que conservan toda esta maquinaria de apareamiento, podría existir una presión selectiva para mantener este sistema, si es que éste jugara un papel importante en virulencia u otro proceso importante para el comensalismo.

*C. glabrata* es una levadura del grupo de los ascomicetos, con un genoma haploide compuesto de 13 cromosomas. Desde que se describió, se ha considerado asexual. *C. glabrata* es filogenéticamente más cercana a *Saccharomyces cerevisiae* que a *C. albicans*, y cuenta con un gran número de genes ortólogos involucrados en diferentes procesos (Wong *et al*, 2003).

En *S. cerevisiae* el apareamiento se regula por los genes codificados en el *locus MAT*, que contiene genes que codifican para factores transcripcionales que pueden ser de tipo “a” o “ $\alpha$ ”. *S. cerevisiae* contiene además dos *loci* llamados *HML* y *HMR* que contienen información idéntica al *locus MAT*, “ $\alpha$ ” y “a” respectivamente (Fig. 2). El único *locus* que se expresa es el *MAT*, y los otros dos se encuentran silenciosos a través de un mecanismo muy eficiente de

silenciamiento que depende de secuencias en *cis* que flanquean a estos *loci*, y de varias proteínas de silenciamiento codificada en el genoma (Zou et al., 2006).

### *Saccharomyces cerevisiae*



**Figura 2. Los *loci* de apareamiento en *S. cerevisiae*.** *Loci de apareamiento de la levadura S. cerevisiae* ubicados en el cromosoma III, solo el locus MAT se encuentra activo y puede contener información de tipo a o  $\alpha$ . Los loci HML y HMR se encuentran silenciosos y casi siempre cuentan con información tipo  $\alpha$  y a respectivamente. CROM III – Cromosoma III de *S. cerevisiae*, TEL – Telómeros, off – indica que el locus se encuentra silencioso, on - indica que el locus se encuentra activo.

La regulación negativa por silenciamiento de las copias adicionales de la información tipo  $\alpha$  y tipo a en los *loci* HML y HMR permite que la célula exprese un solo tipo de información. Esto es indispensable para que se lleve a cabo el proceso de apareamiento, ya que de lo contrario la célula contaría con ambos tipos de información, como si fuese diploide, y no llevaría a cabo este proceso.

El apareamiento en *S. cerevisiae* se da entre células haploides que expresan cada una un tipo distinto de información de apareamiento a partir del *locus* MAT (una célula tipo a con otra tipo  $\alpha$ ). Una vez que se aparean, se genera una célula diploide que expresa ambos tipos de información de apareamiento (células a/ $\alpha$ ). La expresión simultánea de la información a y  $\alpha$  tiene como consecuencia la expresión de una serie de genes indispensables para la meiosis y esporulación, y al mismo tiempo para la regulación negativa de otro conjunto de genes que se expresan específicamente en cada uno de los tipos de células haploides (Herskowitz et al., 1992; Rusche et al., 2003).

Las células haploides de *S. cerevisiae* pueden cambiar de ser *MATa* a *MAT $\alpha$*  y viceversa por un mecanismo de conversión génica en el que la información genética del *locus MAT*, se reemplaza por la contenida en los *loci* silenciosos, mediante la recombinasa HO.

*C. albicans* también se consideró asexual desde que se describió, pero recientemente se descubrió que posee genes de apareamiento similares a los encontrados en *S. cerevisiae*, denominados *MTL* (Mating-Type Like) (Fig. 3) (Hull and Johnson, 1999). Sin embargo, a diferencia de *S. cerevisiae*, *C. albicans* es una levadura patógena diploide, que contiene dos copias de la información involucrada en este proceso (Johnson et al., 2003, Noble et al., 2007).

### *Candida albicans*



**Figura 3. Locus *MTL* de apareamiento de *C. albicans*.** *C. albicans* una levadura diploide cuenta con el locus de apareamiento *MTL* ubicado en el cromosoma 5, la mayoría de las cepas aisladas cuentan información de tipo *a* y  $\alpha$ . *On* - indica que el locus se encuentra activo, *CROM 5* – Cromosoma 5 de *C. albicans*, *TEL* – Telómeros.

La mayoría de las cepas de laboratorio y aislados clínicos estudiados son heterocigotos para el *locus MTL* y expresan ambos tipos de apareamiento, *a*/ $\alpha$ , lo cual puede explicar, al menos en parte, por qué no se había encontrado un ciclo sexual.

Para tratar de inducir un ciclo sexual, *Hull et al. (2000)* y *Mcgee et al. (2000)*, construyeron cepas que solamente presenten un tipo de información de apareamiento en el *locus MTL*, cepas homocigotas **a/a**,  **$\alpha/\alpha$** ; o bien cepas con una mutación nula del *locus MTL* en uno de los dos cromosomas, **a/ $\Delta$**  y  **$\alpha/\Delta$**  y que por lo tanto solamente expresan información **a** o  **$\alpha$**  respectivamente. Con estas cepas, se logró inducir el proceso de apareamiento entre ambas cepas bajo condiciones de laboratorio e *in vivo*, en un modelo de infección en ratones.

El proceso de apareamiento en *C. albicans* está sujeto además a mecanismos reguladores únicos que incluyen un paso adicional de control en relación al apareamiento de *S. cerevisiae*. *C. albicans* requiere primero producir un cambio en la morfología de la colonia llamado “switch fenotípico” donde las colonias cambian de una morfología blanca y abombada, a una morfología “opaca” y plana formada por células alargadas y más oscuras (*Bennett et al., 2005*).

Este cambio en la morfología de la colonia es estocástico y ocurre a una baja frecuencia. El switch fenotípico está controlado por procesos epigenéticos (*Zordan et al., 2006*), que involucran a los reguladores transcripcionales del *locus MTL*, los cuales a su vez regulan la expresión del gen *WOR1*, el cual es indispensable para inducir el cambio morfológico. Una vez que se activa la transcripción de *WOR1*, ésta se mantiene por generaciones. Esto se debe a que Wor1p activa su propia transcripción uniéndose a su promotor lo que resulta en la acumulación de esta proteína en células opacas. En células blancas por el contrario, Wor1p se encuentra presente en muy bajos niveles. Wor1p contiene motivos de unión al DNA y regula la expresión de otros genes involucrados en este proceso.

Este switch fenotípico o cambio en la morfología de la colonia está controlado también por los genes de apareamiento expresados en el *locus MTL*; de tal manera que para llevar a cabo este cambio fenotípico la célula debe tener información homocigota en el *locus MTL* y expresar un sólo tipo de apareamiento, “**a**” o “**α**”; una vez que se ha llevado a cabo el switch fenotípico el apareamiento es mucho más eficiente.

Las células opacas expresan una batería de genes distinta a la información genética expresada en células blancas, y estos estados se heredan durante varias generaciones. La presencia de los factores transcripcionales **a1** y **α2** que forman el complejo represor **a1/α2**, reprime la expresión del gen *WOR1*, cerrando el circuito de expresión. Entre los genes que se expresan diferencialmente entre células opacas y células blancas, están aquellos que se requieren para la respuesta a la feromona de apareamiento, y esto puede explicar en parte por qué solamente las células opacas, y no las blancas, son competentes para aparearse (*Noble et al., 2007*).

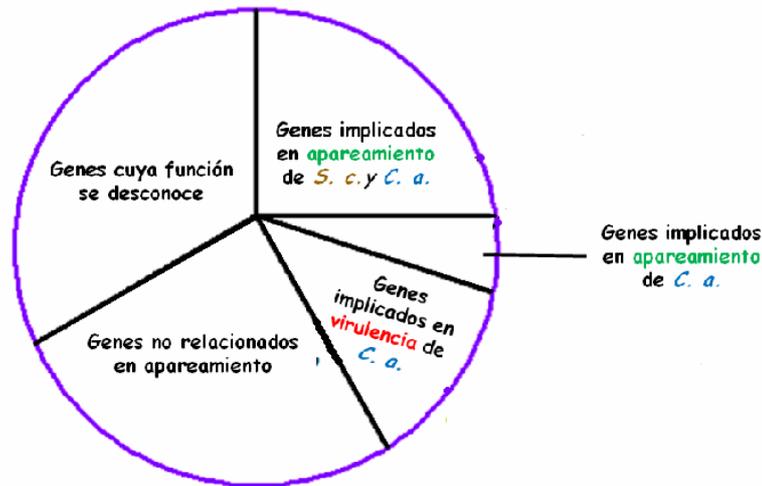
Cepas de *C. albicans* que son heterocigotas en el *locus MTL* tienen una pequeña ventaja en la virulencia y competitividad para la colonización de tejidos dentro del hospedero comparadas con cepas homocigotas (*Wei et al., 2007, Lockhart et al., 2005*). Es posible que estos factores transcripcionales regulen vías implicadas en virulencia (*Bennett et al., 2003, Nielsen et al., 2007*).

Además el proceso de switch fenotípico le da la ventaja a la levadura de tener dos tipos celulares distintos que tienen la capacidad para colonizar diferentes tejidos, lo que le proporciona ventajas para adaptarse a las condiciones cambiantes durante la interacción con el hospedero. Por ejemplo, células del tipo “opacas” son sensibles a temperaturas altas y son más eficientes que las células “blancas” para colonizar la piel en un modelo de colonización en ratones; este

fenómeno podría estar relacionado con la virulencia y capacidad de colonización (Kvaal *et al.*, 1999; Lachke *et al.*, 2003).

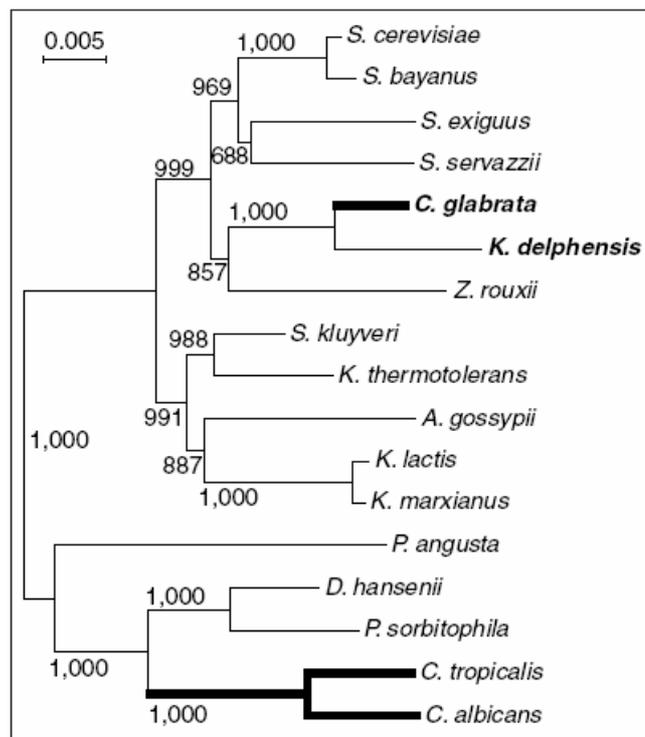
*C. albicans* cuenta además con genes que codifican para las feromonas involucradas en el proceso de apareamiento, en el caso de células con información tipo **a/a**, la feromona **a**, y en células tipo **α/α**, para la feromona **α** (Bennett *et al.*, 2003). Como se mencionó anteriormente, células del tipo “opacas” tienen un patrón de expresión genética característico. Las células opacas con información tipo “a” responden a la feromona sexual “α” y reprograman la expresión genética para inducir genes involucrados en el proceso de apareamiento (Panwar *et al.*, 2003; Dignard *et al.*, 2007).

**62 genes inducidos por la feromona α en *C. albicans***



**Figura 4. Genes inducidos por la feromona α en *C. albicans*.** Mediante microarreglos en cepas de *C. albicans* a las cuales se les trató con la feromona α, se observó la inducción de 62 genes, de los cuales algunos están involucrados en el proceso de apareamiento en *S. cerevisiae* y *C. albicans*, otros genes también implicados en el proceso de apareamiento solo se encuentran en *C. albicans*, de algunos más su función se desconoce y otros genes inducidos por la feromona están relacionados en otros procesos. Sin embargo, 7 de los 62 genes inducidos por la feromona α están involucrados en virulencia. Modificado de Bennett *et al.*, 2003. S. c. – *S. cerevisiae*, C. a. - *C. albicans*

De estos 62 genes inducidos por el factor “ $\alpha$ ” destaca un grupo de 7 genes algunos de los cuales codifican para proteínas de pared celular importantes en la virulencia (Fig. 4); esto sugiere que algunas de las proteínas que median la comunicación celular durante el apareamiento, también pudieran mediar interacciones entre *C. albicans* y las células del hospedero.



**Figura 5. Árbol filogenético de DNA ribosomal.** Tomado de Wolfe et al., 2003, las líneas oscuras muestran los linajes asexuales, el árbol se construyó mediante en método de neighbor-joining y valores de bootstrap se muestran en cada nodo (1,000 replicas)

Sorprendentemente *C. glabrata*, presenta una relación filogenética más estrecha con *S. cerevisiae* que con la levadura patógena *C. albicans*; sin embargo también comparte diferentes genes ortólogos con esta ultima Tabla 2. Árboles filogenéticos de DNA ribosomal (Fig. 5), revelan que está más

cercana filogenéticamente a *S. cerevisiae*, y que cuenta con genes ortólogos a los implicados en los procesos de apareamiento, meiosis y esporulación (Wong et al., 2003).

Los genes que controlan el apareamiento se encuentran localizados en los loci *MTL1*, *MTL2* y *MTL3*; *MTL1* y *MTL3* se encuentran en el cromosoma B, *MTL2* en el cromosoma E (Srikantha et al, 2003) (Fig. 6). Se cree que *MTL1* es el locus de expresión y que *MTL2* y *MTL3*, que se encuentran localizados cerca del telómero a 29 y 11 Kb de este respectivamente, probablemente se encuentran silenciosos. *MTL1* puede tener información de tipo “a” o “ $\alpha$ ” y los loci *MTL2* y *MTL3* generalmente contienen información tipo “a” y “ $\alpha$ ”, respectivamente.

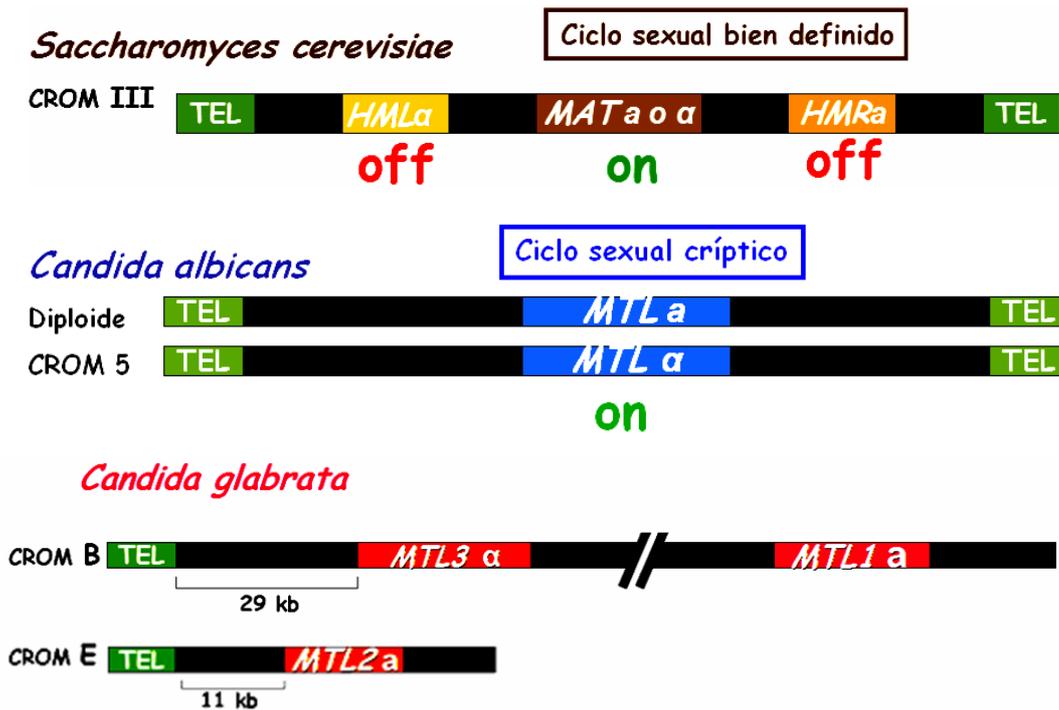


Figura 6. Esquema comparativo de los loci de apareamiento de *S. cerevisiae*, *C. albicans* y *C. glabrata*. Comparación de los loci de apareamiento presentes en *S. cerevisiae*, *C. albicans* y *C. glabrata*. CROM III – Cromosoma III de *S. cerevisiae*, CROM 5 – Cromosoma 5 de *C. albicans*, CROM E – Cromosoma E de *C. glabrata*, CROM B – Cromosoma B de *C. glabrata*, TEL – Telómeros.

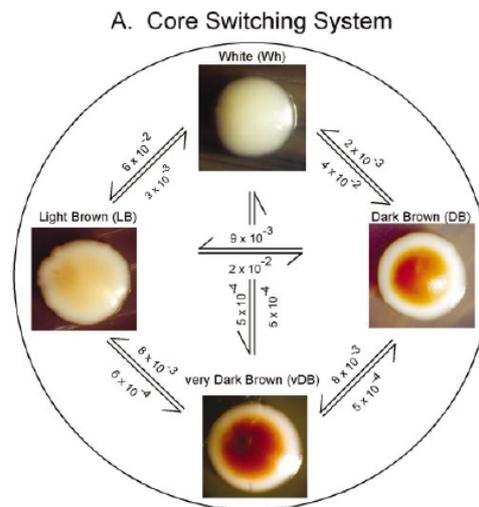


Cuatro de los genes restantes están específicamente en *S. cerevisiae* y participan en etapas tempranas de la recombinación meiótica y en el procesamiento de RNAm durante la meiosis. El último de los genes que no se encuentran presentes en *C. glabrata* es el gen *SIR1* que se requiere para el establecimiento de cromatina silenciosa en *S. cerevisiae* (Rusche et al., 2003); sin embargo, trabajo previo del laboratorio sugiere que a pesar de no existir el gen *SIR1*, *C. glabrata* es capaz de establecer zonas de cromatina silenciosa en regiones subteloómicas (Tabla 1). (De las Peñas et al., 2005).

**Tabla 1. Genes involucrados en el proceso de apareamiento en *S. cerevisiae* y genes parálogos presentes en *C. glabrata***

GEN	<i>S. cerevisiae</i>	Parálogo <i>S. cerevisiae</i>	DESCRIPCIÓN	Parálogo <i>C. glabrata</i>
<i>AFR1</i>	YDR085C	YER158c	Regulador negativo del receptor de la feromona alfa.	CAGLOI08591
<i>DIG2</i>	YDR480W	YPL049c (DIG1)	Regulador de genes específicos de apareamiento y de crecimiento invasivo.	CAGLOL12782
<i>FIG2</i>	YCR089W	YNR044w (AGA1)	Adhesina de pared celular.	CAGLOC03575
<i>MCK1</i>	YNL307C	YOL128c (YGK3)	Controla la segregación de cromosomas y la entrada a la meiosis.	CAGLOE01683
<i>SPS18</i>	YNL204C	YDL226c	Proteína con dominio de unión a Zn inducida en esporulación.	CAGLOG05445
<i>SSF1</i>	YHR066W	YDR312w (SSF2)	Requerido para la maduración de la subunidad grande del ribosoma.	CAGLOJ10890
<i>MER1</i>	YNL210W	NO	Necesario para el procesamiento de mRNAs meióticas y para la recombinación meiótica.	NO
<i>REC104</i>	YHR157W	NO	Involucrada en estadios tempranos de la recombinación meiótica.	NO
<i>SIR1</i>	YKR101W	NO	Represión transcripcional de los loci de apareamiento <i>HML</i> y <i>HMR</i> .	NO
<i>SPO20</i>	YMR017W	NO	Requerida para la formación de la membrana durante la esporulación.	NO
<i>SPO71</i>	YDR104C	NO	Proteína específica de meiosis requerida para la formación de la pared de la espora.	NO

Además se ha comprobado que *C. glabrata* puede llevar a cabo un tipo de “switch” fenotípico, que es el proceso adicional que requiere llevar a cabo *C. albicans* para el apareamiento. El switch de *C. glabrata* consiste en cambiar espontáneamente a 4 tipos diferentes de colonia en agar con 1mM de  $\text{CuSO}_4$  (Fig. 8). Brockert et al. (2003) realizaron un estudio de diferentes cepas procedentes de distintos sitios de colonización y comprobaron que una sola cepa de *C. glabrata* infecta diferentes sitios y esta clona puede llegar a producir cambios fenotípicos en cada tejido, produciendo así diferentes tipos de colonia dependientes del sitio de colonización del que provengan.



**Figura 8. Proceso de “switch” fenotípico en *C. glabrata*, 4 diferentes fenotipos.** Tomado de Soll et al., 2002. Proceso adicional necesario para el apareamiento en *C. albicans*, el Switch fenotípico; este cambio en la morfología de la colonia también se presenta en *C. glabrata* (agar con  $\text{CuSO}_4$ ), los cambios fenotípicos observados son: blanco, café claro, café oscuro y café muy oscuro. Se muestran las frecuencias en las que se presentan estos cambios.

Estos datos sugieren que *C. glabrata* ha conservado los genes necesarios para el proceso de apareamiento aunque este proceso no se lleve a cabo de

manera espontánea. Es posible que *C. glabrata* pudiera desarrollar un ciclo sexual bajo ciertas condiciones; incluso, una hipótesis interesante es que un posible ciclo sexual este relacionado con el proceso de virulencia. Esta relación podría consistir por ejemplo, en que los factores de transcripción codificados en los *loci* MTL regularan la expresión de genes importantes para la virulencia, y/o que *C. glabrata* mantuviera reprimido el ciclo sexual para que algunos genes importantes para la sobrevivencia dentro del hospedero no se perdieran como consecuencia de la recombinación genética durante la reproducción sexual. Esto favorecería la conservación de toda la maquinaria de la reproducción sexual, pero principalmente manteniendo reprimida la mayor parte del tiempo la capacidad de apareamiento en condiciones normales. Algunos ejemplos de genes de *C. albicans* inducidos por la feromona  $\alpha$  que están implicados en crecimiento filamentoso, adherencia o virulencia se muestran en la Tabla 2.

**Tabla 2. Genes inducidos por la feromona  $\alpha$  en *S. cerevisiae* y *C. albicans* que participan en apareamiento, crecimiento filamentoso y virulencia. También se muestran sus ortólogos en *C. glabrata***

GENES <i>C. albicans</i>	GENES <i>S. cerevisiae</i>	FUNCIÓN	GENES <i>C. glabrata</i>
<b>Genes de apareamiento</b>			
<i>STE2</i>	<i>STE2</i>	Receptor de la feromona $\alpha$ .	<i>CAGLOK12340g</i>
<i>AXL1</i>	<i>AXL1</i>	Maduración del factor $\alpha$ .	<i>CAGLOD04686g</i>
<i>HST6</i>	<i>STE6</i>	Exportador del factor $\alpha$ .	<i>CAGLOK00363g</i>
<b>Genes requeridos para el crecimiento filamentoso</b>			
<i>CPH1</i>	<i>STE12</i>	Regulador transcripcional	<i>CAGLOH21454g</i>
<i>CST20</i>	<i>STE20</i>	Componentes de la cascada de la MAP-kinasa.	<i>CAGLIOMI0153g</i>
<i>HST7</i>	<i>STE7</i>	MAPKcinasa que se requiere para apareamiento y crecimiento filamentoso.	<i>CAGLOL01771g</i>
<b>Genes implicados en virulencia en <i>C. albicans</i></b>			
<i>HWPI</i>	-	Adhesina	EPAs
<i>SAP4, 5, 6</i>	<i>YPS3</i>	Aspartil-proteasas	<i>CGYPS3</i> <i>CAGLOE01727g</i>
<i>RBT4</i>	<i>PRY1</i>	Proteína de secreción.	<i>CAGLOGO7667g</i>

El interés general de nuestro laboratorio es entender el proceso de patogenicidad de *C. glabrata* e identificar los factores de virulencia importantes para este proceso, así como los genes necesarios para sobrevivir en el hospedero. Es importante determinar si *C. glabrata* al contar con genes necesarios para llevar a cabo el proceso de apareamiento, bajo condiciones especiales puede aparearse, o bien investigar por qué ha conservado este grupo de genes a lo largo del tiempo. Una característica importante es que *C. glabrata* comparte homología con *C. albicans*, la cual presenta una inducción de genes relacionados con virulencia en respuesta al factor  $\alpha$ . Estos genes también se encuentran presentes en *C. glabrata* lo cual podría ser la razón para conservar esta compleja maquinaria.

Existen reportes de que el *locus MTL1* es el *locus* de expresión (Fabre *et al.*, 2004), por lo cual en este trabajo nos enfocamos en este *locus*, el cual clonamos para establecer el tipo de apareamiento de nuestra cepa tipo. Además determinamos el estado transcripcional de la cromatina en este *locus* utilizando inserciones del gen reportero *URA3* a lo largo del mismo. Posteriormente construimos las cepas con deleciones sencillas, dobles, y triples de los *loci MTL* para determinar la expresión de los genes presentes en estos *loci*, así como para encontrar cuál o cuales de estos *loci* se encuentran transcripcionalmente activos.

Como se mencionó anteriormente para que pueda llevarse a cabo el proceso de apareamiento se requiere que la célula solo exprese un tipo de información, por lo cual es importante conocer la expresión de los *loci* de apareamiento de *C. glabrata*, ya que si existe expresión de más de un *locus* podría significar la expresión de dos tipos de información, tal como lo hace una célula diploide, lo que imposibilitaría su apareamiento.

Realizamos la construcción de cepas con diferentes combinaciones de deleciones en los *loci* de apareamiento, para generar mutantes sencillas, dobles y triples de los *loci MTL*. Esta batería de cepas se utilizarán para realizar estudios de expresión de cada uno de los genes presentes en cada *locus*, mediante RT-PCR. También se utilizarán posteriormente reconstituir cepas con diferente información, a fin de buscar condiciones necesarias para el proceso de apareamiento.

Realizamos la reconstitución del gen *URA3* en todas nuestras cepas construidas con deleciones de los *loci MTL* para colaborar con el Doctor Brendan Cormarck (Universidad de Johns Hopkins, USA), y llevar a cabo experimentos *in vivo* utilizando un modelo murino de infección por vía sanguínea. Utilizaremos la cepa con la deleción total de los tres *loci*, así como las mutantes sencillas y dobles, para analizar una posible relación entre apareamiento y virulencia.

## MATERIALES Y MÉTODOS

Todas las cepas de *E. coli* utilizadas para tanto para transformar y para la construcción de plásmidos se presentan en la Tabla 3. Y las cepas que se utilizaron para las diferentes construcciones realizadas de *C. glabrata* se presentan en la Tabla 4.

Tabla 3. Cepas utilizadas y generadas de *E. coli*

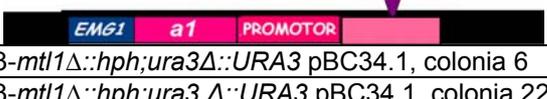
CEPA	NOMBRE	GENOTIPO	RESISTENCIA	REFERENCIA
<b>Cepas utilizadas</b>				
1396	DH10	F <sup>-</sup> <i>mcrA</i> Δ( <i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i> ) φ80 <i>dlacZ</i> Δ <i>M15</i> Δ <i>lacX74</i> <i>deoR</i> <i>recA1</i> <i>endA1</i> <i>araD139</i> Δ( <i>ara,leu</i> )7697 <i>galU</i> <i>galK</i> λ <sup>-</sup> <i>rpsL</i> <i>nupG</i>	-	Calvin N M et al., 1988
1410	pcnB	DH10 <i>pcnB</i> <sup>-</sup>	-	Calvin N M et al., 1988
	DH5α	F <sup>+</sup> / <i>endA1</i> <i>hsdR17</i> ( <i>r<sub>k</sub>-m<sub>k</sub></i> ) <i>glnV44</i> <i>thi-1</i> <i>recA1</i> ( <i>Naf</i> ) <i>relA1</i> Δ( <i>lacIZYA-argF</i> ) <i>U169</i> <i>deoR</i> (φ80 <i>dlac</i> Δ( <i>lacZ</i> ) <i>M15</i> )	-	Woodcock et al., 1989 Raleigh, et al., 1989
	BW23473	Δ <i>lac-169</i> <i>robA1</i> <i>creC510</i> <i>hsdR514</i> <i>endA</i> <i>recA</i> Δ <i>vidA::pir</i> <sup>+</sup>	-	Haldiman et al, 1996
<b>Plásmidos utilizados</b>				
1374	TRANSPOSON pIC6	Contiene un Tn7 modificado con el origen de replicación RGKδ, el gen reportero <i>URA3</i> y resistencia a <i>kanamicina</i> .	<i>Km</i>	Castaño et al. 2003
1484	pBC34.1	pUC:: <i>URA3</i>	<i>Amp</i>	Cormack et al. 1999
1628	pAP599	Contiene un casete de resistencia a <i>higromicina</i> con el promotor PGK y el terminador <i>HIS3</i> , flanqueado por secuencias FRT y el gen que confiere resistencia a <i>ampicilina</i> .	<i>Amp</i>	Domergue, et al 2005
1792	pMZ18	Contiene el promotor de <i>EPA1</i> fusionado al gen que codifica para la proteína FLP, el gen reportero <i>URA3</i> , resistencia a <i>ampicilina</i> .	<i>Amp</i>	Colección Cormack B. et al.

1817	pRZ15	pAP599, con los fragmentos 3' y 5' de locus <i>MTL2</i> .	Amp	Ramírez, Salas-Delgado et al., datos no publicados
1819	pRZ17	pAP599, con los fragmentos 3' y 5' de locus <i>MTL3</i> .	Amp	Ramírez, Salas-Delgado et al., datos no publicados
	pGEM-T	Contiene un promotor T7 y SP6 RNA polimerasa flanqueando un sitio múltiple de clonación que con el péptido $\alpha$ de la $\beta$ -galactosidasa, un origen de replicación del fago f1, resistencia a ampicilina.	Amp	Promega
	pTOPO	Fragmento del gen <i>LacZa</i> de las bases 1-547, sitio múltiple de clonación, promotor T7 y resistencia a kanamicina y ampicilina.	Amp/Km	Invitrogen
1808	pIC122	<i>MTL1</i> clonado con <i>Bam</i> HI en pTOPO	Amp/Km	ESTE TRABAJO
<b>Cepas construidas</b>				
1776	pSD1	3' <i>MTL1</i> - pGEM, <i>Sac</i> I/ <i>Bam</i> HI, oligos 148/149, 3.51 Kb, colonia 11, células <i>DH10</i>	Amp	ESTE TRABAJO
1777	pSD2	3' <i>MTL1</i> - pGEM, <i>Sac</i> I/ <i>Bam</i> HI, oligos 148/149, 3.51 Kb, colonia 20, células <i>DH10</i>	Amp	ESTE TRABAJO
1778	pSD3	5' <i>MTL1</i> - pGEM, <i>Kpn</i> I/ <i>Hind</i> III, oligos 146/147, 3.54 Kb, colonia 6, células <i>pcnB</i>	Amp	ESTE TRABAJO
1779	pSD4	5' <i>MTL1</i> - pGEM, <i>Kpn</i> I/ <i>Hind</i> III, oligos 146/147, 3.54 Kb, colonia 7, células <i>pcnB</i>	Amp	ESTE TRABAJO
1782	pSD5	3' <i>MTL1</i> - pAP599, <i>Sac</i> I/ <i>Bam</i> HI, oligos 148/149, 6.931 Kb, colonia 1, células <i>DH10</i>	Amp	ESTE TRABAJO
1783	pSD6	3' <i>MTL1</i> - pAP599, <i>Sac</i> I/ <i>Bam</i> HI, oligos 148/149, 6.931 Kb, colonia 2, células <i>DH10</i>	Amp	ESTE TRABAJO
1793	pSD8	5' <i>MTL1</i> - pAP599, <i>Kpn</i> I/ <i>Hind</i> III, oligos 146/147, 6.980 Kb, colonia 13, células <i>DH10</i>	Amp	ESTE TRABAJO
1802	pSD7	5' <i>MTL1</i> - pAP599-3' <i>MTL1</i> , <i>Sac</i> I/ <i>Bam</i> HI; <i>Kpn</i> I/ <i>Hind</i> III, oligos 146/147-148/149, 7.505 Kb, células <i>DH10</i>	Amp	ESTE TRABAJO
1846	pSD9	pTOPO- <i>MTL1</i> ; <i>Km</i> <sup>-</sup> , <i>Nco</i> I/ <i>Klemow</i> / <i>Msc</i> I, 6.7 Kb, células <i>DH10</i>	Amp	ESTE TRABAJO
1847	pSD10	pTOPO- <i>MTL1</i> ; <i>Km</i> <sup>-</sup> , <i>Nco</i> I/ <i>Klemow</i> / <i>Msc</i> I, 6.7 Kb, células <i>DH10</i>	Amp	ESTE TRABAJO
1857	pSD11	pSD10::Tn7, 9.989 Kb, <b>a1</b> ::Tn7, <b>a1</b> nt +168 bp río abajo de <b>a1</b> , colonia 13, <i>DH10</i>	Amp/Km	ESTE TRABAJO
				
1858	pSD12	pSD10::Tn7, 9.989 Kb, colonia 15, <i>DH10</i> , <i>EMG</i> ::Tn7	Amp/Km	ESTE TRABAJO
				

1859	pSD13	pSD10::Tn7, 9.989 Kb, <b>a1</b> ::Tn7, <b>a1</b> nt 333 exón 2, colonia 6, <i>DH10</i>		Amp/Km	ESTE TRABAJO
1860	pSD14	pSD10::Tn7, 9.989 Kb, colonia 20, <i>DH10</i> , <i>EMG</i> ::Tn7		Amp/Km	ESTE TRABAJO
1861	pSD15	pSD10::Tn7, 9.989 Kb, <b>a1</b> ::Tn7, <b>a1</b> nt 29 exón 1, colonia 21, <i>DH10</i>		Amp/Km	ESTE TRABAJO
1862	pSD16	pSD10::Tn7, 9.989 Kb, colonia 23, <i>DH10</i> , <i>EMG</i> ::Tn7		Amp/Km	ESTE TRABAJO
1863	pSD17	pSD10::Tn7, 9.989 Kb, <b>a1</b> ::Tn7, <b>a1</b> nt 92 exón 1, colonia 25, <i>DH10</i>		Amp/Km	ESTE TRABAJO
1864	pSD18	pSD10::Tn7, 9.989 Kb, colonia 30, <i>DH10</i> , <i>EMG</i> ::Tn7		Amp/Km	ESTE TRABAJO
1865	pSD19	pSD10::Tn7, 9.989 Kb, colonia 32, <i>DH10</i> , <i>EMG</i> ::Tn7		Amp/Km	ESTE TRABAJO
1866	pSD20	pSD10::Tn7, 9.989 Kb, colonia 36, <i>DH10</i> , <i>BUD5</i> ::Tn7		Amp/Km	ESTE TRABAJO
1923	pSD21	pSD10::Tn7, 9.989 Kb, <b>a1</b> ::Tn7, <b>a1</b> nt -747 río arriba de <b>a1</b> , colonia 67, <i>DH10</i>		Amp/Km	ESTE TRABAJO

Tabla 4. Cepas utilizadas y generadas de *C. glabrata*

CEPA	GENOTIPO	RESISTENCIA	REFERENCIA
<b>Cepas utilizadas</b>			
CGM1	Bg14, <i>ura3Δ(-85 a +932)::Tn903</i> , derivada del aislado clínico CGM2	<i>Kan</i>	<i>Cormack et al. 1999</i>
CGM2	Bg2, aislado clínico	-	<i>Fidel et al. 1996</i>
<b>Cepas construidas</b>			
CGM383	CGM1- <i>mtl1Δ::hph</i> , pSD7/ <i>Bsg</i> I, colonia 1	<i>Hph</i>	ESTE TRABAJO
CGM384	CGM1- <i>mtl1Δ::hph</i> , pSD7/ <i>Bsg</i> I, colonia 2	<i>Hph</i>	ESTE TRABAJO
CGM390	383- <i>mtl1Δ</i> , pMZ18, colonia 2	-	ESTE TRABAJO
CGM391	383- <i>mtl1Δ</i> , pMZ18, colonia 5	-	ESTE TRABAJO
CGM469	CGM1-pSD13/ <i>Mfe</i> I, <i>a1::Tn7</i> , <i>a1</i> nt 333 exón 2, colonia 1	URA3	ESTE TRABAJO
			
CGM470	CGM1-pSD17/ <i>Mfe</i> I, <i>a1::Tn7</i> , <i>a1</i> nt 92 exón 1, colonia 2	URA3	ESTE TRABAJO
			
CGM471	CGM1-pSD17/ <i>Mfe</i> I, <i>a1::Tn7</i> , <i>a1</i> nt 92 exón 1, colonia 1	URA3	ESTE TRABAJO
			
CGM472	383- <i>mtl1Δ</i> ; <i>mtl3Δ::hph</i> , pRZ17/ <i>Bsg</i> I, colonia 5	<i>Hph</i>	ESTE TRABAJO
CGM497	472- <i>mtl1Δ</i> ; <i>mtl3Δ</i> , pMZ18, colonia 13	-	ESTE TRABAJO
CGM498	472- <i>mtl1Δ</i> ; <i>mtl3Δ</i> , pMZ18, colonia 20	-	ESTE TRABAJO
CGM499	383- <i>mtl1Δ</i> ; <i>mtl2Δ::hph</i> , pRZ15/ <i>Bsg</i> I, colonia 4	<i>Hph</i>	ESTE TRABAJO
CGM500	383- <i>mtl1Δ</i> ; <i>mtl2Δ::hph</i> , pRZ15/ <i>Bsg</i> I, colonia 5	<i>Hph</i>	ESTE TRABAJO
CGM501	383- <i>mtl1Δ</i> ; <i>mtl2Δ::hph</i> , pRZ15/ <i>Bsg</i> I, colonia 11	<i>Hph</i>	ESTE TRABAJO

CGM524	CGM1-pSD15/Mfe I, a1::Tn7, a1 nt 29 exón 1, colonia 13	URA3	ESTE TRABAJO
			
CGM525	CGM1-pSD15/Mfe I, a1::Tn7, a1 nt 29 exón 1, colonia 17	URA3	ESTE TRABAJO
			
CGM526	497- <i>mtl1</i> Δ; <i>mtl3</i> Δ: <i>mtl2</i> Δ: <i>hph</i> , pRZ15/Bsg I, colonia 2	<i>Hph</i>	ESTE TRABAJO
CGM529	499- <i>mtl1</i> Δ; <i>mtl2</i> Δ, pMZ18, colonia 14	-	ESTE TRABAJO
CGM530	499- <i>mtl1</i> Δ; <i>mtl2</i> Δ, pMZ18, colonia 4	-	ESTE TRABAJO
CGM531	526- <i>mtl1</i> Δ; <i>mtl3</i> Δ: <i>mtl2</i> Δ, pMZ18, colonia 1	-	ESTE TRABAJO
CGM532	526- <i>mtl1</i> Δ; <i>mtl3</i> Δ: <i>mtl2</i> Δ, pMZ18, colonia 9	-	ESTE TRABAJO
CGM533	CGM1-pSD11/Mfe I, a1::Tn7, a1 nt +168 bp río abajo de a1, colonia 1	URA3	ESTE TRABAJO
			
CGM534	CGM1-pSD11/Mfe I, a1::Tn7, a1 nt +168 bp río abajo de a1, colonia 6	URA3	ESTE TRABAJO
			
CGM535	CGM1-pSD21/Mfe I, a1::Tn7, a1 nt -747 río arriba de a1, colonia 4	URA3	ESTE TRABAJO
			
CGM536	CGM1-pSD21/Mfe I, a1::Tn7, a1 nt -747 río arriba de a1, colonia 5	URA3	ESTE TRABAJO
			
CGM539	383- <i>mtl1</i> Δ: <i>hph</i> ; <i>ura3</i> Δ::URA3 pBC34.1, colonia 6	URA3	ESTE TRABAJO
CGM540	383- <i>mtl1</i> Δ: <i>hph</i> ; <i>ura3</i> Δ::URA3 pBC34.1, colonia 22	URA3	ESTE TRABAJO
CGM541	390- <i>mtl1</i> Δ; <i>ura3</i> Δ::URA3 pBC34.1, colonia 15	URA3	ESTE TRABAJO
CGM542	390- <i>mtl1</i> Δ; <i>ura3</i> Δ::URA3 pBC34.1, colonia 17	URA3	ESTE TRABAJO
CGM543	499- <i>mtl1</i> Δ; <i>mtl2</i> Δ: <i>hph</i> ; <i>ura3</i> Δ::URA3, pBC34.1, colonia 9	URA3	ESTE TRABAJO

CGM544	499- <i>mtl1</i> Δ; <i>mtl2</i> Δ::hph; <i>ura3</i> Δ::URA3, pBC34.1, colonia 18	URA3	ESTE TRABAJO
CGM545	529- <i>mtl1</i> Δ; <i>mtl2</i> Δ; <i>ura3</i> Δ::URA3, pBC34.1, colonia 4	URA3	ESTE TRABAJO
CGM546	529- <i>mtl1</i> Δ; <i>mtl2</i> Δ; <i>ura3</i> Δ::URA3, pBC34.1, colonia 12	URA3	ESTE TRABAJO
CGM547	472- <i>mtl1</i> Δ; <i>mtl3</i> Δ::hph; <i>ura3</i> Δ::URA3, pBC34.1, colonia 7	URA3	ESTE TRABAJO
CGM548	472- <i>mtl1</i> Δ; <i>mtl3</i> Δ::hph; <i>ura3</i> Δ::URA3, pBC34.1, colonia 10	URA3	ESTE TRABAJO
CGM549	497- <i>mtl1</i> Δ; <i>mtl3</i> Δ; <i>ura3</i> Δ::URA3, pBC34.1, colonia 10	URA3	ESTE TRABAJO
CGM550	497- <i>mtl1</i> Δ; <i>mtl3</i> Δ; <i>ura3</i> Δ::URA3, pBC34.1, colonia 13	URA3	ESTE TRABAJO
CGM551	526- <i>mtl1</i> Δ; <i>mtl3</i> Δ: <i>mtl2</i> Δ:hph; <i>ura3</i> Δ::URA3, pBC34.1, colonia 3	URA3	ESTE TRABAJO
CGM552	526- <i>mtl1</i> Δ; <i>mtl3</i> Δ: <i>mtl2</i> Δ:hph; <i>ura3</i> Δ::URA3, pBC34.1, colonia 11	URA3	ESTE TRABAJO
CGM553	531- <i>mtl1</i> Δ; <i>mtl3</i> Δ: <i>mtl2</i> Δ; <i>ura3</i> Δ::URA3, pBC34.1, colonia 4	URA3	ESTE TRABAJO
CGM554	531- <i>mtl1</i> Δ; <i>mtl3</i> Δ: <i>mtl2</i> Δ; <i>ura3</i> Δ::URA3, pBC34.1, colonia 10	URA3	ESTE TRABAJO

## Oligonucleótidos utilizados, (Tabla 1, anexos<sup>1</sup>)

### Soluciones

TE: Tris 10 mM-EDTA 0.1 mM; NaOAc 3M; glicógeno 20 μg/μL; etanol 100%, 70%; TER 10 mM: Tris 10 mM, EDTA 0.1 mM, RNasa 5 μL; GTE: glucosa 50 mM, Tris-Cl pH8 25 mM, EDTA 10 mM; NaOH/SDS: NaOH 0.2 N, SDS 1 %; Acetato de potasio: ácido acético glacial 29.5 mL, aforar a 100 mL con KOH; PEG 50% (PM4000); LiOAc 1 M; esperma de salmón, ssDNA, 2 mg/mL desnaturalizado; buffer A: Tris 50 mM, EDTA 10 mM, NaCl 150 mM, Triton 1 %, SDS 1 %; buffer A sin detergente: Tris 50 mM, EDTA 10 mM, NaCl 150 mM; glicerol 15 %, 60 %; LiOAc 1 M; Dimetilsulfóxido DMSO; fenol:cloroformo:isoamílico (24:24:1); cloruro de sodio 5M.

### **Medios utilizados para *E. coli***

Los medios utilizados para el crecimiento y transformaciones en *E. coli* fueron LB líquido: *triptona 10 g/L, cloruro de sodio 2 g/L, extracto de levadura 5 g/L*; LB-carbenicilina sólido en cajas: *triptóna 10 g/L, cloruro de sodio 5 g/L, extracto de levadura 5 g/L, agar 15 g/L, carbenicilina 100 µg/ml*; LB-carbenicilina/kanamicina sólido en cajas: *triptona 10 g/L, cloruro de sodio 5 g/L, extracto de levadura 5 g/L, agar 15 g/L, carbenicilina 50 µg/ml, Kanamicina 50 µg/ml*; SOB: *extracto de levadura 5 g/L, triptona 20 g/L, cloruro de sodio 10 mM, cloruro de potasio 2.5 g/L*; SOC: *SOB 10 mL, sulfato de magnesio 10 mM, cloruro de magnesio 10 mM, glucosa 4 %*.

### **Medios utilizados para *C. glabrata***

En el caso del crecimiento, expresión de genes reporteros y transformación en *C. glabrata* utilizamos YPD líquido: *extracto de levadura 10 g/L, peptona 20 g/L, uracilo 50 mg/mL, glucosa 2 %*; YPD sólido en cajas, se le adiciona agar al 2 % al YPD líquido. De igual manera para los casos necesarios se le adiciona además higromicina a una concentración final de 400 mg/mL. YP-glicerol: *extracto de levadura 10 g/L, peptona 20 g/L, uracilo 50 mg/mL, agar 20 g/L, glucosa 2 %, glicerol al 3 %*; CAA (medio sin uracilo): *base nitrogenada de levadura 1.7 g/L, sulfato de amonio 5 g/L, casaminiácidos 6 g/L, agar 20 g/L, glucosa 2 %*; CAA-5-FOA: *agar 20 g/L, CAA 6 g/L, sulfato de amonio 5 g/L, uracilo 5 mg/mL, 5-FOA 0.9 g/L, base nitrogenada de levadura 1.7 g/L, glucosa 2 %*.

### **Transformación en *E. coli***

Para las transformaciones de *E. coli* utilizamos el método de electroporación, descrito en *Current Protocols in Molecular Biology*. Se usaron las cepas electrocompetentes previamente preparadas *DH10* ó *pcnB*, Tabla 3. Brevemente las células se descongelan en hielo y se agrega el plásmido a transformar; posteriormente se transfiere la mezcla a celdas de electroporación y se aplica un pulso de 1800 v, 200 mA y 50 F; inmediatamente después se agrega 1 mL de SOC. Se incuba 1 hora a 37 °C con agitación; las células se platan luego en dos cajas de LB con antibiótico, 100 µL de la suspensión en una y el resto en la segunda; se incuban 24 horas a 37 °C.

### **Transformación en *C. glabrata***

En *C. glabrata* las transformaciones las llevamos a cabo utilizando el método de transformación en acetato de litio, el cual consiste en poner un precultivo de las cepas de interés (Tabla 4), en medio líquido YPD, a 30°C, con agitación toda la noche. Se inocula un matraz con 30 mL de YPD fresco con 300 µL del precultivo y se incuba a 30°C hasta obtener una densidad óptica a 600nm, (OD<sub>600</sub>) entre 0.8 y 1.0. Una vez alcanzada la densidad óptica se centrifuga el cultivo y se lava la pastilla celular con un volumen igual de agua estéril, se hace un segundo lavado con 1 mL de LiAOAc 100 mM y finalmente se resuspende en 300 µL de LiAOAc 100mM y de aquí se toman 50 µL de células y se añade una mezcla que contiene el DNA a transformar resuspendido en TE, 240 µL de polietilenglicol 50%, 36 µL de LiAOAc 1 M y 50 µg de DNA de esperma de salmón desnaturizado.

Mezclamos e incubamos en agitación a 30°C por 45 minutos, finalmente agregamos 43 µL de dimetilsulfóxido, sometemos a choque térmico por 15 minutos a 42 °C y centrifugamos. Cuando seleccionamos resistencia a algún antibiótico se resuspende la pastilla celular en 900 µL de YPD e incubamos en agitación a 30°C de 4 a 8 horas, finalmente plateamos las células en 3 cajas de medio YPD con antibiótico, 300 µL de células transformadas por caja e incubando por 2 días a 30°C. En el caso de que se seleccione para la complementación de alguna auxotrofia, a las cepas receptoras transformadas, tras el choque térmico añadimos agua estéril y plateamos 300 µL por caja e incubamos a 30°C durante 2 días.

### **Preservación de plásmidos y cepas**

Los plásmidos construidos en este trabajo se preservaron como cepas de *E. coli* en glicerol al 10%. Las cepas de *C. glabrata* en glicerol al 15%; ambas a -80 °C.

### **Extracción de DNA en *E. coli***

Para la extracción de plásmidos de *E. coli* y la extracción de DNA de gel utilizamos kit comercial de Qiagen (*Valencia, CA 91355*).

## **Extracción de DNA genómico en *C. glabrata***

Las cepas de interés se cultivan toda la noche en YPD líquido por 12 a 20 horas a 30°C, posteriormente centrifugamos el cultivo y la pastilla se resuspende en 500 µL de Buffer A y se añade un volumen igual de fenol:cloroformo:isoamílico, incubamos a 44°C con agitación por 30 minutos. Centrifugamos y se separa la fase acuosa a la cual agregamos 500 µL de Buffer A sin detergente para incubarlo por 30 minutos a 44°C, y finalmente agregamos 15 µL de cloruro de sodio 5M y 2 volúmenes de etanol al 100%. Centrifugamos y lavamos la pastilla con etanol al 70%, resuspendimos en 250 µL de TER.

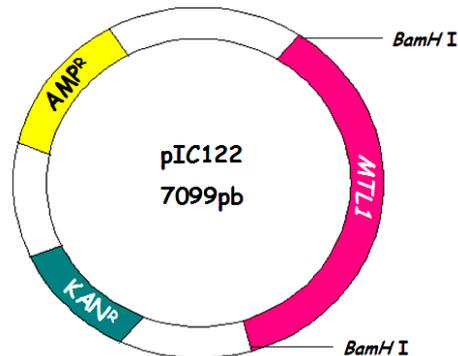
## **Construcción de plásmidos.**

### **a. Clonación del *locus MTL1***

Para obtener el *locus MTL1* diseñamos oligonucleótidos que amplifiquen una región específica del *locus MTL1*, en los que además se incluyeron sitios de reconocimiento para la enzima de restricción *Bam* HI. Realizamos reacciones de PCR con los oligonucleótidos diseñados 160/161 (Tabla 1 anexos<sup>1</sup>), y obtuvimos un fragmento de 3.1 Kb. Posteriormente este se clonó en el vector pCR2.1 TOPO (Invitrogen) y transformamos en *E.coli DH5α* Fig. 9 (Tabla 3).

Seleccionamos las transformantes en cajas de LB – carbenicilina y comprobamos mediante PCR de colonia que el *locus MTL1* estuviera en la construcción utilizando los mismos oligonucleótidos que se utilizaron para amplificar el *locus MTL1* (Tabla 1 anexos<sup>1</sup>). Posteriormente extrajimos DNA

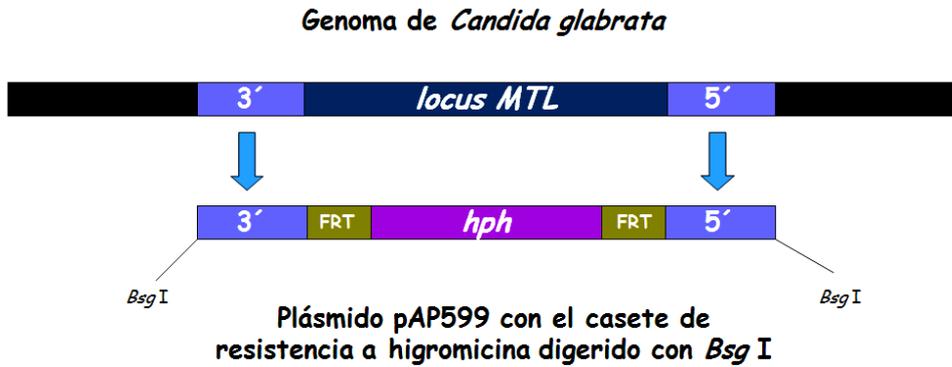
plasmídico, con el Kit Qiagen y mediante digestión de la enzima *Bam* HI comprobamos la presencia del producto original de 3 Kb y el vector 4Kb.



**Figura 9. Plásmido pIC122 que contiene el locus *MTL1*.** Clonación del locus *MTL1* en el plásmido *pTOPO 2.1*, que contiene resistencia a ampicilina y kanamicina. Imagen del plásmido construido, *pIC122*. AMP<sup>R</sup>- Resistencia a ampicilina, KAN<sup>R</sup>- Resistencia a kanamicina.

### b. Plásmidos para generar deleciones/inserciones del locus *MTL1*

La estrategia general para la construcción de estos plásmidos consiste en amplificar los fragmentos 3' y 5' que flanquean el locus a eliminar. Estos fragmentos deben tener un tamaño igual o mayor a 500 pb, y se clonan a ambos lados de un casete que confiere resistencia a higromicina, el cual se clonó previamente en el plásmido *pAP599* (Fig. 10), (Domergue et al., 2005).



**Figura 10. Clonación de los fragmentos 3' y 5' que flanquean el locus *MTL* de interés.**

Obtención de las construcciones para la delección/inserción del locus *MTL1*, mediante PCR de los fragmentos 3' y 5' que flanquean el locus *MTL1* y su posterior clonación delimitando el casete de resistencia a higromicina y las regiones *FRT*. Finalmente la digestión con la enzima de restricción *Bsg I* que corta al 3' de su sitio de reconocimiento. 3'- Fragmento 3' que flanquea el locus a deletar, 5'- Fragmento 5' que flanquea el locus a deletar, *FRT* - *Flp Recombinase Target*, *hph* - Resistencia a higromicina, *Bsg I* - Enzima de restricción utilizada.

Para obtener ambos fragmentos diseñamos oligonucleótidos que contienen sitios para diferentes enzimas de restricción que permitieran clonar ambos fragmentos en el vector pAP599. Los oligonucleótidos además contienen sitios para *Bsg I*, que corta 15 pares de bases al 3' del sitio de reconocimiento y genera extremos romos. De esta manera escindimos la construcción completa: el fragmento 5', el casete de resistencia a higromicina y el fragmento 3' sin tener segmentos de vector.

Mediante PCR obtuvimos ambos fragmentos, el 5' *MTL1* de 554 pb con los oligonucleótidos 146, con sitios para las enzimas de restricción *Kpn I* y *Bsg I*, y el 147, con el sitio para la enzima de restricción *Hind III*. El fragmento 3' de 510 pb lo obtuvimos con los oligonucleótidos 148, con el sitio para la enzima de restricción *Bam HI*, y el oligonucleótido 149, con los sitios para las enzimas de restricción *Sac*

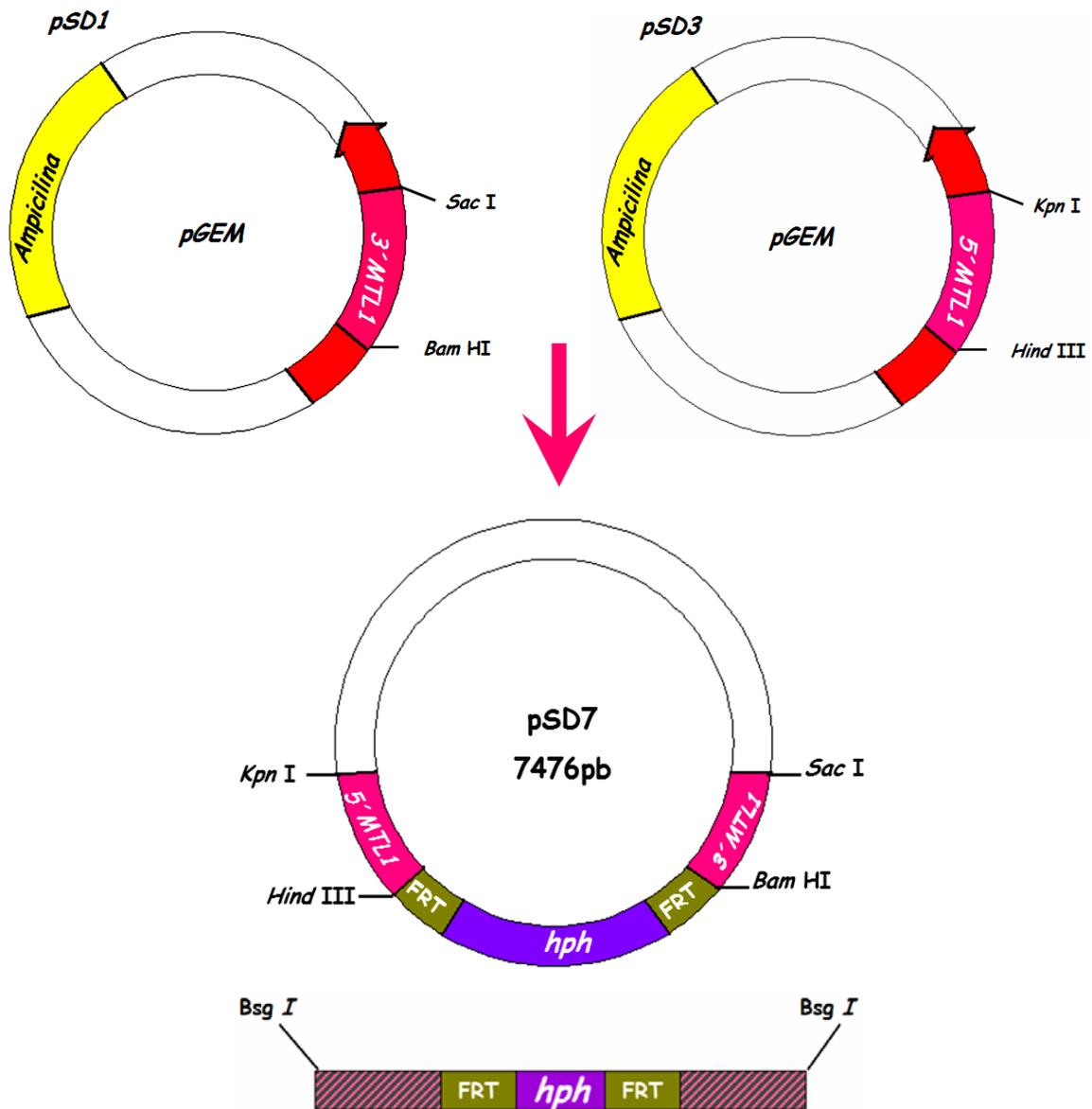
---

I y *Bsg I*, (Tabla 1, *anexos*<sup>1</sup>), ambos fragmentos fueron clonados individualmente en el plásmido pGEM-T, (*mapa anexos*<sup>2</sup>).

Seleccionamos en cajas de LB - carbenicilina y mediante PCR en colonia de alrededor de 50 colonias (*geles*<sup>3,4</sup>, *anexos*), comprobamos la presencia de nuestra construcción, (Tabla 1 *anexos*<sup>1</sup>). Extrajimos DNA plasmídico de las cepas obtenidas; la cepa 1776, plásmido pSD1 con el fragmento 3' y el plásmido pAP599, que contiene el casete de resistencia a higromicina, los digerimos con las enzimas de restricción *Sac I* y *Bam HI*. Extrajimos de gel el fragmento 3', los ligamos y clonamos en *E. coli pcnB* seleccionando en cajas de LB- carbenicilina.

Realizamos PCR de aproximadamente 50 colonias, encontramos clonas con el plásmido, (*gel*<sup>5</sup> *anexos*). Posteriormente extrajimos DNA plasmídico de las cepas 1778, con el plásmido pSD3 que contiene el fragmento 5' de *MTL1*, y 1782, plásmido pSD5 que contiene el casete de resistencia a higromicina y el fragmento 3' de *MTL1*. Digerimos con las enzimas *Kpn I* y *Hind III*, extrajimos de gel el fragmento 5'.

Ligamos este fragmento al vector pSD5 y transformamos en *E. coli DH10* seleccionando en cajas de LB – carbenicilina; mediante PCR de aproximadamente 50 colonias encontramos aquellas que contenían nuestra construcción, (*gel*<sup>6</sup> *anexos*), cepa 1802, pSD7 (Fig. 11).



**Figura 11. Plásmido final pSD7 que contiene los fragmentos 3' y 5' que flanquean el locus *MTL1*.** Obtención de las construcciones para la delección/inserción del locus *MTL1*, mediante la clonación de los fragmentos 3' y 5' que flanquean el locus *MTL1* en el vector pGEM (pSD1, pSD3), y posteriormente en el vector pAP599 (pSD7), que contiene el casete de resistencia a higromicina y las regiones FRT. Este último se digirió con la enzima de restricción Bsg I que corta al 3' de su sitio de reconocimiento. FRT - *E*lp *R*ecombinase *T*arget, hph - Resistencia a higromicina, Bsg I, Sac I, Bam HI, Kpn I - Enzimas de restricción utilizadas.

### c. Plásmidos que contienen las inserciones del Tn7URA3 en el locus MTL1 clonado

Para generar inserciones del reportero *URA3* en distintas posiciones a lo largo del locus *MTL1*, realizamos una mutagénesis *in vitro* con el transposón modificado Tn7 *URA3* Kan, con lo cual se obtienen inserciones al azar de este elemento en cualquier DNA que se utilice como aceptor. Las proteínas que catalizan la transposición son comerciales y el proceso es altamente eficiente.

La mutagénesis del locus *MTL1* se realizó con el plásmido pIC6, cepa 1374 Tabla 3, el cual contiene un transposón Tn7 modificado con el gen reportero *URA3*, además cuenta con el gen que confiere resistencia a Kanamicina, y un origen condicional de replicación R6K $\gamma$  que requiere de la proteína Pir2 para su replicación (Fig. 12). La inmunidad de este transposón permite una sola inserción cada 40 Kb, por lo que solo obtuvimos una inserción por vector (*Metcal et al. 1996*).



**Figura 12. Plásmido pIC6, cepa 1374, contiene un Tn7 modificado, con el gen reportero *URA3* y el gen que confiere resistencia a Kanamicina.** Transposón Tn7 utilizado para realizar inserciones del gen *URA3* y monitorear el estado transcripcional de la cromatina en el locus *MTL1*. El transposón contiene un origen de replicación dependiente de la proteína Pir2 (R6K $\delta$ ), el gen que confiere resistencia a kanamicina (Kan), el gen reportero *URA3* y las secuencias repetidas directas de reconocimiento (Tn7L, Tn7R). Modificado de Castaño et al., 2003.

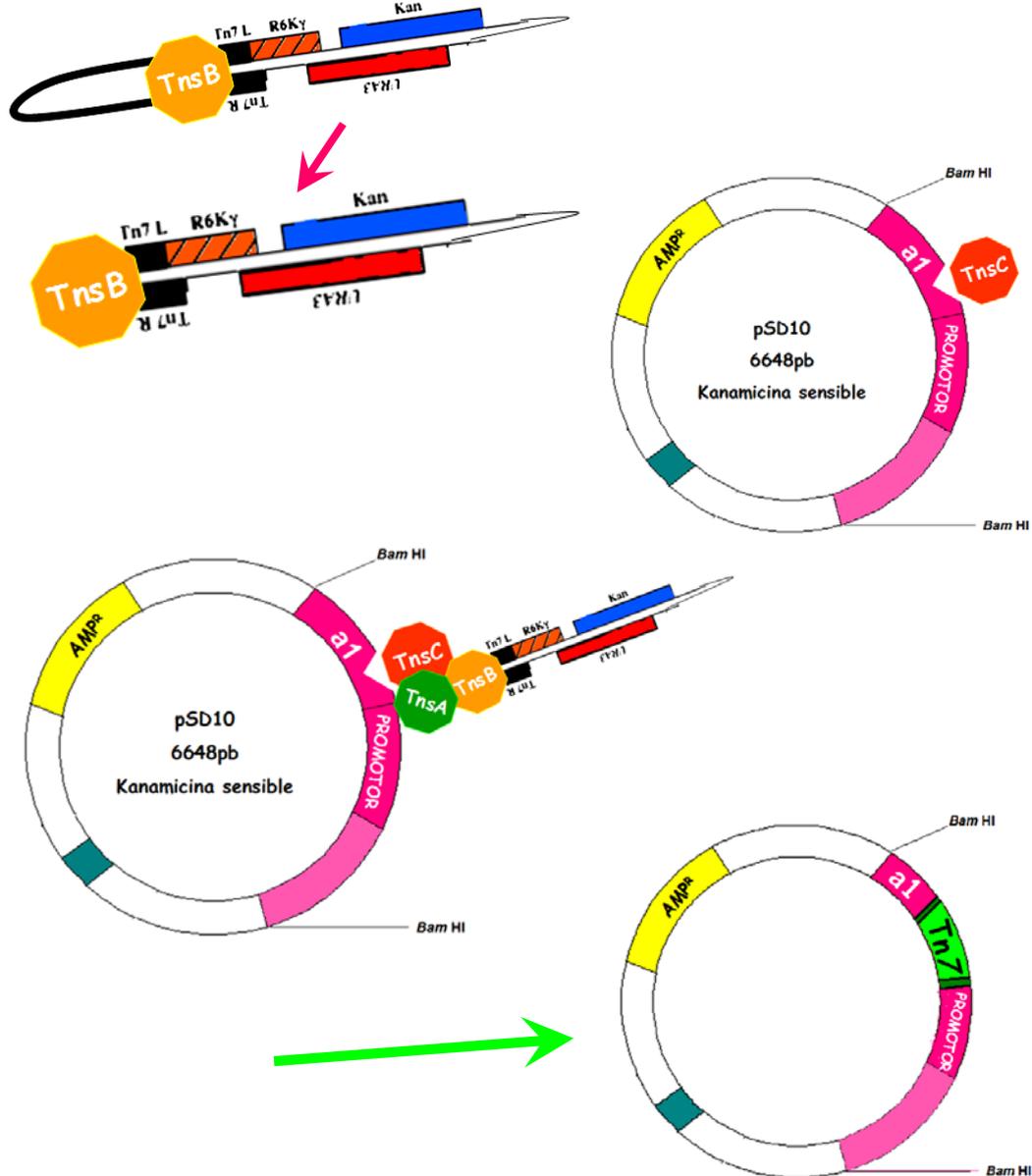
Para realizar la mutagénesis *in vitro* del locus *MTL1*, utilizamos la construcción pIC122 como plásmido aceptor, la cual contiene marcador de resistencia a Ampicilina y Kanamicina (del vector TOPO); por lo cual para poder realizar la mutagénesis del locus *MTL1* eliminamos la resistencia a Kanamicina

.....  
presente en el plásmido. Para esto digerimos con las enzimas de restricción *Nco* I, rellenamos los extremos cohesivos en una reacción con el fragmento Klenow de la DNA polimerasa de *E. coli*, posteriormente digerimos con la enzima *Msc* I, y obtuvimos un plásmido que se religó con extremos romos, y perdió un fragmento de 496 pb, del gen que confiere resistencia a Kanamicina.

Una vez que obtuvimos el plásmido sensible a Kanamicina transformamos en *E. coli DH10* y seleccionamos en cajas de LB – carbenicilina; posteriormente sembramos las colonias obtenidas en cajas con Kanamicina para asegurarnos de la pérdida de la resistencia. Las clonas con la construcción correcta se comprobaron mediante una digestión con la enzima *Bam* HI y se obtuvieron 2 bandas: 3.183 Kb y 3.420 Kb, esta última banda presenta el cambio por la pérdida de 496 pb procedentes de la resistencia a Kanamicina (*gel*<sup>7</sup> anexos).

Realizamos la mutagénesis con aproximadamente 100 ng de plásmido donador, pIC6, y 400 ng de plásmido aceptor, pSD10, en una reacción de 20 µL con la enzima transposasa. La transposasa es un conjunto de 3 proteínas: TnsB que reconoce las terminaciones repetidas directas del Tn7 y escinde el transposón, la TnsC<sup>\*</sup> que se une a secuencias blanco del DNA aceptor y además interacciona con TnsB. Finalmente TnsA se une TnsB que a su vez esta unida al DNA, este complejo formado por las 3 proteínas de la transposasa y las 2 moléculas de DNA (el donador, Tn7 y el aceptor o blanco) es necesario para llevar a cabo la reacción de transposición (Fig. 13).

La reacción se incubó por 1 hora a 37 °C y se para mediante una extracción con fenol para posteriormente electroporar en *E. coli DH10*; esta cepa no produce la proteína Pir2, por lo que el plásmido donador no podrá replicarse. Seleccionamos en cajas de LB- carbenicilina/Kanamicina y purificamos 2 veces las colonias obtenidas.



**Figura 13. Reacciones de transposición para las inserciones del transposón Tn7 en el locus *MTL1*.** Proceso de transposición donde la proteína TnsB reconoce las secuencias repetidas directas del transposón Tn7 y lo corta del plásmido donador. La proteína TnsC reconoce al azar sitios en el plásmido aceptor y finalmente se forma un complejo de estas dos proteínas con la TnsA llevando a cabo la inserción del transposón. Tn7 – transposón, a1 – gen a1, pSD10, plásmido aceptor que contiene el locus *MTL1*, AMP<sup>R</sup> – Resistencia a ampicilina.

## **Comprobación de clonaciones en *E. coli***

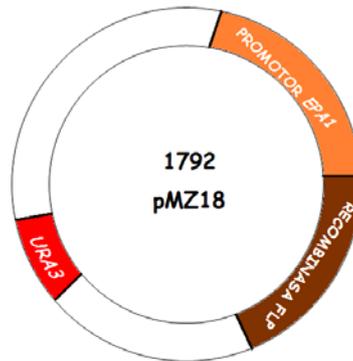
Para todas las comprobaciones de clonaciones o transformaciones en *E. coli* utilizamos la técnica de PCR en colonia, para la cual preparamos la mezcla de PCR con oligonucleótidos internos de los fragmentos clonados, con oligonucleótidos del vector o con distintas combinaciones Tabla 1, anexos<sup>1</sup>. Añadimos un poco de la colonia y posteriormente analizamos la mezcla en geles de agarosa por electroforesis. Estos análisis se realizan en ambos extremos del fragmento clonado.

## **Generación de mutantes sencillas, dobles y triples de los loci *MTL* en *C. glabrata***

Para la generación de mutantes utilizamos los plásmidos antes construidos que contienen el casete de resistencia a higromicina con dos secuencias repetidas directas FRT (E|p R|Recombinase T|arget) en sus extremos, flanqueado por las regiones 5' y 3' del locus a deletar. Digerimos con la enzima de restricción *Bsg* I que corta 15 nucleótidos hacia el 3' del sitio de reconocimiento, con lo cual nos aseguramos de solo escindir la construcción que contiene DNA homólogo a *C. glabrata* sin tener segmentos del vector.

Una vez realizada la digestión transformamos en la cepa CGM1 Tabla 4, y mediante doble recombinación homóloga realizamos la delección del locus *MTL* e inserción del casete de resistencia a higromicina.

Para construir las cepas con deleciones dobles y triples de los *loci MTL* retiramos el casete de resistencia a higromicina mediante la transformación de la cepa que contiene la deleción/inserción, con el plásmido pMZ18 Fig. 14, cepa 1792, el cual contiene el promotor inducible del gen *EPA1*. Este gen codifica para una adhesina que se induce en fase exponencial, y se encuentra fusionado al gen que codifica para la proteína Flp1p y contiene además al gen reportero *URA3* (Tabla 3).

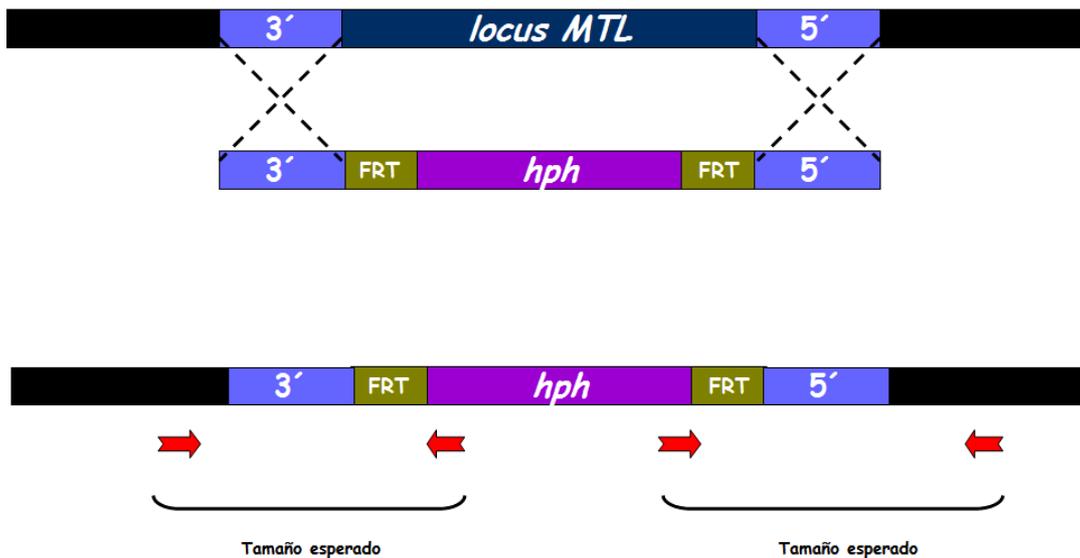


**Figura 14. Imagen del plásmido pMZ18 que codifica el gen de la proteína FLP.** Plásmido utilizado para eliminar el casete de resistencia a higromicina en las cepas construidas con las diferentes deleciones en los *loci MTL*. Contiene al promotor del gen *EPA1*, una adhesina que se expresa en fase exponencial, fusionado con el gen que codifica para la enzima recombinasa, además cuenta con el gen *URA3*.

La proteína Flp1p codificada en pMZ18 corta en las secuencias FRT del casete de resistencia a higromicina y libera el casete, quedando la cepa nuevamente sensible a higromicina. De esta manera se pueden construir deleciones sucesivas utilizando el mismo marcador de resistencia a higromicina con las secuencias FRT, flanqueado por los fragmentos 3'-5' de otro *locus MTL*.

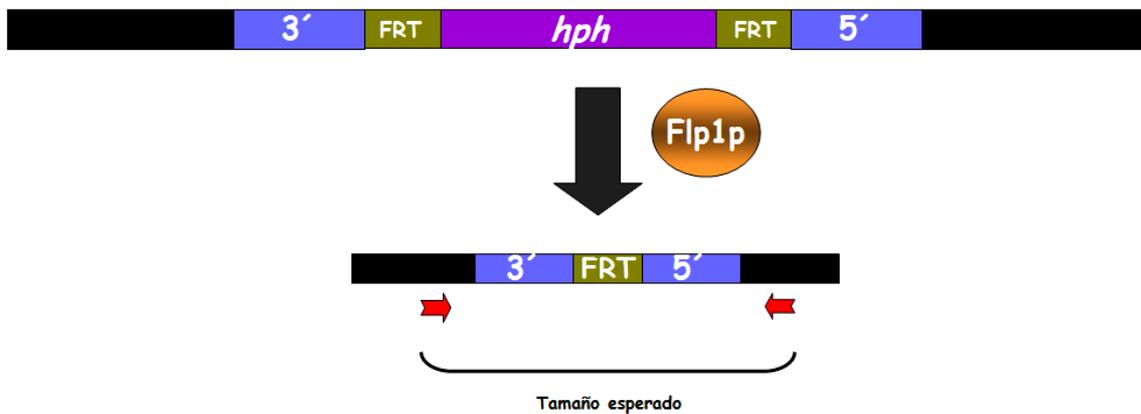
### Comprobación de la delección/inserción de los *loci MTL* en *C. glabrata*

Para las transformaciones realizadas en *C. glabrata* mediante doble recombinación homóloga, comprobamos mediante PCR con oligonucleótidos internos al casete integrado y oligonucleótidos que hibridan en la región cromosómica aledaña a los *loci MTL*, pero externos al casete y a los fragmentos 3' y 5' clonados (Fig. 15, Tabla 1 anexos<sup>1</sup>). Esta comprobación se realizó para ambos lados del casete integrado.



**Figura 15. Imagen de las comprobaciones mediante PCR de las delecciones/inserciones de los *loci MTL*.** Imagen de las delecciones/inserciones de los *loci MTL* mediante doble recombinación homóloga y su posterior comprobación mediante PCR. 3' y 5'- Fragmentos 3' y 5' que flanquean el locus a deletar, FRT - El Recombinase Target, *hph* - Resistencia a higromicina.

En el caso de las transformaciones en las cuales eliminamos la resistencia a antibiótico realizamos PCR con oligonucleótidos externos al casete y a los fragmentos 3', 5', que hibridan en la región aledaña. De esta manera obtenemos una banda de menor tamaño que indica la pérdida del casete (Fig. 16).

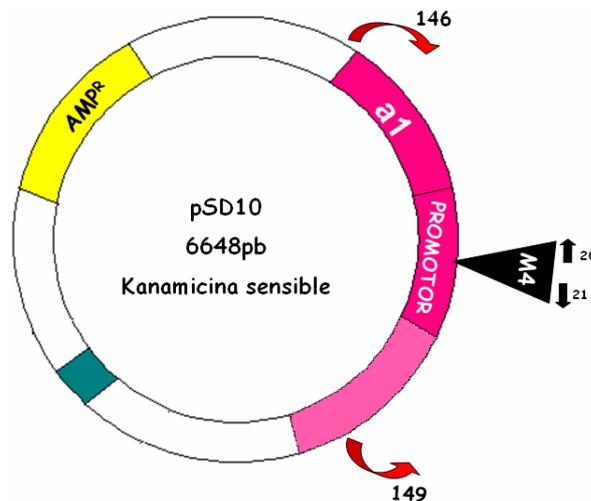


**Figura 16. PCR para verificar la eliminación del casete de resistencia a higromicina.** Eliminación del casete de resistencia a higromicina en las delecciones/inserciones de los diferentes loci MTL. Utilizamos la enzima recombinasa que reconoce los fragmentos repetidos directos FRT y escinde el casete de resistencia a higromicina. 3' y 5'- Fragmentos 3' y 5' que flanquean el locus a deletar, FRT - *Flp* Recombinase Target, *hph* - Resistencia a higromicina, *Flp1p* - Recombinasa

## Determinación de la posición y orientación de las inserciones en el locus *MTL1*

Localizamos el sitio de inserción y la orientación de las inserciones en el locus *MTL1* mediante PCR de colonia (*geles*<sup>8</sup> *anexos*), para ello utilizamos los oligonucleótidos 146 / 149 que hibridan en las regiones 3' y 5' del locus y los oligonucleótidos 20 / 21 en los extremos del Tn7 (Tabla 1 *anexos*<sup>1</sup>).

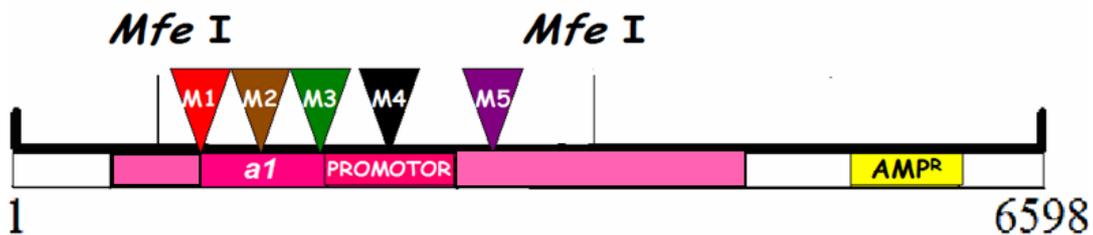
En total monitoreamos 100 colonias independientes que se encontraron a todo lo largo del plásmido pSD10 (Fig. 17) y finalmente decidimos trabajar con 5 de ellas que están localizadas a lo largo del locus *MTL1* y casualmente están en la misma orientación.



**Figura 17. Determinación de la posición de las inserciones mediante PCR de colonia en el plásmido pSD10.** Mediante PCR en colonia determinamos las posiciones de diferentes inserciones del gen reportero *URA3* en el plásmido aceptor pSD10. Se muestran los oligonucleótidos (146 – 149) utilizados en estas reacciones que hibridan tanto en el fragmento *MTL1* clonado como dentro del transposón Tn7. a1 – gen a1, M4 – inserción en el gen a1 nt 92, exón 1::Tn7, AMP<sup>r</sup>-Resistencia a ampicilina.

## Transformación de las inserciones independientes en el *locus MTL1* de *C. glabrata*

Una vez elegidas las inserciones con las que se iba a trabajar, extrajimos DNA plasmídico y digerimos con la enzima *Mfe I*, la cual corta y escinde el *locus MTL1* completo (Fig. 18). Las bandas obtenidas fueron de 4.36 Kb y 5.3 Kb, esta última contenía el *locus* más las inserciones.

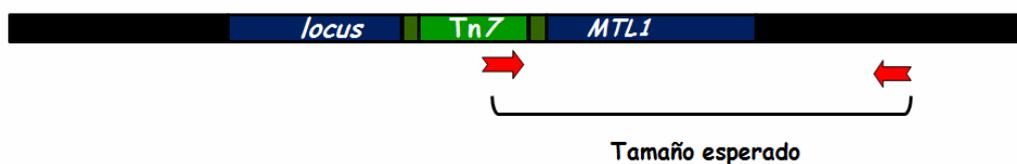


**Figura 18. Digestión de los plásmidos obtenidos con *Mfe I* para transformar en *C. glabrata*.**

Los 5 plásmidos construidos que contienen las diferentes inserciones del gen reportero URA3, a lo largo del locus MTL1 (M1, M2, M3, M4, M5), se digirieron con la enzima de restricción *Mfe I*, la cual corta fuera de las inserciones en regiones con homología para el locus MTL1. Posteriormente estas digestiones se transformaron en *C. glabrata* (cepa CGM1) para realizar los ensayos de crecimiento. AMP<sup>R</sup> - Resistencia a ampicilina

Transformamos en la cepa CGM1, *ura3Δ::Tn903(G418<sup>R</sup>)*, y mediante doble recombinación homóloga introdujimos una a una las diferentes inserciones del *Tn7* a lo largo del locus MTL1 en el genoma de *C. glabrata*. Seleccionamos a las transformantes en cajas de CAA (*sin uracilo*), purificamos las colonias obtenidas, verificamos que no tuvieran daño a mitocondria y extrajimos DNA genómico de aproximadamente 30 colonias por inserción, siendo un total de 150 en total. Mediante PCR con los oligonucleótidos 173/174 que hibridan en el genoma de *C.*

*glabrata* y 20/21 que hibridan en el Tn7 buscamos las colonias que generaran un producto de PCR del tamaño esperado (Fig. 19, gel<sup>9</sup> anexos).



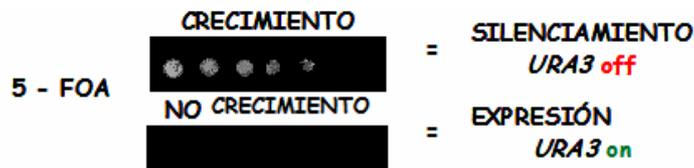
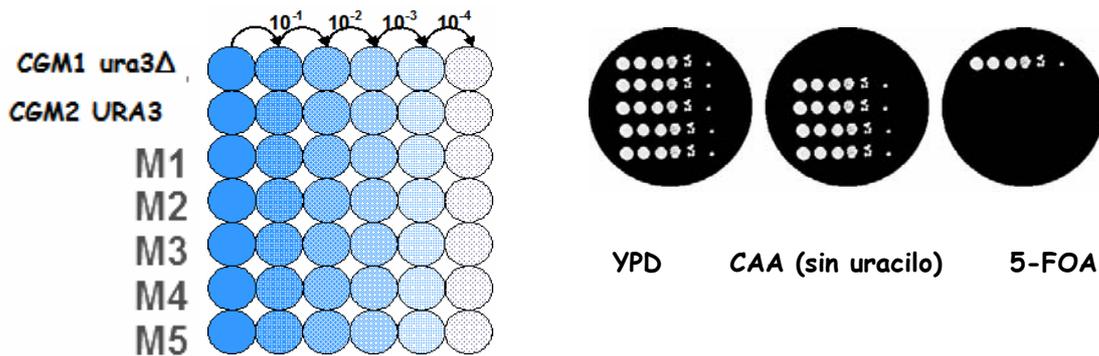
**Figura 19. PCR para encontrar colonias con las inserciones en el genoma de *C. glabrata*.** Después de transformar las 5 inserciones en la cepa CGM1 de *C. glabrata* se extrajo DNA genómico y se realizaron PCR para determinar la presencia de las inserciones en el genoma de *C. glabrata*. Tn7 – transposón.

### Expresión del gen reportero *URA3*

Realizamos un análisis del estado transcripcional de la cromatina del locus *MTL1* evaluando la expresión del gen reportero *URA3* (previamente insertado en varias posiciones a lo largo de este locus), a través de ensayos de crecimiento.

Para determinar la expresión del gen reportero *URA3* a lo largo del locus *MTL1* inoculamos en YPD las cepas que contienen estas inserciones dejando crecer los cultivos a 28°C por 20 horas, posteriormente medimos la densidad óptica a 600nm ( $OD_{600}$ ), de cada uno de los cultivos y calculamos las diluciones necesarias para ajustarlos a una  $OD_{600}$  de 1. Estas suspensiones celulares se diluyen logarítmicamente en agua estéril en placas de 96 pozos; tomamos 5  $\mu$ L de cada pozo depositando el cultivo en cajas con medio YPD, CAA (*sin uracilo*) y

5-FOA, Fig. 20. Incubamos a 28°C y tomamos fotos de las cajas a las 24 y 48 horas de crecimiento; cada goteo de las cepas utilizadas se realiza por duplicado.



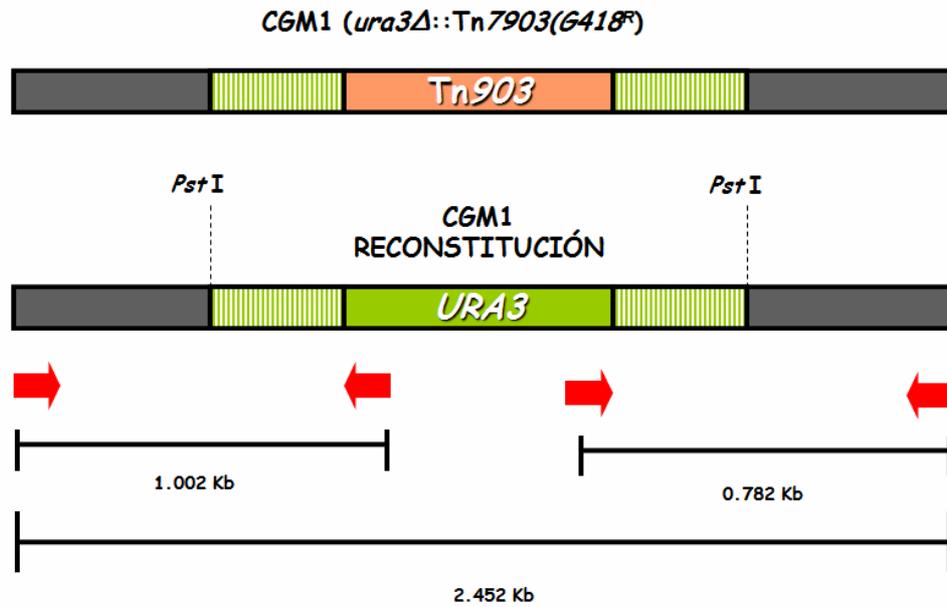
**Figura 20.** Diluciones seriadas de las cepas con las inserciones del gen reportero *URA3* y su expresión. Realizamos ensayos de crecimiento para determinar el estado transcripcional de la cromatina en el locus *MTL1*. Las cepas construidas se crecieron a 28 °C por 20 hrs, se diluyeron a  $OD_{600}$  de 1 se realizaron diluciones seriadas en placas de 96 pozos. Posteriormente se tomaron 5  $\mu$ l de cada pozo y se depositó una gota en cajas de YPD, CAA (sin uracilo) y 5 - FOA. Si la cromatina presente a lo largo del locus *MTL1* se encuentra silenciosa no habrá crecimiento en las cajas sin uracilo (CAA) a diferencia de las cajas con 5-FOA donde si existirá crecimiento. En cambio, si existe crecimiento en cajas sin uracilo (CAA), y no en cajas de 5-FOA, indicará que la cromatina se encuentra transcripcionalmente activa.

## Reconstitución del gen *URA3* en las cepas mutantes

Reconstituimos el gen *URA3* en cada una de las cepas con deleciones de los *loci MTL*, ya que la cepa tipo CGM1, donde se realizaron estas deleciones, tiene una deleción del gen *URA3* e inserción del gen que confiere resistencia a Geneticina, Tabla 4. Para ello utilizamos el plásmido pBC34.1 Tabla 3, (Cormack *et al.* 1999, cepa 1484, digerido con la enzima de restricción *Pst* I. Las bandas obtenidas fueron de 2.2 Kb, donde se encuentra el gen *URA3* flanqueado por fragmentos 3' y 5' del gen original y una banda de 2.9 Kb.

Transformamos las cepas con las distintas combinaciones de las deleciones en los *loci MTL* con este plásmido. Seleccionamos en cajas de CAA (*sin uracilo*), purificamos y sembramos en cajas de YPD–geneticina para asegurarnos de la pérdida de la resistencia y reconstitución del gen *URA3*.

Finalmente a cada una de las cepas sensibles a geneticina les extrajimos DNA genómico, aproximadamente 40 colonias, y mediante PCR con los oligonucleótidos externos a la inserción, 134/137, y los oligonucleótidos internos al gen *URA3*, 135/136, comprobamos la reconstitución del gen. Primero con los oligonucleótidos 137/136, con un fragmento de 1.002 Kb, Fig. 21. A las colonias positivas les realizamos el PCR del otro lado de la inserción con los oligonucleótidos 134/135, con una banda de 0.782 pb (*gel*<sup>10</sup> anexos).



**Figura 21. Reconstitución del gen *URA3* en las cepas con deleciones de los loci *MTL*, tamaños de los fragmento de PCR.** Reconstituimos todas las cepas construidas con las diferentes deleciones en los loci *MTL*, con el gen *URA3*. Utilizamos el plásmido pBC34.1 que contiene el gen *URA3* silvestre con regiones de homología, es te plásmido se digirió con la enzima de restricción *Pst* I. Mediante doble recombinación homóloga se reconstituyo con el gen silvestre a todas nuestras cepas. *Tn903* – Resistencia a geneticina, *CGM1* – Cepa de trabajo.

## RESULTADOS

### La cepa silvestre contiene información tipo “a” en el *locus MTL1*

Una vez que clonamos el *locus MTL1* en el vector pCR2.1 TOPO (pIC122), el DNA obtenido por medio de miniprep lo enviamos a secuenciar con una concentración aproximada de 1 µg/µl utilizando oligonucleótidos universales que hibridan con el vector. Con la secuencia obtenida diseñamos oligonucleótidos para continuar con la secuenciación, y así sucesivamente hasta secuenciar todo el fragmento clonado de 2.993 Kb.

El resultado de la secuenciación mostró que nuestra cepa de laboratorio CGM1 presente un apareamiento tipo “a” en el *locus MTL1*, a diferencia de la cepa reportada en la base de datos que cuenta con un apareamiento tipo “α” en el *locus MTL1*. El *locus MTL1* de nuestra cepa secuenciada de *C. glabrata* consta del gen **a1** y su promotor, así como un fragmento con homología al gen **α2** de *S. cerevisiae*, pero no tiene un codón de inicio, además de que deleciones del ortólogo en *S. cerevisiae* no presentan fenotipos detectables (Srikanta et al., 2003), por lo que no se considera un gen.

Clonamos y secuenciamos también los *loci MTL2* y *MTL3*, y encontramos que en el *locus MTL2* existe información “a” y en el *locus MTL3* tipo “α” (Fig. 22), (Ramírez, Salas-Delgado et al., datos no publicados).

## *Candida glabrata*



**Figura 22. Información de apareamiento en los diferentes loci MTL de nuestra cepa de laboratorio.** Información presente en cada loci MTL de nuestra cepa de trabajo CGM1. El locus MTL1 contiene información tipo a, el locus MTL2 también contiene información tipo a y el locus MTL3 información tipo α. CROM E – Cromosoma E de *C. glabrata*, CROM B – Cromosoma B de *C. glabrata*, TEL - Telómeros

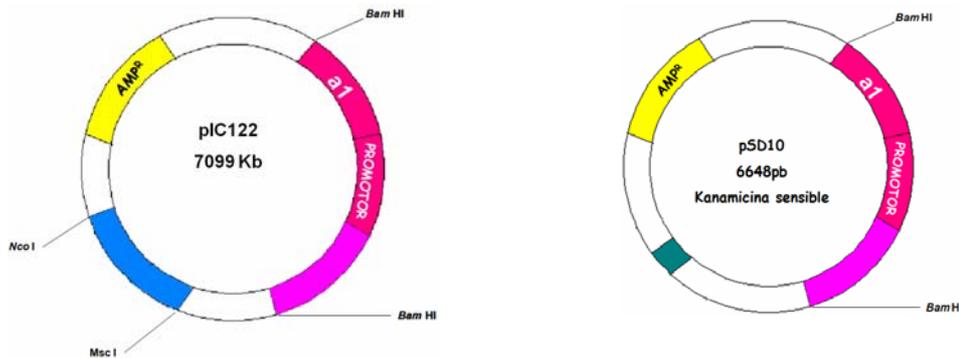
Con la información del tipo de apareamiento de nuestra cepa de laboratorio y la información de los otros loci podemos investigar la expresión de cada uno de los genes presentes en los loci MTL y conocer cual o cuales son los locus de expresión. En *S. cerevisiae* los loci HML y HMR, equivalentes a MTL3 y MTL2 respectivamente, se encuentran silenciosos y solo el locus MAT se expresa, por lo que cada célula expresa un solo tipo de información lo que le permite llevar a cabo el proceso de apareamiento cuando se encuentra con otra célula que exprese el tipo de apareamiento opuesto.

En caso de que el locus MTL1 sea el de expresión, es importante determinar que genes se encuentran regulados por el factor transcripcional a1, para conocer posibles relaciones entre diversos procesos y el apareamiento; así como para investigar posibles condiciones de apareamiento.

## El locus *MTL1* se encuentra transcripcionalmente activo

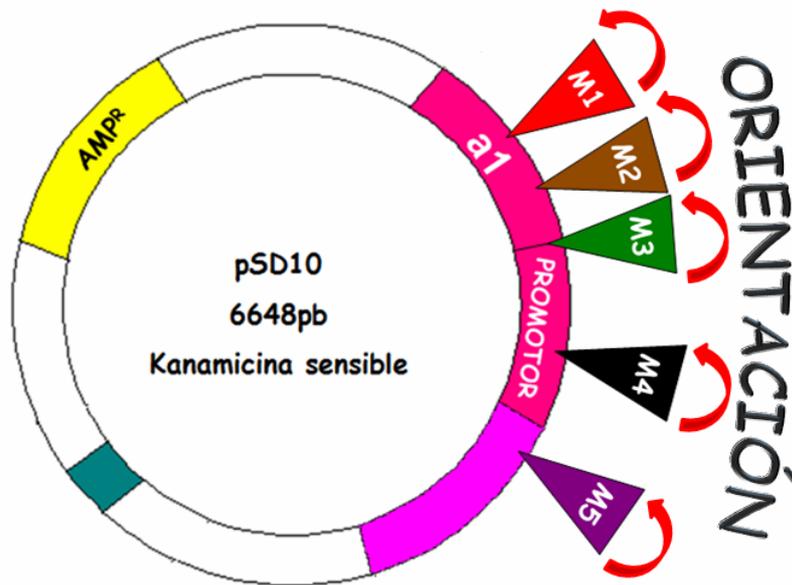
Existen reportes de que este *locus* se encuentra transcripcionalmente activo aunque en baja proporción (Fabre *et al.*, 2004); sin embargo, nosotros decidimos investigar si la cromatina a lo largo de este *locus* se encuentra en una conformación transcripcionalmente activa en nuestra cepa silvestre. Mediante las inserciones del gen reportero *URA3* a lo largo del *locus MTL1*, en la cepa CGM1 (*ura3::Tn903(G418<sup>R</sup>)*), monitoreamos la expresión de este gen a través de ensayos de crecimiento en medios sin uracilo, CAA, y en medio adicionado con 5-FOA, estos ensayos se realizaron por duplicado (Tablas<sup>11</sup> anexos).

Para poder construir estas inserciones se utilizó el plásmido previamente generado que contiene al *locus MTL1*, pIC122, el cual modificamos para eliminar la resistencia al antibiótico Kanamicina y así poder llevar a cabo la mutagénesis. Tras realizar dicha modificación obtuvimos los plásmidos pSD9 y pSD10 (Fig.23), con resistencia solo a Ampicilina (*Materiales y Métodos*).



**Figura 23. Construcción del plásmido pSD10 al eliminar la resistencia a Kanamicina de plásmido pTOPO-*MTL1*.** Eliminamos la resistencia a kanamicina del plásmido pIC122, que contiene clonado el locus *MTL1*. . Construimos así el plásmido pSD10, el plásmido aceptor, para poder realizar la transposición con el *Tn7* modificado; ya que este transposón contiene también resistencia a kanamicina. *a1* – gen *a1*, *AMP<sup>R</sup>*- Resistencia a ampicilina.

La mutagénesis se realizó utilizando el plásmido pIC6 como se describió en Materiales y Métodos, realizamos la determinación de las posiciones y orientación de aproximadamente 100 inserciones en todo el plásmido pSD10 (Tabla 3).



**Figura 24.** Inserciones finales que utilizamos para transformar en *C. glabrata*. Imagen con las 5 inserciones independientes (M1, M2, M3, M4, M5), con sus posiciones aproximadas a lo largo del locus *MTL1* y su orientación. pSD10 – plásmido construido tras la eliminación de la resistencia a kanamicina, a1 – gen a1, AMP<sup>R</sup>-Resistencia a ampicilina.

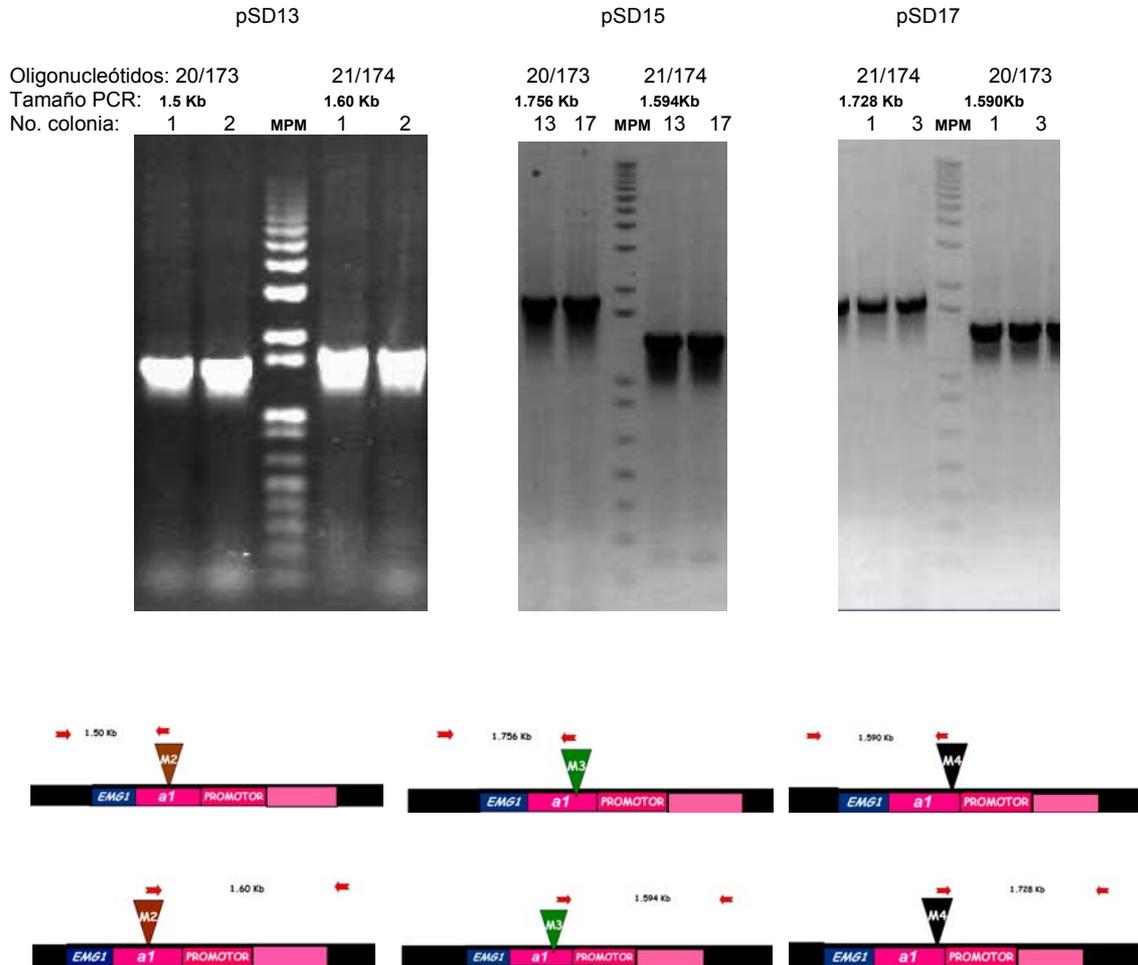
Finalmente decidimos trabajar con 5 construcciones (Fig. 24), que tienen la misma orientación a largo del locus *MTL1*, los plásmidos se mencionan en la Tabla 5, cada uno de ellos se obtuvieron de colonias independientes y se conservaron por duplicado. Secuenciamos cada uno de ellos encontrando así las posiciones exactas de las inserciones a lo largo del locus *MTL1*.

**Tabla 5. Plásmidos construidos con las inserciones a lo largo del locus *MTL1***

Plásmido	No. cepa	Posición
pSD11	1857	+168 pb río abajo de a1 
pSD13	1859	a1, nt 333, exón 2 
pSD15	1861	a1, nt 29, exón 1 
pSD17	1863	a1, nt 92, exón 1 
pSD21	1923	-747 río arriba de a1 

Cada una de estas construcciones las digerimos con la enzima *Mfe* I que escinde el locus *MTL1*, incluyendo la inserción, sin secuencias del plásmido (Fig. 17, materiales y métodos). Transformamos mediante doble recombinación homóloga la cepa CGM1, *ura3Δ::Tn903(G418<sup>R</sup>)*, de *C. glabrata* con cada una de las 5 inserciones obtenidas. Extrajimos DNA genómico de aproximadamente 250 colonias para buscar aquellas cepas con las inserciones integradas a su genoma.

Cada inserción se comprobó mediante PCR con oligonucleótidos externos a la construcción e internos a esta, por ambos lados. Los tamaños esperados de los productos de PCR para cada una de las diferentes inserciones son los que se muestran en la Figura 25.

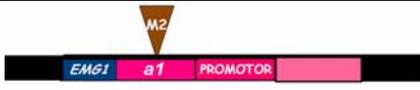


**Figura 25. Búsqueda de las inserciones en el locus *MTL1* del genoma de *C. glabrata*.** Geles de comprobación de algunas inserciones (*pSD13*, *pSD15*, *pSD17*) en el genoma de *C. glabrata*. Se muestran además imágenes con los fragmentos de PCR esperados a ambos lados de las inserciones. MPM – Marcador de peso molecular

Una vez comprobado que habíamos construido 5 cepas de *C. glabrata*, presentadas en la Tabla 6 las cuales se conservaron por duplicado de colonias independientes, cada una con una inserción del reportero *URA3* (*Tn7*) a lo largo del locus *MTL1*, se realizaron ensayos de crecimiento en medio YPD, CAA (sin

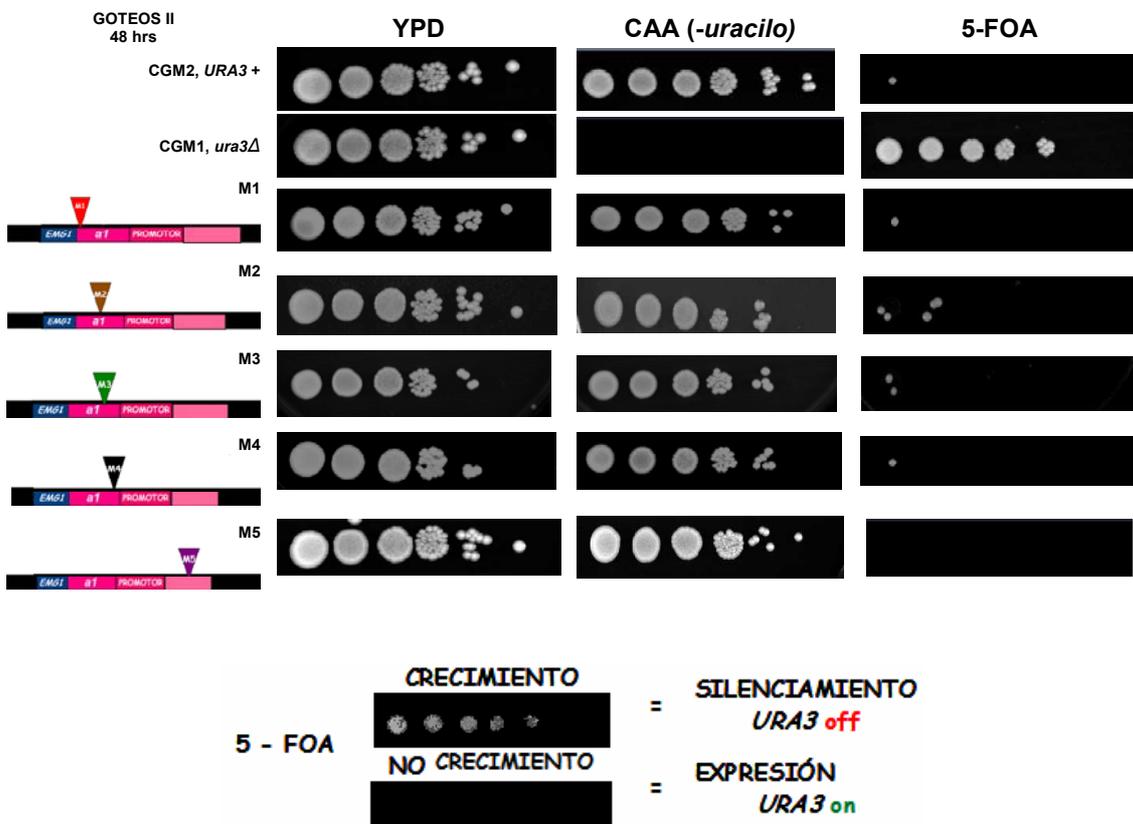
uracilo), 5-FOA, para determinar si el locus *MTL1* se encuentra transcripcionalmente activo.

**Tabla 6. Cepas construidas con las diferentes inserciones en el locus *MTL1* de *C. glabrata***

No. cepa	Genotipo
469	a1 nt 333, exón 2::Tn7 
470	a1 nt 92, exón 1::Tn7 
524	a1 nt 29, exón 1::Tn7 
533	+168 pb río abajo de a1::Tn7 
535	-747 pb río arriba de a1::Tn7 

El gen *URA3* codifica para la enzima orotidina-5-fosfato descarboxilasa que convierte al ácido 5-fluorotico en un compuesto tóxico para la célula y esta muere; entonces en estos ensayos de crecimiento si el locus *MTL1* se encuentra silencioso obtendremos crecimiento en 5-FOA, ya que no se estará expresando el gen *URA3*; sin embargo, en el medio sin uracilo (CAA), no crecerán ya que se requiere de la actividad de Ura3p para la síntesis de uracilo. Por otro lado, si el locus se encuentra transcripcionalmente activo expresará el gen *URA3* y crecerá en el medio que no contiene uracilo (CAA), pero no en el medio con 5-FOA, ya que en este producirá un compuesto tóxico que matará a la levadura.

Los resultados que obtuvimos muestran que el *locus MTL1* es transcripcionalmente activo, ya que todas las cepas que contienen inserciones del gen reportero a lo largo del *locus MTL1* mostraron crecimiento en el medio sin uracilo, CAA, y no lo hicieron en 5-FOA (Fig. 26).



**Figura 26.** Estado transcripcional de la cromatina a lo largo del *locus MTL1* mediante la expresión del gen reportero *URA3*, crecimiento a 48 hrs., 28 °C. Ensayos de crecimiento para observar el estado transcripcional de la cromatina en el *locus MTL1*. Las cepas construidas con las diferentes inserciones del gen reportero *URA3*, a lo largo del *locus*, se crecieron a 28 °C por 20 hrs. y se realizaron diluciones a  $OD_{600}$  de 1. En placas de 96 pozos se realizaron diluciones seriadas y se tomaron 5  $\mu$ l colocándose en cajas de YPD, CAA (sin uracilo) y 5-FOA. Se tomaron fotos de las cajas a las 24 y 48 hrs. observándose el crecimiento en el medio sin uracilo (CAA) y 5-FOA. Se encontró crecimiento en CAA (sin uracilo) a diferencia de las cajas de 5-FOA, esto indica que la cromatina en este *locus*, *MTL1*, se encuentra transcripcionalmente activa.

Datos de laboratorio con los mismos ensayos de crecimiento (*Ramírez, Salas-Delgado et al., datos no publicados*), muestran que el *locus MTL2* también se encuentra transcripcionalmente activo, a diferencia del *locus MTL3* el cual se encuentra en una configuración represiva ya que no presenta crecimiento en el medio sin uracilo, CAA, lo que indica que los genes  $\alpha 1$  y  $\alpha 2$  presentes en este *locus*, podrían estar silenciosos.

Esto puede explicar por qué no se ha encontrado apareamiento en *C. glabrata*, ya que si tiene expresión en dos de sus *loci* de apareamiento podría expresar información tanto tipo “a” como “ $\alpha$ ” y comportarse como diploide. En este caso no podría llevar a cabo el proceso de apareamiento, a menos de que la información en estos dos *loci* fuera igual, como es el caso de nuestra cepa silvestre, y se encontraran las condiciones óptimas para este proceso utilizando otra cepa que exprese del mismo modo información contraria (es decir igual en los *loci* de expresión). En *S. cerevisiae* no existe expresión de dos tipos de información, solo el *locus MAT* se expresa y los *loci HML* y *HMR* se encuentran silenciosos, por lo cual la levadura presenta un solo tipo de información y puede llevar a cabo el proceso de apareamiento, Figura 27.

### *Saccharomyces cerevisiae*

CROM 3





**Figura 27. Comparación entre el estado transcripcional de los loci de apareamiento de *S. cerevisiae* y *C. glabrata*, cepa CGM1.** Comparación entre el estado transcripcional de la cromatina en los diferentes loci de apareamiento en *S. cerevisiae* y *C. glabrata*. Los datos obtenidos por el laboratorio (Ramírez, Salas-Delgado et al., datos no publicados), demuestran que la cromatina presente en los loci *MTL1* y *MTL2*, los cuales expresan ambos información tipo a se encuentra, transcripcionalmente activa. CROM E – Cromosoma E de *C. glabrata*, CROM B – Cromosoma B de *C. glabrata*, TEL - Telómeros

### Cepas con deleciones sencillas, dobles y triples en los loci *MTL*

Dado que en *C. glabrata* puede haber expresión de los genes presentes en el locus *MTL2*, así como en el locus *MTL1*, es necesario construir cepas que solo contengan uno de los 3 loci para poder determinar de cual de ellos se expresa la información. La construcción de diferentes cepas con deleciones en los loci *MTL* es indispensable para comprobar la expresión de cada uno de estos, mediante RT-PCR de cada uno de los genes presentes en estos loci.

En este trabajo se construyó una batería de plásmidos intermediarios con los fragmentos 5' y 3' de los loci *MTL*, (todas estas construcciones se muestran en la Tabla 7) hasta construir finalmente el vector con el casete de resistencia a higromicina y las secuencias repetidas directas FRT, flanqueado por los

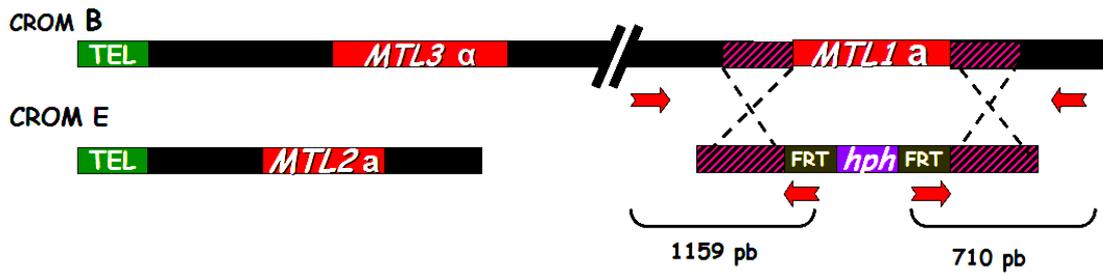
fragmentos 5' y 3' de cada *loci MTL*. De cada construcción se conservó un duplicado independiente (Tabla 3).

**Tabla 7. Plásmidos construidos con los fragmentos 5' y 3' del locus *MTL1*, para la delección/inserción de los *loci MTL*.**

Plásmido	No. cepa	Características
pSD1	1776	pGEM::3' <i>MTL1</i> , (510pb)
pSD3	1778	pGEM::5' <i>MTL1</i> , (554pb)
pSD5	1782	pAP599::3' <i>MTL1</i> , (510pb)
pSD8	1793	pAP599::5' <i>MTL1</i> , (554pb)
pSD7	1802	pAP599:: <i>mtl1</i> Δ:: <i>hph</i>

El plásmido final contiene los fragmentos 5' *MTL1* y 3' *MTL1* que flanquean al casete de resistencia a higromicina, pSD7. Este plásmido digerido con la enzima *Bsg I* lo transformamos en la cepa CGM1, *ura3::Tn903(G418<sup>R</sup>)* y mediante doble recombinación homóloga obtuvimos la delección / inserción del *locus MTL1* (Fig. 28). Para comprobar la Delección del *locus MTL1* e inserción del casete de resistencia a higromicina realizamos PCR a ambos extremos de la construcción (*gel*<sup>12</sup> anexos).

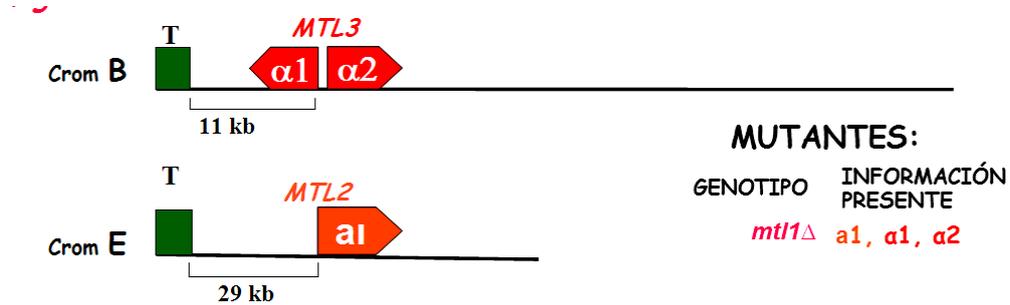
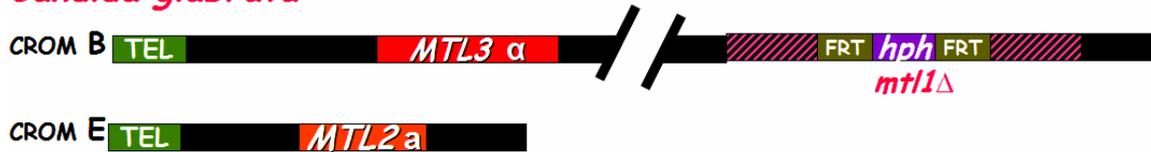
### *Candida glabrata*



**Figura 28. Construcción de la primera mutante sencilla en el locus *MTL1* por doble recombinación homóloga.** Delección del locus *MTL1* e inserción del casete de resistencia a higromicina mediante doble recombinación homóloga. Comprobación mediante PCR de la delección/inserción a ambos lados de la construcción, fragmentos esperados 1159 pb y 710 pb. CROM E – Cromosoma E de *C. glabrata*, CROM B – Cromosoma B de *C. glabrata*, *FRT* - *F*lp *R*ecombinase *T*arget, *hph* – Resistencia a higromicina, TEL - Telómeros

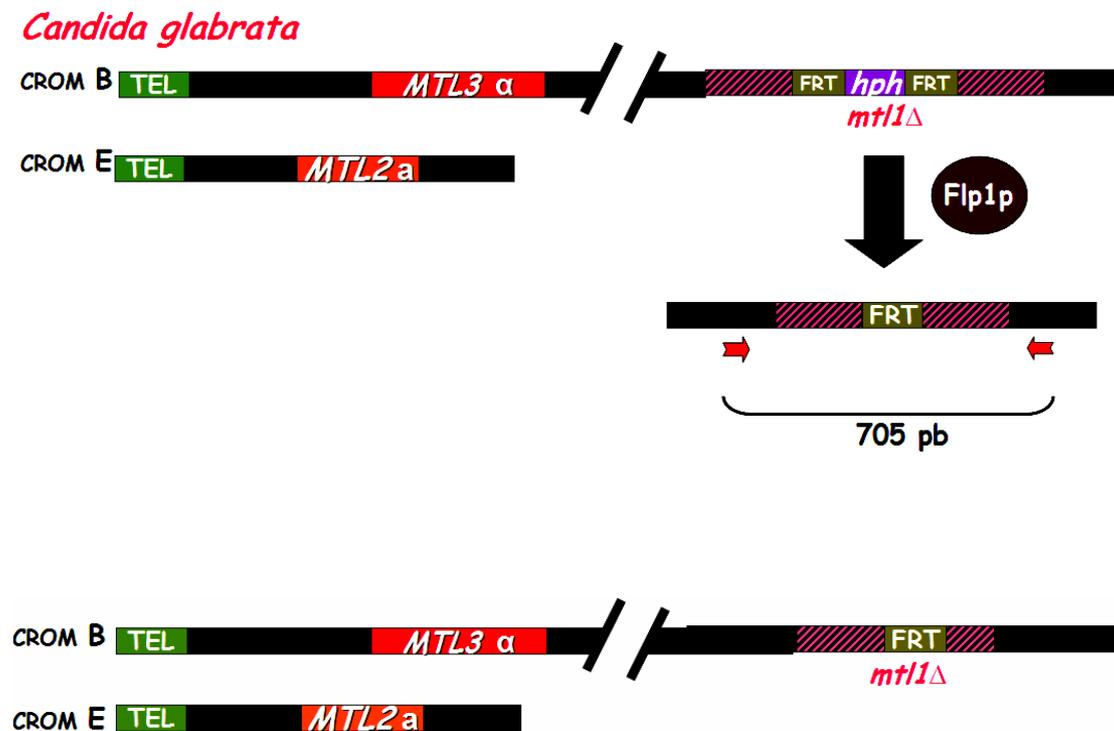
Las mutantes sencillas en el locus *MTL1* obtenidas fueron las cepas CGM383 y CGM384, *mtl1* $\Delta$ ::*hph* (Fig. 29). En esta cepa solo existe información tipo “a” del locus *MTL2*, ya que el locus *MTL1* fue deletado, e información tipo “ $\alpha$ ” proveniente del locus *MTL3*; esta cepa permitirá confirmar si existe expresión del locus *MTL2* mediante RT-PCR del gen *a1*, de igual manera se analizará la expresión de los genes  $\alpha 1$  y  $\alpha 2$  del locus *MTL3* (Tabla 8).

*Candida glabrata*



**Figura 29. Deleción del locus *MTL1* y su genotipo con información tipo  $\alpha$  del locus *MTL2* y tipo  $\alpha$  del locus *MTL3*.** Cepa CGM383 que contiene la deleción del locus *MTL1* e inserción del casete de resistencia a higromicina. Información presente en esta cepa, *MTL2a*, *MTL3 $\alpha$* , *a1*,  $\alpha1$ ,  $\alpha2$ ... CROM E – Cromosoma E de *C. glabrata*, CROM B – Cromosoma B de *C. glabrata*, FRT - *F*lp *R*ecombinase *T*arget, *hph* – Resistencia a higromicina, TEL - Telómeros

Para poder realizar las deleciones / inserciones sucesivas y así obtener dobles y triples mutantes eliminamos el casete de resistencia a higromicina mediante el uso de la recombinasa FLP, que reconoce las secuencias repetidas directas FRT y cataliza una reacción de recombinación homóloga entre ellas, resultando en la escisión del casete de resistencia a higromicina (Fig. 30). Comprobamos la eliminación de cada casete mediante PCR con oligonucleótidos externos que indican la pérdida de este fragmento.

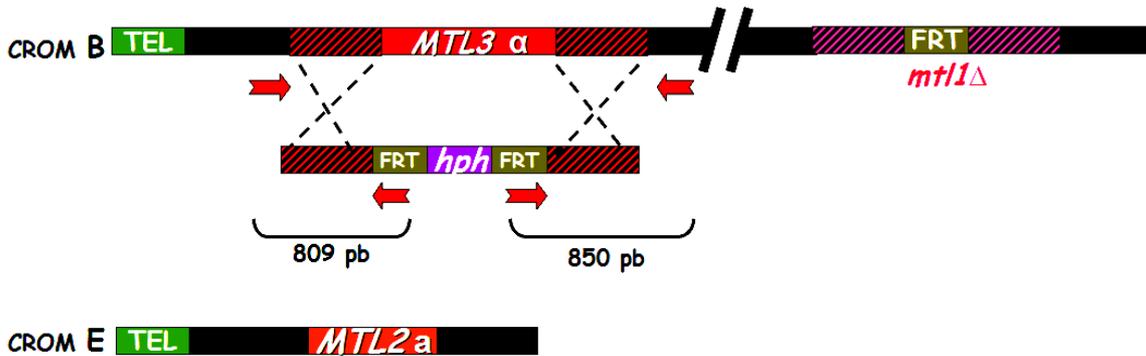


**Figura 30. Eliminación del casete de resistencia a higromicina mediante la recombinasa FLP de la cepa con la delección en el locus *MTL1*.** Escisión del casete de resistencia a higromicina de la cepa *mtl1* $\Delta$  mediante la recombinasa Flp1p (cepa CGM390). CROM E – Cromosoma E de *C. glabrata*, CROM B – Cromosoma B de *C. glabrata*, FRT - Flp Recombinase Target, hph – Resistencia a higromicina, TEL – Telómeros, Flp1p – Recombinasa.

Una vez eliminado el casete de resistencia a higromicina obtuvimos las cepas CGM390 y CGM391, *mtl1* $\Delta$ , (Tabla 4), que servirán para la construcción de cepas con tipos de apareamiento deseados para el estudio de este proceso bajo las condiciones adecuadas.

La construcción de la doble mutante *mtl1* $\Delta$ ,*mtl3* $\Delta$ ::*hph*, se llevó a cabo mediante la digestión del plásmido pRZ17, que contiene los fragmentos 5' y 3' del locus *MTL3*, con la enzima de restricción *Bsg*I. Transformamos en la cepa CGM390 (*mtl1* $\Delta$ ) y nuevamente mediante doble recombinación homóloga eliminamos el locus *MTL3* e insertamos el casete de resistencia a higromicina, Figura 31.

### *Candida glabrata*

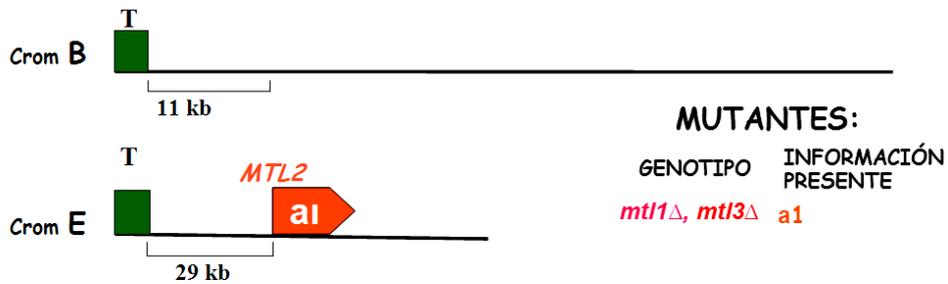


**Figura 31. Doble recombinación homóloga para la delección del locus *MTL3* en la cepa *mtl1* $\Delta$ .** Delección del locus *MTL3* e inserción del casete de resistencia a higromicina en la cepa CGM390, mediante doble recombinación homóloga. Comprobación mediante PCR de la delección/inserción a ambos lados de la construcción, fragmentos esperados 809 pb y 850 pb. CROM E – Cromosoma E de *C. glabrata*, CROM B – Cromosoma B de *C. glabrata*, *FRT* - *E*lp *R*ecombinase *T*arget, *hph* – Resistencia a higromicina, TEL - Telómeros

Comprobamos mediante PCR la delección / inserción, (*geles*<sup>13</sup> *anexos*), obtuvimos la cepa CGM472 *mtl1* $\Delta$ ,*mtl3* $\Delta$ ::*hph*. A esta cepa también le eliminamos el casete de resistencia a higromicina, (*gel*<sup>14</sup> *anexos*), las cepas construidas fueron CGM497 y CGM498, *mtl1* $\Delta$ ,*mtl3* $\Delta$  (Fig. 32).

Nuestra cepa de laboratorio cuenta con información tipo **a** en dos *loci*, *MTL1* y *MTL2*, para establecer cual de estos *loci* se encuentra activo, o si ambos lo están, la cepa con la doble deleción *mtl1* $\Delta$ ,*mtl3* $\Delta$ , permitirá analizar mediante RT-PCR la expresión del gen **a1**. En caso de detectar transcrito, este provendrá únicamente del locus *MTL2*.

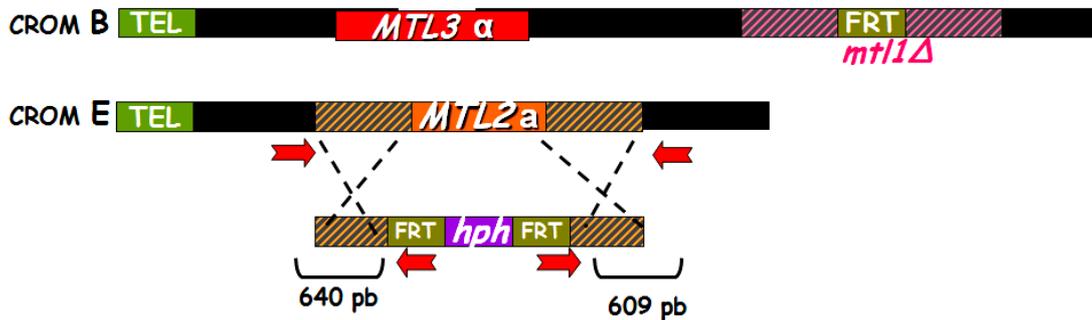
*Candida glabrata*



**Figura 32. Eliminación del casete de resistencia a higromicina del locus *MTL3* en la cepa *mtl1* $\Delta$ ,*mtl3* $\Delta$ , y su genotipo.** Escisión del casete de resistencia a higromicina, cepa CGM497 que contiene la deleción de los loci *MTL1* y *MTL3*. Información presente en esta cepa, *MTL2a*, **a1**. CROM E – Cromosoma E de *C. glabrata*, CROM B – Cromosoma B de *C. glabrata*, FRT - *F*lp *R*ecombinase *T*arget, *hph* – Resistencia a higromicina, TEL – Telómeros

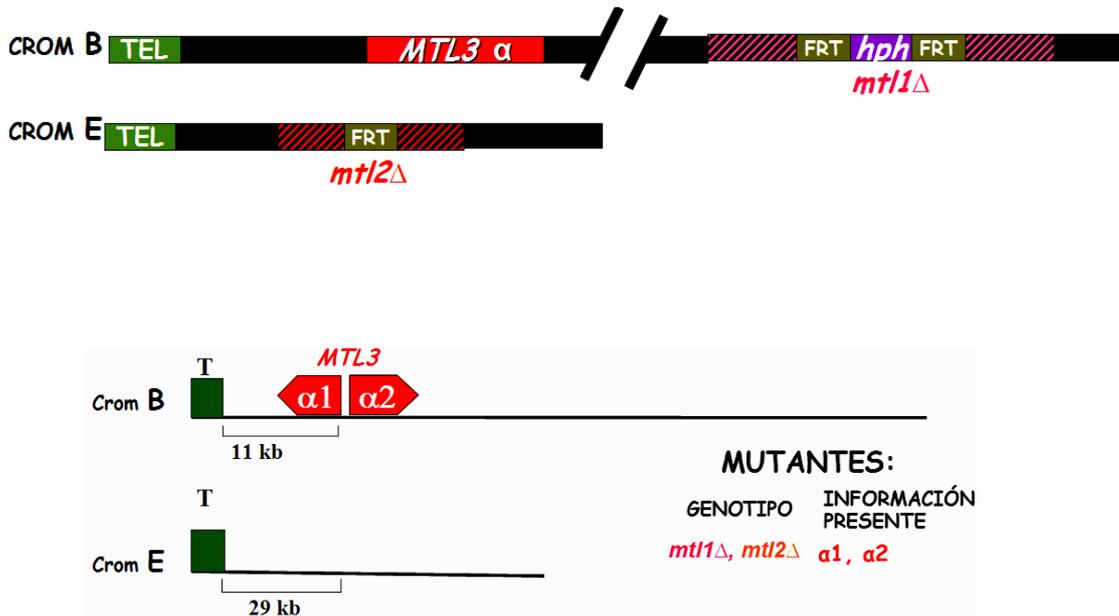
De igual manera construimos la doble mutante, *mtl1* $\Delta$ ,*mtl2* $\Delta$ ::*hph*, utilizando el plásmido pRZ15, que contiene los fragmentos 3' y 5' del locus *MTL2*, para transformar en la cepa CGM390, *mtl1* $\Delta$ . Las transformantes se comprobaron mediante PCR (*gel*<sup>15</sup> anexos). Las cepas obtenidas son CGM499, CGM500, CGM501 *mtl1* $\Delta$ ,*mtl2* $\Delta$ ::*hph*. Eliminamos el casete de resistencia a higromicina, comprobando por PCR la escisión de este (*gel*<sup>16</sup> anexos), cepas CGM529 y CGM530, *mtl1* $\Delta$ , *mtl2* $\Delta$  (Fig. 33).

### *Candida glabrata*



**Figura 33. Doble recombinación homóloga para la delección del locus *MTL2* en la cepa *mtl1* $\Delta$  y eliminación del casete de resistencia a higromicina, *mtl1* $\Delta$ ,*mtl2* $\Delta$ .** Delección del locus *MTL2* e inserción del casete de resistencia a higromicina en la cepa CGM390, mediante doble recombinación homóloga. Comprobación mediante PCR de la delección/inserción a ambos lados de la construcción, fragmentos esperados 640 pb y 609 pb. CROM E – Cromosoma E de *C. glabrata*, CROM B – Cromosoma B de *C. glabrata*, FRT - *E*lp *R*ecombinase *T*arget, *hph* – Resistencia a higromicina, TEL - Telómeros

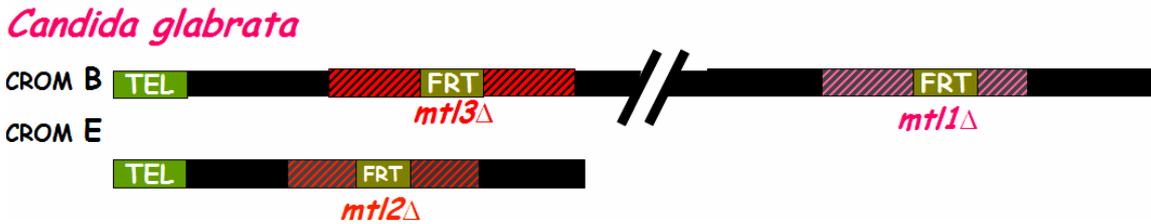
En esta cepa se observará si el *locus MTL3* se expresa al medir los niveles de RNAm de los genes  $\alpha 1$  y  $\alpha 2$  en la cepa con la delección *mtl1* $\Delta$ ,*mtl2* $\Delta$  (Fig.34), donde esta información proviene del *locus MTL3*.



**Figura 34. Genotipo de la cepa doble mutante *mtl1* $\Delta$ ,*mtl3* $\Delta$ .** Escisión del casete de resistencia a higromicina, cepa CGM529 que contiene la delección de los loci *MTL1* y *MTL2*. Información presente en esta cepa, *MTL3* $\alpha$ ,  $\alpha 1$ ,  $\alpha 2$ . CROM E – Cromosoma E de *C. glabrata*, CROM B – Cromosoma B de *C. glabrata*, FRT - *E*lp *R*ecombinase *T*arget, *hph* – Resistencia a higromicina, TEL – Telómeros

Para la construcción de la cepa triple mutante en los *loci MTL* utilizamos la cepa CGM497 (*mtl1* $\Delta$ , *mtl3* $\Delta$ ), para transformarla con el DNA plasmídico pRZ15 digerido con *Bsg* I. Mediante PCR identificamos la cepa (*gel*<sup>17</sup> *anexos*), CGM526 *mtl1* $\Delta$ , *mtl2* $\Delta$ , *mtl3* $\Delta$ ::*hph*; a la cual también le eliminamos el casete de resistencia

a higromicina. Esta cepa también se comprobó mediante PCR, (*gel*<sup>18</sup> anexos), y se obtuvieron las cepas CGM531 y CGM532, *mtl1*Δ, *mtl2*Δ, *mtl3*Δ (Fig. 35).



**Figura 35. Triple mutante en los loci MTL, *mtl1*Δ,*mtl2*Δ,*mtl3*Δ.** Escisión del casete de resistencia a higromicina, cepa CGM531 que contiene la delección de los loci MTL1, MTL2 y MTL3. No contiene ningún tipo de información de apareamiento. CROM E – Cromosoma E de *C. glabrata*, CROM B – Cromosoma B de *C. glabrata*, FRT - *F*<sub>1</sub>*lp* *Recombinase Target*, *hph* – Resistencia a higromicina, TEL – Telómeros.

Construimos cepas con diferentes delecciones en los loci MTL que presentan cada una diferente información y se encuentran descritas en la Tabla 8. Estas cepas son indispensables para el análisis mediante RT-PCR, de la expresión de cada uno de los genes presentes en ellas, para determinar cual o cuales de estos loci se encuentran transcripcionalmente activos. Esto por un lado nos puede ayudar a entender las causas por las cuales no se ha encontrado apareamiento en *C. glabrata*, y además nos permitirán reconstituir los loci de apareamiento. De tal manera que construiremos cepas que expresen uno u otro tipo de información de apareamiento, tanto a partir de los promotores nativos de cada gen como a partir de promotores fuertes constitutivos, para poder desarrollar posibles condiciones de apareamiento.

Tabla 8. Cepas construidas con las deleciones en los *loci MTL* y sus genotipos

MUTANTES:	
GENOTIPO	INFORMACIÓN PRESENTE
<i>mtl1</i> Δ	$\alpha 1$ , $\alpha 1$ , $\alpha 2$
<i>mtl1</i> Δ, <i>mtl3</i> Δ	$\alpha 1$
<i>mtl1</i> Δ, <i>mtl2</i> Δ	$\alpha 1$ , $\alpha 2$
<i>mtl1</i> Δ, <i>mtl3</i> Δ, <i>mtl2</i> Δ	-

## Posible relación entre virulencia y apareamiento

Los genes presentes en los tres *loci MTL* de apareamiento son factores transcripcionales que inducen o reprimen diversos genes involucrados en diferentes procesos. Estudios realizados en *C. albicans* han demostrado la inducción de genes involucrados en virulencia, principalmente aspartil-proteasas, en respuesta al factor  $\alpha$  (Pla et al., 2001, Gow et al., 2007, Hube et al., 2003). Dado que *C. glabrata* posee ortólogos de algunos de estos genes, es posible que exista también en *C. glabrata* un circuito de regulación que comunique a estos factores transcripcionales con la expresión de genes importantes para la colonización o persistencia en el hospedero.

Para conocer una posible relación entre estos factores transcripcionales y la virulencia de *C. glabrata*, las cepas con diferentes deleciones de los *loci MTL*, las probaremos en modelos de infección murinos en colaboración con el Doctor Brendan Cormarck de la Universidad Johns Hopkins. Se inocularán ratones por vía sanguínea con las cepas mutantes y se determinará la capacidad de colonización en riñón, bazo e hígado; para establecer si estos factores de transcripción son importantes para la sobrevivencia en el hospedero. Para poder realizar este experimento, reconstituimos el gen silvestre *URA3* en todas las cepas construidas con las deleciones de los *loci MTL*, Tabla 9.

De las cepas descritas en la Tabla 7 se enviaron las cepas CGM552, *mtl1 $\Delta$ ,mtl3 $\Delta$ ,mtl2 $\Delta$ ::hph;ura3 $\Delta$ ::URA3* y la cepa CGM554 *mtl1 $\Delta$ ,mtl3 $\Delta$ ,mtl2 $\Delta$ ;ura3 $\Delta$ ::URA3*, para los experimentos de infección en ratón.

**Tabla 9. Cepas construidas con las deleciones en los *loci MTL* reconstituidas con el gen *URA3***

<b>Cepa</b>	<b>Genotipo</b>	<b>Información presente</b>
CGM539 CGM540	<i>mtl1Δ::hph; ura3 Δ::URA3</i>	<b><i>MTL2a, MTL3α, a1, α1, α2</i></b>
CGM541 CGM542	<i>mtl1Δ; ura3 Δ:: URA3</i>	<b><i>MTL2a, MTL3α, a1, α1, α2</i></b>
CGM543 CGM544	<i>mtl1Δ,mtl2Δ::hph; ura3 Δ:: URA3</i>	<b><i>MTL3α, α1, α2</i></b>
CGM545 CGM546	<i>mtl1Δ,mtl2Δ; ura3 Δ:: URA3</i>	<b><i>MTL3α, α1, α2</i></b>
CGM547 CGM548	<i>mtl1Δ,mtl3Δ::hph; ura3 Δ:: URA3</i>	<b><i>MTL2a, a1</i></b>
CGM549 CGM550	<i>mtl1Δ, mtl3Δ; ura3 Δ:: URA3</i>	<b><i>MTL2a, a1</i></b>
CGM551 CGM552	<i>mtl1Δ,mtl3Δ,mtl2Δ::hph; ura3 Δ:: URA3</i>	-
CGM553 CGM554	<i>mtl1Δ,mtl3Δ, mtl2Δ; ura3 Δ:: URA3</i>	-

Estas cepas se utilizarán además para la incorporación de marcadores de selección, ya que al reconstituir este gen las cepas no cuentan con ningún tipo de resistencia. Así que tras incorporar marcadores de selección diferentes, así como tipos de información **a** y **α** se podrán buscar condiciones especiales para desarrollar el proceso de apareamiento.

---

## DISCUSIÓN

La reproducción sexual hace posible la aparición de poblaciones genotípica y fenotípicamente diferentes mediante la recombinación genética, la redistribución de genes en la progenie que provoca diversidad, permitiendo así una mejor adaptación de los organismos a las exigencias de un medio ambiente en constante cambio.

*C. glabrata* se ha considerado asexual desde que se describió, sin embargo ahora se sabe que posee genes que controlan el apareamiento localizados en los *loci* *MTL1*, *MTL2* y *MTL3*, los cuales se encuentran dispuestos en una configuración similar a los de *S. cerevisiae* (Srikantha et al, 2003). *C. glabrata* tiene una mayor relación filogenética con *S. cerevisiae* que con la levadura patógena *C. albicans*. Sin embargo, comparte diferentes genes ortólogos con esta última (Tabla 2). En *S. cerevisiae* el apareamiento está regulado por genes codificados en el *locus* *MAT*, el único *locus* que se expresa. Este *locus* codifica para factores transcripcionales que pueden ser de tipo “a” o “ $\alpha$ ”. Además cuenta con dos *loci* silenciosos (Figura 2), *HML* y *HMR*, que generalmente contienen información tipo  $\alpha$  en el *locus* *HML* y tipo a en *HMR* (Zou et al., 2006).

*C. glabrata* además de poseer tres *loci* *MTL* de apareamiento dispuestos en forma similar a los de *S. cerevisiae*, cuenta con 234 genes ortólogos de los 245 involucrados en los procesos de apareamiento, meiosis y esporulación, incluyendo todos los genes de la vía de señalización a la feromona  $\alpha$  (Fig. 7). Seis de los once genes restantes cuentan con un gen parálogo en *S. cerevisiae* y *C. glabrata* tiene genes ortólogos de estos parálogos (Tabla 1). Otros 2 genes se expresan específicamente durante la meiosis en *S. cerevisiae* y participan en etapas tempranas de la recombinación y en el procesamiento de RNAm. Dos

genes más participan en la formación de la pared de las esporas que resultan después de la meiosis. El último gen que *C. glabrata* no contiene es el gen *SIR1*, que en *S. cerevisiae* participa en el establecimiento de la cromatina silenciosa de los *loci HM*. Sin embargo datos previos de nuestro laboratorio han mostrado que *C. glabrata* es capaz de establecer y mantener cromatina silenciosa en regiones subtelo méricas, aún en ausencia de *SIR1*.

Nosotros en el laboratorio estamos interesados en estudiar si *C. glabrata* es capaz de llevar a cabo el proceso de apareamiento, ya que cuenta con la mayor parte de los genes involucrados en el mismo. Para establecer el tipo de información que presenta la cepa con la que trabajamos, procedimos a clonar y secuenciar los tres *loci MTL* de la misma, encontramos que nuestra cepa tipo cuenta con información **a** en los *loci MTL1* y *MTL2* e información **α** en el *locus MTL3*. La cepa cuyo genoma se secuenció completamente (CBS138), contiene información tipo **α** en *MTL1*, a diferencia de la cepa de laboratorio. Existen reportes en los que se ha encontrado mayor prevalencia de cepas con información *MTL2a-MTL1α-MTL3α* (Srikantha et al, 2003). Por otra parte trabajo realizado en el laboratorio (Lavaniegos et al., datos no publicados) con 49 aislados clínicos muestran que existe una mayor proporción de cepas con información tipo **α** en *MTL1* que de cepas con información **a** en este *locus*. Lo cual podría indicar algún tipo de ventaja dependiente de la información presente en los *loci MTL*. Se ha descrito que *C. glabrata*, puede además intercambiar la información del *locus MTL1* por la información presente en los *loci MTL2* y *MTL3*, lo cual podría explicar la prevalencia de cierto tipo de información en los *loci MTL* (Brockert et al., 2003). Es posible que este intercambio se lleve a cabo de manera análoga a como ocurre en *S. cerevisiae* por medio de la recombinasa HO.

Sorprendentemente, aunque la reproducción sexual proporciona ventajas por la generación de variantes beneficiosas mejor adaptadas para sobrevivir, varios hongos patógenos oportunistas que colonizan a los humanos, como *C.*

.....  
*albicans* y *C. glabrata*, no realizan este proceso de manera natural. Se ha propuesto que el apareamiento podría ser desventajoso para el ciclo de vida como comensal y patógeno. Esta desventaja podría consistir en la pérdida de algún gen que forme parte de una combinación importante para la sobrevivencia en el huésped.

Recientemente se describió que *C. albicans* puede llevar a cabo la reproducción sexual *in vitro* e *in vivo*, la cual origina células tetraploides, que por pérdida concertada, aunque aparentemente al azar de cromosomas, genera células otra vez diploides. Estas células diploides en algunas ocasiones pierden ciertas combinaciones de genes indispensables para su sobrevivencia y virulencia (Bennett *et al.*, 2003).

No obstante, varios hongos patógenos pueden sobrevivir sin reproducción sexual frecuente, y por lo tanto sin este intercambio de información, evolucionando y adaptándose para sobrevivir. Si no requieren de este proceso, entonces ¿por qué conservar toda la maquinaria genética necesaria para llevarlo a cabo? Podrían simplemente perder este grupo de genes, de hecho tal es el caso de *Candida parapsilosis*, una levadura asexual que perdió este conjunto de genes involucrados en apareamiento (Heitman *et al.*, capítulo III, 2007). Sin embargo, la mayoría de los hongos patógenos estudiados han conservado casi todos los genes necesarios para llevar a cabo la reproducción sexual.

La conservación de estos genes puede explicarse por su participación en otros procesos importantes además de simplemente proveer recombinación genética (a través de la reproducción sexual), y tal vez este sea el motivo por el cual sea indispensable conservarlos. *C. albicans* responde a la feromona  $\alpha$  induciendo 62 genes diferentes de los cuales solamente 18 están implicados en apareamiento, tanto en *S. cerevisiae* como en *C. albicans*. De los genes restantes muchos no se han descrito previamente, por lo que se desconoce su función, y



El estudio de la expresión de los tres *loci MTL* de *C. glabrata* es indispensable, ya que como se sabe, en *S. cerevisiae* solo debe expresarse un tipo de información para que exista el proceso de apareamiento, o sea la expresión de un solo *locus*, *MAT*, y la regulación negativa por silenciamiento de los otros dos *loci HML* y *HMR*. Si la célula expresa más de uno de estos *loci*, y tienen ambos tipos de información, resultaría en la expresión de ambos tipos de información  $\alpha$  y  $\alpha$  con lo cual reprogramaría su expresión genética para comportarse como diploide y no llevaría a cabo la reproducción sexual.

En este trabajo se realizó el estudio del estado transcripcional de la cromatina del *locus MTL1* en *C. glabrata* utilizando inserciones del gen reportero *URA3* en diferentes posiciones a lo largo del *locus*. Trabajos previos indican que este es el *locus* de expresión (*Srikanta et al., 2003*). Nosotros encontramos expresión del reportero *URA3* en los ensayos de crecimiento, lo cual concuerda con los datos previamente publicados. Datos no publicados del laboratorio (*Ramírez, Salas-Delgado et al*) muestran este mismo estado transcripcional activo para el *locus MTL2*. Esto podría explicar por qué esta levadura no lleva a cabo el proceso de apareamiento, ya que en cepas que contengan información contraria en cada uno de estos *loci*, estaría expresando dos tipos de información y comportándose como una célula diploide.

La información tipo  $\alpha$ , consta del gen  $\alpha 1$  que contiene tres exones interrumpidos por dos intrones, por lo que el RNAm que proviene de este gen debe ser procesado. Existen reportes que muestran que el *locus MTL2* se encuentra transcripcionalmente activo, más no lleva a cabo el proceso de splicing, por lo que el RNAm de  $\alpha 1$  proveniente de este *locus* no se traduce, a diferencia del proveniente del *locus MTL1* (*Muller et al., 2008*). Estos datos indican que el *locus* funcional es *MTL1*, y que por consiguiente si *C. glabrata* solo expresara un tipo de información, podría desarrollar el proceso de apareamiento.

En el laboratorio nos hemos dado a la tarea de investigar cual (o cuales) *locus* de *C. glabrata* se expresan. Para esto se utilizará RT-PCR para medir la expresión de cada gen presente en los *loci* de apareamiento, para esto es indispensable la construcción de cepas que solamente contengan uno de los *loci* a la vez. Estos experimentos nos permitirán conocer la expresión de los diferentes genes, así como discernir de cual de los *loci* proviene dicha expresión. Construimos un total de 16 cepas con diferentes marcadores de selección y deleciones sencillas, dobles y triples en los *loci MTL*; estas permitirán al laboratorio medir la expresión de cada uno de los genes presentes en estos *loci* y, en el caso de **a1** determinar si existe procesamiento del RNAm en ambos *loci*.

Estas cepas permitirán además la reconstitución de la información tipo **a** o tipo  $\alpha$  en diferentes células, para buscar posibles condiciones de apareamiento utilizando diferentes marcadores de selección para la identificación de cepas diploides. La reconstitución de la información también se hará utilizando promotores fuertes para incrementar la expresión de estos genes. De igual manera se podrá determinar la expresión de aquellos genes regulados transcripcionalmente por estos factores transcripcionales (**a1**,  $\alpha1$  y  $\alpha2$ ).

Aún si *C. glabrata* no establece un ciclo sexual, el hecho de conservar intactos casi todos los genes que participan en este proceso, sugiere que los genes de control del apareamiento localizados en los *loci MTL*, son importantes para el control de otros procesos que posiblemente sean necesarios para adaptarse a su estilo de vida como patógeno oportunista. Por esto decidimos realizar una colaboración con el Doctor Brendan Cormarck (Universidad de Johns Hopkins), utilizando un modelo de infección sistémica en ratón. Utilizaremos las cepas construidas en este trabajo con la triple deleción de los *loci* de apareamiento comparando con la cepa silvestre; de esta manera se podrá

---

determinar si estos genes que controlan el apareamiento son importantes para la colonización y sobrevivencia en el ratón.

---

## REFERENCIAS

- Bennett R. J. and Johnson A. D., 2003. **Completion of a parasexual cycle in *Candida albicans* by induced chromosome loss in tetraploid strains**; The EMBO Journal, 22: 2505-2515
- Bennett R. J. and Johnson A. D., 2005. **Review, Mating in *Candida albicans* and the Search for a Sexual Cycle**. Microbiology, 59:233-55
- Bennett R. J., Uhl M. A., Miller M. G., Johnson A. D., 2003. **Identification and Characterization of a *Candida albicans* Mating Pheromone**; Molecular and Cellular Biology, 23: 8189–8201
- Brockert P. J., Lachke A. S., Srikantha T., Pujol C., Galask R., Soll D. R., 2003. **Phenotypic Switching and Mating Type Switching of *Candida glabrata* at sites of Colonization**; Infection and Immunity, 71:7109-18.
- Brown A. J. P., Odds F. C., Gow N. A. R., 2007. **Infection-related gene expression in *Candida albicans***; Current Opinion in Microbiology, Science, 10:307–313
- Dignard D., El-Naggar A. L., Longue M. E., Butler G., Whiteway M., 2007. **Identification and Characterization of *MFA1*, the Gene Encoding *Candida albicans* a-Factor Pheromone**; Eukaryotic Cell, 6:487-94.
- Domergue R., Castaño I., De Las Peñas A., Zupancic M., Lockatell V., Hebel J. R., Johnson D., Cormack B. P., 2005. **Nicotinic acid limitation regulates silencing of *Candida* adhesins during UTI**; Science, 6:866-70.
- Herskowitz I. and Chang F., 1992. **Phosphorylation of FAR1 in Response to a-Factor: A Possible Requirement for Cell-Cycle Arrest**; Molecular Biology of the Cell, 3:445-450.
- Heitman J., Kronstad J. W., Taylor J. W., Casselton L. A., 2007. **Sex in Fungi**; Capítulo III: 215
- Hull C. M. and Johnson A. D., 1999. **Identification of a Mating Type Like Locus in the Asexual Pathogenic Yeast *Candida albicans***; Science, 285:1271.
- Hull C. M., Raisner R. M., Johnson A. D., 2000. **Evidence for mating of the "asexual" yeast *Candida albicans* in a mammalian host**; Science, 289:307-10.
- Lockhart R. S., Wei W., Radke B. J., Zhao R., Soll R. D., 2005. **Increased Virulence and Competitive Advantage of an a/a Over  $\alpha/\alpha$  Offspring Conserves the Mating System of *Candida albicans***; Genetics Society of America, 169:1883-90.
- Magee B. B., Magee P. T., 2000. **Induction of Mating in *Candida albicans* by construction of *MTLa* and *MTLa* strains**; Science, 289:310-3
- Muller H., Hennequin C., Gallaud J., Dujon B., Fairhead C. 2008. **The asexual yeast *Candida glabrata* maintains distinct a and  $\alpha$  haploid mating types**; Eukaryotic Cell, 7:848-58
- Naglik J. R., Challacombe S. J., Hube B., 2003. ***Candida albicans* Secreted Aspartyl Proteinases in Virulence and Pathogenesis**; Microbiology and molecular biology reviews, 67:400–428

Navarro-García F., Sánchez M., Nombela C., Pla J., 2000. **Virulence genes in the pathogenic yeast *Candida albicans***; FEMS Microbiology Reviews, 25: 245-268

Noble M. S., Johnson A. D., 2007. **Review, Genetics of *Candida albicans*, a Diploid Human Fungal Pathogen**; Genetics, 41:193-211.

Panwar S. L., Legrand M., Dignard D., Whiteway M., Magee P. T., 2003. **MF $\alpha$ 1, the Gene Encoding the  $\alpha$  Mating Pheromone of *Candida albicans***; Eukaryotic Cell, 2:1350-60.

Reyna-Figueroa J., Fragoso-Díaz A., Otiz-Ibarra F. J., Soriano-Becerril D., Bermúdez G., Plazota Camacho N., 2007. **Epidemiología hospitalaria de candidiasis neonatal en el Instituto Nacional de Perinatología en un periodo de cinco años**; Enfermedades infecciosas microbiológicas, 27:110-113

Rusche L. N., Kirchmaier A. L., Rine J., 2003. **The establishment, inheritance, and Function of silenced chromatin in *Saccharomyces cerevisiae***; Annual Reviews of Biochemistry, 72:481–516

Srikantha T., Lockhart R. S., Soll D. R., 2003. **Three Mating Type-Like Loci in *Candida glabrata***; Eukaryotic Cell, 2:328-40.

Wei W., Lockhart R. S., Pujol C., Srikantha T., Soll R. D., 2007. **Heterozygosity of genes on the sex chromosome regulates *Candida albicans* virulence**; Molecular Microbiology, 4:1587-604.

Wong S., A Fares M., Zimmermann W., Butler G., H Wolfe K., 2003. **Research, Evidence from comparative genomics for a complete sexual cycle in the “asexual” pathogenic yeast *Candida glabrata***; Genome Biology, 4:R10

Zordan R. E., Galgoczy J. D., Jonson A. D., 2006. **Epigenetic properties of white-opaque switching in *Candida albicans* are based on a self-sustaining transcriptional feedback loop**; PNAS, 22:12807-12.

Zou Y., Yu Q., Chiu Y., and Bi X., 2006, **Position Effect on the Directionality of Silencer Function in *Saccharomyces cerevisiae***; Genetics Society of America, 174:203-13

## ANEXOS

<sup>1</sup> Tabla 1

No. del oligo	NOMBRE	Tm
15	<i>PGK-P@-2292 Rv-out</i>	69.1°C
16	<i>HIS3@2293 Fw-out</i>	68.2°C
20	<i>Tn7@661 Fw</i>	69.5°C
21	<i>Tn7@662 Rv</i>	58.4°C
74	<i>BUD5@-2536 Fw MTL1</i>	68.9°C
75	<i>TOS4@2537 Rv MTL1</i>	66.9°C
134	<i>MRPL10@3'C.g.URA3 Rv</i>	61.9°C
135	<i>C.g.URA3@721 Fw</i>	60.4°C
136	<i>C.g.URA3@54 Rv</i>	65.6°C
137	<i>GEA2@5'C.g.URA3 Fw</i>	63.8°C
146	<i>EMG1@136KpnBsg Fw MTL1</i>	85.4°C
147	<i>EMG1@670Hind Rw MTL1</i>	73.1°C
148	<i>BUD5@-534Bam Fw MTL1</i>	73.3°C
149	<i>BUD5@-66SacIBsg Rv MTL1</i>	82.3°C
160	<i>EMG1@-394Bam Fw MTL1</i>	76.8°C
161	<i>BUD5@114Bam Rv MTL1</i>	89.2°C
173	<i>EMG1@-443 Fw MTL1</i>	52°C
174	<i>BUD5@165 Rv MTL1</i>	53.4°C
175	<i>EPA20@29 Fw MTL2</i>	52.3°C
176	<i>EMG1@-229 Rv MTL2</i>	50.9°C
177	<i>EMG1@-516 Fw MTL3</i>	58.9°C
178	<i>CHA1@98 Rv MTL3</i>	55.7°C

### Oligonucleótidos

2

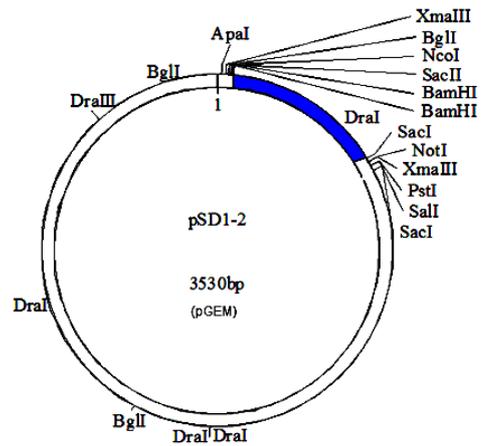
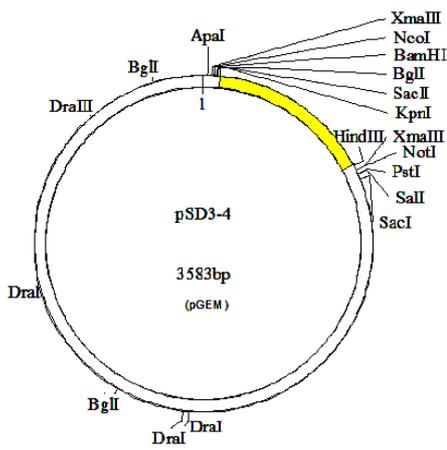
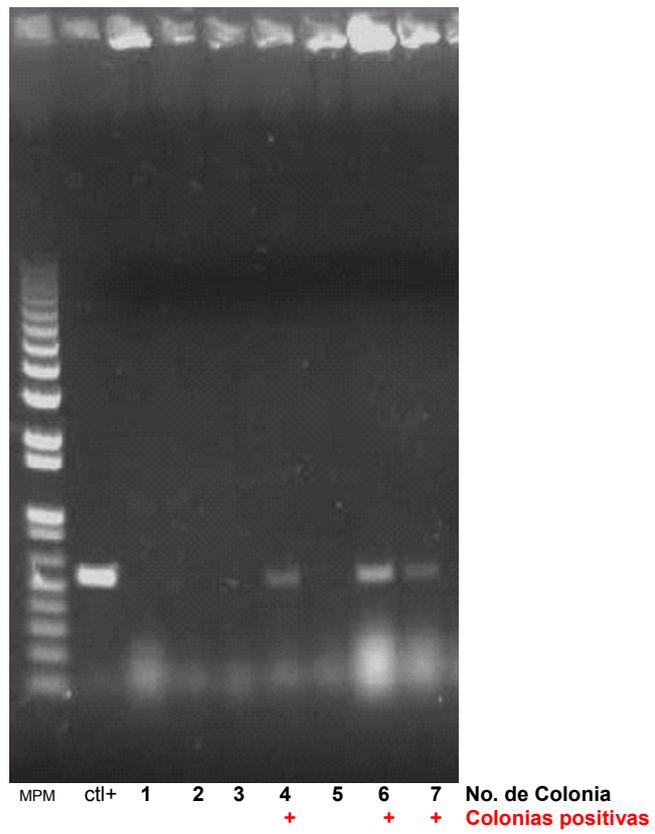


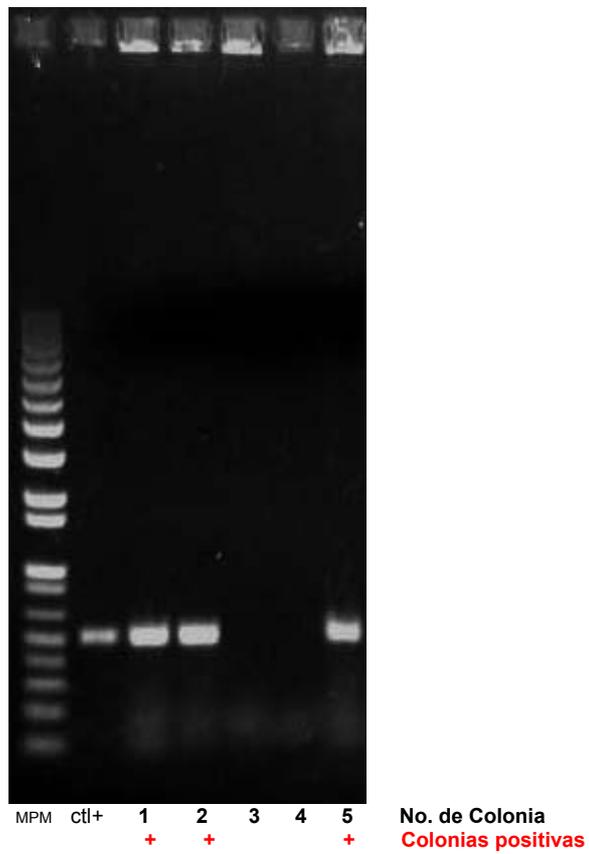
Imagen con lo oligonucleótidos del PCR para obtener los fragmentos 3' y 5' que flanquean el locus *MTL1*. MAPA de lo plásmidos construidos en pGEM con estos fragmentos pSD3-4; pSD1-2

3



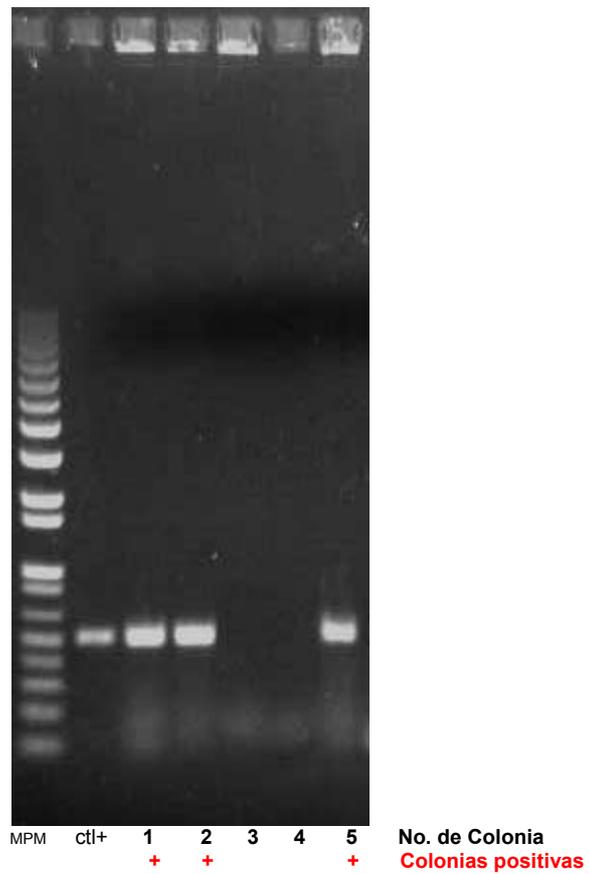
PCR de colonia para identificar las colonias que contienen el plásmido con el fragmento  
5' MTL1

4



PCR de colonia para identificar las colonias que contienen el plásmido con el fragmento  
3' MTL1

5



PCR de colonia para identificar las colonias que contienen el plásmido con el fragmento 3' *MTL1* en el vector pAP599

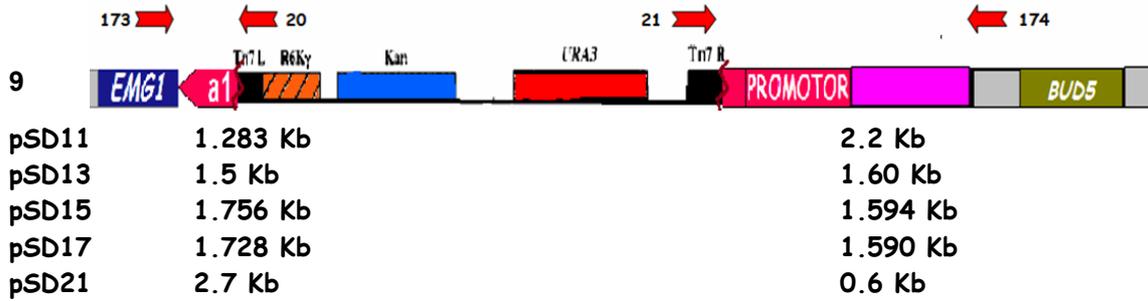


8

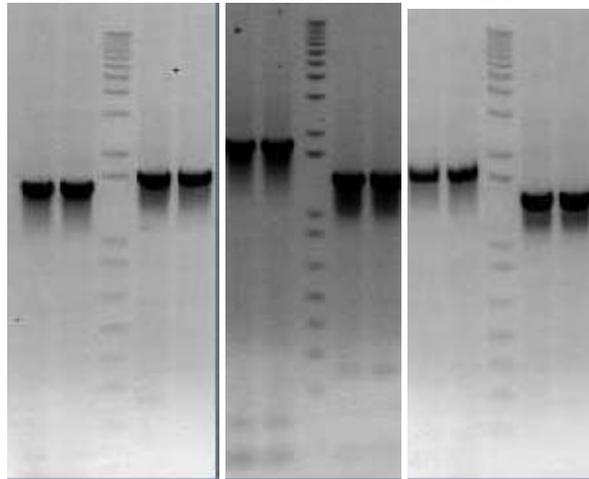


Colonias positivas

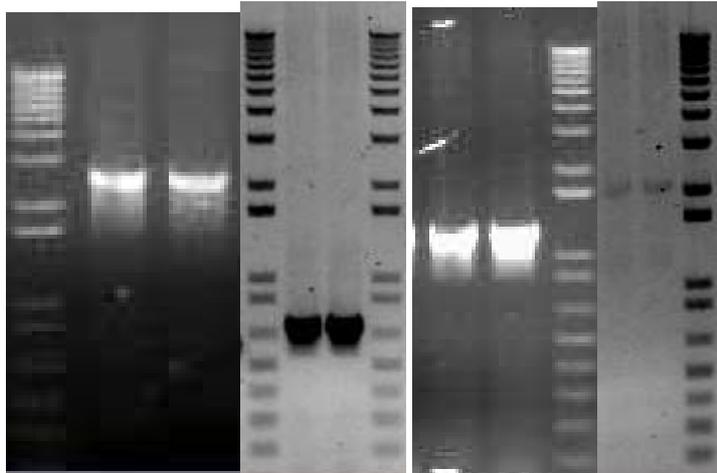
Mapeo de las inserciones en el locus MTL1, PCR de colonia



	pSD13				pSD15				pSD17						
Oligonucleótidos:	20/173	21/174	20/173	21/174	20/173	21/174	20/173	21/174	20/173	21/174	20/173	21/174			
Tamaño PCR:	1.5 Kb	1.60 Kb	1.756 Kb	1.594 Kb	1.728 Kb	1.590 Kb									
No. colonia:	1	2	MPM	1	2	6	7	MPM	6	7	1	3	MPM	1	3

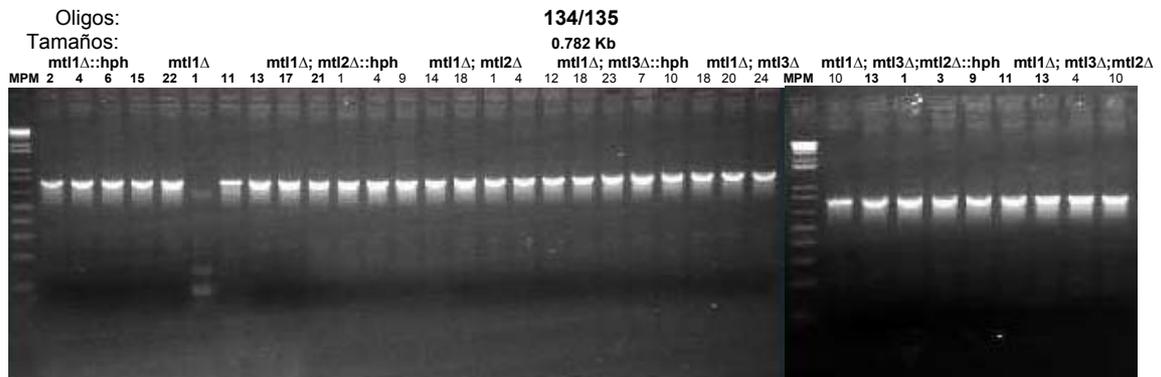
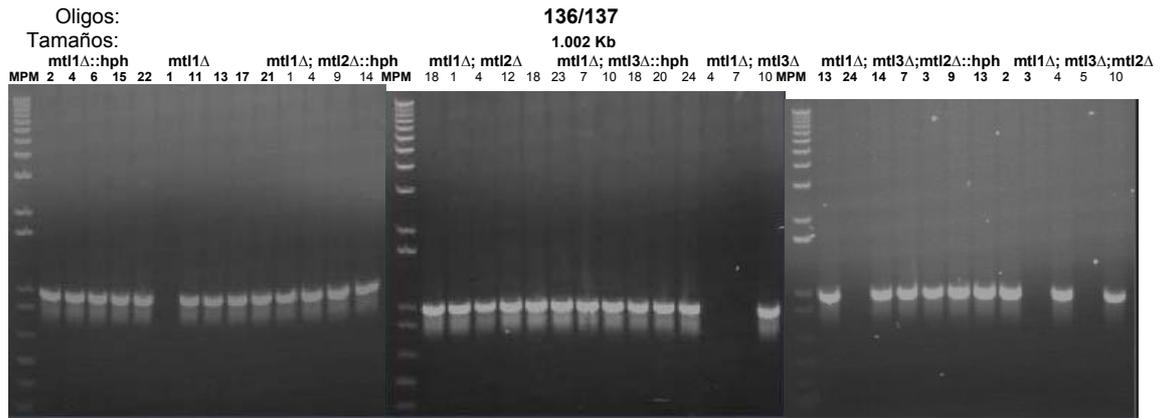


	pSD21			pSD11		
Oligonucleótidos:	20/173	21/174	20/173	21/174	20/173	21/174
Tamaño PCR:	2.7 Kb	0.6 Kb	1.283 Kb	2.2 Kb		
No. colonia:	MPM	2	3	MPM	2	3



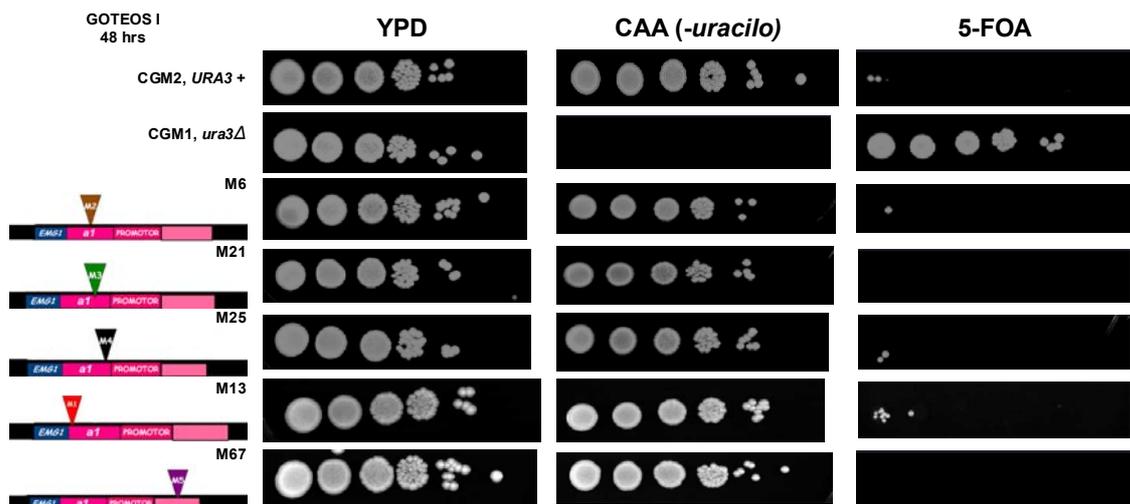
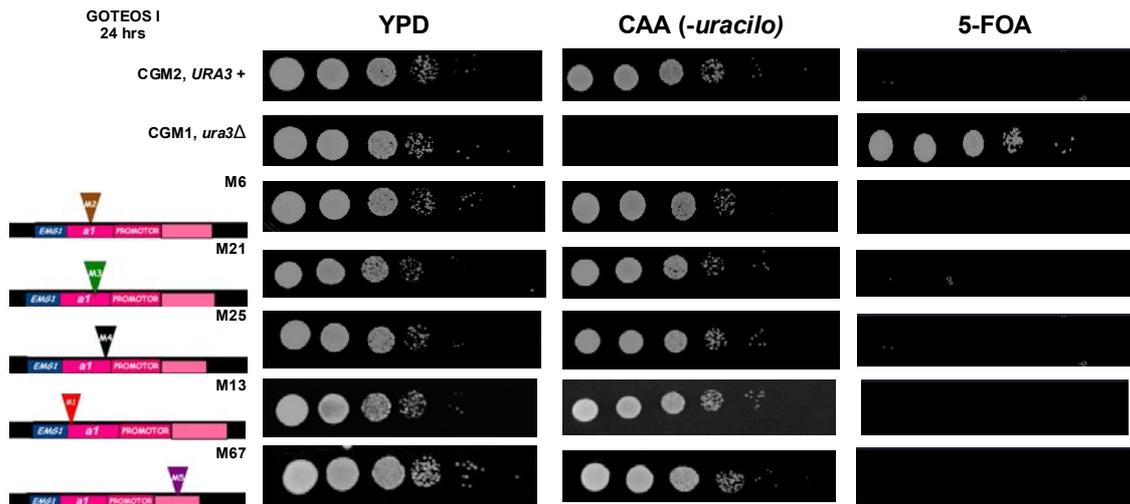
**Búsqueda de las inserciones en el locus *MTL1* del genoma de *C. glabrata***

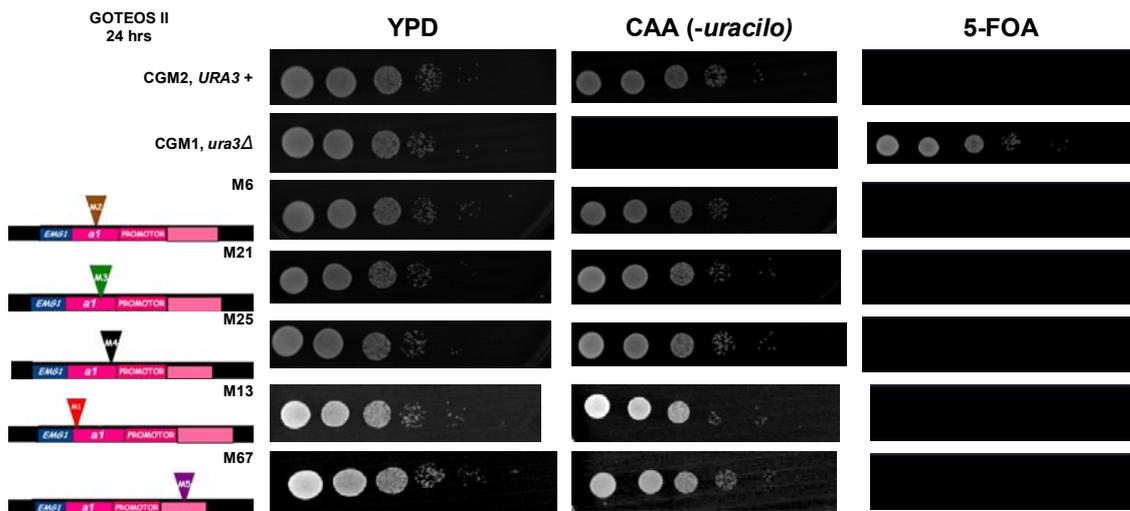
10



Reconstitución del gen *URA3* en todas las cepas construidas

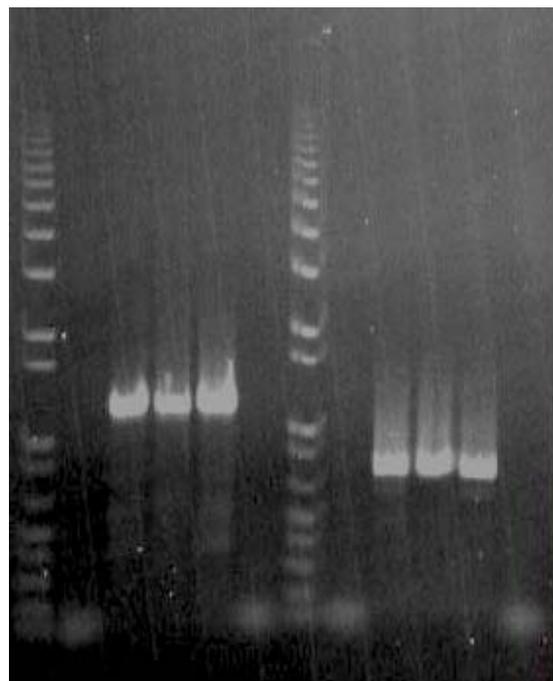
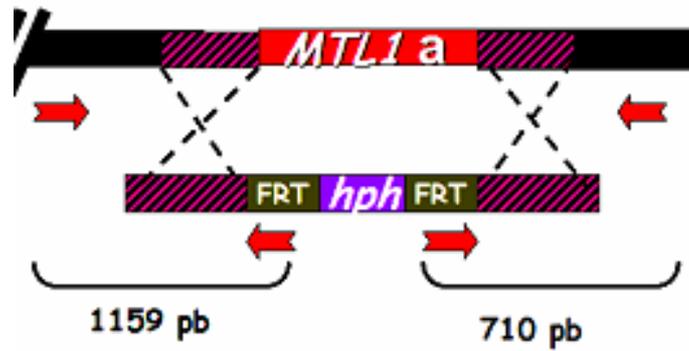
11





**Estado transcripcional del locus *MTL1a* a través de las inserciones del gen reportero *URA3*, duplicados de los goteos mostrados en Resultados, 48 h, 28 °C.** Ensayos de crecimiento para observar el estado transcripcional de la cromatina en el locus *MTL1*. Las cepas construidas con las diferentes inserciones del gen reportero *URA3*, a lo largo del locus, se crecieron a 28 °C por 20 hrs. y se realizaron diluciones a  $OD_{600}$  de 1. En placas de 96 pozos se realizaron diluciones seriadas y se tomaron 5  $\mu$ l colocándose en cajas de YPD, CAA (sin uracilo) y 5-FOA. Se tomaron fotos de las cajas a las 24 y 48 hrs. observándose el crecimiento en el medio sin uracilo (CAA) y 5-FOA. Se encontró crecimiento en CAA (sin uracilo) a diferencia de las cajas de 5-FOA, esto indica que la cromatina en este locus, *MTL1*, se encuentra transcripcionalmente activa.

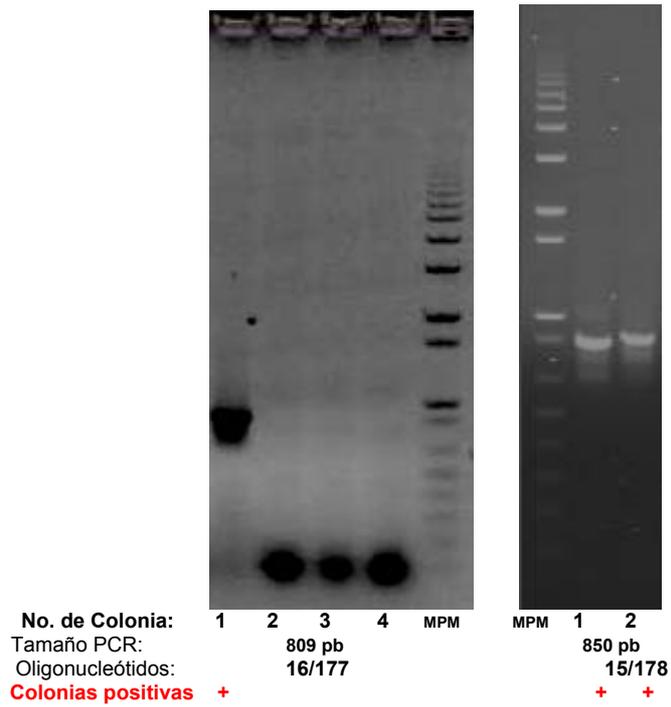
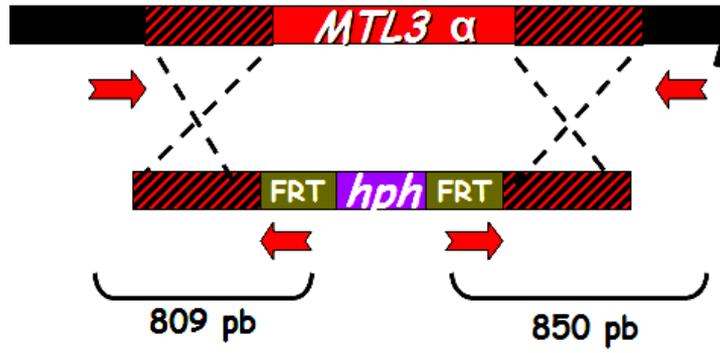
12



MPM 1 2 4 6 8 MPM 1 2 4 6 8 No. de Colonia  
+ + + + + + + + + +  
5' MTL1 oligos 16/173 3' MTL1 oligos 15/174 Colonias positivas

Deleción del locus *MTL1* e inserción del casete de resistencia a higromicina en *C. glabrata*

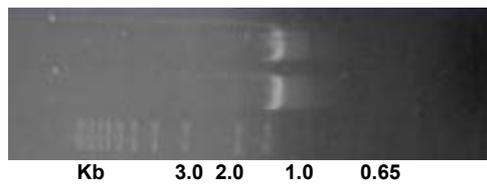
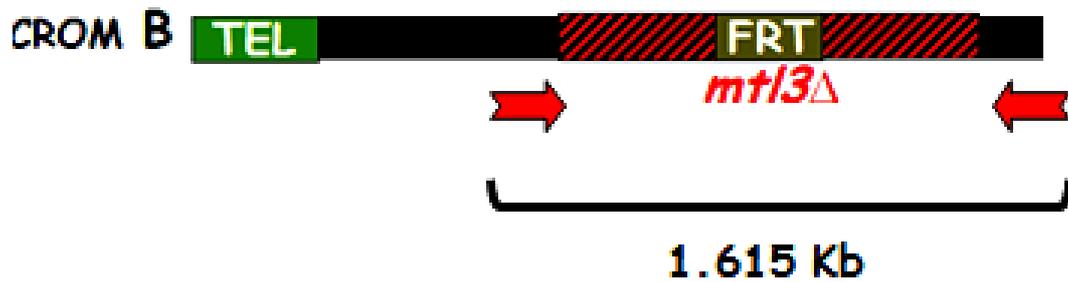
13



Construcción de Dobles Mutantes. Delección del *locus MTL3* en la cepa *mtl1* $\Delta$

14

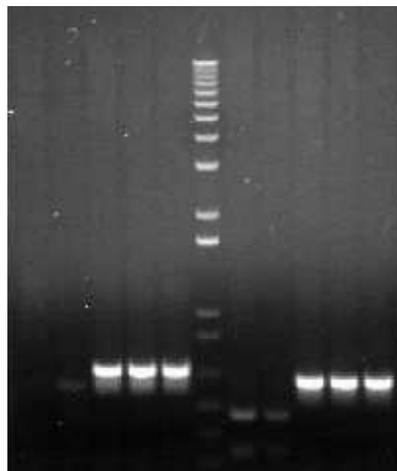
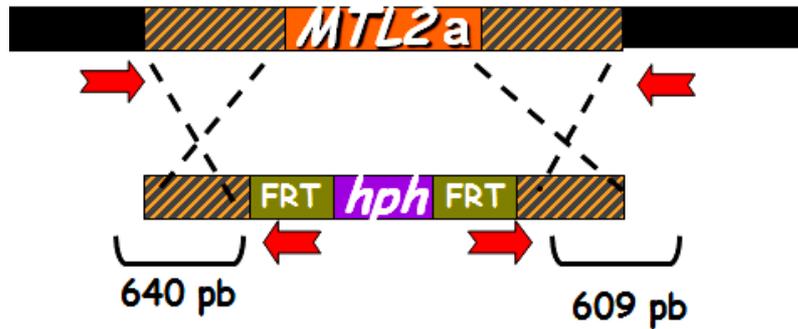
## *Candida glabrata*



oligonucleótidos 177/178 1.615 Kb  
CEPAS: 497, 498 *mtl1*Δ; *mtl3*Δ

Deleción del casete de resistencia a higromicina del locus MTL3 en la cepa *mtl1*Δ; *mtl3*Δ

15

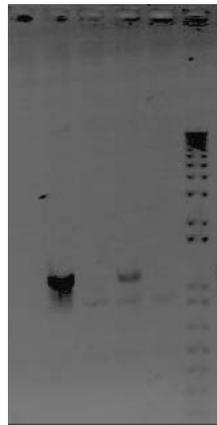


No. de Colonia:	5	6	4	5	11	MPM	5	6	4	5	11
Oligonucleótidos:	16/175						15/176				
Tamaño PCR:	640pb						609 pb				
Colonias positivas			+	+	+				+	+	+

Construcción de Dobles Mutantes. Delección del *locus MTL2* en la cepa *mtl1Δ*

16

## *Candida glabrata*



No. de Colonia:

5 6 4 5 11 MPM

Oligonucleótidos:

175/176

Tamaño PCR:

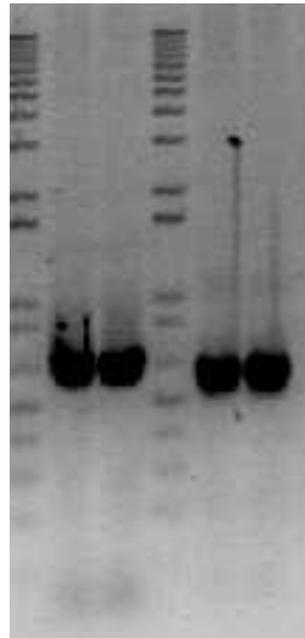
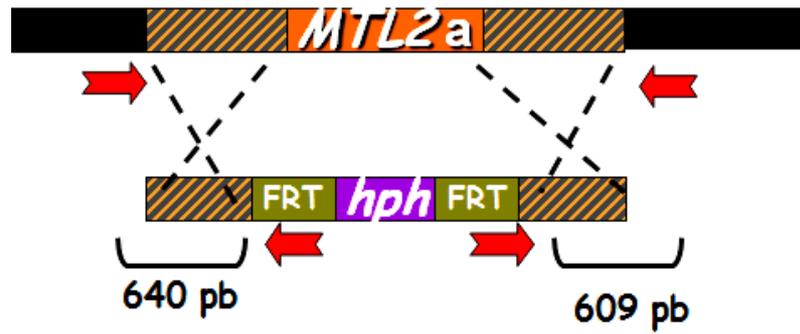
1.1 Kb

Colonias positivas

+ +

Delección del casete de resistencia a higromicina del locus *MTL2* en la cepa *mtl1Δ; mtl2Δ*

17

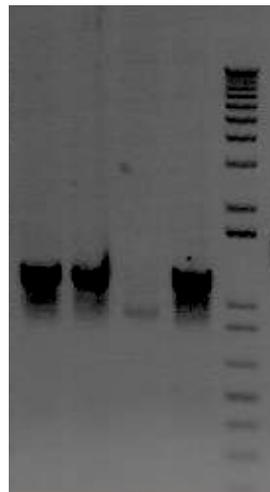
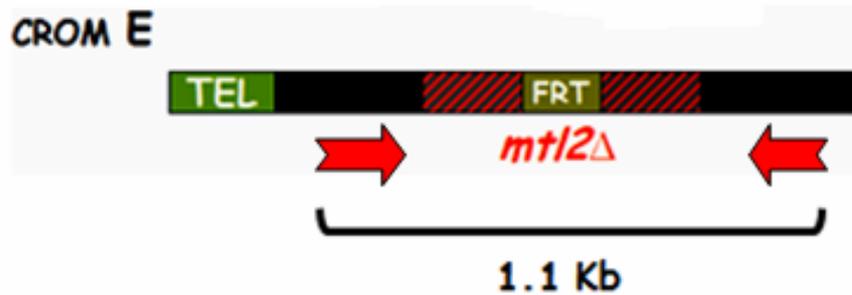


No. de Colonia:	MPM	cti+	2	MPM	cti+	2
Oligonucleótidos:	16/175			15/176		
Tamaño PCR:	640pb			609 pb		

Construcción de la Triple Mutante, delección del locus *MTL2* en la cepa *mtl1* $\Delta$ ;*mtl3* $\Delta$

18

## *Candida glabrata*



No. de Colonia:	1	4	8	9	MPM
Oligonucleótidos:			175/176		
Tamaño PCR:			1.1 Kb		
Colonias positivas		+		+	

Triple Mutante Eliminación del casete de resistencia a higromicina del locus *MTL2* en la cepa *mtl1*Δ;*mtl3*Δ;*mtl2*Δ