



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

POSGRADO EN CIENCIAS EN BIOLOGIA MOLECULAR

***Candida glabrata* contiene una variante más larga
del gen de apareamiento *Cgalfa2* en el locus *MTL3*,
el cual puede formar homodímeros**

Tesis que presenta

M.C. Karina Asyade Robledo Márquez

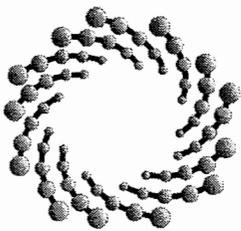
Para obtener el grado de

Doctor en Ciencias en Biología Molecular

Director de la Tesis:

Irene Beatriz Castaño Navarro

San Luis Potosí, S.L.P., a 28 de octubre de 2016



IPICYT

Constancia de aprobación de la tesis

La tesis "*Candida glabrata* contiene una variante más larga del gen de apareamiento *Cgalfa2* en el locus *MTL3*, el cual puede formar homodímeros" presentada para obtener el Grado de Doctora en Ciencias en Biología Molecular fue elaborada por **Karina Asyade Robledo Márquez** y aprobada el **veintiocho de octubre 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
Directora de la tesis

Dra. Lina Raquel Riego Ruiz
Miembro del Comité Tutorial

Dr. Gerardo Rafael Argüello Astorga
Miembro del Comité Tutorial

Dr. Jorge Luis Folch Mallol
Miembro del Comité Tutorial

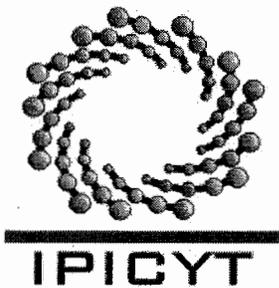


Créditos Institucionales

Esta tesis fue elaborada en el Laboratorio de Microbiología Molecular de Hongos de la División de Biología Molecular del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C., bajo la dirección de la Dra. Irene B. Castaño Navarro.

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 del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (**250299**) y del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A. C.



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

Acta de Examen de Grado

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

En la ciudad de San Luis Potosí a los 28 días del mes de octubre del año 2016, se reunió a las 12:30 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
Dr. Jorge Luis Folch Mallol	Sinodal externo	UAEM

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

DOCTORA EN CIENCIAS EN BIOLOGÍA MOLECULAR

sustentó la C.

Karina Asyade Robledo Márquez

sobre la Tesis intitulada:

Candida glabrata contiene una variante más larga del gen de apareamiento Cgalfa2 en el locus MTL3, el cual puede formar homodímeros

que se desarrolló bajo la dirección de

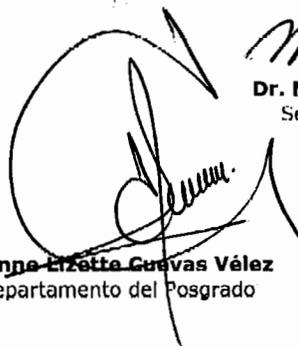
Dra. Irene Beatriz Castaño Navarro

El Jurado, después de deliberar, determinó

APROBARLA

Dándose por terminado el acto a las 14:05 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 28 días del mes de octubre de 2016.



Mtra. Ivonne Lizette Cuevas Vélez
Jefa del Departamento del Posgrado



Dr. Marcial Bonilla Marín
Secretario Académico



Dedicatorias

Este logro lo quiero dedicar a aquellas personas que creyeron en mí, que siempre me apoyaron para seguir adelante y me dieron la fuerza para cada día dar lo mejor de mí.

A mi marido, Raúl Cuz por tu apoyo incondicional, te amo.

A mis padres, Ma. Del Refugio y Abel por enseñarme a ser tenaz y perseverante.

A mis hermanas, Bere y Geral gracias por creer en mí y darme esos cuatro hermosos regalos que son mi fuerza para darles un buen ejemplo; Mis sobrinos quienes amo: Noe,

Diego, André y Emmanuel.

A mi hermano Victor, eres una de las personas que más admiro y siempre me recuerdas que las cosas siempre pueden hacerse mejor.

A mi tío Chato que siempre me ha brindado su apoyo.

Receta para el éxito: estudie mientras otros duermen; trabaje mientras otros holgazanean; prepárese mientras otros juegan; y sueñe mientras otros simplemente desean. William A. Ward

Agradecimientos

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

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT).

Al LANBAMA por el apoyo técnico para realizar este trabajo.

A la Dra. Irene Castaño Navarro por el apoyo y la oportunidad que me dio para llevar a cabo este proyecto. Por su dirección, paciencia y dedicación para transmitir su conocimiento. Gracias por su calidez humana y por la confianza. Siempre serás un ejemplo como investigadora.

Al Dr. Alejandro de las Peñas por la asesoría y su constante reto para que día a día mejorará.

A la Dra. Lina Riego por estar presente durante todo este tiempo, gracias por el apoyo y asesoría. Gracias por los comentarios y la paciencia que me ayudo para crecer durante este periodo. Eres un ejemplo para mi carrera

Al Dr. Argüello y el Dr. Folch por los comentarios y continuos retos que me ayudaron a no conformarme y mejorar día a día.

A mis compañeros del laboratorio de Microbiología Molecular. Además quiero agradecer a nuestro técnico la Dra. Ma. Guadalupe Gutiérrez Escobedo, gracias por todo el apoyo y el conocimiento.

Quiero agradecer a las personas que durante este tiempo marcaron mi camino, gracias por su amistad y apoyo. Grecia, Yamile, Oscar, Lupita, Alex J, Paco, Noemí, Javo, Nicolas, Angélica, Ángel J y Edith U.

A Gloria López por el apoyo siempre otorgado en el laboratorio 6.

Contenido

Constancia de aprobación de la tesis.....	ii
Créditos Institucionales.....	iii
Acta de Examen.....	iv
Dedicatorias.....	v
Agradecimientos.....	vi
Lista de Tablas.....	viii
Lista de Figuras.	ix
Anexos.....	xi
Tablas de Anexos.....	xii
Resumen.....	xiii
Abstract.....	xiv
I. Introducción.....	1
I.1 Antecedentes Directos.....	4
1.2 Planteamiento del Problema.....	5
1.3 Hipótesis.....	5
1.4 Objetivos.....	6
II. Materiales y Métodos.....	7
III. Resultados.....	29
IV. Discusión.....	44
V. Resultados y Discusión Adicionales.....	48
VI. Referencias.....	57
VII. Anexos.....	60
VIII. Tablas de Anexos.....	65
IX. Trabajos en los que participé.....	103

Lista de Tablas

Tabla 1. Cepas generadas en el presente estudio.....	7
Tabla 2. Plásmidos utilizados para realizar el estudio.....	10
Tabla 3. Oligonucleótidos empleados.....	15
Tabla 4. Condiciones de estrés evaluadas en tratamiento crónico mediante ensayo por dilución en gota.....	34

Lista de Figuras

Figura 1. <i>Candida glabrata</i> contiene una variante más larga del gen alfa2 en el locus <i>CgMLT3</i>	30
Figura 2. Estructura del locus <i>CgMTL1</i> de las cepas que expresan de manera simultánea los genes a1 y alfa2 o a1 y alfa3.....	32
Figura 3. Las cepas que expresan ambos tipos de información de manera simultánea (a1 -alfa2 o a1 -alfa3) no presentan diferencias en su fenotipo cuando se someten a diferentes condiciones de estrés comparadas con la cepa parental.....	35
Figura 4. Cepas que expresan simultáneamente <i>Cga1-Cgalfa2</i> o <i>Cga1-Cgalfa3</i> no muestran diferencia en su fenotipo bajo diferentes condiciones de estrés o capacidad de colonización en comparación con la cepa parental.....	36
Figura 5. Las cepas de <i>C. glabrata</i> que expresan simultáneamente <i>Cga1-Cgalfa2</i> o <i>Cga1-Cgalfa3</i> asimilan diferentes fuentes de carbono igual que la cepa parental BG14.....	38
Figura 6. <i>Cga1</i> y <i>Cgalfa2</i> interactúan directamente formando un heterodímero. La interacción entre las proteínas codificadas en <i>CgMTL</i> fueron evaluadas mediante el ensayo de Complementación Bimolecular por Fluorescencia (BiFC).....	41
Figura 7. Ensayo de competencia de colonización en un modelo murino de infección sistémica. Se infectaron grupos de 6 ratones con 4×10^7 células de las cepas indicadas por la vena caudal.....	49
Figura 8. Actividad del promotor de la catalasa en diferentes fondos genéticos en cepas de <i>C. glabrata</i>	48
Figura 9. Diagramas de Venn de genes inducidos y reprimidos en fase logarítmica de cepas de <i>C. glabrata</i> con diferente información de apareamiento.....	53

Figura 10. Genes inducidos o reprimidos e cepas de <i>C. glabrata</i> con diferente información de apareamiento en fase estacionaria.....	55
Figura 11. Heatmap que compara los genes que se encuentran inducidos o reprimidos en la cepa con información tipo a contra las cepas que contienen otro tipo de información de apareamiento.....	56

Anexos

Anexo 1. Alineamiento de <i>Cgalfa2</i> y <i>Cgalfa3</i>	60
Anexo 2. Condiciones nutricionales evaluadas en las cepas que expresan simultáneamente <i>Cga1-Cgafla2</i> o <i>Cga1-Cgalfa3</i>	61
Anexo 3. Células de fase logarítmica de cepas de <i>C. glabrata</i> que expresan de manera simultánea <i>Cga1-Cgalfa2</i> o <i>Cga1-Cgalfa3</i> son susceptibles de igual manera a menadiona que la cepa parental BG14.....	62
Anexo 4. Representación esquemática de la Complementación Bimolecular por Fluorescencia (BiFC) utilizada para determinar la interacción proteína-proteína entre <i>Cga1</i> , <i>Cgalfa2</i> y <i>Cgalfa3</i> , o interacciones para formar homodímeros entre ellas mismas.....	63
Anexo 5. Interacción física entre las proteínas <i>Cgalfa2</i> , <i>Cgalfa3</i> y <i>Cga1</i> mediante Co-inmunoprecipitación.....	64

Tablas de Anexos

Tabla A1. Cepas generadas en el trabajo.....	65
Tabla A2. Plásmidos generados en este trabajo.....	71
Tabla A3. Oligonucleótidos utilizados en este trabajo.....	85
Tabla A4. Genes inducidos en la cepa de <i>C. glabrata</i> que expresa información a (gen a1) en fase logarítmica.....	90
Tabla A5. Genes inducidos en fase logarítmica de las cepas wt, alfaR, a1-alfa2 y a1-alfa3	98
Tabla A6. Genes reprimidos en fase logarítmica que se comparten entre las cepas con diferente información de apareamiento (wt, aR, alfaR, a1-alfa2 y a1-alfa3).....	99
Tabla A7. Genes reprimidos en fase logarítmica únicos de la cepa que expresa el gen a1 solamente (aR).....	100
Tabla A8. Genes reprimidos en fase logarítmica de las cepas wt y alfaR...	101
Tabla A9. Genes inducidos en fase estacionaria únicos de las cepas alfaR y a1-alfa3	102
Tabla A10. Genes reprimidos en fase estacionaria de las cepas que expresan a1-alfa3 y la cepa parental (wt).....	102

Resumen

***Candida glabrata* contiene una variante más larga del gen de apareamiento Cgalfa2 en el locus MTL3, el cual puede formar homodímeros**

El hongo patógeno *Candida glabrata* es un organismo haploide y asexual. *C. glabrata* contiene genes ortólogos que controlan el apareamiento y la identidad del tipo celular en otros hongos, los cuales codifican factores de transcripción localizados en el locus *MAT* en *Saccharomyces cerevisiae* o *MTL* en otros hongos. *C. glabrata* contiene tres copias del locus *CgMTL* pero solamente *CgMTL1* expresa correctamente la información codificada en éste. *CgMTL1* puede contener el gen *Cga1* (información a), o los genes *Cgalfa1* y *Cgalfa2* (información alfa). *CgMTL2* contiene una copia idéntica del gen *Cga1*. *CgMTL3* contiene una copia idéntica del gen *Cgalfa1* pero una variante más larga del gen *Cgalfa2* que nosotros llamamos *Cgalfa3*. En *S. cerevisiae* las células diploides que expresan información *Sca* y *Scalfa*, forman un heterodímero entre las proteínas *Sca1* y *Scalfa2*, el cual reprime genes que son específicos de haploidía y algunos genes involucrados en la respuesta a estrés. En este trabajo construimos cepas de *C. glabrata* que expresan de manera simultánea los genes *Cga1* y *Cgalfa2* ó bien *Cga1* y *Cgalfa3*. No encontramos ningún fenotipo característico cuando cultivamos las cepas que expresan simultáneamente *Cga1-Cgalfa2* ó *Cga1-Cgalfa3* en una variedad de condiciones de estrés y diferentes fuentes nutricionales. Sin embargo, detectamos una interacción entre *Cga1* y *Cgalfa2* mediante Complementación Bimolecular por Fluorescencia (BiFC) y CoIP (Co-inmunoprecipitación), además también observamos que la proteína *Cgalfa3* puede formar homodímeros. En cambio, la proteína *Cgalfa2* no forma heterodímeros eficientemente.

Palabras clave: *Candida glabrata*, genes de apareamiento, factores de transcripción, heterodímero, loci de apareamiento (*MTL*), genes codificados en *MTL*.

Abstract

***Candida glabrata* encodes a longer variant of the mating type (*MAT*) alpha2 gene in the mating type-like *MTL3* locus, which can form homodimers**

The fungal pathogen *Candida glabrata* is a haploid asexual yeast. *C. glabrata* contains orthologues of the genes that control mating and cell type identity in other fungi, which encode putative transcription factors localized in the *MAT* locus in *Saccharomyces cerevisiae* or *MTL* in other fungi. *C. glabrata* contains three copies of the *CgMTL* locus but only *CgMTL1* correctly expresses the information encoded in it. *CgMTL1* can encode the *Cga1* gene (**a** information), or the *Cgalpha1* and *Cgalpha2* genes (alpha information). *CgMTL2* contains an identical copy of the *Cga1* gene. *CgMTL3* contains an identical copy of the *Cgalpha1* gene but a longer variant of the *Cgalpha2* gene we termed *Cgalpha3*. In *S. cerevisiae* diploid cells that express **a** and alpha information, *Sca1* and *Scalpha2* proteins form a heterodimer, which represses genes expressed only in haploid cells and some genes involved in response to stress. We constructed *C. glabrata* strains that simultaneously express *Cga1* and *Cgalpha2* or *Cga1* and *Cgalpha3* genes. We did not find any phenotype in these strains when grown under a large variety of stress and nutritional conditions. However, we could detect an interaction between *Cga1* and *Cgalpha2* and the formation of *Cgalpha3* homodimer by Bimolecular Fluorescent Complementation and Co-IP. However, *Cgalpha2* does not form heterodimers efficiently.

KEY WORDS: *Candida glabrata*, mating type-like loci (*MTL*), *MTL*-encoded genes, transcription factors, heterodimer.

I. Introducción

Candida glabrata es un hongo patógeno de humanos que causa infecciones sistémicas en pacientes inmunocomprometidos y hasta el momento no se ha observado que presente reproducción sexual. Sin embargo, *C. glabrata* contiene la mayoría de los genes que se requieren para el apareamiento (Wong *et al.* 2003; Fabre 2005). Para llevar a cabo una reproducción sexual, en algunos hongos es necesario tener células con diferentes tipos celulares; este proceso se encuentra controlado por dos alelos diferentes codificados en los loci de apareamiento llamados *MAT* en *Saccharomyces cerevisiae* o *MTL* en otros hongos como *C. glabrata*. (Butler 2010).

C. glabrata, al igual que *S. cerevisiae* y otros hongos de la familia *Saccharomycetaceae*, contiene en su genoma tres copias de los loci *MTL*, llamados *CgMTL1*, *CgMTL2* y *CgMLT3* (Hanson, Byrne and Wolfe 2014). *CgMTL1* y *CgMTL2* son transcripcionalmente activos mientras que *CgMTL3* esta sujeto a silenciamiento subtelomérico (Srikantha, Lachke and Soll 2003; Muller *et al.* 2008; Ramirez-Zavaleta *et al.* 2010; Yáñez-Carrillo *et al.* 2014).

En *C. glabrata*, *CgMTL1* puede contener información de tipo **a** que está conformada por el gen *Cga1* (células **a**), o información del tipo alfa que está conformada por los genes *Cgalfa1* y *Cgalfa2* (células alfa). *CgMTL2* contiene información **a** y *CgMTL3* contiene información alfa. El gen *Cga1* contiene dos intrones, pero el procesamiento completo del transcrito solamente se lleva a cabo cuando la transcripción se origina en *CgMLT1a* pero no cuando proviene de *CgMTL2a*, y debido al silenciamiento que existe en *CgMTL3*, solamente los genes

que se encuentran en *CgMTL1* se expresan correcta y eficientemente (Srikantha, Lachke and Soll 2003; Muller *et al.* 2008; Ramirez-Zavaleta *et al.* 2010; Yáñez-Carrillo *et al.* 2014).

El hongo oportunista patógeno de humanos *C. albicans*, que tiene una relación filogenética lejana con *C. glabrata*, es una levadura diploide que presenta un ciclo para-sexual y solamente tiene un locus *MTL* (*CaMTL*), que controla la identidad celular y la reproducción sexual. En hongos como *S. cerevisiae* y en hongos del clado *Candida* como *C. albicans*, los genes **a1**, alfa1 y alfa2 codifican para factores de transcripción. **a1** y alfa2 son proteínas que contienen un homeodominio mientras que alfa1 es una proteína que contiene un dominio de unión a ADN. Diferentes combinaciones de estos factores de transcripción controlan la expresión de un conjunto de genes específicos del tipo celular (genes específicos de **a** o alfa), así como un grupo de genes que se expresan solamente en células que no se han apareado (genes específicos de haploidía) revisado en Smith and Johnson 1992; Butler 2010; Lee and Haber 2015; Baker, Tuch and Johnson 2011. Varios genes específicos de haploidía confieren a cada tipo celular la habilidad de aparearse con la célula del tipo opuesto, además de encontrarse algunos genes involucrados en respuesta a estrés. En contraste, para la células haploides **a** o alfa, el apareamiento de células **a** y alfa, resulta en células diploides que expresan simultáneamente información tanto **a** como alfa, lo cual resulta en la formación de un heterodímero compuesto por las proteínas **a1** y alfa2 (heterodímero **a1**-alfa2) que reprime la transcripción de genes específicos de haploidía y algunos otros involucrados en la respuesta a estrés (Galgoczy *et al.*

2004).

Aunque la estructura general de los loci *CgMTL* se conserva con *S. cerevisiae*, existen diferencias importantes en la regulación y la función de los genes codificados en estos loci. Por ejemplo, nosotros hemos encontrado que en *C. glabrata* no existe una regulación de la identidad del tipo celular sexual; es decir, independientemente de la información que se encuentre en el locus *CgMTL1* (homólogo al locus *MAT* en *S. cerevisiae*), *C. glabrata* expresa genes que son específicos tanto para células **a** como alfa; además no se ha observado la presencia de una reproducción sexual (Butler 2010; Ramirez-Zavaleta *et al.* 2010). Las diferencias entre *C. glabrata* y *S. Cerevisiae*, a pesar de la conservación de los genes relacionados con apareamiento, nos llevan a preguntarnos si los genes codificados en los loci *CgMTL* de *C. glabrata* tienen diferentes funciones a las reportadas para los genes codificados en el locus *ScMAT*.

I.1 ANTECEDENTES DIRECTOS

Candida glabrata contiene los genes de apareamiento codificados en los loci *CgMTL*, llamados *CgMTL1*, *CgMTL2* y *CgMTL3*. A pesar de ello, no se ha descrito un ciclo sexual. Además por datos del laboratorio se sabe que *C. glabrata* no presenta identidad del tipo celular; es decir, independientemente de la información presente en los loci *CgMTL*, los genes ortólogos a *S. cerevisiae* específicos de **a**, alfa o haploidía se expresan, aún en una cepa que no contiene información de apareamiento (Ramirez-Zavaleta *et al.* 2010).

El locus *CgMTL1* es transcripcionalmente activo y presenta información **a** o alfa; *CgMTL2* contiene información **a** y también es transcripcionalmente activo, mientras que *CgMTL3* expresa información del tipo alfa y se encuentra sujeto a un silenciamiento subtelomérico; es decir, una pequeña parte de la población expresa la información presente en este locus (Srikantha, Lachke and Soll 2003; Muller *et al.* 2008; Ramirez-Zavaleta *et al.* 2010; Yáñez-Carrillo *et al.* 2014).

S. cerevisiae un hongo sexual, no patógeno que presenta una cercanía filogenética con *C. glabrata*, que al llevar a cabo el apareamiento entre una célula con información **a** y una célula con información alfa, forma un heterodímero entre las proteínas **a1** y alfa2 que reprime genes que son específicos de cada tipo celular y de haploidía, pero además, se sabe que dicho heterodímero reprime la expresión de genes que se encuentran involucrados en respuesta a estrés (Galgoczy *et al.* 2004).

I.2 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

C. glabrata contiene genes ortólogos a los genes de apareamiento de *S. cerevisiae* pero a pesar de ello, no se ha demostrado una función relacionada con la reproducción sexual en el hongo patógeno o alguna función alternativa como, la regulación de genes de respuesta a estrés como se ha reportado en *S. cerevisiae*. En *S. cerevisiae* y en *C. albicans* las células diploides que tienen tanto información tipo **a** como tipo alfa, se forma un heterodímero **a1-alfa2** que reprime tanto genes específicos de haploidía como de respuesta a ciertos tipos de estrés. Las proteínas **Cga1** y **Cgalfa2** conservan los aminoácidos necesarios para la interacción entre las proteínas **Cga1** y **Cgalfa2**. Dados estos datos, nos preguntamos si en *C. glabrata* se puede formar este heterodímero en células que expresan ambas proteínas y si estas células presentan algún fenotipo observable

I.3 HIPÓTESIS

Los genes codificados en los loci *CgMTL* son factores de transcripción que tienen funciones diferentes en *C. glabrata* de las que se han determinado para las proteínas ortólogas de *S. cerevisiae* o de *C. albicans*.

Para actuar como factores de transcripción estas proteínas **Cga1**, **Cgalfa1**, **Cgalfa2** o **Cgalfa3** pueden hacerlo individualmente o bien las proteínas **Cga1** y **Cgalfa2** pueden formar un heterodímero en *C. glabrata* cuando ambas proteínas se expresan simultáneamente.

1.4 OBJETIVOS

Objetivo General

- Determinar la función de los genes codificados en los loci de apareamiento *MTL* en *C. glabrata*.

Objetivos Particulares

- Determinar el efecto fenotípico de expresar simultáneamente los genes de apareamiento *Cga1-Cgalfa2* o *Cga1-Cgalfa3* en *C. glabrata* mediante caracterización fenotípica en múltiples condiciones de crecimiento.
- Determinar si las proteínas de *C. glabrata* **a1**, alfa2 y alfa3 interactúan entre sí y es posible la formación de heterodímeros entre *Cga1-Cgalfa2* o *Cga1-Cgalfa3*; así como la formación de homodímeros entre *Cgalfa2* o *Cgalfa3*.
- Determinar diferencias en el perfil transcriptómico de cepas de *C. glabrata* con diferente información de apareamiento para poder elucidar posibles rutas en las que participan los genes *MTL*.

II. Materiales y Métodos

Cepas generadas

Todas las cepas generadas en el presente estudio se construyeron en el fondo genético de la cepa BG14 (Cormack and Falkow 1999) y están descritas en la Tabla 1.

Tabla 1. - Cepas generadas en el presente estudio.

Cepas de <i>E. coli</i>		Genotipo	Referencia
DH10B		$F^- mcrA \Delta(mrr-hsdRMS-mcrBC)$ $\phi 80dlacZ\Delta M15 \Delta lacX74 deoR recA1 endA1$ $araD139 \Delta(ara,leu)7697 galU galK \lambda^- rpsL$ $nupG$	(Calvin and Hanawalt, 1988)
Cepas de <i>Candida glabrata</i>			
Cepa	Parental	Genotipo	
BG2		Aislado clínico	(Fidel <i>et al.</i> , 1996)
BG14	BG2	$ura3\Delta::Tn903 G418^R$	(Cormack and Falkow, 1999)
CBS138		Aislado clínico, cepa de referencia (ATCC2001)	https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/?term=candida+glabrata
Cepas con deleciones en los loci <i>MTL</i>			
CGM413	BG14	$ura3\Delta::Tn903 G418^R, mtl2\Delta Hyg^S$ (utilizando pMZ18)	(Ramirez-Zavaleta <i>et</i>

			<i>al.</i> 2010)
CGM531	BG14	<i>ura3Δ::Tn903 G418^R, (mtl1, 2, 3)Δ Hyg^S</i> (utilizando pMZ18)	(Ramirez-Zavaleta et <i>al.</i> 2010)
CGM707	BG14	<i>ura3Δ::Tn903 G418^R, mtl1Δ::MTL1α</i> (<i>mtl2, 3</i>)Δ Hyg ^S	Colección de laboratorio
CGM904	BG14	<i>ura3Δ::Tn903 G418^R, mtl1Δ::MTL1α</i> (<i>mtl2, 3</i>)Δ Hyg ^S	Colección de laboratorio
CGM978	BG14	<i>ura3Δ::Tn903 G418^R, mtl1Δ::P_{PGK1}-</i> <i>MTL1α (mtl2, 3)Δ Hyg^S</i>	Colección de laboratorio
Cepas control para BiFC en <i>Candida glabrata</i>			
CGM2689	CGM531	pRM103 y pRM101, <i>URA3⁺, NAT^R</i> pCU::VC-L, pCN::VN-L (vector vacío)	Este trabajo
CGM2925	CGM531	pRM150 y pRM151, <i>URA3⁺, NAT^R</i> pCU::VC-L- <i>Scalpa2</i> , pCN::VN-L- <i>Scalpa2</i> (control positivo)	Este trabajo
CGM3012	CGM531	pRM148 and pRM151, <i>URA3⁺, NAT^R</i> pCU::VC-L- <i>Scalpa2</i> , pCN::VC-L- <i>Scalpa2</i> (control negativo)	Este trabajo
Cepas con los genes <i>a1</i>, <i>alfa2</i> y <i>alfa3</i> para BiFC en <i>Candida glabrata</i>			
CGM2677	CGM531	pRM111 and pRM107, <i>URA3⁺, NAT^R</i> pCU::VC-L- <i>Cgalpa3</i> , pCN::VN-L- <i>Cgalpa3</i>	Este trabajo
CGM2679	CGM531	pRM111 and pRM116, <i>URA3⁺, NAT^R</i> pCU::VC-L- <i>Cgalpa3</i> , pCN::VN-L-	Este trabajo

		<i>Cgalpha2</i>	
CGM2683	CGM531	pRM109 and pRM116, <i>URA3</i> ⁺ , NAT ^R pCU::VC-L- <i>Cgalpha2</i> , pCN::VN-L- <i>Cgalpha2</i>	Este trabajo
CGM2711	CGM531	pRM111 and pRM124, <i>URA3</i> ⁺ , NAT ^R pCU::VC-L- <i>Cgalpha3</i> , pCN::VN-L- <i>Cga1</i>	Este trabajo
CGM2713	CGM531	pRM109 and pRM124 <i>URA3</i> ⁺ , NAT ^R pCU::VC-L- <i>Cgalpha2</i> , pCN::VN-L- <i>Cga1</i>	Este trabajo
Cepas de <i>C. glabrata</i> que expresan los genes <i>Cga1</i>, <i>Cgalfa2</i> y <i>Cga1</i>, <i>Cgalfa3</i>			
CGM1540	CGM531	<i>MTL1</i> ::pRM4 (<i>Mfe</i> I) (<i>mtl2</i> , 3) Δ Integrante #1	Este trabajo
CGM1552	CGM1540	<i>MTL1</i> :: <i>Cga1-Cgalpha2</i> (<i>mtl2</i> , 3) Δ Segregante #2 (5-FOA ^R)	Este trabajo
CGM1565	CGM531	<i>MTL1</i> ::pRM50 (<i>Mfe</i> I) (<i>mtl2</i> , 3) Δ Integrante #10	Este trabajo
CGM1569	CGM1565	<i>MTL1</i> :: <i>Cga1-Cgalpha3</i> (<i>mtl2</i> , 3) Δ Segregante #3 (5-FOA ^R)	Este trabajo
Cepas de <i>C. glabrata</i> para ColP			
CGM3155	CGM2953	pRM159, <i>URA</i> ⁺ , NAT ^R P _{MT1} ::MYC-L:: <i>Cgalfa3</i> y P _{MT1} ::FLAG-L:: <i>Cga1</i>	Este trabajo
CGM3157	CGM2953	pRM161, <i>URA</i> ⁺ , NAT ^R P _{MT1} ::MYC-L:: <i>Cgalfa3</i> y P _{MT1} ::FLAG-L:: <i>Cgalfa2</i>	Este trabajo
CGM3159	CGM2947	pRM159, <i>URA</i> ⁺ , NAT ^R P _{MT1} ::MYC-L:: <i>Cgalfa2</i> y P _{MT1} ::FLAG-L:: <i>Cga1</i>	Este trabajo
CGM3161	CGM2947	pRM161, <i>URA</i> ⁺ , NAT ^R P _{MT1} ::MYC-L:: <i>Cgalfa2</i> y P _{MT1} ::FLAG-L::	Este trabajo

		Cgalfa2	
CGM3181	CGM2953	pGE124, NAT ^R P _{MT1} ::MYC-L:: Cgalfa3 y P _{MT1} ::FLAG-L:: Cgalfa3	Colección de laboratorio

Tabla 2. Plásmidos utilizados para realizar el estudio.

Plásmido	Genotipo relevante	Referencia
Vectores de clonación		
pYlp/ac211	Vector de clonación integrativo <i>URA3</i> , Amp ^R	(Gietz and Sugino 1988)
pMB11	Vector de clonación, contraselección a <i>sacB</i> Cm ^R <i>oeip15A</i>	(Gallegos-García <i>et al.</i> 2012)
pMZ21	Vector replicativo que expresa la recombinasa (ScFlp1p) para la remoción del casete de resistencia a higromicina; [P _{EPA1} ::FLP1::(3'UTR _{HIS3})] <i>URA3</i> , Amp ^R	Colección del laboratorio de B. Cormack
pFA6a-VN-His3MX6	Vector donador del amino terminal de la proteína fluorescente YFP (VN-YFP), Amp ^R ,	(Sung and Huh 2007)
pFA6a-VC-His3MX6	Vector donador del carboxilo terminal de la proteína fluorescente YFP (VC-YFP), Amp ^R ,	(Sung and Huh 2007)
pCU-MET3	Vector con promotor inducible P _{MET3} , <i>URA3</i> , Amp ^R , <i>C.g</i> CEN/ARS	(Zordan <i>et al.</i> 2013)
pCN-MET3	Vector con promotor inducible P _{MET3} , NAT ^R , Amp ^R , <i>C.g</i> CEN/ARS	(Zordan <i>et al.</i> 2013)
Vectores para cepas con a1-alpha2 y a1-alpha3		
pSF15	Producto de PCR de 1.405 Kb (oligonucleótidos 770 y	Colección

	321) del gen Cgalfa2 de <i>MTL1</i> clonado en pMB11 digerido con <i>Stu I</i> , Cm^R	del laboratorio
pRM1	Fragmento <i>Bam HI/Eco RI</i> de 1.389 Kb (gen Cgalfa2) derivado de pSF15, clonado en pYIplac211 digerido con <i>Bam HI/Eco RI</i> , Amp^R , <i>URA3</i>	Este trabajo
pRM4	Producto de PCR de 1.9 Kb <i>Bam HI/Xba I</i> (oligonucleótidos 764 y 320) del gen Cga1 , clonado en pRM1 digerido con <i>Bam HI/Xba I</i> , <i>URA3</i> , Amp^R . Plásmido que expresa Cga1 y Cgalfa2 simultáneamente	Este trabajo
pRM50	Producto de PCR de 1.553 Kb <i>Bam HI / Mfe I</i> (oligonucleótidos 770 y 143) del gen Cgalfa3 de <i>MTL3</i> , ligado con el producto de PCR de 0.403 Kb (oligonucleótidos 1049 y 321) correspondiente al 3'UTR del gen Cga1 de <i>MTL1</i> digerido con <i>Eco RI</i> , clonados en pRM4 digerido con <i>Bam HI</i> y <i>Eco RI</i> , Amp^R , <i>URA3</i> . Plásmido que expresa Cga1 y Cgalfa3 simultáneamente	Este trabajo
Vectores replicativos base para BiFC		
pRM90	Producto de PCR de 0.300 Kb <i>Sal I/Xho I</i> (oligonucleótidos 1687 y 1685) que corresponde al fragmento <u>carboxilo terminal</u> de YFP (VC) amplificado de pFA6a-VC-His3MX6, colonado en pCN-MET3 <i>Xba I/Spe I</i> . NAT^R , Amp^R , <i>C.g CEN/ARS</i>	Este trabajo
pRM101	Producto de PCR de 0.588Kb <i>Xba I/Spe I</i> (oligonucleótidos 1694 y 1692) que corresponde al fragmento <u>amino terminal</u> de YFP (VN) amplificado de pFA6a-VN-His3MX6, colonado en pCN-MET3 <i>Xba</i>	Este trabajo

	I/Spe I. NAT ^R , Amp ^R , C.g CEN/ARS	
pRM103	Producto de PCR de 0.300 Kb Xba I/Spe I (oligonucleótidos 1687 y 1685) que corresponde al fragmento <u>carboxilo terminal</u> de YFP (VC) amplificado de pFA6a-VC-His3MX6, colonado en pCU-MET3 Xba I/Spe I. URA3, Amp ^R , C.g CEN/ARS	Este trabajo
Vectores replicativos para BiFC con genes etiquetados en el extremo amino		
pRM107	Fragmento de PCR de 0.648 Kb Xba I/Sal I (oligonucleótidos 1878 y 1903) que corresponde al gen Cgalfa3 , clonado en pRM101 Xba I/Sal I. NAT ^R , Amp ^R , C.g CEN/ARS	Este trabajo
pRM109	Fragmento de PCR de 0.575 Kb Xba I/Sal I (oligonucleótidos 1876 y 1902) que corresponde al gen Cgalfa2 , clonado en pRM103 Xba I/Sal I. URA3, Amp ^R , C.g CEN/ARS	Este trabajo
pRM111	Fragmento de PCR de 0.648 Kb Xba I/Sal I (oligonucleótidos 1878 y 1903) que corresponde al gen Cgalfa3 , clonado en pRM103 Xba I/Sal I. URA3, Amp ^R , C.g CEN/ARS	Este trabajo
pRM116	Fragmento de PCR de 0.575 Kb Xba I/Sal I (oligonucleótidos 1876 y 1902) que corresponde al gen Cgalfa2 , clonado en pRM101 Xba I/Sal I. NAT ^R , Amp ^R , C.g CEN/ARS	Este trabajo
pRM124	Fragmento de cDNA de 0.410 Kb Xba I/Sal I (oligonucleótidos 1874 y 1901) que corresponde al gen Cga1 completamente procesado, clonado en pRM101 Xba I/Sal I. NAT ^R , Amp ^R , C.g CEN/ARS	Este trabajo
pRM148	Fragmento de PCR de 0.638 Kb Spe I/Xho I (oligonucleótidos 2233 y 2234) que corresponde al gen	Este trabajo

	Scalpa2 de <i>S. cerevisiae</i> , clonado en pRM90 <i>Spe</i> I/ <i>Xho</i> I. NAT ^R , Amp ^R , C.g CEN/ARS	
pRM150	Fragmento de PCR de 0.638 Kb <i>Spe</i> I/ <i>Xho</i> I (oligonucleótidos 2233 y 2234) que corresponde al gen Scalpa2 de <i>S. cerevisiae</i> , clonado en pRM101 <i>Spe</i> I/ <i>Xho</i> I. NAT ^R , Amp ^R , C.g CEN/ARS	Este trabajo
pRM151	Fragmento de PCR de 0.638 Kb <i>Spe</i> I/ <i>Xho</i> I (oligonucleótidos 2233 y 2234) que corresponde al gen Scalpa2 de <i>S. cerevisiae</i> , clonado en pRM103 <i>Spe</i> I/ <i>Xho</i> I. URA3, Amp ^R , C.g CEN/ARS	Este trabajo
Vectores replicativos con fusiones en el N-terminal de los genes <i>MTL</i> y cMyc o Flag		
pRM153	Fragmento FLAG-Linker (<i>Spe</i> I/ <i>Eco</i> RI) (oligonucleótidos 2340 y 2341) clonado en pCN(<i>Spe</i> I/ <i>Eco</i> RI). NAT ^R , Amp ^R , C.g CEN/ARS	Este trabajo
pRM155	Producto de PCR de 0.572 Kb (oligonucleótidos 2098 y 2099) digerido con <i>Eco</i> RI/ <i>Sal</i> I, clonado en pRM153(<i>Eco</i> RI/ <i>Sal</i> I). NAT ^R , Amp ^R , C.g CEN/ARS	Este trabajo
pRM156	Producto de PCR de 0.4 Kb (oligonucleótidos 2095 y 2337) digerido con (<i>Spe</i> I/ <i>Eco</i> RI), clonado en pRM153(<i>Spe</i> I/ <i>Eco</i> RI). NAT ^R , Amp ^R , C.g CEN/ARS	Este trabajo
pGE122	P _{MT1} (<i>Xba</i> I/ <i>Sac</i> I) clonado en pRM156 (<i>Xba</i> I/ <i>Sac</i> I). NAT ^R , Amp ^R , C.g CEN/ARS. Intercambio de promotores P _{MET3} por P _{MT1}	Este trabajo
pRM159	P _{MT1} (<i>Xba</i> I/ <i>Sac</i> I) clonado en pRM155 (<i>Xba</i> I/ <i>Sac</i> I). NAT ^R , Amp ^R , C.g CEN/ARS. Intercambio de promotores P _{MET3} por P _{MT1}	Este trabajo

pRM161	Fragmento FLAG-Linker (<i>Spe</i> I/ <i>Eco</i> RI) (oligonucleótidos 2340 y 2341) clonado en pCN(<i>Spe</i> I/ <i>Eco</i> RI). NAT ^R , Amp ^R , C.g CEN/ARS	Este trabajo
pGE124	P_{MT1} (<i>Xba</i> I/ <i>Sac</i> I) clonado en pGE122 (<i>Xba</i> I/ <i>Sac</i> I). NAT ^R , Amp ^R , C.g CEN/ARS. Intercambio de promotores P _{MET3} por P _{MT1}	Este trabajo

Oligonucleótidos empleados

Todos los oligonucleótidos empleados en el presente trabajo se encuentran descritos en la Tabla .

Tabla 3.- Oligonucleótidos empleados.

Primer	Nombre	Secuencia (5'-3')	Sitio(s) agregados
Construcción del vector con los genes Cga1 y Cgalfa2			
14	Oligo #14	TATGTTGTGTGGAATTGTGAGCGGA	
143	alpha2@+583SacI BsgI Rv MTL3	CCGAGCTCTTGTGCAGC ATAAAAAC CATTTCGTTATGG	<i>Sac I Bsg I</i>
149	BUD5@-66 SacI Bsg Rv MTL1	CCGAGCTCTTGTGCAGGCGTCTTTC CTGTGATTATGATG	<i>Sac I</i>
161	Bud5@114 Bam Rv	GCGGATCCGCGCGTCCAATTGCTGC GATGG	<i>Bam HI</i>
291	ALPHA2 Rv	AACTGGAACACAATGATATAAG	
320	EMG1@135XbaFw MTL1	CGCTCTAGACTGCTGAACTGTGACG ACCATC	<i>Xba I</i>
321	BUD5@-35RI- RvMTL1	CCCGAATTCGCGTCTTTCCTGTGAT TATGATG	<i>Eco RI</i>
329	EMG@-42 Fw (Pst)	GCTTCTGCAGTATCTACAATAGATAG AAGG	
334	alfa2@nt1aaaRI Fw	GGGAATTC AAAATGTCAAAGAAATC AAGAATTAGTATTACG	<i>Eco RI</i>
764	BUD5@- 424BamRvMTL1a	CCCGGATCCGGTGGT GATCTCTTGT GTGG	<i>Bam HI</i>
770	alfa2@-424FwBam	CCCGGATCCG TAGAGTGACTTCAGA TATTGTACAACTG	<i>Bam HI</i>
771	a1@494noTAA- GFP Rv Bam	GCGGATCCAGT CACGATTGTTTAGA TCTTTCGATC	<i>Bam HI</i>
772	a1MTL1@+1HinFw	CGCAAGCTT CTATAGTTCCTCCTTAC	<i>Hind III</i>

		TCTTTTATAG	
1049	alpha2 MTL1@+114 EcoRI Fw	GAC GAATTC AAGAGATCACCACC	<i>Eco</i> RI
RT-PCR			
219	ACT Fw@70 RT	CGCCGGTGACGATGCTCC	
220	ACT Rv@210 RT	CTTGGATTGAGCTTCGTC	
290	ALPHA2 FW	TCAAGAATTAGTATTACGCATC	
291	ALPHA2 RV	AACTGGAACACAATGATATAAG	
330	a1@nt1 Xba Rv	CCCT CTAG AAAAATGATGACAGTAG ACCCAATACAAGATC	<i>Xba</i> I
469	Rev@377A1	AGATCTTTCGATCTCTTGCGC	
Construcción de los vectores para ensayos de BiFC			
1685	VC-YFP@linker SpeI RV	CCC ACTAGT CGT <u>CGCACCTGCCCCC</u> GCACCTGCTCCAGCGCCCTTGTACA GCTCG	<i>Spe</i> I
1687	VC-YFP@XbaI FW	CCCT CTAG AAAAATGAACCACGACA A	<i>Xba</i> I
1692	VNYFP- Linker@519 Linker Xho1 Rv	GG ACTAGT CGCACCTGCCCCCGCA <u>CCTGCTCCAGCGCCCTCGATGTTGT</u> GG	<i>Spe</i> I
1694	VNYFP-Linker@+1 Xba1 Fw	GCT CTAG AAAAATGGTGAGCAAGG	<i>Xba</i> I
1874	cDNA a1@+1 Xba1 Fw	CGT CTAG AATGATGACAGTAGACC	<i>Xba</i> I
1876	alfa2@+1 Xba1 Fw	CGCT CTAG AATGTCAAAGAAATC	<i>Xba</i> I

1878	alfa3@+1 Xba1 Fw	CGCTCTAGAATGTCAAAGAAATCAA G	Xba I
1901	cDNA a1@Sal1 Rv	CGCGT CGAC CTAGTCACGATTG	Sal I
1902	alfa2@Sal1 Rv	CG GTCGACT CAAGTGTCGAGG	Sal I
1903	alfa3@Sal1 Rv	CGCGT CGACT TTATGTAAGACAAC	Sal I
2233	alpha2-Sc@+1 SpeI FW	GCG ACTAGT ATGAATAAAATACCC	Spe I
2234	alpha2-Sc@orf XhoI RV	GCCT CGAGT CATTCTTTCTTCTTTGC	Xho I
Oligonucleótidos para la construcción de vectores para ColP			
2095	Cg a1 @1 aaa EcoRI Fw	ATAG AATTC AAAATGATGACAGTAGA CCCAATACAAG	Eco RI
2098	Cg Alpha2@1aaa EcoRI Fw	ATAG AATTC AAAATGTCAAAGAAATC AAGAATTAGTATTAC	Eco RI
2099	Cg Alpha2@561 Sall Rv	ATAG TCGACT CAAGTGTCGAGGCTG TTTTGAG	Sal I
2100	Cg Alpha 3@633 Sall Rv	ATAG TCGACT TTATGTAAGACAACCTCA AAGAAAAGACC	Sal I
2337	Cg a1@393 Sall Rv	ATGG TCGAC CCAATCGTGACTAG	Sal I
2340	Oligo Flag-link Spe RI Fw	CTAGTAAAATGGGAGCAGACTACAA AGATGACGATGACAAAGGAGCCGAT TATAAGGACGATGACGATAAAGGGG CTGACTACAAAGATGACGATGACAA GGGCGCTGGAGCAGGTGCGGGGGC AGGTGCGG	Spe I Eco RI
2341	Oligo Flag-link Spe RI Rv	AATTC CGCACCTGCC CCCGCACCTG CTCCAGCGCCCTTGTCATCGTCATC	Spe I Eco RI

		TTTGTAGTCAGCCCCTTTATCGTCAT CGTCCTTATAATCGGCTCCTTTGTCA TCGTCATCTTTGTAGTCTGCTCCCAT TTTA	
--	--	--	--

Medios de cultivo

Las células de levadura se cultivaron en medio estándar como se describió previamente en (Sherman, Fink and Hicks 1986). Para los medios sólidos añadimos 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%. Agregamos 25mg/L de uracilo cuando fue requerido. Medio YNB (MM) contiene base nitrogenada sin aminoácidos 1.7g/L, sulfato de amonio $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 5g/L y se suplementó con glucosa 2% (p/v). Para la selección de colonias resistentes a nourseotricina (NAT^R) en medio mínimo, usamos medio SED que contiene base nitrogenada sin aminoácidos 1.7g/L y glutamato monosódico 1g/L, glucosa 2% (p/v). La Nourseotricina (GoldBio) se agregó a una concentración de 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$. El medio rico utilizado fue 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, el YPD sólido fue suplementado con higromicina (A.G. Scientific®) a una concentración final de 460 $\mu\text{g}/\text{mL}$ o Nourseotricina 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Para ajustar el pH del medio YPD a pH 3.5 y 6.0 se utilizó HCl 5N. Los medios de cultivos para las diferentes condiciones de estrés o condiciones nutricionales (fuentes de carbono o nitrógeno) se prepararon como se describe en (Homann *et al.* 2009). Los siguientes compuestos se agregaron en medio rico a las concentraciones que se indican en la tabla 4: $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, LiCl, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, CdSO_4 , Fluconazol, SDS (Dodecil sulfato de sodio), Blanco de Calcofluor, D-Sorbitol, NaCl, H_2O_2 , Menadiona, Hidroxiurea (HU), $\text{Na}_2[\text{Fe}(\text{CN})_5\text{NO}]$ (NFS).

Medio OFF para la inducción del promotor de *MET3*: el medio que se usó fue YNB suplementado con una mezcla de todos los aminoácidos como se describe en (Zordan *et al.* 2013) excepto L-Tirosina, PABA y Mio-Inositol que no fueron agregados a la mezcla. Medio ON para la inducción del promotor de *MET3*: las condiciones del medio son iguales a las descritas para el medio OFF pero tampoco se agregó metionina ni cisteína.

Para el crecimiento bacteriano se utilizó el medio Luria-Bertani (LB), como se describe en (Ausubel et al, 2001) . Este medio contiene extracto de levadura 5g/L, triptona 10 g/L y NaCl 5g/L. Todos los plásmidos se introdujeron en la cepa DH10 de *Escherichia coli* mediante electroporación, y se seleccionaron en medio con carbenicilina (A. G. Scientific®) a una concentración final de 50µg/mL (Lb-Cb50). Para medio sólido LB se usó agar 1.5% (p/v) concentración final.

Transformación de levadura

Para transformar *C. glabrata* con el plásmido superenrollado o linearizado, seguimos el método de LiOAc descrito previamente descrito (Castano *et al.* 2003).

Construcción de cepas de *C. glabrata* que expresan simultáneamente los genes *Cga1* y *Cgalfa2* o *Cga1* y *Cgalfa3* desde *CgMTL1*.

Utilizamos la cepa CGM531 (*mtl1,2,3*) Δ (Tabla 1) como cepa receptora para la construcción de las cepas que expresan *Cga1* y *Cgalfa2* ó *Cga1* y *Cgalfa3* desde el locus *CgMTL1*. Las cepas se construyeron mediante el método de reemplazo por dos pasos. Para la cepa *CgMTL1 Cga1-Cgalfa2*, se digirió el plásmido pRM4 con *MfeI* (Tabla 2). pRM4 contiene los genes *Cga1* y *Cgalfa2* con sus propios promotores y flanqueados con las regiones río arriba y río abajo de *CgMTL1*. El plásmido linearizado se integró en el locus *CgMTL1* mediante recombinación homóloga después de transformar la cepa CGM531 [(*mtl1,2,3*) Δ , tabla 1]. La integrante correcta en *CgMTL1* se confirmó por PCR con los oligonucleótidos apropiados (329 y 291 para el extremo 5' y 14 y 161 para el extremo 3', tabla 3). Las células de las cepas integrantes se crecieron en medio rico no selectivo para favorecer la recombinación homóloga y la escisión del vector. Las segregantes en donde el locus *mtl1* Δ fue reemplazado por la construcción que expresa *Cga1-Cgalfa2* se identificaron por PCR (oligonucleótidos 329 y 161 para generar un fragmento de PCR que corresponde al fragmento completo de la construcción). Para generar la cepa que contiene *CgMTL1a1-alfa3*, se usó la misma estrategia previamente descrita, excepto que se usó el plásmido pRM50 digerido con *MfeI* para integrar en *CgMTL1* mediante recombinación homóloga. Los oligonucleótidos para diagnóstico mediante PCR para las integrantes fueron 772 y 329 para el

extremo 5' y 14 y 149 para el extremo 3'. Para identificar las segregantes correctas se usaron los oligonucleótidos 771 y 330 para el extremo 5' y 334 y 161 para el extremo 3'.

Construcción de los plásmidos para el ensayo de complementación bimolecular de fluorescencia (BiFC) para *C. glabrata*.

Generamos un conjunto de plásmidos (Tabla 2) que se derivan de pCU y pCN (Zordan *et al.* 2013). Estos plásmidos contienen el promotor inducible del gen *MET3* seguido de un sitio múltiple de clonación. Un grupo de plásmidos contienen el fragmento N-terminal de la versión optimizada de YFP llamada Venus (VN) después del sitio múltiple de clonación, un segundo grupo de plásmidos contienen el fragmento C-terminal de Venus (VC). Después de los fragmentos VN o VC, clonamos en fase la secuencia de 5 repeticiones de los aminoácidos G y A que funcionan para separar el fragmento de Venus y el gen *MTL* correspondiente (función de linker) (Anexo 4). Los fragmentos VC y VN con el linker se sintetizaron como fragmentos de PCR usando los oligonucleótidos 1687, 1685, 1694 y 1692 en donde el oligo reverso contiene la secuencia del linker (Tabla 3). La reacción de PCR fue realizada con una enzima de alta fidelidad (iProof- BioRad). El producto de PCR fue digerido con las enzimas apropiadas y se clonaron en pCU y pCN digeridos con *Xba* I y *Spe* I para generar los plásmidos pRM90, pRM101 y pRM103. En estos vectores base clonamos en diferentes combinaciones *Cga1* (se utilizó cDNA de este gen puesto que contiene dos intrones, y solo se procesa correctamente cuando la expresión proviene de *CgMTL1*), *Cgalfa2* y *Cgalfa3* generados mediante PCR usando los oligonucleótidos diseñados con los sitios para las enzimas de restricción apropiados, se uso una enzima de alta fidelidad para amplificar los genes (iProof- BioRad). Los plásmidos base se secuenciaron. Los genes que se clonaron en los vectores base así como las uniones de las fusiones se verificaron mediante secuenciación. Todas las reacciones para secuenciación se realizaron en LANBAMA-IPICYT.

Ensayo de complementación molecular por fluorescencia (BiFC).

Las cepas que contienen las combinaciones de plásmidos se crecieron una noche en medio OFF (ver medios de cultivo). Después de 12h de crecimiento, las células se lavaron dos veces con agua y se resuspendieron en medio ON, que no contiene Metionina ni Cisteína. La OD₆₀₀ se ajustó a 0.2 y las células se incubaron a 30°C durante 2.75h. Posteriormente, de cada cultivo se tomó una muestra y se realizó la medición de la fluorescencia en el citómetro de fluorescencia FACScalibur (BD Biosciences). Los niveles basales se ajustaron usando una cepa que contiene un vector con el fragmento VC-YFP (sin gen *MTL* fusionado) y otro vector con diferente marcador de selección y con el fragmento VN-YFP sin gen *MTL* fusionado (Esta cepa es no fluorescente). Los niveles de esta cepa se ajustaron a un valor de 10 unidades de fluorescencia. Los cultivos de cada cepa fueron seleccionados usando el forward scatter, se midieron diez mil eventos por cada muestra. Como control positivo utilizamos la proteína Scalfa2 de *S. cerevisiae* que se ha reportado que forma homodímeros. Para ellos se usó una fusión en el amino terminal de Scalfa2 tanto con el fragmento VC como el fragmento VN de YFP, estos plásmidos se expresaron simultáneamente en la cepa (*mtl1,2,3*) Δ de *C. glabrata*. Como control negativo se usó la coexpresión en la cepa (*mtl1,2,3*) Δ de *C. glabrata* de Scalfa2-VC y Scalfa2-VN (con el mismo fragmento de Venus-YFP). Los experimentos se realizaron por triplicado biológico y duplicado técnico. Los resultados mostrados se calcularon como se describe a continuación: obtuvimos para cada cepa el promedio de la media geométrica (unidades arbitrarias de fluorescencia) en el medio ON y el valor medio de la media geométrica del control negativo. Éste último se restó del promedio de la media geométrica de cada cepa. Las cepas que muestran diferencias significativas se indican mediante un asterisco. Se realizó una múltiple comparación con ANOVA, $p \leq 0.05$.

Ensayos de sensibilidad a estrés crónico en medio sólido.

Los cultivos de células de cada cepa se crecieron en medio YPD hasta fase estacionaria (48h) a 30°C con agitación. Cada cultivo se diluyó hasta una OD₆₀₀ de

0.5 en agua estéril. La suspensión de células se diluyó serialmente en una caja de 96 pozos hasta 10^{-5} cel/mL. Se colocaron volúmenes iguales de cada dilución por goteo en cajas de YPD y en medios YPD que contenían diferentes concentraciones de cada compuesto a probar. Las cajas se incubaron a 30°C por 7 días, se tomaron fotografías cada día después de dos días. Cada experimento se repitió al menos tres veces.

Curvas de crecimiento en medio líquido y cálculo de los tiempos de duplicación.

Para la cuantificación de los tiempos de duplicación de cada cepa en diferentes condiciones de estrés utilizamos el método previamente descrito con algunas modificaciones (Gutiérrez-Escobedo *et al.* 2013). Las células fueron crecidas en medio YPD líquido hasta fase estacionaria (48h). La OD₆₀₀ de cada cultivo se ajustó hasta 0.01 en cada medio que se probó (YPD a pH 3.5, pH6.0 y pH7; o YPD con concentraciones de NaCl de 0.5M, 1.0M y 1.5M). Se tomaron 300µL de cada suspensión celular y se transfirieron en una caja Honeycomb de 100 pozos (Growth Curves, USA) y se incubaron a 30°C con agitación constante en el equipo Bioscreen C (Growth Curves, USA). La OD₆₀₀ se midió cada 15 minutos durante 24h o 48h. Para calcular los tiempos de duplicación de cada cepa, solamente se tomó la fase logarítmica de crecimiento de cada curva en los medios evaluados, como se describe en (Murakami *et al.* 2008).

Ensayos de sensibilidad a fluconazol y peróxido de hidrogeno (H₂O₂) y cálculo de la MIC₅₀.

Cultivos en fase estacionaria (células crecidas en medio YPD a 30°C durante 48h) de cada cepa se diluyeron en medio YPD fresco para obtener una suspensión de células a una concentración de 10^4 cel/mL. 150µL de cada suspensión celular se transfirieron a una caja de 100 pozos Honeycomb que contenía 150µL de YPD con diferentes concentraciones de fluconazol (desde 0.0078 hasta 256µg/mL); para H₂O₂ las concentraciones fueron desde 0.3125 hasta 50mM. Las cajas se incubaron en el aparato Bioscreen C a 35°C y 30°C respectivamente con agitación

constante y la OD₆₀₀ se midió cada 15min durante 24h. Los valores de MIC₅₀ para cada cepa se calcularon como se describió previamente basado en las curvas de dosis-respuesta (Orta-Zavalza *et al.* 2013) y se usó el programa de GraphPad PRISM (San Diego, CA). Para la medición de la sensibilidad de cada cepa en hidroxurea y nitroprusiato sódico (NPS) se llevó a cabo el mismo procedimiento, con excepción de la temperatura de incubación que para estos compuesto fue 30°C, las concentraciones utilizadas se indican en la tabla 4.

Ensayos de sensibilidad a exposición aguda a H₂O₂ y menadiona.

Se utilizaron cultivos en fase estacionaria de crecimiento (medio YPD a 30°C durante 48h) para cada cepa se realizaron diluciones en medio fresco YPD y se incubaron a 30°C con agitación constante. Las diluciones se realizaron de manera que después de tener 8 duplicaciones de cada cultivo se alcance una OD₆₀₀ 0.5. Se tomaron 5mL de cada cultivo para tratarlos con las diferentes concentraciones de H₂O₂ o menadiona durante 2h (Tabla 4). Posteriormente las células se lavaron y se resuspendieron en agua estéril. La OD₆₀₀ se midió y se ajustó a 0.1 en medio YPD fresco y se colocaron 300µL de cada tratamiento de cada cepa en las cajas de 100 pozos Honeycomb para comenzar el crecimiento a 30°C en el aparato Bioscreen C (curva de salida). La viabilidad se calculó como se describió previamente (Gutiérrez-Escobedo *et al.* 2013). Los experimentos se realizaron al menos 4 veces.

Estudios de infección sistémica en un modelo murino.

Para evaluar la capacidad de colonización de las cepas que expresan diferente información de apareamiento se inocularon ratones en la vena caudal (4×10^7 cel/mL), después de una semana de inoculados se sacrificaron y se extrajeron bazo, hígado y riñones; se homogenizaron los órganos y se realizaron cuentas viables de cada uno como se describió previamente (Briones-Martin-del-Campo *et al.* 2014) (Fig. 4).

Ensayo de colonización en competencia de un modelo murino de infección sistémica.

Para realizar los ensayos de competencia se inocularon ratones con una combinación de cepas de *C. glabrata* (Tabla Anexos1) en una relación 1:1 (2×10^7 cel/mL de cada cepa donde solamente una de ellas es resistente a higromicina) y se inyectaron en la vena caudal, después de una semana de inoculados se sacrificaron y se extrajeron bazo, hígado y riñones. Los órganos se homogenizaron y se realizaron cuentas viables de cada uno en cajas de YPD (sin antibiótico). Posteriormente se realizó replica print en un medio con higromicina para distinguir el número de colonias que corresponde a la cepa que presenta el casete de resistencia. Para calcular el número correspondiente de colonias de cada cepa se tomaron en cuenta el número de colonias totales (resistentes y sensibles a higromicina) que crecieron en el medio YPD (Total de cfu). Después de realizar replica print en medio YPD suplementado con higromicina, se contaron el número de colonias resistentes. Posteriormente restamos la cantidad de colonias resistentes al número total de colonias para obtener la proporción de cfu de cada cepa que persistió después de la infección con la mezcla (Fig. 7).

RT-PCR.

Se extrajo RNA de células en fase estacionaria (36h, en YPD) usando TRIzol (Invitrogen, Carlsbad, CA) y siguiendo las instrucciones que el proveedor indica. Posteriormente los RNAs obtenidos se trataron 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 *Cga1* oligonucleótidos 330 y 469, gen alfa2 y gen alfa3 oligonucleótidos 290 y 291 y para el gen de actina oligonucleótidos 219 y 220 (Tabla 3). La síntesis de cDNA se llevó a cabo a 45°C por 45 min para cada uno de los genes. La temperatura de alineamiento para cada gen fueron: 60°C para el gen *Cga1*; 55°C para el gen *Cgalfa2* y *Cgalfa3*; 57°C para el gen de actina (Fig. 2).

Análisis de RNAseq.

La preparación de las librerías y secuenciación del RNA se realizó en la compañía BGI Americas (Beijin <http://www.bgi.com>). Las librerías se generaron para las cepas CGM1(cepa parental: *CgMTL1a*, *CgMTL2a*, *CgMTL3*alfa1,alfa3), CGM531($\Delta\Delta\Delta$: *mtl1,2,3*) Δ), CGM707(*CgMTL1*alfa1,alfa2), CGM904(a1: *CgMTL1a*), CGM1552(*CgMTL1a*-alfa2) y CGM1567(*CgMTL1a*-alfa3) (Tabla 1) en dos diferentes condiciones de crecimiento, fase logarítmica y fase estacionaria en medio rico YPD. Las muestras se prepararon por duplicado, se produjo una librería de fragmentos de 200 pb (paired-end) y secuencias unstrand-specific.

El pre-procesamiento de la calidad de los datos se realizó con el programa Trimmomatic-0.35 (Bolger, Lohse and Usadel 2014), los datos procesados fueron paired-end para que todas las lecturas tuvieran el mismo procesamiento. Los parámetros que se utilizaron fueron: ILLUMINACLIP:TruSeq2-PE:2:30:10; SLIDINGWINDOW:4:15; MINLEN:50. La escala de calidad que corresponde según el secuenciador es phred64 (Bolger, Lohse and Usadel 2014).

Para el análisis de la abundancia de los transcritos y mapeo de transcritos se utilizó el programa Kallisto versión 0.42.4 (Bray *et al.* 2016), solamente se utilizaron las primeras lecturas (single end) después de haber sido procesadas con Trimmomatic. Los parámetros usados fueron los estándar, solamente para la cuantificación se colocó el valor de la longitud del fragmento en 180 (-l 180) y la desviación estándar de 20 (-s 20). Para llevar a cabo el análisis se obtuvo el transcriptoma ya reportado de *C. glabrata* que se encuentra en la página de Candida Genome Database (Inglis *et al.* 2012).

El análisis estadístico se llevó a cabo en el programa RStudio. Para identificar la expresión diferencial de los genes en las diferentes cepas se utilizaron las librerías de EdgeR (Robinson, McCarthy and Smyth 2010) y DeSEQ (Anders and Huber 2010) con los parámetros estándar. El corte que se utilizó para identificar los genes diferencialmente expresados fue un FDR (False Discovery Rate) ≤ 0.05 y un corte en el logaritmo de cambio (logFC) ± 0.5 . Estos parámetros se utilizaron para las comparaciones entre cepas en cada una de las fases de crecimiento (LP y SP).

El enriquecimiento de categorías funcionales se realizó con los genes diferencialmente expresados con la ayuda de FungiFun2 (Priebe *et al.* 2015)

Ensayo para medir la actividad del promotor de la catalasa (P_{CTA1}) en cepas de *C. glabrata* que expresan diferente información de apareamiento.

Se evaluó la actividad del promotor de la catalasa en diferentes fondos genéticos de *C. glabrata*, mediante citometría de flujo de las cepas CGM413, CGM573, CGM2448, CGM2540, CGM2452, CGM2454, CGM2458, CGM2460, CGM2462, CGM2464, CGM2755 y CGM2758 (para descripción de cada cepa ver Tabla A1). Se partió de cultivos en fase estacionaria en medio CAA (30°C durante 48h), posteriormente se diluyeron en medio fresco y se crecieron durante 7 duplicaciones hasta alcanzar a una OD₆₀₀ de 0.5. Se agregó 5mM de H₂O₂ y los cultivos se incubaron durante 1 y 2.5h a 30°C. Posteriormente, se realizaron mediciones de las unidades de fluorescencia en el equipo FACSCalibur (BD Biosciences) de cada una de las cepas. Para el análisis de los datos se tomaron las medias geométricas calculando las veces de inducción con respecto a los cultivos sin tratamiento. Los datos se analizaron con el programa GraphPad PRISM utilizando la función 2wayANOVA ($p \leq 0.05$).

Co-Inmunoprecipitación.

El protocolo que se utilizó se reportó en (Orta-Zavalza *et al.* 2013). Brevemente, las cepas que se evaluaron fueron CGM3155(c-Myc-L::alfa3 y FLAG-L::cDNAa1), GCM3157(c-Myc-L::alfa3 y FLAG-L::alfa2), CGM3159(c-Myc-L::alfa2 y FLAG-L::cDNAa1), CGM3161(c-Myc-L::alfa2 y FLAG-L::alfa2), CGM3181(c-Myc-L::alfa3 y FLAG-L::alfa3). Se utilizaron cultivos en CAA de 12h de cada una de las cepas descritas anteriormente. Posteriormente, se indujo la actividad del promotor de *MTL1* con sulfato de cobre 2mM durante 2h a 30°C. Una vez inducido se tomaron 10mL del cultivo y se realizó la extracción de proteína. Se tomaron 30µL de resina que contiene proteína G inmovilizada con agarosa (Sigma® P3296) y se mezclaron con 1mg de los extractos de proteína de cada una de las cepas, se incubaron a 4°C durante 1h en agitación constante, enseguida se centrifugó para

retirar las perlas de agarosa-proteína G . Para inmunoprecipitar las proteínas etiquetadas con cMyc o Flag, los lisados se combinaron con las resinas anti-Flag M2 (Sigma® A2220) y con agarosa conjugada con anti-cMyc (Sigma® A7470). Se dejaron en agitación constante durante 1.5h. Después de la incubación se lavaron las perlas con PBS 1X tres veces y finalmente se resuspendieron en 40µL de buffer 2xSDS, se incubaron a 95°C por 5min. Los sobrenadantes se corrieron en geles SDS-PAGE con cada muestra y se transfirieron a membranas de PVDF durante 2h a 75V. Las membranas se bloquearon con 5% de leche sin grasa por 12h y agitación constante. Para los Western blots se utilizaron los anticuerpos primarios Anti-cMyc(Millipore® 05-419) y anti-Flag (Sigma-Aldrich® F3165) que se incubaron 2h a temperatura ambiente. Después de 3 lavados de 10min con buffer TTBS, las membranas se incubaron con el anticuerpo secundario Goat anti mouse IgG unida a HRP (Thermo Scientific® 31430).

III. Resultados

***Candida glabrata* codifica una versión diferente del gen *Cgalfa2* en los loci *CgMTL1*alfa y *CgMTL3*alfa.**

C. glabrata contiene tres loci de apareamiento llamados *CgMTL1*, *CgMTL2* y *CgMTL3*, estos loci se encuentran en una disposición similar a los tres loci de apareamiento de *S. cerevisiae* (Srikantha, Lachke and Soll 2003; Ramirez-Zavaleta *et al.* 2010; Yáñez-Carrillo *et al.* 2014). En la mayoría de los aislados clínicos estudiados de *C. glabrata* se observa que en el locus *CgMTL2* se presenta información del tipo **a** y en el locus *CgMTL3* se tiene información del tipo alfa, pero en el locus *CgMTL1* puede tener información ya sea del tipo **a** o del tipo alfa (Fig. 1A). La información del tipo **a** consiste en el gen *Cga1*, en aislados clínicos con información **a** en *CgMTL1*, ambas copias del gen **a1** tanto *CgMTL1* como *CgMTL2* son idénticas. La información alfa consiste en los genes alfa1 y alfa2. Inicialmente clonamos y secuenciamos la información alfa de *CgMTL1* de la cepa secuenciada CBS138 (http://www.candidagenome.org/cgi-bin/gbrowse2/gbrowse/cglab_cbs138) y comparamos ambas secuencias contra la información alfa (*CgMTL3*) de nuestra cepa de referencia BG2 (Cormack and Falkow 1999). Encontramos que los genes alfa1 presentes en *CgMTL1* de la cepa CBS138 y *CgMTL3* (en las cepas CBS138 y BG2) son idénticos. Por otra parte, el gen alfa2 presente en *CgMTL1* (CAGL0B01265g) es diferente al gen alfa2 presente en *CgMTL3* (CAGL0B00264g). A esta variante del gen alfa2 nosotros le llamamos alfa3 (Fig. 1B). Posteriormente determinamos si el gen alfa3 se conserva en *CgMTL3* en otros aislados clínicos de *C. glabrata*. Clonamos y secuenciamos los loci *CgMTL1* y *CgMTL3* de tres aislados clínicos que contienen información alfa en el locus *CgMTL1* y *CgMTL3*, y encontramos que todos los aislados analizados con información alfa en *CgMTL1* contienen el gen *Cgalfa2* y en *CgMTL3* presentan la variante *Cgalfa3* (Fig. 1B). La comparación de la secuencia de proteína predicha para *Cgalfa2* y *Cgalfa3* muestra que ambas son idénticas en los primeros 172 aminoácidos, *Cgalfa2* contiene 14 aa más para un total de 186 aa, mientras que *Cgalfa3* tiene 38 aa más para un total de 210 aminoácidos (Fig. 1B y Anexo 1).

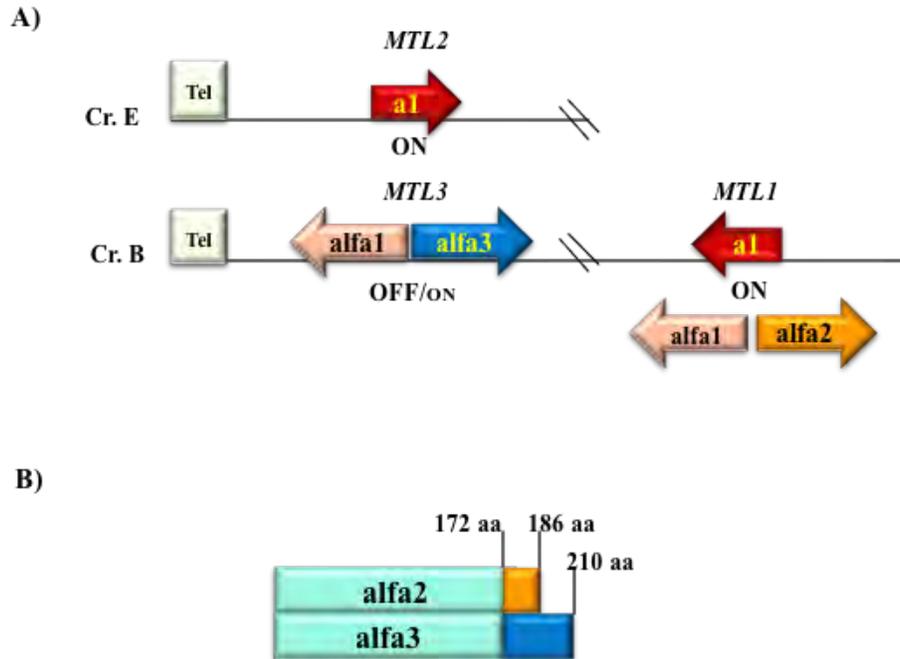


Figura 1. *Candida glabrata* contiene una variante más larga del gen *Cgalfa2* en el locus *CgMTL3*. (A) *C. glabrata* contiene tres loci de apareamiento *CgMTL*, se encuentran distribuidos en dos cromosomas. *CgMTL1*, se encuentra localizado en el cromosoma B y puede contener información *a* (gen *Cga1*) o información del tipo alfa (genes *Cgalfa1* y *Cgalfa2*). *CgMTL2*, se encuentra en el cromosoma E y contiene una copia idéntica del gen *Cga1* de *CgMTL1*. *CgMTL3*, se encuentra cerca del telómero izquierdo del cromosoma B y contiene información alfa, presenta una copia idéntica del gen *Cgalfa1* pero presenta una variante más larga del gen *Cgalfa2* llamado *Cgalfa3*. *CgMTL1* y *CgMTL2* son transcripcionalmente activos (ON) mientras que *CgMTL3* se encuentra sujeto a silenciamiento subtelo mérico (OFF/ON). (B) Representación esquemática de las proteínas putativas *Cgalfa2* y *Cgalfa3*. *Cgalfa2* y *Cgalfa3* son idénticas en los primeros 172 aa y difieren en el extremo carboxi-terminal. A partir del aminoácido 172, *Cgalfa2* tiene 14 aminoácidos más para un total de 186, y *Cgalfa3* contiene 24 aminoácidos después del aa 172 con un total de 210 aminoácidos.

Construcción de las cepas que expresan simultáneamente los genes *Cga1* y *Cgalfa2* o *Cga1* y *Cgalfa3*.

La expresión simultánea de la información **a** y alfa en *S. cerevisiae* y en *C. albicans* generan la formación de un heterodímero entre las proteínas **a1** y alfa2 (**a1**-alfa2), este heterodímero controla un grupo de genes que son importantes para mantener la identidad del tipo celular, así como otro tipo de genes, algunos están involucrados en la respuesta a estrés (*HOG1* en *S. cerevisiae*) o están involucrados en la virulencia (*ECE1* en *C. albicans*, entre otros) (Miller and Johnson 2002; Tsong *et al.* 2003).

El locus *CgMTL3* de *C. glabrata* está sujeto a silenciamiento subtelomérico (Ramirez-Zavaleta *et al.* 2010). Sin embargo, este silenciamiento es incompleto y es posible que una pequeña fracción de la población exprese la información que proviene de este locus. De manera natural, los aislados de *C. glabrata* que presentan información **a** en el locus *CgMTL1* e información alfa en el locus *CgMTL3* podrían estar expresando de manera simultánea los genes *Cga1* y *Cgalfa3*. Para conocer las consecuencias de expresar de manera eficiente y simultáneamente ambos tipos de información en *C. glabrata*, decidimos construir dos cepas diferentes. En la primera cepa se introdujo mediante recombinación homóloga los genes *Cga1* y *Cgalfa2* en el locus *CgMTL1*, cada uno de los genes se clonaron con sus propios promotores (ver Materiales y Métodos). En la segunda cepa se clonaron los genes *Cga1* y *Cgalfa3* en el locus *CgMTL1* (Fig. 2A). Estas cepas no contienen información de apareamiento en los loci *CgMTL2* y *CgMTL3*; de esta manera, solamente la información de apareamiento presente es aquella que se tiene integrada en el locus *CgMTL1* (cepas CGM1552 y CGM1569, respectivamente) (Tabla 1). Es importante destacar que para tener un procesamiento completo del gen *Cga1*, el transcrito debe de provenir del locus *CgMTL1* y no del locus *CgMTL2* (Muller *et al.* 2008; Ramirez-Zavaleta *et al.* 2010). Para determinar si las cepas generadas expresan y procesan de manera completa la información integrada en *CgMTL1* se realizó un RT-PCR. En la Fig. 2B se muestra el gen *Cga1* de las cepas generadas y se observa que el mRNA del gen *Cga1* se procesa completamente, en comparación con la cepa que expresa *Cga1*

en el locus *CgMTL2*, donde se observa la expresión pero el transcrito no se procesa por completo (parcialmente procesado). Como control positivo utilizamos una cepa que expresa el gen *Cga1* bajo el promotor fuerte constitutivo del gen *PGK1*, integrado en el locus *CgMTL1* (*a1*-SE) y como control negativo usamos la cepa receptora que no contiene información de apareamiento en los tres loci *CgMTL* [(*mtl1,2,3*) Δ]. Los genes *Cgalfa2* y *Cgalfa3* se expresaron de manera correcta comparado con la cepa control que expresa *Cgalfa2* desde *CgMTL1* en la cepa CBS138 (*CgMTL1alfa*) (Fig. 2C).

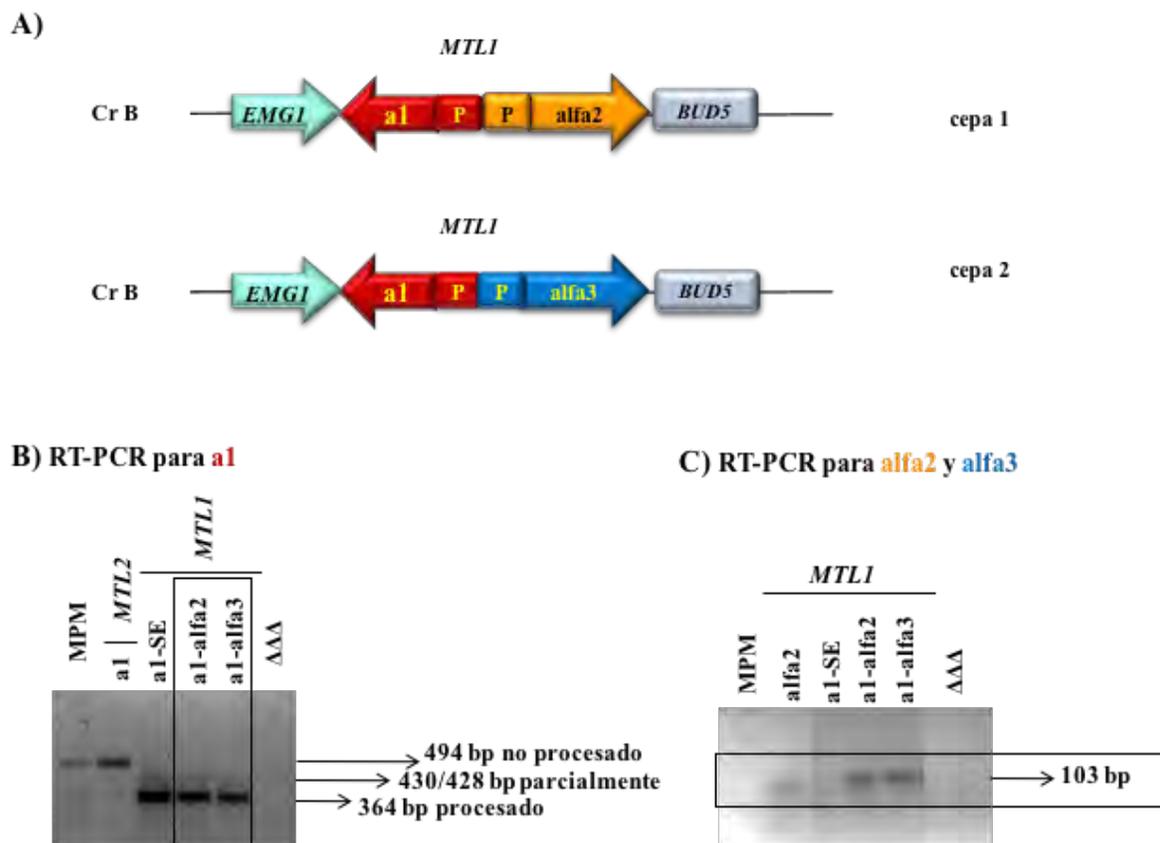


Figura 2. Estructura del locus *CgMTL1* de las cepas que expresan de manera simultánea los genes *Cga1* y *Cgalfa2* o *Cga1* y *Cgalfa3*. (A) Construimos dos cepas de *C. glabrata* que tienen como cepa parental la cepa que no tiene información en los loci de apareamiento (*mtl1,2,3*) Δ . En la primera cepa introdujimos mediante recombinación homologa en *CgMTL1* los genes *Cga1* con su propio promotor y adyacente a éste *Cgalfa2* también con su propio promotor. En la segunda cepa se introdujo *Cga1* y *Cgalfa3* también ambos bajo sus propios promotores. (B) RT-PCR para determinar la transcripción y procesamiento del gen *Cga1* en las cepas construidas. Se extrajo RNA de cada cepa en fase

estacionaria. El gen *Cga1* contiene dos intrones, el RNAm no procesado corresponde a un amplicón de 494pb, el parcialmente procesado es de 428 y 430pb y el completamente procesado es de 364pb. En las cepas generadas, *CgMTL1a1-alfa2* y *CgMTL1a1-alfa3*, el principal RNA detectado corresponde al procesamiento completo de *Cga1* (364pb); sin embargo, el producto parcialmente procesado también puede ser detectado. Como controles se incluyeron la cepa secuenciada CBS138 (*Cga1* | *MTL2*), que expresa el gen *Cga1* desde el locus *CgMTL2* y no se procesa. Otro control incluido fue la cepa que no contiene información de apareamiento (*mtl1,2,3*) Δ , en esta cepa no detectamos transcrito para *Cga1*. Un control positivo fue la cepa que sobre-expresa información a desde el locus *CgMTL1*. **(C)** RT-PCR para determinar la transcripción de los genes *Cgalfa2* y *Cgalfa3*. Se utilizaron oligonucleótidos que alinean en la región donde los genes *Cgalfa2* y *Cgalfa3* son idénticos, por esta razón el tamaño del amplicón será igual para ambos. Se utilizaron las misma cepas que en el panel (B). Ambas cepas tanto la que expresa *Cga1* y *Cgalfa2* como la que expresa *Cga1* y *Cgalfa3* muestran el tamaño del transcrito esperado (103pb). Como control se tiene la cepa CBS138, la cual contiene información alfa en el locus *MTL1*.

La expresión simultánea de los genes a1-alfa2 o a1-alfa3 no muestra fenotipo bajo diferentes condiciones de estrés.

En *S. cerevisiae* la formación del heterodímero entre *Sca1* y *Scalfa2* reprime un conjunto de genes que normalmente se expresan en células haploides. Existen otros genes que se encuentran reprimidos por la presencia de éste heterodímero, uno de estos genes es *SchOG1*. La represión de este gen resulta en susceptibilidad de las células a altas concentraciones de NaCl (Galgoczy *et al.* 2004). Por ello, decidimos caracterizar las cepas que expresan de manera simultánea los genes *Cga1-Cgalfa2* ó *Cga1-Cgalfa3* en diferentes condiciones de estrés, en comparación con la cepa parental (BG14) y con la cepa que no contiene información de apareamiento (*mtl1,2,3*) Δ .

En la tabla 4 se muestran las condiciones que se evaluaron en medio sólido en presencia de diferentes agentes causantes de estrés, así como el resultado obtenido en cada una de las condiciones evaluadas. Estas condiciones fueron evaluadas en una exposición crónica y se midió el efecto mediante crecimiento en caja, de manera cualitativa, mediante el crecimiento de colonias y morfología después de 24, 48 y 72 horas. Los resultados muestran que los agentes evaluados no generan fenotipo en las cepas que contienen diferente información

de apareamiento en un tratamiento crónico.

Tabla 4. Condiciones de estrés evaluadas en tratamiento crónico mediante ensayo por dilución en gota. Modificada de (Robledo-Márquez *et al.* 2016)

Cepas evaluadas		BG14 (<i>MTL1a1</i>) (<i>mtl1,2,3</i>) Δ <i>MTL1 a1, alfa2</i> <i>MTL1 a1, alfa3</i>
Condición de estrés	Agente	Concentración
Metal	Cu	13 y 15mM
	Li	1M
	Zn	1, 5 y 10mM
	Cd	0.5, 2.5 y 10mM
Daño a membrana	Fluconazol	100 μ M
	SDS	0.04%
Daño a pared celular	Calcoflúor	20 μ M
Estrés osmótico	Sorbitol	1.5M
	NaCl	1.5 y 1.8M
Desbalance REDOX (pH)	HCl o NaOH	1.33 a 8.93
Estrés oxidante	H ₂ O ₂	10, 20, 40 y 100mM
	Menadiona	30, 60, 80 y 110 μ M
Anaerobiosis	No agente	No agente

En la Fig. 3 se muestran los crecimientos que se obtuvieron de las diferentes cepas en tres condiciones de estrés en exposición crónica. Se puede observar que las cepas que expresan *Cga1-Cgalfa2* ó *Cga1-Cgalfa3* presentan el mismo crecimiento que la cepa parental BG14 o que la cepa mutante nula en los tres loci de apareamiento en los medios que contienen zinc, SDS y calcoflúor. Esto resultados nos sugieren que la información de apareamiento no se encuentra relacionada con la respuesta a estas condiciones de estrés.

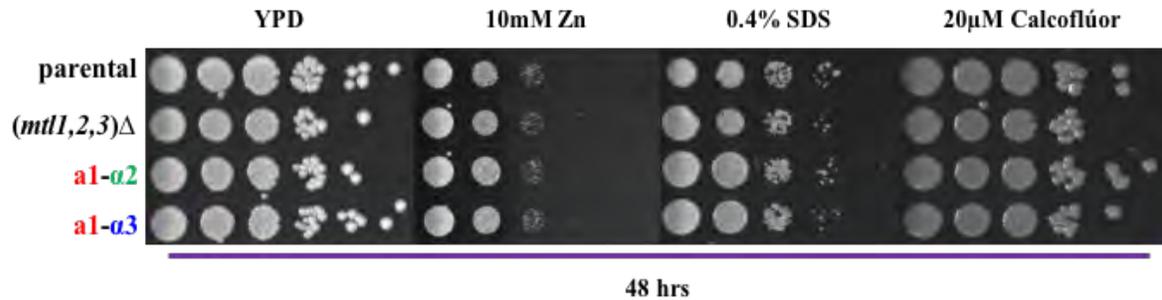


Figura 3. Las cepas que expresan ambos tipos de información de manera simultánea (*Cga1-Cgalfa2* o *Cga1-Cgalfa3*) no presentan diferencia en su fenotipo cuando se someten a diferentes condiciones de estrés comparadas con la cepa parental. Se muestra el crecimiento de la cepa parental, la triple mutante nula [(*mtl1,2,3*) Δ], las cepas que expresan simultáneamente *Cga1-Cgalfa2* o *Cga1-Cgalfa3* bajo tres condiciones de crecimiento donde se somete a la célula bajo estrés a metales (Zn), daño a membrana (SDS) y daño a pared celular (Calcoflúor) en un ensayo de exposición crónica; las células se crecieron a 30°C durante 48 horas.

Además de evaluar mediante ensayos de exposición crónica los diferentes agentes causantes de estrés, decidimos hacer experimentos que nos permitieran determinar de manera cuantitativa el efecto que éstos pudieran tener en las diferentes cepas. Para ello, se realizaron mediciones de los tiempos de duplicación de las cepas que expresan *Cga1-Cgalfa2* o *Cga1-Cgalfa3* en comparación con la cepa parental o la cepa mutante nula en presencia de NaCl en el medio a diferentes concentraciones. En la Fig. 4C se presentan los tiempos de duplicación de las diferentes cepas en presencia de tres concentraciones diferentes de NaCl y no observamos diferencias en los tiempos de duplicación. Se midió la concentración mínima inhibitoria (MIC_{50}) para cada cepa en presencia de peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y fluconazol (Fig. 4A y B). Nuevamente, la MIC_{50} para fluconazol y H_2O_2 es igual en las cepas que expresan diferente tipo de información de apareamiento, incluso en la cepa que no contiene los genes *MTL*.

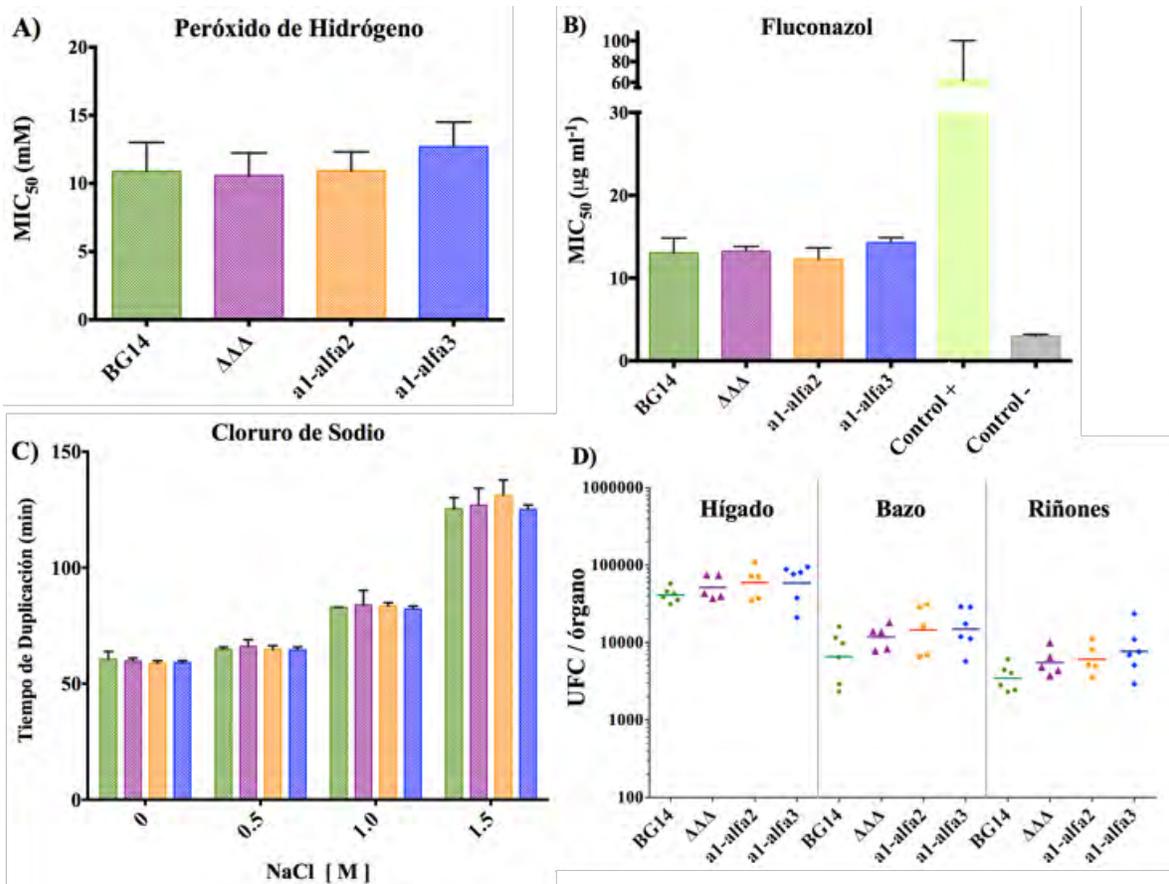


Figura 4. Cepas que expresan simultáneamente *Cga1-Cgalfa2* o *Cga1-Cgalfa3* no muestran diferencia en su fenotipo bajo diferentes condiciones de estrés o capacidad de colonización en comparación con la cepa parental. (A) Células en fase estacionaria de las cepas indicadas se diluyeron en medio YPD fresco de manera que después de 8 duplicaciones lleguen a una DO_{600} de 0.5. Las células se diluyeron nuevamente en medio fresco a una DO_{600} de 0.01 con diferentes concentraciones de H_2O_2 (desde 0.3125 a 50mM), se distribuyeron en cajas de 100 pozos (Honeycomb) y se incubaron a 30°C en el equipo Bioscreen C donde se monitoreó la DO_{600} cada 15min durante 24h. La MIC_{50} se determinó tomando como base la curva dosis respuesta. Los datos son la media de tres experimentos biológicos independientes. **(B)** Cultivos en fase estacionaria de las cepas indicadas se inocularon a una DO_{600} de 0.01 en medio YPD con diferentes concentraciones de fluconazol (desde 0.0078 hasta 256 μ g/mL). La suspensión celular se colocó en cajas de 100 pozos (Honeycomb) y se incubaron a 30°C y la DO_{600} se monitoreó cada 15 min durante 24 hrs. Las MIC_{50} se determinaron tomando como base la curva dosis respuesta. El control positivo es la cepa *hst1Δ* que es resistente a altas dosis de fluconazol y el control negativo es la cepa *pdr1Δ* que es sensible. **(C)** Cultivos en fase estacionaria de las cepas indicadas se inocularon a una DO_{600} de 0.01 en YPD con las concentraciones de NaCl indicadas. Las suspensiones celulares se colocaron en cajas de 100 pozos (Honeycomb), se incubaron a 30°C y se monitoreó la DO_{600} cada 15min durante

24h y con esos datos se calcularon los tiempos de duplicación. **(D)** Las cepas que expresan simultáneamente los genes *Cga1-Cgalfa2* ó *Cga1-Cgalfa3* presentan la misma eficiencia de colonización de los diferentes órganos que la cepa parental, en un modelo de infección sistémica en ratón. Se infectaron grupos de 6 ratones con 4×10^7 células de las cepas indicadas por la vena caudal. Siete días después de la infección los ratones se sacrificaron y los órganos se homogenizaron y se platearon para determinar las unidades formadoras de colonias (u.f.c). Se muestran los datos de un experimento representativo. Cada símbolo representa un ratón y la línea horizontal representa la media de los 6 ratones utilizados por grupo inoculados con cada cepa de *C. glabrata*.

Otros agentes que pueden causar estrés en la célula son las condiciones nutricionales (Anexo 2); Por ello, decidimos evaluar el tiempo de duplicación de las cepas que expresan simultáneamente los genes *Cga1-Cgalfa2* o *Cga1-Cgalfa3* en presencia de diferentes condiciones nutricionales; es decir, diferentes fuentes de carbono ó nitrógeno. En la Fig. 5A, B y C se muestran tres gráficas con los tiempo de duplicación de las diferentes cepas evaluadas en presencia de tres diferentes fuentes de carbono. Nuestros resultados muestran que no hay diferencias en los tiempos de duplicación de la cepas que expresan simultáneamente *Cga1-Cgalfa2* ó *Cga1-Cgalfa3* en comparación con la cepa parental o la cepa triple mutante. Esto indica que es probable que no exista una relación entre la información de apareamiento y la asimilación de diferentes fuentes de carbono y nitrógeno en *C. glabrata*.

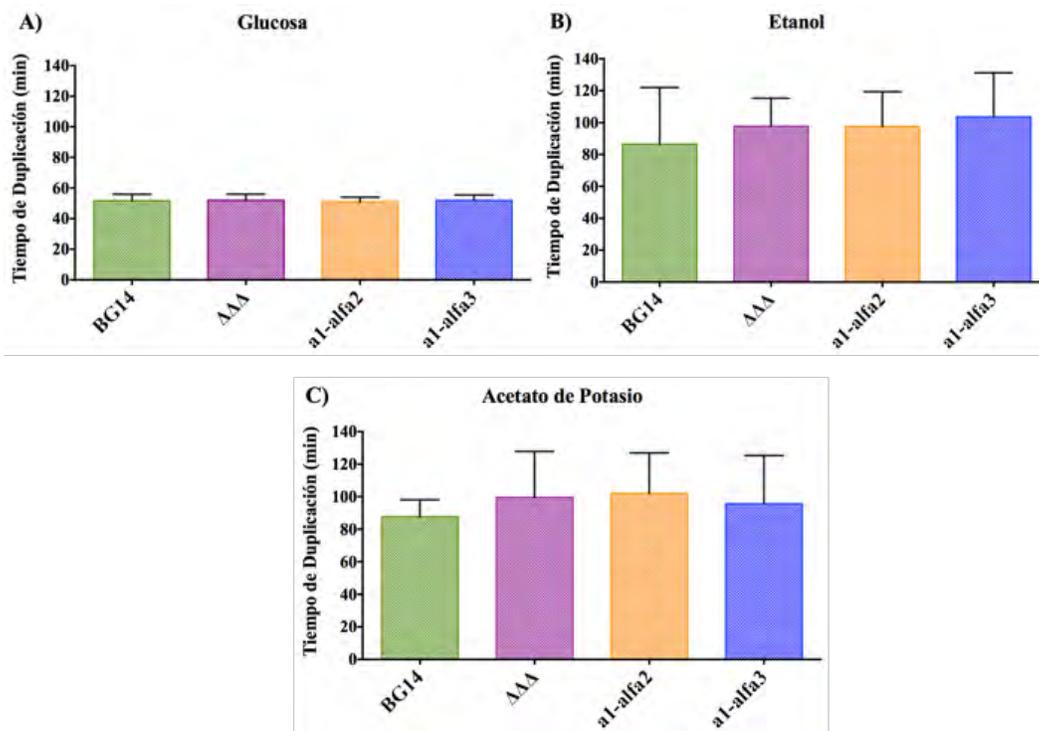


Figura 5. Las cepas de *C. glabrata* que expresan simultáneamente *Cga1-Cgalfa2* o *Cga1-Cgalfa3* asimilan diferentes fuentes de carbono igual que la cepa parental BG14. Se crecieron cada una de las cepas indicadas hasta fase estacionaria y se diluyeron en medio fresco YP con glucosa, etanol o acetato de potasio como fuentes de carbono. Se llevaron a una DO_{600} de 0.01. Se tomaron 300 μ L de cada suspensión de células y se colocaron en una placa de 100 pozos (Honeycomb), se incubaron en el BioscreenC por 24h a 30°C y se realizaron mediciones cada 20min. Se presenta el promedio de tres experimentos independientes en cada medio evaluado.

La cepas que expresan simultáneamente la información α y α colonizan de manera eficiente los órganos blanco en un modelo de ratón en una infección sistémica.

Además de caracterizar el crecimiento de las cepas que expresan *Cga1-Cgalfa2* o *Cga1-Cgalfa3* en diferentes agentes causantes de estrés *in vitro*, decidimos evaluar la capacidad de colonización y persistencia dentro del hospedero en un modelo de ratón en una infección sistémica. La Fig. 4D muestra las unidades formadoras de colonias que se encuentran en hígado, bazo y riñones, que nos indica la capacidad de colonización que tienen las diferentes cepas en un modelo murino de infección sistémica. Podemos observar que no se encuentran

diferencias significativas en la capacidad de colonización de las cepas que expresan simultáneamente *Cga1-Cgalfa2* o *Cga1-Cgalfa3* con respecto a la cepa parental BG14 o incluso con respecto a la cepa que no contiene información *MTL* (*mtl1,2,3*) Δ . Los resultados obtenidos nos sugieren que la información de apareamiento no se encuentra relacionada con la capacidad de colonización de *C. glabrata* en un modelo de infección sistémica en ratón.

Las proteínas a1 y alfa2 de *C. glabrata* interactúan directamente *in vivo*, mientras que alfa3 forma homodímeros.

En *S. cerevisiae* las proteínas *Sca1* y *Scalfa2* interaccionan entre sí y forman un heterodímero que regula genes diferentes de los que regula cada proteína por separado. Nos preguntamos si la proteína *Cga1* podía interactuar directamente con *Cgalfa2* o *Cgalfa3* (o ambas) cuando las expresamos de manera simultánea en la célula. La mayoría de los aminoácidos necesarios para la interacción entre las proteínas *Sca1* y *Scalfa2* (para formar el heterodímero *Sca1-Scalfa2*), se encuentran conservados en los ortólogos de *C. glabrata* (Anexo 1B). Para determinar si en *C. glabrata* se puede formar este heterodímero, utilizamos un ensayo de complementación bimolecular por fluorescencia (BiFC) (Sung and Huh 2007). Generamos plásmidos compatibles que expresan una fusión proteínica del fragmento amino-terminal o del carboxilo-terminal de la proteína fluorescente Venus-YFP (VN o VC) con el extremo amino de cada uno de las proteínas codificadas en *CgMTL* (*Cga1*, *Cgalfa2*, *Cgalfa3*). Cada una de ellas está separada de los extremos VN o VC mediante un linker que esta compuesto por cinco repeticiones de los aminoácidos G y A. Las fusiones se expresaron bajo la actividad del promotor inducible del gen *MET3* (Anexo 4).

Transformamos *C. glabrata* con la combinación de los plásmidos para poder coexpresar en la misma célula ambas partes de la proteína YFP fusionada a cada una de las proteínas *Cga1*, *Cgalfa2* ó *Cgalfa3* para evaluar si se regenera la YFP funcional. Si *Cga1* interactúa físicamente con *Cgalfa2* o *Cgalfa3*, ambas mitades de YFP se pueden unir y regenerar la estructura de la proteína, la cual emitirá

fluorescencia que se puede detectar bajo el estímulo de luz UV, utilizando el equipo FACS que estimula, detecta y separa células que emiten fluorescencia. Utilizamos un control positivo para corroborar que las herramientas generadas funcionan correctamente en *C. glabrata*. Para ello, fusionamos la proteína Scalfa2 de *S. cerevisiae* a cada uno de los extremos de la proteína Venus-YFP clonadas en dos plásmidos compatibles, puesto que esta proteína forma homodímeros (Smith and Johnson 1992; Tan and Richmond 1998). Realizamos la coexpresión de estas fusiones en *C. glabrata* y se midió la fluorescencia mediante citometría de flujo. En la Fig. 6B se muestran los resultados obtenidos donde claramente podemos observar que cuando se coexpresan ambas fusiones de Scalfa2, las células emiten fluorescencia (control positivo, color marrón). Medimos la fluorescencia en construcciones en *C. glabrata* que expresan la combinación de los plásmidos, uno de ellos que etiqueta en el extremo amino-terminal la proteína **Cga1** fusionada con el fragmento VN de la proteína Venus-YFP y el otro plásmidos que contiene como etiqueta la parte complementaria de Venus-YFP (VC) fusionada con Cgalfa2 o Cgalfa3. En la Fig. 6B se observa una señal de fluorescencia en la construcción donde se expresan simultáneamente **Cga1-Cgalfa2** (VN-Cga1; VC-Cgalfa2), esto indica la formación de un heterodímero entre estas dos proteínas. Sin embargo, no observamos fluorescencia en la construcción que coexpresa **Cga1-Cgalfa3** (VN-Cga1; VC-Cgalfa3), lo que sugiere que no se forman heterodímeros entre **Cga1** y Cgalfa3. Sin embargo, pudimos observar la formación de un homodímero entre Cgalfa3 cuando coexpresamos de VN-Cgalfa3 y VC-Cgalfa3. En cambio, no observamos fluorescencia cuando coexpresamos VN-Cgalfa2 y VC-Cgalfa2, esto nos indica que Cgalfa2 no forma un homodímeros pero que puede interaccionar con **Cga1** al formar el heterodímero.

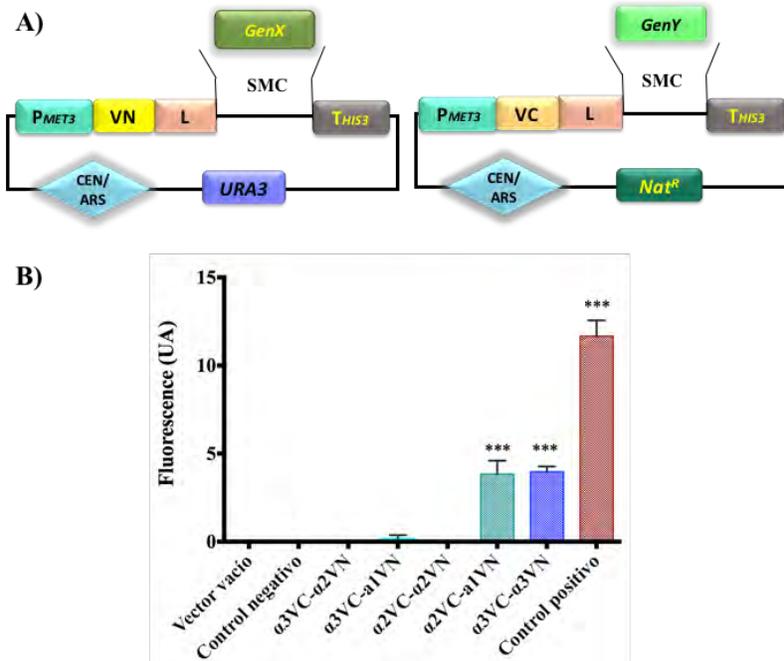


Figura 6. Cga1 y Cgalfa2 interactúan directamente formando un heterodímero. La interacción entre las proteínas codificadas en CgMTL fueron evaluadas mediante el ensayo de Complementación Bimolecular por Fluorescencia (BiFC). (A) Representación de los plásmidos usados para el ensayo de BiFC. Los plásmidos contienen fusiones traduccionales de los fragmentos VN o VC de la proteína Venus-YFP fusionados en el extremo amino-terminal de Cga1, Cgalfa2 o Cgalfa3 y separados por un linker de cinco repeticiones de los aminoácidos G y A (L). Las fusiones se encuentran bajo el control del promotor inducible del gen MET3. La cepa de *C. glabrata* que no contiene información de apareamiento [(*mtl1,2,3*)Δ], se transformó con dos plásmidos que contienen la combinación a estudiar cada uno con diferente marcador de selección. Como control positivo se utilizó la proteína Scalfa2 que forma homodímeros. Cuando existe una interacción directa entre las proteínas fusionadas con los extremos de Venus-YFP se logra restaurar la configuración y se puede observar la emisión de fluorescencia. **(B)** Las cepas contienen la combinación de plásmidos indicadas en la figura (α3VC-α2VN; α3VC-α1VN; α2VC-α2VN; α2VC-α1VN y α3VC-α3VN). Los cultivos de cada cepa se crecieron en medio OFF (+Met, +Cys) durante una noche. Después se realizaron dos lavados con agua estéril, se indujeron las células cambiando a medio ON (sin Met y Cys, ver Materiales y Métodos) durante 2.75h. Se tomaron alícuotas para realizar las mediciones de fluorescencia mediante citometría de flujo. Los resultados muestran la media de tres experimentos independientes y se representa como unidades de fluorescencia. Los datos mostrados corresponden al promedio de la media geométrica de cada una de las cepas después de restar el valor promedio de la media geométrica del control negativo. El control negativo expresa dos plásmidos con las fusiones de Scalfa2 en el amino terminal con el mismo fragmento de la proteína YFP (Scalfa2-VC, Scalfa2-VC).

* Los valores son estadísticamente significativos para las cepas que expresan α 3VC- α 3VN y α 2VC-**a**1VN.

Para corroborar los datos obtenidos mediante BiFC, realizamos un ensayo de coimmunoprecipitación de cepas que expresan plásmidos con los genes *Cgalfa2* o *Cgalfa3* fusionados en el amino terminal con el epítipo c-Myc unidos mediante un linker (5 repeticiones de los residuos G y A) y bajo la expresión del promotor inducible P_{MT1} ; además cada una de estas cepas fue transformada con plásmidos que expresan *Cgalfa2*, *Cgalfa3* o *Cga1* fusionados en el extremo amino con el epítipo Flag unido con un linker bajo el mismo promotor inducible P_{MT1} , de tal manera que se generaron cepas que expresaran todas las combinaciones posibles: *Cga2*-cMyc *Cga2*-Flag; *Cga2*-cMyc *Cga3*-Flag; *Cga2*-cMyc *Cga1*-Flag; *Cga3*-cMyc *Cga1*-Flag; *Cga3*-cMyc *Cga3*-Flag (Tabla 1). Se realizó la extracción de proteína de cada una de las cepas después de inducir la expresión con 2mM de CuSO_4 durante 2h (ver Materiales y Métodos). Para el experimento, inmunoprecipitamos los extractos de proteína con perlas de sefarosa acopladas al anticuerpo c-Myc (de esta manera precipitamos las proteínas *Cga3*-cMyc o *Cga2*-cMyc), y los inmunoprecipitados se utilizaron para realizar dos Western blots. Uno de ellos se reveló utilizando el anticuerpo primario contra c-Myc con el cual se evalúa el “input”, es decir el total de la proteína de fusión inmunoprecipitada con el que iniciamos el ensayo. Como control negativo utilizamos una cepa que no contiene ninguna etiqueta (*(mtl1,2,3)* Δ o $\Delta\Delta\Delta$). En el carril 1 del Western se observa la cepa no etiquetada en la cuál no detectamos señal (Anexo 5). En los carriles del 2 al 6 se puede observar la señal que corresponde a las proteínas *Cgalfa3* y *Cgalfa2* etiquetadas con el epítipo c-Myc (que son las inmunoprecipitadas). En el siguiente panel (carriles del 7 al 8) inmunodetectamos con el anticuerpo primario α -Flag, de esta manera pudimos observar que *Cgalfa3* forma dímero con ella misma (carril 8). Además en el carril 10 podemos observar que *Cga1* coimmunoprecipita con *Cgalfa2*. Estos resultados concuerdan con lo obtenido mediante BiFC. Otra observación es la coimmunoprecipitación de *Cga1* con *Cgalfa3* que se puede observar en el carril 12 del Anexo 5. Por último en el

carril 9 se observar una señal muy débil que corresponde a la detección de *Cgalfa2* con una posible formación de dímero con ella misma; sin embargo, esta señal es muy débil y además la formación de homodímeros de *Cgalfa2* no se puede detectar por medio de BiFC, por lo que es probable que *Cgalfa2* no forma homodímeros eficientemente.

IV. Discusión

Aunque *C. glabrata* tiene una relación filogenética muy cercana con *S. cerevisiae* existen diferencias importantes en cuanto a la habilidad de mantener la identidad del tipo celular sexual y la reproducción sexual. *C. glabrata* ha conservado los loci *CgMTL1*, *CgMTL2*, *CgMTL3* en una disposición similar a los tres loci de apareamiento de *S. cerevisiae* (*ScMAT*, *ScHMR* y *ScHML* respectivamente). Sin embargo, la regulación de la expresión de los genes que se codifican en estos loci en *S. cerevisiae*, así como la expresión de genes específicos del tipo celular no se encuentran conservados en *C. glabrata*. Por ejemplo, *CgMTL2* es transcripcionalmente activo en *C. glabrata* mientras que éste es eficientemente silenciado en *S. cerevisiae*, lo cual es esencial para determinar la identidad del tipo celular (Muller *et al.* 2008; Ramirez-Zavaleta *et al.* 2010). Además, *C. glabrata* no mantiene la expresión de genes específicos del tipo celular; *i.e.* genes que en *S. cerevisiae* están expresados de manera específica debido a la regulación que ejerce el alelo que se encuentra presente en el locus *MAT*. En *C. glabrata* estos genes llamados específicos del tipo celular se expresan sin importar la información presente en los loci *MTL*, o incluso en ausencia de información de apareamiento [*mtl(1,2,3)*Δ] (Ramirez-Zavaleta *et al.* 2010).

***C. glabrata* contiene una variante del gen alfa2 más larga en el locus *CgMTL3* llamada alfa3.**

En este trabajo nosotros hemos mostrado primero que *C. glabrata* codifica dos variantes del gen *Cgalfa2* que nosotros hemos llamado *Cgalfa2* y *Cgalfa3*. *Cgalfa2* está codificado en el locus *CgMTL1* (en aislados clínicos con información alfa en este locus), y *Cgalfa3* está presente en *CgMTL3*. *CgMTL3*alfa3 está conservado en *C. glabrata*, ya que está presente en 4 aislados clínicos diferentes que nosotros hemos secuenciado (datos no mostrados). Sin embargo, *CgMTL3*alfa3 está silenciado en *C. glabrata* y por ello, solamente una pequeña fracción de la población de cualquier cultivo puede expresar *CgMTL3*alfa3.

La expresión simultánea de *Cga1-Cgalfa2* ó *Cga1-Cgalfa3* no presenta fenotipo observable en *C. glabrata*.

En células diploides de *S. cerevisiae* y células heterocigotas en el locus *MTL* de *C. albicans*, el heterodímero **a1-alfa2** se forma, el cual es un regulador transcripcional con propiedades diferentes a las que presentan las dos proteínas por separado (Goutte and Johnson 1993; Johnson 1995; Miller and Johnson 2002). En *S. cerevisiae*, el heterodímero **Sca1-Scafa2** reprime un grupo de genes que están involucrados en una variedad de procesos; por ejemplo, algunos genes son únicos de células haploides, otros están involucrados en meiosis, esporulación y respuesta a feromonas y estrés osmótico. En *C. albicans*, los genes reprimidos por el heterodímero **Caa1-Caalfa2** incluyen genes involucrados en el cambio morfogénico, algunos genes que participan en funciones relacionadas con el apareamiento, y otros más que se han relacionado con la virulencia (Bennett and Johnson 2003; Galgoczy *et al.* 2004). En este trabajo construimos cepas de *C. glabrata* que expresan ambos genes simultáneamente ***Cga1-Cgalfa2*** o ***Cga1-Cgalfa3*** para determinar si estas cepas muestran un fenotipo en el crecimiento bajo diferentes condiciones de estrés. Como se muestra en la Tabla 4 y Anexo 2, no encontramos ningún fenotipo en el crecimiento, incluso cuando evaluamos el crecimiento bajo diferentes condiciones de estrés o nutricionales en ambas cepas.

El hecho de que *C. glabrata* no parezca mantener la identidad del tipo celular; es decir, los genes llamados de tipo celular se expresan independientemente de la información presente en *CgMTL1*, sugiere que en *C. glabrata* estos genes podrían estar involucrados en la regulación de un conjunto de genes diferentes (Ramirez-Zavaleta *et al.* 2010). En un experimento preliminar en donde analizamos el transcriptoma de células que expresan ***Cga1-Cgalfa2*** o ***Cga1-Cgalfa3*** no encontramos diferencias en la expresión de los genes llamados específicos del tipo celular cuando se comparan con la cepa que no contiene información de apareamiento (*mtl1,2,3*) Δ . Aún falta analizar el transcriptoma de las cepas que expresan solamente uno de los genes de *CgMTL* y bajo diferentes condiciones para poder determinar qué genes, si existen algunos, están regulados por estos

factores de transcripción putativos. Además necesitamos realizar un experimento de ChIP-seq para encontrar si estas proteínas se unen a secuencias de ADN blanco.

Cga1 y Cgalfa2 pueden interaccionar para formar un heterodímero.

En *C. glabrata*, las variantes *Cgalfa2* y *Cgalfa3* comparten homología con el gen *Scalfa2* y conservan varios de los aminoácidos involucrados en la interacción con *Sca1* (Anexo 1). Para determinar si estas proteínas pueden interactuar entre ellas o formar homodímeros, realizamos fusiones traduccionales con los fragmentos N- o C-terminales de la proteína fluorescente YFP con el N-terminal de cada proteína, ya que en *S. cerevisiae* estas proteínas interactúan a través de sus respectivos C-terminales. Para este experimento las fusiones construidas están bajo la actividad del promotor inducible del gen *MET3* (Fig. 6A). Encontramos evidencia de una interacción directa entre *Cga1* y *Cgalfa2* pero no entre *Cga1* y *Cgalfa3*, mediante BiFC (Fig. 6B). Esto es notable ya que en las cepas naturales de *C. glabrata*, que son haploides, normalmente no expresan *Cga1* y *Cgalfa2* en la misma célula, ya que el ARNm de *Cga1* solamente se procesa correctamente cuando el transcrito proviene de *CgMTL1* (no de *CgMTL2*) y *Cgalfa2* se encuentra presente solamente en *CgMTL1* (no en *CgMTL3*). Por lo tanto, la única combinación que pudiera ocurrir de manera natural podría ser *Cga1* y *Cgalfa3* (de *CgMTL1a* y *CgMTL3alfa* respectivamente), o *Cgalfa2* y *Cgalfa3* (de *CgMTL1alfa* y *CgMTL3alfa* respectivamente), con ninguna de las cuales observamos la formación de heterodímeros. Sin embargo, la expresión artificial de *Cga1* y *Cgalfa2* (nuestra cepa construida), que podría formar heterodímeros, no dio lugar a fenotipos observables que se asociaran con éste. Es evidente que si estas proteínas tienen una función en *C. glabrata*, ésta no es similar a la previamente descrita en *S. cerevisiae*.

Pudimos detectar una interacción entre moléculas de *Cgalfa3*, esto indica una formación de homodímeros, no así para *Cgalfa2* en *C. glabrata* (Fig. 6B). Hasta el momento no se conoce si *Cgalfa3* u homodímeros de *Cgalfa3* pueden unirse a

ADN y tener una función específica. Estamos en proceso de construir cepas que solamente expresen *Cgalfa3* desde *CgMTL1* así como cepas que solamente expresen uno de los genes *MTL* desde *CgMTL1*.

El dato de que *Cga1* y *Cgalfa3* co-inmunoprecipitan pero no se detecta este heterodímero por BiFC, podría indicar que estas proteínas interactúan pero no de manera directa. De hecho podrían estar interactuando como parte de un complejo donde tal vez la proteína mayoritaria sea *Cgalfa3* y en menor cantidad, algunas moléculas de *Cga1*. Es posible que exista un impedimento estérico entre estas proteínas o que las etiquetas no permitan que la interacción se realice de manera correcta. El ensayo de co-inmunoprecipitación (CoIP) nos corrobora la interacción que se obtiene por BiFC entre las proteínas *Cga1-Cgalfa2* y *Cgalfa3-Cgalfa3* (Anexo 5) El homodímero *Cgalfa2-Cgalfa2* parece no formarse eficientemente, ya que sólo pudimos observar una señal muy débil por co-inmunoprecipitación pero no por BiFC, a diferencia de la formación muy eficiente de homodímeros de *Cgalfa3*.

V. Resultados y Discusión Adicionales

La información de apareamiento no tiene efecto en la colonización de un modelo murino en una infección sistémica cuando se realizan ensayos de competencia.

Para poder evaluar si la información de apareamiento tiene algún efecto sutil en la capacidad de colonización en una infección sistémica en *C. glabrata*, decidimos evaluar mediante ensayos de infección *in vivo* en competencia entre las cepas que expresan de manera simultánea los genes *Cga1-Cgalfa2* o *Cga1-Cgalfa3* y la cepa parental en un modelo murino (ver Materiales y Métodos). Analizamos la colonización del hígado, bazo y riñones de cada ratón. El experimento consistió en mezclar números iguales de células de la cepa parental y de una de las cepas que probamos para inyectarlas en la vena caudal de los ratones. La primera mezcla consistió en células de la cepa parental y la que expresa *Cga1-Cgalfa2* simultáneamente; la segunda mezcla fue la cepa parental y la que expresa *Cga1-Cgalfa3*. Además, inoculamos ratones con cada una de las cepas por separado. Los resultados que obtuvimos no muestran diferencias significativas en la capacidad de colonización de las cepas que se retaron con la cepa parental solamente comparada con las mezclas (Fig. 7). Podemos observar que la capacidad de colonización de las cepas con diferente información de apareamiento es similar. Estos datos sugieren que la capacidad de colonización de *C. glabrata* no se ve afectada por la presencia de los genes *Cga1*, *Cgalfa2* y *Cgalfa3*. Probablemente la capacidad de colonización de este hongo patógeno no está relacionada con la información de apareamiento como previamente se ha descrito para el hongo patógeno *C. albicans* (Bennett *et al.* 2003).

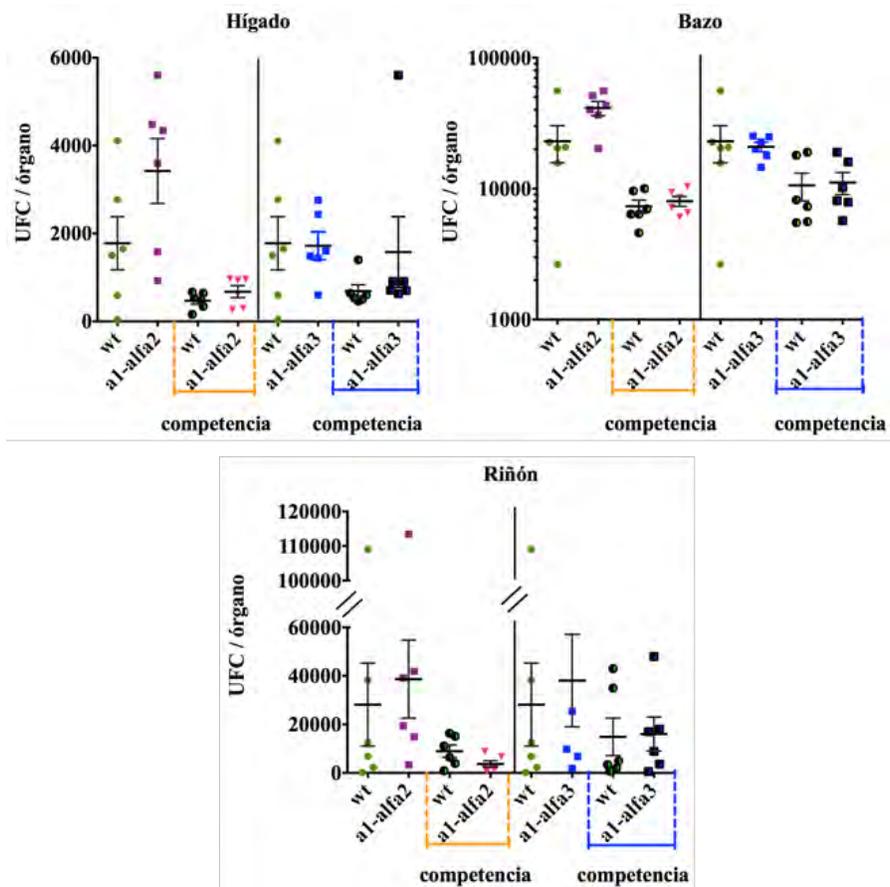


Figura 7. Ensayo de competencia de colonización en un modelo mÚrido de infecci3n sist3mica. Se infectaron grupos de 6 ratones con 4×10^7 c3lulas de las cepas indicadas por la vena caudal. Para la competencia se inocularon 2×10^7 c3lulas de la cepa parental y la misma cantidad para la cepa que expresa *Cga1-Cgalfa2* o *Cga1-Cgalfa3* al mismo tiempo (una relaci3n 1:1 de cada cepa por rat3n). Siete d3as despu3s de la infecci3n los ratones se sacrificaron y los 3rganos se homogenizaron y se platearon para determinar las unidades formadoras de colonias (u.f.c). Se muestran los datos de un experimento representativo. Cada s3mbolo representa un rat3n y la l3nea horizontal representa la media de los 6 ratones utilizados por grupo inoculados con cada cepa de *C. glabrata*.

La actividad del promotor de la catalasa no se ve afectada por la presencia de diferente informaci3n de apareamiento.

Con el fin de descartar completamente que las cepas que expresan de manera simult3nea los genes de apareamiento *Cga1-Cgalfa2* o *Cga1-Cgalfa3* no son sensibles a compuestos que causan estr3s oxidante, realizamos un ensayo en el que medimos la actividad del promotor de la catalasa, que es una enzima que

degrada el peróxido de hidrógeno, lo que contrarresta el daño que la célula presenta por estas especies ya sean producto de los procesos biológicos de la célula o de agentes externos. En la Fig. 8 podemos observar la inducción que el promotor presenta cuando la célula se incubaba en presencia de H_2O_2 durante 1 y 2.5h, en las cepas de *C. glabrata* que tienen diferente información de apareamiento. El resultado muestra que no hay una diferencia significativa de la actividad en comparación con la cepa parental. Esto nos indica que la información de apareamiento no regula la inducción del promotor de la catalasa en presencia de estrés oxidante por H_2O_2 .

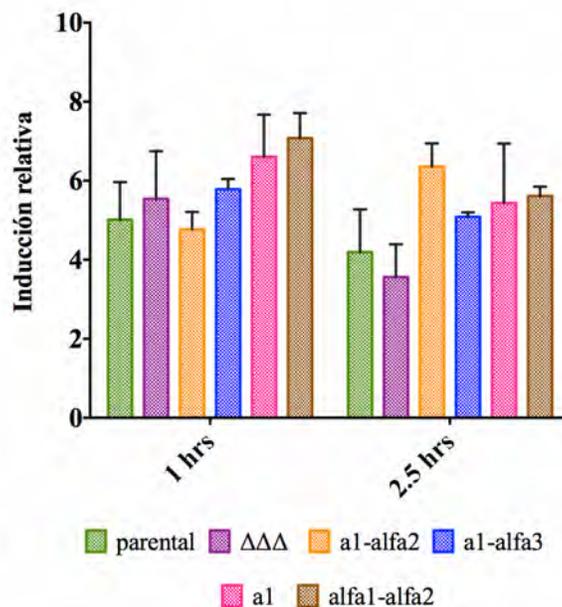


Figura 8. Actividad del promotor de la catalasa en diferentes fondos genéticos en cepas de *C. glabrata*. Las cepas de *C. glabrata* con la información de apareamiento indicada se transformaron con un plásmido que contiene una fusión transcripcional del promotor del gen de la catalasa *CTA1* con GFP. Cultivos en fase logarítmica de cada cepa se expusieron a una concentración de 5mM de H_2O_2 durante 1 y 2.5h, posteriormente se midieron las unidades de fluorescencia de cada una de ellas para evaluar la actividad del promotor de *CTA1*. Se realizaron tres experimentos independientes con duplicados técnicos y se realizó un análisis de 2wayANOVA con múltiple comparación con respecto a la cepa parental (color verde), $p \leq 0.05$. verde: cepa parental (BG14), morado: cepa que no expresa información de apareamiento ($\Delta\Delta\Delta$), naranja: cepa que expresa simultáneamente los genes *Cga1-Cgalfa2*, azul: cepa que expresa simultáneamente los genes *Cga1-Cgalfa3*, rosa: cepa que solo expresa el gen *Cga1* y café: cepa que expresa información alfa (*Cgalfa1-Cgalfa2*).

Evaluación del perfil transcriptómico de cepas de *C. glabrata* que expresan diferente información de apareamiento.

Con el fin de elucidar posibles rutas que fueran reguladas por la información de apareamiento en *C. glabrata*, decidimos realizar un análisis transcriptómico de cepas que expresaran diferente información de apareamiento, de manera que los datos nos indiquen qué genes podrían estar controlados por uno o combinaciones de los genes codificados en los loci *CgMTL*, que no se ve reflejado en la caracterización fenotípica que realizamos previamente. Para determinar el perfil transcriptómico, analizamos la cepa parental BG14, la cepa que no contiene información de apareamiento ($\Delta\Delta\Delta$), la cepa que expresa *Cga1-Cgalfa2*, la cepa que expresa *Cga1-Cgalfa3*, una cepa que expresa solamente el gen *Cga1* y otra cepa que expresa información alfa (*Cgalfa1* y *Cgalfa2*). Analizamos estas cepas en dos estadios de crecimiento diferentes en medio rico YPD, tanto en fase estacionaria (48h de cultivo) como fase logarítmica (7 duplicaciones). Cosechamos las células y se congelaron a -70°C . Estas células congeladas las enviamos a la compañía BGI Americas para la extracción de RNA, construcción de bibliotecas de cDNA y secuenciación.

El primer análisis que realizamos fue la comparación en fase logarítmica de crecimiento de los transcriptomas de las diferentes cepas evaluadas contra la cepa que no contiene información de apareamiento ($\Delta\Delta\Delta$). En la Fig. 9 se presentan los genes inducidos y reprimidos en cada una de las cepas comparadas con la cepa sin información (*mtl1,2,3*) Δ . El análisis de los genes inducidos (Fig. 9A) nos muestra que las cepas que expresan ambos tipos de información (*Cga1-Cgalfa2* ó *Cga1-Cgalfa3*), la cepa que expresa información alfa (*Cgalfa1* y *Cgalfa2*) y la cepa parental, inducen pocos genes propios de cada cepa comparadas con la (*mtl1,2,3*) Δ . Sin embargo, lo sorprendente en este análisis es que la cepa que expresa solamente el gen *Cga1* induce 106 genes.

Para comparar los patrones de expresión de cada cepa, realizamos una comparación de los 106 genes inducidos en la cepa que expresa *Cga1* (respecto a

la (*mtl1,2,3*) Δ), con el nivel de expresión de estos mismos 106 genes en las demás cepas evaluadas (todas comparadas con la (*mtl1,2,3*) Δ y realizamos un heatmap (Fig. 11A). Este heatmap nos indica mediante el cambio de color, el nivel de expresión de cada uno de los 106 genes inducidos en la cepa que expresa *Cga1*, para cada una de las cepas analizadas. Los datos obtenidos sugieren que el gen *Cga1* puede funcionar como un activador (directa o indirectamente) ya que en cepas que no expresan información de apareamiento (cepa $\Delta\Delta\Delta$) estos genes se encuentran completamente reprimidos. La cepa parental presenta un perfil de expresión parecido a la cepa que expresa información α solamente (gen *Cga1*); sin embargo, se pueden observar varios genes que no presentan un cambio de expresión. Es posible que la fracción de la población que expresa *Cgalfa3* desde el locus *MTL3* forme un heterodímero entre *Cgalfa3* y *Cga1* que titule la cantidad del gen activador *Cga1* y de esta manera bloquee su función. En las cepas que expresan ambos tipos de información *Cga1-Cgalfa2* o *Cga1-Cgalfa3*, los perfiles de expresión de estos 106 genes son parecidos entre sí, pero diferentes de la cepa que solamente expresa *Cga1*. Por ejemplo, la cepa que expresa solamente el gen α la mayoría de estos genes ya no se inducen en las cepas que expresan *Cga1-Cgalfa2* o *Cga1-Cgalfa3*. Es posible que los genes *Cgalfa2* o *Cgalfa3* pudieran bloquear la activación de estos genes, este bloqueo pudiera ser debido a la formación del heterodímero que titularía la proteína *Cga1* o la interacción entre *Cga1-Cgalfa2* podría provocar un cambio conformacional que impida la unión a DNA para la activación de genes. También, la formación del homodímero que forma *Cgalfa3* podría evitar una posible interacción de *Cga1* con sus regiones blanco. El perfil de la cepa que solamente expresa información alfa es completamente diferente de las otras cepas. Estos datos y los anteriormente descritos sugieren que estos genes se encuentran regulados ya sea de manera directa o indirecta por la información α (gen *Cga1*) en *C. glabrata*.

Algunos de los genes que se pueden destacar que se encuentran inducidos en la cepa α R (expresa gen *Cga1*) son algunos cuya función se ha descrito como adhesinas: los genes *PWP1*, *EPA20*, *EPA10* y *EPA9*, este último se sabe que media la adhesión de *C. glabrata* a células epiteliales. Estos conocimientos nos

pueden permitir iniciar estudios para deducir posibles motivos que *Cga1* pudiera reconocer en el DNA para inducir la expresión de genes o su posible función en la inducción de genes que median adhesión en *C. glabrata*.

Además al realizar el análisis ontológico de estos genes se observa el enriquecimiento de la respuesta celular a iones de plata (2 genes de 3 involucrados), de cobre (2 genes de 3 involucrados) y también se tienen varios transportadores transmembranales representados (3 genes de 11 involucrados). Es importante destacar que de los 7 genes de tRNA que cargan el amino ácido tirosina, 6 se inducen fuertemente en la cepa que expresa solamente *Cga1* (genes que adaptan amino ácidos UAC) (Fig. 9C).

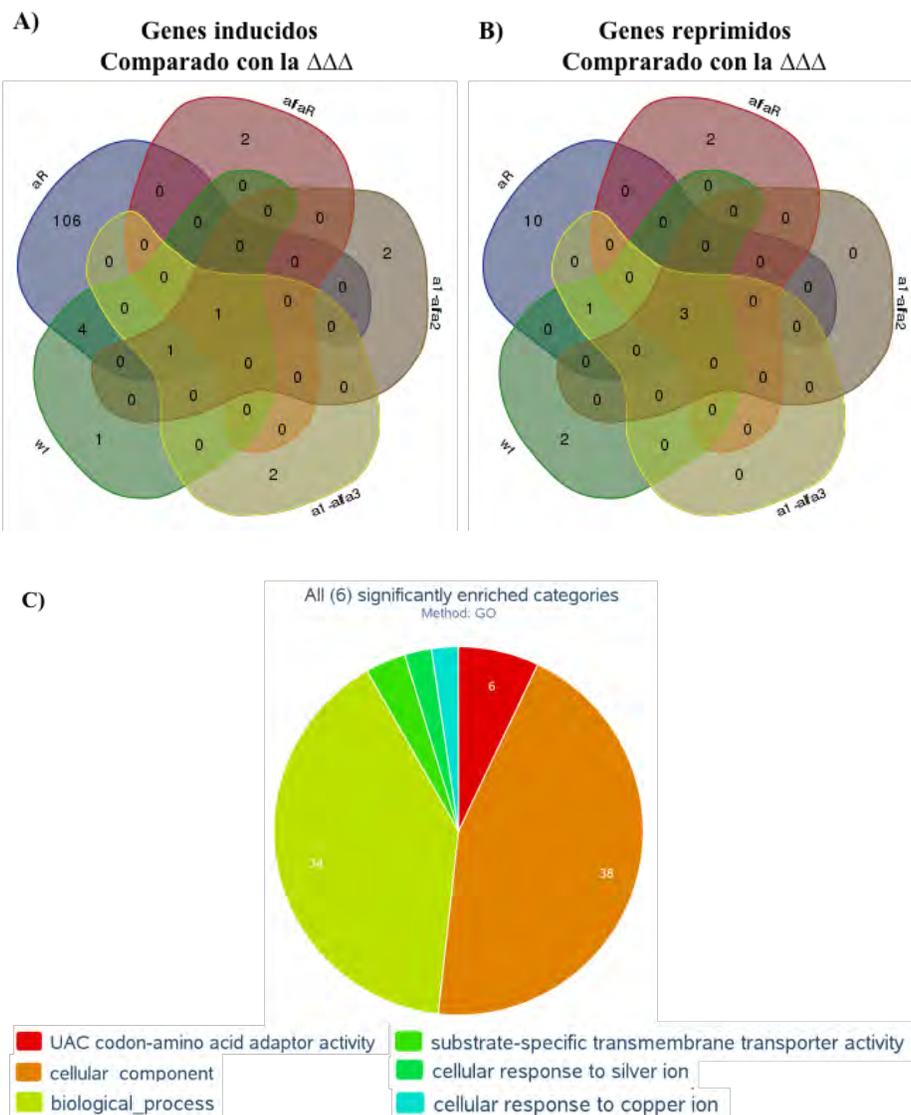


Figura 9. Diagramas de Venn de genes inducidos y reprimidos en fase logarítmica de cepas de *C. glabrata* con diferente información de apareamiento. A) Genes que se encuentran inducidos en las cepas: wt (BG14, parental), aR (*CgMTL1a1*, CGM904), alfaR (*CgMTL1alfa1*, alfa2, CGM707), *Cga1-Cgalfa2* (CGM1552), *Cga1-Cgalfa3* (CGM1569) en comparación con la cepa que no contiene información de apareamiento $\Delta\Delta\Delta$ (CGM531). **B)** Diagrama de Venn que representa los genes que se encuentran reprimidos en cada una de las cepas evaluadas con respecto a la cepa que no contiene información de apareamiento. (<http://bioinformatics.psb.ugent.be/software/details/Venn-Diagrams>). **C)** Enriquecimiento de categorías GO de los 106 genes inducidos en la cepa que expresa información a (gen *Cga1*). (Priebe *et al.* 2015)

Los genes que se encuentran reprimidos en fase logarítmica son un número pequeño en general y tenemos nuevamente que la cepa que expresa sólo información a, reprime 14 genes en general y 10 de ellos son propios de esta cepa (Fig. 9B). Al comparar estos 10 genes propios de expresar solamente el gen *Cga1* con las cepas que tienen otro tipo de información de apareamiento, encontramos que se encuentran reprimidos también; sin embargo, en la cepa que no expresa información de apareamiento (*mtl(1,2,3)* Δ) se encuentran inducidos. Al tener un número tan pequeño de genes no es factible poder hacer una relación con alguna ruta en particular. Sin embargo, una observación importante en los genes reprimidos son los 3 genes compartidos entre las cepas con diferente información de apareamiento en comparación con la cepa triple mutante ($\Delta\Delta\Delta$), ya que 2 de los 5 genes que están involucrados en la biosíntesis de la tiamina se encuentran reprimidos. Estos genes son *THI4* y *THI20* y su actividad se encuentra relacionada con la obtención de precursores del medio ambiente para sintetizar tiamina. Es interesante este perfil ya que *C. glabrata* es auxótrofa de tiamina. Es probable que esto se deba al nicho donde se encuentra *C. glabrata* ya que puede tomar esta vitamina o precursores de éste del hospedero (losue *et al.* 2016). Además encontramos que las cepas parental (wt), que expresa *Cga1* (aR) y la cepa que expresa simultáneamente *Cga1-Cgalfa3* tienen reprimido además el gen *PET18*, que también está involucrado en la ruta del metabolismo de la tiamina. Esto podría sugerir que el gen *Cga1* podría reprimir este gen (con lo cual son 3 genes de 5 de esta ruta que están reprimidos en estas cepas). Sin embargo, no se tiene

conocimiento suficiente de esta ruta y sería importante evaluar el crecimiento con concentraciones limitantes de esta vitamina, así como los precursores para la biosíntesis de la tiamina (vitamina B1) en las cepas que expresan diferente información de apareamiento.

Por otra parte, los perfiles transcriptómicos de las cepas en fase estacionaria no muestran diferencias significativas en la cantidad de genes inducidos o reprimidos como se muestra en la Fig. 10. La comparación realizada fue contra la cepa que no expresa información de apareamiento (*mtl1, 2, 3*) Δ . Es probable que la función que estos genes pudieran tener en *C. glabrata* estaría no relacionada con el apareamiento; más bien, podrían estar involucrados en alguna ruta que sea propia del crecimiento de este hongo en fase logarítmica y no tanto en fase estacionaria.

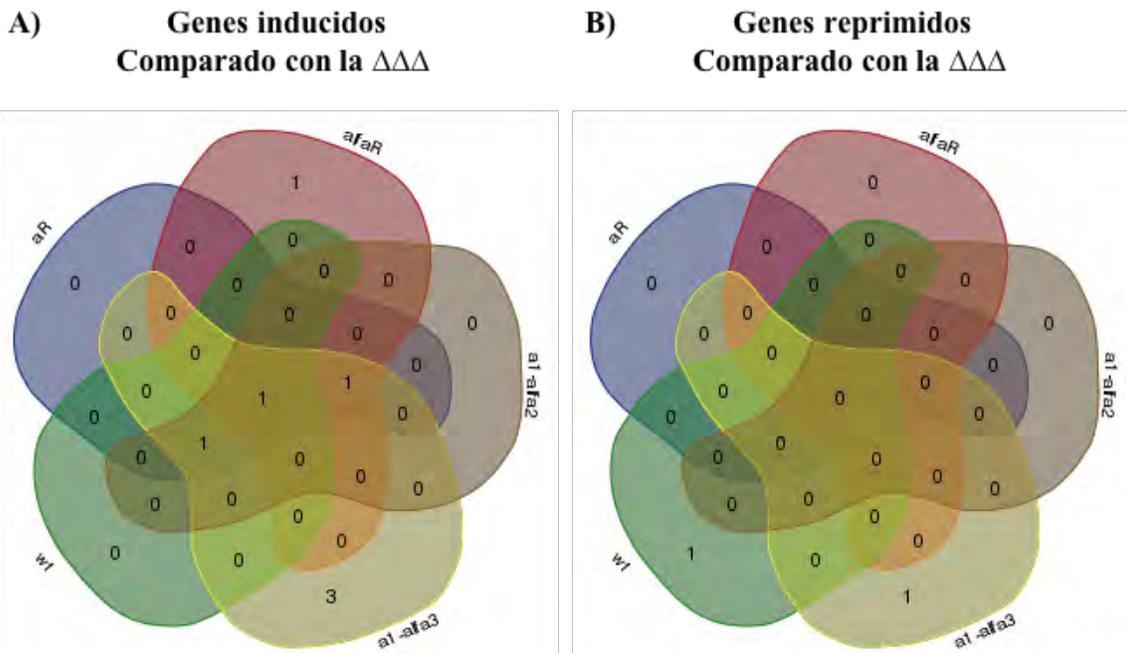


Figura 10. Genes inducidos o reprimidos en cepas de *C. glabrata* con diferente información de apareamiento en fase estacionaria. A) Diagrama de Venn que presenta los genes inducidos en fase estacionaria de las cepas con diferente información de apareamiento en comparación con la cepa triple mutante nula ($\Delta\Delta\Delta$). **B)** Diagrama de Venn que presenta los genes reprimidos en fase estacionaria de cada una de las cepas con diferente información de apareamiento en comparación con la cepa triple mutante nula ($\Delta\Delta\Delta$).

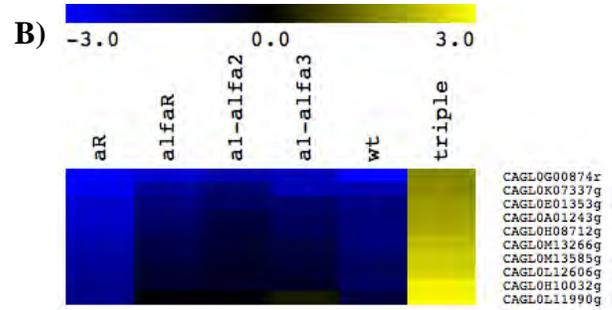
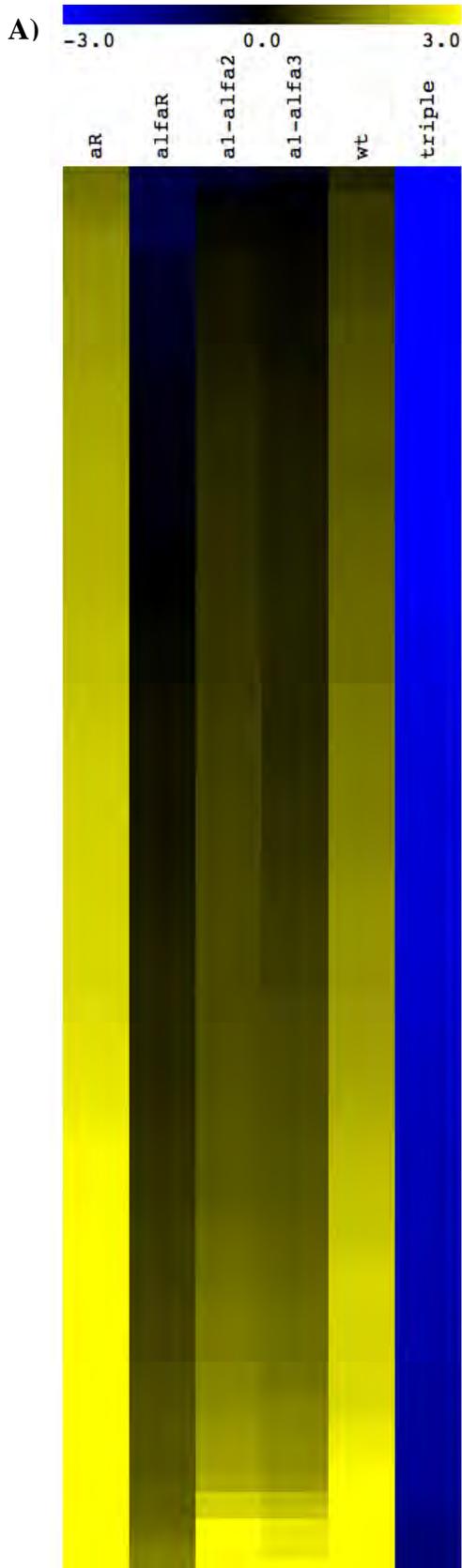


Figura 11. Heatmap que compara los genes que se encuentran inducidos o reprimidos en la cepa con información tipo a contra las cepas que contienen otro tipo de información de apareamiento. A) Comparación de 106 genes inducidos en fase logarítmica propios de la cepa que expresa el gen *Cga1* solamente contra las cepas que contienen diferente información de apareamiento. **B)** Representación del perfil de expresión de los 10 genes que se encuentran reprimidos propios de expresar el gen *Cga1* en comparación con las cepas que expresan diferente información de apareamiento. Los colores indican el nivel de expresión que cada gen presenta en las diferentes cepas de *C. glabrata*.

VI. Referencias

- Anders S, Huber W. Differential expression analysis for sequence count data. *Genome Biol* 2010;**11**:R106.
- Ausubel F, Brent R, Kingson RE *et al.* *Current Protocols in Molecular Biology*. New York: Wiley & Sons, Inc., 2001.
- Bennett RJ, Johnson AD. Completion of a parasexual cycle in *Candida albicans* by induced chromosome loss in tetraploid strains. *EMBO J* 2003;**22**:2505–15.
- Bennett RJ, Uhl MA, Miller MG *et al.* Identification and Characterization of a *Candida albicans* Mating Pheromone. *Mol Cell Biol* 2003;**23**:8189–201.
- Bolger AM, Lohse M, Usadel B. Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinformatics* 2014;**30**:2114–20.
- Bray NL, Pimentel H, Melsted P *et al.* Near-optimal probabilistic RNA-seq quantification. *Nat Biotechnol* 2016;**34**:525–7.
- Briones-Martin-del-Campo M, Orta-Zavalza E, Juárez-Cepeda J *et al.* The oxidative stress response of the opportunistic fungal pathogen *Candida glabrata*. *Revista Iberoamericana de Micología* 2014;**31**:67–71.
- Butler G. Fungal Sex and Pathogenesis. *Clinical Microbiology Reviews* 2010;**23**:140–59.
- Castano I, Kaur R, Pan S *et al.* Tn7-based genome-wide random insertional mutagenesis of *Candida glabrata*. *Genome Research* 2003;**13**:905–15.
- Cormack BP, Falkow S. Efficient homologous and illegitimate recombination in the opportunistic yeast pathogen *Candida glabrata*. *Genetics* 1999;**151**:979–87.
- Fabre E. Comparative Genomics in Hemiascomycete Yeasts: Evolution of Sex, Silencing, and Subtelomeres. *Molecular Biology and Evolution* 2005;**22**:856–73.
- Galgoczy DJ, Cassidy-Stone A, Llinás M *et al.* Genomic dissection of the cell-type-specification circuit in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004;**101**:18069–74.
- Gallegos-García V, Pan S-J, Juárez-Cepeda J *et al.* A novel downstream regulatory element cooperates with the silencing machinery to repress EPA1 expression in *Candida glabrata*. *Genetics* 2012;**190**:1285–97.
- Gietz RD, Sugino A. New yeast-*Escherichia coli* shuttle vectors constructed with in

- vitro mutagenized yeast genes lacking six-base pair restriction sites. *Gene* 1988;**74**:527–34.
- Goutte C, Johnson AD. Yeast a1 and alpha 2 homeodomain proteins form a DNA-binding activity with properties distinct from those of either protein. *J Mol Biol* 1993;**233**:359–71.
- Gutiérrez-Escobedo G, Orta-Zavalza E, Castano I *et al.* Role of glutathione in the oxidative stress response in the fungal pathogen *Candida glabrata*. *Curr Genet* 2013;**59**:91–106.
- Hanson SJ, Byrne KP, Wolfe KH. Mating-type switching by chromosomal inversion in methylotrophic yeasts suggests an origin for the three-locus *Saccharomyces cerevisiae* system. *Proc Natl Acad Sci USA* 2014;**111**:E4851–8.
- Homann OR, Dea J, Noble SM *et al.* A phenotypic profile of the *Candida albicans* regulatory network. Copenhaver GP (ed.). *PLoS Genet* 2009;**5**:e1000783.
- Inglis DO, Arnaud MB, Binkley J *et al.* The *Candida* genome database incorporates multiple *Candida* species: multispecies search and analysis tools with curated gene and protein information for *Candida albicans* and *Candida glabrata*. *Nucleic Acids Research* 2012;**40**:D667–74.
- Iosue CL, Attanasio N, Shaik NF *et al.* Partial Decay of Thiamine Signal Transduction Pathway Alters Growth Properties of *Candida glabrata*. Polymenis M (ed.). *PLoS ONE* 2016;**11**:e0152042–18.
- Johnson AD. Molecular mechanisms of cell-type determination in budding yeast. *Curr Opin Genet Dev* 1995;**5**:552–8.
- Lee C-S, Haber JE. Mating-type Gene Switching in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol Spectr* 2015;**3**:MDNA3–0013–2014.
- Miller MG, Johnson AD. White-opaque switching in *Candida albicans* is controlled by mating-type locus homeodomain proteins and allows efficient mating. *Cell* 2002;**110**:293–302.
- Muller H, Hennequin C, Gallaud J *et al.* The Asexual Yeast *Candida glabrata* Maintains Distinct a and Haploid Mating Types. *Eukaryotic Cell* 2008;**7**:848–58.
- Murakami CJ, Burtner CR, Kennedy BK *et al.* A method for high-throughput quantitative analysis of yeast chronological life span. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 2008;**63**:113–21.
- Orta-Zavalza E, Guerrero-Serrano G, Gutiérrez-Escobedo G *et al.* Local silencing controls the oxidative stress response and the multidrug resistance in *Candida glabrata*. *Molecular Microbiology* 2013;**88**:1135–48.

- Priebe S, Kreisel C, Horn F *et al.* FungiFun2: a comprehensive online resource for systematic analysis of gene lists from fungal species. *Bioinformatics* 2015;**31**:445–6.
- Ramirez-Zavaleta CY, Salas-Delgado GE, Las Penas De A *et al.* Subtelomeric Silencing of the MTL3 Locus of *Candida glabrata* Requires yKu70, yKu80, and Rif1 Proteins. *Eukaryotic Cell* 2010;**9**:1602–11.
- Robinson MD, McCarthy DJ, Smyth GK. edgeR: a Bioconductor package for differential expression analysis of digital gene expression data. *Bioinformatics* 2010;**26**:139–40.
- Robledo-Márquez K, Gutiérrez-Escobedo G, Yáñez-Carrillo P *et al.* *Candida glabrata* encodes a longer variant of the mating type (MAT) alpha2 gene in the mating type-like MTL3 locus, which can form homodimers. *FEMS Yeast Research* 2016:fow082.
- Sherman F, Fink GR, Hicks JB. *Methods in Yeast Genetics*. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1986.
- Smith DL, Johnson AD. A molecular mechanism for combinatorial control in yeast: MCM1 protein sets the spacing and orientation of the homeodomains of an alpha 2 dimer. *Cell* 1992;**68**:133–42.
- Srikantha T, Lachke SA, Soll DR. Three Mating Type-Like Loci in *Candida glabrata*. *Eukaryotic Cell* 2003;**2**:328–40.
- Sung M-K, Huh W-K. Bimolecular fluorescence complementation analysis system for in vivo detection of protein-protein interaction in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* 2007;**24**:767–75.
- Tan S, Richmond TJ. Crystal structure of the yeast MATalpha2/MCM1/DNA ternary complex. *Nature* 1998;**391**:660–6.
- Tsong AE, Miller MG, Raisner RM *et al.* Evolution of a combinatorial transcriptional circuit: a case study in yeasts. *Cell* 2003;**115**:389–99.
- Wong S, Fares MA, Zimmermann W *et al.* Evidence from comparative genomics for a complete sexual cycle in the “asexual” pathogenic yeast *Candida glabrata*. *Genome Biol* 2003;**4**, DOI: 10.1186/gb-2003-4-2-r10.
- Yáñez-Carrillo P, Robledo-Márquez KA, Ramírez-Zavaleta CY *et al.* The mating type-like loci of *Candida glabrata*. *Revista Iberoamericana de Micología* 2014;**31**:30–4.
- Zordan RE, Ren Y, Pan S-J *et al.* Expression Plasmids for Use in *Candida glabrata*. *G3* 2013;**3**:g3.113.006908–1686.

Anexo 2. Condiciones nutricionales evaluadas en las cepas que expresan simultáneamente *Cga1-Cga1a2* o *Cga1-Cga1a3*. Las cepas de *C. glabrata* con diferente información de apareamiento asimilan de igual manera las diferentes fuentes nutricionales.

Condición Nutricional	Fenotipo comparado con la cepa parental ^a
Sin Fuente de Nitrógeno	NF
Amonio	NF
Prolina	NF
Isoleucina	NF
Ornitina	NF
GABA	NF
Sin Fuente de Carbono	NF
Glucosa ^b	NF
Glicerol	NF
Manitol	NF
Manosa	NF
Etanol ^b	NF
Acetato de Potasio ^b	NF
EDTA	NF

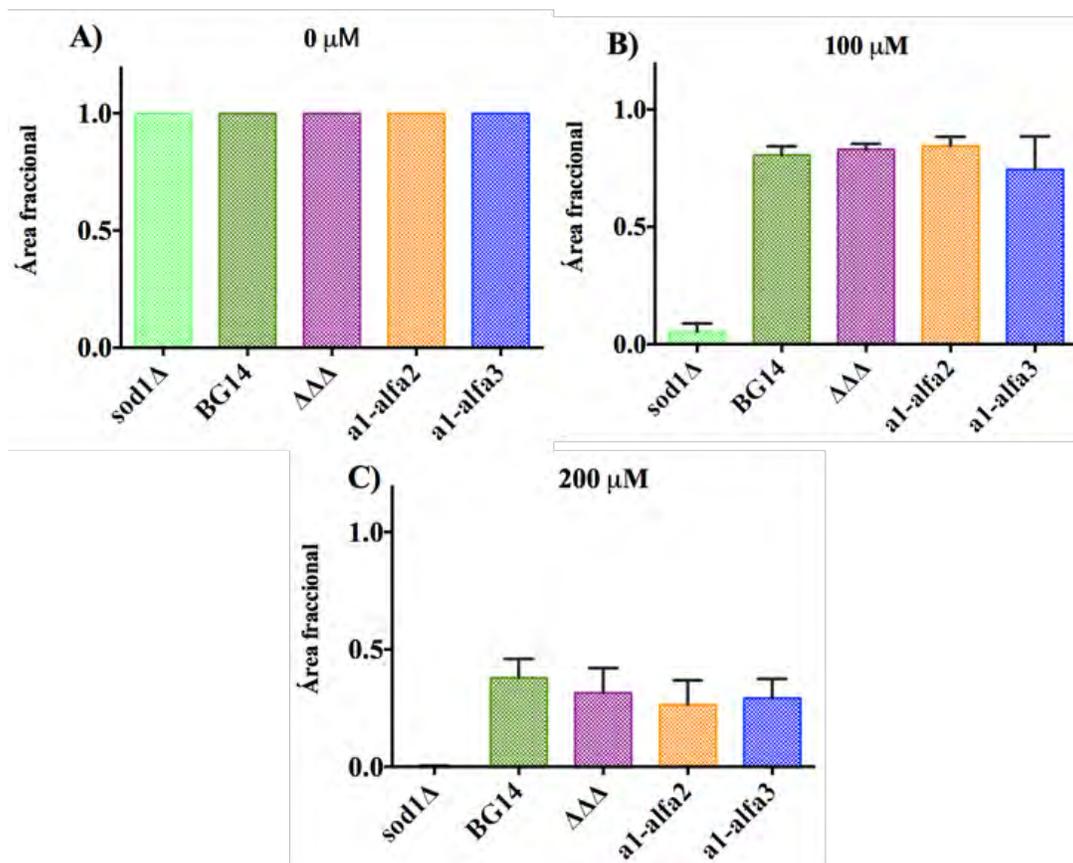
^a las cepas utilizadas fueron: BG14 (*CgMTL1a*); *Cg(mtl1,2,3)*Δ; *CgMTL1a1-alfa2*; and *CgMTL1a1-alfa3*.

^b Los experimentos se realizaron en medio líquido (YP) con las diferentes fuentes de carbono en el aparato BioscreenC. Se realizaron mediciones de la DO₆₀₀ cada 20min y se calculó el tiempo de duplicación de cada cepa en cada medio evaluado. Las demás fuentes nutricionales evaluadas fueron mediante medio sólido.

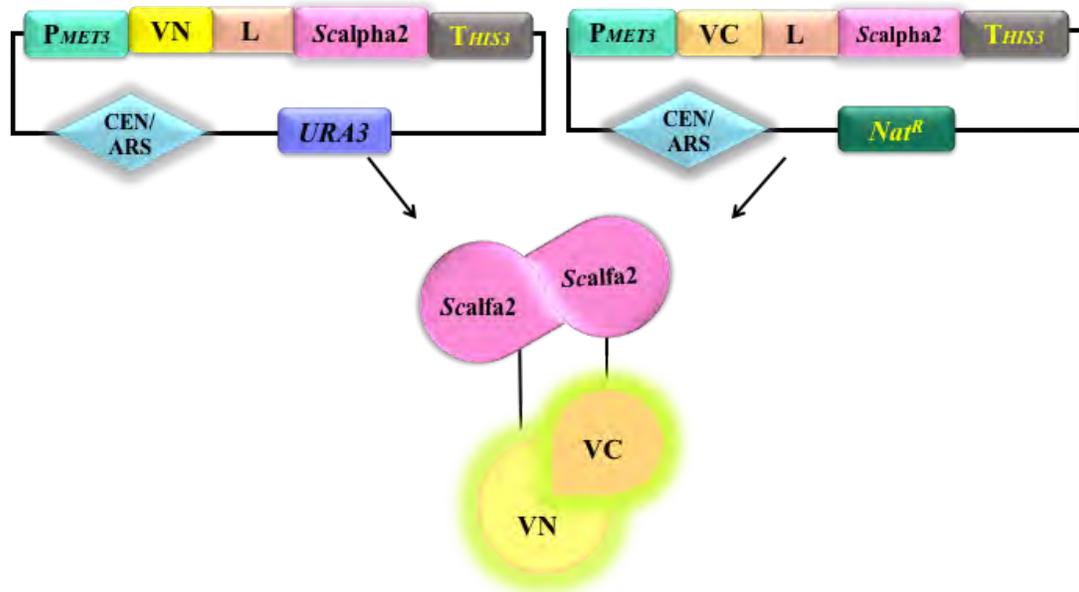
Los medios se prepararon como se describe en (Homann *et al.* 2009) con excepción de los medios con manosa, acetato de potasio y etanol (en líquido, ver Materiales y Métodos).

NF: no hay diferencia en el fenotipo detectado con respecto a la cepa parental BG14.

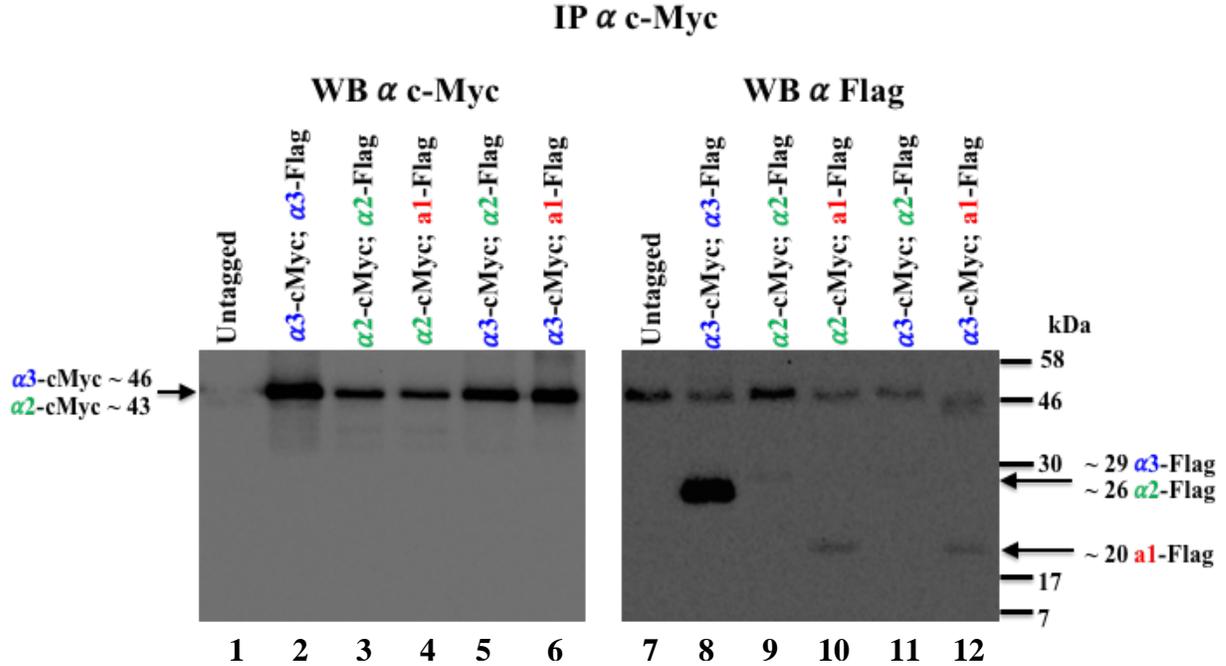
Menadiona



Anexo 3. Células de fase logarítmica de cepas de *C. glabrata* que expresan de manera simultánea *Cga1-Cgalfa2* o *Cga1-Cgalfa3* son susceptibles de igual manera a menadiona que la cepa parental BG14. Células en fase estacionaria (crecidas a 30°C por 48h en YPD) de las cepas indicadas se diluyeron en medio YPD fresco para que después de 8 duplicaciones se tuviera una DO_{600} de 0.5. Las suspensiones celulares fueron divididas en diferentes tubos y se adicionó menadiona a 100 μM ó 200 μM y se incubaron a 30°C, 2h, después de ese tiempo el oxidante se removió. Las células se lavaron con agua estéril y se ajustó la DO_{600} a 0.01 con medio YPD fresco y se realizaon curvas de crecimiento en el aparato Bioscreen C para calcular las áreas fraccionales bajo la curva, esto es proporcional a la viabilidad celular. El área fraccional de la cepa parental BG14 fue estandarizada a 100%. El experimento se repitió tres veces. Como control de sensibilidad se incluyó la cepa *sod1 Δ* .



Anexo 4. Representación esquemática de la Complementación Bimolecular por Fluorescencia (BiFC) utilizada para determinar la interacción proteína-proteína entre *Cga1*, *Cgalfa2* y *Cgalfa3*, o interacciones para formar homodímeros entre ellas mismas. Las construcciones están bajo la actividad del promotor inducible *CgMET3* (P_{MET3}) y las fusiones con los fragmentos N- o C-terminal de la proteína Venus-YFP (VN ó VC respectivamente), fueron realizadas con los extremos N-terminal de las proteínas *Cga1* ó *Cgalfa* separados mediante un linker (L) que consiste en 5 repeticiones de los aminoácidos G y A (Materiales y Métodos). Como control positivo se utilizó *Scalpa2*, el cual forma homodímeros (ejemplo mostrado)



Anexo 5. Interacción física entre las proteínas *Cgalfa2*, *Cgalfa3* y *Cga1* mediante Co-inmunoprecipitación. Las cepas no contienen información de apareamiento ($\Delta\Delta\Delta$) y fueron transformadas con plásmidos que contienen la información indicada con los dos epítomos fusionados a cada proteína dirigidos por el promotor P_{MT1} . Se indujo la actividad del promotor con la adición de 2mM de CuSO_4 . El lisado celular fue inmunoprecipitado usando perlas de sefarosa acopladas a anti-cMyc. Se corrió un gel de acrilamida con los inmunoprecipitados y se transfirió a una membrana PVDF para realizar el análisis de Western blot. A la izquierda se tiene el gel correspondiente al input donde se utilizó el anticuerpo primario α -cMyc y en el gel de la derecha se utilizó el anticuerpo primario α -Flag (Co-IP). Carril 1 y 7 corresponden a los lisados celulares de la cepa que no expresa información de apareamiento ($\Delta\Delta\Delta$) y no contiene plásmido; carril 2 y 8 corresponde a los lisados celulares de la cepa $\Delta\Delta\Delta$ que contiene los plásmidos cMyc-*Cgalfa3* y Flag-*Cgalfa3*; carril 3 y 9 corresponde a los lisados de la cepa que expresa los plásmidos cMyc-*Cgalfa2* y Flag-*Cgalfa2*; carril 4 y 10 corresponde a los lisados celulares de la cepa que expresa los plásmidos cMyc-*Cgalfa2* y Flag-*Cga1*; carril 5 y 11 corresponde a los lisados celulares de la cepa que expresa los plásmidos cMyc-*Cgalfa3* y Flag-*Cgalfa2*; por último, carril 6 y 12 corresponde a los lisados celulares de la cepa que expresa cMyc-*Cgalfa3* y Flag-*Cga1*.

VIII. Tablas de Anexos

Tabla A1. Cepas generadas en este trabajo

		Genotipo	Referencia
Cepas de <i>E. coli</i>			
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 araD139</i> Δ(<i>ara,leu</i>)7697 <i>galU galK λ⁻ rpsL 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.html#
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-Zavaleta <i>et al.</i> , 2010)
CGM526	CGM498	<i>ura3</i> Δ::Tn903 G418 ^R , (<i>mtl1</i> , <i>mtl2</i> :: <i>hph</i> , <i>mtl3</i>)Δ Hyg ^R (utilizando pRZ15)	Colección de laboratorio
CGM531	BG14	<i>ura3</i> Δ::Tn903 G418 ^R , (<i>mtl1</i> , <i>mtl2</i> , <i>mtl3</i>)Δ Hyg ^S (utilizando pMZ18)	(Ramirez-Zavaleta <i>et al.</i> , 2010)
CGM557		<i>ura3</i> Δ::Tn903 G418 ^R , (<i>mtl2</i> , <i>mtl3</i>)Δ Hyg ^S	
CGM707	BG14	<i>ura3</i> Δ::Tn903 G418 ^R , <i>mtl1</i> Δ:: <i>MTL1α</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
CGM983			
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
CGM2947	CGM531	pVA92, <i>URA3</i> ⁺ pMT1::c-Myc-linker:: <i>Cgalpha2</i>	Colección de

			laboratorio
CGM2953	CGM531	pVA90, <i>URA3</i> ⁺ pMT1::c-Myc-linker:: <i>Cgalpha3</i>	Colección de laboratorio
Cepas control para BiFC en <i>Candida glabrata</i>			
CGM2612-13	CGM531	pCU, <i>URA</i> ⁺	Este trabajo
CGM2614-15	CGM531	pCU::GFP, <i>URA</i> ⁺	Este trabajo
CGM2616-17	CGM531	pRM89 pCU::L-VN, <i>URA</i> ⁺	Este trabajo
CGM2618-19	CGM531	pRM103 pCU::VC-L, <i>URA</i> ⁺	Este trabajo
CGM2620-21	CGM531	pRM93, <i>URA</i> ⁺ pCU:: HDF1 ::L-VN	Este trabajo
CGM2622-23	CGM531	pRM120, <i>URA</i> ⁺ pCU:: HDF2 ::L-VN	Este trabajo
CGM2653-54	CGM2620	pRM95, <i>URA</i> ⁺ , NAT ^R pCU:: HDF1 ::L-VN, pCN:: HDF1 ::L-VC	Este trabajo
CGM2655-56	CGM2620	pRM118, <i>URA</i> ⁺ , NAT ^R pCU:: HDF1 ::L-VN, pCN:: HDF2 ::L-VC	Este trabajo
CGM2657-58	CGM2622	pRM95, <i>URA</i> ⁺ , NAT ^R pCU:: HDF2 ::L-VN, pCN:: HDF1 ::L-VC	Este trabajo
CGM2659-60	CGM2622	pRM118, <i>URA</i> ⁺ , NAT ^R pCU:: HDF2 ::L-VN, pCN:: HDF2 ::L-VC	Este trabajo
CGM2705-06	CGM2622	pRM130, <i>URA</i> ⁺ , NAT ^R pCU:: HDF2 ::L-VN, pCN::VC-L:: HDF1	Este trabajo
CGM2715-16	CGM2630	pRM130, <i>URA</i> ⁺ , NAT ^R pCU::VC-L:: alfa2 , pCN::VC-L:: HDF1	Este trabajo
CGM2921-22	CGM531	pRM151, <i>URA</i> ⁺ pCU::VC-L:: Scalfa2	Este trabajo
CGM2923-24	CGM531	pRM150, NAT ^R pCN::VN-L:: Scalfa2	Este trabajo
CGM2925-26	CGM531	pRM150 y pRM151, <i>URA</i> ⁺ , NAT ^R pCU::VC-L- Scalfa2 , pCN::VN-L- Scalfa2 (control positivo)	Este trabajo
CGM3012	CGM531	pRM148 y pRM151, <i>URA</i> ⁺ , NAT ^R pCU::VC-L- Scalfa2 , pCN::VC-L- Scalfa2 (control negativo)	Este trabajo
Cepas con los genes <i>Cga1</i>, <i>Cgalfa2</i> y <i>Cgalfa3</i> para BiFC en <i>Candida glabrata</i>			
CGM2624-25	CGM531	pRM91, <i>URA</i> ⁺ pCU:: <i>Cgalfa3</i> ::L-VN	Este trabajo
CGM2626-27	CGM531	pRM114, <i>URA</i> ⁺ pCU:: <i>Cgalfa2</i> ::L-VN	Este trabajo
CGM2628-29	CGM531	pRM111, <i>URA</i> ⁺ pCU::VC-L:: <i>Cgalfa3</i>	Este trabajo
CGM2630-	CGM531	pRM109, <i>URA</i> ⁺	Este

31		pCU::VC-L:: Cgalfa2	trabajo
CGM2661-62	CGM2624	pRM97, <i>URA</i> ⁺ , NAT ^R pCU:: Cgalfa3 ::L-VN, pCN:: Cgalfa2 ::L-VC	Este trabajo
CGM2663-64	CGM2624	pRM99, <i>URA</i> ⁺ , NAT ^R pCU:: Cgalfa3 ::L-VN, pCN:: Cgalfa3 ::L-VC	Este trabajo
CGM2665-66	CGM2624	pRM105, <i>URA</i> ⁺ , NAT ^R pCU:: Cgalfa3 ::L-VN, pCN::VC-L:: Cgalfa3	Este trabajo
CGM2667-68	CGM2624	pRM113, <i>URA</i> ⁺ , NAT ^R pCU::VC-L:: Cgalfa3 , pCN::VN-L:: Cgalfa3	Este trabajo
CGM2669-70	CGM2626	pRM97, <i>URA</i> ⁺ , NAT ^R pCU:: Cgalfa2 ::L-VN, pCN:: Cgalfa2 ::L-VC	Este trabajo
CGM2671-72	CGM2626	pRM99, <i>URA</i> ⁺ , NAT ^R pCU:: Cgalfa2 ::L-VN, pCN:: Cgalfa3 ::L-VC	Este trabajo
CGM2673-74	CGM2626	pRM105, <i>URA</i> ⁺ , NAT ^R pCU:: Cgalfa2 ::L-VN, pCN::VC-L:: Cgalfa3	Este trabajo
CGM2675-76	CGM2626	pRM113, <i>URA</i> ⁺ , NAT ^R pCU:: Cgalfa2 ::L-VN, pCN::VC-L:: Cgalfa2	Este trabajo
CGM2677-78	CGM2628	pRM107, <i>URA</i> ⁺ , NAT ^R pCU::VC-L:: Cgalfa3 , pCN::VN-L:: Cgalfa3	Este trabajo
CGM2679-80	CGM2628	pRM116, <i>URA</i> ⁺ , NAT ^R pCU::VC-L:: Cgalfa3 , pCN::VN-L:: Cgalfa2	Este trabajo
CGM2681-82	CGM2630	pRM107, <i>URA</i> ⁺ , NAT ^R pCU::VC-L:: Cgalfa2 , pCN::VN-L:: Cgalfa3	Este trabajo
CGM2683-84	CGM2630	pRM116, <i>URA</i> ⁺ , NAT ^R pCU::VC-L:: Cgalfa2 , pCN::VN-L:: Cgalfa2	Este trabajo
CGM2685-86	CGM2616	pRM82, pRM89, <i>URA</i> ⁺ , NAT ^R pCU::L-VN; pCN::L-VC (vector vacío)	Este trabajo
CGM2687-88	CGM2616	pRM90, pRM89, <i>URA</i> ⁺ , NAT ^R pCU::L-VN; pCN::VC-L (vector vacío)	Este trabajo
CGM2689-90	CGM531	pRM103, pRM101, <i>URA</i> ⁺ , NAT ^R pCU::VC-L, pCN::VN-L (vector vacío)	Este trabajo
CGM2707-08	CGM2624	pRM128, <i>URA</i> ⁺ , NAT ^R pCU:: Cgalfa3 ::L-VN, pCN::VC-L:: Cga1	Este trabajo
CGM2709-10	CGM2626	pRM128, <i>URA</i> ⁺ , NAT ^R pCU:: Cgalfa2 ::L-VN, pCN::VC-L:: Cga1	Este trabajo
CGM2711-12	CGM531	pRM111 y pRM124, <i>URA</i> ⁺ , NAT ^R pCU::VC-L- Cgalfa3 , pCN::VN-L- Cga1	Este trabajo
CGM2713-14	CGM531	pRM109 y pRM124 <i>URA</i> ⁺ , NAT ^R pCU::VC-L- Cgalfa2 , pCN::VN-L- Cga1	Este trabajo
Cepas de <i>C. glabrata</i> que expresan los genes a1-alfa2 y a1-alfa3			
CGM1540	CGM531	<i>MTL1</i> ::pRM4 (<i>Mfe</i> I) (<i>mtl2</i> , <i>mtl3</i>)Δ Integrante #1	Este trabajo
CGM1552	CGM1540	<i>MTL1</i> :: Cga1 - Cgalfa2 (<i>mtl2</i> , <i>mtl3</i>)Δ Segregante #2 (5-FOA ^R)	Este trabajo
CGM1565	CGM531	<i>MTL1</i> ::pRM50 (<i>Mfe</i> I) (<i>mtl2</i> , 3)Δ Integrante #10	Este trabajo
CGM1569	CGM1565	<i>MTL1</i> :: Cga1 - Cgalfa3 (<i>mtl2</i> , 3)Δ Segregante #3 (5-FOA ^R)	Este trabajo

Cepas con etiquetas VN o VC integrados en cromosoma (BiFC)			
CGM1497-98	BG14	pRM18, <i>Kpn I/Spe I</i> , HDF1::VN::hph , Hyg ^R	Este trabajo
CGM1499-00	BG14	pRM20, <i>Kpn I/Spe I</i> , HDF1::VC::hph , Hyg ^R	Este trabajo
CGM1509-10	CGM1499	pMZ21, HDF1::VC , Hyg ^S	Este trabajo
CGM1511-12	CGM1497	pMZ21, HDF1::VN , Hyg ^S	Este trabajo
CGM1532-33	CGM1511	pRM22, <i>Kpn I</i> , HDF1::VN , HDF2::VN::hph , Hyg ^R	Este trabajo
CGM1534-35	CGM1511	pRM24, <i>Kpn I</i> , HDF1::VN , HDF2::VC::hph , Hyg ^R	Este trabajo
CGM1536-37	CGM1509	pRM22, <i>Kpn I</i> , HDF1::VC , HDF2::VN::hph , Hyg ^R	Este trabajo
CGM1538-39	CGM1509	pRM24, <i>Kpn I</i> , HDF1::VC , HDF2::VC::hph , Hyg ^R	Este trabajo
CGM1697-CGM1700	CGM531	pRM53, Cgalfa3::VN::hph , Hyg ^R	Este trabajo
CGM1698-99	CGM531	pRM57, <i>Mfel</i> , Cgalfa2::VC::hph , Hyg ^R <i>pop in</i> , en <i>MTL1</i>	Este trabajo
CGM1744-45	CGM1697	pMZ21, Cgalfa3::VN::Hyg^S	Este trabajo
CGM1755-56	CGM1698	pRM57, <i>Mfel</i> , alfa2::VC::hph , Hyg ^R <i>pop out</i> , en <i>MTL1</i>	Este trabajo
CGM1757-58	CGM531	pRM51, <i>Mfel</i> , Cgalfa2::VN::hph , Hyg ^R <i>pop in</i>	Este trabajo
CGM1759-60	CGM531	pRM55, Cgalfa3::VC::hph , Hyg ^R	Este trabajo
CGM1766-67	CGM1757	pRM51, <i>Mfel</i> , Cgalfa2::VN::hph <i>pop out</i>	Este trabajo
CGM1761	CGM1744	pMZ21, Cgalfa3::VN::Hyg^S , sin tener pMZ21	Este trabajo
CGM1781-82	CGM531	pRM38, Cga1::VN::hph , Hyg ^R en <i>MTL1</i>	Este trabajo
CGM1783-84	CGM531	pRM40, Cga1::VN::hph , Hyg ^R en <i>MTL1</i>	Este trabajo
CGM1785-86	CGM557	pRM38, Cga1::VN::hph , Hyg ^R en <i>MTL1</i> , (<i>mtl2,3</i>) Δ	Este trabajo
CGM1787-88	CGM557	pRM40, Cga1::VC::hph , Hyg ^R en <i>MTL1</i> , (<i>mtl2,3</i>) Δ	Este trabajo
CGM1789-90	CGM1784	pMZ21, pRM40, Cga1::VC::Hyg^S en <i>MTL1</i>	Este trabajo
CGM1791-92	CGM1781	pMZ21, pRM38, Cga1::VN::Hyg^S en <i>MTL1</i>	Este trabajo
CGM1793-94	CGM1785	pMZ21, pRM38, Cga1::VN::Hyg^S en <i>MTL1</i> , (<i>mtl2,3</i>) Δ	Este trabajo

CGM1823	CGM1791	pRM53, <i>Cga1::VN::Hyg^S</i> en <i>MTL1</i> , <i>Cgalfa3::VN::hph</i> en <i>MTL3</i> , <i>Hyg^R</i>	Este trabajo
CGM1824- 25	CGM1789	pRM53, <i>Cga1::VC::Hyg^S</i> en <i>MTL1</i> , <i>Cgalfa3::VN::hph</i> en <i>MTL3</i> , <i>Hyg^R</i>	Este trabajo
CGM1826- 27	CGM1791	pRM55, <i>Cga1::VN::Hyg^S</i> en <i>MTL</i> , <i>Cgalfa3::VC::hph</i> en <i>MTL3</i> , <i>Hyg^R</i>	Este trabajo
CGM1828	CGM1789	pRM55, <i>Cga1::VC::Hyg^S</i> en <i>MTL1</i> , <i>Cgalfa3::VC::hph</i> en <i>MTL3</i> , <i>Hyg^R</i>	Este trabajo
CGM1829- 30	CGM1823	pMZ21, <i>Cga1::VN::Hyg^S</i> en <i>MTL1</i> , <i>Cgalfa3::VN::Hyg^S</i> en <i>MTL3</i> ,	Este trabajo
CMG1831- 32	CGM1824	pMZ21, <i>Cga1::VC::Hyg^S</i> en <i>MTL1</i> , <i>Cgalfa3::VN::Hyg^S</i> en <i>MTL3</i>	Este trabajo
CGM1833- 34	CGM1828	pMZ21, <i>Cga1::VC::Hyg^S</i> en <i>MTL1</i> , <i>Cgalfa3::VC::Hyg^S</i> en <i>MTL3</i>	Este trabajo
CGM1835- 36	CGM1828	pMZ21, <i>Cga1::VC::Hyg^S</i> en <i>MTL1</i> , <i>Cgalfa3::VC::Hyg^S</i> en <i>MTL3</i>	Este trabajo

Cepas con integración de a1 en cromosoma con etiquetas VN o VC y plásmidos episomales con Cgalfa2 o Cgalfa3 para BiFC

CGM1768	CGM1761	pRM59, vector episomal, <i>Hyg^R</i> <i>Cgalfa3::VN::Hyg^S</i> ; <i>Cga1::VC</i> en plásmido	Este trabajo
CGM2092- 93	CGM1789	pRM64, vector episomal, <i>Hyg^R</i> <i>Cga1::VC::Hyg^S</i> ; <i>Cgalfa3::VN</i> en plásmido	Este trabajo
CGM2094- 95	CGM1789	pRM66, vector episomal, <i>Hyg^R</i> <i>Cga1::VC::Hyg^S</i> ; <i>Cgalfa3::VC</i> en plásmido	Este trabajo
CGM2096- 97	CGM1791	pRM66, vector episomal, <i>Hyg^R</i> <i>Cga1::VN::Hyg^S</i> ; <i>Cgalfa3::VC</i> en plásmido	Este trabajo
CGM2098- 99	CGM1789	pRM68, vector episomal, <i>Hyg^R</i> <i>Cga1::VC::Hyg^S</i> ; <i>Cgalfa2::VN</i> en plásmido	Este trabajo
CGM2100- 01	CGM1791	pRM68, vector episomal, <i>Hyg^R</i> <i>Cga1::VN::Hyg^S</i> ; <i>Cgalfa2::VN</i> en plásmido	Este trabajo
CGM2169- 70	CGM1789	pRM59, vector episomal, <i>Hyg^R</i> <i>Cga1::VC::Hyg^S</i> ; <i>Cga1::VC</i> en plásmido	Este trabajo
CGM2171- 72	CGM1791	pRM59, vector episomal, <i>Hyg^R</i> <i>Cga1::VN::Hyg^S</i> ; <i>Cga1::VC</i> en plásmido	Este trabajo
CGM2173- 74	CGM1789	pRM62, vector episomal, <i>Hyg^R</i> <i>Cga1::VC::Hyg^S</i> ; <i>Cgalfa2::VC</i> en plásmido	Este trabajo
CGM2175- 76	CGM1791	pRM62, vector episomal, <i>Hyg^R</i> <i>Cga1::VN::Hyg^S</i> ; <i>Cgalfa2::VC</i> en plásmido	Este trabajo
CGM2177- 78	CGM1791	pRM64, vector episomal, <i>Hyg^R</i> <i>Cga1::VN::Hyg^S</i> ; <i>Cgalfa3::VN</i> en plásmido	Este trabajo

Cepas para realizar competencia y ensayos de colonización en ratón			
CGM139	BG14	pBC34.1, Pst1, ura3Δ::URA3 G418 ^S , URA ⁺	Colección de laboratorio
CGM1837-38	CGM1567	pBC34.1, Pst1, ura3Δ::URA3 <i>Cga1-Cgalfa3</i> , URA ⁺ , G418 ^S	Este trabajo
CGM1839-40	CGM1552	pBC34.1, Pst1, ura3Δ::URA3 <i>Cga1-Cgalfa2</i> , URA ⁺ , G418 ^S	Este trabajo
CGM1851-52	CGM557	pSD7, Bsg1 (<i>mtl1,2,3</i>)Δ, G418 ^S	Este trabajo
CGM2065-66	CGM1839	pRZ15 <i>Cga1-Cgalfa2</i> con <i>hph</i> en <i>MTL2</i> , URA ⁺ , Hyg ^R , G418 ^S	Este trabajo
CGM2067-68	CGM1837	pRZ15 <i>Cga1-Cgalfa3</i> con <i>hph</i> en <i>MTL2</i> , URA ⁺ , Hyg ^R , G418 ^S	Este trabajo
CGM2191	CGM526	pBC34.1 ΔΔΔ Hyg ^R , URA ⁺ , G418 ^S	Este trabajo
CGM2192-93	CGM1851	pBC34.1, ura3Δ::URA3 (<i>mtl1,2,3</i>)Δ, Hyg ^R , URA ⁺ , G418 ^S	Este trabajo
Cepas para medir actividad del promotor de la catalasa mediante citometría de flujo			
CGM473	BG14	pMC18, URA ⁺ P _{CTA1} ::GFP	Colección del laboratorio
CGM514	BG14	pMC14, URA ⁺ plásmido sin promotor de CTA1 y con GFP	Colección del laboratorio
CGM2448-49	CGM531	pMC14, ΔΔΔ, URA ⁺ plásmido sin promotor de CTA1 y con GFP	Este trabajo
CGM2450-51	CGM531	pMC18, ΔΔΔ, URA ⁺ P _{CTA1} ::GFP	Este trabajo
CGM2452-53	CGM1552	pMC14, <i>Cga1-Cgalfa2</i> , URA ⁺ plásmido sin promotor de CTA1 y con GFP	Este trabajo
CGM2454-55	CGM1552	pMC18, <i>Cga1-Cgalfa2</i> , URA ⁺ P _{CTA1} ::GFP	Este trabajo
CGM2456-57	CGM1567	pMC14, <i>Cga1-Cgalfa3</i> , URA ⁺ plásmido sin promotor de CTA1 y con GFP	Este trabajo
CGM2458-59	CGM904	pMC14, <i>mtl1</i> Δ:: <i>MTL1a</i> (<i>mtl2</i> , <i>mtl3</i>)Δ, URA ⁺ plásmido sin promotor de CTA1 y con GFP	Este trabajo
CGM2460-61	CGM904	pMC18, <i>mtl1</i> Δ:: <i>MTL1a</i> (<i>mtl2</i> , <i>mtl3</i>)Δ, URA ⁺ P _{CTA1} ::GFP	Este trabajo
CGM2462-63	CGM707	pMC14, <i>mtl1</i> Δ:: <i>MTL1α</i> (<i>mtl2</i> , <i>mtl3</i>)Δ, URA ⁺ plásmido sin promotor de CTA1 y con GFP	Este trabajo
CGM2464-65	CGM707	pMC18, <i>mtl1</i> Δ:: <i>MTL1α</i> (<i>mtl2</i> , <i>mtl3</i>)Δ P _{CTA1} ::GFP	Este trabajo
CGM2755-56	CGM1569	pMC14, <i>Cga1-Cgalfa3</i> , URA ⁺ plásmido sin promotor de CTA1 y con GFP	Este trabajo

CGM2758-59	CGM1569	pMC18, <i>Cga1-Cgalfa3</i> , URA ⁺ P _{CTA1} ::GFP	Este trabajo
Cepas para realizar CoIP con Myc y Flag			
CGM3155-56	CGM2953	pRM159, URA ⁺ , NAT ^R P _{MT1} ::MYC-L:: <i>Cgalfa3</i> y P _{MT1} ::FLAG-L:: <i>Cga1</i>	Este trabajo
CGM3157-58	CGM2953	pRM161, URA ⁺ , NAT ^R P _{MT1} ::MYC-L:: <i>Cgalfa3</i> y P _{MT1} ::FLAG-L:: <i>Cgalfa2</i>	Este trabajo
CGM3159-60	CGM2947	pRM159, URA ⁺ , NAT ^R P _{MT1} ::MYC-L:: <i>Cgalfa2</i> y P _{MT1} ::FLAG-L:: <i>Cga1</i>	Este trabajo
CGM3161-62	CGM2947	pRM161, URA ⁺ , NAT ^R P _{MT1} ::MYC-L:: <i>Cgalfa2</i> y P _{MT1} ::FLAG-L:: <i>Cgalfa2</i>	Este trabajo
CGM3163-64	CGM531	pRM161, NAT ^R P _{MT1} ::FLAG-L:: <i>Cgalfa2</i>	Este trabajo
CGM3165-66	CGM531	pRM159, NAT ^R P _{MT1} ::FLAG-L:: <i>Cga1</i>	Este trabajo
CGM3181	CGM2953	pGE124, NAT ^R P _{MT1} ::MYC-L:: <i>Cgalfa3</i> y P _{MT1} ::FLAG-L:: <i>Cgalfa3</i>	Colección del laboratorio

Tabla A2. Plásmidos generados en este trabajo

No. Cepa	Plásmido	Genotipo relevante	Referencia
Vectores de clonación			
1485	pYIplac211	Vector de clonación integrativo URA3, Amp ^R	(Gietz and Sugino, 1988)
2095	pOZ14	Vector de clonación, Hyg ^R , URA3, Amp ^R . Cassette 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
1771	pMB11	Vector de clonación, contraselección a <i>sacB</i> Cm ^R oeip15A	(Gallegos-Garcia, et al. 2012: 1285-97)
1655	pMZ21	Vector replicativo que expresa la recombinasa (ScFlp1p) para la remoción del casete de	Colección del

		resistencia a higromicina; [<i>P_{EPA1}::FLP1::(3'UTR_{HIS3})</i>] <i>URA3</i> , Amp ^R	laboratorio de B. Cormack
2593	pFA6a-VN- His3MX6	Vector donador del amino terminal de la proteína fluorescente YFP (VN-YFP), Amp ^R ,	(Sung and Huh, 2007)
2595	pFA6a-VC- His3MX6	Vector donador del carboxilo terminal de la proteína fluorescente YFP (VC-YFP), Amp ^R ,	(Sung and Huh, 2007)
3446- 3447	pCU-MET3	Vector con promotor inducible <i>MET3</i> , <i>URA3</i> , Amp ^R , <i>C.g</i> CEN/ARS	(R. E. Zordan et al. 2013)
3448- 3449	pCU-MET3- GFP	Vector con promotor iducible <i>MET3</i> fusionado con GFP, <i>URA3</i> , Amp ^R , <i>C.g</i> CEN/ARS	(R. E. Zordan et al. 2013)
3450- 3451	pCN-MET3	Vector con promotor inducible <i>MET3</i> , NAT ^R , Amp ^R , <i>C.g</i> CEN/ARS	(R. E. Zordan et al. 2013)
3452- 3453	pCN-MET3- GFP	Vector con promotor inducible <i>MET3</i> fusionado con GFP, NAT ^R , Amp ^R , <i>C.g</i> CEN/ARS	(R. E. Zordan et al. 2013)
1484	pBC34.1	pUC19:: <i>CgURA3</i> , Pst1; Producto de 2.2kb Amp ^R	Cormack, B.P and S Falkow 1999
1802	pSD7	3' <i>MTL1</i> -pAP599-5' <i>MTL1</i> , Amp ^R	Colección del laboratorio
1904	pMC14	pGBR2.0::3' <i>UTR</i> ::GFP, Amp ^R	Colección del laboratorio
1914	pMC18	3' <i>UTR</i> ::GFP::P _{CTA}	Colección del laboratorio
2572	pSF15	Producto de PCR de 1.405 Kb (oligonucleótidos 770 y 321) del gen <i>Cgalfa2</i> de <i>MTL1</i> clonado en	Colección del

		pMB11 digerido con <i>Stu</i> I, Cm ^R	laboratorio
4187	pGE122	Producto de PCR de 0.630 Kb (oligonucleótidos 2098 y 2100) que corresponde al gen <i>Cgalfa3</i> digerido con <i>Eco</i> RI/ <i>Sal</i> I, clonado en pRM153(<i>Eco</i> RI/ <i>Sal</i> I). NAT ^R , Amp ^R , C.g CEN/ARS	Colección de laboratorio
4191	pGE124	PMT1 (<i>Xba</i> I/ <i>Sac</i> I) clonado en pGE122 (<i>Xba</i> I/ <i>Sac</i> I). NAT ^R , Amp ^R , C.g CEN/ARS. Intercambio de promotores P _{MET3} por P _{MT1}	Colección de laboratorio
Vectores generados			
2638-39	pRM1-2	Producto <i>Bam</i> HI/ <i>Eco</i> RI de 1.389 Kb (gen Cgalfa2) derivado de pSF15, clonado en pYIplac211 digerido con <i>Bam</i> HI/ <i>Eco</i> RI, Amp ^R , <i>URA3</i>	Este trabajo
2655	pRM4	Producto de PCR de 1.9 Kb <i>Bam</i> HI/ <i>Xba</i> I (oligonucleótidos 764 y 320) del gen Cga1 , clonado en pRM1 digerido con <i>Bam</i> HI/ <i>Xba</i> I, <i>URA3</i> , Amp ^R . Plásmido que expresa a1 y alfa2 simultáneamente	Este trabajo
2656-2657	pRM5-6	Producto de PCR de 1.9Kb (oligonucleótidos 764 y 320) que corresponde a Cga1 de <i>MTL1</i> , clonado en pMB11 digerido con <i>Stu</i> I, Cm ^R	Este trabajo
2727	pRM7	Producto de PCR de 0.621 Kb (oligonucleótidos 903 y 904) que corresponde al producto VN-YFP , clonado en pOZ14 digerido con <i>Bam</i> HI, Amp ^R , <i>URA3</i> ⁺ , Hyg ^R	Este trabajo
2728-2729	pRM8-9	Producto de PCR de 0.349 Kb (oligonucleótidos 894 y 895) que corresponde al producto VC-YFP , clonado en pOZ14 digerido con <i>Bam</i> HI, Amp ^R , <i>URA3</i> ⁺ , Hyg ^R	Este trabajo
2730-	pRM10-17	Producto que corresponde a 3' del ORF de HDF1	Este trabajo

2737		obtenido de la digestión de pGE51 con <i>Spe I</i> y <i>Bam HI</i> de 0.9 Kb, clonado en pRM7 digerido con <i>Spe I</i> y <i>Bam HI</i> , Amp ^R , <i>URA3</i> ⁺ , Hyg ^R	
2731-2732	pRM11-12	Producto que corresponde a 3' ORF de HDF1 obtenido de la digestión de pGE51 con <i>Spe I</i> y <i>Bam HI</i> de 0.9 Kb, clonado en pRM8 digerido con <i>Spe I</i> y <i>Bam HI</i> , Amp ^R , <i>URA3</i> ⁺ , Hyg ^R	Este trabajo
2733-2734	pRM13-14	Producto que corresponde a 3'ORF de HDF2 obtenido de la digestión de pGE53 con <i>Sac I</i> y <i>Bam HI</i> de 0.7 Kb, clonado en pRM7 digerido con <i>Sac I</i> y <i>Bam HI</i> , Amp ^R , <i>URA3</i> ⁺ , Hyg ^R	Este trabajo
2735-2736	pRM15-16	Producto que corresponde a 3'ORF de HDF2 obtenido de la digestión de pGE53 con <i>Sac I</i> y <i>Bam HI</i> de 0.7 Kb, clonado en pRM8 digerido con <i>Sac I</i> y <i>Bam HI</i> , Amp ^R , <i>URA3</i> ⁺ , Hyg ^R	Este trabajo
2738-2739	pRM18-19	Producto de 3'UTR de HDF1 obtenido por digestión de pAP746 con <i>Hind III</i> y <i>Kpn I</i> de 0.8 Kb, clonado en pRM10 digerido con <i>Hind III</i> y <i>Kpn I</i> , Amp ^R , <i>URA3</i> ⁺ , Hyg ^R	Este trabajo
2740-2741	pRM20-21	Producto de 3'UTR de HDF1 obtenido por digestión de pAP746 con <i>Hind III</i> y <i>Kpn I</i> de 0.8 Kb, clonado en pRM11 digerido con <i>Hind III</i> y <i>Kpn I</i> , Amp ^R , <i>URA3</i> ⁺ , Hyg ^R	Este trabajo
2742-2743	pRM22-23	Producto de 3'UTR de HDF2 obtenido por digestión de pAP752 con <i>Hind III</i> y <i>Sal I</i> de 0.7 Kb, clonado en pRM13 digerido con <i>Hind III</i> y <i>Sal I</i> , Amp ^R , <i>URA3</i> ⁺ , Hyg ^R	Este trabajo
2744-2745	pRM24-25	Producto de 3'UTR de HDF2 obtenido por digestión de pAP752 con <i>Hind III</i> y <i>Sa II</i> de 0.7 Kb, clonado en pRM15 digerido con <i>Hind III</i> y <i>Sal I</i> , Amp ^R , <i>URA3</i> ⁺ , Hyg ^R	Este trabajo
2746-2747	pRM26-27	Producto de PCR de 0.717 Kb que corresponde al 3'UTR de Cga1 (oligonucleótidos 772 y 907)	Este trabajo

		digerido con <i>Hind</i> III y <i>Xho</i> I, clonado en pRM7 (<i>Hind</i> III/ <i>Xho</i> I), Amp ^R , <i>URA3</i> ⁺ , Hyg ^R	
2748-2749	pRM28-29	Producto de PCR de 0.717 Kb que corresponde al 3'UTR de <i>Cga1</i> (oligonucleótidos 772 y 907) digerido con <i>Hind</i> III y <i>Xho</i> I, clonado en pRM8 (<i>Hind</i> III/ <i>Xho</i> I), Amp ^R , <i>URA3</i> ⁺ , Hyg ^R	Este trabajo
2758-2759	pRM30-31	Producto de PCR de 0.645 Kb que corresponde al 3'UTR de <i>Cgalfa3</i> (oligonucleótidos 898 y 899) clonado en pMB11(<i>Stu</i> I), Cm ^R , SacB ^S	Este trabajo
2760-2761	pRM32-33	Producto de PCR de 2.164 Kb que corresponde al gen <i>Cgalfa2</i> (oligonucleótidos 900 y 890) clonado en pMB11(<i>Stu</i> I), Cm ^R , SacB ^S	Este trabajo
2762-2763	pRM34-35	Producto de PCR de 0.539 Kb que corresponde al 3'UTR de <i>Cgalfa2</i> (oligonucleótidos 901 y 891) clonado en pMB11(<i>Stu</i> I), Cm ^R , SacB ^S	Este trabajo
2770-2771	pRM36-37	Producto de PCR de 2.135 Kb que corresponde al gen <i>Cgalfa3</i> (oligonucleótidos 896 y 897) clonado en pMB11(<i>Stu</i> I), Cm ^R , SacB ^S	Este trabajo
2817-2818	pRM38-39	Producto de PCR de 1.24 Kb que corresponde al gen <i>Cga1</i> (oligonucleótidos 904 y 905) digerido con <i>Spe</i> I y <i>Bam</i> HI, clonado en pRM26(<i>Spe</i> I/ <i>Bam</i> HI), Amp ^R , <i>URA3</i> ⁺ , Hyg ^R	Este trabajo
2819-2820	pRM40-41	Producto de PCR de 1.24 Kb que corresponde al gen <i>Cga1</i> (oligonucleótidos 904 y 905) digerido con <i>Spe</i> I y <i>Bam</i> HI, clonado en pRM28(<i>Spe</i> I/ <i>Bam</i> HI), Amp ^R , <i>URA3</i> ⁺ , Hyg ^R	Este trabajo
2821-2822	pRM42-43	Producto de PCR de 2.164 Kb que corresponde al gen <i>Cgalfa2</i> (oligonucleótidos 900 y 890) digerido con <i>Not</i> I y <i>Bam</i> HI clonado en pRM7(<i>Not</i> I/ <i>Bam</i> HI), Amp ^R , <i>URA3</i> ⁺ , Hyg ^R	Este trabajo
2823-2824	pRM44-45	Producto de PCR de 2.164 Kb que corresponde al gen <i>Cgalfa2</i> (oligonucleótidos 900 y 890) digerido con <i>Not</i> I y <i>Bam</i> HI clonado en	Este trabajo

		pRM8(<i>Not I/Bam HI</i>), Amp ^R , URA3 ⁺ , Hyg ^R	
2825	pRM46	Producto de PCR de 2.135 Kb que corresponde al gen <i>Cgalfa3</i> (oligonucleótidos 896 y 897) digerido con <i>Not I</i> y <i>Bam HI</i> clonado en pRM7(<i>Not I/Bam HI</i>), Amp ^R , URA3 ⁺ , Hyg ^R	Este trabajo
2826-2827	pRM47-48	Producto de PCR de 2.135 Kb que corresponde al gen <i>Cgalfa3</i> (oligonucleótidos 896 y 897) digerido con <i>Not I</i> y <i>Bam HI</i> clonado en pRM8(<i>Not I/Bam HI</i>), Amp ^R , URA3 ⁺ , Hyg ^R	Este trabajo
2843-2844	pRM49-50	Producto de PCR de 1.553 Kb <i>Bam HI</i> / <i>Mfe I</i> (oligonucleótidos 770 y 143) del gen <i>Cgalfa3</i> de <i>MTL3</i> , ligado con el producto de PCR de 0.403 Kb (oligonucleótidos No. 1049 y 321) correspondiente al 3'UTR del gen <i>Cga1</i> de <i>MTL1</i> digerido con <i>Eco RI</i> , clonados en pRM4 digerido con <i>Bam HI</i> y <i>Eco RI</i> , Amp ^R , URA3 ⁺	Este trabajo
2928-2929	pRM51-52	Producto de PCR de 0.6 Kb que corresponde al 3'UTR de <i>Cgalfa2</i> (oligonucleótidos 901 y 891) digerido con <i>Sal I</i> y <i>Xho I</i> , clonado en pRM42(<i>Sal I/Xho I</i>), Amp ^R , URA3 ⁺ , Hyg ^R	Este trabajo
2930-2931	pRM53-54	Producto de PCR de 0.628 Kb que corresponde al 3'UTR de <i>Cgalfa3</i> (oligonucleótidos 898 y 899) digerido con <i>Sal I</i> y <i>Xho I</i> , clonado en pRM46(<i>Sal I/Xho I</i>), Amp ^R , URA3 ⁺ , Hyg ^R	Este trabajo
2932-2933	pRM55-56	Producto e PCR de 0.628 Kb que corresponde al 3'UTR de <i>Cgalfa3</i> (oligonucleótidos 898 y 899) digerido con <i>Sal I</i> y <i>Xho I</i> , clonado en pRM48(<i>Sal I/Xho I</i>), Amp ^R , URA3 ⁺ , Hyg ^R	Este trabajo
2938-2939	pRM57-58	Producto de PCR de 0.6 Kb que corresponde al 3'UTR de <i>Cgalfa2</i> (oligonucleótidos 901 y 891) digerido con <i>Sal I</i> y <i>Xho I</i> , clonado en pRM44(<i>Sal I/Xho I</i>), Amp ^R , URA3 ⁺ , Hyg ^R	Este trabajo
2946-	pRM59-60	Producto de PCR de 0.6 Kb que corresponde a	Este trabajo

2947		CgCEN/ARS (oligonucleótidos 1517 y 1518) clonado en pRM40, Amp ^R , URA3 ⁺ , Hyg ^R , plásmido replicativo	
3199	pRM61	Producto de PCR de 0.6 Kb que corresponde a CgCEN/ARS (oligonucleótidos 1517 y 1518) clonado en pMB11(<i>Stu</i> I), Cm ^R , SacB ^S .	Este trabajo
3205-3206	pRM62-63	CgCEN/ARS obtenido de la digestión de pRM61 (<i>Sal</i> I) y clonado en pRM51(<i>Xho</i> I), Amp ^R , URA3 ⁺ , Hyg ^R , plásmido replicativo	Este trabajo
3207-3208	pRM64-65	CgCEN/ARS obtenido de la digestión de pRM61(<i>Sal</i> I) y clonado en pRM53(<i>Xho</i> I), Amp ^R , URA3 ⁺ , Hyg ^R , plásmido replicativo	Este trabajo
3209-3210	pRM66-67	CgCEN/ARS obtenido de la digestión de pRM61 (<i>Sal</i> I) y clonado en pRM55(<i>Xho</i> I), Amp ^R , URA3 ⁺ , Hyg ^R , plásmido replicativo	Este trabajo
3211-3212	pRM68-69	CgCEN/ARS obtenido de la digestión de pRM61 (<i>Sal</i> I) y clonado en pRM57(<i>Xho</i> I), Amp ^R , URA3 ⁺ , Hyg ^R , plásmido replicativo	Este trabajo
3370-3371	pRM70-71	Producto de PCR de 0.898 Kb que corresponde al 5'UTR + Cgalfa1 (oligonucleótidos 1697 y 1698) digerido con <i>Bam</i> HI y <i>Spe</i> I, clonado en pYC44(<i>Bam</i> HI/ <i>Spe</i> I), Amp ^R , URA3 ⁺ , NAT ^R	Este trabajo
3392-3393	pRM72-73	Producto de PCR de 0.571 Kb que corresponde al 3'UTR Cgalfa2 (oligonucleótidos 1699 y 1633) digerido con <i>Xho</i> I y <i>Kpn</i> I, clonado en pYC44(<i>Xho</i> I/ <i>Kpn</i> I), Amp ^R , URA3 ⁺ , NAT ^R	Este trabajo
3411-3412	pRM74-75	Producto de PCR de 0.963 Kb que corresponde al 5'UTR + Cgalfa3 (oligonucleótidos 1702 y 1650) digerido con <i>Sac</i> I y <i>Bam</i> HI, clonado en pRM72(<i>Sac</i> I/ <i>Bam</i> HI), Amp ^R , URA3 ⁺ , NAT ^R	Este trabajo
3413-3414	pRM76-77	Producto de PCR de 0.886 Kb que corresponde al 5'UTR + Cgalfa2 (oligonucleótidos 1700 y 1640) digerido con <i>Sac</i> I y <i>Bam</i> HI, clonado en	Este trabajo

		pRM72(<i>Sac I/Bam HI</i>), Amp ^R , <i>URA3</i> ⁺ , NAT ^R	
3425-3426	pRM78-79	Producto de PCR de 0.698 Kb que corresponde al 5'UTR BUD5 (oligonucleótidos 1703 y 1704) clonado en pMB11(<i>Stu I</i>), Cm ^R , SacB ^S . Producto para hacer plásmido que solo expresa alfa1	Este trabajo
3442	pRM80	Producto de PCR de 0.698 Kb que corresponde al 5'UTR BUD5 (oligonucleótidos 1703 y 1704) digerido con <i>Spe I</i> y <i>Sac II</i> , clonado en pRM70(<i>Spe I/Sac II</i>), Amp ^R , <i>URA3</i> ⁺ , NAT ^R	Este trabajo
3573	pRM82	Producto de PCR de 0.3 Kb <i>Sal I/Xho I</i> (oligonucleótidos 1868 y 1869) que corresponde al fragmento <u>carboxilo terminal</u> de YFP amplificado de pFA6a-VC-His3MX6, clonado en pCN-MET3(<i>Sal I/Xho I</i>). NAT ^R , Amp ^R , C.g CEN/ARS	Este trabajo
3590-3591	pRM83-84	Producto de PCR de 0.356 Kb que corresponde a un fragmento de EMG1 (oligonucleótidos 1705 y 1706) digerido con <i>Sac I</i> y <i>Sac II</i> , clonado en pRM72 (<i>Sac I/Sac II</i>), Amp ^R , <i>URA3</i> ⁺ , NAT ^R . El fragmento de <i>EMG1</i> es parte del 5'UTR de <i>MTL1</i>	Este trabajo
3597-3598	pRM85-86	Producto de PCR de 0.886 Kb que corresponde al 5'UTR + Cgalfa2 (oligonucleótidos 1700 y 1640) digerido con <i>Sac II</i> y <i>Bam HI</i> , clonado en pRM83(<i>Sac II/Bam HI</i>), Amp ^R , <i>URA3</i> ⁺ , NAT ^R .	Este trabajo
3599-3600	pRM87-88	Producto de PCR de 0.963 Kb que corresponde al 5'UTR + Cgalfa3 (oligonucleótidos 1702 y 1650) digerido con <i>Sac II</i> y <i>Bam HI</i> , clonado en pRM83(<i>Sac II/Bam HI</i>), Amp ^R , <i>URA3</i> ⁺ , NAT ^R .	Este trabajo
3601	pRM89	Producto de PCR de 0.588 Kb (<i>Sal I/Xho I</i>) (oligonucleótidos 1866 y 1867) que corresponde al fragmento <u>amino terminal</u> de YFP amplificado de pFA6a-VN-His3MX6, clonado en pCU-MET3 (<i>Sal I/Xho I</i>). <i>URA3</i> ⁺ , Amp ^R , C.g CEN/ARS	Este trabajo

3619	pRM90	Producto de PCR de 0.300 Kb (<i>Xba I/Spe I</i>) (oligonucleótidos 1687 y 1685) que corresponde al fragmento <u>carboxilo terminal</u> de YFP amplificado de pFA6a-VC-His3MX6, colonado en pCN-MET3 (<i>Xba I/Spe I</i>). NAT ^R , Amp ^R , C.g CEN/ARS	Este trabajo
3620-3621	pRM91-92	Producto de PCR de 0.648 Kb (<i>Xba I/Sal I</i>) (oligonucleótidos 1878 y 1879) que corresponde al gen Cgalfa3 , clonado en pRM89(<i>Xba I/Sal I</i>). URA3, Amp ^R , C.g CEN/ARS	Este trabajo
3622-3623	pRM93-94	Producto de PCR de 1.835 Kb (<i>Xba I/Sal I</i>) (oligonucleótidos 1870 y 1871) que corresponde al gen HDF1 , clonado en pRM89(<i>Xba I/Sal I</i>). URA3, Amp ^R , C.g CEN/ARS	Este trabajo
3632-3633	pRM95-96	Producto de PCR de 1.835 Kb (<i>Xba I/Sal I</i>) (oligonucleótidos 1870 y 1871) que corresponde al gen HDF1 , clonado en pRM82 (<i>Xba I/Sal I</i>). NAT ^R , Amp ^R , C.g CEN/ARS	Este trabajo
3634-3635	pRM97-98	Producto de PCR de 0.575 Kb (<i>Xba I/Sal I</i>) (oligonucleótidos 1876 y 1877) que corresponde al gen Cgalfa2 , clonado en pRM82 (<i>Xba I/Sal I</i>). NAT ^R , Amp ^R , C.g CEN/ARS	Este trabajo
3636-3637	pRM99-100	Producto de PCR de 0.648 Kb (<i>Xba I/Sal I</i>) (oligonucleótidos 1878 y 1879) que corresponde al gen Cgalfa3 , clonado en pRM82(<i>Xba I/Sal I</i>). NAT ^R , Amp ^R , C.g CEN/ARS	Este trabajo
3664-3665	pRM101-102	Producto de PCR de 0.588Kb (<i>Xba I/Spe I</i>) (oligonucleótidos 1694 y 1692) que corresponde al fragmento <u>amino terminal</u> de YFP amplificado de pFA6a-VN-His3MX6, colonado en pCN-MET3 (<i>Xba I/Spe I</i>). NAT ^R , Amp ^R , C.g CEN/ARS	Este trabajo
3664-3665	pRM103-104	Producto de PCR de 0.300 Kb <i>Xba I/Spe I</i> (oligonucleótidos 1687 y 1685) que corresponde	Este trabajo

		al fragmento <u>carboxilo terminal</u> de YFP amplificado de pFA6a-VC-His3MX6, colonado en pCN-MET3 <i>Xba I/Spe I. URA3, Amp^R, C.g CEN/ARS</i>	
3676-3677	pRM105-106	Producto de PCR de 0.648 Kb (<i>Xba I/Sal I</i>) (oligonucleótidos 1878 y 1903) que corresponde al gen Cgalfa3 , clonado en pRM90 (<i>Xba I/Sal I</i>). <i>NAT^R, Amp^R, C.g CEN/ARS</i>	Este trabajo
3678-3679	pRM107-108	Producto de PCR de 0.648 Kb (<i>Xba I/Sal I</i>) (oligonucleótidos 1878 y 1903) que corresponde al gen Cgalfa3 , clonado en pRM101 (<i>Xba I/Sal I</i>). <i>NAT^R, Amp^R, C.g CEN/ARS</i>	Este trabajo
3680-3681	pRM109-110	Producto de PCR de 0.575 Kb (<i>Xba I/Sal I</i>) (oligonucleótidos 1876 y 1902) que corresponde al gen Cgalfa2 , clonado en pRM103 (<i>Xba I/Sal I</i>). <i>URA3, Amp^R, C.g CEN/ARS</i>	Este trabajo
3682-3683	pRM111-112	Producto de PCR de 0.648 Kb (<i>Xba I/Sal I</i>) (oligonucleótidos 1878 y 1903) que corresponde al gen Cgalfa3 , clonado en pRM103 (<i>Xba I/Sal I</i>). <i>URA3, Amp^R, C.g CEN/ARS</i>	Este trabajo
3684	pRM113	Producto de PCR de 0.575 Kb (<i>Xba I/Sal I</i>) (oligonucleótidos 1876 y 1902) que corresponde al gen Cgalfa2 , clonado en pRM90 (<i>Xba I/Sal I</i>). <i>NAT^R, Amp^R, C.g CEN/ARS</i>	Este trabajo
3694-3695	pRM114-115	Producto de PCR de 0.575 Kb (<i>Xba I/Sal I</i>) (oligonucleótidos 1876 y 1877) que corresponde al gen Cgalfa2 , clonado en pRM89 (<i>Xba I/Sal I</i>). <i>URA3, Amp^R, C.g CEN/ARS</i>	Este trabajo
3696-3697	pRM116-117	Producto de PCR de 0.575 Kb (<i>Xba I/Sal I</i>) (oligonucleótidos 1876 y 1902) que corresponde al gen Cgalfa2 , clonado en pRM101 (<i>Xba I/Sal I</i>). <i>NAT^R, Amp^R, C.g CEN/ARS</i>	Este trabajo
3706-	pRM118-	Producto de PCR de 1.863 Kb (<i>Cla I/Sal I</i>)	Este trabajo

3707	119	(oligonucleótidos 1872 y 1873) que corresponde al gen HDF2 , clonado en pRM82 (<i>Cla</i> I/ <i>Sal</i> I). NAT ^R , Amp ^R , C.g CEN/ARS	
3708-3709	pRM120-121	Producto de PCR de 1.863 Kb (<i>Cla</i> I/ <i>Sal</i> I) (oligonucleótidos 1872 y 1873) que corresponde al gen HDF2 , clonado en pRM89 (<i>Cla</i> I/ <i>Sal</i> I). <i>URA3</i> , Amp ^R , C.g CEN/ARS	Este trabajo
3740-3741	pRM122-123	Producto de cDNA de 0.410 Kb (<i>Xba</i> I/ <i>Sal</i> I) (oligonucleótidos 1874 y 1875) que corresponde al gen Cga1 completamente procesado, clonado en pRM89 (<i>Xba</i> I/ <i>Sal</i> I). <i>URA3</i> , Amp ^R , C.g CEN/ARS	Este trabajo
3742-3743	pRM124-125	Producto de cDNA de 0.410 Kb (<i>Xba</i> I/ <i>Sal</i> I) (oligonucleótidos 1874 y 1901) que corresponde al gen Cga1 completamente procesado, clonado en pRM101 (<i>Xba</i> I/ <i>Sal</i> I). NAT ^R , Amp ^R , C.g CEN/ARS	Este trabajo
3744-3745	pRM126-127	Producto de cDNA de 0.410 Kb (<i>Xba</i> I/ <i>Sal</i> I) (oligonucleótidos 1874 y 1901) que corresponde al gen Cga1 completamente procesado, clonado en pRM103 (<i>Xba</i> I/ <i>Sal</i> I). <i>URA3</i> , Amp ^R , C.g CEN/ARS	Este trabajo
3746-3747	pRM128-129	Producto de cDNA de 0.410 Kb (<i>Xba</i> I/ <i>Sal</i> I) (oligonucleótidos 1874 y 1901) que corresponde al gen Cga1 completamente procesado, clonado en pRM90 (<i>Xba</i> I/ <i>Sal</i> I). NAT ^R , Amp ^R , C.g CEN/ARS	Este trabajo
3748-3749	pRM130-131	Producto de PCR de 1.835 Kb (<i>Xba</i> I/ <i>Xho</i> I) (oligonucleótidos 1897 y 1898) que corresponde al gen HDF1 , clonado en pRM90 (<i>Spe</i> I/ <i>Xho</i> I). NAT ^R , Amp ^R , C.g CEN/ARS	Este trabajo
3750-3751	pRM132-133	Producto de PCR de 1.835 Kb (<i>Xba</i> I/ <i>Xho</i> I) (oligonucleótidos 1897 y 1898) que corresponde	Este trabajo

		al gen HDF1 , clonado en pRM101 (<i>Spe I/Xho I</i>). NAT ^R , Amp ^R , C.g CEN/ARS	
3752- 3753	pRM134- 135	Producto de PCR de 1.835 Kb (<i>Xba I/Xho I</i>) (oligonucleótidos 1897 y 1898) que corresponde al gen HDF1 , clonado en pRM103 (<i>Spe I/Xho I</i>). <i>URA3</i> , Amp ^R , C.g CEN/ARS	Este trabajo
3863- 3864	pRM136- 137	Producto de PCR de 0.953 Kb (<i>Xba I/Sac I</i>) (oligonucleótidos 2081 y 2179) que corresponde al promotor CgMT1 , clonado en pMB11(<i>Stu I</i>). Cm ^R , SacB ^S	Este trabajo
3883- 3884	pRM138- 139	P_{MT1} (<i>Xba I/Sac I</i>) clonado en pCN-GFP (<i>Xba I/Sac I</i>). NAT ^R , Amp ^R , C.g CEN/ARS. Intercambio de promotores P _{MET3} por P _{MT1}	Este trabajo
3885- 3886	pRM140- 141	P_{MT1} (<i>Xba I/Sac I</i>) clonado en pRM89 (<i>Xba I/Sac I</i>). <i>URA3</i> , Amp ^R , C.g CEN/ARS. Intercambio de promotores P _{MET3} por P _{MT1}	Este trabajo
3887- 3888	pRM142- 143	P_{MT1} (<i>Xba I/Sac I</i>) clonado en pRM90 (<i>Xba I/Sac I</i>). NAT ^R , Amp ^R , C.g CEN/ARS. Intercambio de promotores P _{MET3} por P _{MT1}	Este trabajo
3889- 3890	pRM144- 145	P_{MT1} (<i>Xba I/Sac I</i>) clonado en pRM101 (<i>Xba I/Sac I</i>). NAT ^R , Amp ^R , C.g CEN/ARS. Intercambio de promotores P _{MET3} por P _{MT1}	Este trabajo
4042- 4043	pRM146- 147	Producto de PCR de 0.639 Kb (oligonucleótidos 2233 y 2234) que corresponde al gen Scalfa2 de <i>S. cerevisiae</i> , clonado en pMB11(<i>Stu I</i>) . Cm ^R , SacB ^S	Este trabajo
4044- 4045	pRM148- 149	Producto de PCR de 0.638 Kb (<i>Spe I/Xho I</i>) (oligonucleótidos 2233 y 2234) que corresponde al gen Scalfa2 de <i>S. cerevisiae</i> , clonado en pRM90(<i>Spe I/Xho I</i>). NAT ^R , Amp ^R , C.g CEN/ARS	Este trabajo
4046	pRM150	Producto de PCR de 0.638 Kb (<i>Spe I/Xho I</i>) (oligonucleótidos 2233 y 2234) que corresponde al gen Scalfa2 de <i>S. cerevisiae</i> , clonado en	Este trabajo

		pRM101 (<i>Spe I/Xho I</i>). NAT ^R , Amp ^R , C.g CEN/ARS	
4047- 4048	pRM151- 152	Producto de PCR de 0.638 Kb (<i>Spe I/Xho I</i>) (oligonucleótidos 2233 y 2234) que corresponde al gen <i>Scalfa2</i> de <i>S. cerevisiae</i> , clonado en pRM103 (<i>Spe I/Xho I</i>). URA3, Amp ^R , C.g CEN/ARS	Este trabajo
4163- 4164	pRM153- 154	Fragmento FLAG-Linker (<i>Spe I/Eco RI</i>) (oligonucleótidos 2340 y 2341) clonado en pCN(<i>Spe I/Eco RI</i>). NAT ^R , Amp ^R , C.g CEN/ARS	Este trabajo
4165- 4169	pRM155- 158	Producto de PCR de 0.572 Kb (oligonucleótidos 2098 y 2099) que corresponde a <i>Cgalfa2</i> , digerido con <i>Eco RI/Sal I</i> , clonado en pRM153(<i>Eco RI/Sal I</i>). NAT ^R , Amp ^R , C.g CEN/ARS	Este trabajo
4166- 4167	pRM156- 157	Producto de PCR de 0.4 Kb (oligonucleótidos 2095 y 2337) digerido con (<i>Spe I/Eco RI</i>), que corresponde al transcrito procesado de <i>Cga1</i> , clonado en pRM153(<i>Spe I/Eco RI</i>). NAT ^R , Amp ^R , C.g CEN/ARS	Este trabajo
4170- 4171	pRM159- 160	P_{MT1} (<i>Xba I/Sac I</i>) clonado en pRM156 (<i>Xba I/Sac I</i>). NAT ^R , Amp ^R , C.g CEN/ARS. Intercambio de promotores P _{MET3} por P _{MT1}	Este trabajo
4172- 4173	pRM161- 162	P_{MT1} (<i>Xba I/Sac I</i>) clonado en pRM155 (<i>Xba I/Sac I</i>). NAT ^R , Amp ^R , C.g CEN/ARS. Intercambio de promotores P _{MET3} por P _{MT1}	Este trabajo
4202- 4203	pRM163- 164	P_{MT1} (<i>Xba I/Sac I</i>) clonado en pRM82 (<i>Xba I/Sac I</i>). NAT ^R , Amp ^R , C.g CEN/ARS. Intercambio de promotores P _{MET3} por P _{MT1}	Este trabajo
4204- 4205	pRM165- 166	P_{MT1} (<i>Xba I/Sac I</i>) clonado en pRM103 (<i>Xba I/Sac I</i>). URA3, Amp ^R , C.g CEN/ARS. Intercambio de promotores P _{MET3} por P _{MT1}	Este trabajo
4206-	pRM167-	Producto de PCR de 0.547 Kb (oligonucleótidos	Este trabajo

4207	168	1695 y 146) digerido con (<i>Xho</i> I/ <i>Kpn</i> I), que corresponde al 3' <i>UTR</i> de alfa1, clonado en pRM80 (<i>Xho</i> I/ <i>Kpn</i> I). NAT ^R , <i>URA3</i> , Amp ^R , plásmido integrativo	
------	-----	---	--

Tabla A3. Oligonucleótidos utilizados en este trabajo

Primer	Nombre	Secuencia (5'-3')	Sitio(s) agregados
143	alpha2@+583SacI BsgI Rv MTL3	CCGAGCTCTTGTGCAG CATAAAAAC CATTTCGTTATGG	<i>Sac I Bsg I</i>
146	EMG1@136KpnBs gFwMTL1	CCGGTACCTTGTGCAGCT GCTGAAC TGTGACGACCATC	<i>Kpn I Bsg I</i>
219	ACT Fw@70 RT	CGCCGGTGACGATGCTCC	
220	ACT Rv@210 RT	CTTGGATTGAGCTTCGTC	
290	ALFA2 FW	TCAAGAATTAGTATTACGCATC	
291	ALFA2 RV	AACTGGAACACAATGATATAAG	
320	EMG1@135XbaFw MTL1	CGCTCTAGACT GCTGAACTGTGACG ACCATC	<i>Xba I</i>
321	BUD5@-35RI- RvMTL1	CCCGAATTC GCGTCTTTCCTGTGAT TATGATG	<i>Eco RI</i>
330	a1@nt1 Xba Rv	CCCTCTAGAAAAAT GATGACAGTAG ACCCAATACAAGATC	<i>Xba I</i>
469	Rev@377A1	AGATCTTTCGATCTCTTGCGC	
764	BUD5@-424BamRvMTL1a	CCCGGATCCGGTGGT GATCTCTTGT GTGG	<i>Bam HI</i>
770	alfa2@-424FWBam	CCCGGATCCGTAGAGT GACTTCAGA TATTGTACAACCTG	<i>Bam HI</i>
772	a1MTL1@+1HinFw	CGCAAGCTT CTATAGTTCCTCCTTA CTCTTTTATAG	<i>Hind III</i>
890	alpha2@557 no stop Bam Rv	TTAGGATCCCAGT GTGCGAGGCTGTT TTGAG	<i>Bam HI</i>
891	Bud5@-37Xho_Bsg Rv	CGGCTCGAGTTGTGCAGG TCTTTCC TGTGATTATGATGTAAGTTG	<i>Xho I Bsg I</i>
894	VC-VYFP@+7 Rv Bgl2	GCGAGATCTCGCGCC CTACTTGTAC	<i>Bgl II</i>
895	VC-VYFP@-88 FW	GTACGCTGCAGGTCGAC	
896	alfa2-3 mtl3@-1485 Not FW	ATAGCGGCCGCGAAGCTT GATGAA ATGG	<i>Not I</i>
897	alfa2-3 mtl3@629 Bam no stop Rv	GCGGGATCCCTGTAAGACA ACTCAA AGAAAAGACC	<i>Bam HI</i>

898	alfa2-3 mtl3@+22 Sal FW	CGCGTCGACCTCGCTATTATTATAT AACGGT C GG	<i>Sal</i> I
899	alfa2-3 mtl3@+649 Xho Rv	GCGCTCGAGGTAAGTTTCCTCAATC ACTAGCTATTC	<i>Xho</i> I
900	EMG1@-42 FW Not(Pst) for alfa2-1	TATGCGGCCGCGCTTCTGCAGTATC TACAATAGATAGAAG	<i>Not</i> I <i>Pst</i> I
901	alpha2MTL1@+3 Sal FW	CGCGTCGACCAAACATATACATTTTC TCTTTGTCTTC	<i>Sal</i> I
903	VN-YFP@+32 Rv Bgl2	CCCAGATCTAGAAATTCGCTTATTTA GAAGTG	<i>Bgl</i> II
904	a1@-717 Spe FW	GAGACTAGTTCATTTTGACTGAAAG TTTATTT C G	<i>Spe</i> I
905	a1@519 no TAG Bam Rv	CAGGGATCCGGTCACGATTGTTTAG ATCTTT C G	<i>Bam</i> HI
907	a1@+720 XhoI Rv	CGCCTCGAGCGAATGACCACAGGA CC	<i>Xho</i> I
1049	alpha2MTL1@+11 4EcoRI Fw	GACGAATTCAAGAGATCACCACC	<i>Eco</i> RI
1517	CgCEN ARS Sall Fw	CGGTCGACCTCTAATGATGCAATTT TTGTTTT G	<i>Sal</i> I
1518	CgCEN ARS Sall Rv	GCGGTCGACGCAGGTTAGACTAAC ATGCAAAA A G	<i>Sal</i> I
1633	alfa2@+1 XhoI FW	CGCCTCGAGCTCAAACATAT	<i>Xho</i> I
1640	alfa2@561 BamHI RV	CCCGGATCCTCAAGTGTCGAGGC	<i>Bam</i> HI
1650	alfa3@633 BamHI RV	CGCGGATCCTTATGTAAGACAACT	<i>Bam</i> HI
1685	VC-YFP@linker SpeI RV	CCCACTAGTCGTCGCACCTGCCCC CGCACCTGCTCCAGCGCCCTTGTAC AGCT C G	<i>Spe</i> I
1687	VC-YFP@XbaI FW	CCCTTAGAAAATGAACCACGACA A	<i>Xba</i> I
1692	VNYFP- Linker@519 Linker Xho1 Rv	GGACTAGTCGCACCTGCCCCCGCA CCTGCTCCAGCGCCCTCGATGTTGT GG	<i>Spe</i> I
1694	VNYFP-Linker@+1 Xba1 Fw	GCTTAGAAAATGGTGAGCAAGG	<i>Xba</i> I

1695	alfa1@+1 XhoI FW	AAACTCGAGCAGAACTTGGAGCA	Xho I
1697	alfa1@-312 (SpeI) FW	AATGTACTTTGGTATTTTTAA	
1698	alfa1@BamHI RV	AAAGGATCCTCATGGCGCTG	Bam HI
1699	alfa2@+552 KpnI RV	AAAGGTACCTGACAGTTGTATT	Bam HI
1700	alfa2@-306 SacII FW	AAACCGCGGAGTGACTTCAGAT	Sac II
1702	alfa3@-312 SacII FW	CGCCCGCGGTAGTAGAGTGACTTCAGAT	Sac II
1703	Bud5@114 SacII RV MTL1	GCGCCGCGGGCGCGTCCAATTGCTGCGATGG	Sac II
1704	BUD5@-552 SpeI FW MTL1	CGCACTAGTCTCAAACATATACATT	Spe I
1705	EMG1@135 SacI FW MTL1	CGCGAGCTCCTGCTGAACTGTGACGACCATC	Sac I
1706	EMG1@477 SacII RV MTL1	CGCCCGCGGCCTTCCGGCAGTCG	Sac II
1866	VN-YFP@-1 Linker SalI FW	<u>CCCGTCGACGGCGCTGGAGCAGGTGCGGGGGCAGGTGCGATGGTGAGCAAGG</u>	Sal I
1867	VN-YFP@+32 Linker Xho I Rv	CGCTCGAGAGAAATTCGC	Xho I
1868	VC-YFP@-1 Linker Sal I FW	<u>CCGTCGACGGCGCTGGAGCAGGTGCGGGGGCAGGTGCGATGAACCACGAC</u>	Sal I
1869	VC-YFP@+7 Linker Xho I Rv	GCGCTCGAGCGCGCCCTACTT	Xho I
1870	HDF1@+1 Xba I FW	GCGTCTAGAATGTCAGAGTTGG	Xba I
1871	HDF1@sin tga Sal I Rv	CC GT CGACTAAGTTTAGTTTAGGC	Sal I
1872	HDF2@+1 Cla I Fw	CCATCGATATGTCGGAAGCCAC	Cla I
1873	HDF2@sin taa Sal I Rv	CGCGT CG ACTGACTCCCCTTCTCTTGC	Sal I

1874	cDNA a1@+1 Xba1 Fw	CGTCTAGA ATGATGACAGTAGACC	<i>Xba</i> I
1875	cDNA a1@sin tga Sal1 Fw	CG CGTCGAC GTACGATTGTTTAG	<i>Sal</i> I
1876	alfa2@+1 Xba1 Fw	CG CTCTAGA ATGTCAAAGAAATC	<i>Xba</i> I
1877	alfa2@sin tga Sal1 Rv	CG GTCGAC AGTGTCGAGGC	<i>Sal</i> I
1878	alfa3@+1 Xba1 Fw	CG CTCTAGA ATGTCAAAGAAATCAA G	<i>Xba</i> I
1879	alfa3@sin taa Sal1 Rv	CG CGTCGAC TGTAAGACAACCTCAAA GAAAAGACC	<i>Sal</i> I
1897	HDF1@+1 Xba1 Fw	CG TCTAGA ATGTCAGAGTTGG	<i>Xba</i> I
1898	HDF1@1821 Xho1 Rv	CG CTCGAG TCATAAGTTTAGTTTAG G	<i>Xho</i> I
1900	HDF2@1848 Sal1 Rv	CC GTCGAC TTATGACTCC	<i>Sal</i> I
1901	cDNA a1@Sal1 Rv	CG CGTCGAC CTAGTCACGATTG	<i>Sal</i> I
1902	alfa2@Sal1 Rv	CG GTCGAC TCAAGTGTCGAGG	<i>Sal</i> I
1903	alfa3@Sal1 Rv	CG CGTCGAC TTATGTAAGACAAC	<i>Sal</i> I
2081	MT1@-941 SacI Fw	TAT GAGCTC CCGGAGCACCTGGC	<i>Sac</i> I
2095	Cg a1 @1 aaa EcoRI Fw	AT AGAATT CAAAATGATGACAGTAG ACCCAATACAAG	<i>Eco</i> RI
2098	Cg Alpha2@1aaa EcoRI Fw	AT AGAATT CAAAATGTCAAAGAAATC AAGAATTAGTATTAC	<i>Eco</i> RI
2099	Cg Alpha2@561 Sall Rv	AT AGTCGAC TCAAGTGTCGAGGCTG TTTTGAG	<i>Sal</i> I
2100	Cg Alpha 3@633 Sall Rv	AT AGTCGAC TTATGTAAGACAACCTC AAAGAAAAGACC	<i>Sal</i> I

2179	MT1@-1 XbaI Rv	ATAT CTAGAT GTGTTTGT TTTGTAT GTG	Xba I
2233	alpha2-Sc@+1 Spe1 FW	GCG ACTAGT ATGAATAAAATACCC	Spe I
2234	alpha2-Sc@orf Xho1 RV	GC CTCGAGT CATTCTTTCTTCTTTGC	Xho I
2337	Cg a1@393 Sall Rv	ATGG TCGACCA ATCGTGACTAG	Sal I
2340	Oligo Flag-link Spe RI Fw	CTAGTAAAATGGGAGCAGACTACAA AGATGACGATGACAAAGGAGCCGAT TATAAGGACGATGACGATAAAGGGG CTGACTACAAAGATGACGATGACAA GGGCGCTGGAGCAGGTGCGGGGG CAGGTGCGG	Spe I Eco RI
2341	Oligo Flag-link Spe RI Rv	AATTCCGCACCTGCCCCCGCACCTG CTCCAGCGCCCTTGTGCATCGTCATC TTTGTAGTCAGCCCCTTTATCGTCAT CGTCCTTATAATCGGCTCCTTTGTCA TCGTCATCTTTGTAGTCTGCTCCCAT TTTA	Spe I Eco RI

- Calvin, N.M., and Hanawalt, P.C. (1988) High-efficiency transformation of bacterial cells by electroporation. *J Bacteriol* **170**: 2796-2801.
- Cormack, B.P., and Falkow, S. (1999) Efficient homologous and illegitimate recombination in the opportunistic yeast pathogen *Candida glabrata*. *Genetics* **151**: 979-987.
- Fidel, P.L., Jr., Cutright, J.L., Tait, L., and Sobel, J.D. (1996) A murine model of *Candida glabrata* vaginitis. *J Infect Dis* **173**: 425-431.
- Gietz, R.D., and Sugino, A. (1988) New yeast-*Escherichia coli* shuttle vectors constructed with in vitro mutagenized yeast genes lacking six-base pair restriction sites. *Gene* **74**: 527-534.
- Ramirez-Zavaleta, C.Y., Salas-Delgado, G.E., De Las Penas, A., and Castano, I. (2010) Subtelomeric Silencing of the MTL3 Locus of *Candida glabrata* Requires yKu70, yKu80, and Rif1 Proteins. *Eukaryotic Cell* **9**: 1602-1611.
- Sung, M.K., and Huh, W.K. (2007) Bimolecular fluorescence complementation low analysis system for in vivo detection of protein-protein interaction in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* **24**: 767-775.
- Zordan, R. E., et al. (2013) Expression plasmids for use in *Candida glabrata*. *G3* **3**: 1675-1686.

Tabla A4. Genes inducidos en la cepa de *C. glabrata* que expresa información **a** (gen **a1**) en fase logarítmica.

ID	Log FC	Name	Ortholog	Description
CAGL0E00341g	8.61003613	<i>MTLa1</i>	<i>HMRA1</i>	Mating type protein a1; differentially spliced transcript; expressed in both MATa and MATalpha strains
CAGL0D06061t	7.61592674			Long terminal repeat
CAGL0G07166t	7.615926468			Long terminal repeat
CAGL0G04257t	7.615926095			Long terminal repeat
CAGL0F05137g	7.402447347	<i>uncharacterized</i>	<i>PRY2</i>	Ortholog(s) have sterol binding activity role in pathogenesis, sterol transport and cell surface, extracellular region, fungal-type vacuole localization
CAGL0B01265g	5.112379846	<i>MATalpha2</i>	<i>MATALPHA2</i>	Mating-type regulatory protein alpha2; expressed in all MTLalpha strains and not in MTLa strains
CAGL0D02662g	5.095487111	<i>uncharacterized</i>		Has domain with predicted substrate-specific transmembrane transporter activity, transmembrane transporter activity, role in transmembrane transport and integral component of membrane, membrane localization
CAGL0D02640g	5.095487109	<i>uncharacterized</i>		Has domain with predicted substrate-specific transmembrane transporter activity, transmembrane transporter activity, role in transmembrane transport and integral component of membrane, membrane localization
CAGL0G08976r	4.825929207	<i>tY(GUA)1</i>		tRNA-Tyr, predicted by tRNAscan-SE; GUA anticodon
CAGL0I02618r	4.825921327	<i>tY(GUA)3</i>		tRNA-Tyr, predicted by tRNAscan-SE; GUA anticodon
CAGL0L01595r	4.825914262	<i>tY(GUA)6</i>		tRNA-Tyr, predicted by tRNAscan-SE; GUA anticodon
CAGL0K11154r	4.825908664	<i>tY(GUA)5</i>		tRNA-Tyr, predicted by tRNAscan-SE; GUA anticodon
CAGL0K10538r	4.825905963	<i>tY(GUA)4</i>		tRNA-Tyr, predicted by tRNAscan-SE; GUA anticodon
CAGL0H01903r	4.825903247	<i>tY(GUA)2</i>		tRNA-Tyr, predicted by tRNAscan-SE; GUA anticodon
CAGL0M03421g	4.478173813	<i>uncharacterized</i>		Protein of unknown function

CAGL0J10296g	4.254459332	<i>uncharacterized</i>	<i>APJ1</i>	Ortholog(s) have ATPase activator activity, unfolded protein binding activity, role in protein sumoylation and mitochondrion, nucleus localization
CAGL0I10211g	3.973053226	<i>Novel_protein coding25</i>		
CAGL0I10147g	3.915236128	<i>PWP1</i>		Protein with 32 tandem repeats; putative adhesin-like protein
CAGL0L03916g	3.885829016	<i>uncharacterized</i>		Has domain with predicted nucleic acid binding activity
CAGL0H03619g	3.778479933	<i>uncharacterized</i>	<i>YNL011C</i>	
CAGL0K04367g	3.677001265	<i>uncharacterized</i>		Has domain(s) with predicted amino acid transmembrane transporter activity, role in amino acid transmembrane transport and membrane localization
CAGL0F02057g	3.62748296	<i>uncharacterized</i>		Has domain(s) with predicted DNA binding activity
CAGL0I07249g	3.466569487	<i>uncharacterized</i>	<i>BAG7</i>	Putative GTPase-activating protein involved in cell wall and cytoskeleton homeostasis; gene is upregulated in azole-resistant strain
CAGL0K04565g	3.413404248	<i>uncharacterized</i>	<i>VHT1</i>	Ortholog(s) have biotin transporter activity, role in biotin transport and plasma membrane localization
CAGL0C00946g	3.336214051	<i>Novel_protein coding6</i>		
CAGL0B03949g	3.298593788			Protein of unknown function
CAGL0H06853g	3.091826573	<i>ADH6</i>		Putative NADP-dependent alcohol dehydrogenase VI; protein abundance in ace2 mutant cells
CAGL0K12716g	2.97551867	<i>uncharacterized</i>	<i>YFL040W</i>	Ortholog(s) have prospore membrane localization
CAGL0J01774g	2.969837666	<i>uncharacterized</i>		Putative adhesin-like protein; has glycine and serine rich repeats
CAGL0E06292g	2.965585475	<i>uncharacterized</i>		Has domain(s) with predicted GTP binding, GTPase activity, role in protein transport signal transduction, small GTPase mediated signal transduction and intracellular, membrane localization
CAGL0M03025g	2.94864619	<i>uncharacterized</i>	<i>CAT8</i>	Ortholog(s) have RNA polymerase II core promoter proximal region sequence-specific DNA binding

CAGL0J02530g	2.941535979	<i>uncharacterized</i>		Putative adhesion protein; predicted GPI-anchor
CAGL0F05093g	2.940019277	<i>uncharacterized</i>	<i>BER1</i>	Ortholog(s) have role in microtubule-based process and cytoplasm localization
CAGL0G06622g	2.938578733	<i>uncharacterized</i>		Protein of unknown function
CAGL0L09537g	2.909758957	<i>uncharacterized</i>		Ortholog(s) have cytosol, nucleus localization
CAGL0I09878g	2.824312387	<i>uncharacterized</i>		Ortholog(s) have myristoyl-CoA ligase activity, oleoyl-CoA ligase activity, palmitoyl-CoA ligase activity and role in long-chain fatty acid metabolic process, long-chain fatty-acyl-CoA metabolic process
CAGL0I02024g	2.780115234	<i>OYE2</i>		Putative NADPH dehydrogenase; protein abundance increased in <i>ace2</i> mutant cells
CAGL0H05379g	2.743387259	<i>uncharacterized</i>	<i>GCR1</i>	Ortholog(s) have RNA polymerase II core promoter proximal region sequence-specific DNA binding
CAGL0H09130g	2.724394791	<i>uncharacterized</i>		Protein of unknown function
CAGL0I05610g	2.695134327	<i>uncharacterized</i>	<i>YNR014W</i>	Ortholog(s) have cytoplasm localization
CAGL0E03762g	2.675495862	<i>uncharacterized</i>	<i>RIM101</i>	Ortholog(s) have RNA polymerase II core promoter proximal region sequence-specific DNA binding transcription factor activity involved in negative regulation of transcription, sequence-specific DNA binding activity
CAGL0H08910g	2.670635829	<i>uncharacterized</i>	<i>YGL138C</i>	Ortholog(s) have prospore membrane localization
CAGL0A01366g	2.631372741	<i>EPA9</i>	<i>FLO1</i>	Putative adhesin; belongs to adhesin cluster I
CAGL0F01815g	2.628989229	<i>uncharacterized</i>		Protein of unknown function
CAGL0B02137r	2.590103027	<i>uncharacterized</i>		Protein of unknown function
CAGL0F05115g	2.560436663	<i>uncharacterized</i>	<i>INA1</i>	Ortholog(s) have plasma membrane localization
CAGL0G05329g	2.534277581	<i>uncharacterized</i>	<i>SNF11</i>	Ortholog(s) have DNA translocase activity, role in positive regulation of transcription from RNA polymerase II promoter and SWI/SNF complex, cytosol localization
CAGL0I02794g	2.53176836	<i>uncharacterized</i>	<i>YOR114W</i>	Ortholog of <i>S. cerevisiae</i> : YOR114W and <i>Saccharomyces cerevisiae</i> S288C : YOR114W

CAGL0M10153g	2.52530131	<i>uncharacterized</i>	<i>STE20</i>	Ortholog(s) have MAP kinase kinase kinase kinase activity, histone kinase activity (H2B-S14 specific), mRNA binding activity
CAGL0G03047g	2.520564794	<i>uncharacterized</i>	<i>DBF2</i>	Ortholog(s) have protein serine/threonine kinase activity
CAGL0I06116g	2.509341517	<i>uncharacterized</i>	<i>SSY5</i>	Ortholog(s) have serine-type endopeptidase activity, role in protein processing, response to amino acid and extrinsic component of plasma membrane localization
CAGL0H05533g	2.508640563	<i>uncharacterized</i>	<i>MOT1</i>	Ortholog(s) have ATPase activity, DNA binding, TBP-class protein binding activity
CAGL0L11154g	2.503518654	<i>uncharacterized</i>	<i>NTE1</i>	Ortholog(s) have lysophospholipase activity, role in phosphatidylcholine catabolic process, regulation of phospholipid biosynthetic process and endoplasmic reticulum localization
CAGL0J11528g	2.499988602	<i>uncharacterized</i>	<i>YNL193W</i>	
CAGL0L10340g	2.498581245	<i>uncharacterized</i>	<i>SLD7</i>	Ortholog(s) have role in regulation of DNA-dependent DNA replication initiation and DNA replication preinitiation complex, chromosome, centromeric region, endoplasmic reticulum, nuclear envelope, spindle pole body localization
CAGL0A01284g	2.478806649	<i>EPA10</i>	<i>FLO1</i>	Putative adhesin-like protein; belongs to adhesin cluster I
CAGL0K06435g	2.468435117	<i>uncharacterized</i>	<i>SSP41</i>	Ortholog(s) have role in negative regulation of transcription from RNA polymerase II promoter and cytosol, nucleus localization
CAGL0H00264g	2.456148922	<i>uncharacterized</i>	<i>YPR174C</i>	Ortholog(s) have nuclear envelope, nuclear periphery, spindle pole body localization
CAGL0L06248g	2.450416612	<i>uncharacterized</i>	<i>YBR085C-A</i>	Ortholog(s) have cytoplasm, nucleus localization
CAGL0A01782g	2.448058993	<i>HXT4</i>	<i>HXT4</i>	Ortholog(s) have glucose transmembrane transporter activity, pentose transmembrane transporter activity and plasma membrane localization
CAGL0A01694g	2.43709742	<i>uncharacterized</i>	<i>YGL036W</i>	Ortholog(s) have cytoplasm localization
CAGL0M03179g	2.421069871	<i>uncharacterized</i>	<i>IML2</i>	Ortholog(s) have cytosol, nucleus localization

CAGL0I06138g	2.40770022	<i>uncharacterized</i>	<i>FAR1</i>	Ortholog(s) have cyclin-dependent protein serine/threonine kinase inhibitor activity
CAGL0J05159g	2.402037298	<i>uncharacterized</i>		Putative adhesin-like protein
CAGL0E05280g	2.363855101	<i>GRE2(B)</i>	<i>GRE2</i>	Putative methylglyoxal reductase (NADPH-dependent)
CAGL0J11506g	2.349242436	<i>uncharacterized</i>	<i>CHS1</i>	Ortholog(s) have chitin synthase activity, role in ascospore wall assembly, ascospore wall chitin biosynthetic process, cell separation after cytokinesis and cell septum, chitosome, endoplasmic reticulum, plasma membrane localization
CAGL0K02651g	2.34605571	<i>uncharacterized</i>	<i>YHL008C</i>	Ortholog(s) have role in chloride transport and fungal-type vacuole localization
CAGL0B03091g	2.293547038	<i>uncharacterized</i>	<i>BUD8</i>	Protein of unknown function
CAGL0I01958g	2.285750708	<i>uncharacterized</i>	<i>RTT107</i>	Protein of unknown function
CAGL0F01859g	2.256884172	<i>uncharacterized</i>	<i>OSW2</i>	Ortholog(s) have role in ascospore wall assembly and cytoplasm, prospore membrane localization
CAGL0L10626g	2.221890682	<i>uncharacterized</i>	<i>VIK1</i>	Ortholog(s) have microtubule binding activity, role in microtubule-based process, mitotic sister chromatid cohesion and kinesin complex, spindle pole body localization
CAGL0L01771g	2.220370222	<i>uncharacterized</i>	<i>SOK2</i>	Has domain(s) with predicted DNA binding, sequence-specific DNA binding transcription factor activity and role in regulation of transcription, DNA-templated
CAGL0D05093t	2.215491829	<i>uncharacterized</i>		Repeat_region
CAGL0I05632g	2.166201253	<i>PHO91</i>	<i>PHO91</i>	Ortholog(s) have glycerol-3-phosphate transmembrane transporter activity, inorganic phosphate transmembrane transporter activity
CAGL0H07557g	2.166145535	<i>uncharacterized</i>	<i>FZF1</i>	Ortholog(s) have RNA polymerase II core promoter proximal region sequence-specific DNA binding
CAGL0H05973g	2.127393175	<i>uncharacterized</i>	<i>YPL108W</i>	Ortholog(s) have cytoplasm localization
CAGL0E01529g	2.119348754	<i>uncharacterized</i>	<i>PFK27</i>	Ortholog(s) have role in fructose 2,6-bisphosphate metabolic process, regulation of glycolytic process

CAGL0H07601g	2.114144005	<i>uncharacterized</i>	<i>HFM1</i>	Ortholog(s) have DNA helicase activity, role in DNA unwinding involved in DNA replication, reciprocal meiotic recombination, synapsis and nucleus localization
CAGL0H04279g	2.103577251	<i>MT-IIB</i>		Copper-binding metallothionein, involved in sequestration of metal ions; inducible by copper and silver; present in multiple (3-9) tandemly arranged copies in various strains
CAGL0L01831g	2.103576901	<i>uncharacterized</i>		Protein of unknown function
CAGL0H04257g	2.103576165	<i>MT-II</i>		Copper-binding metallothionein, involved in sequestration of metal ions; inducible by copper and silver; present in multiple (3-9) tandemly arranged copies in various strains; gene is downregulated in azole-resistant strain
CAGL0H02123g	2.06180092	<i>uncharacterized</i>	<i>NAM8</i>	Ortholog(s) have mRNA binding activity, role in mRNA splice site selection, positive regulation of mRNA splicing, via spliceosome and U1 snRNP, U2-type prespliceosome, commitment complex, cytoplasm localization
CAGL0A01738g	2.054321159	<i>uncharacterized</i>	<i>OCH1</i>	Putative mannosyltransferase of cis-Golgi apparatus; gene is upregulated in azole-resistant strain
CAGL0M06325g	2.051293214	<i>uncharacterized</i>	<i>RLM1</i>	Ortholog(s) have DNA binding, bending, RNA polymerase II core promoter proximal region sequence-specific DNA binding transcription factor activity, sequence-specific DNA binding activity
CAGL0J10494g	2.043191613	<i>uncharacterized</i>	<i>APT1</i>	Ortholog(s) have adenine phosphoribosyltransferase activity, role in adenine salvage and cytoplasm, nucleus localization
CAGL0M03795g	2.023686798	<i>uncharacterized</i>	<i>HRP1</i>	Has domain(s) with predicted nucleic acid binding, nucleotide binding activity
CAGL0A03432g	2.008376129	<i>uncharacterized</i>	<i>RAD5</i>	Ortholog(s) have DNA-dependent ATPase activity, Y-form DNA binding, four-way junction DNA binding, four-way junction helicase activity
CAGL0M00352g	1.978868622	<i>uncharacterized</i>	<i>IML1</i>	Ortholog(s) have GTPase activator activity, role in regulation of autophagic vacuole assembly and Iml1 complex, extrinsic component of fungal-type vacuolar membrane localization
CAGL0M02761g	1.973510398	<i>TBF1</i>	<i>TBF1</i>	Telomere repeat-binding factor

CAGL0H05995g	1.961920894	<i>uncharacterized</i>	<i>AIM2</i>	Ortholog(s) have cytosol, nucleus localization
CAGL0L12188g	1.927663284	<i>uncharacterized</i>	<i>SMC4</i>	Ortholog(s) have ATPase activity, chromatin binding activity and role in DNA unwinding involved in DNA replication, cellular protein localization, mitotic chromosome condensation, rDNA condensation, tRNA gene clustering
CAGL0C00253g	1.927159743	<i>uncharacterized</i>	<i>Some similarities with YIR019c STA1</i>	Putative cell wall adhesin; belongs to adhesin cluster III; predicted GPI anchor; contains 6 tandem repeats
CAGL0J01529g	1.847743774	<i>uncharacterized</i>	<i>RCO1</i>	Ortholog(s) have role in histone deacetylation, negative regulation of antisense RNA transcription and positive regulation of transcription from RNA polymerase II promoter
CAGL0G09493g	1.826962003	<i>uncharacterized</i>	<i>ULS1</i>	Ortholog(s) have SUMO binding activity, role in chromatin assembly or disassembly, mating type switching, negative regulation of double-strand break repair via nonhomologous end joining and mitochondrion, nucleolus localization
CAGL0G02717g	1.821653872	<i>uncharacterized</i>	<i>SGA1</i>	Ortholog(s) have glucan 1,4-alpha-glucosidase activity, role in glycogen catabolic process and Golgi apparatus, endoplasmic reticulum, fungal-type vacuole, prospore membrane localization
CAGL0I04774g	1.810599303	<i>uncharacterized</i>	<i>CSG2</i>	Ortholog(s) have enzyme regulator activity, role in cellular calcium ion homeostasis and integral component of endoplasmic reticulum membrane localization
CAGL0C02233g	1.7992445	<i>uncharacterized</i>	<i>MXR1</i>	Ortholog(s) have L-methionine-(S)-S-oxide reductase activity, peptide-methionine (S)-S-oxide reductase activity and role in L-methionine biosynthetic process from methionine sulphoxide, cellular response to hydrogen peroxide
CAGL0B01595g	1.766214476	<i>uncharacterized</i>		Protein of unknown function
CAGL0M01188g	1.729507501	<i>uncharacterized</i>	<i>SWR1</i>	Ortholog(s) have structural molecule activity, role in histone exchange and Swr1 complex, cytosol localization
CAGL0E05962g	1.706338039	<i>uncharacterized</i>	<i>FMP40</i>	Ortholog(s) have cytosol, mitochondrion, nucleus localization

CAGL0I03476g	1.699139304	<i>uncharacterized</i>	<i>DHH1</i>	Ortholog(s) have chromatin binding, mRNA binding, translation regulator activity, nucleic acid binding activity
CAGL0E01265g	1.691938033	<i>uncharacterized</i>	<i>NUM1</i>	Ortholog(s) have tubulin binding activity and role in microtubule cytoskeleton organization, mitochondrial fission, mitochondrion inheritance, nuclear migration along microtubule
CAGL0I05698g	1.65589182	<i>uncharacterized</i>	<i>PFK2</i>	Ortholog(s) have 6-phosphofructokinase activity, mRNA binding activity, role in glycolytic process, proton transport and 6-phosphofructokinase complex, mitochondrion localization
CAGL0H08129g	1.586982103	<i>uncharacterized</i>	<i>DFG16</i>	Ortholog(s) have role in cellular response to pH, filamentous growth of a population of unicellular organisms in response to pH, pathogenesis, protein processing, pseudohyphal growth, regulation of intracellular pH
CAGL0L08162g	1.466346194	<i>uncharacterized</i>	<i>SNT1</i>	Ortholog(s) have role in cellular response to biotic stimulus, cellular response to starvation and filamentous growth of a population of unicellular organisms in response to biotic stimulus
CAGL0I06666g	1.401350924	<i>uncharacterized</i>	<i>PEA2</i>	Ortholog(s) have role in bipolar cellular bud site selection, budding cell apical bud growth, positive regulation of actin cytoskeleton reorganization and pseudohyphal growth
CAGL0L08668g	1.335764743	<i>HST2</i>	<i>HST2</i>	Ortholog(s) have NAD-dependent histone deacetylase activity
CAGL0F05929g	1.271524102	<i>uncharacterized</i>	<i>RCH1</i>	Ortholog(s) have role in calcium ion import and plasma membrane localization

Tabla A5. Genes inducidos en fase logarítmica de las cepas wt, alfaR, a1-alfa2 y a1-alfa3

ID	Log FC	Name	Ortholog	Description
alfaR				
CAGL0B00242g	10.87518043	<i>MATalpha1</i>	HMLALPHA1	Alpha-domain mating-type protein alpha1p
CAGL0B01243g	2.24846381	MATalpha1	MATalpha1	Alpha-domain mating-type protein alpha1p; expressed in all MTLalpha strains and not in MTLalpha strains
a1-alfa2				
CAGL0J07062g	2.55963039	uncharacterized	CAR1	Ortholog(s) have arginase activity, manganese ion binding, ornithine carbamoyltransferase inhibitor activity, zinc ion binding activity
CAGL0L13409r	2.725824066	RDN5-1		5s-RNA
a1-alfa3				
CAGL0B00264g	8.052685437	<i>MTLalpha2</i>	HMLALPHA2	Homeobox-domain protein alpha2
CAGL0M05533g	4.12513647	<i>DUR1,2</i>	DUR1,2	Ortholog(s) have allophanate hydrolase activity, urea carboxylase activity, role in cellular response to alkaline pH, nitrogen utilization, pathogenesis, urea catabolic process and cytoplasm localization
wt				
CAGL0G04433g	4.352750034	uncharacterized	PRM10	Ortholog(s) have endoplasmic reticulum localization

Tabla A6. Genes reprimidos en fase logarítmica que se comparten entre las cepas con diferente información de apareamiento (wt, aR, alfaR, a1-alfa2 y a1-alfa3).

ID	Name	Ortholog	Description
CAGL0C05071g	uncharacterized	THI20	Ortholog(s) have hydroxymethylpyrimidine kinase activity, phosphomethylpyrimidine kinase activity, thiaminase activity, role in thiamine biosynthetic process, thiamine catabolic process and cytosol localization
CAGL0K07546g	PMU2	PMU1	Putative phosphate starvation inducible acid phosphatase; contains a phosphomutase-like domain; functionally complements a <i>S. cerevisiae</i> pho5 mutant; transcript abundance during phosphate starvation regulated by Pho4p
CAGL0M01166g	uncharacterized	THI4	Ortholog(s) have ferrous iron binding activity, role in mitochondrial genome maintenance, thiamine biosynthetic process, thiazole biosynthetic process and cytosol, nucleus localization

Tabla A7. Genes reprimidos en fase logarítmica únicos de la cepa que expresa el gen **a1** solamente (aR).

ID	Log FC	Name	Ortholog	Description
CAGL0A01243g	-2.409281613	GIT1		Has domain(s) with predicted transmembrane transporter activity, role in transmembrane transport and integral component of membrane localization
CAGL0E01353g	-2.438860608	uncharacterized		Putative high-affinity zinc transporter; gene is downregulated in azole-resistant strain
CAGL0G00874r	-2.927461639	Novel_noncoding_57		
CAGL0H08712g	-2.22982452	uncharacterized		Has domain(s) with predicted phosphatidylinositol binding activity and role in cell communication
CAGL0H10032g	-1.630318029	PST2	PST2	Ortholog(s) hace membrane raft, mitochondrion, plasma membrane localization
CAGL0K07337g	-2.858186035	uncharacterized		Has domain(s) with predicted ion channel activity, role in ion transport and membrane localization
CAGL0L11990g	-1.60787826	uncharacterized	GRX4	Ortholog(s) hace RNA polymerase II activating transcription factor binding, disulfide oxidoreductase activity
CAGL0L12606g	-1.799017528	uncharacterized	ISM1	Ortholog(s) hace role in mitochondrial translation and cytosol, mitochondrion localization
CAGL0M13266g	-2.001158257	Novel_proteincoding47		
CAGL0M13585g	-1.872850346	uncharacterized	HER2	ortholog(s) have glutaminyl-tRNA synthase (glutamine-hydrolyzing) activity and role in

endoplasmic reticulum organization, glutaminyl-tRNA^{Gln} biosynthesis via transamidation

Tabla A8. Genes reprimidos en fase logarítmica de las cepas wt y alfaR.

ID	Log FC	Name	Ortholog	Description
wt				
CAGL0B05137g	-4.935138394	uncharacterized		Protein of unknown function
CAGL0E00275g	-2.432197402	EPA20	FLO5	Putative adhesin; belongs to adhesin cluster I
alfaR				
CAGL0K07315g	-1.846676189	uncharacterized	COA6	Ortholog(s) have role in cellular copper ion homeostasis, mitochondrial respiratory chain complex IV assembly and mitochondrial intermembrane space, nucleus localization
CAGL0E00116g	-3.015554974	uncharacterized		Protein of unknown function

Tabla A9. Genes inducidos en fase estacionaria únicos de las cepas alfaR y a1-alfa3.

ID	Log FC	Name	Ortholog	Description
alfaR				
CAGL0B00242g	10.000195269	<i>MATalpha1</i>	HMLALPHA1	Alpha-domain mating-type protein alpha1p
a1-alfa3				
CAGL0B00264g	7.631045935	MTLalpha2	HMLALPHA2	Homeobox-domain protein alpha2
CAGL0M03465g	2.542761800	uncharacterized	ATO2	Ortholog(s) have acetate transmembrane transporter activity and role in plasma membrane acetate transport
CaglIfMt19	4.942750213	<i>tl(GAU)1mt</i> , tRNA-Ile		Mitochondrial isoleucine tRNA, has GAU anticodon

Tabla A10. Genes reprimidos en fase estacionaria de las cepas que expresan a1-alfa3 y la cepa parental (wt).

ID	Log FC	Name	Ortholog	Description
wt				
CAGL0E00275g	-1.809362423	EPA20	FLO5	Putative adhesin; belongs to adhesin cluster I
a1-alfa3				
CAGL0C02519g	-2.362280358	uncharacterized	MIG3	Has domain(s) with predicted nucleic acid binding activity

IX. Trabajos en los que participé



JOURNALS
investing in science

FEMS Yeast Research, 16, 2016, fow082

doi: 10.1093/femsyr/fow082

Advance Access Publication Date: 19 September 2016

Research Article

RESEARCH ARTICLE

Candida glabrata encodes a longer variant of the mating type (MAT) alpha2 gene in the mating type-like MTL3 locus, which can form homodimers

5 Karina Robledo-Márquez, Guadalupe Gutiérrez-Escobedo,
Patricia Yáñez-Carrillo, Yamile Vidal-Aguilar,
Marcela Briones-Martín-del-Campo, Emmanuel Orta-Zavalza,
Alejandro De Las Peñas and Irene Castaño*

Q1 10 División de Biología Molecular, IPICYT—Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, Camino a la Presa San Jose no. 2055, Lomas 4a Seccion, San Luis Potosí, 78216, México

Q2 *Corresponding author: División de Biología Molecular, IPICYT—Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, Camino a la Presa San Jose no. 2055, Lomas 4a Seccion, San Luis Potosí, SLP, 78216, México. Tel: +(52)-444-834-2038; Fax: +(52)-444-834-2010; E-mail: icastano@ipicyt.edu.mx

Q3 One sentence summary: The asexual fungal pathogen *Candida glabrata* contains three mating type-like loci. *Candida glabrata* conserves a variant of the alpha2 gene (alpha3) a1 and alpha2 forms heterodimers and alpha3 homodimers.

15 Editor: Richard Calderone

ABSTRACT

The fungal pathogen *Candida glabrata* is a haploid asexual yeast. *Candida glabrata* contains orthologs of the genes that control mating and cell-type identity in other fungi, which encode putative transcription factors localized in the MAT locus in *Saccharomyces cerevisiae* or MTL in other fungi. *Candida glabrata* contains three copies of the CgMTL locus but only CgMTL1 correctly expresses the information encoded in it. CgMTL1 can encode the Cga1 gene (a information), or the Cgalpha1 and Cgalpha2 genes (alpha information). CgMTL2 contains an identical copy of the Cga1 gene. CgMTL3 contains an identical copy of the Cgalpha1 gene but a longer variant of the Cgalpha2 gene that we termed Cgalpha3. In *S. cerevisiae* diploid cells, that express Sca and Scalpa information, Sca1 and Scalpa2 proteins form a heterodimer, which represses genes expressed only in haploid cells and some genes involved in stress response. We constructed *C. glabrata* strains that simultaneously express Cga1 and Cgalpha2 or Cga1 and Cgalpha3 genes. We did not find any phenotype in these strains when grown under a large variety of stress and nutritional conditions. However, we detected an interaction between Cga1 and Cgalpha2 but not between Cga1 and Cgalpha3 by Bimolecular Fluorescence Complementation and co-immunoprecipitation assays.

Q3 20 **Keywords:** *Candida glabrata*; mating type-like loci (MTL); MTL-encoded genes; transcription factors; Cga1-Cgalpha2 heterodimer; Cgalpha3-Cgalpha3 homodimer

Para consultar la publicación completa se puede visitar la siguiente liga:
<http://femsyr.oxfordjournals.org/content/early/2016/09/19/femsyr.fow082.long>

The superoxide dismutases of *Candida glabrata* protect against oxidative damage and are required for lysine biosynthesis, DNA integrity and chronological life survival

Marcela Briones-Martin-del-Campo, Emmanuel Orta-Zavalza, Israel Cañas-Villamar, Guadalupe Gutiérrez-Escobedo, Jacqueline Juárez-Cepeda, Karina Robledo-Márquez, Omar Arroyo-Helguera,† Irene Castaño and Alejandro De Las Peñas

Correspondence
Alejandro De Las Peñas
cano@ipicyt.edu.mx

IPICYT, División de Biología Molecular, Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, Camino a la Presa San José, no. 2055, Col. Lomas 4ª Sección, San Luis Potosí, San Luis Potosí 78216, Mexico

Received 2 October 2014
Accepted 17 November 2014

The fungal pathogen *Candida glabrata* has a well-defined oxidative stress response, is extremely resistant to oxidative stress and can survive inside phagocytic cells. In order to further our understanding of the oxidative stress response in *C. glabrata*, we characterized the superoxide dismutases (SODs) Cu,ZnSOD (Sod1) and MnSOD (Sod2). We found that Sod1 is the major contributor to total SOD activity and is present in cytoplasm, whereas Sod2 is a mitochondrial protein. Both SODs played a central role in the oxidative stress response but Sod1 was more important during fermentative growth and Sod2 during respiration and growth in non-fermentable carbon sources. Interestingly, *C. glabrata* cells lacking both SODs showed auxotrophy for lysine, a high rate of spontaneous mutation and reduced chronological lifespan. Thus, our study reveals that SODs play an important role in metabolism, lysine biosynthesis, DNA protection and aging in *C. glabrata*.

Para consultar la publicación completa se puede visitar la siguiente liga:

<http://mic.microbiologyresearch.org/content/journal/micro/10.1099/mic.0.000006#tab1>



Mycologic Forum

The mating type-like loci of *Candida glabrata*



Patricia Yáñez-Carrillo, Karina A. Robledo-Márquez, Candy Y. Ramírez-Zavaleta¹,
Alejandro De Las Peñas, Irene Castaño*

División de Biología Molecular, Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica (IPICYT), San Luis Potosí, San Luis Potosí, Mexico

ARTICLE INFO

Article history:

Received 16 August 2013

Accepted 27 September 2013

Available online 16 November 2013

Keywords:

Candida glabrata

Mating type-like loci

Subtelomeric silencing

Cell type identity

ABSTRACT

Candida glabrata, a haploid and opportunistic fungal pathogen that has not known sexual cycle, has conserved the majority of the genes required for mating and cell type identity. The *C. glabrata* genome contains three mating-type-like loci called *MTL1*, *MTL2* and *MTL3*. The three loci encode putative transcription factors, **a1**, $\alpha 1$ and $\alpha 2$ that regulate cell type identity and sexual reproduction in other fungi like the closely related *Saccharomyces cerevisiae*. *MTL1* can contain either **a** or α information. *MTL2*, which contains **a** information and *MTL3* with α information, are relatively close to two telomeres. *MTL1* and *MTL2* are transcriptionally active, while *MTL3* is subject to an incomplete silencing nucleated at the telomere that depends on the silencing proteins Sir2, Sir3, Sir4, yKu70/80, Rif1, Rap1 and Sum1. *C. glabrata* does not seem to maintain cell type identity, as cell type-specific genes are expressed regardless of the type (or even absence) of mating information. These data highlight important differences in the control of mating and cell type identity between the non-pathogenic yeast *S. cerevisiae* and *C. glabrata*, which might explain the absence of a sexual cycle in *C. glabrata*. The fact that *C. glabrata* has conserved the vast majority of the genes involved in mating might suggest that some of these genes perhaps have been rewired to control other processes important for the survival inside the host as a commensal or as a human pathogen.

This manuscript is part of the series of works presented at the "V International Workshop: Molecular genetic approaches to the study of human pathogenic fungi" (Oaxaca, Mexico, 2012).

© 2013 Revista Iberoamericana de Micología. Published by Elsevier España, S.L. All rights reserved.

Para consultar la publicación completa se puede visitar la siguiente liga:

<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1130140613001137>