



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

POSGRADO EN CIENCIAS EN BIOLOGIA MOLECULAR

**Expresión inducible de fusiones
traduccionales de los genes *MTL* de *Candida
glabrata***

Tesis que presenta

Yamile Vidal Aguiar

Para obtener el grado de

Maestra en Ciencias en Biología Molecular

Codirectoras de la Tesis:

Dra. Irene Beatriz Castaño Navarro

Dra. María Guadalupe Gutiérrez Escobedo

San Luis Potosí, S.L.P., julio de 2016



Constancia de aprobación de la tesis

La tesis "**Expresión inducible de fusiones traduccionales de los genes MTL de *Candida glabrata***" presentada para obtener el Grado de Maestra en Ciencias en Biología Molecular fue elaborada por **Yamile Vidal Aguiar** y aprobada el **once de julio del dos mil dieciséis** 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
Codirectora de la tesis

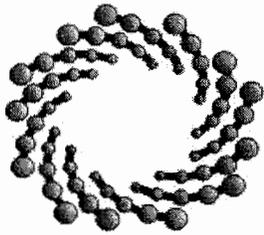
Dra. Ma. Guadalupe Gutiérrez Escobedo
Codirectora de la tesis

Dr. Samuel Lara González
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 codirección de la Dra. Irene Castaño Navarro y la Dra. María Guadalupe Gutiérrez Escobedo. Este trabajo fue apoyado por el proyecto CB 2014 No. 239629 del Fondo de Ciencia Básica, SEP-CONACYT otorgado a ICN. Durante la realización del trabajo el autor recibió una beca académica otorgada por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (No. 331651) 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 147 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 11 días del mes de julio del año 2016, 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. Samuel Lara González

Presidente

IPICYT

Dra. Ma. Guadalupe Gutiérrez Escobedo

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.

Yamile Vidal Aguiar

sobre la Tesis intitulada:

Expresión inducible de fusiones traduccionales de los genes MTL de Candida glabrata

que se desarrolló bajo la dirección de

Dra. Irene Beatriz Castaño Navarro

Dra. Ma. Guadalupe Gutiérrez Escobedo

El Jurado, después de deliberar, determinó

APROBARLA

Dándose por terminado el acto a las 18:00 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 11 días del mes de julio de 2016.

Mtra. Ivonne Lizette Cuevas Vélez
Jefa del Departamento del Posgrado

Dr. Marcial Bonilla Marín
Secretario Académico



Dedicatorias

A MI FAMILIA Y AMIGOS.

“THE SOLUTION TO A PROBLEM, CHANGES THE PROBLEM”

Agradecimientos

AI INSTITUTO POTOSINO DE INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA Y TECNOLÓGICA,
A. C. POR DARME LA OPORTUNIDAD DE HACER MI MAESTRÍA EN EL
POSGRADO DE BIOLOGÍA MOLECULAR

AL CONACYT POR EL APOYO ECONÓMICO

A LA DRA. IRENE CASTAÑO NAVARRO POR EL CAUDAL DE
CONOCIMIENTOS Y SOBRE TODO POR EL EJEMPLO. GRACIAS POR
ENSANCHAR JUNTOS MI HORIZONTE E INCLUSO GRACIAS POR TODO LO
QUE NO PUEDE DECIRSE CON PALABRAS.

AL DR. ALEJANDRO DE LAS PEÑAS NAVA POR SU AYUDA Y COMENTARIOS
QUE CONTRIBUYERON EN MI FORMACIÓN ACADÉMICA

A LA DRA. MARÍA GUADALUPE GUTIÉRREZ ESCOBEDO Y EL DR. SAMUEL
LARA GONZÁLEZ POR SUS AYUDAS Y RECOMENDACIONES EN UNA PARTE
IMPORTANTE DE LA TESIS

A LAS PERSONAS DEL LABORATORIO 6 DE MICROBIOLOGÍA MOLECULAR

A LA DRA. LINA RIEGO POR HABER CONFIADO EN MI CUANDO TODO
COMENZÓ

Contenido

Constancia de aprobación de la tesis	ii
Créditos Institucionales	iii
Agradecimientos	vi
Contenido	vii
Lista de tablas	ix
Lista de tablas suplementarias	ix
Lista de figuras	x
Abreviaturas	xi
Resumen	xii
Abstract	xiii
Resumen	2
1. Introducción	3
2. Materiales y Métodos	5
2.1. Cepas, plásmidos y oligonucleótidos.	5
2.2.1 Medios de cultivo para <i>E. coli</i> .	5
2.2.2 Medios de cultivo para <i>C. glabrata</i> .	5
2.3. Extracción de DNA plasmídico de <i>E. coli</i> y purificaciones de gel.	6
2.4. Transformación en <i>E. coli</i> .	6
2.5. Transformación genética de <i>C. glabrata</i> .	6
2.7. Obtención de curvas de crecimiento de cepas de <i>C. glabrata</i> .	7
3. Resultados	8
3.1. Las proteínas $\alpha 1$ y las variantes alélicas de $\alpha 2$ en <i>C. glabrata</i> conservan la estructura tridimensional del homeodominio.	8
3.2. Diseño de los vectores para generar fusiones traduccionales bajo promotores inducibles.	9
3.3. Determinación de las condiciones de inducción del promotor <i>MET3</i> y <i>MT1</i> mediante la expresión de GFP.	10
3.4. Obtención de fusiones traduccionales de las proteínas de los loci <i>MTL</i> con epítomos y fluoróforos tanto en el extremo amino como en el carboxilo bajo el promotor inducible <i>MET3</i> .	11

3.5. Evaluación del efecto de la sobre-expresión de los genes alfa en el crecimiento celular.	12
4. Discusión	12
5. Conclusiones	16
6. Literatura citada.	16

Lista de tablas

Tabla 1: Vectores base replicativos con promotores inducibles ya obtenidos.	19
Tabla 2. Fusiones traduccionales de los genes codificados en los loci <i>MTL</i> con fluoróforos y epítomos bajo el promotor inducible del gen <i>MET3</i> .	20
Tabla 3: Media geométrica de la inducción de GFP bajo la actividad del promotor del gen <i>MT1</i> .	21
Tabla 4: Retención de plásmido calculada a las 0 y 24 horas en medio ON y OFF	22

Lista de tablas suplementarias

Tabla S 1: Cepas utilizadas de <i>E. Coli</i>	33
Tabla S 2: Cepas utilizadas de <i>Candida glabrata</i>	33
Tabla S 3: Vectores utilizados en este trabajo	36
Tabla S 4: Oligonucleótidos utilizados en este trabajo	40

Lista de figuras

- Figura 1: Esquema de las proteínas del gen $\alpha 1$ y los tres genes alfa. 23
- Figura 2: Predicción estructural de las proteínas $\alpha 1$, $\alpha 2$ y $\alpha 3$ de *C. glabrata*. 23
- Figura 3: Representación esquemática de los vectores base replicativos para construir fusiones traduccionales inducibles con epítomos o fluoróforos al extremo amino o carboxilo de cualquier gen de interés. 23
- Figura 4: Representación esquemática de los vectores con los genes silvestres clonados bajo promotor inducible P_{MET3} ó P_{MT1} . 23
- Figura 5: Histograma de la actividad del promotor *MET3* a las 2.5 horas posterior a la inducción. 23
- Figura 6: Histograma de la actividad del promotor *MT1* a las 3 horas posterior a la inducción en presencia de 1mM de sulfato de cobre. 23
- Figura 7: Fluorescencia de $\alpha 2$ y $\alpha 3$ fusionados a mCherry bajo promotor inducible P_{MT1} . 24
- Figura 8: Tiempos de duplicación de cepas de *C. glabrata* que sobreexpresan los genes alfa en estudio. 24

Abreviaturas

(algunas por sus siglas en inglés)

MAT	<i>m</i> ating <i>t</i> ype <i>l</i> ocus
MTL	<i>m</i> ating <i>t</i> ype <i>l</i> ike
FT	F <u>a</u> ctor de t <u>r</u> anscripci <u>o</u> n
HD	H <u>o</u> meod <u>o</u> minio
c-Myc	<u>M</u> yelo <u>C</u> ytomatosis proto-oncogen protein
YFP	Yellow fluorescent protein
ChIP	Chromatin Immunoprecipitation
ChIP Seq	ChIP-sequencing
CoIP	Co-Immunoprecipitation
C-	Carboxilo terminal
N-	Amino terminal
CAA	Casaminoácidos
YPD	Yeast extract-Peptone-Dextrose
OD	Optical Density
OD_i	Initial Optical Density
PEG	Polietilenglicol
LB	Medio Luria-Bertani
SC	Medio sintético completo
YNB	Yeast Nitrogen Base
NAT	Nourseothricin resistanece marker
NAT^R	Nourseothricin-resistance colonies
DMSO	Dimetilsulfóxido
Met	Metionina
Cys	Cisteína
P_{MET3}	Promotor del gen de <i>MET3</i>
P_{MT1}	Promotor del gen de <i>MT1</i>

Resumen

Expresión inducible de fusiones traduccionales de los genes *MTL* de *Candida glabrata*

La reproducción sexual y el control de la identidad del tipo celular sexual en la mayoría de los hongos está regulada por los genes codificados en el locus *MAT* (*mating type locus*) o *MTL* (*mating type like*) en otros hongos. *Candida glabrata* es una levadura haploide y asexual. Sin embargo, contiene en su genoma tres loci *MTL* en los cuales codifica los genes ortólogos a los que regulan el apareamiento en *Saccharomyces cerevisiae*, denominados **a1**, alfa1 y alfa2. El hecho de que *C. glabrata* haya conservado estos genes aun cuando no existan hasta el momento evidencias experimentales de reproducción sexual, plantea la pregunta de cuál es la función de estos genes en esta levadura.

Para el estudio de la función de estos genes, hemos generado cuatro vectores replicativos en *C. glabrata* que nos permitirán construir fusiones traduccionales con dos epítomos diferentes (Flag o c-Myc) o con dos fluoróforos (mCherry o YFP), tanto en el extremo carboxilo como el amino de los genes de interés. Los vectores además contienen un promotor inducible, el del gen *MET3* o del gen *MT1*, de manera que es posible etiquetar los genes de interés en cualquiera de los extremos e inducirlos mediante el crecimiento en medios específicos. Hemos generado diferentes fusiones traduccionales donde los genes codificados en los loci *MTL* ya se encuentran etiquetados en el extremo carboxilo y amino terminal con fluoróforos o epítomos de estos vectores. Con estas construcciones realizaremos ensayos para identificar la localización celular de las proteínas codificadas por estos genes (para los genes etiquetados con fluoróforos), así como estudios de interacción DNA-proteínas (ChIP, ChIP-seq) e interacción entre proteínas (CoIP) mediante la coexpresión de diferentes genes etiquetados.

Paralelamente, para realizar estudios de la función de estos genes hemos clonado los genes silvestres de interés (sin fusiones traduccionales) bajo el promotor inducible P_{MT1} para determinar el fenotipo de la sobreexpresión de cada uno de estos genes.

PALABRAS CLAVE: fusiones traduccionales inducibles, *Candida glabrata*, *MTL*

Abstract

Inducible expression of translational fusions of the *MTL* genes in *Candida glabrata*

Sexual reproduction in most fungi is controlled by genes encoded in the *MAT* locus (Mating Type Locus) or *MTL* (Mating-Type Like) in other fungi. In *Saccharomyces cerevisiae* these genes encode transcription factors involved in the establishment of the cell-type identity and regulation of mating. *Candida glabrata* is a haploid and asexual yeast that is an opportunistic pathogen of humans. However, it has orthologous genes to those that regulate mating in *S. cerevisiae*, called **a1**, alpha1 and alpha2 encoded in the *MTL* loci. The fact that *C. glabrata* has preserved these genes, even though there is no experimental evidence of sexual reproduction, raises the question of what is the role of these genes in this organism.

To elucidate the function of these genes, we have generated four different replicative recipient vectors in *C. glabrata*, that allow us to generate translational fusions with two different epitopes (Flag or c-Myc) or two fluorophores (mCherry or YFP), at either the C or N-termini of the genes of interest. These plasmids are replicative in *C. glabrata* and have different selection markers to allow for selection of two plasmids in a single cell, and coexpression of two different tagged proteins.

In addition the vectors contain one of two inducible promoters: the promoter of either *MET3* or *MT1* genes, so it is possible to tag the genes of interest at either end and induce the fusions by growing in specific media. We generated different translational fusions of the *MTL* genes at the carboxy and amino termini with both fluorophores and epitopes used in this work. We will use these fusions to identify the cellular localization of these proteins (in the case of genes tagged with fluorophores), as well as studies of DNA-protein interaction (ChIP, ChIP-seq) and protein-protein interactions by co-expression of different genes in the same cell (CoIP).

In parallel, we have cloned each wild-type gene (with no epitope or fluorophore fusion) under the inducible promoter P_{MT1} to study the effect of the over-expression of these genes.

KEY WORDS. Inducible translational fusions, *Candida glabrata*, *MTL*.

Expresión inducible de fusiones traduccionales de los genes *MTL* de

Candida glabrata

Yamile Vidal Aguiar, María Guadalupe Gutiérrez, Alejandro De Las Peñas e Irene Castaño*.

* Corresponding author

Email: icastano@ipicyt.edu.mx

Mailing Address: Camino a la Presa San Jose # 2055. Col. Lomas 4^a sección, San Luis Potosí, 78216, México.

División de Biología Molecular.

IPICYT. Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica

Phone: (52) 444-834-2038

Fax: (52) 444-834-2010

Resumen

La reproducción sexual y el control de la identidad del tipo celular sexual en la mayoría de los hongos está regulada por los genes codificados en el locus *MAT* (*mating type locus*) o *MTL* (*mating type like*) en otros hongos. *Candida glabrata* es una levadura haploide y asexual. Sin embargo, contiene en su genoma tres loci *MTL* en los cuales codifica los genes ortólogos a los que regulan el apareamiento en *S. cerevisiae*, denominados **a1**, alfa1 y alfa2. El hecho de que *C. glabrata* haya conservado estos genes aun cuando no existan hasta el momento evidencias experimentales de reproducción sexual, plantea la pregunta de cuál es la función de estos genes en esta levadura.

Para el estudio de la función de estos genes, hemos generado cuatro vectores replicativos en *C. glabrata* que nos permitirán construir fusiones traduccionales con dos epítomos diferentes (Flag o c-Myc) o con dos fluoróforos (mCherry o YFP), tanto en el extremo carboxilo como el amino de los genes de interés. Los vectores además contienen un promotor inducible, ya sea el del gen *MET3* o el del gen *MT1*, de manera que es posible etiquetar los genes de interés en cualquiera de los extremos e inducirlos mediante el crecimiento en medios específicos. Hemos generado diferentes fusiones traduccionales donde los genes codificados en los loci *MTL* ya se encuentran etiquetados en el extremo carboxilo y amino terminal con fluoróforos o con los epítomos de este trabajo. Con estas construcciones realizaremos ensayos para identificar la localización celular de las proteínas codificadas por estos genes (para los genes etiquetados con fluoróforos), así como estudios de interacción DNA-proteínas (ChIP o ChIP-seq) e interacción entre proteínas (CoIP) mediante la coexpresión de diferentes genes etiquetados

Paralelamente para realizar estudios de la función de estos genes hemos clonado los genes silvestres de interés (sin fusiones traduccionales) bajo el promotor inducible P_{MT1} para determinar el fenotipo de la sobreexpresión de cada uno de estos genes

Palabras Clave: fusiones traduccionales inducibles, *Candida glabrata*, *MTL*

1. Introducción

Candida glabrata es una levadura patógena haploide que carece de un ciclo sexual definido. Esta levadura contiene en su genoma tres loci de apareamiento *MTL* (*mating type like*): *MTL1* y *MTL3* en el cromosoma B y *MTL2* en el cromosoma E. Los genes codificados en estos loci (genes **a1**, alfa1 y alfa2) son ortólogos a los que regulan el apareamiento en *S. cerevisiae* (Srikantha et al., 2003).

En *S. cerevisiae* estos genes codifican para proteínas que funcionan como factores transcripcionales los cuales están involucrados en la identidad de tipo celular sexual y presentan una región conservada denominada homeodominio (HD). El HD es un fragmento de 60 aminoácidos que adopta una estructura caracterizada por la estructura de hélice-giro-hélice la cual puede reconocer al DNA de una manera específica de secuencia (Goutte and Johnson, 1994). La proteína **a1** (130 aminoácidos) es un factor de transcripción (FT) que contiene un homeodominio tipo HD2 (59 aminoácidos que representa el 45.3% de la proteína total) la cual se expresa en células **a**. Por su parte, las células alfa expresan el alelo del locus *MAT α* que contiene los genes alfa1 y alfa2, que codifican para dos FT que poseen dominio α y homeodominio de clase HD1, respectivamente (Herskowitz et al., 1992). La proteína alfa1 presenta una longitud de 175 aminoácidos y por su parte alfa2 tiene un tamaño de 210 aminoácidos y el homeodominio HD1 representa el 28.6% respecto a la proteína total.

En una célula haploide alfa, la proteína alfa1 activa la expresión de los genes específicos de este tipo celular (alfa-sg) por unión directa al DNA y mediante interacción proteína-proteína con un segundo regulador transcripcional, Mcm1 (Grayhack, 1992) y alfa2 reprime los genes específicos de células **a** (**asg**). En una célula haploide **a**, los **asg** no requieren de activación de ningún FT; a la proteína **a1** no se le ha adjudicado función definida en la identidad celular, ya que los datos experimentales muestran que una cepa que no contenga ninguna información en el locus *MAT* se comporta como célula **a** (Herskowitz et al., 1992). En células diploides, **a1** y alfa2 forman un heterodímero (**a1**/ α 2) que actúa como represor transcripcional de los genes específicos de haploidía (Goutte and Johnson, 1994).

El análisis de la secuencia de los genes presentes en los loci *MTL* de *C. glabrata* en comparación con los ortólogos en *S. cerevisiae* muestran una conservación en secuencia que es del 46% de similitud total para el caso del gen **a**1 y del 56% para el caso del gen alfa2 (Figura 1, datos suplementarios). Además el homeodominio, el cual es la región requerida para interactuar con el DNA, de los genes **a**1 y alfa2 están conservados entre *C. glabrata* y *S. cerevisiae* (datos del laboratorio).

En la gran mayoría de los aislados clínicos, el locus *MTL2* contiene información **a**, y *MTL3* información alfa, mientras que *MTL1* puede contener información **a** ó alfa. *C. glabrata* presenta tres variantes del gen alfa2: alfa2 en el locus *MTL1*, alfa3 en el locus *MTL3* y alfa4 en los únicos dos aislados clínicos que presentan información alfa (en vez de **a**) en locus *MTL2*. Estas versiones diferentes del gen alfa2 conservan el homeodominio (Yañez-Carrillo, 2015). Datos previos generados en nuestro laboratorio indican que en *C. glabrata* los loci *MTL* no están involucrados en la identidad de tipo celular sexual, ya que los genes específicos de cada tipo celular se expresan independientemente del tipo de información presente en los loci *MTL* (Ramírez-Zavaleta et al., 2010).

La función que tienen estos genes en *C. glabrata* no ha sido descrita hasta el momento. Sin embargo, el hecho de que de que esta levadura haya conservado estos genes podría indicar la presencia de un ciclo sexual aún no descrito o bien que estos genes hayan evolucionado hacia la regulación de vías independientes a las descritas hasta el momento.

Con el fin de estudiar la función de los genes codificados en los loci *MTL* hemos generado vectores de expresión que permitan construir fusiones traduccionales de los genes de estudio con fluoróforos (YFP ó mCherry) o epítopos (c-Myc ó Flag). Hemos generado versiones etiquetadas de estos genes tanto en el amino (N-) como el carboxilo (C-) terminal. Estos vectores de expresión nos permitirán generar cepas de *C. glabrata* en las que podamos estudiar la localización/colocalización de estos genes así como interacción entre las proteínas y entre el DNA y las proteínas.

Adicionalmente estos vectores nos permiten generar construcciones inducibles de los genes silvestres de interés, para estudiar su función cuando se induce la sobreexpresión.

2. Materiales y Métodos

2.1. Cepas, plásmidos y oligonucleótidos.

Todas las cepas, plásmidos y oligonucleótidos usados en este trabajo están listados en Tabla S 1, Tabla S 2, Tabla S 3 y Tabla S 4 (material suplementario).

2.2. Medios

2.2.1 Medios de cultivo para *E. coli*.

Para el crecimiento bacteriano se utilizó el medio Luria-Bertani (LB), como se describe en (Frederick M. Ausubel, 2003). Para el medio LB sólido, se añadió agar bacteriológico a una concentración final de 1.5% (p/v). Este medio contiene extracto de levadura 5 g/L, triptona 10 g/L y NaCl 5 g/L. En la mayoría de los casos se suplementó con carbenicilina a una concentración final de 50 µg/mL.

2.2.2 Medios de cultivo para *C. glabrata*.

Las células de levadura se cultivaron en medio estándar como se describe en (Sherman et al., 1986). Para los medios sólidos se añadió agar bacteriológico a una concentración final de 2% (w/v). El medio sintético completo (SC) contiene 1.7 g/L de base nitrogenada de levadura [sin (NH₄)₂SO₄ ni aminoácidos], 5 g/L (NH₄)₂SO₄, 0.6% casaminoácidos, y 2% de glucosa. El medio YPD (del Inglés Yeast extract-Peptone-Dextrose), contiene 10g/L de extracto de levadura, 20g/L de peptona, 2% (p/v) de glucosa y se le añade 25mg/L de uracilo. Cuando se requirió, las cajas de YPD y SC se suplementaron con NAT a una concentración final de 100 µg/mL y 150 µg/mL respectivamente.

Agar YPG sólido: extracto de levadura 10 g/L, peptona 20 g/L, uracilo 25 mg/ml, glicerol 3%, agar 20 g/L

2.3. Extracción de DNA plasmídico de *E. coli* y purificaciones de gel.

Las purificaciones de gel y extracciones de plásmidos se realizaron con columnas Qiagen (Qiagen, QIAquick Gel Extraction Kit Cat. No. 28706; QIAprep Spin Miniprep Kit Cat. No. 27106).

2.4. Transformación en *E. coli*.

Todos los plásmidos se introdujeron en la cepa DH10B mediante electroporación. Las cepas de *E. coli* se conservaron en glicerol al 10% a una temperatura de - 80°C.

2.5. Transformación genética de *C. glabrata*.

Para realizar las transformaciones en *C. glabrata* usamos el método de transformación con acetato de litio (Gietz et al., 1992), en el cual las células se cultivan en YPD líquido hasta llegar a una densidad óptica (OD₆₀₀) de 1.0, las cosechamos, lavamos con agua estéril y después con 1mL de acetato de litio 100 mM hasta resuspender en 300 µL acetato de litio 100 mM. Tomamos alícuotas de esta suspensión celular y adicionamos una mezcla de 240 µl de PEG al 50% (PM 4000), 36 µL de acetato de litio 1M, 50 µg de ADN de esperma de salmón desnaturalizado por calor y aproximadamente 350 – 500 ng del DNA plásmido que se desea introducir en la levadura. Esta mezcla se incubó a 30°C por 45 min, y pasado este tiempo se le agregó 43 µL de DMSO. Posteriormente se le dió un choque térmico a 42°C por 15 min. Estas células se centrifugaron, y resuspendieron en 900 µL de agua estéril y se platearon alícuotas de 300 µL en cajas de selección apropiada para cada plásmido.

Antes de platear en medio de selección con antimicóticos, las células transformadas se resuspenden en 1 mL de YPD y se incuban por 4 horas a 30°C. Posteriormente se platean en el medio correspondiente y se incuban a 30°C por aproximadamente 72 h. Las colonias transformantes se purifican mediante crecimiento en medio de selección sólido en estrías para obtener colonias aisladas dos veces consecutivas. Las colonias positivas se sembraron por estría nuevamente en YPG para descartar las colonias con una función mitocondrial afectada. Las cepas de *C. glabrata* transformadas se conservaron en glicerol al 15% a una temperatura de -80 °C.

2.6. Microscopía de fluorescencia

Para visualizar las cepas de levadura en el microscopio se incubaron cultivos líquidos apropiados por 12 h a 30°C en YPD. Posteriormente se inocularon cultivos en diferentes tipos de medio fresco a una OD₆₀₀ de 0.5 y se cultivaron por 2.5 horas. Los medios son: ON (CAA + CuSO₄ 1mM) y medio OFF (CAA) respectivamente. Posteriormente se tomó 2mL de la suspensión celular y las células se lavaron dos veces en agua estéril. Las células se resuspendieron en 50 µL de agua estéril. Los tiempos de excitación que se emplearon para mCherry fue 1s. Las longitudes de emisión y excitación utilizadas para este fluoróforo fueron 557 y 572 nm respectivamente. Las células se visualizaron con el equipo Zeiss Axio Vision Blue edition.

2.7. Obtención de curvas de crecimiento de cepas de *C. glabrata*.

Utilizamos un precultivo de cada cepa de 12 h incubado a 30°C con agitación en YPD líquido, del cual tomamos 5µL para inocularlos en 5mL de medio selectivo (CAA) y los inoculamos a 30°C con agitación por 12 h.

Los cultivos fueron ajustados a una OD₆₀₀ de 0.05 en medio ON (CAA+CuSO₄ 1mM) y OFF (CAA) respectivamente. Se tomó 300 µL de cada muestra y se colocó en placas de 100 pozos. El crecimiento fue obtenido automáticamente usando el analizador Bioscreen C a 30°C (Thermic LabSystems Oy, Finland) con agitación constante y los valores de OD₆₀₀ se tomaron cada 15 min por 24 horas (Warringer and Blomberg, 2003). El tiempo de duplicación fue calculado como se describe en (Olsen et al., 2010).

La pérdida del plásmido se calculó en el tiempo t=0 y t=24 horas. Para ello se ajustó el número de células a platear partiendo de un cultivo de OD₆₀₀= 0.5 (1x10⁷ células/mL) en cajas de CAA y YPD respectivamente. Las colonias fueron cuantificadas y el porcentaje de células que conservan el plásmido se calculó a partir de la siguiente fórmula:

$$\text{Células que conservan plásmido} = \frac{\text{Número de células crecidas en CAA} \times 100}{\text{Número de células crecidas en YPD}}$$

2.8. Ensayos de fluorescencia.

2.8.1. Actividad del promotor *MET3*

La cepa CGM2857 (Tabla S 2) que contiene el vector base con la proteína fluorescente GFP bajo el promotor del gen *MET3*, se cultivó en 5 mL de medio CAA a 28°C con agitación continua por 12 horas. Las células se lavaron dos veces en agua estéril y se inoculó en medio ON (YNB) y medio OFF (YNB+Met+Cys 2mM) respectivamente. Se ajustó la OD_i a 0.5. Se realizaron lecturas a diferentes tiempos (0, 1, 2, 2.5, 5 y 24 horas) en fase logarítmica. Se utilizó como control positivo una cepa que contiene una fusión transcripcional de YFP bajo el promotor fuerte constitutivo del gen *TEF1*. La pérdida de plásmido se calculó al final del experimento como se describió previamente.

2.8.2. Actividad del promotor *MT1*

La cepa CGM2853 (Tabla S 2), que contiene el vector base con la proteína GFP bajo el promotor inducible del gen *MT1*, se cultivó en medio CAA. Las células se lavaron dos veces en agua estéril y se inoculó en diferentes medios ON (CAA+ 50, 100, 150 µM y 1, 2, 3, 4 y 5mM de sulfato de cobre) y medio OFF (CAA). Se ajustó la OD_i a 0.5. Se realizaron lecturas a diferentes tiempos (0, 2, 3, 4, 6, 8 y 24 horas). Se utilizó como control positivo una cepa que contiene una fusión transcripcional de YFP bajo el promotor fuerte constitutivo del gen *TEF1*.

3. Resultados

3.1. Las proteínas *a1* y las variantes alélicas de *alfa2* en *C. glabrata* conservan la estructura tridimensional del homeodominio.

En trabajo previo en el laboratorio se describió que las proteínas *a1* y las variantes alélicas del gen *alfa2* en *C. glabrata* conservan el homeodominio (Figura 1) (Robledo-Márquez et al., 2016, sometido).

Una cuestión importante es determinar si el homeodominio presente en estos genes conserva la estructura tridimensional. Para ello se modelaron las proteínas *a1*, *alfa2* y *alfa3* de *C. glabrata* usando el predictor I-TASSER (Yang et al., 2014). Los resultados obtenidos se analizaron y se eligió el modelo con base al C-score y al

TM-score conforme a lo reportado por (Yang et al., 2014). El C-score es una puntuación de confianza para la estimación de la calidad de los modelos predichos y TM-score es un parámetro que mide la similitud estructural entre el modelo generado y proteínas resueltas similares, en donde los parámetros como C-score están típicamente en el rango de -5 a 2 y TM-score va desde 0 a 1. Los valores de C-score para las proteínas **a1**, **alfa2** y **alfa3** fueron -2.98, -3.14 y -3.05 respectivamente. Los valores de TM-score fueron 0.38 ± 0.12 , 0.36 ± 0.12 y 0.37 ± 0.13 . TM-score mide la similitud entre la estructura del modelo creado y la estructura de la proteína más parecida de la base de datos y es menos sensible a las variaciones estructurales locales; TM-score >0.5 nos indica que hay dos estructuras con topología similar, mientras que un TM-score <0.17 nos indica que la similitud es al azar. Dado que en este caso el TM-score fue mayor a 0.17 se concluyó que la similitud no es al azar, ya que los valores obtenidos se acercan más a 0.5. A pesar que estos valores no son >0.5 , el modelo predicho puede ser confiable puesto que el único dominio conocido en estas proteínas es el homeodominio. El encontrar mediante “threading” proteínas para usar como plantilla, provenientes de bases de datos de estructuras resueltas que tienen una estructura o un motivo estructural similar a la secuencia de consulta puede ser complejo para el resto de la proteína. Este hecho puede contribuir negativamente a los valores de C-score y TM-score obtenidos.

Los modelos se superpusieron con las estructuras depositadas en PDB (Protein Data Bank) de las proteínas ortólogas de *S. cerevisiae* usando para ello el programa UCSF Chimera (Li et al., 1998; Pettersen et al., 2004). De acuerdo con los modelos podemos predecir que los genes **a1**, **alfa2** y **alfa3** de *C. glabrata* no solo conservan la secuencia que corresponde al homeodominio sino que también mantienen la estructura tridimensional necesaria para unirse al DNA. Estos datos sugieren que en *C. glabrata* estos genes podrían actuar como factores de transcripción (Figura 2)

3.2. Diseño de los vectores para generar fusiones traducionales bajo promotores inducibles.

Para el estudio de los genes de interés se han generado vectores replicativos que se muestran en la Figura 3. Estos vectores permitirán etiquetar los genes de interés

en el extremo amino o carboxilo terminal (N- o C-terminal) con diferentes fluoróforos o epítomos. Las fusiones traduccionales generadas se encuentran espaciadas por un linker flexible (5 repeticiones de los amino ácidos G, A) que favorecerá un plegamiento correcto de la proteína de interés fusionada con los fluoróforos o epítomos utilizados en estos vectores (Szewczyk et al., 2006). Estas fusiones se encuentran bajo la regulación del promotor inducible *MET3*, el cual se induce en ausencia de metionina y cisteína. Adicionalmente se generaron otras versiones de las mismas construcciones pero bajo la regulación de un promotor inducible aún más fuerte (promotor del gen *MT1*), el cual se induce en presencia de sulfato de cobre en el medio.

Paralelamente se generaron otras construcciones que permitirán estudiar los genes silvestres de interés (sin fusiones traduccionales) bajo la expresión de ambos promotores inducibles (Figura 4).

3.3. Determinación de las condiciones de inducción del promotor *MET3* y *MT1* mediante la expresión de GFP.

Para el estudio de los genes de interés es importante en primer lugar establecer las condiciones óptimas de inducción de los promotores utilizados en este trabajo.

Mediante el empleo de una cepa de *C. glabrata* la cual contiene un plásmido con una fusión transcripcional de GFP bajo el promotor inducible *MET3*, estudiamos las condiciones óptimas de inducción de este promotor mediante un ensayo de citometría de flujo. Observamos actividad del promotor *MET3* desde las 2 horas posteriores a la inducción del promotor. Se estableció que a las 2.5 horas después de la inducción en un medio sin cisteína ni metionina, es el tiempo óptimo para realizar las siguientes mediciones (Figura 5).

Para el estudio del tiempo óptimo de inducción del promotor *MT1* se utilizó una cepa de *C. glabrata* que contiene una fusión transcripcional del gen de GFP bajo la actividad del promotor de *MT1*. Se midió la inducción del promotor mediante citometría de flujo en presencia de diferentes concentraciones de sulfato de cobre (50, 100, 150 μ M y 1, 2, 3, 4 y 5mM) (Tabla 3). Desde las 2 horas posteriores a la

inducción se observó actividad del promotor en presencia de concentraciones iguales o superiores a 1mM de sulfato de cobre. La actividad del promotor se mantiene después de 24 horas en presencia de sulfato de cobre en todas las concentraciones ensayadas. A partir de estos resultados se estableció 1mM de sulfato de cobre como la concentración a ensayar las siguientes mediciones, ya que a esta concentración se obtiene una inducción alta del promotor sin que afecte el crecimiento de la levadura (Figura 6).

3.4. Obtención de fusiones traduccionales de las proteínas de los loci *MTL* con epítomos y fluoróforos tanto en el extremo amino como en el carboxilo bajo el promotor inducible *MET3*.

Clonamos los genes alfa2, alfa3 y alfa4 para generar las fusiones traduccionales bajo el promotor inducible *MET3*. Todas las fusiones ya obtenidas se muestran en la Tabla 2. Estas fusiones tienen el linker flexible entre el gen y el fluoróforo o epítomo correspondiente. Los genes etiquetados tanto en el extremo amino como carboxilo terminal permitirán realizar ensayos de localización celular y la inmunodetección de estas fusiones mediante Western Blot. Hasta el momento tenemos construidas las fusiones en el carboxilo-terminal correspondientes a estos genes bajo el promotor *MET3*. Las fusiones traduccionales en el amino terminal se encuentran tanto bajo la regulación del promotor de *MET3* como del gen *MT1*.

Los genes alfa2 y alfa3 fusionados con mCherry en el N-terminal bajo el promotor P_{MT1} pueden ser visualizados por microscopía de fluorescencia.

Al observar bajo el microscopio de fluorescencia las cepas que contienen los plásmidos con las fusiones tanto de alfa2 como alfa3 en el N-terminal con mCherry detectamos señal de fluorescencia (Figura 7). La fluorescencia parece estar localizada en puntos intensos de fluorescencia, algunos de los cuales parecen coincidir con el núcleo, aunque aún no hemos teñido simultáneamente con DAPI para visualizar el núcleo.

3.5. Evaluación del efecto de la sobre-expresión de los genes alfa en el crecimiento celular.

Con el objetivo de definir un fenotipo asociado con la sobreexpresión de los genes en estudio realizamos un ensayo de crecimiento en el equipo Bioscreen-C. Para este ensayo utilizamos cepas que expresan los genes silvestres en un fondo genético que contienen mutaciones nulas en los tres loci *MTL* [(*mtl1,2,3*) Δ]. Evaluamos el crecimiento de cada cepa a 30°C mediante lecturas de OD cada 15 minutos por 24 horas posteriores a la inducción del promotor de *MT1* en medio "ON". Utilizamos como control del ensayo las mismas cepas crecidas en medio "OFF". Además utilizamos como control también la cepa transformada con el vector vacío. El crecimiento es similar en todas las cepas evaluadas y este comportamiento es independiente de la expresión de los genes estudiados. Los tiempos de duplicación fueron similares también (Figura 8).

Cabe señalar que determinamos la estabilidad del plásmido en estos experimentos y encontramos que estos plásmidos se mantienen en la gran mayoría de las células (aproximadamente el 90%), desde el inicio hasta el final del experimento (Tabla 4).

4. Discusión

En ese trabajo se generaron una serie de vectores de expresión que permitirá etiquetar cualquier gen de interés en el extremo amino o carboxilo terminal con diferentes fluoróforos (YFP, mCherry) y epítomos (c-Myc y FLAG). Estas nuevas versiones se diferencian de las generadas anteriormente en el laboratorio (Yáñez-Carrillo et al., 2015) en 3 características: a) se podrán generar fusiones ya sea en el N- o el C-terminal de las proteínas de interés; b) estos vectores permitirán generar fusiones traduccionales bajo dos promotores inducibles diferentes P_{MET3} y P_{MT1} ; y c) dichas construcciones contienen un linker que separa el gen de interés del epítomo o el fluoróforo, lo cual favorecerá un correcto plegamiento y mayor estabilidad de los genes etiquetados. El uso de los linkers posibilita una conexión entre diferentes proteínas que pueden adoptar una conformación extendida que otorga una máxima flexibilidad. Se conoce que secuencias con una alta posibilidad de formar α -hélices o hojas- β pueden limitar la flexibilidad de la fusión traduccional y consecuentemente

tener un efecto desfavorable en la actividad biológica de las proteínas en estudio (Crasto and Feng, 2000). En este trabajo se utilizó un linker con 5 repeticiones de los amino ácidos G, A. La glicina se utiliza generalmente en linkers porque la ausencia de un carbono β permite que el esqueleto del polipéptido pueda acceder a ángulos que son energéticamente prohibidos por otros aminoácidos (Bahmani and Hosseinkhani, 2016). Por lo tanto, un linker rico en glicina será más flexible que un linker de longitud comparable compuesto de residuos diferentes a este aminoácido. La secuencia del linker utilizado en este trabajo de (GA)₅ se considera como un linker muy flexible que favorece el plegamiento correcto de cada dominio de la proteína de fusión (Szewczyk et al., 2006).

Estas herramientas permitirán utilizar una serie de vectores para estudiar la regulación transcripcional y traduccional de cualquier gen de interés así como la localización intracelular de las proteínas de *C. glabrata*.

La fuerza relativa de cada promotor se analizó mediante el monitoreo de la expresión de GFP en cepas de *C. glabrata* que poseen dichas construcciones mediante citometría de flujo. El promotor de *MET3* ha sido usado en estudios previos en *C. albicans* y *C. glabrata* (Care et al., 1999; Zordan et al., 2013). Como se observa en el histograma en presencia de Met y Cys (2mM) (OFF) la expresión de GFP se reprime y el perfil de fluorescencia corresponde a cepas que presentan sólo el vector vacío (datos no mostrados). En medio que carece de estos aminoácidos (ON) la expresión de GFP se induce en fase logarítmica. Estos datos son consistentes con estudios reportados anteriormente (Zordan et al., 2013). En las condiciones ensayadas se estableció las 2.5 horas después de transferir las células al medio ON, como el tiempo de máxima inducción.

El promotor de *MT1* es un promotor inducible por la adición de sulfato de cobre en el medio. Este promotor ha sido utilizado para modular la expresión de genes en *S. cerevisiae* (Mascorro-Gallardo et al., 1996) y *Pichia Pastoris* (Koller et al., 2000). Ensayamos varias concentraciones de sulfato de cobre y tiempos de inducción y determinamos 1mM de sulfato de cobre como la máxima concentración de inductor a utilizar sin que inhiba el crecimiento de la levadura (Tabla 3). Comparando la

media geométrica de fluorescencia a las 2.5 horas para *MET3* y 3 horas de inducción para *MT1* podemos concluir que el P_{MT1} es más fuerte que P_{MET3} (249.29 vs 386.28) (Figura 5 y Figura 6). Además la inducción del promotor *MT1* persiste a las 24 horas en presencia de 1mM de sulfato de cobre, donde se registraron los máximos valores de media geométrica para este promotor sin que afecte el crecimiento (Tabla 3). Sin embargo en este tiempo el P_{MET3} ya no se encuentra inducido (76.12 vs 1019.24).

En el caso del vector *pMET3-GFP* el histograma presenta dos picos bien definidos, uno de ellos se corresponde con la población que expresa GFP bajo las condiciones de inducción del promotor y el otro pico, que corresponde a una intensidad de fluorescencia del plásmido en condiciones OFF o al que no tiene promotor (10 unidades), puede ser reflejo de una población que han perdido el plásmido. Los valores de pérdida de plásmido realizado con el vector *pVA17 (pMET3-YFP)* indican que solo el 40% de la población retiene el plásmido, aún bajo crecimiento en medio selectivo para el plásmido. Para este vector se observó un comportamiento similar en el histograma obtenido al plásmido con la fusión del promotor *MET3* con GFP (datos no mostrados). Sin embargo para el caso del vector *pMT1- GFP* se observa una única población que se encuentra inducida. Los valores de pérdida de plásmido demuestran que este vector no se pierde en *C. glabrata* (el 96% de las células conservan el plásmido). Teniendo en cuenta estos resultados se decidió utilizar para los estudios subsecuentes las construcciones obtenidas bajo la regulación de este promotor.

Para la generación de las fusiones traduccionales se tomó como vectores base los generados en este trabajo tanto para las construcciones en el extremo amino como carboxilo terminal (Tabla 1). Todos los vectores base se han secuenciado y la secuencia de los mismos son correctas. Hemos obtenido varias fusiones traduccionales con los genes de interés. Las fusiones de estos genes en el amino terminal fueron secuenciadas y son correctas.

En trabajos anteriores en el laboratorio, se han estudiado la sobreexpresión de los genes *alfa1*, *alfa2*, *alfa3* y *alfa4* fusionados a diferentes fluoróforos y epítomos en el

extremo carboxilo terminal sin utilizar un linker para separar el gen del fluoróforo. La señal de fluorescencia en las cepas sobreexpresantes se observa en toda la célula (Tesis de Doctorado Patricia Yañez). Teniendo en cuenta estos resultados resultaba interesante estudiar estos genes mediante el etiquetado en el extremo amino terminal y determinar de esta manera si observábamos un mismo comportamiento que las cepas ensayadas previamente.

Además, se ha reportado que en *S. cerevisiae*, la sobreexpresión del gen alfa2 es tóxica, y en nuestro laboratorio no hemos tenido éxito en construir una cepa que sobreexpresara el gen alfa2 silvestre en *C. glabrata*. Sin embargo, como se menciona arriba, se logró obtener cepas que sobreexpresan a partir de un plásmido fusiones de alfa2, alfa3 y alfa4 con diferentes fluoróforos en el carboxilo terminal sin linker. Una posible explicación es que la fusión en el extremo C-terminal sin el linker (donde se encuentra el HD), podría interferir con la función de interacción con el DNA de los genes alfa2 y por esta razón se pueden sobreexpresar estas fusiones.

En *C. glabrata* pudimos visualizar por microscopía de fluorescencia solamente las fusiones traduccionales de los genes alfa etiquetados en amino terminal con mCherry (alfa2 y alfa3), pero no las fusiones en el C-terminal con el linker (Figura 7). Para ambos genes se observa localización celular en puntos específicos, a diferencia de lo observado previamente, mediante la sobreexpresión de estos genes etiquetados en el C-terminal (sin linker) y bajo un promotor fuerte, donde se observó una señal de fluorescencia difusa en toda la célula. En este sentido es necesario realizar tinciones preferenciales para determinar en qué compartimento celular se encuentran dichos genes. El hecho de no haber visualizado las fusiones traduccionales con este epítipo en el carboxilo terminal podría indicar que esta fusión con el linker es menos estable. Para investigar estas posibilidades, realizaremos un RT-PCR para detectar el transcrito y un Western Blot con las proteínas etiquetadas con c-Myc y FLAG para detectar la proteína.

Una estrategia para determinar la función de un gen, es evaluar el fenotipo de las cepas que carecen de él o bien que lo sobreexpresan, en determinadas condiciones de crecimiento. En este caso puesto que nuestro objetivo es conocer la función de

estos genes en *C. glabrata*, utilizamos una cepa que contiene mutaciones nulas en los tres loci de apareamiento, es decir nuestra cepa triple mutante (*mtl1,2,3*) Δ (Ramírez-Zavaleta et al., 2010) y evaluamos el efecto que tiene la sobreexpresión de los genes alfa. Utilizamos 30°C, como la temperatura de crecimiento ya que es la condición que se utiliza *in vitro* para el crecimiento de levadura. En términos generales, no vimos ninguna diferencia significativa en el tiempo de duplicación de ninguna de nuestras cepas con respecto a las cepas controles que no sobreexpresan los genes silvestres en estas condiciones.

5. Conclusiones

- 5.1. Hemos construido los vectores base replicativos en *C. glabrata* para la generación de fusiones traduccionales, tanto en el extremo amino como en el extremo carboxilo de cualquier proteína de interés, con dos fluoróforos o dos epítomos distintos. Estas fusiones se encuentran bajo la regulación de dos promotores inducibles y además tienen dos marcadores diferentes de selección para poder coexpresar dos proteínas simultáneamente.
- 5.2. Se establecieron las condiciones de inducción de los promotores *MET3* y *MT1*.
- 5.3. Se visualizó por microscopía de fluorescencia las fusiones traduccionales de los genes alfa (alfa2 y alfa3) etiquetados en amino terminal con mCherry.
- 5.4. No se observaron diferencias en el crecimiento y tiempos de duplicación asociados con la inducción de la expresión de los genes en estudio a partir del promotor *MT1*.

6. Literatura citada.

- Bahmani, P., Hosseinkhani, S., 2016. Increase of segmental mobility through insertion of a flexible linker in split point of firefly luciferase. *Int. J. Biol. Macromol.* doi:10.1016/j.ijbiomac.2016.03.055
- Calvin, N.M., Hanawalt, P.C., 1988. High-efficiency transformation of bacterial cells by electroporation. *J. Bacteriol.* 170, 2796–2801.
- Care, R.S., Trevethick, J., Binley, K.M., Sudbery, P.E., 1999. The *MET3* promoter: a new tool for *Candida albicans* molecular genetics. *Mol. Microbiol.* 34, 792–

798. doi:10.1046/j.1365-2958.1999.01641.x
- Carrillo, P.Y., 2015. Expresión y localización intracelular de las proteínas codificadas en los loci de apareamiento de *Candida glabrata*. Tesis Dr.
- Crasto, C.J., Feng, J. a, 2000. LINKER: a program to generate linker sequences for fusion proteins. *Protein Eng.* 13, 309–312. doi:10.1093/protein/13.5.309
- De Las Peñas, A., Pan, S.J., Castaño, I., Alder, J., Cregg, R., Cormack, B.P., 2003. Virulence-related surface glycoproteins in the yeast pathogen *Candida glabrata* are encoded in subtelomeric clusters and subject to RAP1- and SIR-dependent transcriptional silencing. *Genes Dev.* 17, 2245–2258. doi:10.1101/gad.1121003
- Fidel, P.L., Cutright, J.L., Tait, L., Sobel, J.D., 1996. A murine model of *Candida glabrata* vaginitis. *J. Infect. Dis.* 173, 425–431.
- Frederick M. Ausubel, 2003. *Current Protocols in Molecular Biology*.
- Gietz, D., St Jean, A., Woods, R.A., Schiestl, R.H., 1992. Improved method for high efficiency transformation of intact yeast cells. *Nucleic Acids Res.* 20, 1425.
- Goutte, C., Johnson, A.D., 1994. Recognition of a DNA operator by a dimer composed of two different homeodomain proteins. *EMBO J.* 13, 1434–42.
- Grayhack, E.J., 1992. The yeast alpha 1 and MCM1 proteins bind a single strand of their duplex DNA recognition site. *Mol. Cell. Biol.* 12, 3573–82.
- Herskowitz, I., Rine, J., Strathern, J., 1992. 11 Mating-type Determination and Mating-type Interconversion in *Saccharomyces cerevisiae*. Cold Spring Harb. Monogr. Arch. doi:10.1101/087969365.21B.583
- Koller, a., Valesco, J., Subramani, S., 2000. The CUP1 promoter of *Saccharomyces cerevisiae* is inducible by copper in *Pichia pastoris*. *Yeast* 16, 651–656. doi:10.1002/(SICI)1097-0061(200005)16:7<651::AID-YEA580>3.0.CO;2-F
- Li, T., Jin, Y., Vershon, a K., Wolberger, C., 1998. Crystal structure of the MATa1/MATalpha2 homeodomain heterodimer in complex with DNA containing an A-tract. *Nucleic Acids Res.* 26, 5707–5718. doi:10.1093/nar/26.24.5707
- Mascorro-Gallardo, J.O., Covarrubias, A.A., Gaxiola, R., 1996. Construction of a CUP1 promoter-based vector to modulate gene expression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Gene* 172, 169–170. doi:10.1016/0378-1119(96)00059-5
- Olsen, B., Murakami, C.J., Kaeberlein, M., 2010. YODA: software to facilitate high-

- throughput analysis of chronological life span, growth rate, and survival in budding yeast. *BMC Bioinformatics* 11, 141. doi:10.1186/1471-2105-11-141
- Pettersen, E.F., Goddard, T.D., Huang, C.C., Couch, G.S., Greenblatt, D.M., Meng, E.C., Ferrin, T.E., 2004. UCSF Chimera--a visualization system for exploratory research and analysis. *J. Comput. Chem.* 25, 1605–12. doi:10.1002/jcc.20084
- Ramírez-Zavaleta, C.Y., Salas-Delgado, G.E., De Las Peñas, A., Castaño, I., 2010. Subtelomeric silencing of the MTL3 locus of *Candida glabrata* requires yKu70, yKu80, and Rif1 proteins. *Eukaryot. Cell* 9, 1602–11. doi:10.1128/EC.00129-10
- Sherman, F., Hicks, J.B., Fink, G.R., Laboratory, C.S.H., 1986. *Methods in yeast genetics*.
- Srikantha, T., Lachke, S.A., Soll, D.R., 2003. Three mating type-like loci in *Candida glabrata*. *Eukaryot. Cell* 2, 328–40.
- Szewczyk, E., Nayak, T., Oakley, C.E., Edgerton, H., Xiong, Y., Taheri-Talesh, N., Osmani, S. a, Oakley, B.R., 2006. Fusion PCR and gene targeting in *Aspergillus nidulans*. *Nat. Protoc.* 1, 3111–3120. doi:10.1038/nprot.2006.405
- Warringer, J., Blomberg, A., 2003. Automated screening in environmental arrays allows analysis of quantitative phenotypic profiles in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* 20, 53–67. doi:10.1002/yea.931
- Yang, J., Yan, R., Roy, A., Xu, D., Poisson, J., Zhang, Y., 2014. The I-TASSER Suite: protein structure and function prediction. *Nat. Methods* 12, 7–8. doi:10.1038/nmeth.3213
- Yáñez-Carrillo, P., Orta-Zavalza, E., Gutiérrez-Escobedo, G., Patrón-Soberano, A., De Las Peñas, A., Castaño, I., 2015. Expression vectors for C-terminal fusions with fluorescent proteins and epitope tags in *Candida glabrata*. *Fungal Genet. Biol.* 80, 43–52. doi:10.1016/j.fgb.2015.04.020
- Zordan, R.E., Ren, Y., Pan, S.-J., Rotondo, G., De Las Peñas, A., Iluore, J., Cormack, B.P., 2013. Expression plasmids for use in *Candida glabrata*. *G3 (Bethesda)*. 3, 1675–86. doi:10.1534/g3.113.006908

Tabla 1: Vectores base replicativos con promotores inducibles ya obtenidos.

Nombre ^a	Promotor inducible	Fuoróforo/Epítipo	Marcador de selección	Para fusiones en
pVA17	P_{MET3}	YFP- LINKER	NAT ^R	C-terminal
pVA25		c-Myc- LINKER		C-terminal
pVA9		FLAG- LINKER		C-terminal
pVA7		mCherry- LINKER		C-terminal
pVA134/ pVA152	P_{MET3}/P_{MT1}	YFP- LINKER	Ura ⁺	N-terminal
pVA59/ pVA101		c-Myc-LINKER		N-terminal
pVA35/ pVA87		mCherry-LINKER		N-terminal
pVA136/ pVA150	P_{MET3}/P_{MT1}	YFP- LINKER	NAT ^R	N-terminal
pVA57/ pVA94		c-Myc-LINKER		N-terminal
pVA37/ pVA99		mCherry-LINKER		N-terminal

^a Estos vectores se utilizarán para la generación de las fusiones traduccionales en el extremo carboxilo y amino terminal. Todos los vectores se secuenciaron y están correctos.

Tabla 2. Fusiones traduccionales de los genes codificados en los loci *MTL* con fluoróforos y epítomos bajo el promotor inducible del gen *MET3*.

Promotor Inducible	Marcador de selección	Epítomo/fluoróforo	Fusiones carboxi-terminal	Fusiones amino-terminal
P_{MET3}	NAT	YFP	alfa2 ^a alfa3 ^a alfa4 ^a	-
		mCherry	alfa2 ^a alfa3 ^a alfa4 ^a	alfa2 ^a alfa3 ^a alfa4 ^a
		Flag	alfa2 alfa3 alfa4	-
		c-Myc	alfa4	-
	URA ⁺	c-Myc-LINKER	-	alfa2 ^a alfa3 ^a

^a Todos los vectores se secuenciaron y están correctos.

Tabla 3: Media geométrica de la inducción de GFP bajo la actividad del promotor del gen *MT1*.

Tiempo inducción (horas) ^a		0	1	2	4	6	8	24
Concentración de CuSO4	0µM	31	42.32	40.32	46.76	42.67	42.46	43.44
	50 µM	29.27	51.38	66.43	86.88	173.57	224.51	520.33
	100 µM	29.43	54.91	76.06	115.85	228.96	412.19	422.17
	150 µM	29.47	59.72	88.86	150.60	266.51	429.1	513.26
	1mM	29.09	169.22	330.51	465.27	606.15	763.5	868.97
	2 mM	29.48	212.01	447.82	665.08	720.14	797.51	1065.25
	3 mM	29.02	210.83	485.55	743.12	807.25	856.2	1194.08
	4 mM	29.54	203.66	433.69	509.32	444.98	775.58	174.73
	5 mM	28.61	210.26	416.13	464.99	380.30	832.04	98.38
	Control Positivo (P _{TEF1} ::YFP)	445.89	524.99	761.67	846.90	694.45	613.14	276.93

^a Evaluamos las concentraciones de CuSO4 y tiempos de inducción indicados.

Tabla 4: Retención de plásmido calculada a las 0 y 24 horas en medio ON y OFF

Genes Silvestres Sobreexpresados	Cepas	Tiempo 0h^a ON (%)	Tiempo 0h OFF (%)	Tiempo 24h ON (%)	Tiempo 24h OFF (%)
alfa1		100	83	100	94
alfa2		94	95	90	92
alfa3		100	100	100	100
alfa4		97	94	87	100
Vector vacío		100	93	100	71

^a El porcentaje de células que perdieron el plásmido se calculó al tiempo 0 y 24 horas en medio ON y OFF en cepas que expresan los genes silvestres en un fondo genético que contienen mutaciones nulas en los tres loci *MTL* [(*mtl1,2,3*) Δ]. Los valores indican el porcentaje de células que conservan el plásmido.

Figura 1: Esquema de las proteínas del gen $\alpha 1$ y los tres genes alfa.

En la zona azul claro se muestra la longitud idéntica en secuencia entre los tres genes alfa, en la región amarilla la secuencia compartida sólo entre $\alpha 2$ y $\alpha 3$. La zona morada es específica de $\alpha 2$, la zona azul oscuro es específica de $\alpha 3$ y a zona verde es específica de $\alpha 4$. Los 60 aminoácidos que conforman el homeodominio (HD) están indicados en color rosa. El ORF de cada gen tiene una longitud en nucleótidos de 378 nt para $\alpha 1$, 559 nt para $\alpha 2$, 631 nt para $\alpha 3$ y 532 nt para $\alpha 4$.

Figura 2: Predicción estructural de las proteínas $\alpha 1$, $\alpha 2$ y $\alpha 3$ de *C. glabrata*.

Las estructuras predichas son presentadas en la misma orientación acorde a la superposición de estructuras generadas por UCSF- Chimera mediante diagramas de ribbons. Estructura del complejo $\alpha 1$ -DNA y $\alpha 2$ -DNA de *S. cerevisiae* se muestra en morado. Las proteínas ortólogas de *C. glabrata* se muestran en cyan.

Figura 3: Representación esquemática de los vectores base replicativos para construir fusiones traduccionales inducibles con epítopos o fluoróforos al extremo amino o carboxilo de cualquier gen de interés.

La expresión de estas fusiones traduccionales se encuentra bajo la regulación del promotor inducible del gen P_{MET3} ó del gen P_{MT1} .

Figura 4: Representación esquemática de los vectores con los genes silvestres clonados bajo promotor inducible P_{MET3} ó P_{MT1} .

Nótese que este vector no genera fusiones traduccionales. En la figura se señalan los genes en estudio.

Figura 5: Histograma de la actividad del promotor *MET3* a las 2.5 horas posterior a la inducción.

Se realizó un ensayo mediante citometría de flujo con el objetivo de establecer las condiciones de inducción del promotor. La máxima inducción se observó a las 2.5 horas. Se estableció este tiempo para realizar mediciones en ensayos posteriores.

Figura 6: Histograma de la actividad del promotor *MT1* a las 3 horas posterior a la inducción en presencia de 1mM de sulfato de cobre.

Las condiciones de inducción del promotor se determinaron mediante citometría de flujo. La máxima inducción se observó a las 24 horas en presencia de 1mM de sulfato de cobre.

Figura 7: Fluorescencia de alfa2 y alfa3 fusionados a mCherry bajo promotor inducible P_{MT1} .

En la figura se muestra las proteínas alfa2 y alfa3 etiquetadas con mCherry. En el experimento se utilizó el vector sin genes como control de fluorescencia.

Figura 8: Tiempos de duplicación de cepas de *C. glabrata* que sobreexpresan los genes alfa en estudio.

Se calculó los tiempos de duplicación de cepas que expresan los genes alfa (silvestres) en un fondo genético que contienen mutaciones nulas en los tres loci *MTL* [*mtl1,2,3*Δ]. Utilizamos como control del ensayo las mismas cepas crecidas en medio “OFF”.

Figura 1

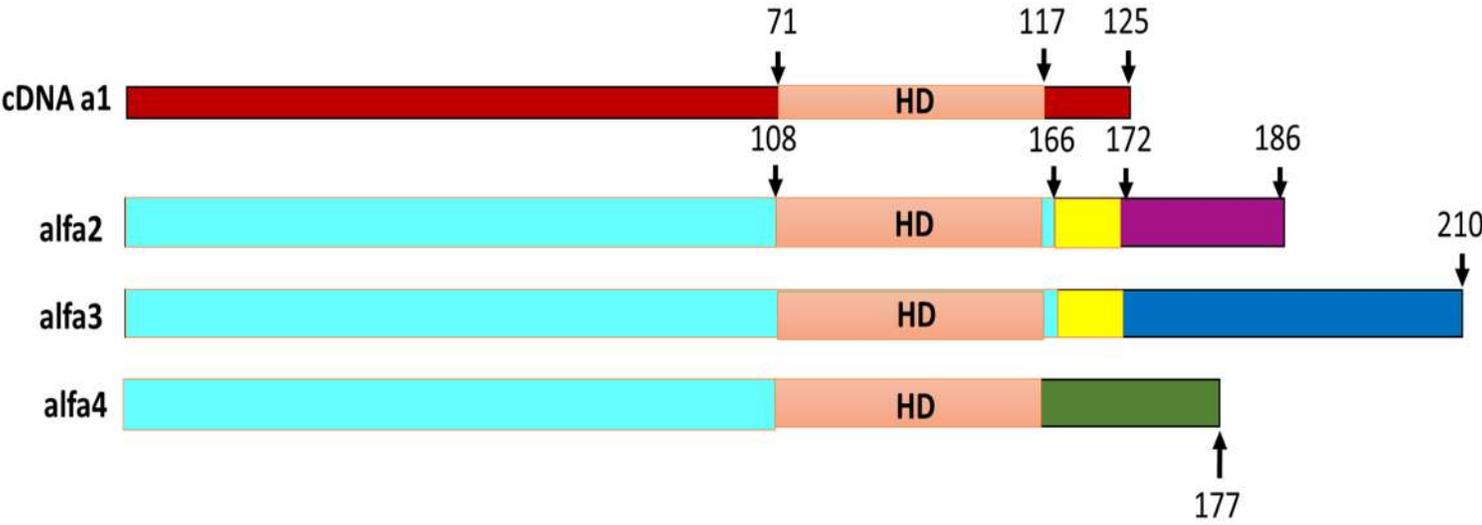


Figura 2

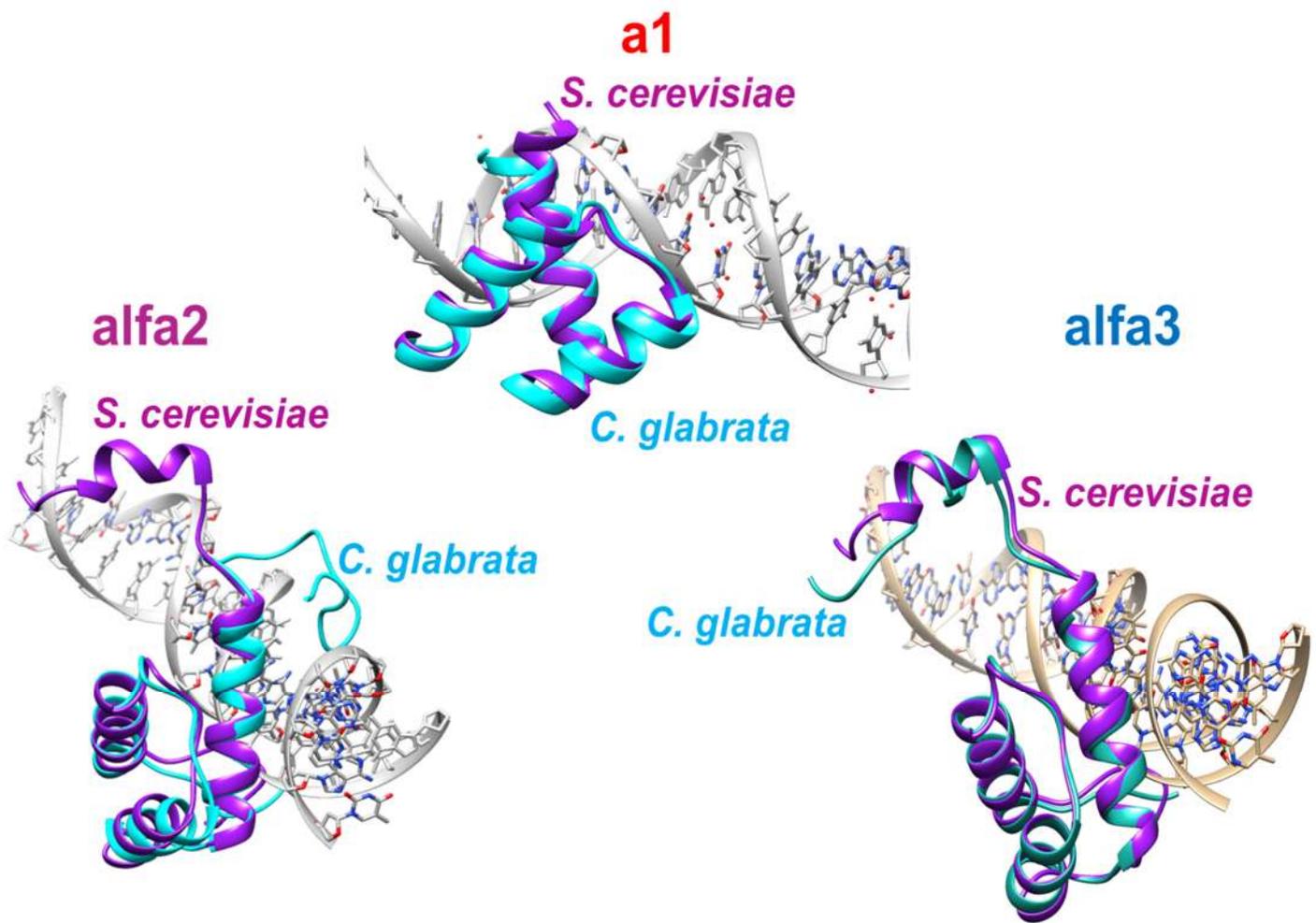
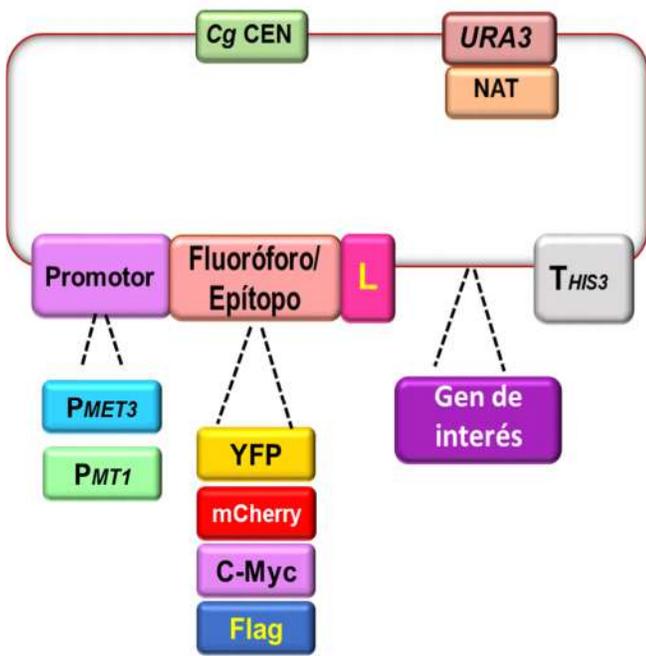


Figura 3

N-terminal fusions



C-terminal fusions

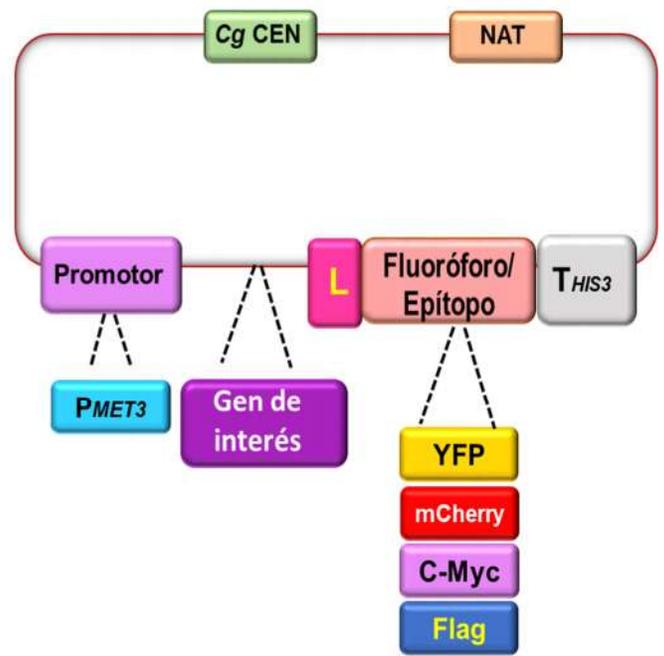


Figura 4

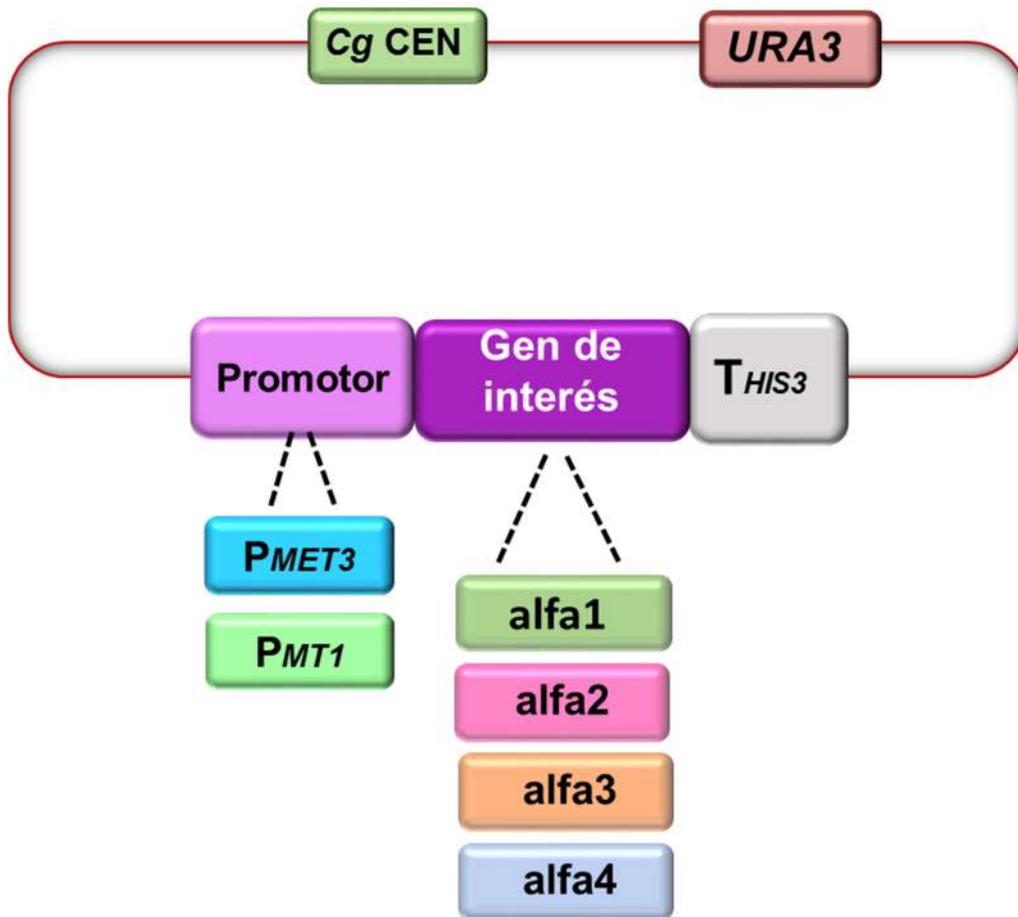


Figura 5

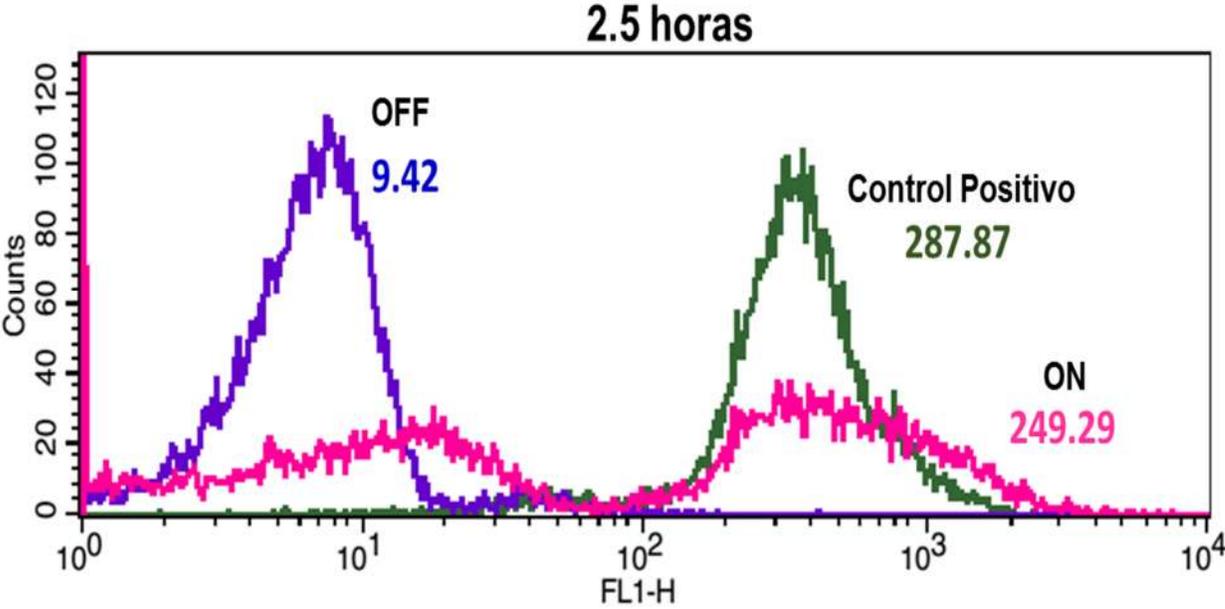


Figura 6.

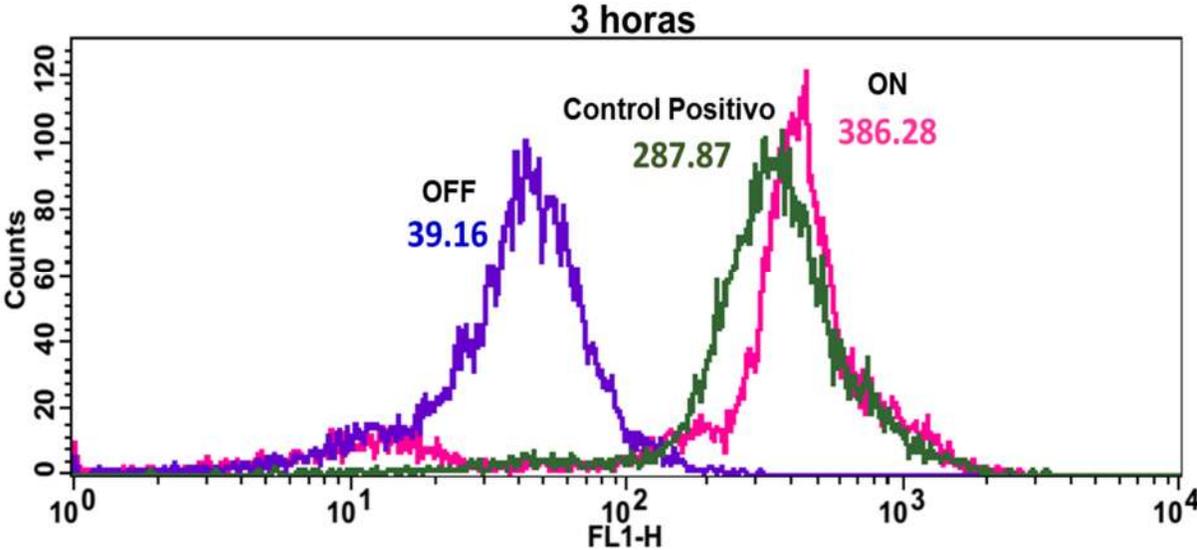
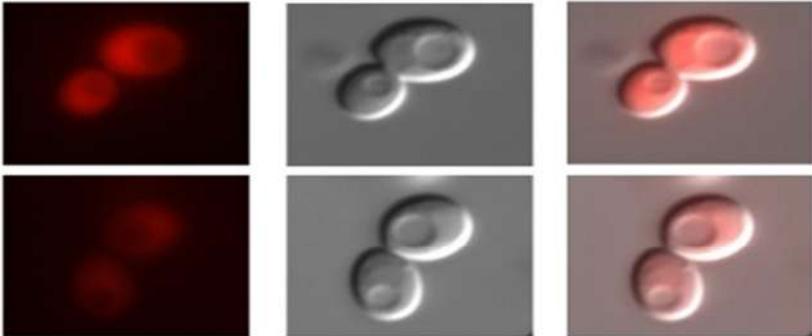
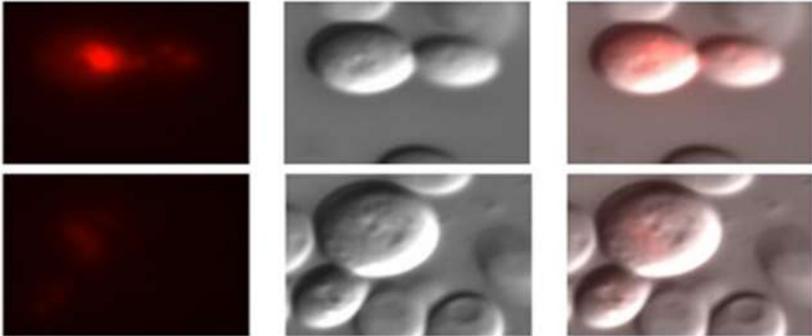


Figura 7

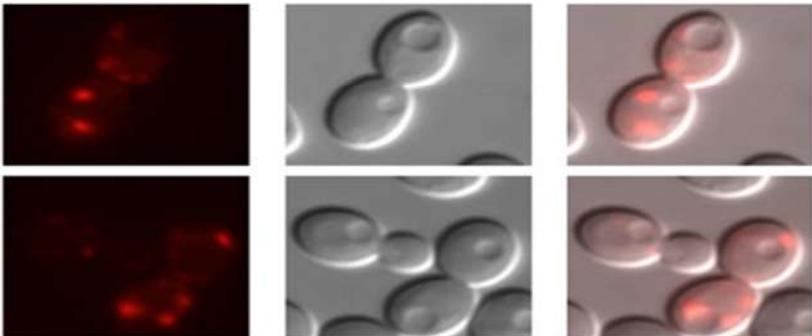
$P_{MT1} :: mCherry \text{ link}$



$P_{MT1} :: mCherry \text{ link} :: \text{alfa2}$



$P_{MT1} :: mCherry \text{ link} :: \text{alfa3}$



mCherry

DIC

MERGE

Figura 8

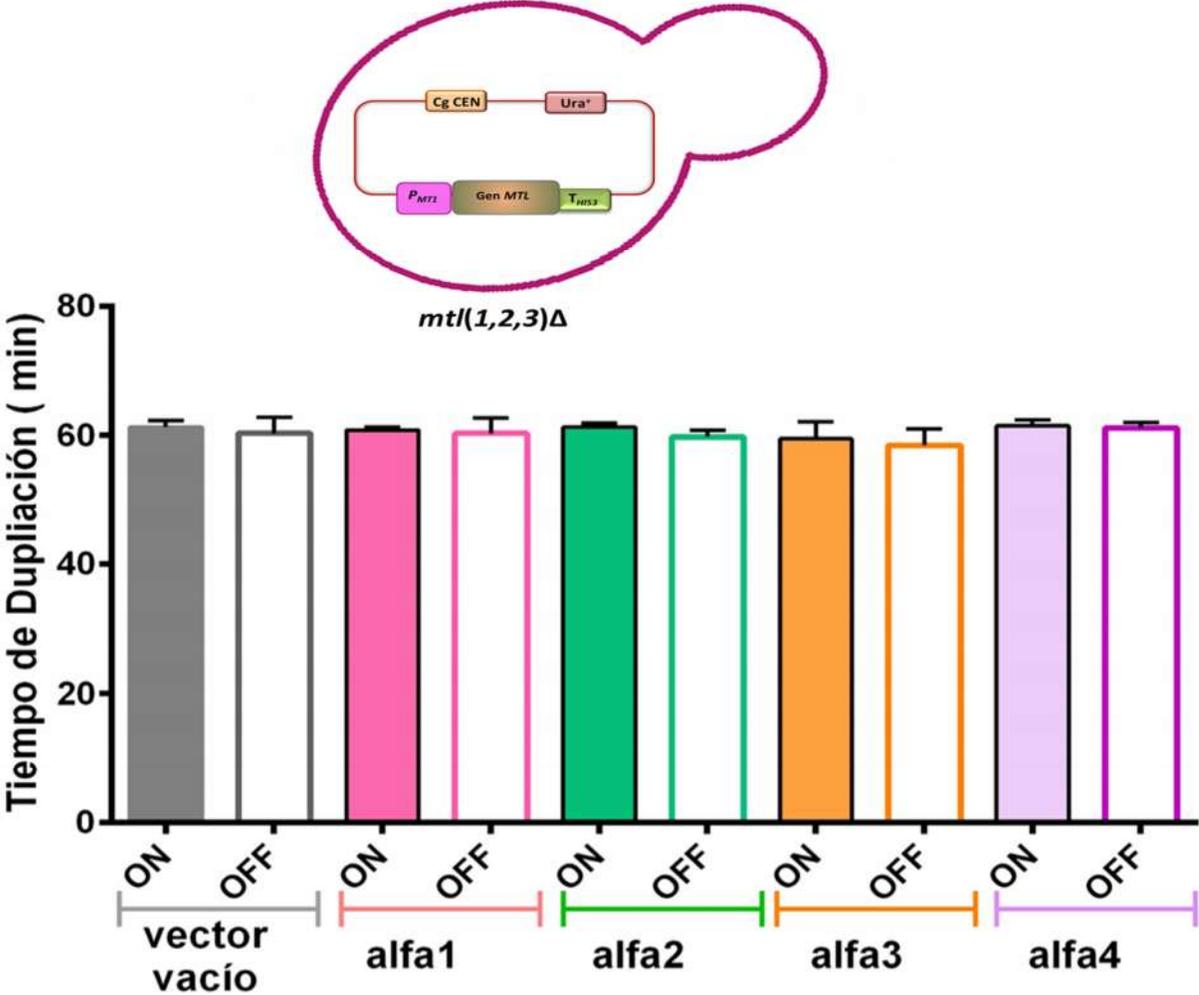


Tabla S 1: Cepas utilizadas de *E. Coli*

Cepa	Nombre	Genotipo	Referencia
1396	DH10	F ⁻ <i>mcrA</i> Δ (<i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i>) ϕ 80 <i>dlacZ</i> Δ <i>M15</i> <i>lacX74 deoR recA1 endA1 araD139</i> Δ (<i>ara,leu</i>)7697 <i>galU galK</i> λ - <i>rpsL nupG</i>	(Calvin and Hanawalt, 1988)

Tabla S 2: Cepas utilizadas de *Candida glabrata*

Cepa	Parental	Genotipo	Resistencia	Referencia
BG2		Aislado clínico	Ura ⁺	(Fidel et al., 1996)
BG14	BG2	<i>ura3</i> Δ ::Tn903 G418 ^R	Ura ⁻	(Cormack and Falkow, 1999)
CGM531	BG14	<i>ura3</i> Δ ::Tn903 G418 ^R , (<i>mtl1</i> , <i>mtl2</i> , <i>mtl3</i>) Δ Hyg ^S (utilizando pMZ18)	Ura ⁻	(Ramirez-Zavaleta et al., 2010)
CGM1578	CGM1	pP _{ScTEF1} ::YFP	Ura ⁺	(Yáñez-Carrillo et al., 2015)
CGM2507	CGM531	(<i>mtl1</i> , <i>mtl2</i> , <i>mtl3</i>) Δ , pGRB2.0 Vector vacío	Ura ⁺	Este trabajo
CGM2634	CGM531	(<i>mtl1</i> , <i>mtl2</i> , <i>mtl3</i>) Δ , pVA11 pCU-MET3::alpha2	Ura ⁺	Este trabajo
CGM2636	CGM531	(<i>mtl1</i> , <i>mtl2</i> , <i>mtl3</i>) Δ , pCU MET3pr vector vacío	Ura ⁺	Este trabajo
CGM2723	CGM531	(<i>mtl1</i> , <i>mtl2</i> , <i>mtl3</i>) Δ , pCN MET3pr vector vacío	NAT ^R	Este trabajo
CGM2725	CGM531	(<i>mtl1</i> , <i>mtl2</i> , <i>mtl3</i>) Δ , pVA39 pVA7::alpha2-Link- mCherry	NAT ^R	Este trabajo
CGM2727	CGM531	(<i>mtl1</i> , <i>mtl2</i> , <i>mtl3</i>) Δ , pVA47 pVA17::alpha4-Link-YFP	NAT ^R	Este trabajo
CGM2729	CGM531	(<i>mtl1</i> , <i>mtl2</i> , <i>mtl3</i>) Δ , pVA56 pVA25::alpha4-Link-cMyc	NAT ^R	Este trabajo
CGM2731	CGM531	(<i>mtl1</i> , <i>mtl2</i> , <i>mtl3</i>) Δ , pVA51 pVA7::alpha4-Link-mCherry	NAT ^R	Este trabajo
CGM2733	CGM531	(<i>mtl1</i> , <i>mtl2</i> , <i>mtl3</i>) Δ , pVA45	NAT ^R	Este trabajo

		pVA9::alpha4-Link-Flag		
CGM2735	CGM531	(<i>mtl1</i> , <i>mtl2</i> , <i>mtl3</i>) Δ , pVA43 pVA7::alpha3-Link-mCherry	NAT ^R	Este trabajo
CGM2737	CGM531	(<i>mtl1</i> , <i>mtl2</i> , <i>mtl3</i>) Δ , pVA53	NAT ^R	Este trabajo
CGM2739	CGM531	(<i>mtl1</i> , <i>mtl2</i> , <i>mtl3</i>) Δ , pVA52 pVA17::alpha3-Link-YFP	NAT ^R	Este trabajo
CGM2741	CGM531	(<i>mtl1</i> , <i>mtl2</i> , <i>mtl3</i>) Δ , pVA41 pVA9::alpha2-Link- Flag	NAT ^R	Este trabajo
CGM2743	CGM531	(<i>mtl1</i> , <i>mtl2</i> , <i>mtl3</i>) Δ , pVA49 pVA17::alpha2-Link-YFP	NAT ^R	Este trabajo
CGM2768	CGM531	(<i>mtl1</i> , <i>mtl2</i> , <i>mtl3</i>) Δ , pVA17 P _{MET3} :: YFP	NAT ^R	Este trabajo
CGM2849	CGM531	(<i>mtl1</i> , <i>mtl2</i> , <i>mtl3</i>) Δ , pVA29 pCU-MET3::alpha3	Ura ⁺	Este trabajo
CGM2851	CGM531	(<i>mtl1</i> , <i>mtl2</i> , <i>mtl3</i>) Δ , pVA74 pCU-MET3::c-Myc- LINKER::alpha2	Ura ⁺	Este trabajo
CGM2853	CGM531	(<i>mtl1</i> , <i>mtl2</i> , <i>mtl3</i>) Δ , pVA80 pGRB2.3:: P _{MT}	Ura ⁺	Este trabajo
CGM2855	CGM531	(<i>mtl1</i> , <i>mtl2</i> , <i>mtl3</i>) Δ , pVA76 pCU-MET3::c-Myc- LINKER::alpha3	Ura ⁺	Este trabajo
CGM2857	CGM531	(<i>mtl1</i> , <i>mtl2</i> , <i>mtl3</i>) Δ , pVA78 pGRB2.3:: P _{MET3}	Ura ⁺	Este trabajo
CGM2947	CGM531	(<i>mtl1</i> , <i>mtl2</i> , <i>mtl3</i>) Δ , pVA92 P _{MT1} ::c-Myc-LINKER::alpha2	Ura ⁺	Este trabajo
CGM2949	CGM531	(<i>mtl1</i> , <i>mtl2</i> , <i>mtl3</i>) Δ , pVA120 P _{MT1} ::cDNA a1	Ura ⁺	Este trabajo
CGM2951	CGM531	(<i>mtl1</i> , <i>mtl2</i> , <i>mtl3</i>) Δ , pVA98 pCU::P _{MT1}	Ura ⁺	Este trabajo
CGM2953	CGM531	(<i>mtl1</i> , <i>mtl2</i> , <i>mtl3</i>) Δ , pVA90 P _{MT1} ::c-Myc-LINKER::alpha3	Ura ⁺	Este trabajo
CGM2955	CGM531	(<i>mtl1</i> , <i>mtl2</i> , <i>mtl3</i>) Δ , pVA85 P _{MT1} ::alpha3	Ura ⁺	Este trabajo
CGM2957	CGM531	(<i>mtl1</i> , <i>mtl2</i> , <i>mtl3</i>) Δ , pVA124 P _{MT1} ::alpha4	Ura ⁺	Este trabajo

CGM2959	CGM531	(<i>mtl1</i> , <i>mtl2</i> , <i>mtl3</i>) Δ , pVA102 P _{MT1} ::alpha2	Ura ⁺	Este trabajo
CGM2961	CGM531	(<i>mtl1</i> , <i>mtl2</i> , <i>mtl3</i>) Δ , pVA96 P _{MT1} ::alpha3	NAT ^R	Este trabajo
CGM2963	CGM531	(<i>mtl1</i> , <i>mtl2</i> , <i>mtl3</i>) Δ , pVA122 P _{MT1} ::alpha4	NAT ^R	Este trabajo
CGM2965	CGM531	(<i>mtl1</i> , <i>mtl2</i> , <i>mtl3</i>) Δ , pVA118 pVA114:: P _{MT1}	NAT ^R	Este trabajo
CGM3008	CGM531	(<i>mtl1</i> , <i>mtl2</i> , <i>mtl3</i>) Δ , pVA140 P _{MT1} ::alpha1	Ura ⁺	Este trabajo
CGM3010	CGM531	(<i>mtl1</i> , <i>mtl2</i> , <i>mtl3</i>) Δ , pVA87 P _{MT1} ::mCherry-LINKER	Ura ⁺	Este trabajo
CGM3018	CGM531	(<i>mtl1</i> , <i>mtl2</i> , <i>mtl3</i>) Δ , pVA146 P _{MT1} ::mCherry- LINKER::cDNA a1	Ura ⁺	Este trabajo
CGM3020	CGM531	(<i>mtl1</i> , <i>mtl2</i> , <i>mtl3</i>) Δ , pVA142 P _{MT1} ::c-Myc-LINKER::cDNA a1	Ura ⁺	Este trabajo
CGM3022	CGM531	(<i>mtl1</i> , <i>mtl2</i> , <i>mtl3</i>) Δ , pVA101 P _{MT1} ::c-Myc-LINKER	Ura ⁺	Este trabajo
CGM3024	CGM531	(<i>mtl1</i> , <i>mtl2</i> , <i>mtl3</i>) Δ , pVA152 P _{MT1} ::YFP-LINKER	Ura ⁺	Este trabajo
CGM3026	CGM531	(<i>mtl1</i> , <i>mtl2</i> , <i>mtl3</i>) Δ , pVA148 P _{MT1} ::mCherry- LINKER::alpha3	NAT ^R	Este trabajo
CGM3028	CGM531	(<i>mtl1</i> , <i>mtl2</i> , <i>mtl3</i>) Δ , pVA89 P _{MT1} ::alpha2	NAT ^R	Este trabajo
CGM3030	CGM531	(<i>mtl1</i> , <i>mtl2</i> , <i>mtl3</i>) Δ , pVA150 P _{MT1} :: YFP-LINKER	NAT ^R	Este trabajo
CGM3032	CGM531	(<i>mtl1</i> , <i>mtl2</i> , <i>mtl3</i>) Δ , pVA106 pCN::P _{MT1}	NAT ^R	Este trabajo
CGM3034	CGM531	(<i>mtl1</i> , <i>mtl2</i> , <i>mtl3</i>) Δ , pVA144 P _{MT1} :: YFP-LINKER	NAT ^R	Este trabajo
CGM3036	CGM531	(<i>mtl1</i> , <i>mtl2</i> , <i>mtl3</i>) Δ , pVA138 P _{MT1} ::alpha1	NAT ^R	Este trabajo

Tabla S 3: Vectores utilizados en este trabajo

Vector	Número de cepa	Genotipo	Referencia
pMB11	1771	Vector de clonación replicativo <i>CgCEN/ARS Cm^R</i>	Colección del laboratorio
pGRB2.0	1391	Vector de clonación replicativo vacío <i>CgCEN/ARS Amp^R, URA3⁺</i>	(De Las Peñas et al., 2003)
pGRB2.3	1391	Vector de clonación replicativo <i>P_{PGK1}::GFP CgCEN/ARS, T_{HIS3} Amp^R, URA3⁺</i>	(De Las Peñas et al., 2003)
pCN-MET3	3450	<i>MET3pr</i> vector vacío Amp ^R , NAT ^R	(Zordan et al., 2013)
pCU-MET3	3446	<i>MET3pr</i> vector vacío Amp ^R , URA3 ⁺	(Zordan et al., 2013)
pVA5	3638	pMB11:: <i>P_{MT1}</i> Cm ^R	Este trabajo
pVA7	3652	Vector Receptor Replicativo mCherry (Carboxilo terminal) pYC156:: <i>P_{MET3}</i> <i>P_{MET3}:: mCherry Amp^R, NAT^R</i>	Este trabajo
pVA9	3654	Vector Receptor Replicativo Flag (Carboxilo terminal) pVA1:: <i>P_{MET3}</i> <i>P_{MET3}:: FFlag Amp^R, NAT^R</i>	Este trabajo
pVA11	3656	pCU-MET3:: <i>alpha2</i> Amp ^R , URA3 ⁺	Este trabajo
pVA17	3668	Vector Receptor Replicativo YFP (Carboxilo terminal) pYC177:: <i>P_{MET3}</i> <i>P_{MET3}:: YFP, Amp^R, NAT^R</i>	Este trabajo
pVA19	3698	pCN-MET3:: <i>alpha2</i> Amp ^R , NAT ^R	Este trabajo
pVA23	3702	pCN-MET3:: <i>alpha3</i> Amp ^R , NAT ^R	Este trabajo
pVA25	3704	Vector Receptor Replicativo c-Myc (Amino terminal) pYC161:: <i>P_{MET3}</i> <i>P_{MET3}:: c-Myc Amp^R, NAT^R</i>	Este trabajo
pVA29	3718	pCU-MET3:: <i>alpha3</i> Amp ^R , URA3 ⁺	Este trabajo

pVA35	3726	c pCU-MET3::mCherry-LINKER Amp ^R , URA3 ⁺	Este trabajo
pVA37	3728	Vector Receptor Replicativo mCherry(Amino terminal) pCN-MET3::mCherry-LINKER Amp ^R , NAT ^R	Este trabajo
pVA39	3730	pVA7::alpha2-Link- mCherry Amp ^R , NAT ^R	Este trabajo
pVA41	3732	pVA9::alpha2-Link- Flag Amp ^R , NAT ^R	Este trabajo
pVA43	3762	pVA7::alpha3-Link-mCherry Amp ^R , NAT ^R	Este trabajo
pVA45	3764	pVA9::alpha4-Link-Flag Amp ^R , NAT ^R	Este trabajo
pVA47	3766	pVA17::alpha4-Link-YFP Amp ^R , NAT ^R	Este trabajo
pVA49	3768	pVA17::alpha2-Link-YFP Amp ^R , NAT ^R	Este trabajo
pVA51	3770	pVA7::alpha4-Link-mCherry Amp ^R , NAT ^R	Este trabajo
pVA52	3771	pVA17::alpha3-Link-YFP Amp ^R , NAT ^R	Este trabajo
pVA53	3772	pVA9::alpha3-Link-Flag Amp ^R , NAT ^R	Este trabajo
pVA56	3775	pVA25::alpha4-Link-cMyc Amp ^R , NAT ^R	Este trabajo
pVA57	3776	Vector Receptor Replicativo c-Myc (Amino terminal) pCN-MET3::c-Myc-LINKER Amp ^R , NAT ^R	Este trabajo
pVA59	3778	Vector Receptor Replicativo c-Myc (Amino terminal) pCU-MET3::c-Myc-LINKER Amp ^R , URA3 ⁺	Este trabajo
pVA74	3980	pCU-MET3::c-Myc-LINKER::alpha2 Amp ^R , URA3 ⁺	Este trabajo
pVA76	3982	pCU-MET3::c-Myc-LINKER::alpha3 Amp ^R , URA3 ⁺	Este trabajo
pVA78	3988	pGRB2.3:: P _{MET3} Amp ^R , URA3 ⁺	Este trabajo
pVA80	3990	pGRB2.3:: P _{MT1} Amp ^R , URA3 ⁺	Este trabajo
pVA82	3995	pMB11::cDNA a1 Cm ^R	Este trabajo
pVA84	4020	pCN-MET3::mCherry-LINKER::alpha4 Amp ^R , NAT ^R	Este trabajo
pVA85	4021	pVA29::P _{MT1} P _{MT1} ::alpha3 Amp ^R , URA3 ⁺	Este trabajo
pVA87	4023	Vector Receptor Replicativo mCherry(Amino terminal)	Este trabajo

		pVA35::P _{MT1} P _{MT1} ::mCherry-LINKER Amp ^R , URA3 ⁺	
pVA89	4025	pVA19::P _{MT1} P _{MT1} ::alpha2 Amp ^R , NAT ^R	Este trabajo
pVA90	4028	pVA76::P _{MT1} P _{MT1} ::c-Myc-LINKER::alpha3 Amp ^R , URA3 ⁺	Este trabajo
pVA92	4030	pVA74::P _{MT1} P _{MT1} ::c-Myc-LINKER::alpha2 Amp ^R , URA3 ⁺	Este trabajo
pVA94	4032	Vector Receptor Replicativo c-Myc (Amino terminal) pVA57::P _{MT1} P _{MT1} ::c-Myc-LINKER Amp ^R , NAT ^R	Este trabajo
pVA96	4034	pVA23::P _{MT1} P _{MT1} ::alpha3 Amp ^R , NAT ^R	Este trabajo
pVA98	4036	P _{MT1} vector vacío Amp ^R , URA3 ⁺ pCU::P _{MT1}	Este trabajo
pVA99	4037	Vector Receptor Replicativo mCherry(Amino terminal) pVA37::P _{MT1} P _{MT1} ::mCherry-LINKER Amp ^R , NAT ^R	Este trabajo
pVA101	4039	Vector Receptor Replicativo c-Myc (Amino terminal) pVA59::P _{MT1} P _{MT1} ::c-Myc-LINKER Amp ^R , URA3 ⁺	Este trabajo
pVA102	4040	pVA11::P _{MT1} P _{MT1} ::alpha2 Amp ^R , URA3 ⁺	Este trabajo
pVA106	4059	P _{MT1} vector vacío Amp ^R , NAT ^R pCN::P _{MT1}	Este trabajo
pVA108	4073	Vector Receptor Replicativo FLAG (Amino terminal) pCN-MET3:: FLAG-LINKER Amp ^R , NAT ^R	Este trabajo
pVA110	4075	pCN-MET3::alpha4 Amp ^R , NAT ^R	Este trabajo
pVA112	4077	pCU-MET3::alpha4 Amp ^R , URA3 ⁺	Este trabajo
pVA114	4079	pCN-MET3::cDNA a1 Amp ^R , NAT ^R	Este trabajo
pVA116	4081	pCU-MET3::cDNA a1 Amp ^R , URA3 ⁺	Este trabajo

pVA118	4087	pVA114:: P _{MT1} P _{MT1} ::cDNA a1 Amp ^R , NAT ^R	Este trabajo
pVA120	4089	pVA116:: P _{MT1} P _{MT1} ::cDNA a1 Amp ^R , URA3 ⁺	Este trabajo
pVA122	4091	pVA110:: P _{MT1} P _{MT1} ::alpha4 Amp ^R , NAT ^R	Este trabajo
pVA124	4093	pVA112:: P _{MT1} P _{MT1} ::alpha4 Amp ^R , URA3 ⁺	Este trabajo
pVA126	4101	pVA37::alpha3 pCN-MET3::mCherry-LINKER::alpha3 Amp ^R , NAT ^R	Este trabajo
pVA128	4103	pVA37::alpha2 pCN-MET3::mCherry-LINKER::alpha2 Amp ^R , NAT ^R	Este trabajo
pVA130	4105	pVA59::cDNA a1 pCU-MET3::c-Myc-LINKER::cDNA a1 Amp ^R , URA3 ⁺	Este trabajo
pVA132	4107	pVA35::cDNA a1 pCU-MET3::mCherry-LINKER::cDNA a1 Amp ^R , URA3 ⁺	Este trabajo
pVA134	4109	Vector Receptor Replicativo YFP(Amino terminal) pCU-MET3::YFP-LINKER Amp ^R , URA3 ⁺	Este trabajo
pVA136	4111	Vector Receptor Replicativo YFP(Amino terminal) pCN-MET3:: YFP-LINKER Amp ^R , NAT ^R	Este trabajo
pVA138	4113	pVA106::alpha1 P _{MT1} ::alpha1 Amp ^R , NAT ^R	Este trabajo
pVA140	4123	pVA98::alpha1 P _{MT1} ::alpha1 Amp ^R , URA3 ⁺	Este trabajo
pVA142	4127	pVA130:: P _{MT1} P _{MT1} ::c-Myc-LINKER::cDNA a1 Amp ^R , URA3 ⁺	Este trabajo
pVA144	4129	pVA136:: P _{MT1} P _{MT1} :: YFP-LINKER Amp ^R , NAT ^R	Este trabajo
pVA146	4131	pVA132:: P _{MT1}	Este trabajo

		$P_{MT1}::mCherry-LINKER::cDNA\ a1\ Amp^R,$ $URA3^+$	
pVA148	4133	pVA126:: P_{MT1} $P_{MT1}::mCherry-LINKER::\alpha3\ Amp^R,$ NAT^R	Este trabajo
pVA150	4135	pVA136:: P_{MT1} $P_{MT1}::YFP-LINKER\ Amp^R, NAT^R$	Este trabajo
pVA152	4137	pVA134:: P_{MT1} $P_{MT1}::YFP-LINKER\ Amp^R, URA3^+$	Este trabajo

Tabla S 4: Oligonucleótidos utilizados en este trabajo

Primer	Nombre	Secuencia (5'-3')	Sitio(s) agregados
2080	MT1@-1 XbaI 1 Rv	atatctagaTGTGTTTGTTCCTTGTATGTG	XbaI
2081	MT1@-941 SacI Fw	tatgagctcCCGGAGCACCTGGC	SacI
1819	MET@-1 EcoRV Rv	AAAGATATCTTGTTAGGTGTTTCTTTCTG GAGTGTTA	EcoRV
1818	MET@-1070 XhoI Fw	TGACTCGAGATACCAGTTACAATTAGTAT TACAATGGTTTAC	XhoI
Fluoróforos y Epítomos.			
2082	mCherry@1aaaSpeI Fw	ataACTAGTaaaATGGTGAGCAAGGGCG	SpeI
2083	mCherry-LINK@709 NO STOP EcoRI Rv	atagaattccgcacctgccccgcacctgctccagcgccC TTGTACAGCTCGTCCATGC	EcoRI
2088	c-Myc@1aaaatgSpeI Fw	AtaACTAGTaaaatgGGGTTAATTAACGGTG AACAAAAG	SpeI
2089	c-Myc-LinK@540 no stop EcoRI Rv	atagaattccgcacctgccccgcacctgctccagcgccG TGATTGATTAATTTTTGTTCCACC	EcoRI
2215	YFP@1 SpeI Fw	AtaACTAGTaaaATGAGTAAAGGAGAAGAA CTTTTCAC	SpeI
2092	YFP LINK@723 NO STOP EcoRI Rv	atagaattccgcacctgccccgcacctgctccagcgccT TTGTATAGTTCATCCATGCC	EcoRI
2213	Oligo Flag-link SpeI R1 Fw	CTAGTaaaatgGGAGCAGACTACAAAGATG ACGATGACAAaGgaGCCGATTATAAGGAC GATGACGATAAAGGGGCTGACTACAAAG ATGACGATGACAAGggcgctggagcaggtgcg gggcaggtgcgG	SpeI

2214	Oligo Flag-link SpeI R1 Rv	AATTCgcgacactgccccgcacactgctccagcgccCT TGTCATCGTCATCTTTGTAGTCAGCCCCT TTATCGTCATCGTCCTTATAATCGGCtCtT TGTCATCGTCATCTTTGTAGTCTGCTCCc atTTA	SpeI
Genes para las construcciones en el amino terminal			
2095	Cg a1@1 aaa EcoRI Fw	atagaattcaaaATGATGACAGTAGACCCAAT ACAAG	EcoRI
2096	Cg a1@393 Sall Rv	atggtcgacCAATCGTGACTAG	Sall
2098	Cg Alpha2@1aaa EcoRI Fw	atagaattcaaaATGTCAAAGAAATCAAGAATT AGTATTAC	EcoRI
2099	Cg Alpha2@561 Sall Rv	atagtcgacTCAAGTGTGAGGCTGTTTTGA G	Sall
2100	Cg Alpha 3@633 Sall Rv	atagtcgacTTATGTAAGACAACACTCAAAGAAA AGACC	Sall
2101	Cg alpha4@534 Sall Rv	atagtcgacTCAAATGAACAGTGTATGCCC TTTTC	Sall
2102	Cg Alpha 1@1aaa BamHI Fw	ataggatccaaaATGTTAACTGAAACACTGAC TATGAAG	BamHI
2103	Cg Alpha 1@1 aaa EcoRI Fw	atagaattcaaaATGTTAACTGAAACACTGACT ATGAAG	EcoRI
2104	Cg Alpha1@576 Sall Rv	atagtcgacTCATGGCGCTGAGGACGC	Sall
Genes para las construcciones en el carboxilo terminal			
2105	Cg alpha1-LINK@573 no STOP RI Rev	atagaattctcgacactgccccgcacactgctccagcgccT GGCGCTGAGGACGC	EcoRI
2106	Cg alpha1@1aaaRV Fw	ataGATATCaaaATGTTAACTGAAACACTGA CTATGAAG	EcoRV
2107	Cg alpha1- LINK@573noSTOP Avr2 Rev	ataCCTAGGGCcgacactgccccgcacactgctccag cgccTGGCGCTGAGGACGC	AvrII
2108	Cg alpha2@1aaa SnaB Fw	gtttacgtaaaaATGTCAAAGAAATCAAGAATTA GTATTAC	SnaB
2109	Cgalpha2LINK@538 noSTOP RI Rev	ctagaattcCgcacactgccccgcacactgctccagcgcc AGTGTCGAGGCTGTTTTGAG	EcoRI
2110	Cgalpha2LINK@538 NO STOP Avr2 Rev	ATAcctaggCGcgcacactgccccgcacactgctccagc gccAGTGTCGAGGCTGTTTTGAG	AvrII

2111	Cg Alpha3LINK@668 NoSTOP RI Rev	TATgaattcCcgcacctgccccgcacctgctccagcgc cTGTAAGACAACTCAAAGAAAAGACC	EcoRI
2112	CgAlpha3 LINK@668 NO STOP Avr2 Rev	TATcctaggCGcgcacctgccccgcacctgctccagc gccTGTAAGACAACTCAAAGAAAAGACC	AvrII
2213	Cg alpha4LINK@538 NO STOP RI Rev	TATgaattcCcgcacctgccccgcacctgctccagcgc cAAATGAACAGTGTATGCCCTTTTC	EcoRI
2214	Cg Alpha4LINK@538 NO STOP Avr2 Rev	cctaggGCcgcacctgccccgcacctgctccagcgcA AATGAACAGTGTATGCCCTTTTC	AvrII
2215	Cg a1@1aaa R5 Fw	agaGATATCaaaATGATGACAGTAGACCCA ATACAAG	EcoRV
2116	Cg a1-LINK@390 no STOP RI Rv	ATAgaattcCcgcacctgccccgcacctgctccagcgc cCTAAACAATCGTGAC	EcoRI
2117	Cg a1Link@390 NO STOP Avr2 Rev	TATcctaggGCcgcacctgccccgcacctgctccagc gccCTAAACAATCGTGAC	AvrII
2118	Cg alpha1@1aaaBamHI Fw	ataGGATCCaaaATGTAACTGAAACACTG ACTATGAAG	BamHI
2119	Cg alpha2@1aaaBamHI Fw	gttGGATCCaaaATGTCAAAGAAATCAAGAA TTAGTATTAC	BamHI
2120	Cg a1@1aaa BamHI Fw	agaGGATCCaaaATGATGACAGTAGACCC AATACAAG	BamHI
Wild type gene			
597	alpha1@1aaaXba Rv	GAGTCTAGAAAATGTTAACTGAAACACTG ACTATGAAGTATACTGC	EcoRV
773	EMG@135MTL1 Xho Bsg Fw	CGGCTCGAGTTGTGCAGCTGCTGAACTG TGACGACCATC	BSg
334	alfa2@nt1aaaR1 Fw	GGAATTCAAATGTCAAAGAAATCAAGA ATTAGTATTACG	EcoRI
891	Bud5@-37 Xho-Bsg Rv	CGGCTCGAGTTGTGCAGGTCTTTCCTGT GATTATGATGTAAGTTG	Bsg
899	MTL3@+649 Xho Rv	GCGCTCGAGGTAAGTTTCCTCAATCACTA GCTATTC	EcoRV
777	emgMTL2@-144 Xho Bsg Rv	GCGCTCGAGTTGTGCAGCTGATATGATT TGGATATTGAAG	Bsg