

IPICYT

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

POSGRADO EN CIENCIAS EN BIOLOGÍA MOLECULAR

**“Caracterización de cepas de *Candida glabrata* que expresan
simultáneamente los genes $\alpha 1$ y $\alpha 2$ ó $\alpha 1$ y $\alpha 3$ ”**

Tesis que presenta

Karina Asyade Robledo Márquez

Para obtener el grado de

Maestra en Ciencias en Biología Molecular

Director de Tesis

Dra. Irene Castaño Navarro

San Luis Potosí, S.L.P., Julio de 2012



Constancia de aprobación de la tesis

La tesis “**Caracterización de cepas de *Candida glabrata* que expresan simultáneamente los genes $\alpha 1$ y $\alpha 2$ ó $\alpha 1$ y $\alpha 3$** ” presentada para obtener el Grado de de Maestro en Ciencias en Biología Molecular fue elaborada por **Karina Asyade Robledo Márquez** y aprobada el **20 de 06 de 2012** por los suscritos, designados por el Colegio de Profesores de la División de Biología Molecular del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C.

Dra. Irene Castaño Navarro
(Director de la tesis)

Dra. Lina Raquel Riego Ruiz
(Miembro del Comité Tutorial)

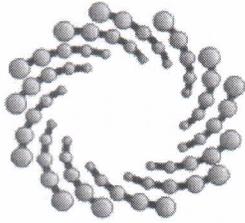
Dr. Gerardo Rafael Argüello Astorga
(Miembro del Comité Tutorial)



Créditos Institucionales

Esta tesis fue elaborada en el Laboratorio de Microbiología Molecular de la División de Biología Molecular del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C., bajo la dirección de la Dra. Irene Castaño Navarro, apoyada por el Proyecto Ciencia Básica-2010-01 No. 151517.

Durante la realización del trabajo el autor recibió una beca académica del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (No. de registro 375866) 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 095 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 3 días del mes de julio del año 2012, se reunió a las 17:00 horas en las instalaciones del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C., el Jurado integrado por:

Dr. Gerardo Rafael Argüello Astorga	Presidente	IPICYT
Dra. Lina Raquel Riego Ruiz	Secretaria	IPICYT
Dra. Irene Beatriz Castaño Navarro	Sinodal	IPICYT

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

MAESTRA EN CIENCIAS EN BIOLOGÍA MOLECULAR

sustentó la C.

Karina Asyade Robledo Márquez

sobre la Tesis intitulada:

Caracterización de cepas de Candida glabrata que expresan simultáneamente los genes $\alpha 1$ y $\alpha 2$ ó $\alpha 1$ y $\alpha 3$

que se desarrolló bajo la dirección de

Dra. Irene Beatriz Castaño Navarro

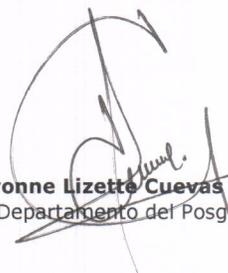
El Jurado, después de deliberar, determinó

APROBARLA

Dándose por terminado el acto a las 18:50 horas, procediendo a la firma del Acta los integrantes del Jurado. Dando fe el Secretario Académico del Instituto.

A petición de la interesada y para los fines que a la misma convengan, se extiende el presente documento en la ciudad de San Luis Potosí, S.L.P., México, a los 3 días del mes de julio de 2012.


Dr. Marcial Bonilla Marín
Secretario Académico


Mtra. Ivonne Lizette Cuevas Vélez
Jefa del Departamento del Posgrado



Dedicatorias

Para mis padres, Ma. del Refugio Márquez y Abel Robledo.

A mis hermanos Víctor, Berenice y Geral.

A mis sobrinos Noelia, Diego, André y Emmanuel.

A mi familia.

A mis amigos que siempre han estado a mi lado y aquellos que conocí a lo largo de este recorrido.

A Raúl Cruz.

“Soy de los que piensan que la ciencia tiene una gran belleza. Un científico en su laboratorio no es sólo un técnico: es también un niño colocado ante fenómenos naturales que le impresionan como un cuento de hadas” Marie Curie

Agradecimientos

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

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología.

Al LANBAMA y LINAN por el apoyo técnico.

A la Dra. Irene Castaño Navarro por todo el apoyo y por la dedicación que tuvo para que llevara a cabo el proyecto. Por su constante dirección y por transmitirme todo su conocimiento para mejorar mi aprendizaje. Gracias por ser un ejemplo a seguir para mi carrera como investigadora.

Al Dr. Alejandro de las Peñas por su paciencia y asesoría. Por estimularme a ser mejor día a día.

A la Dra. Lina Riego y el Dr. Gerardo Argüello por sus aportaciones y comentarios tan valiosos en mi trabajo. Por tomarse el tiempo de mejorar este escrito.

A todos mis compañeros y amigos del laboratorio 6 de Microbiología Molecular, por la ayuda constante para mejorar día a día en el trabajo de laboratorio, por todos los momentos que convivimos dentro y fuera del laboratorio.

A la Dra. Candy Ramírez que fue la primera persona que me enseñó a trabajar dentro del laboratorio, gracias por su dedicación, conocimiento, paciencia y por todo el apoyo técnico que me otorgó.

A Gloria López por el apoyo en el laboratorio 6.

Contenido

Constancia de aprobación de la tesis	ii
Créditos Institucionales	iii
Acta de Examen	iv
Dedicatorias	v
Agradecimientos	vi
Contenido	vii
Lista de figuras	ix
Lista de tablas	x
Resumen	xi
Abstract	xii
1. Resumen	1
2. Introducción	3
3. Resultados	7
3.1 Construcción de cepas de <i>C. glabrata</i> que expresan simultáneamente los genes a1 -alfa2 o bien los genes a1 -alfa3 a partir del locus <i>MTL1</i> mediante la construcción de plásmidos integrativos que contienen estos genes	7
3.2 Caracterización fenotípica de cepas de <i>C. glabrata</i> con diferente información en los loci <i>MTL</i> , crecidas en distintas condiciones de estrés y temperatura	11
3.3 Construcción de los plásmidos que contienen la mitad del lado carboxilo del ORF de HDF1 y HDF2 que se utilizaran como controles positivos para el ensayo de complementación bimolecular BiFC.	18
3.4 Construcción de plásmidos integrativos que contienen los extremos amino y carboxilo de la proteína YFP y el gen a1 del locus <i>MTL1</i> .	24
3.5 Construcción de plásmidos integrativos que contienen los extremos amino y carboxilo de YFP fusionado al gen alfa2 del locus <i>MTL1</i> de la cepa secuenciada CBS138 y al gen alfa3 del locus <i>MTL3</i> .	24

4. Discusión	26
5. Materiales y Métodos	31
6. Bibliografía	37
7. Material Suplementario	39
7.1 Tablas Suplementarias	39
7.2 Figuras Suplementarias	47

Lista de figuras

- Figura 1.** La proteína alfa2 codificada en *MTL1* difiere en el dominio carboxilo-terminal la proteína codificada por el gen alfa2 del locus *MTL3* al cual denominamos alfa3. **9**
- Figura 2.** Caracterización fenotípica de las cepas de *C. glabrata* que expresan los genes a1-alfa2 y a1-alfa3. **13**
- Figura 3.** Plásmidos para la construcción de las cepas que se utilizarán en el ensayo de complementación bimolecular por fluorescencia (BiFC). **19**
- Figura 4.** Generación de cepas que expresan las fusiones traduccionales de los genes **a1**, *HDF1* y *HDF2* con ambos fragmentos de YFP por medio de la integración de los plásmidos pRM18, pRM20, pRM38 y pRM40. **22**
- Figura 5.** Microscopía de fluorescencia y DIC (microscopía diferencial de contraste de interferencia) de cultivos en fase estacionaria de las cepas indicadas. **23**

Lista de Figuras Suplementarias

- Figura S1.** Crecimiento en medio sólido YPD suplementado con diferentes concentraciones de NaCl y H₂O₂. **47**
- Figura S2.** Control negativo de la RT-PCR (sin transcriptasa reversa). **49**
- Figura S3.** Curvas de crecimiento a 30°C en medio YPD con diferente pH. **50**
- Figura S4.** Curvas de crecimiento a 30°C con diferentes concentraciones de NaCl. **51**
- Figura S5.** Microscopía de fluorescencia y DIC (microscopía diferencial de contraste de interferencia) de cultivos en fase estacionaria de la cepa que contiene el gen de la proteína fluorescente YFP bajo el promotor fuerte constitutivo del gen *TEF1*. **52**

Lista de Tablas

Tabla 1. Tiempos de duplicación de cepas de <i>C. glabrata</i> en medios con diferentes pHs y concentraciones de NaCl a 37°C.	17
--	-----------

Lista de Tablas Suplementarias

Tabla S1. Cepas utilizadas y generadas en este trabajo.	39
Tabla S2. Plásmidos utilizados en este trabajo.	41
Tabla S3. Oligonucleótidos utilizados en este trabajo.	45

Resumen

“Caracterización de cepas de *Candida glabrata* que expresan simultáneamente los genes **a1** y alfa2 ó **a1** y alfa3”

Candida glabrata es un hongo asexual, patógeno de humanos que tiene una relación filogenética cercana con *Saccharomyces cerevisiae*, un hongo sexual, no patógeno que a otros hongos de su mismo género. *C. glabrata* contiene tres loci de apareamiento llamados *MTL*. El locus *MTL1* (que puede contener información tipo **a** o alfa) y el locus *MTL2* (con información tipo **a**) son transcripcionalmente activos mientras que *MTL3* (con información tipo alfa), presenta un silenciamiento incompleto. En el laboratorio encontramos que el gen alfa2 presente en el locus *MTL3* (denominado alfa3) es una variante más larga del gen alfa2 que se encuentra en el locus *MTL1*. En células de *S. cerevisiae* que expresan simultáneamente información **a** y alfa, las proteínas **a1** y alfa2 forman un heterodímero que reprime varios genes del ciclo sexual y de respuesta a estrés osmótico. En *C. glabrata* podría formarse un heterodímero en cepas que contienen información **a** en *MTL1* y alfa en *MTL3*. En este trabajo implementamos la técnica de complementación bimolecular para investigar si se forman los heterodímeros **a1**/alfa2 ó **a1**/alfa3. Construimos cepas que expresan simultáneamente los genes **a1** y alfa2 o bien **a1** y alfa3, y encontramos que estas crecen más lentamente en medio líquido con NaCl, que las cepas que solo expresan un tipo de información o ninguna. PALABRAS CLAVE: *C. glabrata*, loci *MTL*, complementación bimolecular por fluorescencia (BiFC).

Abstract

“Characterization of *Candida glabrata* strains simultaneously expressing genes **a1** and **alpha2** or **a1** and **alpha3**”

Candida glabrata is an asexual human pathogen, closely related to *Saccharomyces cerevisiae*, a non-pathogenic sexual fungus. *C. glabrata* contains three mating type-like loci called *MTL*. *MTL1* (which can contain information type **a** or alpha), and *MTL2* (type **a** information) are transcriptionally active while *MTL3* (type alpha information) is repressed by silencing although not completely. We have found that the alpha2 gene present at the *MTL3* locus is a longer variant, called alpha3, of the alpha2 gene present at *MTL1*. In *S. cerevisiae* cells that express both types of information, the proteins **a1** and alpha2 form a heterodimer that represses several mating genes and genes involved in the response to osmotic stress. In *C. glabrata* cells an analogous heterodimer could be formed in cells that contain **a**-type information in *MTL1* and alpha-type information in *MTL3*. In this work we implemented the Bimolecular Fluorescence Complementation technique to determine whether the heterodimers **a1**-alpha2 or **a1**-alpha3 can be formed in *C. glabrata*. We also constructed strains that simultaneously express **a1** and alpha2 or **a1** and alpha3 genes and found that these strains grow more slowly in liquid media with NaCl than strains that contain only one type, or no mating information.

Keywords: *C. glabrata*, *MTL* loci, Bimolecular Fluorescence Complementation (BiFC).

Caracterización de cepas de *Candida glabrata* que expresan simultáneamente los genes *a1* y *alfa2* ó *a1* y *alfa3*.

Karina A. Robledo Márquez, Alejandro De Las Peñas e Irene Castaño*.

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

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

Resumen

Candida glabrata es un hongo asexual, patógeno de humanos que tiene una relación filogenética cercana con *Saccharomyces cerevisiae*, un hongo sexual, no patógeno que a otros hongos de su mismo género. *C. glabrata* contiene tres loci de apareamiento llamados *MTL*. El locus *MTL1* (que puede contener información tipo **a** o alfa) y el locus *MTL2* (con información tipo **a**) son transcripcionalmente activos mientras que *MTL3* (con información tipo alfa), presenta un silenciamiento incompleto. En el laboratorio encontramos que el gen *alfa2* presente en el locus *MTL3* (denominado *alfa3*) es una variante más larga del gen *alfa2* que se encuentra en el locus *MTL1*. En células de *S. cerevisiae* que expresan simultáneamente información **a** y alfa, las proteínas **a1** y *alfa2* forman un heterodímero que reprime varios genes del ciclo sexual y de respuesta a estrés osmótico. En *C. glabrata* podría formarse un heterodímero en cepas que contienen información **a** en *MTL1* y alfa en *MTL3*. En este trabajo implementamos la técnica de complementación bimolecular para investigar si se forman los heterodímeros **a1/alfa2** ó **a1/alfa3**. Construimos cepas que expresan simultáneamente los genes **a1** y *alfa2* o bien **a1** y *alfa3*, y encontramos que estas crecen más lentamente en

medio líquido con NaCl, que las cepas que solo expresan un tipo de información o ninguna.

Introducción

La reproducción sexual y la identidad celular del tipo sexual en hongos, están controladas por los genes codificados en el locus llamado *MAT* (por sus siglas en inglés mating type) o *MTL* (mating-type like, en algunos hongos). Mientras que *Saccharomyces cerevisiae* presenta un ciclo sexual bien definido, varios hongos patógenos de humanos no parecen tener un ciclo sexual (o presentan un ciclo críptico); sin embargo, la mayoría de ellos conserva los genes presentes en los loci *MTL*. *S. cerevisiae* presenta tres tipos celulares: células tipo **a**, células tipo alfa (ambas haploides) y células diploides **a/alfa** que resultan del apareamiento entre una célula **a** con una alfa (HERSKOWITZ *et al.* 1992). *S. cerevisiae* posee tres loci de apareamiento de los cuales el único que se expresa es el locus *MAT*, que puede tener información tipo **a** o tipo alfa. *MAT_a* codifica para la proteína **a1**, mientras que *MAT_{alfa}* codifica para las proteínas alfa1 y alfa2. Estas tres proteínas son factores transcripcionales que se combinan para controlar el tipo de apareamiento (o identidad del tipo celular) a través de un circuito regulatorio que involucra la formación de un heterodímero de las proteínas **a1** y alfa2 (Herskowitz *et al.*, 1992).

C. glabrata presenta una mayor cercanía filogenética a *S. cerevisiae* que a otras especies de su mismo género como *C. albicans* (BUTLER 2010; DUJON *et al.* 2004), y posee también tres loci de apareamiento dispuestos en una configuración similar, denominados *MTL1*, *MTL2* y *MTL3*. A diferencia de *S. cerevisiae*, ambos loci, *MTL1* y *MTL2* son transcripcionalmente activos, mientras que *MTL3* presenta un silenciamiento incompleto que depende del telómero (RAMIREZ-ZAVALA *et al.*

2010). El locus *MTL1* puede tener información tipo **a** o tipo alfa (MULLER *et al.* 2008; RAMIREZ-ZAVALA *et al.* 2010; SRIKANTHA *et al.* 2003) y *MTL2* y *MTL3* codifican generalmente para información tipo **a** y tipo alfa, respectivamente. En la cepa que estudiamos en el laboratorio encontramos que el locus *MTL3* contiene una variante del gen alfa2 que codifica una proteína que difiere en los últimos 14 amino ácidos en el extremo carboxilo terminal, y es 24 amino ácidos más larga hacia el carboxilo terminal que la proteína codificada por el gen alfa2 presente en *MTL1* de la cepa secuenciada (CBS138). De manera interesante, encontramos que esta variante se conserva no solo en nuestra cepa de laboratorio sino en 3 aislados clínicos además de la cepa secuenciada (CBS138). A este gen, lo hemos denominado alfa3, para distinguirlo del gen identificado como alfa2 en el locus *MTL1* de la cepa secuenciada. Es importante hacer notar que otros 3 aislados clínicos que contienen información alfa en *MTL1* y que hemos secuenciado, todos tienen el gen alfa2 (Yañez-Carrillo, datos no publicados). Entonces, a diferencia de *S. cerevisiae*, en *C. glabrata*, se ha conservado una variante del gen alfa2, denominado alfa3, presente en *MTL3*, y el gen alfa2 en *MTL1* (en las cepas que contienen información alfa en *MTL1*).

A pesar de que *C. glabrata* posee estos genes, no se ha descrito un ciclo sexual en esta levadura. Una situación similar se ha descrito en otros hongos patógenos de humanos, en los cuales los genes que se encuentran en los loci *MTL* están conservados, pero aparentemente no tienen un ciclo sexual o bien presentan un ciclo críptico. Se ha propuesto que estos genes participan en la patogenicidad o capacidad de supervivencia dentro del hospedero, o bien que

hayan evolucionado para controlar la expresión de otro grupo de genes, que podrían participar en la respuesta a condiciones de estrés.

En *S. cerevisiae* y en otros hongos, los genes **a1**, alfa1 y alfa2, controlan el ciclo sexual. En *S. cerevisiae*, además regulan la expresión de otras vías de señalización que son importantes para el crecimiento, la filamentación y la adaptación a diferentes condiciones de osmolaridad (BAHN *et al.* 2007; BUTLER 2010; ZHAO *et al.* 2007). Por ejemplo, el heterodímero **a1/alfa2** de *S. cerevisiae* reprime la expresión de algunos genes relacionados con la respuesta a ciertos tipos de estrés (GALGOCZY *et al.* 2004; GUSTIN 1998), como es el gen *HOG1* que codifica para la proteína Hog1. Hog1 a su vez, activa factores de transcripción que están involucrados en la inducción de genes de respuesta a estrés y osmoregulación. Esto resulta en mayor susceptibilidad a estrés osmótico (y otros tipos de estrés) de cepas de *S. cerevisiae* que expresan ambos tipos de información (GALGOCZY *et al.* 2004).

En nuestro laboratorio encontramos que las cepas que expresan solamente un tipo de información (**a** o alfa) o ninguno, son más resistentes a condiciones de estrés oxidante y osmótico con respecto a aquellas que contienen ambos tipos de información (YAÑEZ-CARRILLO 2010). Es posible que nuestra cepa de *C. glabrata* forme el heterodímero **a1/alfa3** debido al silenciamiento incompleto del locus *MTL3*. Éste heterodímero podría reprimir genes de respuesta a estrés como se ha reportado anteriormente en *S. cerevisiae* (GALGOCZY *et al.* 2004).

En este trabajo nos propusimos determinar por una parte si se forma el heterodímero **a1**/alfa2 y/o **a1**/alfa3 en *C. glabrata*, para ello utilizaremos la técnica de complementación bimolecular por fluorescencia (BiFC) (SUNG and HUH 2007), que nos permitirá detectar la formación del heterodímero y su localización celular. Además, caracterizaremos fenotípicamente cepas de *C. glabrata* que expresen simultáneamente los genes **a1** y alfa2 o **a1** y alfa3. Estos experimentos nos permitirán determinar si la información presente en los loci *MTL* participa en la regulación de la respuesta a ciertos tipos de estrés.

Resultados

Construcción de cepas de C. glabrata que expresan simultáneamente los genes a1-alfa2 o bien los genes a1-alfa3 a partir del locus MTL1 mediante la construcción de plásmidos integrativos que contienen estos genes.

En el laboratorio encontramos que el locus *MTL3* de *C. glabrata* contiene la variante del gen alfa2 que hemos denominado alfa3. En la figura 1A se muestran las diferencias entre las proteínas codificadas por los genes alfa3 y alfa2 que se encuentran en *MTL1* de las cepas de *C. glabrata* con información alfa en este locus. El gen alfa3 que codifica para la proteína alfa3 es idéntico a la proteína alfa2 codificada por el gen alfa2 excepto en los últimos 14 amino ácidos de esta última, y además, alfa3 contiene 24 amino ácidos más en el lado carboxi terminal, que alfa2.

Para determinar si la expresión simultánea de los genes **a1-alfa2** o la expresión simultánea de los genes **a1-alfa3** resultan en la represión de genes necesarios para la respuesta a ciertos tipos de estrés, construimos dos plásmidos, uno que contiene los genes **a1-alfa2** (pRM4) y otro con los genes **a1-alfa3** (pRM49) (Tabla S2) de manera divergente con sus propios promotores y regiones flanqueantes del locus *MTL1* para integrarlos en este locus.

Para la construcción del plásmido pRM4 se clonó en el vector integrativo YIp/*lac211* un producto de PCR que corresponde al gen alfa2 proveniente del locus *MTL1* de la cepa secuenciada (CBS138) con su propio promotor y 517 pb de la región intergénica al 3' del gen (que incluye el 3' UTR). Además, a partir de DNA

genómico de la cepa silvestre del laboratorio CGM1, se amplificó y se clonó otro fragmento de PCR que contiene el gen **a1** con su propio promotor (Tabla S2 y S3).

Del plásmido resultante, pRM4 (Fig.1B), se comprobó la inserción correcta del fragmento, primero mediante PCR de colonia y posteriormente por patrón de restricción con 4 enzimas. Finalmente, secuenciamos el inserto y comprobamos que tiene la secuencia correcta para ambos genes (datos no mostrados).

El plásmido pRM49 se generó mediante PCR, amplificando primero un fragmento de 1549 pb que contiene el gen alfa3 del locus *MTL3* de la cepa silvestre y después amplificando un fragmento de 403 pb que corresponde a una región de homología al 3' del gen **a1** del locus *MTL1*. Estos dos productos se ligaron y después se amplificó por PCR el producto de la ligación de 1600 pb. Este último producto de PCR se clonó en pRM4 generando el plásmido pRM49. Se comprobó la inserción correcta del producto mediante PCR de colonia y patrón de restricción con dos enzimas de restricción (Tabla S2 y S3).

Para reconstituir información deseada en el locus *MTL1*, realizamos la técnica de dos pasos y utilizamos como receptora a la cepa mutante triple nula de los loci *MTL* (*mtl1*, 2, 3) Δ , indicada como $\Delta\Delta\Delta$ en las figuras. Para ello, los plásmidos pRM4 y pRM49 se linearizaron con la enzima *MfeI* para dirigir la integración al locus *MTL1* (primer paso). Posteriormente se seleccionó la resolución del cointegrado y se buscaron las colonias que retuvieron en el locus *MTL1* los genes **a1**-alfa2 (provenientes de la integración de pRM4) y **a1**-alfa3 (de pRM49) (Tabla S1).

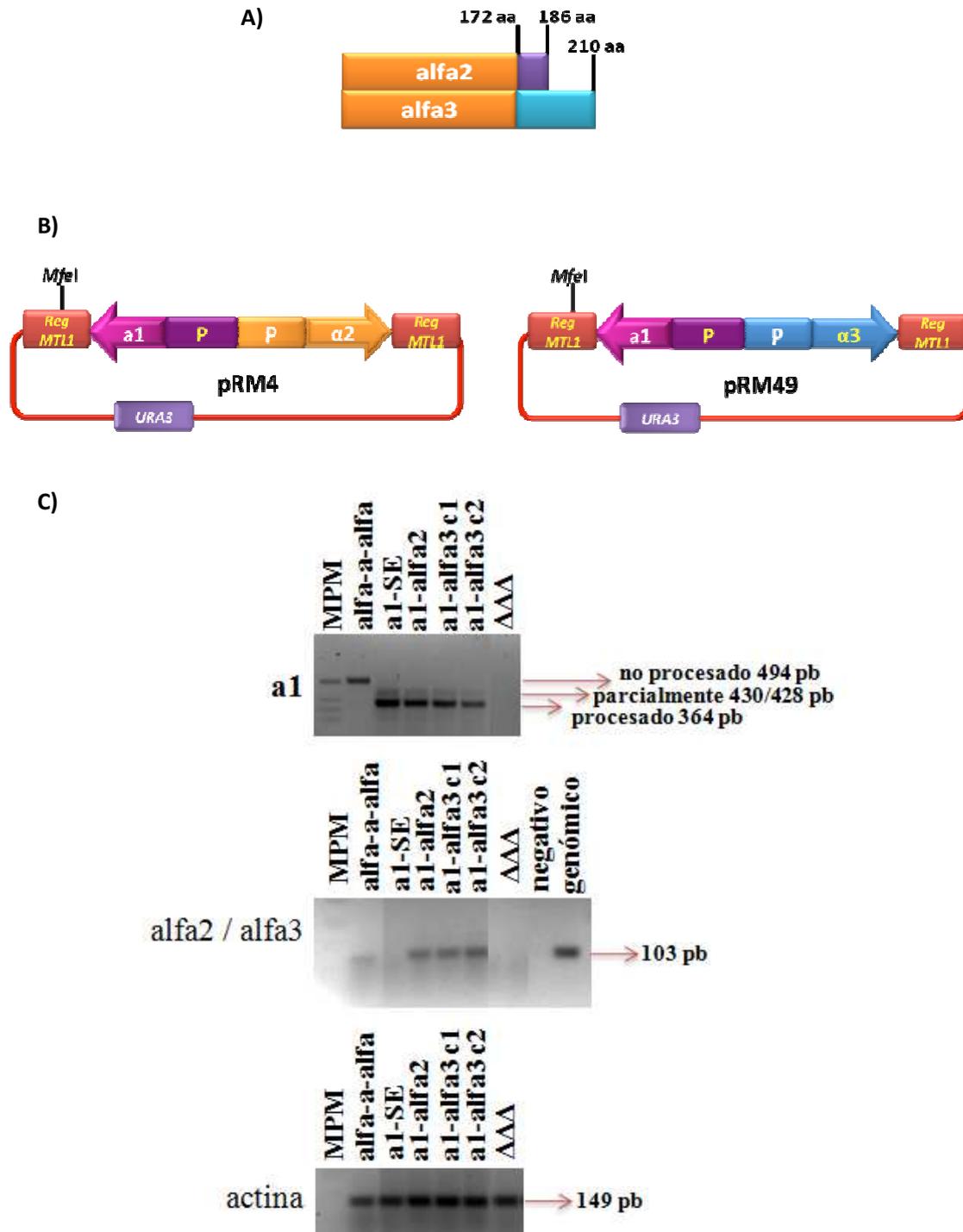


Figura 1. La proteína alfa2 codificada en *MTL1* difiere en el dominio carboxilo-terminal la proteína codificada por el gen alfa2 del locus *MTL3* al cual denominamos alfa3. A) Esquema que muestra las diferencias entre la

proteína alfa2 codificada por el gen alfa2 que proviene del locus *MTL1*, y la proteína alfa3 codificada por el gen alfa3 proveniente de *MTL3*. La primera proteína difiere de alfa3 en los últimos 14 amino ácidos de su extremo carboxilo terminal, mientras que alfa3 es 24 amino ácidos más larga hacia el carboxilo terminal que la proteína codificada por el gen alfa2 presente en *MTL1* de la cepa secuenciada (CBS138).

B) Construcción de cepas que expresan simultáneamente los genes a1 y alfa2 o bien a1 y alfa3, cada uno a partir de sus propios promotores. Mapa de los plásmidos integrativos construidos para integrar los genes **a1** y alfa2 o **a1** y alfa3 en el locus *MTL1* (pRM4 y pRM49). Los genes **a1** y alfa2 y **a1** y alfa3 están flanqueados por regiones de homología específicas de *MTL1* para dirigir la integración a este locus. Se indica el sitio *MfeI* con el cual se linearizó el plásmido para inducir la recombinación en el locus *MTL1*.

C) Determinación por medio de RT-PCR de la expresión de los genes introducidos en el locus *MTL1* (a1, alfa2 y alfa3) y actina como control. Se extrajo RNA en fase estacionaria de las cepas indicadas y se realizó una RT-PCR para los genes descritos. Las cepas utilizadas fueron las siguientes: CBS138 (cepa de referencia secuenciada con información alfa en *MTL1* y *MTL3* e información **a** en *MTL2*); **a1-SE** (cepa que contiene el gen **a1** bajo el promotor fuerte constitutivo del gen *PGK1* integrado en *MTL1*); **a1-alfa2** (cepa que contiene los genes **a1** y alfa2 con sus propios promotores integrado en el locus *MTL1*); **a1-alfa3** (dos cepas independientes, c1 y c2, que contienen los genes **a1** y alfa3 con sus propios promotores integrado en el locus *MTL1*); $\Delta\Delta\Delta$ (cepa triple mutante nula de los loci *MTL*). El gen **a1** contiene dos intrones. El tamaño del mensajero completamente procesado corresponde a 364 pb, el mensajero parcialmente procesado es de 430/428 pb y el no procesado corresponde a 494 pb como se indica en la figura. El transcrito del gen **a1** solo se procesa cuando este se origina en *MTL1*. El carril marcado con "genómico" es un control positivo de una PCR utilizando como molde DNA genómico de la cepa silvestre.

Caracterización fenotípica de cepas de C. glabrata con diferente información en los loci MTL, crecidas en distintas condiciones de estrés y temperatura.

Para determinar si la información en los loci *MTL* regula la respuesta a condiciones de estrés osmótico y oxidante inducido por NaCl y H₂O₂ respectivamente realizamos experimentos de crecimiento en medio sólido y líquido con diferentes concentraciones de NaCl y de peróxido de hidrógeno.

Para los experimentos de crecimiento en medio sólido, se utilizó medio rico YPD suplementado con diferentes concentraciones de NaCl (0.5M, 1.0M, 1.5M y 1.8M) y H₂O₂ (20mM, 23mM y 25mM). Partimos de cultivos en fase estacionaria y se ajustó la OD_{600nm} a 0.5 y se realizaron cinco diluciones logarítmicas de cada cepa. Posteriormente, se colocaron gotas de 5µl de cada dilución de cada cepa en forma horizontal. De manera que se presenta una cepa diferente en cada línea y en cada columna las diferentes diluciones de manera creciente.

Las cajas se incubaron a tres diferentes temperaturas (30°C, 37°C y 45°C) durante 4 días y se tomaron fotografías cada día para evaluar su crecimiento. En la figura 2A se muestran las fotografías tomadas a los 2 días en medio YPD, YPD suplementado con 0.5M de NaCl y YPD suplementado con 25mM de H₂O₂. En ninguno de los medios utilizados encontramos diferencia en el crecimiento de las cepas utilizadas, únicamente se observa un retardo similar en el crecimiento de cada una en presencia de NaCl o peróxido de hidrógeno. También utilizamos medio YPD con 1 M y 1.5 M de NaCl y 20mM y 23mM de H₂O₂, pero tampoco se

observó ninguna diferencia de crecimiento entre las cepas (material suplementario, Fig. S1)

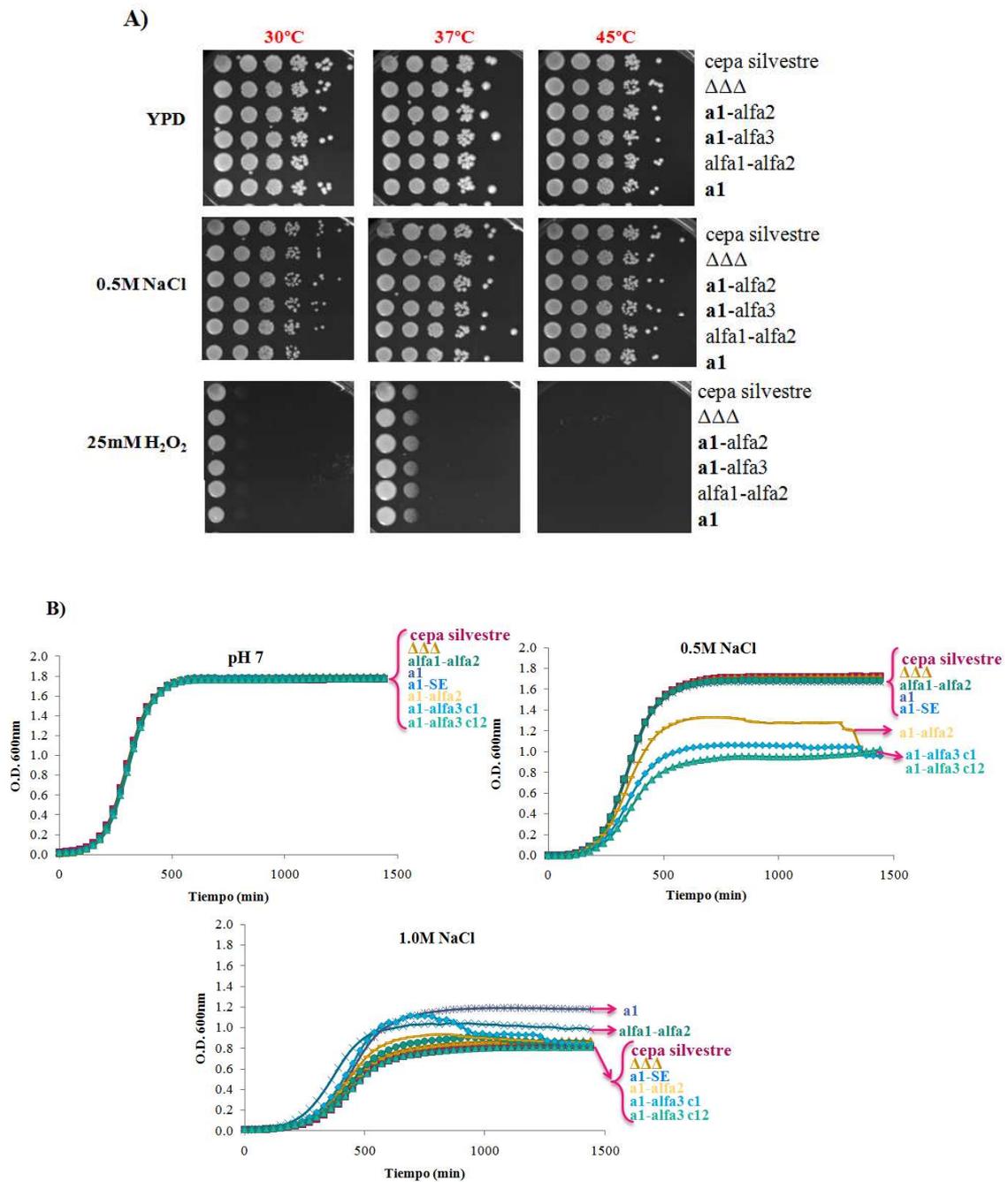


Figura 2. Caracterización fenotípica de las cepas de *C. glabrata* que expresan los genes a1-alfa2 y a1-alfa3.

A) Las cepas de *C. glabrata* con diferente información en los loci *MTL* crecen igual que la cepa silvestre en medio sólido con NaCl o peróxido de

hidrógeno a diferentes temperaturas. A) Se utilizaron cultivos en fase estacionaria de cada una de las cepas indicadas (y descritas en la Figura 1). La OD de cada uno se ajustó a 0.5 y se hicieron diluciones logarítmicas. La cepa silvestre (CGM1) contiene información **a** tanto en *MTL1* como en *MTL2*, e información alfa en *MTL3* (genes alfa1 y alfa3). Se tomaron 5 μ L de cada dilución y se depositaron en cada uno de los distintos medios: medio rico (YPD), medio rico suplementado con 0.5 M NaCl y medio rico con 25 mM de H₂O₂ y se incuban a 30°C, 37°C y 45°C durante 4 días y se tomaron fotos cada 24hrs. Solamente se muestran las fotos de 2 días de crecimiento **B) Las cepas que expresan simultáneamente los genes a1 y alfa3 crecen más lentamente que la silvestre en medio líquido con NaCl a 37°C.** Curvas de crecimiento de cepas con diferente información en *MTL1* en medio líquido con NaCl realizadas en el aparato Bioscreen C. Se utilizaron cultivos en fase estacionaria de cada una de las cepas indicadas y se inocularon en placas de microdilución a una OD de 0.05 en un volumen de 300 μ L de cada uno de los medios indicados y se incubaron con agitación a 37°C durante 24 hrs. Los experimentos se realizaron por duplicado con dos réplicas cada uno.

Por otra parte, realizamos curvas de crecimiento en el aparato Bioscreen C que permite la determinación continua de la OD_{600nm} de cultivos en microplacas con 100 pozos utilizando un volumen final de 300µL. Utilizamos medio rico YPD ajustado a 3 diferentes valores de pH, pH 3.5, pH 6 y pH 7, así como medio rico YPD (pH7) con 4 diferentes concentraciones de NaCl: 0.5M, 1.0M, 1.5M y 1.8M. Partimos de cultivos en fase estacionaria de cepas que contienen diferente información en *MTL1*, y se ajustó la OD_{600nm} a 0.05. A partir de los datos de OD, calculamos los tiempos de duplicación para cada cepa en la parte de crecimiento logarítmico de cada curva. (Fig 2B y Tabla 1.)

Las curvas de crecimiento en medio líquido YPD (pH 7.0) a 37°C presentan un comportamiento similar para cada una de las cepas evaluadas. Para los diferentes pHs evaluados (pH 3.5 y 6.0) se observa que el crecimiento de cada cepa es similar, y presentan tiempos de duplicación menores que los calculados a pH 7.0 (Tabla 1 y Fig. 2B). En las gráficas de las curvas realizadas en presencia de NaCl 0.5M, se observa un retardo en el crecimiento de las cepas, aunque esto no se refleja en tiempos mayores de duplicación (Fig. 2B). A una concentración de NaCl 1.0M se observa una disminución del crecimiento de todas las cepas evaluadas, sin embargo, puede observarse que la cepa que expresa el gen **a1** y la cepa que expresa simultáneamente los genes alfa1-alfa2 (es decir, cepas que expresan solamente un tipo de información), alcanzan un crecimiento ligeramente mayor comparado con las demás cepas (Fig. 2B).

Se evaluó también el crecimiento a 30°C en los medios suplementados con NaCl y diferentes valores de pH (Figs. S3 y S4). En este experimento no se evaluaron las cepas que expresan los genes $\alpha 1$ -alfa3. Pero se observa que en condiciones con diferente pH, las cepas presentan un crecimiento similar entre ellas y lo único que se observa en el crecimiento a pH 3.5, es que los tiempos de duplicación son menores para todas las cepas (Fig. S3). En el caso del crecimiento en las diferentes concentraciones de NaCl podemos observar que a mayor concentración de NaCl las células disminuyen su crecimiento, presentando un aumento en sus tiempos de duplicación (Fig. S4 y Tabla 1). Todas las cepas evaluadas a 37°C y en ambas condiciones muestran un comportamiento similar entre sí. De manera que no encontramos una diferencia en su crecimiento que dependa del tipo de información que contienen en sus loci *MTL*.

Tabla 1. Tiempos de duplicación de cepas de *C. glabrata* en medios con diferentes pHs y concentración de NaCl a 37°C

Genotipo en <i>MTL1</i>	Tiempo de duplicación (min)						
	pH			NaCl			
	3.5	6.0	7.0	0.5M	1.0M	1.5M	1.8M
WT	41.3	40.8	48.2	51.5	75.0	108.4	144.9
ΔΔΔ	43.3	41.4	44.4	52.0	79.5	115.9	149.6
alfa1-alfa2	45.9	41.6	44.7	50.9	61.8	101.8	158.3
a1	47.7	41.0	44.5	50.1	67.1	100.3	165.6
a1-SE	40.9	44.3	45.3	51.5	75.0	108.0	166.1
a1/alfa2	45.4	41.2	44.1	53.4	71.4	106.7	169.7
a1/alfa3 c1	43.6	40.4	44.4	53.2	67.8	99.0	167.5
a1/alfa3 c2	47.0	40.5	44.5	53.7	80.7	105.4	168.4

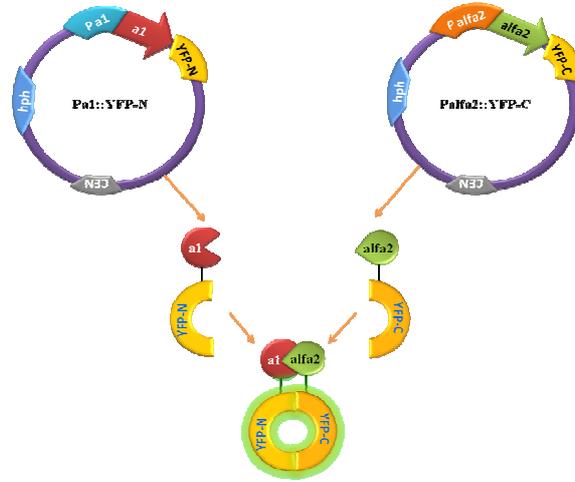
Tiempos de duplicación obtenidos de la fase de crecimiento logarítmica para cada una de las cepas mostradas. Se realizaron los ensayos por duplicado a 37°C en el aparato Bioscreen C que permite la determinación de la OD_{600nm} de cultivos en microplacas con 100 pozos. Inicialmente utilizamos cultivos en fase estacionaria y se ajustaron a una OD_{600nm} de 0.05. El genotipo de las cepas está indicado en la tabla. Todas las cepas, excepto la silvestre, son mutantes nulas de *MTL2* y *MTL3* y el genotipo indicado se reconstituyó en el locus *MTL1*. La cepa silvestre contiene información tipo **a** en *MTL1*, **a** en *MTL2* y alfa en *MTL3*.

Construcción de los plásmidos que contienen fusiones traduccionales de *HDF1* y *HDF2* con fragmentos complementarios de la proteína fluorescente amarilla que se utilizaran como controles positivos para el ensayo de complementación bimolecular BiFC.

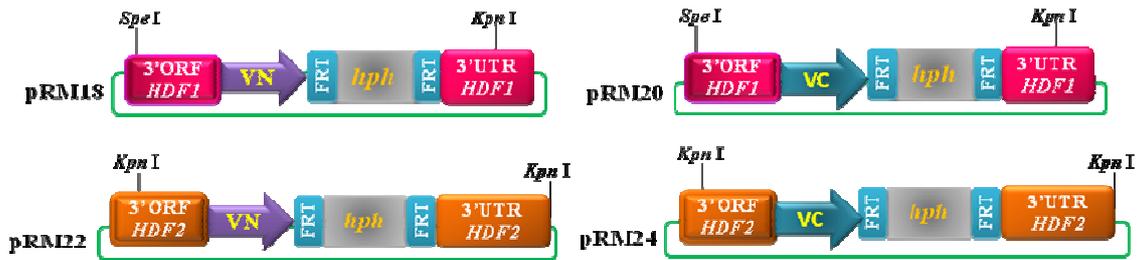
Para determinar si existe una interacción física entre las proteínas codificadas por los genes *a1*, *alfa2* y *alfa3*, utilizamos el ensayo de complementación bimolecular de fluorescencia (BiFC) (Fig. 3A). Decidimos construir inicialmente un control positivo con dos proteínas que hemos determinado previamente en el laboratorio que interaccionan entre sí en *C. glabrata* (MEDINA-SANCHEZ 2011), con el objeto de determinar si este ensayo BiFC funciona eficientemente en *C. glabrata*. Utilizamos las proteínas Ku70 y Ku80 (codificadas por los genes *HDF1* y *HDF2* respectivamente) para construir cepas que expresen simultáneamente fusiones traduccionales de *HDF1* y *HDF2* con cada una de las dos mitades de la proteína fluorescente amarilla YFP (denominadas VN y VC que corresponden a la mitad del amino-terminal y carboxilo-terminal respectivamente) (MEDINA-SANCHEZ 2011; SUNG and HUH 2007).

Construimos plásmidos integrativos que contienen una fusión traduccional de *HDF1* con VN-YFP o bien con VC-YFP, así como las fusiones traduccionales de *HDF2* con VN-YFP o bien con VC-YFP (Fig. 3B). Estas construcciones se introdujeron por recombinación homóloga en el locus nativo correspondiente (*HDF1* o *HDF2*) del genoma de *C. glabrata* y se escindió el casete que confiere resistencia a higromicina (Fig. 4A).

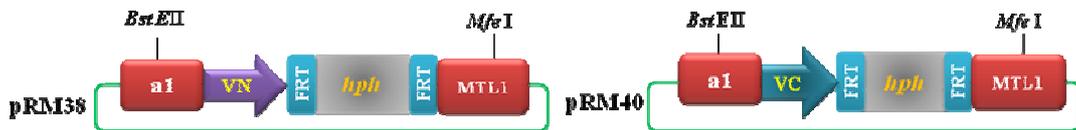
A) Ensayo de Complementación Bimolecular por Fluorescencia (BiFC)



B) Plásmidos integrativos para construir cepas control de BiFC'



C) Plásmidos integrativos con el gen a1 para BiFC'



D) Plásmidos integrativos con los genes alfa2 y alfa3 para BiFC (inconcluso)



Figura 3. Plásmidos para la construcción de las cepas que se utilizarán en el ensayo de complementación bimolecular por fluorescencia (BiFC).

A) Ensayo de complementación bimolecular por fluorescencia. Consiste en construir dos fusiones: la primera, con el fragmento amino terminal de la proteína YFP (VN) y el primer gen de interés y la segunda fusión es con el fragmento carboxilo terminal de la proteína YFP (Pijnappel et al.) y el segundo gen. Si hay una interacción entre ambas proteínas los extremos VN y VC interaccionan generando fluorescencia en las células (indicado con un fondo verde en la figura).

B) pRM18 y pRM20, plásmidos integrativos que contienen un fragmento del carboxilo terminal del gen *HDF1* fusionado con un fragmento del amino terminal (VN) y carboxilo terminal (Pijnappel et al.) de YFP.. pRM22 y pRM24, plásmidos integrativos que contienen un fragmento del carboxilo terminal del gen *HDF2* fusionado a VN y VC.

C) pRM38 y pRM48, plásmidos integrativos que contienen el gen *a1* fusionado con VN y VC respectivamente, flanqueados por regiones de homología al 5' y 3' del locus *MTL1*.

D) Esquema de los plásmidos integrativos que contienen el gen alfa2 y alfa3 fusionado con VN y VC de YFP, flanqueados por regiones de homología al 5' y 3' del locus *MTL1*. Estos plásmidos no se han terminado de construir. Hasta el momento hemos generado los plásmidos intermedios que contienen los genes alfa2 y alfa3 fusionados con cada fragmento de YFP y la región de homología del lado 5'. Solamente se requiere clonar la región de homología al 3'.

Utilizamos las cepas de *C. glabrata* con *HDF1::VN-YFP* y *HDF1::VC-YFP* como receptoras para transformar con los plásmidos que llevan las fusiones de *HDF2* con los fragmentos complementarios de la proteína YFP (pRM22 y pRM24) (Tabla S2). Las cepas resultantes que contienen las dos fusiones traduccionales complementarias, *HDF1::VN-YFP*, *HDF2-VC-YFP* y *HDF1::VC-YFP*, *HDF2::VN-YFP* se utilizaron como control positivo de la técnica de complementación bimolecular (Fig. 4A). Para ello se observaron al microscopio de fluorescencia cultivos de cada una de estas cepas para evaluar la fluorescencia emitida. Observamos que las cepas que contienen ambas proteínas Ku con las fusiones complementarias de la proteína YFP, *HDF1::VN-YFP*, *HDF2-VC-YFP* y *HDF1::VC-YFP*, *HDF2::VN-YFP*, presentan una fluorescencia mayor que la autofluorescencia que se observa de la cepa silvestre, así como la autofluorescencia que también se percibe en la cepa que solamente presenta una etiqueta *HDF1::VN-YFP* (Fig. 5).

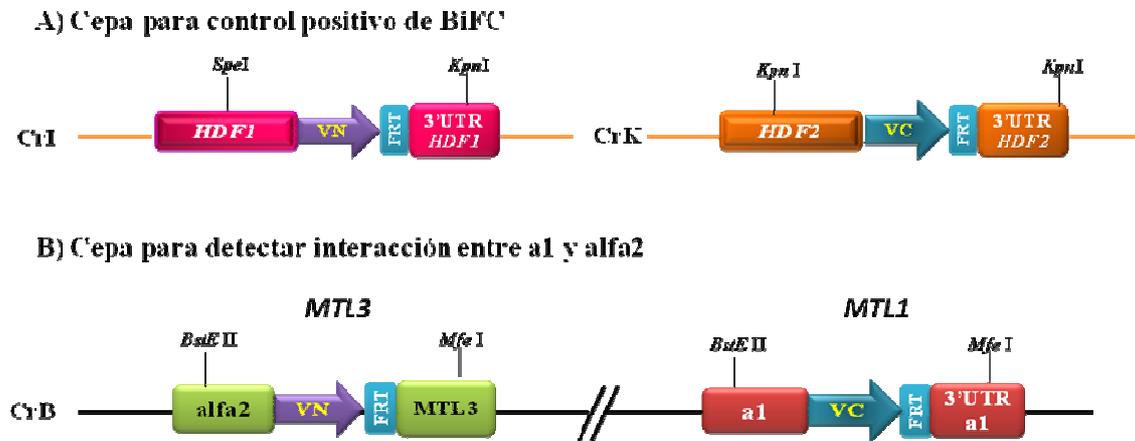


Figura 4. Generación de cepas que expresan las fusiones traduccionales de los genes *a1*, *HDF1* y *HDF2* con ambos fragmentos de YFP por medio de la integración de los plásmidos pRM18, pRM20, pRM38 y pRM40.

A) Esquema de la integración por doble recombinación homóloga, y posterior escisión del casete de resistencia a higromicina, en los loci de los genes *HDF1* y *HDF2* del fragmento liberado de pRM18 y pRM20 al digerirlos con las enzimas indicadas. Se muestra solamente una combinación, pero se ha generado también la combinación en la que el gen *HDF1* está fusionado con el fragmento VC de YFP y el gen *HDF2* con el fragmento VN. **B)** Representación de la integración en los loci *MTL1* y *MTL3* por doble recombinación homóloga, y escisión posterior del casete de resistencia a higromicina. Se representa la cepa resultante que contiene ambos genes con los fragmentos VN y VC para su posterior estudio en microscopía. Hasta el momento se han generado las cepas que contienen la fusión de *a1*::VN y *a1*::VC. CrI indica cromosoma I de *C. glabrata*; CrK indica cromosoma K y CrB indica cromosoma B. Tanto *MTL1* como *MTL3* se encuentran en el cromosoma B separados por una distancia mayor a 200 kb, indicada como barras de discontinuidad.

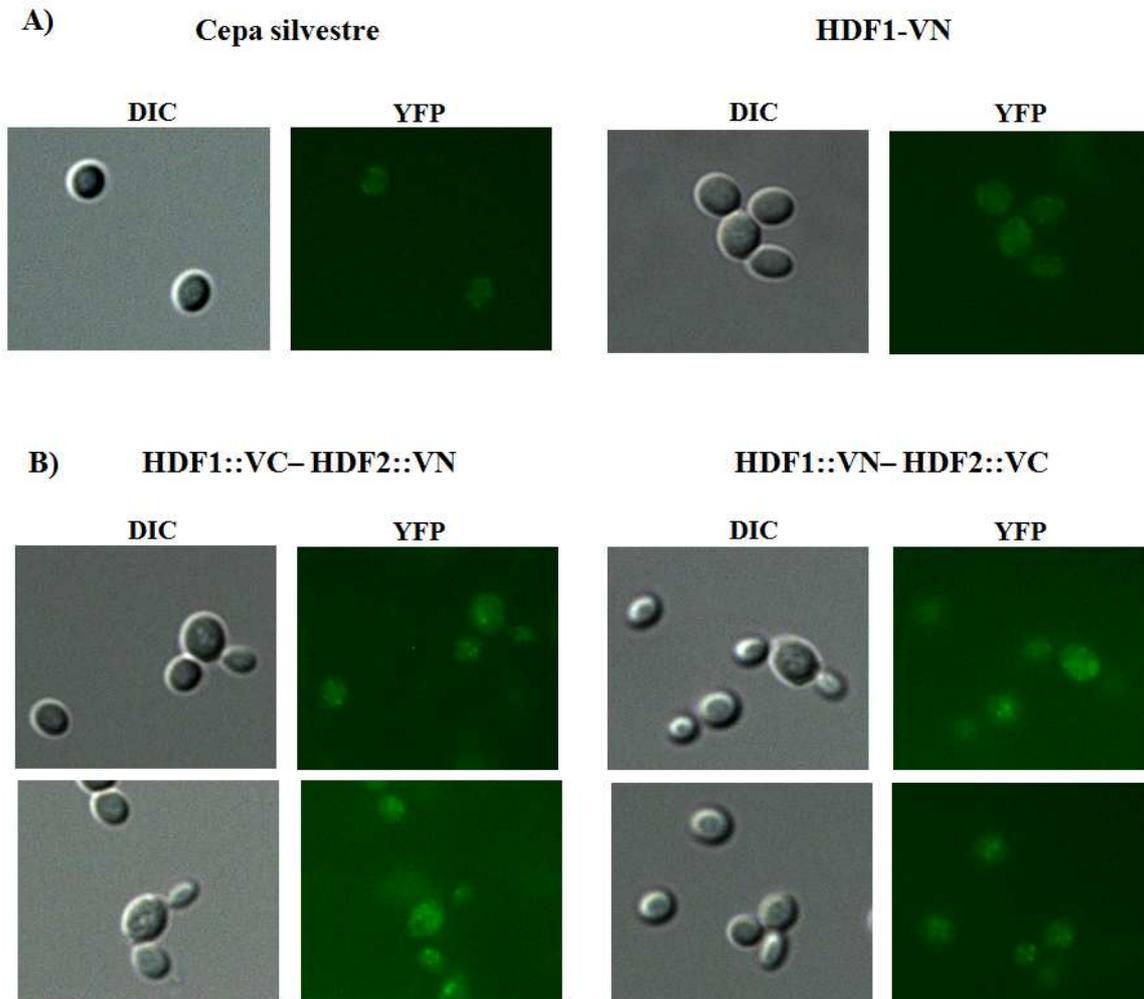


Figura 5. Microscopía de fluorescencia y DIC (microscopía diferencial de contraste de interferencia) de cultivos en fase estacionaria de las cepas indicadas. El tiempo de exposición fue el mismo para todas las fotografías. A) Cepa silvestre sin YFP (autofluorescencia) y cepa con la fusión de *HDF1* con el amino terminal de YFP (VN) exclusivamente. **B)** Cepas con doble fusión: *HDF1*-VN y *HDF2*-VC y la configuración: *HDF1*-VC y *HDF2*-VN. Se presentan dos campos representativos para cada una de las fusiones.

Construcción de plásmidos integrativos que contienen los extremos amino y carboxilo de la proteína YFP y el gen a1 del locus MTL1.

Para evaluar una posible interacción de las proteínas **a1**-alfa2 y **a1**-alfa3 mediante el ensayo de complementación bimolecular por fluorescencia (BiFC) construimos los plásmidos que contienen la fusión del gen **a1** con VN-YFP y VC-YFP flanqueado por regiones de homología al 5' y 3' del locus *MTL1* para dirigir la integración a este locus.

Los plásmidos resultantes pRM38 y pRM40, contienen 5'UTRa1::VN-YFP::3'UTRa1 y 5'UTRa1::VC-YFP::3'UTRa1 (Fig. 3B), cada uno de estos plásmidos se integraron en el locus *MTL1* de la cepa triple mutante nula de los loci *MTL* de *C. glabrata*, y posteriormente se escindió el casete de selección (resistencia a higromicina) a cada una de las transformantes.

Construcción de plásmidos integrativos que contienen los extremos amino y carboxilo de YFP fusionado al gen alfa2 del locus MTL1 de la cepa secuenciada CBS138 y al gen alfa3 del locus MTL3.

Se construyeron los plásmidos que contienen el gen alfa2 fusionado con el amino y carboxilo terminal de YFP los cuales contienen la fusión alfa2::VN-YFP y alfa2::VC-YFP, que son pRM42 y pRM44 respectivamente (Tabla S2).

Los plásmidos que contienen el gen alfa3 fusionado con el amino y carboxilo terminal de la proteína fluorescente YFP son pRM46 (alfa3::VN-YFP) y pRM47 (alfa3::VC-YFP) (Tabla S2).

Aún falta por realizar la construcción de los plásmidos que se muestran en la figura 3C para integrarlos en las cepas que contienen las fusiones 5'UTRa1::VN-YFP::3'UTRa1 y 5'UTRa1::VC-YFP::3'UTRa1, para de esta manera obtener las cepas que expresen ambas proteínas (**a1** y alfa2 o bien **a1** y alfa3) cada una fusionada con VC o VN y realizar el ensayo de BiFC.

Discusión

Candida glabrata presenta tres loci de apareamiento llamados *MTL*: El locus *MTL1*, que puede contener ya sea información **a** o alfa, *MTL2* que contiene generalmente información **a**, y *MTL3* que contiene generalmente información alfa. La información tipo **a** consiste solamente en un gen, **a1**, que codifica una proteína que contiene un homeodominio, y posiblemente funciona como factor transcripcional. La información tipo alfa, consiste en dos genes, alfa1 y alfa2, de los cuales el gen alfa2 también codifica una proteína con un homeodominio. En células diploides de *S. cerevisiae*, que expresan tanto información **a** como alfa, la proteína **a1** forma un heterodímero con la proteína alfa2, el cual reprime varios genes necesarios para el ciclo sexual, así como otros genes, algunos de los cuales están relacionados a la respuesta a estrés osmótico. En *C. glabrata*, que es haploide, no se ha investigado si el heterodímero **a1**/alfa2 ó **a1**/alfa3, se forma en células que expresen ambos tipos de información. Nosotros hemos propuesto que en cepas de *C. glabrata* que contienen información tipo **a** en *MTL1* y tipo alfa en *MTL3*, existe una pequeña población de células que pueden expresar ambos tipos de información simultáneamente debido al silenciamiento incompleto de *MTL3*. De forma interesante, hemos encontrado una variante del gen alfa2 en el locus *MTL3* (denominado alfa3). Alfa3 es idéntico a alfa2 excepto en los últimos 14 amino ácidos de este último, y además, alfa3 se extiende 24 amino ácidos más que alfa2 del lado carboxilo terminal.

Candida glabrata ha conservado una variante del gen alfa2

Nosotros clonamos y secuenciamos el locus *MTL3* de nuestra cepa silvestre (CGM1) y encontramos que el gen alfa2 de este locus es una variante del gen alfa2 presente en el locus *MTL1* de la cepa secuenciada (CBS138). A esta variante la denominamos alfa3. Para investigar si alfa3 se encuentra conservado en *C. glabrata*, secuenciamos los loci *MTL3* de otros 3 aislados clínicos de la colección del laboratorio y encontramos que también en estos aislados, así como en la cepa secuenciada y en otras secuencias depositadas en el GenBank, contienen la variante alfa3 en *MTL3*, y por lo tanto concluimos que la variante alfa3 está conservada en numerosos aislados clínicos de *C. glabrata* (Yáñez-Carrillo, datos no publicados).

Adicionalmente en nuestro laboratorio encontramos que los loci *MTL1* y *MTL2* son transcripcionalmente activos mientras que el locus *MTL3* presenta un silenciamiento incompleto (RAMIREZ-ZAVALA *et al.* 2010). Por lo que el heterodímero **a1**/alfa3 podría formarse en cepas que expresan información **a** a partir del locus *MTL1* e información alfa a partir del locus *MTL3*. Nosotros estamos interesados en determinar si este heterodímero y/o el heterodímero **a1**/alfa2 se forma, y si participa en la represión de genes de respuesta a diferentes condiciones de estrés.

Para poder evaluar el efecto que tiene la expresión simultánea de ambos genes **a1** y alfa2 o bien **a1** y alfa3, construimos cepas que expresan ambos genes a partir del locus *MTL1* y se evaluaron en diferentes condiciones de estrés.

Construcción de dos cepas de C. glabrata que expresan de manera simultánea a1-alfa2 y a1-alfa3 desde el locus MTL1.

Se construyeron dos cepas que expresan simultáneamente los genes **a1**-alfa2 y **a1**-alfa3, lo cual se comprobó mediante RT-PCR y se demostró que el transcrito del gen **a1** se procesa correctamente. Encontramos que estas cepas presentan un retardo en su crecimiento a 37°C en medio líquido YPD adicionado con NaCl 0.5M respecto a cepas que contienen solamente un tipo de información en los loci *MTL* o ninguna. Además estas cepas alcanzan densidades ópticas mucho menores que las cepas que solamente expresan un tipo de información, o que la silvestre (Fig. 2B). A su vez, en un medio con NaCl 1.0M se observó una disminución en el crecimiento de todas las cepas; sin embargo, las cepas que expresan un solo tipo de información (**a1** o alfa1-alfa2) alcanzan una densidad óptica ligeramente mayor. En contraste, no se observa ninguna diferencia entre cepas cuando se utiliza medio sólido con las mismas concentraciones de NaCl. Es posible que las condiciones de aireación influyan también en la capacidad de crecer con NaCl. Estos datos sugieren que en cepas en las que se expresan simultáneamente los genes **a1** y alfa3, y en menor medida **a1** y alfa2, sí se podrían reprimirse genes involucrados en la respuesta a estrés osmótico, al menos bajo ciertas condiciones de aireación (en medio líquido). En presencia de H₂O₂ en medio sólido, no hubo diferencia en el crecimiento de las cepas.

Aún falta por realizar curvas de crecimiento y ensayos de viabilidad en otros tipos de estrés en estas cepas para determinar si cuando se co-expresan **a1** y

alfa3 o **a1** y alfa2, también se observa menor resistencia a otros tipos de estrés. Esto apoyaría la hipótesis de que en *C. glabrata* se puede formar uno o dos tipos de heterodímero, y que éste (o éstos) probablemente reprima genes involucrados en la respuesta a distintos tipos de estrés.

Implementación del ensayo de complementación bimolecular por fluorescencia (BiFC).

Para estudiar si se puede formar un heterodímero entre las proteínas **a1** y alfa2 o **a1** y alfa3 se construyeron cepas de *C. glabrata* para la implementación del ensayo de BiFC.. Primero, construimos cepas que se utilizaron como controles positivos. Para ello, utilizamos las fusiones traduccionales de los genes *HDF1* y *HDF2* con las secuencias codificantes de los fragmentos amino terminal y carboxilo terminal de la proteína fluorescente amarilla YFP (VN y VC, respectivamente). Se seleccionaron estos genes como controles, ya que, por datos previos del laboratorio habíamos determinado que las proteínas Ku70 y Ku80 (codificadas por los genes *HDF1* y *HDF2* respectivamente) tienen una interacción física (MEDINA-SANCHEZ 2011). Se construyeron las cepas con las siguientes combinaciones: *HDF1::VN-YFP*, *HDF2-VC-YFP* y *HDF1::VC-YFP*, *HDF2::VN-YFP*. Además se utilizó como un control negativo la cepa que solamente contiene el gen *HDF1* fusionado a VN. Mediante microscopía de fluorescencia observamos que las cepas que contienen ambas fusiones (*HDF1::VN-YFP*, *HDF2-VC-YFP* y *HDF1::VC-YFP*, *HDF2::VN-YFP*) presentan una fluorescencia mayor que la autofluorescencia presente en la cepa silvestre y en la

cepa que contiene solamente un fragmento de YFP (HDF1::VN). Además de la mayor intensidad de fluorescencia, se observan puntos de fluorescencia específicos dentro de la célula. Esto podría indicar el reclutamiento de los cromosomas hacia la periferia nuclear mediante las proteínas Ku, que se unen a los telómeros y los localizan en la periferia (LAROCHE *et al.* 1998). Aún se requiere realizar simultáneamente una tinción nuclear con DAPI para determinar si estos puntos fluorescentes co-localizan con el núcleo. Sin embargo, estos resultados con las cepas control sugieren que para *C. glabrata* es posible utilizar el ensayo BiFC para observar interacción física entre dos proteínas.

Por otro lado, aún falta obtener las cepas de *C. glabrata* que contengan las fusiones de los genes **a1**, alfa2 y alfa3 con los fragmentos VN y VC en todas las combinaciones para posteriormente realizar el estudio de la interacción entre ellos. En caso de que la expresión de estas proteínas sea baja a partir de sus propios promotores, hemos considerado realizar construcciones en las que se sobreproduzcan estas proteínas con las fusiones correspondientes con VN y VC para poder visualizarlas al microscopio de fluorescencia.

En caso de obtener fluorescencia de YFP con las fusiones descritas, sería evidencia muy sólida de que en *C. glabrata* se forma un heterodímero con estas proteínas de manera análoga al heterodímero de *S. cerevisiae*, y podríamos correlacionar los datos de caracterización fenotípica en diferentes condiciones de estrés de las cepas que expresan las dos proteínas con la formación del heterodímero.

Materiales y métodos

Cepas, plásmidos y oligonucleótidos

Todas las cepas, plásmidos y oligonucleótidos utilizados y generados en este trabajo se muestran en las tablas suplementarias 1, 2 y 3 respectivamente.

Construcción de plásmidos integrativos que contienen los genes a1-alfa2 y a1-alfa3.

Para la construcción del plásmido pRM4 (que contiene los genes **a1-alfa2** con sus respectivos promotores), se utilizó un fragmento de 1389 pb *Bam*HI/*Eco*RI que corresponde al gen alfa2 del locus *MTL1* de la cepa CBS138 y se clonó en el vector integrativo pYIplac211 digerido con *Bam*HI/*Eco*RI generando el plásmido pRM1. El fragmento de PCR de 1900 pb que contiene el gen **a1** de la cepa silvestre (oligos No. 320 y 764) digerido con *Bam*HI/*Xba*I se clonó en pRM1 digerido con *Bam*HI/*Xba*I. Dicho plásmido se comprobó mediante PCR de colonia y posteriormente por patrón de restricción con las enzimas *Eco*RI/*Bam*HI y *Bam*HI/*Xba*I. Finalmente, secuenciamos el inserto y confirmamos que el plásmido tiene la secuencia correcta.

La construcción del plásmido pRM49 (que contiene los genes **a1-alfa3**), se generó mediante PCR. Amplificamos primero un fragmento de 1549 pb que contiene el gen alfa3 del locus *MTL3* de la cepa silvestre (oligos No. 770 y 143). Posteriormente amplificamos un fragmento de 403 pb que corresponde a una región de homología al 3' del gen **a1** del locus *MTL1* (oligos No. 321 y 1049).

Estos dos productos se ligaron y después se amplificó por PCR el producto de la ligación de 1600 pb (oligos No. 770 y 321). Este último producto de PCR se clonó en pRM4 digerido *EcoRI/BamHI* generando el plásmido pRM49. Se comprobó la correcta inserción del fragmento mediante PCR de colonia y patrón de restricción con dos enzimas de restricción *EcoRV/BamHI*. Además, se enviará a secuenciar el inserto completo.

Medios de cultivo

Las células de levadura se cultivaron en medio estándar como se describió previamente en (SHERMAN 1986). Para los medios sólidos se añadió agar bacteriológico a una concentración final de 2% (p/v). El medio sintético completo (SC o CAA) contiene base nitrogenada de levadura [sin $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ni aminoácidos] 1.7g/L, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 5g/L, casaminoácidos 0.6% y glucosa 2%. El medio YPD (del inglés Yeast extract-Peptone-Dextrose), contiene extracto de levadura 10g/L, peptona 20g/L, glucosa 2% (p/v) y es complementado con uracilo 25mg/L. Cuando se requirió, los medios sólidos de YPD se suplementaron con higromicina (A.G. Scientific®) a una concentración final de 460µg/mL. Para ajustar el pH del medio YPD a pH 3.5 y 6.0 se utilizó HCl 5N. El medio YPD suplementado con H_2O_2 se realizó de la siguiente manera: YPD-20mM, medio YPD adicionado con 17.2mL/L de H_2O_2 1.1633M. YPD-23mM, medio YPD adicionado con 19.77mL/L de H_2O_2 1.1633M. YPD-25mM, medio YPD adicionado con 21.46mL/L de H_2O_2 1.1633M. Para los ensayos con NaCl se utilizó medio YPD suplementado con 0.5M, 1.0M, 1.5M y 1.8M de NaCl.

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

Transformación genética de C. glabrata

Para transformar genéticamente a *C. glabrata* con ADN lineal o superenrollado se utilizó una modificación del método de transformación por acetato de litio (LiAcO) (GIETZ 1992). Cada cepa a transformar se creció en medio YPD durante la noche. Al día siguiente, se transfirieron 0.3mL de este inóculo a 30mL de YPD fresco (dilución 1:100) y se incubó con agitación hasta alcanzar una OD_{600nm} de 0.8-1.0. Las células se colectaron por centrifugación y se lavaron con un volumen equivalente de agua estéril. Posteriormente se concentraron 100 veces en LiAcO 100mM y se dividieron en alícuotas de 50µL c/u. Para cada transformación, a una alícuota de células se le añadieron 240µL de polietilenglicol 50% (Fluka Biochemica®) (PM ~ 4000) (concentración final ~30%), 36µL de LiAcO 1M (concentración final ~90mM), 25µL de ADN acarreador de cadena sencilla (Invitrogen® 2mg/mL) desnaturalizado por calor (concentración final ~125ng/µL) y el ADN a transformar, resuspendido en un volumen de 50µL de Tris 10mM. La mezcla se incubó a 30°C por 45min, después se le agregaron 43µL de DMSO y se

sometió a choque térmico por 15min a 42°C. Por último, las células se centrifugaron para retirar el PEG y dependiendo del tipo de selección a realizar, se resuspendieron en agua o en medio YPD. Para la selección de células transformantes que conservan el plásmido que complementan la auxotrofia por uracilo, las células fueron resuspendidas en 600µL de agua y se sembraron en dos cajas de medio SC; una con 50µL de la suspensión y otra con 100µL. Para la selección con higromicina se resuspendieron en 1mL de YPD y se incubaron al menos 4h a 30°C. Al término de este periodo, se sembraron 3 cajas de medio YPD-Hyg con 300µL. Todas las cajas se incubaron a 30°C, al menos durante 48h.

Se eligieron en promedio 10 colonias de cada transformante y se purificaron dos veces en medio de selección adecuado (CAA o YPD-Hyg). Se estiraron en medio YPG para analizar su capacidad de utilizar glicerol como fuente de carbono no fermentable y de este modo descartar que hayan presentado mutaciones que alteraran su función mitocondrial (*petite*). Posteriormente se extrajo ADN genómico y se diagnosticó por PCR la modificación genética correspondiente.

Ensayos de sensibilidad a NaCl y H₂O₂.

Para los ensayos de sensibilidad a NaCl y H₂O₂. Se partió de cultivos en fase estacionaria. Se diluyó el cultivo para obtener una OD_{600nm} de 0.5 y se realizaron cinco diluciones logarítmicas en agua estéril. Se colocaron 5µL de cada una de las diluciones en cajas con medio YPD suplementado con cuatro concentraciones diferentes de NaCl: 0.5M, 1.0M, 1.5M y 1.8M. y cajas de medio YPD suplementado con tres concentraciones de H₂O₂: 20mM, 23mM y 25mM. Las

cajas se incubaron a 30°C, 37°C y 45°C durante cuatro días y se tomaron fotografías cada día.

Curvas de crecimiento y obtención de los tiempos de duplicación.

Para varias cepas se caracterizó su crecimiento en medio YPD líquido a diferentes pHs (3.5, 6.0 y 7.0) y concentraciones de NaCl (0.5M, 1.0M, 1.5M y 1.8M) a 37°C mediante el aparato Bioscreen C. Se partió de cultivos en fase estacionaria de cada cepa y se diluyeron para tener una OD_{600nm} inicial de 0.05 para cada uno de los medios evaluados. En placas de microdilución con 300µL de cultivo se midió la OD_{600nm} durante 24 horas teniendo lecturas cada 30min.

Para calcular los tiempos de duplicación se utilizaron los datos obtenidos tomando solamente la parte de crecimiento logarítmico de cada curva en los diferentes medios evaluados.

RT-PCR

Se extrajo RNA de células en fase estacionaria (36 horas, en YPD) usando TRIzol (Invitrogen, Carlsbad, CA) siguiendo las instrucciones que el proveedor indica y posteriormente se trataron los RNA's obtenidos con DNAsal (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO). La síntesis de cDNA y el PCR se realizaron utilizando el kit AccessQuick (RT-PCR) (Promega, Madison, WI). Los oligonucleótidos utilizados para cada uno de los genes evaluados fueron: gen **a1** oligonucleótidos No. 330 y No. 469, gen alfa2 y gen alfa3 oligonucleótidos No. 290 y No. 291 y para el gen de actina oligonucleótidos No. 219 y No. 220 (Tabla 3). La síntesis de cDNA se llevó

a cabo a 45°C por 45 min para cada uno de los genes. La reacción de PCR se llevó a cabo a 60°C para el gen **a1**; 55°C para el gen alfa2 y alfa3; 57°C para el gen de actina.

Microscopia de fluorescencia

Se utilizó un microscopio de fluorescencia Zeiss Axio Observer Z.1. Se observaron cultivos de células en fase estacionaria (en medio SC) de cada una de las cepas indicadas. Se utilizó el objetivo 100X para una amplificación final de 1000X. Las fotografías se tomaron con la cámara AxioCam MRc. Para fluorescencia con el filtro YFP se utilizó una exposición fija de 2000 mseg. Para DIC la exposición fue de aproximadamente 300 mseg.

Bibliografía

- AUSUBEL, F., R. BRENT, R. E. KINGSTON, D. D. MOORE, J. G. SEIDMAN, J. A. SMITH, AND K. STRUHL., 2001 *Current Protocols in Molecular Biology*. . Wiley & Sons, Inc., NY., New York.
- BAHN, Y. S., C. Y. XUE, A. IDNURM, J. C. RUTHERFORD, J. HEITMAN *et al.*, 2007 Sensing the environment: lessons from fungi. *Nature Reviews Microbiology* **5**: 57-69.
- BUTLER, G., 2010 Fungal Sex and Pathogenesis. *Clin Microbiol Rev* **23**: 140-159.
- CALVIN, N. M., and P. C. HANAWALT, 1988 High-efficiency transformation of bacterial cells by electroporation. *J Bacteriol* **170**: 2796-2801.
- CORMACK, B. P., and S. FALKOW, 1999 Efficient homologous and illegitimate recombination in the opportunistic yeast pathogen *Candida glabrata*. *Genetics* **151**: 979-987.
- DUJON, B., D. SHERMAN, G. FISCHER, P. DURRENS, S. CASAREGOLA *et al.*, 2004 Genome evolution in yeasts. *Nature* **430**: 35-44.
- FIDEL, P. L., JR., J. L. CUTRIGHT, L. TAIT and J. D. SOBEL, 1996 A murine model of *Candida glabrata* vaginitis. *J Infect Dis* **173**: 425-431.
- GALGOCZY, D. J., A. CASSIDY-STONE, M. LLINAS, S. M. O'ROURKE, I. HERSKOWITZ *et al.*, 2004 Genomic dissection of the cell-type-specification circuit in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **101**: 18069-18074.
- GIETZ, D., ST. JEAN, A., WOODS, R. A., AND SCHIESTL, R. H. , 1992 Improved method for high efficiency transformation of intact yeast cells. *Nucleic Acids Res* **20**: 1425.
- GIETZ, R. D., and A. SUGINO, 1988 New yeast-*Escherichia coli* shuttle vectors constructed with in vitro mutagenized yeast genes lacking six-base pair restriction sites. *Gene* **74**: 527-534.
- GUSTIN, M. C. E. A., 1998 MAP Kinase Pathway in the Yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* **62**: 1264-1300.
- HERSKOWITZ, J., J. RINE and J. STRATHERN, 1992 *Mating type determination and mating-type interconversion in Saccharomyces cerevisiae*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.
- LAROCHE, T., S. G. MARTIN, M. GOTTA, H. C. GORHAM, F. E. PRYDE *et al.*, 1998 Mutation of yeast Ku genes disrupts the subnuclear organization of telomeres. *Curr Biol* **8**: 653-656.
- MEDINA-SANCHEZ, L., 2011 Generación de versiones etiquetadas de las proteínas Ku70 y Ku80 de *Candida glabrata* para el estudio de su localización a lo largo del telómero derecho del cromosoma E. Tesis de Maestría. IPICYT.
- MULLER, H., C. HENNEQUIN, J. GALLAUD, B. DUJON and C. FAIRHEAD, 2008 The asexual yeast *Candida glabrata* maintains distinct a and alpha haploid mating types. *Eukaryotic Cell* **7**: 848-858.
- NG, H. H., Q. FENG, H. B. WANG, H. ERDJUMENT-BROMAGE, P. TEMPST *et al.*, 2002 Lysine methylation within the globular domain of histone H3 by Dot1 is important for telomeric silencing and Sir protein association. *Genes & Development* **16**: 1518-1527.
- PIJNAPPEL, W. W., D. SCHAFT, A. ROGUEV, A. SHEVCHENKO, H. TEKOTTE *et al.*, 2001 The *S. cerevisiae* SET3 complex includes two histone deacetylases, Hos2 and Hst1, and is a meiotic-specific repressor of the sporulation gene program. *Genes Dev* **15**: 2991-3004.
- RAMIREZ-ZAVALETA, C. Y., G. E. SALAS-DELGADO, A. DE LAS PENAS and I. CASTANO, 2010 Subtelomeric Silencing of the MTL3 Locus of *Candida glabrata* Requires yKu70, yKu80, and Rif1 Proteins. *Eukaryotic Cell* **9**: 1602-1611.
- SHERMAN, F., FINK, G. R., AND HICKS, J. B., 1986 *Methods in Yeast Genetics*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.

- SRIKANTHA, T., S. A. LACHKE and D. R. SOLL, 2003 Three mating type-like loci in *Candida glabrata*. *Eukaryotic Cell* **2**: 328-340.
- SUNG, M. K., and W. K. HUH, 2007 Bimolecular fluorescence complementation low analysis system for in vivo detection of protein-protein interaction in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* **24**: 767-775.
- YAÑEZ-CARRILLO, P., 2010 Los factores transcripcionales **a1**, alfa1 y alfa2 de *Candida glabrata* participan en la respuesta y adaptacion al estres. Tesis de Maestría. IPICYT.
- ZHAO, X. H., R. MEHRABI and J. R. XU, 2007 Mitogen-activated protein kinase pathways and fungal pathogenesis. *Eukaryotic Cell* **6**: 1701-1714.

Material Suplementario

Tabla S1. Cepas utilizadas en este trabajo

Cepa de <i>Escherichia coli</i>		Genotipo	Referencia
DH10B		F ⁻ <i>mcrA</i> Δ(<i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i>) φ80 <i>dlacZ</i> Δ <i>M15</i> Δ <i>lacX74 deoR recA1 endA1</i> <i>araD139</i> Δ(<i>ara, leu</i>)7697 <i>galU galK λ⁻ rpsL</i> <i>nupG</i>	(CALVIN and HANAWALT 1988)
Cepas de <i>Candida glabrata</i>			
Cepa	Parental	Genotipo	
BG2		Aislado clínico	(FIDEL <i>et al.</i> 1996)
BG14	BG2	<i>ura3</i> Δ::Tn903 G418 ^R	(CORMACK and FALKOW 1999)
CBS138		Aislado clínico, cepa de referencia (ATCC2001)	http://www.genolevures.org/cagl.htm l#
Cepas con deleciones en los loci <i>MTL</i>			
CGM413	BG14	<i>ura3</i> Δ::Tn903 G418 ^R , <i>mtl2</i> Δ Hyg ^S (utilizando pMZ18)	(RAMIREZ-ZAVALA <i>et al.</i> 2010)
CGM531	BG14	<i>ura3</i> Δ::Tn903 G418 ^R , (<i>mtl1</i> , <i>mtl2</i> , <i>mtl3</i>)Δ Hyg ^S (utilizando pMZ18)	(RAMIREZ-ZAVALA <i>et al.</i> 2010)
CGM707	BG14	<i>ura3</i> Δ::Tn903 G418 ^R , <i>mtl1</i> Δ:: <i>MTL1a</i> (<i>mtl2</i> , <i>mtl3</i>)Δ Hyg ^S	Colección de laboratorio
CGM904	BG14	<i>ura3</i> Δ::Tn903 G418 ^R , <i>mtl1</i> Δ:: <i>MTL1a</i> (<i>mtl2</i> , <i>mtl3</i>)Δ Hyg ^S	Colección de laboratorio
CGM978	BG14	<i>ura3</i> Δ::Tn903 G418 ^R , <i>mtl1</i> Δ::P _{PGK1} - <i>MTL1a</i> (<i>mtl2</i> , <i>mtl3</i>)Δ Hyg ^S	Colección de laboratorio
Cepas control para BiFC			
CGM1497	BG14	<i>ura3</i> Δ::Tn903 G418 ^R , pRM18 <i>Kpn I/Spe I</i> , <i>HDF1</i> ::VN::hph	Este trabajo

CGM1499	BG14	<i>ura3Δ::Tn903 G418^R, pRM20 Kpn I/Spe I, HDF1::VC::hph</i>	Este trabajo
CGM1509	CGM1499	<i>ura3Δ::Tn903 G418^R, pRM20 Kpn I/Spe I, HDF1::VC, Hyg^S (utilizando pMZ21)</i>	Este trabajo
CGM1511	CGM1497	<i>ura3Δ::Tn903 G418^R, pRM18 Kpn I/Spe I, HDF1::VN, Hyg^S (utilizando pMZ21)</i>	Este trabajo
CGM1532	CGM1511	<i>ura3Δ::Tn903 G418^R, pRM22 Kpn I, HDF1::VN, HDF2::VN::hph</i>	Este trabajo
CGM1534	CGM1511	<i>ura3Δ::Tn903 G418^R, pRM24 Kpn I, HDF1::VN, HDF2::VC::hph</i>	Este trabajo
CGM1536	CGM1509	<i>ura3Δ::Tn903 G418^R, pRM22 Kpn I, HDF1::VC, HDF2::VN::hph</i>	Este trabajo
CGM1538	CGM1509	<i>ura3Δ::Tn903 G418^R, pRM24 Kpn I, HDF1::VC, HDF2::VC::hph</i>	Este trabajo
Cepas de <i>C. glabrata</i> que expresan los genes <i>a1</i>, <i>alfa2</i> y <i>a1</i>, <i>alfa3</i>			
CGM1540	CGM531	<i>ura3Δ::Tn903 G418^R, MTL1::pRM4 (Mfe I) (mtl2, mtl3)Δ Integrante #1</i>	Este trabajo
CGM1552	CGM1540	<i>ura3Δ::Tn903 G418^R, MTL1::a1 alfa2 (mtl2, mtl3)Δ Segregante #2 (5-FOA^R)</i>	Este trabajo
CGM1564	CGM531	<i>ura3Δ::Tn903 G418^R, MTL1::pRM49 (Mfe I) (mtl2, mtl3)Δ Integrante #12</i>	Este trabajo
CGM1566	CGM1564	<i>ura3Δ::Tn903 G418^R, MTL1::a1 alfa3 (mtl2, mtl3)Δ Segregante #2 (5-FOA^R)</i>	Este trabajo

Tabla S2. Plásmidos usados en este trabajo

Plásmido	Genotipo relevante	Referencia
Vectores de clonación		
pYIp $lac211$	Vector de clonación integrativo $URA3$, Amp^R	(GIETZ and SUGINO 1988)
pOZ14	Vector de clonación, Hyg^R , $URA3$, Amp^R . Casete de selección para transformación en <i>C. glabrata</i> flanqueado por secuencias FRT. [[FRT3'UTR $_{CTA1}$] P_{PGK1} ::hph::(3'UTR $_{HIS3}$)-FRT]	Colección del laboratorio
pMZ21	Vector replicativo que expresa la recombinasa (ScFlp1p) para la remoción del casete de resistencia a higromicina; [P_{EPA1} ::FLP1::(3'UTR $_{HIS3}$)] $URA3$, Amp^R	Colección del laboratorio de B. Cormack
pFA6a-VN-His3MX6	Vector donador del amino terminal de la proteína fluorescente YFP (VN-VYFP), Amp^R ,	(SUNG and HUH 2007)
pFA6a-VC-His3MX6	Vector donador del carboxilo terminal de la proteína fluorescente YFP (VC-VYFP), Amp^R ,	(SUNG and HUH 2007)
Vectores intermedios		
pGE51	Producto de PCR de 0.9 Kb (oligos No.376 y 377) del 3'ORF <i>HDF1</i> sin codón de paro, clonado en pGEM®-T, Amp^R	Colección del laboratorio
pGE53	Producto de PCR de 0.7 Kb (oligos No.381 y 382) del 3'ORF <i>HDF2</i> sin codón de paro, clonado en pGEM®-T, Amp^R	Colección del laboratorio
pAP746	Producto de PCR de 0.8 Kb del 3'UTR <i>HDF1</i> , clonado en pGEM®-T, Amp^R	Colección del laboratorio
pAP752	Producto de PCR de 0.8 Kb del 3'UTR <i>HDF2</i> , clonado en pGEM®-T, Amp^R	Colección del laboratorio
pSF15	Producto de PCR de 1.405 Kb (oligos No.770 y 321) del gen <i>alfa2</i> de <i>MTL1</i> clonado en pMB11 digerido con <i>Stu</i> I, Cm^R	Colección del laboratorio

pRM1	Fragmento <i>Bam</i> HI/ <i>Eco</i> RI de 1.389 Kb (gen <i>alfa2</i>) derivado de pSF15, clonado en pYIplac211 digerido con <i>Bam</i> HI/ <i>Eco</i> RI, Amp ^R , <i>URA3</i>	Este trabajo
pRM4	Producto de PCR de 1.9 Kb (oligos No.764 y 320) del gen <i>a1</i> digerido con <i>Bam</i> HI/ <i>Xba</i> I, clonado en pRM1 digerido con <i>Bam</i> HI/ <i>Xba</i> I, <i>URA3</i> , Amp ^R . Plásmido que expresa <i>a1</i> y <i>alfa2</i> simultáneamente	Este trabajo
pRM7	Producto de PCR de 0.621 Kb (oligos No.903 y 902) (Amino terminal de YFP) de pFA6a-VN-His3MX6 digerido con <i>Bam</i> HI/ <i>Bgl</i> II, clonado en pOZ14 digerido con <i>Bam</i> HI, Amp ^R , <i>URA3</i> , Hyg ^R .	Este trabajo
pRM8	Producto de PCR de 0.349 Kb (oligos No.894 y 895) (Carboxilo terminal de YFP) de pFA6a-VC-His3MX6 digerido con <i>Bam</i> HI/ <i>Bgl</i> II, clonado en pOZ14 digerido con <i>Bam</i> HI, Amp ^R , <i>URA3</i> , Hyg ^R .	Este trabajo
pRM10	Fragmento <i>Spe</i> I/ <i>Bam</i> HI de 0.9 Kb (3'ORF <i>HDF1</i>) derivado de pGE51, clonado en pRM7 digerido con <i>Spe</i> I/ <i>Bam</i> HI, Amp ^R , <i>URA3</i> , Hyg ^R .	Este trabajo
pRM11	Fragmento <i>Spe</i> I/ <i>Bam</i> HI de 0.9 Kb (3'ORF <i>HDF1</i>) derivado de pGE51, clonado en pRM8 digerido con <i>Spe</i> I/ <i>Bam</i> HI, Amp ^R , <i>URA3</i> , Hyg ^R .	Este trabajo
pRM13	Fragmento <i>Sac</i> I/ <i>Bam</i> HI de 0.7 Kb (3'ORF <i>HDF2</i>) derivado de pGE53, clonado en pRM7 digerido con <i>Sac</i> I/ <i>Bam</i> HI, Amp ^R , <i>URA3</i> , Hyg ^R .	Este trabajo
pRM15	Fragmento <i>Sac</i> I/ <i>Bam</i> HI de 0.7 Kb (3'ORF <i>HDF2</i>) derivado de pGE53, clonado en pRM8 digerido con <i>Sac</i> I/ <i>Bam</i> HI, Amp ^R , <i>URA3</i> , Hyg ^R .	Este trabajo
pRM18	Fragmento <i>Hind</i> III/ <i>Kpn</i> I de 0.8 Kb (3'UTR <i>HDF1</i>) derivado de pAP746, clonado en pRM10 digerido con <i>Hind</i> III/ <i>Kpn</i> I, Amp ^R , <i>URA3</i> , Hyg ^R . 5' <i>HDF1</i> ::VN 3'UTR	Este trabajo
pRM20	Fragmento <i>Hind</i> III/ <i>Kpn</i> I de 0.8 Kb (3'UTR <i>HDF1</i>) derivado de pAP746, clonado en pRM11 digerido con <i>Hind</i> III/ <i>Kpn</i> I, Amp ^R , <i>URA3</i> , Hyg ^R . 5' <i>HDF1</i> ::VC 3'UTR	Este trabajo

pRM22	Fragmento <i>Hind</i> III/ <i>Sal</i> I de 0.7 Kb (3'UTR <i>HDF2</i>) derivado de pAP746, clonado en pRM13 digerido con <i>Hind</i> III/ <i>Sal</i> I, Amp ^R , <i>URA3</i> , Hyg ^R . 5' <i>HDF1</i> ::VN 3'UTR	Este trabajo
pRM24	Fragmento <i>Hind</i> III/ <i>Sal</i> I de 0.7 Kb (3'UTR <i>HDF2</i>) derivado de pAP746, clonado en pRM15 digerido con <i>Hind</i> III/ <i>Sal</i> I, Amp ^R , <i>URA3</i> , Hyg ^R . 5' <i>HDF1</i> ::VC 3'UTR	Este trabajo
pRM26	Producto de PCR de 0.717 Kb (oligos No.772 y 907) correspondiente al 3'UTR del gen a1 del <i>MTL1</i> digerido con <i>Hind</i> III / <i>Xho</i> I, clonado en pRM7 digerido con <i>Hind</i> III / <i>Xho</i> I, Amp ^R , <i>URA3</i> , Hyg ^R .	Este trabajo
pRM28	Producto de PCR de 0.717 Kb (oligos No.772 y 907) correspondiente al 3'UTR del gen a1 del <i>MTL1</i> digerido con <i>Hind</i> III / <i>Xho</i> I, clonado en pRM8 digerido con <i>Hind</i> III / <i>Xho</i> I, Amp ^R , <i>URA3</i> , Hyg ^R .	Este trabajo
pRM38	Producto de PCR de 1.237 Kb (oligos No. 904 y 905) correspondiente al gen a1 de <i>MTL1</i> digerido con <i>Spe</i> I / <i>Bam</i> HI, clonado en pRM26 digerido con <i>Spe</i> I / <i>Bam</i> HI, Amp ^R , <i>URA3</i> , Hyg ^R .	Este trabajo
pRM40	Producto de PCR de 1.237 Kb (oligos No. 904 y 905) correspondiente al gen a1 de <i>MTL1</i> digerido con <i>Spe</i> I / <i>Bam</i> HI, clonado en pRM28 digerido con <i>Spe</i> I / <i>Bam</i> HI, Amp ^R , <i>URA3</i> , Hyg ^R .	Este trabajo
pRM42	Producto de PCR de 2.144 Kb (oligos No.900 y 890) correspondiente al gen alfa2 de <i>MTL1</i> digerido con <i>Not</i> I / <i>Bam</i> HI, clonado en pRM7 digerido con <i>Not</i> I / <i>Bam</i> HI, Amp ^R , <i>URA3</i> , Hyg ^R .	Este trabajo
pRM44	Producto de PCR de 2.144 Kb (oligos No.900 y 890) correspondiente al gen alfa2 de <i>MTL1</i> digerido con <i>Not</i> I / <i>Bam</i> HI, clonado en pRM8 digerido con <i>Not</i> I / <i>Bam</i> HI, Amp ^R , <i>URA3</i> , Hyg ^R .	Este trabajo
pRM46	Producto de PCR de 2.117 Kb (oligos No.896 y 897) correspondiente al gen alfa3 de <i>MTL3</i> digerido con <i>Not</i> I / <i>Bam</i> HI, clonado en pRM7 digerido con <i>Not</i> I / <i>Bam</i> HI, Amp ^R , <i>URA3</i> , Hyg ^R .	Este trabajo
pRM47	Producto de PCR de 2.144 Kb (oligos No.896 y 897) correspondiente al gen alfa3 de <i>MTL3</i> digerido con <i>Not</i> I / <i>Bam</i> HI, clonado en pRM8 digerido con <i>Not</i> I /	Este trabajo

	<i>Bam</i> HI, Amp ^R , <i>URA3</i> , Hyg ^R .	
pRM49	Producto de PCR de 1.553 Kb (oligos No. 770 y 143) del gen <i>alfa3</i> de <i>MTL3</i> digerido con <i>Bam</i> HI / <i>Mfe</i> I, ligado con el producto de PCR de 0.403 Kb (oligos No. 1049 y 321) correspondiente al 3'UTR del gen <i>a1</i> de <i>MTL1</i> digerido con <i>Eco</i> RI, clonados en pRM4 digerido con <i>Bam</i> HI y <i>Eco</i> RI, Amp ^R , <i>URA3</i> .	Este trabajo

Tabla S3. Oligonucleótidos utilizados en este trabajo

Primer	Nombre	Secuencia (5'-3')	Sitio(s) agregados
Construcción del vector con los genes $\alpha 1$ y $\alpha 2$			
320	EMG1@135XbaFwMTL1	CGCTCTAGACTGCTGAACTGTGACGACCATC	<i>Xba I</i>
764	BUD5@-424BamRvMTL1a	CCCGGATCCGGTGGTGATCTCTTGTGTGG	<i>Bam HI</i>
Construcción de los vectores para ensayos de BiFC			
772	$\alpha 1$ @+1HindIII FW	CGCAAGCTTCTATAGTTCCTCCTTACTCTTTTATAG	<i>Hind III</i>
894	VC-VYFP@+7Rv Bgl2	GCGAGATCTCGCGCCCTACTTGTAC	<i>Bgl II</i>
895	VC-VYFP@-88Fw	GTACGCTGCAGGTCGAC	
902	VN-VYFP@-60Fw	GAAGCTTCGTACGCTGCAG	
903	VN-VYFP@+32Rv Bgl2	CCCAGATCTAGAAATTCGCTTATTAGAAGTG	<i>Bgl II</i>
907	$\alpha 1$ @+720 XhoI Rv	CGCCTCGAGCGAATGACCACAGGACC	<i>Xho I</i>
Oligonucleótidos para diagnóstico			
13	#1505	GGCGATTAAGTTGGGTAACGCCAGGG	
15	PGK-P Rev-out	CGATAAGAGGCCACGTGCTTTATG	
16	HIS3 Fw-out	AGAAATACGCACGAACACGATATAGAGG	
80	HDF1 int@141 Fw	CGGAACATATGTTTCGAGGTAC	
143	$\alpha 2$ @+583SaclBsgl Rv	CCGAGCTCTTGTGCAGCATAAAAAACCATTTTCGTTATGG	<i>Sac I</i> <i>Bsg I</i>
321	Bud5@-35RI-Rv MTL1	CCCGAATTCGCGTCTTTCCTGTGATTATGATG	<i>Eco RI</i>
374	HDF1@+1bp HindIII FW	GCGAAGCTTCCCCTTTCTTTTTTTTGATAATTC	<i>Hind III</i>

375	HDF1 @+839 KpnI Rv	TTTGGTACCTATGAAAGAACCAG	<i>Kpn I</i>
376	HDF1 @927bpSpe Fw	CAAAC TAGTATATGAAAACCAGGA AATAAGG	<i>Spe I</i>
379	HDF2 @+1bp HindIII	GCGAAGCTTCAGGTCGTATATATA TCATTCTATATAACTC	<i>Hind III</i>
380	HDF2 @+837 KpnI Rv	GTTGGTACCGATTCTATTTGG	<i>Kpn I</i>
381	HDF2 @1116bp SacI Fw	GTCGAGCTCCAGCAGCGCAGACC	<i>Sac I</i>
468	Fwd@13A1	GACCCAATACAAGATCTACGC	
469	Rev@377A1	AGATCTTTTCGATCTCTTGCGC	
672	HDF1 @+972Rv	CCCGTACTACA ACTAACAATGCAG C	
770	alfa2 @-422 Fw Bam	CCCGGATCCGTAGAGTGACTTCA GATATTGTACA ACTG	<i>Bam HI</i>
890	alpha2 @557 no stop Bam Rv	TTAGGATCCCAGTGTCGAGGCTG TTTTGAG	<i>Bam HI</i>
896	alfa2-3 mtl3 @-1485 Not Fw	ATAGCGGCCGCCGAAGCTTGATG AAATGG	<i>Not I</i>
897	alfa2-3 mtl3 @629 Bam no stop Rv	GCGGGATCCCTGTAAGACA ACTC AAAGAAAAGACC	<i>Bam HI</i>
900	EMG1 @-42 FW Not(Ng et al.) for alfa2-1	TATGCGGCCGCGCTTCTGCAGTA TCTACAATAGATAGAAG	<i>Not I (Pst I)</i>
904	a1 @-717 Spe Fw	GAGACTAGTTCATTTT GACTGAAA GTTTATTTTCG	<i>Spe I</i>
905	a1 @519 no TAG Bam Rv	CAGGGATCCGGTCACGATTGTTTA GATCTTTTCG	<i>Bam HI</i>
1049	alpha2 MTL1 @+114 Eco RI Fw inv 74	GACGAATTC AAGAGATCACCACC	<i>Eco RI</i>

Figuras Suplementarias

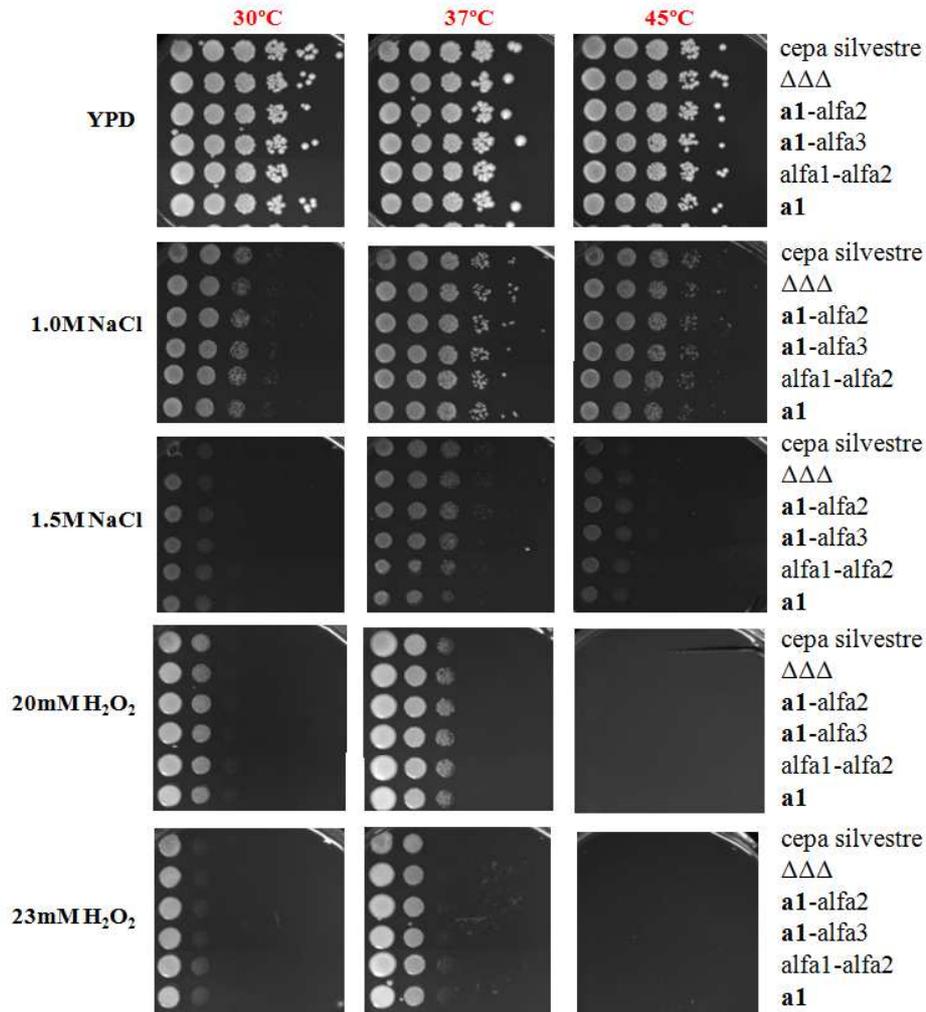


Figura S1. Crecimiento en medio sólido YPD suplementado con diferentes concentraciones de NaCl y H₂O₂.

Se utilizaron cultivos en fase estacionaria de cada una de las cepas y se ajustó la OD_{600nm} a 0.5. Se realizaron cinco diluciones seriadas y posteriormente se colocó una gota de 5µl de cada dilución de cada cepa. Las cepas utilizadas están descritas en el pie de figura de la Fig. 1. Los medios utilizados fueron medio rico YPD, medio YPD suplementado con 1.0M, 1.5M de NaCl y 20mM, 23mM de H₂O₂.

Las fotografías fueron tomadas a los 2 días de incubación en cada una de las temperaturas indicadas en la parte superior.

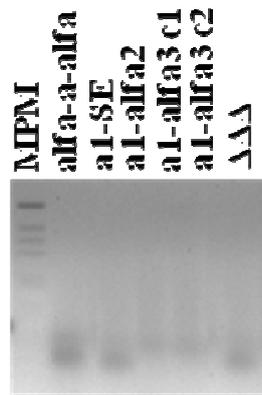


Figura S2. Control negativo de la RT-PCR (sin transcriptasa reversa). No se observa amplificación en ninguna de las cepas utilizadas (descritas en la Figura 1), lo que indica que la extracción de RNA no está contaminada con DNA.

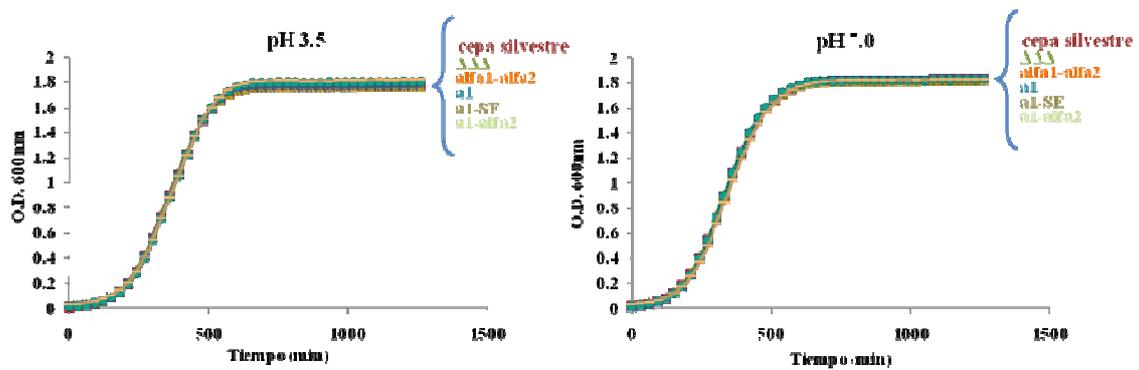


Figura S3. Curvas de crecimiento a 30°C en medio YPD con diferente pH.

Curvas de crecimiento y determinación de los tiempos de duplicación en medio YPD con pH 3.5 y pH 7 en el aparato Bioscreen. Se realizaron curvas de crecimiento de varias cepas con distinta información en los loci *MTL* (descritas en la Fig. 1) en placas de microdilución en un volumen de 300 μ L. El crecimiento se llevo a cabo a 30°C durante 24 horas y se la OD se leyó cada 30 min.

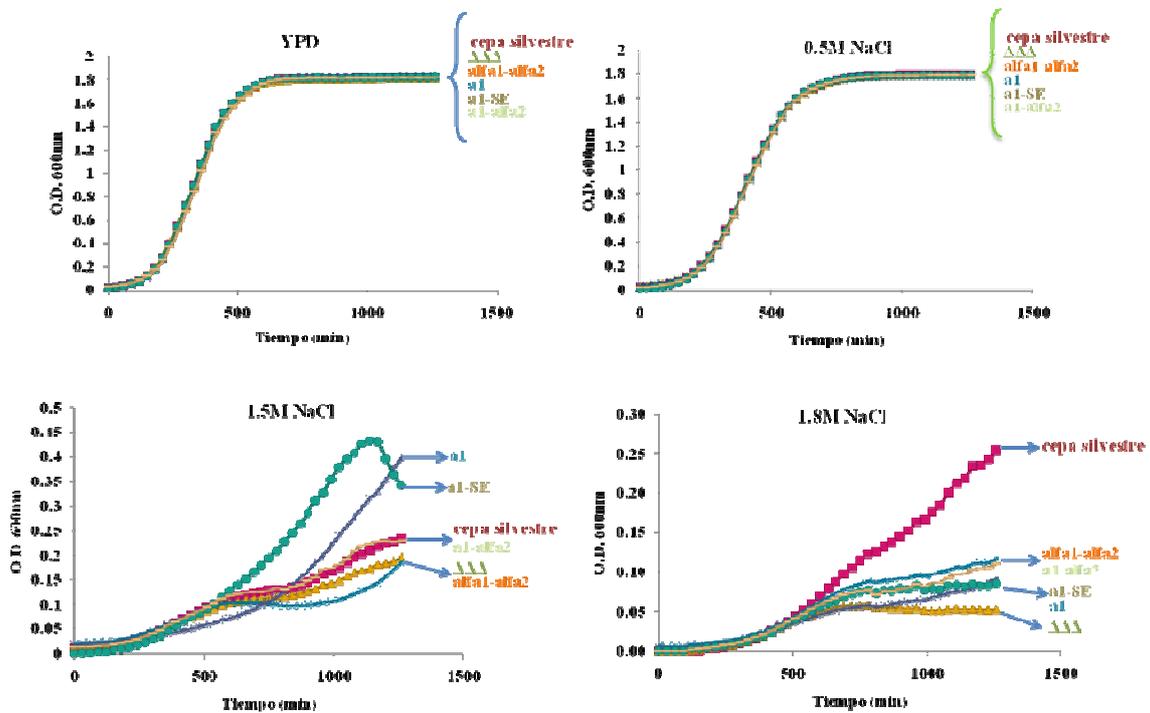


Figura S4. Curvas de crecimiento a 30°C con diferentes concentraciones de NaCl.

Curvas de crecimiento y determinación de los tiempos de duplicación en medio YPD con concentraciones de NaCl de 0.5M, 1.5M y 1.8M, en el aparato Bioscreen. Se realizaron curvas de crecimiento de varias cepas con distinta información en los loci *MTL* en placas de microdilución en un volumen de 300 μ L. El crecimiento se llevo a cabo a 30°C durante 24 horas y se tomaron lecturas de la OD cada 30 min. En este experimento no se incluyeron las cepas que expresan **a1** y alfa3.

TEF::YFP

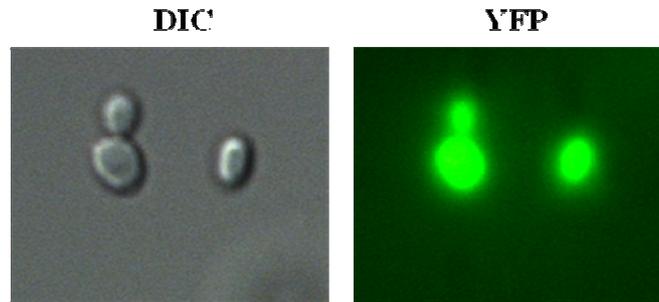


Figura S5. Microscopía de fluorescencia y DIC (microscopía diferencial de contraste de interferencia) de cultivos en fase estacionaria de la cepa que contiene el gen de la proteína fluorescente YFP bajo el promotor fuerte constitutivo del gen *TEF1*. El tiempo de exposición para la fotografía de fluorescencia fue el mismo para todas las fotos de este trabajo (2000 mseg para el filtro YFP, y aproximadamente 300 mseg para DIC).