



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

**POSGRADO EN CIENCIAS EN BIOLOGIA MOLECULAR**

**El factor de transcripción Gln3 y la proteína Ure2  
forman un complejo en *Candida glabrata*.**

Tesis que presenta

**Juan David Vázquez Briones**

Para obtener el grado de

**Maestro en Ciencias en Biología Molecular**

**Codirectoras de la Tesis:**

**Dra. Lina Riego Ruiz**

**Dra. Karina Asyade Robledo Márquez**

San Luis Potosí, S.L.P., a 16 de Julio 2020



## Constancia de aprobación de la tesis

La tesis “**El factor de transcripción Gln3 y la proteína Ure2 forman un complejo en *Candida glabrata***” presentada para obtener el Grado de Maestro en Ciencias en Biología Molecular fue elaborada por **Juan David Vázquez Briones** y aprobada el **16 de Julio de 2020** 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. Karina Asyade Robledo Márquez**

Codirectora de la tesis

---

**Dra. Lina Raquel Riego Ruiz**

Codirectora de la tesis

---

**Dr. Alejandro De Las Peñas Nava**

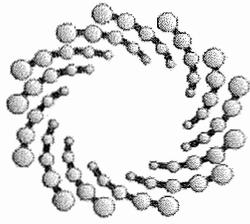
Miembro del Comité Tutorial



## **Créditos Institucionales**

Esta tesis fue elaborada en el Laboratorio de Genómica Funcional y Comparativa de la División de Biología Molecular del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C., bajo la codirección de las doctoras Karina Asyade Robledo Márquez y Lina Raquel Riego Ruiz.

Durante la realización del trabajo el autor recibió una beca académica del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología No. de registro 02420600.



**IPICYT**

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

## Acta de Examen de Grado

El Secretario Académico del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C., certifica que en el Acta 207 del Libro Segundo de Actas de Exámenes de Grado del Programa de Maestría en Ciencias en Biología Molecular está asentado lo siguiente:

En la ciudad de San Luis Potosí a los 7 días del mes de agosto del año 2020, se reunió a las 10:00 horas en las instalaciones del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C., el Jurado integrado por:

<b>Dr. Alejandro De Las Peñas Nava</b>	<b>Presidente</b>	<b>IPICYT</b>
<b>Dra. Lina Raquel Riego Ruiz</b>	<b>Secretaria</b>	<b>IPICYT</b>
<b>Dra. Karina Asyade Robledo Márquez</b>	<b>Sinodal</b>	<b>IPICYT</b>

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

**MAESTRO EN CIENCIAS EN BIOLOGÍA MOLECULAR**

sustentó el C.

**Juan David Vázquez Briones**

sobre la Tesis intitulada:

*El factor de transcripción Gln3 y la proteína Ure2 forman un complejo en Candida glabrata*

que se desarrolló bajo la dirección de

**Dra. Karina Asyade Robledo Márquez**

**Dra. Lina Raquel Riego Ruiz**

El Jurado, después de deliberar, determinó

**APROBARLO**

Dándose por terminado el acto a las 11:50 horas, procediendo a la firma del Acta los integrantes del Jurado. Dando fe el Secretario Académico del Instituto.

A petición del interesado y para los fines que al mismo convengan, se extiende el presente documento en la ciudad de San Luis Potosí, S.L.P., México, a los 7 días del mes de agosto de 2020.

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

**Dr. Marcial Bonilla Marín**  
Secretario Académico



## **Agradecimientos**

A mis codirectoras Lina Riego y Karina Robledo, por su paciencia y dirección durante la realización del proyecto.

Al Dr. Nicolás Gómez, cuyo apoyo técnico (tanto logístico como práctico) fue indispensable para llevar a cabo el proyecto.

A todos mis compañeros del laboratorio de Genómica Funcional y Comparativa por su amistad, apoyo y ayuda sin la cual este proyecto no hubiera sido posible.

A LANBAMA del IPICYT por los servicios de secuenciación recibidos.

A mi familia que durante la realización del proyecto me apoyaron de principio a fin.

# Contenidos

Constancia de aprobación de la tesis	ii
Créditos institucionales	iii
Acta de examen	iv
Agradecimientos	v
Anexos	vii
Abreviaturas	viii
Resumen	ix
Abstract	x
Introducción	1
Materiales y Métodos	8
Resultados	25
Discusión	39
Conclusión	42
Referencias	43
Anexos	47

## Lista de figuras

Figura 1. Esquema simplificado del control de la expresión de genes NCR sensibles regulados por Gln3 en <i>S. cerevisiae</i> .	3
Figura 2. Tiempos de duplicación de la cepa parental (BG14) y de las mutantes sencillas, dobles y triple de <i>GLN3</i> , <i>GAT1</i> y <i>URE2</i> crecidas en diferentes fuentes de nitrógeno.	5
Figura 3. Representación de la complementación bi-molecular de fluorescencia (BiFC).	7
Figura 4. Esquema de la estructura de los plásmidos pDV generados en el estudio.	19
Figura 5. Esquema de construcción de los plásmidos BiFC.	26
Figura 6. Tiempos de duplicación de la cepa parental de <i>C. glabrata</i> y de las mutantes nulas <i>gln3Δ</i> , <i>ure2Δ</i> y <i>gln3Δ ure2Δ</i> .	27
Figura 7. Tiempos de duplicación de las cepas derivadas de <i>ure2Δ</i> transformadas con los plásmidos que codifican para las proteínas quiméricas de <i>URE2</i> con las fracciones de Venus.	29
Figura 8. Tiempos de duplicación de las cepas derivadas de <i>gln3Δ</i> transformadas con el plásmido que codifica para la proteína quimérica de <i>GLN3</i> con una de las fracciones de Venus.	30
Figura 9. Tiempos de duplicación de las cepas derivadas de la mutante doble <i>gln3Δ ure2Δ</i> transformadas con las parejas de plásmidos que codifican para las quimeras de Gln3 y Ure2.	32
Figura 10. Expresión de <i>GAP1</i> de <i>C. glabrata</i> en cepas transformadas derivadas de <i>gln3Δ ure2Δ</i> .	34
Figura 11. Fluorescencia relativa de las cepas que expresan las quimeras de Gln3 y Ure2 bajo el promotor inducible <i>MT1</i> .	36
Figura 12. Esquema simplificado de la interacción entre las quimeras de Ure2 y Gln3 en <i>C. glabrata</i> .	42

## Lista de tablas

Tabla 1. Plásmidos utilizados en el estudio.	8
Tabla 2. Cepas parentales utilizadas en el estudio.	10
Tabla 3. Cepas de <i>E. coli</i> transformadas con los plásmidos de las proteínas quiméricas generadas en el estudio.	10
Tabla 4. Cepas de <i>C. glabrata</i> generadas.	11
Tabla 5. Oligonucleótidos empleados en el estudio.	15
Tabla 6. Quimeras de Ure2 y Gln3 generadas en el estudio.	31

## Anexos

- Figura S1. Histogramas de fluorescencia de las cepas BiFC.
- Figura S2. Curvas de crecimiento de las cepas de *ure2Δ* transformadas con los plásmidos para el análisis por BiFC.

## ABREVIATURAS

<b>BiFC</b>	Biomolecular Fluorescence Complementation
<b>Cg</b>	<i>Candida glabrata</i>
<b>CAA</b>	Casaminoácidos
<b>Co-IP</b>	Co-inmunoprecipitación
<b>DMSO</b>	Dimetilsulfóxido
<b>FACS</b>	Flourescence Activated Cell Sorting
<b>FLAG</b>	Octapéptido FLAG, utilizado en etiquetado inmunofluorescente
<b>FRET</b>	Flourescence Resonance Energy Transfer
<b>LiAc</b>	Acetato de Litio
<b>MTL</b>	Mating Type Like
<b>NAT<sup>R</sup></b>	Casete de resistencia al antifúngico nourseotricina
<b>OD<sub>600nm</sub></b>	Optical Density at 600 nm
<b>PEG</b>	Polietilenglicol
<b>P<sub>MET3</sub></b>	Promotor del gen <i>MET3</i>
<b>P<sub>MT1</sub></b>	Promotor del gen <i>MT1</i>
<b>Sc</b>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
<b>URA3</b>	Orotidine-5'-phosphate (OMP) decarboxylase
<b>VC</b>	Fragmento carboxilo terminal de la proteína Venus
<b>VN</b>	Fragmento amino terminal de la proteína Venus
<b>YFP</b>	Yellow Fluorescent Protein (Venus)
<b>YNB</b>	Yeast Nitrogen Base
<b>YPD</b>	Yeast extract-Peptone-Dextrose

## Resumen

El factor de transcripción Gln3 y la proteína Ure2 forman un complejo en *Candida glabrata*.

En levaduras como *Saccharomyces cerevisiae*, los compuestos nitrogenados se internalizan a la célula y se utilizan a través de diversas vías metabólicas. Estos compuestos se usan en la síntesis de proteínas, como precursores para la síntesis de otros aminoácidos o bien para el metabolismo de azúcares. Sin embargo, no todas las fuentes de nitrógeno se usan de la misma forma. En *S. cerevisiae*, el factor de transcripción Gln3 induce la expresión de permeasas y enzimas catabólicas de acuerdo a las fuentes de nitrógeno disponibles. A esta regulación se le conoce como Represión Catabólica Nitrogenada (NCR por sus siglas en inglés).

La NCR se ha estudiado en varios organismos como *S. cerevisiae*, *Candida albicans*, *Aspergillus fumigatus* y en *Candida glabrata*. Recientemente en nuestro laboratorio, se identificaron en *C. glabrata*, los ortólogos de *GLN3* y *URE2* (represor de la actividad de Gln3) de *S. cerevisiae*. Se crecieron la cepa de *C. glabrata* silvestre y cepas mutantes en *GLN3* y *URE2* en diferentes fuentes de nitrógeno. Se compararon los fenotipos de crecimiento y la expresión de genes ortólogos bajo el control transcripcional de Gln3 (*MEP2*, *GAP1*, *GLN1* y *PUT4*). La ausencia de *GLN3* en *C. glabrata* provoca alteraciones en el crecimiento y en la expresión de los genes arriba mencionados. La ausencia de Ure2 tiene alteraciones en el crecimiento cuando amonio o glutamina son las únicas fuentes de nitrógeno.

En este trabajo de tesis buscamos probar si Gln3 y Ure2 de *C. glabrata*, interactúan formando un complejo proteína-proteína como lo reportado para los ortólogos de *S. cerevisiae*, usando la técnica de Complementación Bi-molecular de Fluorescencia acoplada a Citometría de flujo (BiFC-FC por sus siglas en inglés). Para ello, construimos proteínas quiméricas entre los fragmentos carboxilo y amino terminales de la proteína amarilla Venus y a los extremos amino y carboxilo terminales de Gln3 y Ure2 en una cepa doble mutante *gln3Δ ure2Δ*. Con el fin de evaluar la funcionalidad de las quimeras de Gln3 y Ure2 en comparación con la cepa silvestre, hicimos curvas de crecimiento y medimos la expresión de *GAP1*, que depende de Gln3, en medios con amonio o prolina como únicas fuentes de nitrógeno. Observamos que las proteínas quiméricas de Gln3 y Ure2 son funcionales y forman un complejo en *C. glabrata*.

Palabras clave: Represión catabólica nitrogenada, *GLN3*, *URE2*, *C. glabrata*.

## Abstract

Gln3 transcription factor and Ure2 protein form a complex in *Candida glabrata*

In yeasts like *Saccharomyces cerevisiae*, nitrogen compounds are internalized to the cell and metabolized through various metabolic pathways. These compounds are used for protein synthesis, as precursors in amino acids synthesis or in sugars' metabolism. However, not all nitrogen sources are used in the same way. In *S. cerevisiae*, the transcription factor Gln3 induces the expression of permeases and catabolic enzymes according to the available nitrogen sources, through a mechanism called Nitrogen Catabolic Repression (NCR).

The existence of the NCR has been studied in several organisms such as *S. cerevisiae*, *Candida albicans*, *Aspergillus fumigatus* and in *Candida glabrata*. Recently in our laboratory, the *S. cerevisiae* orthologs of *GLN3* and *URE2* (a Gln3 repressor), were identified in *C. glabrata*. The *C. glabrata* wild type and mutant strains in *GLN3* and *URE2* were grown in different nitrogen sources. Growth phenotypes and the expression of orthologous genes that are under the transcriptional control of Gln3 (*MEP2*, *GAP1*, *GLN1* and *PUT4*) were compared. In *C. glabrata*, *GLN3* deletion causes growth alterations and different expression levels of the above mentioned genes. Ure2 absence presents growth alterations when ammonium or glutamine are the only nitrogen sources available.

In this thesis work we seek to test, using the Bi-molecular Fluorescence Complementation technique coupled to Flow Cytometry (BiFC-FC), if Gln3 and Ure2 of *C. glabrata* interact to form a protein-protein complex as reported for *S. cerevisiae* orthologs. To do this, we constructed chimeric proteins between the carboxyl and amino terminal fragments of the Venus yellow protein and the amino and carboxyl terminal ends of Gln3 and Ure2 in a *gln3Δ ure2Δ* double mutant strain. In order to evaluate the functionality of the Gln3 and Ure2 chimeras compared to the wild type strain, we made growth curves and measured the expression of *GAP1*, which depends on Gln3, in media with ammonia or proline as sole nitrogen sources. We show that Gln3 and Ure2 chimeric proteins are functional and form a complex in *C. glabrata*.

Keywords: Nitrogen Catabolite Repression, *URE2*, *GLN3*, *Candida glabrata*

# 1. Introducción

## 1. Compuestos de nitrógeno en el metabolismo de las levaduras

Los organismos vivos requieren de nutrientes para su supervivencia y reproducción. Algunos nutrientes como el cobre, el zinc y el hierro solo se requieren en cantidades mínimas, como cofactores para apoyar el funcionamiento óptimo de la maquinaria celular o en reacciones redox (Eide, D.J. *et al.*, 2005). Otros compuestos como el carbono y el nitrógeno, se requieren en cantidades mayores y de manera constante debido a su papel fundamental en el funcionamiento correcto del metabolismo (Cooper, T.G., 1982). En hongos, como *Candida albicans* y *Saccharomyces cerevisiae*, se han estudiado las rutas metabólicas relacionadas con el aprovechamiento de nutrientes. Se encontró que los nutrientes disponibles en el medio determinan la tasa de crecimiento y la respuesta de la célula a su ambiente (Ries, L.N.A. *et al.*, 2018; Lee, I.R. *et al.*, 2013; Hensel, M. *et al.*, 1998; Monahan, B.J. *et al.*, 2005; Rutherford, J. *et al.*, 2008).

Los compuestos de nitrógeno constituyen, después de los azúcares, los nutrientes más importantes involucrados en el crecimiento (Ries, L.N.A. *et al.*, 2018; Wong, K.H. *et al.*, 2007; Lee, I.R. *et al.*, 2013). En el organismo modelo *S. cerevisiae*, los aminoácidos glutamina y glutamato así como el amonio se encuentran en el centro del metabolismo de compuestos nitrogenados donde juegan un papel principal en la vía llamada metabolismo central de nitrógeno. La síntesis de glutamato se lleva a cabo por las glutamato deshidrogenasas (codificadas por los genes parálogos *GDH1* y *GDH3*) que incorporan amonio y 2-oxoglutarato para obtener glutamato. El glutamato también puede obtenerse por medio de la reacción de la glutamato sintasa (GOGAT, codificada por *GLT1*), que genera glutamato a partir de glutamina y 2-oxoglutarato. Mientras tanto, la glutamina puede sintetizarse a partir de la reacción entre glutamato y amonio, catalizada por la glutamino sintetasa (GS, codificada por *GLN1*). La expresión de estas enzimas la determinan las fuentes de nitrógeno presentes en el medio (Hoffman-Bang, J., 1999; Zhang, W. *et al.*, 2018, Magasanik, B. & Kaiser, C., 2002; Magasanik, B., 2003).

Adicionalmente, las fuentes de nitrógeno se consumen con base a la capacidad del organismo para aprovecharlas. Por ejemplo, algunas fuentes, como glutamina, amonio y glutamato, se consumen por sobre otras como la prolina, el ácido gamma-aminobutírico, o la tirosina. Hay fuentes de nitrógeno cuya presencia inhibe el uso de otras fuentes de nitrógeno por lo que se conocen como fuentes represivas. Las fuentes cuyo metabolismo solo se lleva a cabo cuando las fuentes represivas no se encuentren disponibles se conocen como fuentes no represivas de nitrógeno (Ljungdahl, P.O. & Daigian-Fornier, B., 2012; Magasanik, B. & Kaiser, C.A., 2002).

Para el consumo de fuentes no represivas de nitrógeno se requiere de la síntesis *de novo* de transportadores y enzimas catabólicas específicas. Esta regulación dinámica del metabolismo se encuentra bajo un estricto control transcripcional conocido como Represión Catabólica Nitrogenada (NCR, por sus siglas en inglés). La NCR comprende la activación o la inactivación de factores de transcripción de tipo GATA, que regulan la expresión de genes involucrados en el metabolismo de las diferentes fuentes de nitrógeno (ter Schure, E.G. *et al.*, 2000; Courchesne, W. & Magasanik, B., 1987).

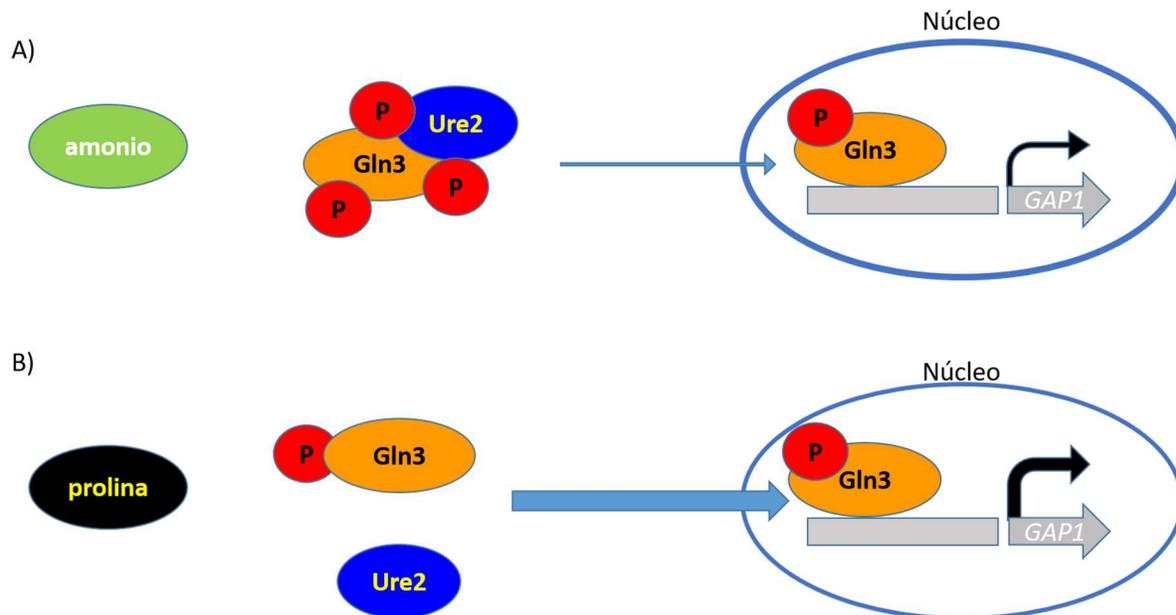
## **2. La NCR en *Saccharomyces cerevisiae***

La NCR depende de factores de transcripción de tipo GATA que se unen a los promotores de genes que presentan una secuencia consenso "GATWA". Esta interacción con el DNA se da por medio de dominios proteicos conocidos como dedos de zinc, que están altamente conservados en diversas especies (Ko, L.J. & Engel, J., 1993).

En *S. cerevisiae* se han descrito dos genes, *GLN3* y *GAT1*, que codifican para factores de transcripción de tipo GATA que inducen la expresión de genes involucrados con el transporte y el metabolismo de fuentes de nitrógeno no represivas (Bertram, P.G. *et al.*, 2000; Coffman, J. *et al.*, 1997; Georis, I. *et al.*, 2009; Courchesne, W. & Magasanik, B., 1987). Además, existen dos factores transcripcionales, Dal80 y Gzf3, que son represores de genes sensibles a NCR en presencia de fuentes de nitrógeno represivas (Coffman, J. *et al.*, 1997; Ljungdahl, P.O. & Daignan-Fornier, B., 2012).

Cuando los compuestos nitrogenados que se usan preferentemente están presentes en el medio en cantidades suficientes para satisfacer las necesidades metabólicas de la célula, el factor de transcripción Gln3 se encuentra mayoritariamente en el citoplasma formando un complejo con el represor citoplásmico Ure2 (Gln3-Ure2) el cual se encuentra hiperfosforilado e impide que Gln3 entre al núcleo (Blinder, D., Coschigano, P.W. & Magasanik, B., 1996; Beck, T. & Hall, M., 1999; Bertram, P.G. *et al.*, 2000). Con Gln3 en el citoplasma hay una disminución en la expresión de genes sensibles a NCR; es decir, solo se pueden utilizar un número reducido de fuentes de nitrógeno no represivas (Carvalho, J. & Zheng, X.S., 2003).

Por el contrario, cuando la célula se encuentra en un medio donde los compuestos nitrogenados son escasos o solo se encuentran disponibles fuentes no represivas, el complejo Gln3-Ure2 se desfosforila, lo que provoca su disociación. Esto permite que Gln3 entre al núcleo e induzca la expresión de genes NCR (Figura 1) (Beck, T. & Hall M., 1999; Carvalho, J. & Zheng, X.S., 2003; Tate, J. & Cooper, T., 2013).



**Figura 1. Esquema simplificado del control de la expresión de genes NCR sensibles regulados por Gln3 en *S. cerevisiae*.**

- A) En presencia de fuentes represivas de nitrógeno (por ejemplo, amonio) el factor de transcripción Gln3 se mantiene mayoritariamente en el citoplasma, debido a que forma un complejo con el represor Ure2 (complejo Gln3-Ure2). Solo un número reducido de moléculas de Gln3 logra ingresar al núcleo, lo que permite mantener una expresión basal de los genes NCR.
- B) En condiciones de insuficiencia de nitrógeno en el medio o en presencia de fuentes no represivas de nitrógeno (por ejemplo, prolina), el complejo Gln3-Ure2 se desfosforila y se disocia. Gln3 libre puede ingresar al núcleo en una mayor cantidad lo que induce la transcripción de genes NCR sensibles (Modificado de Rai, R., Tate, J.J. & Cooper, T.G., 2016).

Gln3 en el núcleo se une a secuencias específicas en los promotores de genes relacionados con el metabolismo, transporte y biosíntesis de fuentes de nitrógeno no represivas. Entre estos se encuentran genes que codifican para permeasas de fuentes no represivas de nitrógeno (*DAL4*, *PUT4* y *GAP1*), para enzimas catabólicas (*GDH2*, *PUT1* y *DAL1*) y para factores de transcripción (*GZF3*, *GAT1* y *DAL80*), entre otros (Airoldi, E.M. *et al.*, 2014; Ljungdahl, P.O. & Daignan-Fornier, B., 2012).

### 3. NCR en *Candida glabrata*

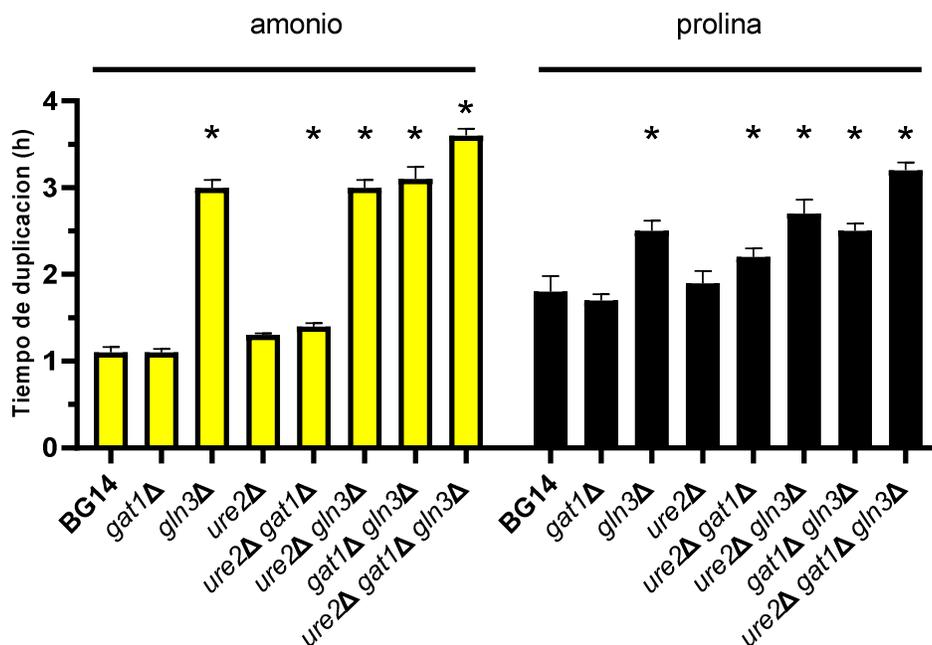
La NCR ha sido estudiada en otras especies de levaduras, tanto inocuas como patógenas. Sin embargo, la cantidad de información disponible es variable y aún existen

varias interrogantes sobre las particularidades de los sistemas NCR de diversas especies. *C. glabrata* y *S. cerevisiae* provienen de un ancestro que pasó por un evento de duplicación genómica completa, lo que hace que estas dos especies compartan algunas particularidades en su genoma como la pérdida de genes involucrados en el metabolismo y que varias de las proteínas dedicadas a procesos de replicación y metabolismo tengan homólogos entre las dos especies (Descorps-Declère, S. *et al.*, 2015; Ahmad, K.M. *et al.*, 2014).

*C. glabrata* es una levadura, patógena oportunista que se aísla en pacientes inmunosuprimidos. Es el segundo agente causal de candidiasis en seres humanos y presenta una alta resistencia innata a agentes antifúngicos (Muller, H. *et al.*, 2008). Al igual que *C. albicans* y *Cryptococcus neoformans*, ambos patógenos en humanos (Liao, W.L. *et al.*, 2008; Ngamskulrungrroj, P. *et al.*, 2012), *C. glabrata* es capaz también de discriminar entre fuentes represivas y no represivas de nitrógeno por medio de la NCR (Pérez-delosSantos, F.J. & Riego-Ruiz, L., 2016).

En un estudio previo de nuestro laboratorio se encontraron, por medio de un análisis de sintenia y comparación de secuencias, los ortólogos de los genes *GLN3*, *GAT1* y *URE2* de *S. cerevisiae* en *C. glabrata* (Pérez-delosSantos, F.J. & Riego-Ruiz, L., 2016). Se determinó la función de estos genes en la respuesta NCR tanto en el fenotipo de crecimiento como en la expresión de genes sensibles a NCR en las cepas mutantes sencillas *gln3Δ*, *ure2Δ* y *gat1Δ*, así como en mutantes dobles (*gln3Δ ure2Δ*, *gln3Δ gat1Δ* y *ure2Δ gat1Δ*) y en una mutante triple (*gln3Δ ure2Δ gat1Δ*), por medio de la delección de los ortólogos de *GLN3*, *URE2* y *GAT1*.

La cepa silvestre de *C. glabrata* (BG14) y las mutantes generadas se crecieron en medios con glutamina, amonio o prolina como únicas fuentes de nitrógeno para dilucidar los efectos de la pérdida de *GLN3*, *URE2* y *GAT1*. Los resultados de estos experimentos se resumen en la Figura 2.



**Figura 2. Tiempos de duplicación de la cepa parental (BG14) y de las mutantes sencillas, dobles y triple de *GLN3*, *GAT1* y *URE2* crecidas en diferentes fuentes de nitrógeno.**

Los tiempos de duplicación de la cepa de *C. glabrata* parental (BG14), las mutantes sencillas (*gln3Δ*, *ure2Δ* y *gat1Δ*), las mutantes dobles (*gln3Δ ure2Δ*, *gln3Δ gat1Δ*, *ure2Δ gat1Δ*) y la mutante triple (*gln3Δ ure2Δ gat1Δ*) crecidas en medio mínimo adicionado con amonio (amarillo) o prolina (negro) como única fuente de nitrógeno. Los tiempos de duplicación calculados representan el promedio de triplicados biológicos  $\pm$  la desviación estándar (Modificado de Pérez-delosSantos, F.J. & Riego-Ruiz, L., 2016).

\* Tiempo de duplicación estadísticamente diferente del calculado en la cepa parental crecida en el mismo medio,  $P < 0.05$  por prueba de t de dos colas.

Se encontró que las mutantes en *GLN3* presentaban incrementos en sus tiempos de duplicación en todos los medios comparado con el tiempo de duplicación observado en la cepa silvestre, lo que sugiere un papel central de *GLN3* en la regulación de genes implicados en el metabolismo de nitrógeno. En cambio, las mutantes en *URE2* presentaron incrementos modestos en su tiempo de duplicación en medios con glutamina y amonio como fuentes de nitrógeno, en comparación con la cepa BG14. Ya que no se presentaron cambios en el fenotipo en prolina, como única fuente de nitrógeno, se sugirió que el papel de *Ure2* sobre el metabolismo de nitrógeno en *C. glabrata* estaba limitado a fuentes consideraras como represivas.

La mutante sencilla de *gat1Δ* no presentó diferencias en su crecimiento comparada con la cepa parental (BG14); sin embargo, se encontraron diferencias cuando algún otro gen (*GLN3* y/o *URE2*) se encontraba ausente en la misma cepa por lo que se dedujo que su función era complementaria a *GLN3* en *C. glabrata* (Pérez-delosSantos, F.J. & Riego-Ruiz, L., 2016).

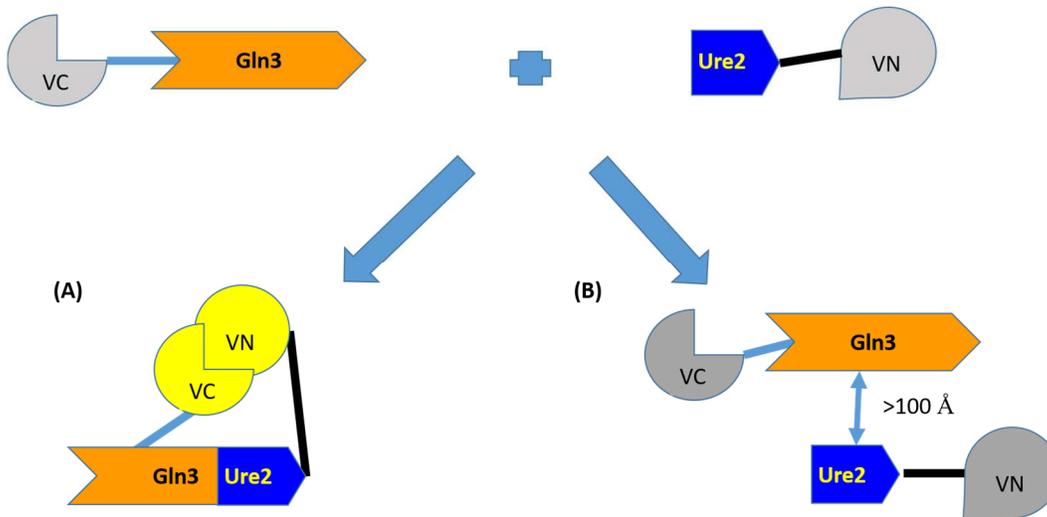
Para evaluar si Gln3, Gat1 y Ure2 participaban en la regulación de la transcripción de genes sensibles a NCR, se identificaron en *C. glabrata*, los ortólogos de los genes *GAP1*, *GLN1* y *MEP2* (genes involucrados en el metabolismo y transporte de compuestos nitrogenados) de *S. cerevisiae*. Se evaluó, mediante qRT-PCR, el efecto de la fuente de nitrógeno en la expresión de estos genes en la cepa silvestre crecida en amonio o prolina como única fuente de nitrógeno. Se encontró que estos tres genes aumentan su expresión hasta 6 veces en presencia de prolina en comparación con la expresión en amonio. Estos resultados indican que la expresión de *GAP1*, *GLN1* y *MEP2* en *C. glabrata* está bajo el control de NCR ya que su expresión disminuía en amonio y aumentaba hasta 15 veces en la cepa silvestre (Pérez-delosSantos, F.J. & Riego-Ruiz, L., 2016).

Se evaluaron también los perfiles de expresión de los genes de *GAP1*, *GLN1* y *MEP2* de la cepa silvestre en comparación con las mutantes simples (*gat1Δ*, *gln3Δ* y *ure2Δ*), dobles (*gln3Δ ure2Δ*, *ure2Δ gat1Δ* y *gln3Δ gat1Δ*) y la mutante triple (*gat1Δ gln3Δ ure2Δ*), crecidas en amonio o prolina como única fuente de nitrógeno. Se observó que la expresión de los genes *MEP2* y *GAP1* se abolió en mutantes en *GLN3* en comparación con la cepa silvestre BG14, lo que indicó que en *C. glabrata* Gln3 es un regulador positivo para la expresión de estos dos genes. En cambio, la expresión de *GLN1* no se modificó en casi todas las cepas con la excepción de las mutantes carentes de *URE2*. Este resultado indica que Ure2 tiene una función represora. Asimismo, en mutantes en *URE2*, los genes *MEP2* y *GAP1* aumentaron su expresión en amonio, lo que parece indicar que *URE2* tiene una función represora sobre genes NCR sensibles en fuentes represivas de nitrógeno (Pérez-delosSantos, F.J. & Riego-Ruiz, L., 2016).

Estos resultados señalan que los ortólogos de *GLN3* y *URE2* en *C. glabrata* tienen un papel regulatorio que depende de la fuente de nitrógeno presente en el medio. Además, Gln3 tiene un papel en la inducción de genes de *C. glabrata* relacionados con el metabolismo de nitrógeno bajo control NCR dependiente debida a la presencia de Ure2. Sin embargo, el mecanismo por el cual Gln3 es reprimido por Ure2 o si existen otras proteínas involucradas en su control, no se conoce hasta ahora.

Con base en la información obtenida por Pérez-delosSantos y Riego-Ruiz (2016) queremos evaluar mediante Complementación Bimolecular de Fluorescencia (BiFC, por sus siglas en inglés) si Gln3 y Ure2 de *C. glabrata* forman un complejo Gln3-Ure2 de manera similar al formado por estas proteínas en *S. cerevisiae*.

El análisis por BiFC determinará, con base a la fluorescencia detectada por FACS (Fluorescence Activated Cell Sorting), si existe interacción entre ambas proteínas, ya que la formación de un complejo proteína-proteína entre ellas permitiría la unión de las fracciones amino y carboxilo de la proteína fluorescente Venus (no fluorescentes por si mismas), lo que recuperaría la capacidad de fluorescer (Ver Figura 3) (Xing, S. *et al.*, 2016).



**Figura 3. Representación de la complementación bi-molecular de fluorescencia (BiFC).**

En la Complementación Bi-molecular de Fluorescencia se busca que las dos proteínas quiméricas, formadas por Gln3 o Ure2 fusionadas al fragmento carboxilo terminal (VC) o amino terminal (VN) de la proteína amarilla fluorescente Venus respectivamente, se encuentren lo suficientemente cerca de manera que la estructura terciaria de la proteína Venus se regenere y de esta manera emitir fluorescencia.

(A) La formación de un complejo proteína-proteína permite la recuperación de fluorescencia al incidir un haz de luz de 520 nm; (B) de no existir una interacción directa entre las proteínas de interés no se recupera la fluorescencia debido a la imposibilidad de regenerar la estructura terciaria de Venus.

## 2. Materiales y métodos

### Plásmidos utilizados

Los plásmidos utilizados en el estudio se describen en la Tabla 1.

Para *Candida glabrata* (*Cg*).

Para *Saccharomyces cerevisiae* (*Sc*).

**Tabla 1. Plásmidos utilizados en el estudio.**

Plásmido	Descripción	Referencia
pRM140	$P_{MT1}$ ( <i>Xba</i> I/ <i>Sac</i> I) clonado en pRM89 ( <i>Xba</i> I/ <i>Sac</i> I). <i>URA3</i> , <i>Amp<sup>R</sup></i> , <i>Cg</i> CEN/ARS. Intercambio de promotores $P_{MET3}$ por $P_{MT1}$	Robledo Márquez, K., 2016
pRM142	$P_{MT1}$ ( <i>Xba</i> I/ <i>Sac</i> I) clonado en pRM90 ( <i>Xba</i> I/ <i>Sac</i> I). Intercambio de promotores $P_{MET3}$ por $P_{MT1}$	Robledo Márquez, K., 2016
pRM163	$P_{MT1}$ ( <i>Xba</i> I/ <i>Sac</i> I) clonado en pRM82 ( <i>Xba</i> I/ <i>Sac</i> I). NAT, <i>Amp<sup>R</sup></i> , <i>Cg</i> CEN/ARS. Intercambio de promotores $P_{MET3}$ por $P_{MT1}$	Robledo Márquez, K., 2016
pRM165	$P_{MT1}$ ( <i>Xba</i> I/ <i>Sac</i> I) clonado en pRM103 ( <i>Xba</i> I/ <i>Sac</i> I) <i>URA3</i> , <i>Amp</i> , <i>Cg</i> CEN/ARS. Intercambio de promotores $P_{MET3}$ por $P_{MT1}$	Robledo Márquez, K., 2016
pRM150	Producto de PCR de 0.638 Kb ( <i>Spe</i> I/ <i>Xho</i> I) (oligonucleótidos 2233 y 2234) que corresponde al gen <i>Scalfa2</i> de <i>S. cerevisiae</i> , clonado en pRM101 ( <i>Spe</i> I/ <i>Xho</i> I). NAT <sup>R</sup> , <i>Amp<sup>R</sup></i> , <i>Cg</i> CEN/ARS	Robledo Márquez, K., 2016
pRM151	Producto de PCR de 0.638 Kb ( <i>Spe</i> I/ <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> I/ <i>Xho</i> I). <i>URA3</i> , <i>Amp<sup>R</sup></i> , <i>Cg</i> CEN/ARS	Robledo Márquez, K., 2016
pRM148	Producto de PCR de 0.638 Kb ( <i>Spe</i> I/ <i>Xho</i> I) (oligonucleótidos 2233 y 2234) que corresponde al gen <i>Scalfa2</i> de <i>S. cerevisiae</i> , clonado en pRM90 ( <i>Spe</i> I/ <i>Xho</i> I). NAT <sup>R</sup> , <i>Amp<sup>R</sup></i> , <i>Cg</i> CEN/ARS	Robledo Márquez, K., 2016

pVA150	P <sub>MT1</sub> ::YFP-LINKER Amp <sup>R</sup> NAT <sup>R</sup>	Vidal Aguiar, Y., 2016
pVA80	pGRB2.3::P <sub>MT1</sub> Amp <sup>R</sup> URA3	Vidal Aguiar, Y., 2016
pDV1-2	Gen <i>URE2</i> de <i>C. glabrata</i> amplificado por PCR para introducir sitios <i>Cla</i> I y <i>Xho</i> I y clonado en pJET 1.2/blunt	Este trabajo
pDV3	Gen <i>URE2</i> de <i>C. glabrata</i> amplificado por PCR para introducir sitios <i>Xba</i> I y <i>Bam</i> HI y clonado en pJET 1.2/blunt	Este trabajo
pDV8-9	Gen <i>URE2</i> de <i>C. glabrata</i> obtenido por la digestión con enzimas <i>Cla</i> I y <i>Xho</i> I de pDV1 y clonado en el plásmido pRM144 previamente digerido con las mismas enzimas. Amp <sup>R</sup> , NAT <sup>R</sup> Cg CEN/ARS	Este trabajo
pDV10	Gen <i>URE2</i> de <i>C. glabrata</i> obtenido por la digestión con enzimas <i>Cla</i> I y <i>Xho</i> I de pDV1 y clonado en el plásmido pRM165 previamente digerido con las mismas enzimas Amp <sup>R</sup> URA3 Cg CEN/ARS	Este trabajo
pDV12-13	Gen <i>URE2</i> de <i>C. glabrata</i> obtenido por la digestión con <i>Xba</i> I y <i>Bam</i> HI de pDV1 y clonado en el plásmido pRM140 digerido con las mismas enzimas. Amp <sup>R</sup> URA3 Cg CEN/ARS	Este trabajo
pDV14	Gen <i>URE2</i> de <i>C. glabrata</i> obtenido por digestión con <i>Xba</i> I y <i>Bam</i> HI de pDV1 y clonado al plásmido pRM140 Amp <sup>R</sup> NAT <sup>R</sup> Cg CEN/ARS.	Este trabajo
pDV15-17	Gen <i>GLN3</i> de <i>C. glabrata</i> obtenido por amplificación de DNA genómico de <i>C. glabrata</i> con los oligonucleótidos I55 e I57 y clonado en el plásmido pRM163 digerido con <i>Spe</i> I y <i>Bam</i> HI. Amp <sup>R</sup> NAT <sup>R</sup> Cg CEN/ARS.	Este trabajo
pDV47	Plásmido pDV13 digerido con enzimas <i>Xba</i> I y <i>Xho</i> I para liberar módulo Ure2-L-VN y clonado al plásmido pRM142 previamente digerido con <i>Xba</i> I/ <i>Xho</i> I NAT <sup>R</sup> Amp <sup>R</sup> Cg CEN/ARS.	Este trabajo
pDV52-53	Gen <i>GLN3</i> de <i>C. glabrata</i> amplificado con oligos I55 e I57 y clonado en el plásmido pGEM-T digerido con <i>Spe</i> I y <i>Bam</i> HI. Amp <sup>R</sup>	Este trabajo

### Cepas parentales

Cepas de *Escherichia coli* y *Candida glabrata* silvestre y mutantes utilizadas en el estudio.

**Tabla 2. Cepas parentales utilizadas en el estudio.**

Cepa	Parental	Genotipo	Referencia
<i>Escherichia coli</i>			
<i>E. coli</i> DH5 $\alpha$	-	<i>fhuA2 lac(del)U169 phoA glnV44 <math>\Phi</math>80' lacZ(del)M15 gyrA96 recA1 relA1 endA1 thi-1 hsdR17</i>	Taylor, R.G. <i>et al.</i> , (1993).
<i>Candida glabrata</i>			
<i>C. glabrata</i> BG14	Aislado clínico	<i>ura3<math>\Delta</math>(-851 + 932)::Tn903 Neo<sup>R</sup></i>	Cormack, B.P. & Falkow, S., 1999
<i>C. glabrata</i> <i>ure2<math>\Delta</math></i>	BG14	<i>ura3:Tn903 Neo<sup>R</sup>, ure2<math>\Delta</math>::FRT</i>	Pérez-delosSantos, F.J. & Riego-Ruiz, L., 2016
<i>C. glabrata</i> <i>gln3<math>\Delta</math></i>	BG14	<i>ura3:Tn903 Neo<sup>R</sup>, gln3<math>\Delta</math>::FRT</i>	Pérez-delosSantos, F.J. & Riego-Ruiz, L., 2016
<i>C. glabrata</i> <i>ure2<math>\Delta</math> gln3<math>\Delta</math></i>	<i>C. glabrata</i> <i>ure2<math>\Delta</math></i>	<i>ura3:Tn903 Neo<sup>R</sup>, ure2<math>\Delta</math>::FRT gln3<math>\Delta</math>::FRT</i>	Pérez-delosSantos, F.J. & Riego-Ruiz, L., 2016

### Cepas de *Escherichia coli* generadas

Las cepas de *E. coli* transformadas con los plásmidos de proteína quimérica (Tabla 1) generadas en el estudio están descritas en la Tabla 3.

**Tabla 3. Cepas de *E. coli* transformadas con los plásmidos de las proteínas quimérica generadas en el estudio.**

Cepa	Parental	GENOTIPO	Referencia
B19	DH5 $\alpha$	pJET1.2:: <i>URE2</i> Amp <sup>R</sup>	Este trabajo
B20	DH5 $\alpha$	pJET1.2:: <i>URE2</i> Amp <sup>R</sup>	Este trabajo
B21	DH5 $\alpha$	pJET1.2:: <i>URE2</i> Amp <sup>R</sup>	Este trabajo

B22	DH5α	pRM165::VN-L Amp <sup>R</sup> URA3 Cg CEN/ARS	Este trabajo
B23	DH5α	pRM165::VN-L Amp <sup>R</sup> URA3 Cg CEN/ARS	Este trabajo
B24	DH5α	pRM140::L-VC Amp <sup>R</sup> URA3 Cg CEN/ARS	Este trabajo
B25	DH5α	pRM140::L-VC Amp <sup>R</sup> URA3 Cg CEN/ARS	Este trabajo
B52	DH5α	pRM144::URE2 Amp <sup>R</sup> NAT <sup>R</sup> Cg CEN/ARS	Este trabajo
B53	DH5α	pRM144::URE2 Amp <sup>R</sup> NAT <sup>R</sup> Cg CEN/ARS	Este trabajo
B54	DH5α	pRM165::URE2 Amp <sup>R</sup> URA3 Cg CEN/ARS	Este trabajo
B56	DH5α	pRM140::URE2 Amp <sup>R</sup> URA3 Cg CEN/ARS	Este trabajo
B57	DH5α	pRM140::URE2 Amp <sup>R</sup> URA3 Cg CEN/ARS	Este trabajo
B58	DH5α	pRM163::URE2 Amp <sup>R</sup> NAT <sup>R</sup> Cg CEN/ARS	Este trabajo
B59	DH5α	pRM163::GLN3 Amp <sup>R</sup> NAT <sup>R</sup> Cg CEN/ARS	Este trabajo
B60	DH5α	pRM163::GLN3 Amp <sup>R</sup> NAT <sup>R</sup> Cg CEN/ARS	Este trabajo
B61	DH5α	pRM163::GLN3 Amp <sup>R</sup> NAT <sup>R</sup> Cg CEN/ARS	Este trabajo
B71	DH5α	pRM142::URE2-L-VN Amp <sup>R</sup> NAT <sup>R</sup> Cg CEN/ARS	Este trabajo
B80	DH5α	pGEM-T::GLN3 Amp <sup>R</sup>	Este trabajo
B81	DH5α	pGEM-T::GLN3 Amp <sup>R</sup>	Este trabajo

### Cepas de *C. glabrata*

Las cepas de *C. glabrata* utilizadas en el estudio se presentan en la Tabla 4.

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

Cepa	Parental	Descripción	Quimera	Referencia
DV1-2	<i>gln3Δ</i>	GLN3-L-VC clonado en pDV15, transformado en la cepa mutante <i>gln3Δ</i> . NAT <sup>R</sup> , Amp <sup>R</sup> , Cg CEN/ARS (VC en el carboxilo de Gln3)	Gln3-L-VC	Este trabajo
DV3-4	<i>gln3Δ</i>	L-VC clonado en pRM163 transformado en la cepa mutante <i>gln3Δ</i> . NAT <sup>R</sup> , Amp <sup>R</sup> , Cg CEN/ARS	L-VC	Este trabajo
DV5-6	<i>ure2Δ</i>	VC-L clonado en pRM165, transformado en cepa mutante <i>ure2Δ</i> . URA3, Amp <sup>R</sup> , Cg CEN/ARS	VC-L	Este trabajo

DV7-8	<i>ure2Δ</i>	VN-L- <i>URE2</i> clonado en pDV8, transformado en la cepa mutante <i>ure2Δ</i> . NAT <sup>R</sup> , Amp <sup>R</sup> , <i>Cg</i> CEN/ARS (VN en el amino de Ure2)	VN-L-Ure2	Este trabajo
DV9-10	<i>ure2Δ</i>	VN-L clonado en pRM144 y transformado en la cepa mutante <i>ure2Δ</i> Amp <sup>R</sup> , NAT <sup>R</sup> , <i>Cg</i> CEN/ARS	VN-L	Este trabajo
DV11	<i>ure2Δ</i>	L-VN clonado en pRM140 y transformado en la cepa mutante <i>ure2Δ</i> Amp <sup>R</sup> , <i>URA3</i> , <i>Cg</i> CEN/ARS	L-VN	Este trabajo
DV12	<i>ure2Δ</i>	VC-L- <i>URE2</i> clonado en pDV10 y transformado en la cepa mutante <i>ure2Δ</i> <i>URA3</i> , Amp <sup>R</sup> , <i>Cg</i> CEN/ARS (VC en el amino de Ure2)	VC-L-Ure2	Este trabajo
DV13-14	<i>ure2Δ</i>	<i>URE2</i> -L-VN clonado en pDV13 y transformado en la cepa mutante <i>ure2Δ</i> . Amp <sup>R</sup> , <i>URA3</i> , <i>Cg</i> CEN/ARS (VN en el carboxilo de Ure2)	Ure2-L-VN	Este trabajo
DV15-17	<i>ure2Δ</i>	VN-L- <i>URE2</i> clonado en pDV9 y transformado en la cepa mutante <i>ure2Δ</i> . NAT <sup>R</sup> , Amp <sup>R</sup> , <i>Cg</i> CEN/ARS (VN en el amino de Ure2)	VN-L-Ure2	Este trabajo
DV18-20	<i>ure2Δ gln3Δ</i>	<i>GLN3</i> -L-VC clonado en pDV15 y transformado en cepa mutante doble <i>gln3Δ ure2Δ</i> . NAT <sup>R</sup> , Amp <sup>R</sup> , <i>Cg</i> CEN/ARS (VC en el carboxilo de Gln3)	Gln3-L-VC	Este trabajo
DV21-22	<i>ure2Δ gln3Δ</i>	L-VC clonado en pRM163 y transformado en la cepa mutante doble <i>gln3Δ ure2Δ</i> NAT <sup>R</sup> , Amp <sup>R</sup> , <i>Cg</i> CEN/ARS	L-VC	Este trabajo
DV23-24	<i>ure2Δ gln3Δ</i>	L-VN clonado en pRM140 y transformado en la cepa mutante doble <i>gln3Δ ure2Δ</i> . Amp <sup>R</sup> , <i>URA3</i> , <i>Cg</i> CEN/ARS	L-VN	Este trabajo
DV25-27	DV18 ( <i>ure2Δ</i> )	<i>URE2</i> -L-VN clonado en pDV12 y transformado en la cepa DV18. <i>URA3</i> , NAT <sup>R</sup> , Amp <sup>R</sup> , <i>Cg</i> CEN/ARS (VN en el carboxilo de Ure2 VC en el carboxilo de Gln3)	Ure2L-VN Gln3-L-VC	Este trabajo
DV28-30	<i>ure2Δ gln3Δ</i>	<i>URE2</i> -L-VN clonado en pDV12 y transformado en la cepa mutante doble <i>gln3Δ ure2Δ</i> . Amp <sup>R</sup> , <i>URA3</i> , <i>Cg</i> CEN/ARS (VN en el carboxilo de Ure2)	Ure2-L-VN	Este trabajo

DV31-33	<i>gln3Δ</i>	<i>URE2-L-VN</i> clonado en pDV42 y transformado en la cepa mutante <i>gln3Δ Amp<sup>R</sup>, NAT<sup>R</sup>, Cg CEN/ARS</i> (VN en el carboxilo de Ure2)	Ure2-L-VN	Este trabajo
DV34	<i>ure2Δ gln3Δ</i>	Fragmento amino terminal de Venus clonado en pDV6 y transformado en la cepa mutante doble <i>gln3Δ ure2Δ. Amp<sup>R</sup>, URA3, Cg CEN/ARS</i>	L-VN	Este trabajo
DV35	<i>gln3Δ</i>	Fragmento carboxilo terminal de Venus clonado en pRM165 y transformado en la cepa mutante <i>gln3Δ. Amp<sup>R</sup>, URA3, Cg CEN/ARS</i>	L-VC	Este trabajo
DV36	BG14	<i>URE2-L-VN</i> clonado en pDV12 y transformado en la cepa silvestre BG14. <i>Amp<sup>R</sup>, URA3, Cg CEN/ARS</i> (VN en el carboxilo de Ure2)	Ure2-L-VN	Este trabajo
DV37-38	BG14	<i>GLN3-L-VC</i> clonado a pDV15 y transformado a la cepa silvestre BG14 de <i>C. glabrata. Amp<sup>R</sup>, NAT<sup>R</sup>, Cg CEN/ARS</i> (VC en el carboxilo de Gln3)	Gln3-L-VC	Este trabajo
DV39-41	<i>ure2Δ</i>	<i>GLN3-L-VC</i> clonado en pDV15 y transformado en la cepa mutante <i>ure2Δ. Amp<sup>R</sup>, NAT<sup>R</sup>, Cg CEN/ARS</i> (VC en el carboxilo de Gln3)	Gln3-L-VC	Este trabajo
DV40-42	BG14	Fragmento carboxilo terminal de Venus clonado en pRM163 y transformado en la cepa silvestre BG14. <i>Amp<sup>R</sup>, NAT<sup>R</sup>, Cg CEN/ARS</i>	L-VC	Este trabajo
DV43	BG14	<i>URE2-L-VN</i> clonado en pDV47 y transformado en la cepa silvestre BG14. <i>Amp<sup>R</sup>, NAT<sup>R</sup>, Cg CEN/ARS</i> (VN en el carboxilo de Ure2)	Ure2-L-VN	Este trabajo
DV44	DV22	Fragmento carboxilo terminal de Venus clonado en pRM163 y transformado en la cepa DV22. <i>URA3, NAT<sup>R</sup>, Amp<sup>R</sup>, Cg CEN/ARS</i>	L-VC L-VN	Este trabajo
DV45	<i>ure2Δ gln3Δ</i>	VC-L y L-VN clonados en pRM165 y pRM142 transformados en la cepa doble mutante <i>gln3Δ ure2Δ. URA3, NAT<sup>R</sup>, Amp<sup>R</sup>, Cg CEN/ARS</i>	VC-L L-VN	Este trabajo
DV53-54	<i>ure2Δ gln3Δ</i>	VC-L- <i>GLN3</i> Clonado en pDV42 transformado en la cepa doble mutante <i>gln3Δ ure2Δ.</i> (VC en el amino de Gln3)	VC-L-Gln3	Este trabajo

DV55-.56	BG14	VC-L-GLN3 clonado en pDV42 transformado en la cepa BG14 (VC en el amino de Gln3)	VC-L-Gln3	Este trabajo
DV57-58	<i>ure2Δ gln3Δ</i>	<i>URE2-L-VN</i> clonado en pDV47 y transformado en la cepa doble mutante <i>gln3Δ ure2Δ</i> . NAT <sup>R</sup> , Amp <sup>R</sup> , <i>Cg</i> CEN/ARS (VN en el carboxilo de Ure2)	Ure2-L-VN	Este trabajo
DV59-60	<i>ure2Δ gln3Δ</i>	VC-L- <i>GLN3</i> y <i>URE2-L-VN</i> clonados en pDV42 y pDV47 respectivamente y transformados en la cepa doble mutante <i>gln3Δ ure2Δ</i> . <i>URA3</i> , NAT <sup>R</sup> , Amp <sup>R</sup> , <i>Cg</i> CEN/ARS (VC en el amino de Gln3 VN en el carboxilo de Ure2)	Ure2-L-VN VC-L-Gln3	Este trabajo.
CGM531 (DV46)	BG14	<i>ura3Δ::Tn903 G418<sup>R</sup> (mtl1, mtl2, mtl3)Δ</i> Hyg <sup>S</sup> .	-	Ramirez-Zavaleta, C.Y. et al., 2010
CGM2853 (DV47)	CGM531	Plásmido que codifica para la proteína verde fluorescente (GFP) bajo un promotor inducible de metalotioneína ( <i>P<sub>MT1</sub></i> ) transformado en la cepa CGM531. Amp <sup>R</sup> , <i>URA3</i> , pVA80	-	Vidal Aguiar, Y., 2016
CGM1578 (DV48)	CGM1	Plásmido que codifica para la proteína amarilla fluorescente (YFP) bajo el promotor constitutivo <i>TEF1</i> . <i>URA3</i> , Amp <sup>R</sup>	-	Vidal Aguiar, Y., 2016
CGM2925 (DV49)	CGM531	Plásmidos pRM150 y pRM151 que codifican para las proteínas quiméricas VC-L- <i>Scalpa2</i> y VN-L- <i>Scalpa2</i> , respectivamente. <i>URA3</i> , NAT <sup>R</sup> (VC en el amino de alpha2 VN en el amino de alpha2)	VC-L-alpha2 VN-L-alpha2	Robledo Márquez, K., 2016
CGM3012 (DV50)	CGM531	Plásmidos pRM148 y pRM151 que codifican para las proteínas quiméricas VC-L- <i>Scalpa2</i> y VC-L- <i>Scalpa2</i> , respectivamente. <i>URA3</i> , NAT <sup>R</sup> (VC en el amino de alpha2)	VC-L-alpha2 VC-L-alpha2	Robledo Márquez, K., 2016
CGM3030 (DV51)	CGM531	Plásmido que codifica para una proteína amarilla fluorescente (YFP) bajo un promotor inducible de metalotioneína transformado a la cepa CGM531. NAT <sup>R</sup> , Amp <sup>R</sup>	-	Vidal Aguiar, Y., 2016

CGM2926 (DV52)	CGM531	Plásmidos pRM150 y pRM151 que codifican para las proteínas quiméricas VC-L- <i>Scalpa2</i> y VN-L- <i>Scalpa2</i> , respectivamente. <i>URA3</i> , NAT <sup>R</sup> (VC en el amino de alpha2 VN en el amino de alpha2)	VC-L-alpha2 VN-L-alpha2	Vidal Aguiar, Y., 2016
-------------------	--------	----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	----------------------------	---------------------------

## Oligonucleótidos empleados

Los oligonucleótidos empleados en el estudio se presentan en la Tabla 5.

**Tabla 5. Oligonucleótidos empleados en el estudio.**

No.	Nombre	Descripción	Secuencia 5'-3'
I51	Gln3C-STOP@2473Xho I Rv	Oligo de <i>GLN3</i> que introduce un stop al final de la secuencia seguido de un sitio <i>Xho</i> I	GACTCGAGTCAAATACCAAATTTTAACCGTC
I55	Gln3@+1Spe I Fw	Oligo forward de <i>GLN3</i> que introduce sitio <i>Spe</i> I antes del ATG inicial	GGACTAGTAAAATGGAGGGGTTTCAGG
I57	Gln3S-STOP@2480Bam HI Rv	Oligo reverso de <i>GLN3</i> que introduce sitio <i>Bam</i> HI sin secuencia de Stop	AATACCAAATTTTAACCGTC
I52	Ure2@+1Xba I Fw	Oligo forward de <i>URE2</i> que introduce un sitio <i>Xba</i> I antes del ATG inicial	GGTCTAGAAAATGGGTGACTCAGG
I54	Ure2@S-STOP@1065Bam HI Rv	Oligo reverso de <i>URE2</i> que introduce un sitio <i>Bam</i> HI al final de la secuencia sin secuencia de Stop	AAGGATCCCTCTCCGCGAAGG
I53	Ure2C-STOP@1068Xho I Rv	Oligo reverso de <i>URE2</i> que introduce una secuencia de stop seguida de un sitio <i>Xho</i> I	GACTCGAGTTACTCTCCGCGAAGG
I56	Ure2@+1Cla I Fw	Oligo forward de <i>URE2</i> que introduce un sitio <i>Cla</i> I antes del ATG inicial	ATCGATATGGGTGACTCACGCAATACTGG
2216	pMT1@846 Fw	Oligo interno al promotor de metalotioneína	GAGGTCTTTTTGAAATGTTAGATC

L03 L04 L05 L06 L07 L08 L09 L10	Gln3@543_Fw2 Gln3@1087_Fw3 Gln3@1623_Fw4 Gln3@2244_Fw5 Gln3@2080_Rv2 Gln3@1590_Rv3 Gln3@1005_Rv4 Gln3@459_Rv5	Oligos internos para la secuenciación del gen <i>GLN3</i> de <i>C. glabrata</i> En fragmentos de aproximadamente 600 pb	AGAATGGTCAAATCGCACAG TGAACGACCTCCAGATCCAG GCAGGTCATCTTCGAGATCAAATGT AACAACTCCAACCATGCAGGGACA CAGCAACAAAGATTCTCCTGAG GAAGCAGTACATCATCTGTCAA CACTGCCGAGACAGTTATCGTCEGA GCACAACACAATTACAACCCAT
44 45	Gln3@+1_Fw Gln3@186_Rv	Oligos que amplifican un fragmento de 200 pb para la verificación de la presencia de <i>GLN3</i> .	TTCAGGATGATCTCGATGGG CCTTGACTTCACATCCCTGT
1514 935	Ure2@1514_Fw Ure2@935_Fw	Oligos internos de <i>URE2</i> para la secuenciación del gen. En fragmentos de 600pb	AAATCCTAATGCTAGAGTTCCAGCTC CCAATATGATGTCTCGCCAAGTA
29 30 31 32	Cg_ <i>GAP1</i> _29_Fw Cg_ <i>GAP1</i> _30_Rv Cg_ <i>ACT1</i> _31_Fw Cg_ <i>ACT1</i> _32_Rv	Oligos para PCR en tiempo real que codifican fragmentos de 200pb en los genes <i>GAP1</i> y <i>ACT1</i> de <i>C. glabrata</i>	CACTACCTATGCCACGAGATTC TCACCGTAACCTTTCACACC CGCCGGTGACGATGCTCC CTTGATTGAGCTTCGTC

## Medios de Cultivo

### Medios para *E. coli*

#### MEDIO LB LÍQUIDO

Para el crecimiento de colonias de *E. coli* transformadas con los plásmidos de la proteína de fusión para BiFC se utiliza el medio Luria-Bertani (LB) que contiene triptona (10 g/L), extracto de levadura (5 g/L) y NaCl (1 g/L). Para medios sólidos se añadió agar bacteriológico a 14 g/L (*csprotocols.cshlp.org*, 2016). Para la selección de transformantes se añade carbenicilina (de un stock a 100 mg/mL) para una concentración final de 1 µL/mL.

#### MEDIO SOB

El medio SOB se prepara con triptona (20 g/L), extracto de levadura (5 g/L), NaCl (0.5 g/L), KCl 250mM (10 mL/L) y se ajusta el pH de la solución a 7 para esterilizar posteriormente. Una vez estéril se añade MgCl<sub>2</sub> 2M (5 mL/L, estéril) (*csprotocols.cshlp.org*, 2018).

#### MEDIO SOC

Utilizado para la incubación de células de *E. coli* después de electroporarlas. El medio SOC se prepara con la adición de glucosa 1M (20 mL/L; esterilizada previamente por filtración) a medio SOB estéril preparado previamente (*csprotocols.cshlp.org*, 2018).

### Medios para *C. glabrata*

#### MEDIO RICO (YPD)

Para el crecimiento y transformación de colonias de *C. glabrata* se empleó el medio YPD (Extracto de levadura-Peptona-Dextrosa, YPD) que contiene Peptona (20 g/L), Extracto de levadura (10 g/L) y Dextrosa 2% (20 g/L) (*csprotocols.cshlp.org*, 2016).

Para medios sólidos de YPD se añadió agar bacteriológico de SIGMA-ALDRICH™ (A7002-500G) a una concentración de 15 g/L.

#### MEDIO MÍNIMO (YNB)

Para la evaluación del fenotipo de crecimiento de *C. glabrata* en un medio mínimo se empleó Yeast Nitrogen Base (YNB) Difco™ de J.T. Baker a 1.7 g/L de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Dependiendo de la fuente de nitrógeno a evaluar, se añadió sulfato de amonio ((NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) de J.T. Baker a una concentración de 1 g/L para la evaluación de crecimiento en amonio. Las fuentes de nitrógeno glutamina o prolina se añadieron a una concentración de 1 mg/mL a partir de un stock de 10 mg/mL (esterilizado

por filtración con filtro Millex HA de 0.45 µm) para la evaluación del crecimiento en el aminoácido respectivo.

Cuando fue necesario, se añadió uracilo a una concentración final de 30 µg/mL a partir de un stock de 10 mg/mL, para complementar las auxotrofías de las cepas. Para el crecimiento en medios sólidos se preparó medio mínimo con sulfato de amonio como fuente de nitrógeno y se añadió agar bacteriológico a una concentración de 15 g/L.

Para la selección de colonias derivadas de la cepa doble mutante *gln3Δ ure2Δ* transformadas con los plásmidos de trabajo, se añadió glutamato monosódico a una concentración de 1 g/L en lugar de sulfato de amonio. Adicionalmente, al medio estéril se le agregó nourseotrisina, cuando fuera necesario, a una concentración de 150 µg/mL y 100 µg/mL para medios líquidos y sólidos, respectivamente.

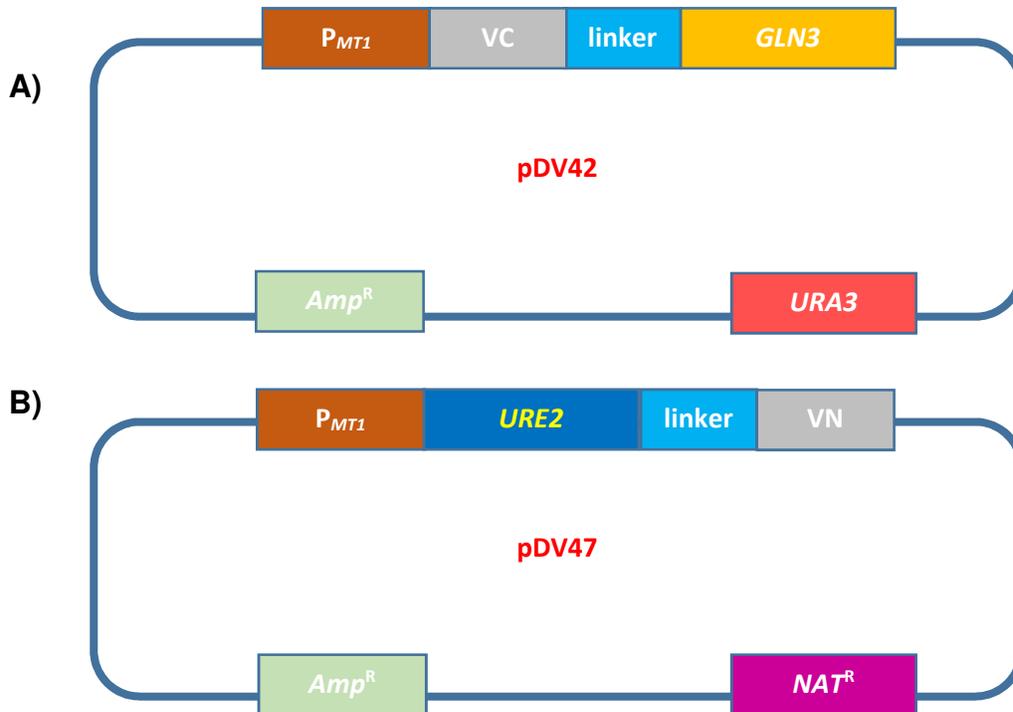
#### MEDIO CASAMINOÁCIDOS (CAA)

Para la inducción de la expresión de las proteínas quiméricas bajo el promotor de *MT1* se usó CAA. El medio se prepara de igual manera que el medio mínimo adicionado con amonio al que se le añade sulfato de cobre (CuSO<sub>4</sub>) a una concentración de 2 mM a partir de un stock 1 M y casaminoácidos (Fischer BioReagents™) a una concentración de 5 g/L.

#### **Diseño de plásmidos para la realización de BiFC**

Para construir las fusiones de VN y VC se partió de los plásmidos (pRM140, pRM144, pRM163 y pRM165) que contienen diferentes combinaciones de la fracción amino terminal (VN) o carboxilo terminal (VC) de la proteína amarilla fluorescente Venus (versión optimizada de YFP), fijadas a un linker de cinco repeticiones de G y A que confieren flexibilidad al fragmento correspondiente (Robledo Márquez, K., 2016; Sung, M.K. & Huh, W.K., 2007). Los plásmidos tienen un promotor inducible de metalotioneína (*P<sub>MT1</sub>*) que permite la expresión inducible del gen con sulfato de cobre según lo establecido por Vidal Aguiar (2016). Los genes se amplificaron a partir de DNA genómico de la cepa parental BG14 de *C. glabrata* (Tabla 3). Las secuencias de los genes *GLN3* y *URE2* así como la secuencia de la unión entre estos y el linker correspondiente en cada plásmido fueron verificadas por secuenciación en el LANBAMA, los oligonucleótidos utilizados se encuentran en la Tabla 3.

La estructura general de los plásmidos se representa en la Figura 4.



**Figura 4. Esquema de la estructura de los plásmidos pDV generados en el estudio.**

Se diseñaron plásmidos que codificaran una quimera entre el gen  $GLN3$  o  $URE2$  y el extremo carboxilo terminal (VC, 260pb) o amino terminal (VN, 550pb) de la proteína fluorescente Venus. Las etiquetas VN y VC no son fluorescentes por sí solas.

- A) Esquema del plásmido pDV42, que contiene el promotor de metalotioneína ( $P_{MT1}$ ) que permite la inducción de la transcripción de la proteína quimérica de interés con la adición de sulfato de cobre al medio. La fracción de proteína Venus (VC), se une por medio de un linker, que consiste de cinco repeticiones de glicina y alanina, al gen  $GLN3$  de *C. glabrata*. El casete de resistencia a ampicilina ( $Amp^R$ ) permite la selección de colonias de *E. coli* transformadas en un medio con carbenicilina. El casete de selección ( $URA3$ ) permite la selección de colonias de *C. glabrata* transformadas por su crecimiento en medios carentes de uracilo.
- B) Esquema del plásmido pDV47, que al igual que el pDV42 contiene una fusión entre un fragmento de la proteína Venus (VN) y el gen  $URE2$  pero con casete de resistencia a nourseotricina ( $NAT^R$ ) que permite la selección de colonias de *C. glabrata* transformadas por su crecimiento en medios suministrados con nourseotricina.

### **Transformación de *E. coli* por electroporación**

Para la transformación de *E. coli* se emplearon 50  $\mu$ l de células electrocompetentes DH5 $\alpha$  a las que se les añadió DNA plasmídico (50 ng/ $\mu$ L) y se transformaron por electroporación (2500 V/25  $\mu$ F/200  $\Omega$ ) de acuerdo a lo establecido por Dower, W.J. *et al.*, (1988). Las células se recuperan en 600  $\mu$ l de medio SOC o medio LB adicionado con dextrosa 2% por 1 h a 37  $^{\circ}$ C. En seguida, las células se sembraron en placas de LB con

carbenicilina y se incubaron por 12 h a 37 °C. Finalmente, se realizó PCR de colonia para verificar las colonias positivas.

Para la selección de colonias transformadas con los plásmidos de *URE2*, se amplificó un fragmento de 1080 pb con los oligonucleótidos I52/I56 e I54/I53 (dependiendo de los sitios de corte añadidos al gen). Para los plásmidos de *GLN3*, se utilizaron los oligonucleótidos 44 y 45 que corresponden a un fragmento de 200 pb. Las cepas generadas y los oligonucleótidos utilizados se encuentran descritos en la Tabla 3 y la Tabla 5, respectivamente.

### **Lisis alcalina para la extracción de plásmidos en *E. coli***

Para la extracción de DNA plasmídico de las cepas de *E. coli* que expresaban los plásmidos de trabajo, se cultivaron 3 mL de la cepa en medio LB con carbenicilina (1 µL/mL) a 37 °C por 12 h. Se centrifugaron 1.5 mL de cultivo en un tubo Eppendorf y se decantó el medio. Cada pastilla celular se re-suspendió en 100 µL de solución 1 (glucosa 1 M, Tris-HCl 1 M y EDTA 0.5 M por cada 100 mL de agua). Posteriormente se agregaron 200 µL de solución 2 (1 mL de SDS 1% y 200 µL de NaOH 0.2 M por cada 100 mL de agua) se mezcló por inversión y se incubó a temperatura ambiente durante 5 min. Después se añadieron 200 µL de solución 3 neutralizante (60 mL de acetato de potasio 5 M, y 11.5 mL de ácido acético glacial por cada 100 mL de agua) y se mezcló por inversión cuidadosamente, se incubó 10 min en hielo.

Se centrifugó a 13000 rpm por 20 min y se decantó el sobrenadante a un tubo nuevo. Al sobrenadante se le añadió 630 µL de isopropanol absoluto y se dejó en incubación en hielo por 30 min. El tubo se centrifugó a 13000 rpm por 10 min y se descartó el sobrenadante. Se lavó la pastilla con 500 µL de etanol al 70%.

Finalmente, el tubo se centrifugó durante 3 min a 13000 rpm y se descartó el etanol por decantación. La pastilla celular se dejó secar al aire por 5 min. Se resuspendió la pastilla en 50 µL de agua miliQ estéril. Se añadió 1.25 µL de RNAsa 1 mg/µL para eliminar residuos de RNA y se visualizó el plásmido en un gel de agarosa al 1% (Sambrook, J., Fritsch, E.F., & Maniatis, T., 1989).

### **Transformación de *C. glabrata***

La transformación de *C. glabrata* se realizó de acuerdo al protocolo establecido por Castaño, I. *et al.* (2003). Los pre-cultivos de 5 mL de cada cepa se crecieron a 30 °C/12 h. Del cultivo saturado se tomaron 300 µL y se crecieron en 50 mL de medio YPD a 30°C con agitación hasta alcanzar una OD<sub>600nm</sub> entre 0.8 y 1. Posteriormente, se transfirió el cultivo a tubos Falcon de 50 mL para centrifugar a 3500 rpm durante 5 min. Se descartó el sobrenadante y se lavaron las células con 25 mL de agua miliQ estéril, se volvieron a centrifugar y se descartó el sobrenadante. Las células se resuspendieron en

1 mL de acetato de litio (LiAc) 0.1M y se transfirieron a tubos Eppendorf para posteriormente centrifugar a 13000 rpm por 30 s; se descartó el sobrenadante y la pastilla celular se re-suspendió en 300  $\mu$ L de LiAc 0.1M. Para cada transformación se tomó 50  $\mu$ L de células tratadas con LiAc, se le añadieron 50  $\mu$ L de una dilución de DNA plasmídico (2-3  $\mu$ L DNA plasmídico en 47  $\mu$ L buffer Tris-EDTA estéril a una concentración final de  $\sim$ 50 ng/ $\mu$ L). Posteriormente, se trataron con 301  $\mu$ L de una mezcla de transformación (240  $\mu$ L de PEG al 50%, 36  $\mu$ L de LiAc 1 M y 25  $\mu$ L de ssDNA (2 mg/mL), cada una) y se incubaron a 28°C por 45 min. Pasado este tiempo, se añadió 43  $\mu$ L de DMSO estéril y se sometieron a un choque térmico (42°C por 15 min).

Finalmente, las células se incubaron 4 horas a 28°C en 900  $\mu$ L de YPD (para cepas con selección NAT<sup>R</sup>) y se platearon en medio YPD sólido adicionado con nourseotricina (100  $\mu$ g/mL). Para las cepas con selección Ura a los tubos de transformación se les añadieron 900  $\mu$ L de agua miliQ estéril y se platearon directamente en medio YNB adicionado con sulfato de amonio (1 g/L). Para la doble selección de cepas NAT<sup>R</sup>/URA<sup>+</sup> las células se platearon en medio YNB adicionado con glutamato monosódico a una concentración de 1 mg/mL como fuente de nitrógeno y 30  $\mu$ L/mL de NAT. Las cajas se incubaron a 30°C por 48-36 h (Tabla 2).

### **Curva de crecimiento de *C. glabrata* cuantificada con Bioscreen C™**

Para determinar el tiempo de duplicación de las cepas de *C. glabrata* silvestre BG14, mutantes *ure2* $\Delta$ , *gln3* $\Delta$  y *gln3* $\Delta$  *ure2* $\Delta$  y las cepas transformadas (Ver Tabla 4), las cepas se crecieron en medio rico YPD hasta tener un cultivo saturado. Se centrifugaron las cepas y las pastillas celulares se lavaron dos veces con agua miliQ estéril.

Posteriormente, se resuspendieron las pastillas en 1 mL de agua estéril. Se mide la OD<sub>600nm</sub> con un espectrofotómetro UV-1700PharmaSpec de Shimadzu™ y se ajusta la OD<sub>600nm</sub> a 2 en agua estéril. En 1 mL de medio YPD o YNB con amonio o prolina como fuentes de nitrógeno se agrega la cantidad necesaria de células para tener una OD<sub>600nm</sub> inicial de 0.2 y se toman 300  $\mu$ L que se colocan en cada pozo de la placa honeycomb del Bioscreen C. Se realizaron las curvas a 30°C con máxima agitación. Se midió la OD<sub>600nm</sub> cada 15 min con luz de amplio espectro durante 48 o 72 h dependiendo de la cepa a analizar. Los ensayos se realizaron por triplicado biológico con duplicado técnico de cada cepa y el tiempo de duplicación se calculó de acuerdo al método de Murakami, C.J. *et al.* (2008).

### **Extracción de RNA de *C. glabrata*.**

Para la extracción de RNA de las cepas de *C. glabrata* transformadas con plásmido, las cepas se crecieron en YPD 30°C/12 h y luego se inocularon en matraces de 50 mL con medio mínimo con amonio (Tabla 4) hasta alcanzar una OD<sub>600nm</sub> entre 0.6 y 0.8.

Para la extracción de RNA de las cepas de *C. glabrata* en medios con prolina se incubó 1 mL de cultivo saturado en medio mínimo con amonio hasta alcanzar una OD<sub>600nm</sub> de 0.6, se centrifugaron los medios a 3500 rpm durante 5 min, la pastilla celular se lavó con 25 mL de agua estéril, se realizó una centrifugación a 3500 rpm durante 5 min y se eliminó el agua por decantación. Las pastillas celulares se resuspendieron en 50 mL de medio mínimo con prolina y se dejaron en agitación durante 1 hora antes de continuar con el resto del protocolo.

Los cultivos (crecidos en medio con amonio o después de 1 hora en medio con prolina) se centrifugaron a 3500 rpm durante 5 min para desechar el medio y se lavaron con 25 mL de agua miliQ estéril. A las pastillas se les adicionaron 1.2 mL de Buffer AE (Acetato de sodio 50 mM y EDTA 10 mM a pH 5.3) y se tomaron alícuotas de 400 µL para tratarlas con 40 µL de SDS al 10%. A esta mezcla se le trató con fenol ácido y se incubó a 65°C por 4 min, se sometieron a choque térmico en un baño de etanol absoluto a -70°C hasta cristalización (10-20 min aproximadamente).

Se descongelaron las muestras a temperatura ambiente, se centrifugaron, se separó la fase acuosa y se añadieron 500 µL de Fenol-Cloroformo-Alcohol Isoamílico y se mezcló con agitación en un vortex por 5 min. El tubo se centrifugó a 14000 rpm durante 10 min, se pasó la fase acuosa a un tubo nuevo, se añadió 40 µL de acetato de sodio 3 M y 1 mL de etanol absoluto frío y se dejó en incubación a -20 °C toda la noche. Posteriormente, el tubo se centrifugó a 4 °C, 14000 rpm durante 5 min, el sobrenadante se decantó y se dejó secar la pastilla por 10 min. La pastilla seca se re-suspendió en 20 µL de agua estéril libre de RNAsas. La calidad del RNA se verificó en un gel de agarosa con formaldehído al 1.1% (Schmitt M.E. *et al.*, 1990).

### **Síntesis de cDNA de *C. glabrata* para experimentos de expresión de *GAP1*.**

El RNA extraído se utilizó para generar el DNA complementario (cDNA) correspondiente siguiendo las instrucciones del fabricante del kit TURBO DNA-free™ de Invitrogen™. El DNA residual del proceso de extracción se eliminó tratando 5 µg de RNA de cada muestra con 1 µL de DNAsa I a 37°C/30 min y purificando la muestra con Fenol-Cloroformo-Alcohol Isoamílico.

El cDNA se obtuvo a partir de 2 µg de RNA libre de DNA, según el protocolo de síntesis de cDNA con retrotranscriptasa reversa SuperScript™ II RT de Invitrogen™ de acuerdo a las recomendaciones del fabricante. La muestra obtenida se ajustó a una concentración de 125 µg/µL para realizar el ensayo de PCR en tiempo real.

### **Determinación de la expresión de *GAP1* en cepas de *C. glabrata* por qRT-PCR.**

Para determinar la expresión de *GAP1* (permeasa general de aminoácidos sensible a NCR) se utilizó el cDNA previamente obtenido y se realiza una mezcla de reacción con SYBR™ Green Master Mix de Applied Biosystems™ y los oligonucleótidos específicos (Tabla 3). La expresión del gen *ACT1* (que codifica para la actina, proteína estructural del citoesqueleto) se utilizó como control y para normalizar la expresión del gen *GAP1* (VanGuilder, H.D., Vrana, K.E. and Freeman, W.M., 2008; Brunke, S. *et al.*, 2014).

La reacción se llevó a cabo en el equipo PikoReal96™ PCR System de Thermo Scientific™ bajo los siguientes parámetros:

- Pre-incubación: 95°C/7 min.
- Amplificación: 95°C/5 s, 58°C 30 s y 60°C/30 s, en 40 ciclos.
- Extensión final 60°C/15 min.

Los fragmentos internos amplificados del gen *GAP1* o *ACT1* corresponden a amplicones de 219 pb y 121 pb, respectivamente. Los resultados de la expresión se evaluaron por medio de la prueba de t de dos colas para saber si existía diferencia significativa entre la expresión de *GAP1* de la cepa parental y la expresión en las cepas transformadas con los plásmidos de BiFC.

### **Ensayo de BiFC mediante citometría de flujo en *C. glabrata*.**

Las cepas que contienen las combinaciones de plásmidos que codifican las combinaciones de interés de las proteínas quiméricas se crecieron en medio YNB adicionado con amonio como fuente de nitrógeno (sin uracilo y adicionado con NAT a 150 µg/L) durante 12-18 h. Los cultivos se centrifugaron y se lavaron dos veces con 1 mL de agua miliQ estéril para eliminar trazas de medio y se resuspendieron en 1 mL de agua miliQ estéril. Se midió la OD<sub>600nm</sub> y se tomaron 300 µL de alícuota para medir fluorescencia en condición cero en FACScalibur de BD Biosciences™.

Las células resuspendidas se cultivaron en medio mínimo adicionado con amonio y casaminoácidos con o sin sulfato de cobre 2 mM (Medio ON o Medio OFF, respectivamente), ajustando la OD<sub>600nm</sub> a 1. Los cultivos se incubaron a 30 °C y la fluorescencia se midió a las 2, 3, 4 y 5 horas en el citómetro de flujo FACScalibur de BD Biosciences™. Para cada cepa se midieron diez mil eventos. Los niveles basales de fluorescencia se ajustaron con la cepa *C. glabrata* silvestre BG14 a 10 unidades arbitrarias de fluorescencia.

Como controles positivos de fluorescencia se emplearon las cepas CGM3030 y CGM1758 (Vidal Aguiar, Y., 2016) que contienen plásmidos que expresan la proteína amarilla fluorescente (YFP) bajo el promotor *MT1* inducible con CuSO<sub>4</sub> y el promotor constitutivo *TEF1*, respectivamente. Como controles de BiFC se emplearon las cepas

CGM2926 y CGM3012 (Robledo Márquez, K., 2016). Estas cepas contienen una combinación de plásmidos que codifican para las proteínas alfa2 ( $\alpha 2$ ) de *S. cerevisiae* fusionadas a fragmentos VN y VC de Venus. La proteína alpha2 se ha reportado que forma dímeros, y adquieren fluorescencia cuando se co-expresan (Keleher, C.A., Goutte, C. & Johnson, A.D., 1988; Robledo Márquez, K., 2016).

Los resultados se analizaron con el software FlowJo de BD Biosciencias™ que permite calcular la media geométrica, en unidades arbitrarias de fluorescencia, de cada cultivo en medio con y sin sulfato de cobre (medios ON y OFF, respectivamente). El valor promedio de la media que se reporta se obtuvo de la resta del promedio de las medias geométricas de cada cepa en medio ON menos el valor del promedio de las medias geométricas de cada cepa en medio OFF.

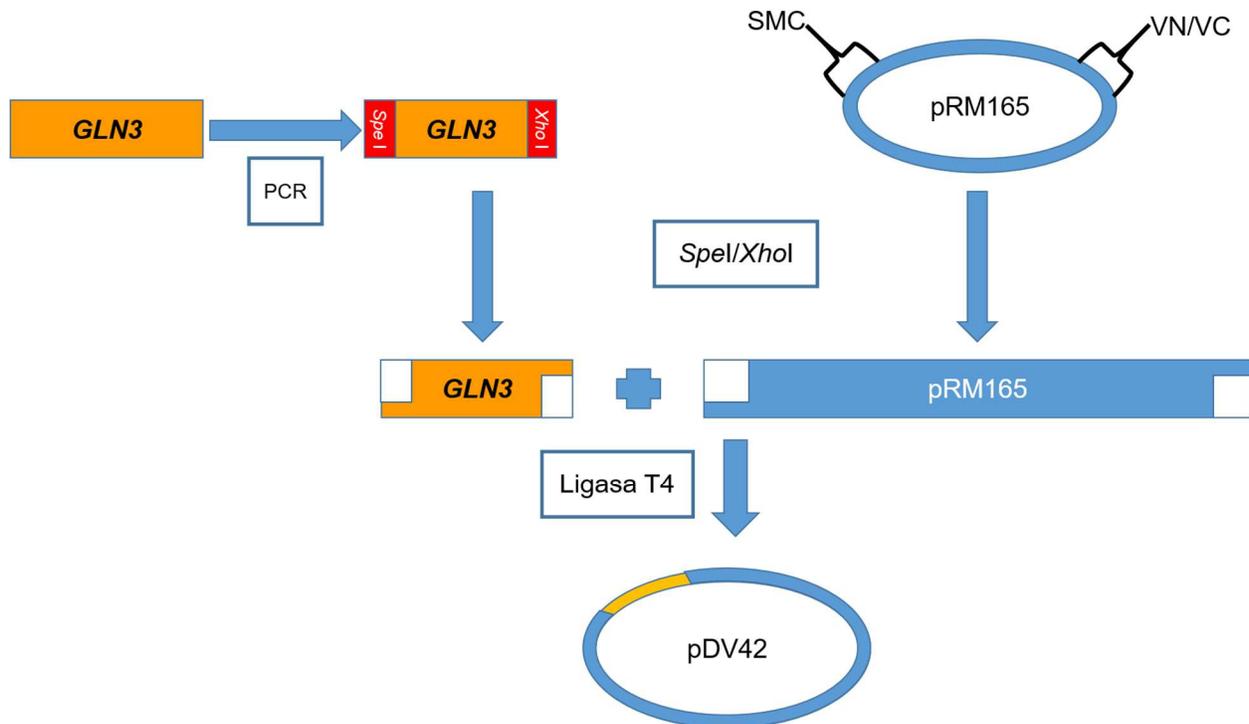
### 3. Resultados

#### **Construcción de las cepas que expresen las proteínas quiméricas de Gln3 y Ure2 con las fracciones de la proteína fluorescente Venus**

Para llevar a cabo la complementación bimolecular de fluorescencia en *C. glabrata* es necesario construir una batería de plásmidos que contengan las fusiones de los fragmentos carboxilo y amino terminal de la proteína fluorescente Venus, que es una versión optimizada de YFP (Nagai, T. *et al.*, 2002), unida al gen de interés *GLN3* o *URE2* ligados por un linker flexible que le da libertad de movimiento a los fragmentos VC y VN que permita su complementación y por consiguiente, emitir fluorescencia (Fredriksson, S. & Bülow, L., 2001).

Se utilizaron los plásmidos base que codifican para el fragmento carboxilo (VC) o amino (VN) de la proteína Venus y que se encuentran bajo el promotor del gen de la metalotioneína (*MT1*). Este promotor es inducible por sulfato de cobre (Mascorro-Gallardo, J.O. *et al.*, 1996; Vidal Aguiar, Y., 2016). En los plásmidos la secuencia de VN o VC se encuentra junto a un sitio de clonación múltiple que permite clonar el gen de interés (*GLN3* o *URE2*) amplificado por PCR, a partir de DNA genómico usando los oligonucleótidos de la Tabla 5.

Estos oligonucleótidos insertan en los extremos del producto de PCR sitios de restricción que permiten clonar los genes en los plásmidos base. Tanto el plásmido base como el gen de interés se trataron con las enzimas de restricción correspondientes y se ligaron. De esta manera se obtienen las fusiones de proteína quimérica. La expresión de estas fusiones es inducible por sulfato de cobre y se obtienen las proteínas quiméricas que contienen a Gln3 o a Ure2 marcados con los fragmentos de Venus pero que no son fluorescentes por si mismos (Figura 5).



**Figura 5. Esquema de construcción de los plásmidos BiFC.**

*GLN3* se amplificó por PCR a partir de DNA genómico de *C. glabrata* con oligonucleótidos que insertan sitios de restricción (*Spe I* y *Xho I*) en los extremos del fragmento. El plásmido base (pRM165) y el producto de amplificación, se cortaron con las enzimas correspondientes, se linealizó el plásmido (aprovechando los sitios de restricción presentes en el sitio múltiple de clonación, SMC) y se obtuvieron extremos cohesivos de *Spe I* y *Xho I*. Empleando la ligasa T4 se clonó el gen *GLN3* al plásmido pRM165 para obtener el plásmido pDV42, el cual se transformó en *E. coli* para su diagnóstico y almacenamiento.

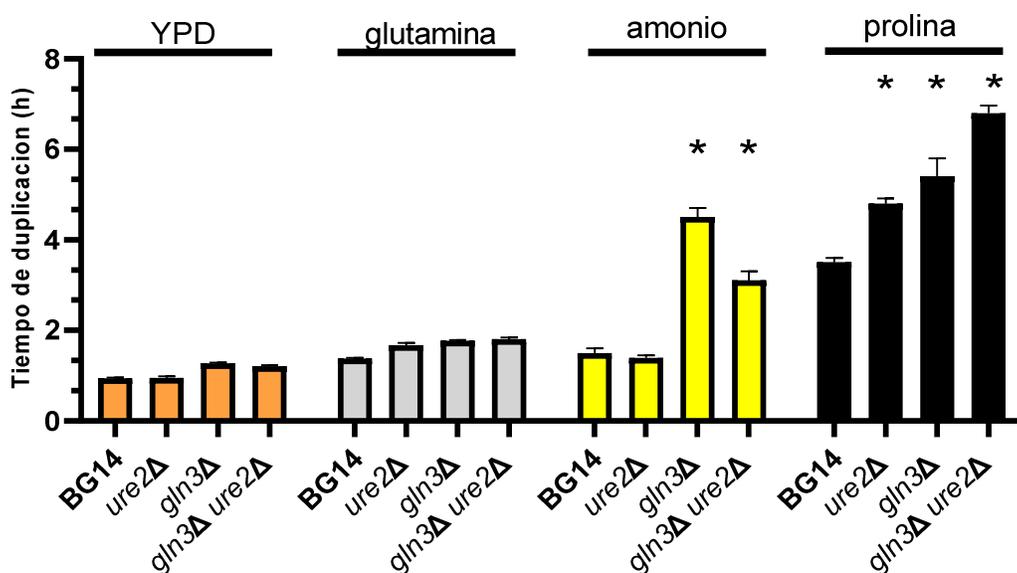
Para determinar si las proteínas Gln3 y Ure2 son capaces de interactuar, es necesario que los fragmentos de Venus sean capaces de moverse en el espacio y permitir la complementación en trans de las fracciones para poder emitir fluorescencia. Es importante que las fracciones no afecten el plegamiento de las proteínas en estudio para evitar así un efecto estérico. Debido a que no es posible determinar la estructura de cada proteína quimérica formada, se deben generar diferentes combinaciones de los genes con las etiquetas. La complementación de las proteínas quiméricas se evalúa por medio de experimentos subsecuentes para obtener el par más adecuado que genere fluorescencia y que ésta pueda ser detectada por citometría de flujo en un FACS.

Se llevó a cabo la transformación de los plásmidos construidos (descritos en la Tabla 3) en células de *E. coli* DH5 $\alpha$  por medio de electroporación (Dower, W.J. *et al.*, 1988). El correcto ensamblaje del fragmento VC o VN de cada plásmido con el gen de interés (*GLN3* o *URE2*) y se verificó por secuenciación Sanger en el Laboratorio Nacional de

Biotecnología Agrícola, Medica y Ambiental (LANBAMA), del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica (IPICYT).

**La ausencia de *GLN3* y *URE2* generan alteraciones en el fenotipo de crecimiento de las cepas mutantes en medios con amonio y prolina como únicas fuentes de nitrógeno.**

Para evaluar las diferencias en el fenotipo de crecimiento de la cepa parental y de las cepas mutantes en *GLN3* y *URE2*, se llevaron a cabo curvas de crecimiento en medio rico (YPD) y en medio mínimo adicionado con amonio, glutamina o prolina como única fuente de nitrógeno. Los tiempos de duplicación en las cepas mutantes *gln3Δ* y *gln3Δ ure2Δ* crecidas en medio mínimo con amonio y prolina, en comparación con la cepa parental, aumentaban tres y dos veces, respectivamente. Sin embargo, en YPD y en medios mínimos con glutamina, solo se observaron diferencias modestas entre los tiempos de duplicación de la cepa de *C. glabrata* silvestre BG14 y las mutantes (Figura 6).



**Figura 6. Tiempos de duplicación de la cepa parental de *C. glabrata* y de las mutantes nulas *gln3Δ*, *ure2Δ* y *gln3Δ ure2Δ*.**

La cepa parental (BG14), las mutantes de *GLN3* (*gln3Δ*, *gln3Δ ure2Δ*) y las mutantes de *URE2* (*ure2Δ*) se crecieron en medio rico YPD (naranja), medio mínimo con glutamina (gris) amonio (amarillo), y prolina (negro). El tiempo de duplicación representa la media de triplicados biológicos en horas  $\pm$  la desviación estándar.

\*Tiempo de duplicación estadísticamente diferente con respecto a la cepa parental en el mismo medio con una  $p < 0.05$  por t de student.

Estos resultados comprueban el comportamiento reportado por Pérez-delosSantos, F.J. & Riego-Ruiz, L (2016).

### **Transformación de las mutantes sencillas en *GLN3* y *URE2* y la mutante doble de *C. glabrata* con los plásmidos que codifican para proteínas quiméricas de Gln3 y Ure2 fusionadas con los fragmentos de Venus.**

Los plásmidos obtenidos y secuenciados (Tabla 2) fueron extraídos de *E. coli* por lisis alcalina y purificados para ser transformados en las cepas mutantes nulas de *GLN3* (*gln3Δ*), *URE2* (*ure2Δ*) y una mutante doble (*gln3Δ ure2Δ*) de *C. glabrata* utilizando el método de PEG/Acetato de Litio (Castaño, I. *et al.*, 2003). Para la selección de las colonias transformadas, las colonias se seleccionaron en cajas YPD Nat capaces de crecer con nourseotricina o en medios que permiten seleccionar el marcador *URA3*. Las cepas de la doble mutante *gln3Δ ure2Δ* transformadas con un par de plásmidos se seleccionaron por su capacidad de crecer en un medio mínimo sin uracilo y con nourseotricina.

Como control, se generaron cepas de *C. glabrata* transformadas con los plásmidos base sin los genes de interés. Todas las cepas obtenidas de *C. glabrata* se describen en la Tabla 4.

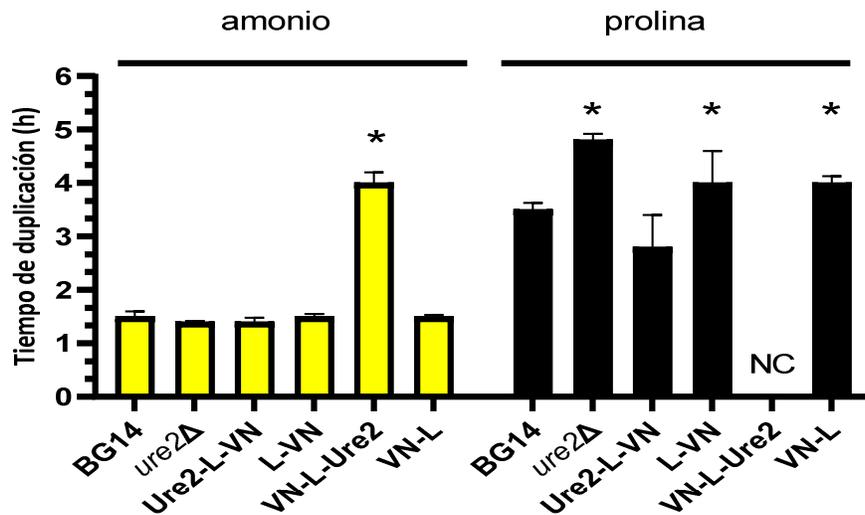
Posteriormente, se comparó el fenotipo de crecimiento de las cepas que expresan de forma episomal los genes etiquetados (Ure2-L-VN y Gln3-L-VC) contra el fenotipo de la cepa silvestre y la cepa mutante parental correspondiente para cada una.

### **Las cepas mutantes de *GLN3* y *URE2* presentan un crecimiento similar al de la cepa silvestre cuando se transforman con plásmidos que codifican para las proteínas quiméricas de Gln3 y Ure2 con fragmentos de Venus.**

Llevamos a cabo curvas de crecimiento para determinar la funcionalidad de las construcciones de Gln3 y Ure2 fusionadas a los fragmentos de Venus en medio mínimo con prolina y amonio como únicas fuentes de nitrógeno (ver Tabla 4). Para observar si las proteínas quiméricas podían complementar el fenotipo observado en la cepa parental BG14.

Se generaron también cepas control para observar cualquier efecto que la fracción de Venus (VN o VC) pudiera tener en la cepa mutante (Tabla 4). Estos plásmidos control contienen la secuencia de una fracción de Venus más la secuencia del linker en el extremo amino o carboxilo de la fracción de Venus correspondiente.

Las cepas transformadas DV13 y DV15 se generaron al transformar a la mutante *ure2Δ* con los plásmidos que codifican para las quimeras Ure2-L-VN y VN-L-Ure2, respectivamente (Figura 7).



**Figura 7. Tiempos de duplicación de las cepas derivadas de *ure2Δ* transformadas con los plásmidos que codifican para las proteínas quiméricas de *URE2* con las fracciones de Venus.**

Tiempos de duplicación de la cepa silvestre BG14, la mutante *ure2Δ* y de las cepas transformadas que codifican para las quimeras Ure2-L-VN (DV13), L-VN (DV23), VN-L-Ure2 (DV15) y VN-L (DV9), en medio mínimo adicionado con amonio (barras amarillas) o prolina (barras negras) como fuentes de nitrógeno. Cada valor representa la media de triplicados biológicos  $\pm$  desviación estándar. NC: No crecimiento.

\*Tiempo de duplicación estadísticamente diferente con respecto a la cepa parental BG14 crecida en el mismo medio con una  $p < 0.05$ , obtenida por t de student.

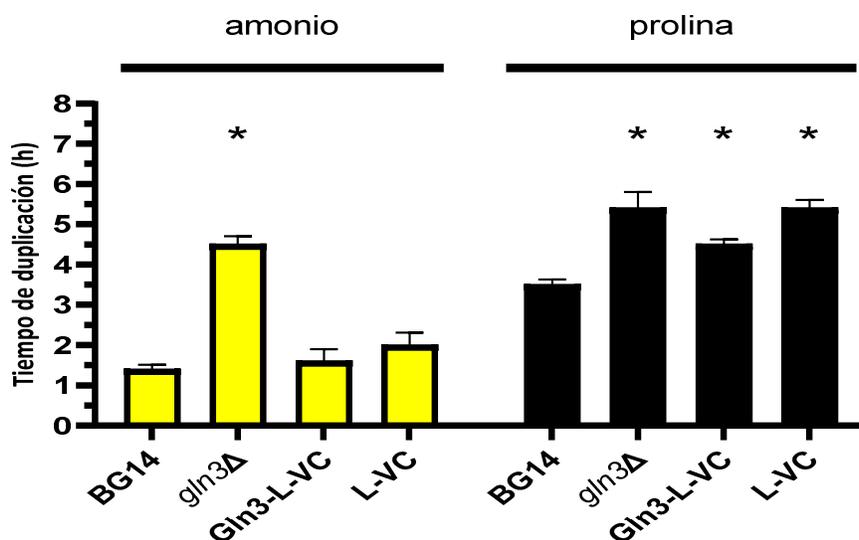
Se observó que en medio mínimo adicionado con amonio, no se presentaban diferencias en el tiempo de duplicación entre la cepa silvestre, la mutante *ure2Δ* y la cepa que codifica para la quimera Ure2-L-VN. Sin embargo, en la cepa que codifica para la quimera VN-L-Ure2, el tiempo de duplicación fue de más del doble en comparación con su parental, *ure2Δ*.

Mientras tanto, en medios con prolina como única fuente de nitrógeno se observó que únicamente la cepa que codifica la quimera Ure2-L-VN crecía en un tiempo similar al de la cepa BG14 a diferencia de los controles con plásmido vacío, los cuales presentaron tiempos de crecimiento similares a la mutante *ure2Δ*.

La cepa DV15 (VN-L-Ure2) no fue capaz de crecer en medio con prolina como única fuente de nitrógeno. Esto parece indicar que la adición de la etiqueta VN en el extremo amino de la proteína Ure2 provoca una pérdida de la función de Ure2, lo que conlleva una alteración drástica del fenotipo.

Con base en estos resultados, el plásmido que codifica para la quimera Ure2-L-VN se utilizó para complementar la función de Ure2 en la mutante *gln3Δ ure2Δ* y se descartó el uso de las quimeras de Ure2 con la etiqueta VN en el amino terminal.

Las cepas transformadas DV1 y DV3 fueron generadas al transformar a la mutante *gln3Δ* con los plásmidos que codifican las quimeras Gln3-L-VC y la etiqueta L-VC (como control), respectivamente (Figura 8).



**Figura 8. Tiempos de duplicación de las cepas derivadas de *gln3Δ* transformadas con el plásmido que codifica para la proteína quimérica de *GLN3* con una de las fracciones de Venus.**

Tiempos de duplicación de las cepas silvestre BG14, la mutante *gln3Δ*, cepas transformadas que codifican las quimeras Gln3-L-VC (DV18), L-VN (DV21), en medio mínimo adicionado con amonio (barras amarillas) o prolina (barras negras) como fuentes de nitrógeno. Cada valor representa la media de triplicados biológicos  $\pm$  desviación estándar.

\*Tiempo de duplicación estadísticamente diferente con respecto a la cepa parental BG14 crecida en el mismo medio con una  $p < 0.05$ , obtenida por t de student.

De acuerdo a los tiempos de duplicación obtenidos, se observa que en medios con amonio, la quimera Gln3-L-VC presentó un tiempo de duplicación muy similar al de la cepa silvestre BG14 y diferente al de su parental *gln3Δ* (Ver Figura 8). De manera que la quimera Gln3-L-VC complementa la función de Gln3 en presencia de amonio.

En presencia de prolina, el tiempo de duplicación de la cepa transformada con la quimera Gln3-L-VC es menor con respecto a su parental *gln3Δ*; sin embargo, este tiempo aún es superior al que presenta la cepa silvestre.

Por lo tanto, el tiempo de duplicación observado en la cepa transformada con la quimera Gln3-L-VC indicaría que la complementación con esta quimera solo restaura de manera

parcial el fenotipo de la cepa *gln3Δ* en prolina. Este fenotipo podría indicar que la quimera de Gln3 no es capaz de complementar totalmente la función de Gln3.

Con base a este resultado, la cepa transformada con el plásmido que codifica para la quimera Gln3-L-VC se usó para complementar la función de Gln3 en la cepa doble mutante *gln3Δ ure2Δ* debido a que, aunque la función de la quimera de Gln3 no es exactamente igual a la cepa silvestre, la proteína es capaz de comportarse de manera similar a la proteína Gln3 silvestre en amonio (Figura 8), evidenciado por la similitud entre los fenotipos de la cepa silvestre y la cepa que expresa la quimera Gln3.

Para poder evaluar la interacción de Gln3 y Ure2 por BiFC se requiere expresar en la misma cepa ambas quimeras (Gln3-L-VC y Ure2-L-VN). Para ello, se transformaron los plásmidos que codifican para estas quimeras en la cepa mutante doble *gln3Δ ure2Δ* para obtener la cepa que expresa ambos genes con las fracciones complementarias para BiFC (DV26, Ver Tabla 4).

Tomamos en cuenta, la posibilidad de que la adición del fragmento de Venus interfiriera con la interacción proteína-proteína de Gln3 y Ure2, por lo que se generaron 2 pares de quimeras con diferentes acomodos en la unión entre la proteína de interés y el fragmento de Venus. Sin embargo, durante la realización del proyecto, la generación de quimeras de Gln3 tuvo más complicaciones de lo esperado, a pesar de ello se generaron quimeras de Gln3 con el extremo carboxilo de Venus en los extremos amino y carboxilo de Gln3 (VC-L-Gln3 y Gln3-L-VC, respectivamente).

En la tabla 6 se muestran las quimeras generadas para ambos genes y se señala el marcador de selección que posee el plásmido.

**Tabla 6. Quimeras de Ure2 y Gln3 generadas en el estudio.**

Quimera	Marcador de selección	Crecimiento relativo en amonio	Crecimiento relativo en prolina
Ure2-L-VN	<i>URA3</i>	Crecimiento equivalente a BG14	Crecimiento menor
Ure2-L-VN*	NAT <sup>R</sup>	Crecimiento equivalente a BG14	Crecimiento menor
Gln3-L-VC	NAT <sup>R</sup>	Crecimiento equivalente a BG14	Crecimiento menor a <i>gln3Δ</i> , mayor a BG14
VC-L-Gln3	<i>URA3</i>	No se evaluó	No se evaluó

Se presentan en la tabla las quimeras generadas a partir de Gln3 o Ure2 unidas al fragmento amino (VN) o al fragmento carboxilo (VC) de Venus utilizadas transformadas a la cepa de *C. glabrata* mutante doble *gln3Δ ure2Δ*. Las quimeras se expresan de manera episomal a partir de un plásmido que contiene un marcador de selección *URA3* (para la complementación de la auxotrofia de la cepa mutante) o un casete de resistencia NAT<sup>R</sup> (para el crecimiento en medios con nourseotricina) para permitir la identificación de cepas que co-expresen ambos plásmidos.

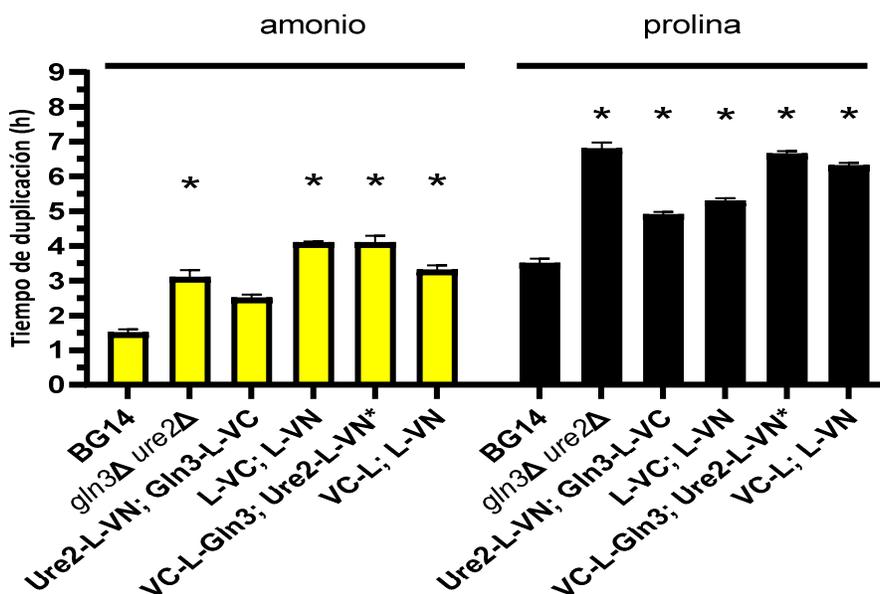
\*La quimera de Ure2-L-VN cuya secuencia se digirió con *Xba I/Xho I* y se ligó a un plásmido base con un casete de resistencia NAT<sup>R</sup>.

Crecimiento con respecto a la cepa silvestre de *C. glabrata* BG14.

Debido a la necesidad de utilizar la quimera de Ure2-L-VN para el experimento de complementación con el par de quimeras VC-L-Gln3/Gln3-L-VC que tienen selección URA3 y NAT<sup>R</sup> respectivamente, fue necesario subclonar la quimera de Ure2-L-VN en un plásmido base con un marcador compatible. Para esto, se digirió el plásmido pDV13, que expresa la quimera Ure2-L-VN, con *Xho* I y *Xba* I, las cuales flanquean la secuencia del gen junto con el extremo amino de la proteína fluorescente y lo mismo se realizó con el plásmido base pRM142. Se ligaron ambos fragmentos y se obtuvo la quimera Ure2-L-VN\* (Ver Tabla 6) con el marcador de selección NAT<sup>R</sup>.

Se transformó la cepa *gln3Δ ure2Δ* de *C. glabrata*, con los plásmidos que codifican estas dos quimeras y así se generó la cepa que expresa el par quimérico VC-L-Gln3/Ure2-L-VN\* (DV60).

Las cepas de *gln3Δ ure2Δ* transformadas con el par de quimeras Gln3-L-VC/Ure2-L-VN (DV26) y VC-L-Gln3/Ure2-L-VN\* (DV60) se evaluaron con base a su velocidad crecimiento en medios con amonio y prolina junto a sus cepas control DV44 y DV45 que codifican solo para el par de etiquetas de Venus (Figura 9).



**Figura 9. Tiempos de duplicación de las cepas derivadas de la mutante doble *gln3Δ ure2Δ* transformadas con las parejas de plásmidos que codifican para las quimeras de Gln3 y Ure2.**

Tiempos de duplicación de las cepas de *C. glabrata* silvestre (BG14), *gln3Δ ure2Δ*, cepas transformadas (*gln3Δ ure2Δ* con los plásmidos) que codifican los pares de quimeras Gln3-L-VC;

Ure2-L-VN (DV26), L-VC; L-VN (DV44), VC-L-Gln3; Ure2-L-VN (DV60) y VC-L; L-VN (DV45), en medio mínimo con amonio (barras amarillas) o prolina (barras negras) como fuentes de nitrógeno. Cada valor representa la media de triplicados biológicos  $\pm$  desviación estándar.

\*Tiempo de duplicación estadísticamente diferente con respecto a la cepa parental BG14 crecida en el mismo medio con una  $p < 0.05$ , obtenida por t de student.

En el caso de la pareja de quimeras VC-L-Gln3/Ure2-L-VN\*, los tiempos de duplicación en amonio son 30% más altos que en la cepa mutante *gln3 $\Delta$  ure2 $\Delta$*  y más del doble que la cepa silvestre. Además en presencia prolina el tiempo de duplicación de la cepa transformada es semejante al de la cepa doble mutante. Estos datos indican que la pareja de quimeras VC-L-Gln3/Ure2-L-VN\* no logran complementar la función de Gln3 silvestre.

Por otra parte, la pareja Ure2-L-VN/Gln3-L-VC tuvo un tiempo de duplicación 0.5 veces más alto que el de la cepa silvestre BG14 y estadísticamente distinta al tiempo de duplicación de la mutante doble *gln3 $\Delta$  ure2 $\Delta$*  en amonio. En presencia de prolina, el tiempo de duplicación fue 25% más bajo que el observado en la cepa *gln3 $\Delta$  ure2 $\Delta$*  pero presenta un 40% más de tiempo de duplicación que la cepa silvestre BG14. Este resultado indica que la pareja Gln3-L-VC/Ure2-L-VN complementa de mejor manera a la mutante *gln3 $\Delta$  ure2 $\Delta$*  mostrando un fenotipo cercano a la cepa silvestre BG14.

Se llevó a cabo el análisis de la expresión del gen *GAP1* de *C. glabrata* en las dos cepas que expresan un par que quimeras para evaluar la función de las proteínas quiméricas para inducir o reprimir la expresión de *GAP1*.

**La expresión de *GAP1* en las cepas que codifican para las quimeras de Gln3 y Ure2, unidas a las fracciones de Venus, solo se asemeja a la expresión en la cepa parental para uno de los pares de quimeras crecidas en amonio.**

Para evaluar si las quimeras de Gln3 y Ure2 con la fracciones VN o VC son funcionales para inducir o reprimir la expresión de *GAP1* (gen sensible a NCR) se llevó a cabo el análisis de la expresión por qRT-PCR, con base a lo reportado por Pérez-delosSantos, F.J. & Riego-Ruiz, L. (2016).

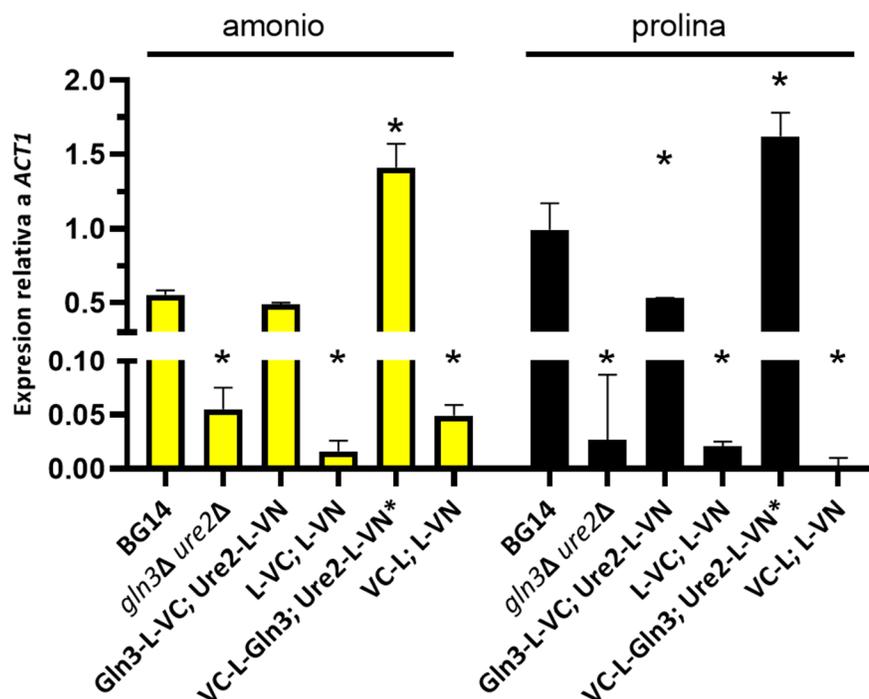
De acuerdo a sus observaciones, la expresión del ortólogo de *GAP1* en *C. glabrata* depende de la actividad de Gln3; es decir, que su ausencia debe abrogar la expresión de *GAP1* en presencia de prolina mientras que la ausencia de Ure2 en amonio debe aumentar la expresión de *GAP1*.

Si la quimera de Gln3 con la fracción VC de Venus, complementa la función de Gln3 silvestre en una cepa mutante (*gln3 $\Delta$*  o *gln3 $\Delta$  ure2 $\Delta$* ) la expresión de *GAP1* debería ser similar a la observada en la cepa silvestre BG14.

Para este análisis de la expresión de *GAP1* en *C. glabrata*, se extrajo el RNA de cultivos de cada cepa en fase exponencial de crecimiento (OD<sub>600nm</sub> entre 0.6 y 0.8) y se obtuvo el cDNA correspondiente a cada cepa (Ver Materiales y métodos). Se empleó el gen *ACT1* (ortólogo en *C. glabrata* del gen de actina de *S. cerevisiae*) para normalizar la

expresión de *GAP1* y se utilizaron los oligonucleótidos para qRT-PCR descritos en la Tabla 5.

El análisis de la expresión de *GAP1* se llevó a cabo en la cepa silvestre BG14, la cepa mutante doble *gln3Δ ure2Δ*, las cepas transformadas con los plásmidos base vacíos y en las cepas transformadas con los plásmidos que codifican para las quimeras de Ure2 y Gln3 (ver Tabla 4).



**Figura 10. Expresión de *GAP1* de *C. glabrata* en cepas transformadas derivadas de *gln3Δ ure2Δ*.**

Expresión del gen *GAP1* en la cepa silvestre (BG14), la mutante doble *gln3Δ ure2Δ* y las cepas transformadas derivadas de *gln3Δ ure2Δ* que codifican para las quimeras Gln3-L-VC/ Ure2-L-VN (DV26), VC-L-Gln3/Ure2-L-VN (DV60), L-VC; L-VN (DV44) y VC-L; L-VN (DV45) crecidas en medio mínimo con amonio (barras amarillo) y prolina (barras negras) como fuentes de nitrógeno. Los niveles relativos de expresión se cuantificaron por qRT-PCR y se normalizaron con la expresión del gen *ACT1* como control. Los valores obtenidos son el promedio de triplicados biológicos con triplicado técnico del cDNA de cada cepa, obtenido a partir del RNA extraído durante la fase media exponencial.

\*Expresión génica de *GAP1* estadísticamente diferente con respecto a la cepa silvestre BG14, obtenido por t de student con  $p < 0.05$ .

En presencia de amonio, se observó que la expresión de *GAP1* en la cepa que expresa las quimeras VC-L-Gln3/Ure2-L-VN\* es casi tres veces más que la expresión de *GAP1* en la cepa silvestre BG14. En cambio, la expresión de *GAP1* en la cepa transformada con el par Gln3-L-VC/Ure2-L-VN fue similar en comparación con la cepa silvestre. Como

se esperaba, la expresión de este gen fue mínima en la cepa doble mutante y en las cepas control que expresan las fracciones de Venus L-VN/L-VC y L-VN/VC-L.

En presencia de prolina como única fuente de nitrógeno, la expresión de *GAP1* de la pareja VC-L-Gln3/Ure2-L-VN\* fue 0.6 veces mayor que la expresión en la cepa silvestre, mientras que en la cepa que expresa las quimeras Gln3-L-VC/Ure2-L-VN, la expresión de *GAP1* fue de apenas la mitad que la observada en BG14. Estos datos indican que las quimeras Gln3-L-VC/Ure2-L-VN asemejan el comportamiento de las proteínas silvestres solo en medios represivos.

Con estos resultados observamos que la influencia de las fracciones de VN y VC sobre Gln3 y Ure2 varía dependiendo de la posición de la fracción. La presencia de las fracciones de Venus en extremos opuestos parece permitir el funcionamiento de Gln3 y Ure2 de forma más similar a las proteínas silvestres que las quimeras con la fracción de Venus en los extremos carboxilo.

**Las proteínas quiméricas de *GLN3* y *URE2* forman un complejo ya que son capaces de generar fluorescencia cuando los fragmentos de Venus se encuentran en extremos terminales diferentes en cada proteína quimérica.**

Para el experimento de BiFC se emplearon las cepas que expresan las parejas de plásmidos que codifican para las quimeras Gln3-L-VC/Ure2-L-VN (DV26) y VC-L-Gln3/Ure2-L-VN (DV60) crecidas en medios con o sin sulfato de cobre para inducir a el promotor  $P_{MT1}$ , el cual permite la sobreexpresión de las quimeras de Ure2 y Gln3 (Materiales y métodos, Figura 5).

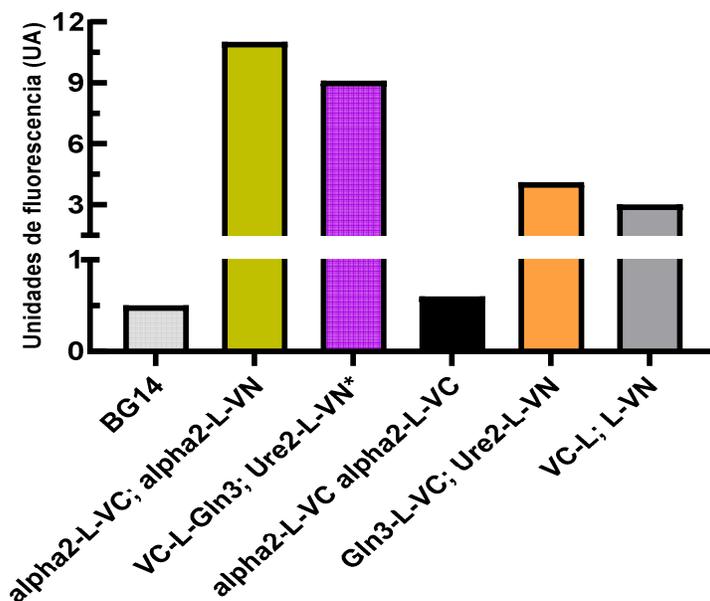
Medimos la fluorescencia de las células en un equipo FACS que permite la emisión y la cuantificación de fluorescencia por célula.

Como controles positivos y negativos de fluorescencia, debida a la complementación de las fracciones de Venus, dependiente de la interacción entre dos proteínas se emplearon cepas de la colección del laboratorio de la Dra. Irene Castaño (ver Tabla 4, cepas CGM) y que nos fueron generosamente proporcionadas para contar con controles positivos para BiFC y que ya han sido reportados previamente (Keleher, C.A., Goutte, C. & Johnson, A.D., 1988; Robledo Márquez, K., 2016).

Como control positivo de fluorescencia se empleó una cepa que expresa la pareja de proteínas quiméricas alpha2-L-VN/alpha2-L-VC (derivadas de la proteína alpha2 de *S. cerevisiae* unida a las fracciones VC y VN de Venus). Como control negativo de fluorescencia se empleó una cepa transformada con la pareja de quimeras alpha2-L-VC/alpha2-L-VC.

Se observó que la cepa que expresa la pareja de quimeras VC-L-Gln3 y Ure2-L-VN (DV60) emite una cantidad de fluorescencia similar a la del control positivo de interacción (alpha2-L-VC; alpha2-L-VN) cuya emisión de fluorescencia ya está reportada (Robledo Márquez, K., 2016). Mientras tanto, los controles negativos (alpha2-LVC; alpha2-L-VC y

VC-L; L-VN) y el par quimérico Gln3-L-VC; Ure2-L-VN (DV26) emiten menos fluorescencia y esto se puede deber a un cierto número de interacciones entre las quimeras o las fracciones de Venus, presentes en las células pero no en números suficientes para representar el promedio de la población (Ver Figura 11).



**Figura 11. Fluorescencia relativa de las cepas que expresan las quimeras de Gln3 y Ure2 bajo un promotor inducible *MT1*.**

Las cepas empleadas son la cepa silvestre BG14 (barra gris), las cepas transformadas con plásmidos que codifican para quimeras de alpha2 de *S. cerevisiae* unida a VC y VN, alpha2-L-VC/alpha2-L-VN (CGM2926, barra ocre) y alpha2-L-VC/alpha2-L-VN (CGM3012, barra negra) como controles positivos y negativos de fluorescencia debida a interacción proteína-proteína respectivamente, las cepas que codifican para las quimeras de Gln3 y Ure2, Gln3-L-VC/Ure2-L-VN (DV26, barra naranja) y VC-L-Gln3/Ure2-L-VN\* (DV60, barra morada) y la cepa transformada con los plásmidos vacíos L-VN/VC-L (DV45, barra gris oscuro).

Todos los genes se expresan a partir del promotor de *MT1*, inducible por CuSO<sub>4</sub>.

Los datos de la gráfica representan el valor de la media geométrica de cada una de las cepas crecidas en medio mínimo con amonio y casaminoácidos con CuSO<sub>4</sub> (medio ON) después de restar el valor de la media geométrica de cada cepa crecida en medio mínimo con amonio y casaminoácidos, sin CuSO<sub>4</sub> (medio OFF) para eliminar el efecto de la fluorescencia de fondo de la cepa. Todos los resultados provienen de la lectura de 10,000 eventos por cada cepa.

Todas las cepas se crecieron en medio mínimo con amonio y casaminoácidos adicionado con CuSO<sub>4</sub> a una concentración final de 2mM (medio ON) y se midieron los valores de fluorescencia de las cepas en medios OFF y ON a las 2, 3, 4 y 5 h del inicio del experimento.

La barra en la gráfica representa la emisión de fluorescencia 5 horas después del inicio del experimento para tomar en cuenta la salida de las cepas que expresan las quimeras de fase lag.

## 4. Discusión

La formación de un complejo Gln3-Ure2 está reportado en *S. cerevisiae* (Cooper, T.G., 1982; Magasanik, B. & Kaiser, C.A., 2002; Bertram, P.G. *et al.*, 2000) y nuestro estudio constituye el primero en presentar evidencia de la formación de un complejo entre los ortólogos de estas dos proteínas en *C. glabrata*.

En este trabajo utilizamos los genes ortólogos de *GLN3* y *URE2* de *S. cerevisiae* en *C. glabrata*, en combinación con plásmidos que codifican un fragmento de la proteína fluorescente Venus, bajo un promotor inducible por sulfato de cobre para sobreexpresar los genes en estudio (Vidal Aguiar Y., 2016; Robledo Márquez K., 2016). El objetivo fue generar quimeras entre las proteínas Gln3 y Ure2 y las fracciones de Venus para evaluar si existía una interacción proteína-proteína entre Gln3 y Ure2 de *C. glabrata* de manera que las fracciones de Venus puedan acercarse lo suficiente para replegarse y reconstituir la proteína completa que es capaz de fluorescer (Kodama, Y., & Hu, C.D., 2012; Sung, M.K. & Huh, W.K., 2007; Miller, K.E. *et al.*, 2015; Hu, C.D., Chinenov, Y. and Kerppola, T.K., 2002).

Generamos diversos plásmidos para BiFC, que codifican para proteínas quiméricas de Gln3 y Ure2 con las fracciones de Venus ancladas a diferentes extremos de cada uno, de manera que pudiéramos tomar en cuenta el efecto de la fracción de Venus en la función de Gln3 y Ure2. Este enfoque fue debido a que en *S. cerevisiae*, la interacción entre Gln3 y Ure2 para formar el complejo Gln3-Ure2 es susceptible a impedimento estérico así como a alteraciones en la secuencia de la proteína. Por lo tanto generamos diferentes combinaciones de proteínas quiméricas para tomar en cuenta esta limitante (Bertram, P.G. *et al.*, 2000; Beck, T. & Hall M., 1999; Förg, T. *et al.*, 2010).

El análisis del fenotipo de crecimiento de las cepas transformadas con los plásmidos que codifican para la quimera de Ure2, demostró que la adición del fragmento amino terminal de Venus en el extremo amino terminal de Ure2 resultaba en un crecimiento lento en comparación con la cepa mutante parental, la cepa de *C. glabrata* silvestre y las cepas transformadas con otras quimeras de Ure2 en amonio; además, presentó una incapacidad para crecer cuando prolina fue la única fuente de nitrógeno disponible. Mientras tanto, la adición de la fracción amino de Venus en el extremo carboxilo de Ure2 no presentó diferencia en el fenotipo de crecimiento con respecto a la cepa silvestre, además de que existía un claro contraste entre el crecimiento de esta cepa (Ure2-L-VN) y la cepa mutante parental (*ure2Δ*) (Ver Figura 7 y anexos Figura S2).

Se sabe que en *S. cerevisiae*, la función de Ure2 está determinada por su fracción carboxilo terminal, la cual contiene el dominio que interacciona con Gln3 (Thual, C. *et al.*, 2001) lo que, de acuerdo al porcentaje de similitud entre la secuencia de Ure2 de *C. glabrata* y *S. cerevisiae* (Pérez-delosSantos, F.J. & Riego-Ruiz, L., 2016), nos lleva a proponer que la adición del fragmento de Venus en el extremo carboxilo de Ure2 genera un efecto negativo en la función de la proteína. De acuerdo a nuestros resultados, la adición de VN en el extremo carboxilo de Ure2 no generó alteraciones en su función pero sí cuando la fracción VN se añadió al extremo amino de Ure2 (Ver Figura 7).

El extremo amino terminal de Ure2, se caracteriza por poseer una estructura intrínsecamente desordenada (Oldfield, C.J. & Dunker, A.K., 2014; Thual, C. *et al.*, 2001), forma fibrillas amiloideas y es propensa a la formación de priones, por causas aún no del todo claras, los cuales generan cúmulos no funcionales de la proteína y una disminución de la tasa de crecimiento en *S. cerevisiae* (Baxa, U. *et al.*, 2002). La adición de la fracción de Venus en el extremo amino de Ure2 podría estar relacionada con una mayor probabilidad de formar una estructura anómala de Ure2 y por lo tanto, observamos la disminución de la velocidad de crecimiento.

En las cepas transformadas con plásmidos que codifican para quimeras de Gln3, la adición del fragmento VC de Venus al extremo carboxilo de Gln3 permitió una recuperación del fenotipo de crecimiento con respecto a la cepa silvestre en amonio pero no fue capaz de recuperar el fenotipo de manera total cuando la cepa se crece en prolina. Este resultado podría estar relacionado a alteraciones que la fracción VC genere sobre la estructura de Gln3. En *S. cerevisiae*, la adecuada función de Gln3 depende de secuencias dentro de la proteína que regulan la interacción con Ure2, la exportación del factor transcripcional al núcleo dependiente de la fuente de nitrógeno disponible o la fosforilación de estas regiones (Rai, R. *et al.*, 2016; Tate, J. *et al.*, 2018). Todas estas regiones se encuentran hacia el carboxilo terminal y pudieran tener afectaciones relacionadas a la presencia de VC; sin embargo, el grado de similitud entre las secuencias de Gln3 de *C. glabrata* y *S. cerevisiae* es de poco menos del 50% y pueden existir otros factores dentro de la estructura de Gln3 de *C. glabrata* que gobiernen la regulación entre esta proteína y Ure2 en la formación del complejo (Pérez-delosSantos, F.J. & Riego-Ruiz, L., 2016).

El análisis del crecimiento de las cepas transformadas con los pares de quimeras VC-L-Gln3/Ure2-L-VN\* y Gln3-L-VN/Ure2-L-VC, mostró que solamente la cepa que expresa el par Gln3-L-VN/Ure2-L-VC presentaba un fenotipo similar a la cepa silvestre mientras que la cepa que expresa VC-L-Gln3/Ure2-L-VN\* presentaba un fenotipo más cercano a su parental *gln3Δ ure2Δ* en amonio. En prolina como fuente de nitrógeno ninguna de las

cepas transformadas se asemejó a la cepa silvestre, lo que indica que en un medio no represivo las quimeras complementaban parcialmente la función de Gln3 y Ure2.

En prolina, la restauración de Venus podría traer consigo un problema. La unión entre los fragmentos de Venus permite el repliegamiento de la proteína, su maduración y la emisión de fluorescencia y por consiguiente, la regeneración de Venus puede dificultar la separación del complejo entre Ure2 y Gln3 (Xing, S. *et al.*, 2016; Berendzen, K.W. *et al.*, 2012). Así que la dificultad de las quimeras para restaurar los fenotipos en medios con prolina, podría deberse a la incapacidad de liberar a Gln3 del complejo Gln3-Ure2. Este fenómeno no se presenta en los análisis de las cepas individuales ya que en esas cepas se presenta la interacción entre una quimera y una proteína silvestre.

El análisis, por qRT-PCR, de la función de los pares de quimeras de Ure2 y Gln3 para inducir o reprimir la expresión de *GAP1*, cuya expresión es dependiente de la función de Gln3 (Pérez-delosSantos, F.J. & Riego-Ruiz, L., 2016), de acuerdo a la fuente de nitrógeno disponible, mostró que la cepa que expresa las proteínas quiméricas Ure2-L-VN/Gln3-L-VC presentaba la misma expresión de *GAP1* que la cepa silvestre en amonio. Sin embargo, en medios con prolina no se observaron cambios en la expresión de *GAP1* con respecto a la cepa BG14. Este resultado fue diferente a lo que esperábamos, ya que la proteína Gln3 silvestre aumenta la expresión de *GAP1* en medios con prolina y esto no se observó con la quimera Gln3-L-VC (Ver Figura 10).

Existen dos posibilidades a considerar, el complejo Ure2-Gln3 no se separó con el cambio en las fuentes de nitrógeno, o bien sí se separó el complejo pero Gln3 no es capaz de entrar al núcleo o unirse adecuadamente a los promotores de los genes NCR sensibles. En ambos casos la adición de la fracción VC de Venus podría estar involucrada en la falta de funcionalidad de Gln3, sin que esto tenga efectos negativos sobre el fenotipo de crecimiento de *C. glabrata* como se evidenció en los estudios de curva de crecimiento. Cabe destacar que la red completa de regulación de Gln3 en *C. glabrata* no se conoce; sin embargo, al tomar en cuenta que la expresión de *GAP1* de *C. glabrata* es casi completamente dependiente de Gln3 con un leve efecto de Gat1 (Pérez-delosSantos, F.J. & Riego-Ruiz, L., 2016) y que la expresión no cambió con la fuente de nitrógeno se puede suponer que la expresión presente del gen es debida a Gln3 que entra basalmente al núcleo aún en el medio con amonio.

Por otra parte, las cepas que expresan a las quimeras VC-L-Gln3/Ure2-L-VN\* presentaron una ligera diferencia en la expresión de *GAP1* entre amonio y prolina como se esperaba; sin embargo, en ambos medios, la expresión de *GAP1* fue mayor en comparación con BG14. Lo que podemos suponer con este resultado es que el fragmento VC añadido en el extremo amino de Gln3 no genera el o los impedimentos

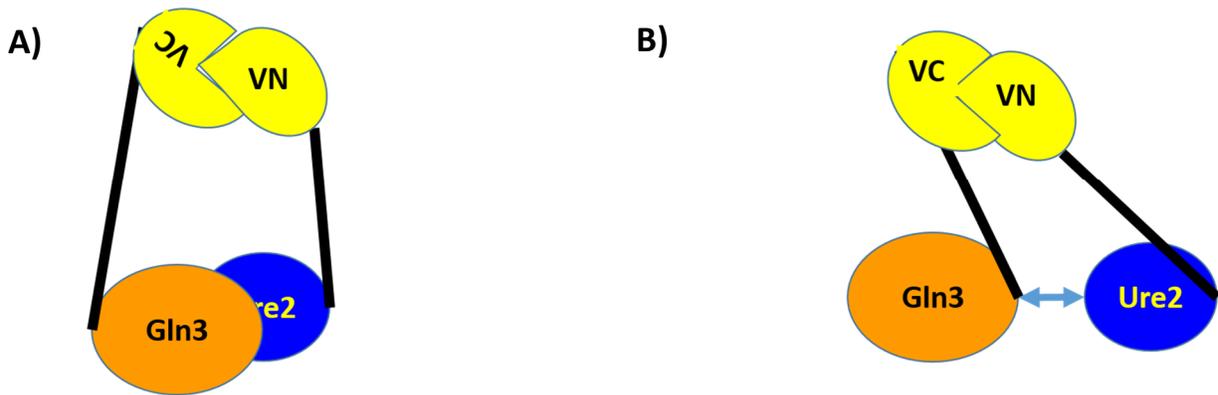
que se presentan para la entrada de Gln3 al núcleo que se observan con la quimera Gln3-L-VN.

Cualesquiera que sean las razones concretas detrás del comportamiento de la expresión de *GAP1* en las cepas transformadas que expresan las proteínas quiméricas para BiFC no se puede negar la función de las quimeras de Gln3, ya que ambas quimeras lograron expresar *GAP1* en mayor cantidad que la cepa mutante parental aún cuando la funcionalidad de las quimeras no se asemeja a la cepa silvestre.

Con respecto a los resultados de BiFC, el par quimérico conformado por Ure2-L-VN/Gln3-L-VC registró apenas un cuarto de la fluorescencia del control positivo de fluorescencia (alpha2-L-VN/alpha2-L-VC). En *S. cerevisiae* la unión entre Gln3 y Ure2 se lleva a cabo entre las secuencias presentes hacia el extremo carboxilo terminal de Ure2 y Gln3 (Pérez-delosSantos, F.J. & Riego-Ruiz, L., 2016; Tate, J. *et al.*, 2018; Rai, R. *et al.*, 2016). Por lo tanto, la presencia de las fracciones de Venus pudo dificultar la formación del complejo por impedimento estérico, lo que explicaría la menor proporción de células capaces de regenerar fluorescencia por interacción entre Gln3 y Ure2 que permitiera la emisión de fluorescencia de Venus.

Sin embargo, el par de quimeras VC-L-Gln3/Ure2-L-VN\* fue capaz de generar fluorescencia de manera similar a la fluorescencia reportada para las quimeras alpha2-L-VN/alpha2-L-VC. Este resultado fue sorprendente ya que la cepa que expresa este par de quimeras no presentó un fenotipo de crecimiento diferente al de la cepa doble mutante parental pero si se observó un aumento en la expresión de *GAP1* entre el crecimiento de la cepa en amonio contra el crecimiento en prolina.

Al tomar en cuenta que la estructura de Ure2-L-VN y Ure2-L-VN\* es la misma (el único cambio es el plásmido base a partir del que se codifica), se observó que las quimeras VC-L-Gln3 y Ure2-L-VN\* interactúan mejor que cuando la quimera de Ure2-L-VN se coexpresa con la quimera Gln3-L-VC. A partir de este resultado, podemos suponer que los puntos críticos para la interacción entre Gln3 y Ure2 de *C. glabrata* son, el extremo amino de Ure2 (evidenciado por los efectos en el crecimiento de la quimera VN-L-Ure2) y el extremo carboxilo de Gln3 (debido a la generación de fluorescencia por la quimera VC-L-Gln3, la cual no se observó cuando la quimera tenía el fragmento VC en el extremo carboxilo de Gln3) (Ver Figura 12).



**Figura 12. Esquema simplificado de la interacción entre las quimeras de Ure2 y Gln3 en *C. glabrata*.**

En condiciones de suficiencia de nitrógeno (medios con fuentes represivas de nitrógeno) las quimeras conformadas por Gln3 de *C. glabrata* unida a la fracción VC de Venus y Ure2 unida a la fracción VN de Venus interactúan dependiendo de la ubicación en que la fracción se fusiona a la proteína de estudio.

A) Cuando la fracción de VC se fusiona a Gln3 en el extremo amino, la interacción con Ure2 se lleva a cabo, lo que permite detectar altos números de células fluorescentes por citometría.

B) Cuando VC se encuentra en el extremo carboxilo de Gln3 ocurre algún evento que limita la interacción entre las proteínas, lo que se evidenció por un bajo número de células capaces de regenerar la fluorescencia de Venus.

Nuestros resultados de BiFC presentan evidencia a favor de la presencia de una interacción proteína-proteína entre Gln3 y Ure2 de *C. glabrata* en un medio suplementado con amonio como fuente de nitrógeno, de manera similar a lo observado en *S. cerevisiae*. Sin embargo, es necesario corroborar este resultado por medio de una técnica alternativa que permita verificar la formación del complejo entre Gln3 y Ure2. Una opción podría ser mediante Co-IP, donde etiquetemos Gln3 y Ure2 con etiquetas de Myc y Flag, por ejemplo, y comprobemos que sea posible obtener precipitados del complejo luego del tratamiento con anticuerpos contra MYC y FLAG en sucesión (Xing, S. *et al.*, 2016).

## 5. Conclusiones

Las quimeras de Ure2 y Gln3 con los fragmentos amino y carboxilo de Venus respectivamente, complementan el fenotipo de la cepa silvestre solo cuando las cepas se crecen con amonio como única fuente de nitrógeno. Las quimeras son incapaces de complementar el fenotipo de crecimiento cuando prolina es la única fuente de nitrógeno posiblemente por la alteración de los extremos carboxilo de Gln3.

La expresión del gen *GAP1* no presenta cambios entre fuentes represivas y no represivas de nitrógeno cuando la quimera de Gln3 tiene la fracción carboxilo de Venus en el extremo carboxilo del gen pero sí cuando la etiqueta se encuentra en el extremo amino. Esto indica que la fracción carboxilo de Gln3 es indispensable para el correcto funcionamiento de Gln3 de *C. glabrata* en prolina.

En medios con amonio y CAA, Gln3 y Ure2 de *C. glabrata* interactúan para formar un complejo que es capaz de regenerar la fluorescencia de Venus.

Con base a los efectos en el crecimiento de la cepa, la expresión de genes NCR dependientes y la presencia de interacción proteína-proteína entre Gln3 y Ure2 observados durante el estudio proponemos que elementos reguladores responsables para la interacción, liberación y exportación de Gln3 al núcleo, se encuentren hacia el extremo carboxilo de Gln3 de *C. glabrata*.

## 6. Referencias

- Ahmad, K.M., Kokošar, J., Guo, X., Gu, Z., Ishchuk, O.P. and Piškur, J., 2014. 'Genome structure and dynamics of the yeast pathogen *Candida glabrata*'. *FEMS Yeast Research*, 14(4), pp.529-535.
- Airoidi, E.M., Miller, D., Athanasiadou, R., Brandt, N., Abdul-Rahman, F., Neymotin, B., Hashimoto, T., Bahmani, T. and Gresham, D., 2016. 'Steady-state and dynamic gene expression programs in *Saccharomyces cerevisiae* in response to variation in environmental nitrogen'. *Molecular Biology of the Cell*, 27(8), pp.1383-1396.
- Baxa, U., Speransky, V., Steven, A.C. and Wickner, R.B., 2002. 'Mechanism of inactivation on prion conversion of the *Saccharomyces cerevisiae* Ure2 protein'. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 99(8), pp.5253-5260.
- Beck, T. and Hall, M.N., 1999. 'The TOR signalling pathway controls nuclear localization of nutrient-regulated transcription factors'. *Nature*, 402(6762), pp.689-692.
- Berendzen, K.W., Böhmer, M., Wallmeroth, N., Peter, S., Vesić, M., Zhou, Y., Tiesler, F.K., Schleifenbaum, F. and Harter, K., 2012. 'Screening for in planta protein-protein interactions combining bimolecular fluorescence complementation with flow cytometry'. *Plant Methods*, 8(1), p.25.
- Bertram, P.G., Choi, J.H., Carvalho, J., Ai, W., Zeng, C., Chan, T.F. and Zheng, X.S., 2000. 'Tripartite regulation of Gln3p by TOR, Ure2p, and phosphatases'. *Journal of Biological Chemistry*, 275(46), pp.35727-35733.
- Blinder, D., Coschigano, P.W. and Magasanik, B., 1996. 'Interaction of the GATA factor Gln3p with the nitrogen regulator Ure2p in *Saccharomyces cerevisiae*'. *Journal of Bacteriology*, 178(15), pp.4734-4736.
- Brunke, S., Seider, K., Richter, M.E., Bremer-Streck, S., Ramachandra, S., Kiehntopf, M., Brock, M. and Hube, B., 2014. 'Histidine degradation via an aminotransferase increases the nutritional flexibility of *Candida glabrata*'. *Eukaryotic Cell*, 13(6), pp.758-765.
- Carvalho, J. and Zheng, X.S., 2003. 'Domains of Gln3p interacting with karyopherins, Ure2p, and the target of rapamycin protein'. *Journal of Biological Chemistry*, 278(19), pp.16878-16886.
- Castaño, I., Kaur, R., Pan, S., Cregg, R., De Las Peñas, A., Guo, N., Biery, M.C., Craig, N.L. and Cormack, B.P., 2003. 'Tn7-based genome-wide random insertional mutagenesis of *Candida glabrata*'. *Genome Research*, 13(5), pp.905-915.

Coffman, J., Rai, R., Loprete, D., Cunningham, T., Svetlov, V. and Cooper, T. (1997). 'Cross regulation of four GATA factors that control nitrogen catabolic gene expression in *Saccharomyces cerevisiae*'. *Journal of Bacteriology*, 179(11), pp.3416-3429.

Cooper, T.G., 1982. 'Nitrogen metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*'. *The Molecular Biology of the Yeast Saccharomyces: Metabolism and Gene Expression*, 2, pp.39-99.

Cormack, B.P., Ghori, N. and Falkow, S., 1999. 'An adhesin of the yeast pathogen *Candida glabrata* mediating adherence to human epithelial cells'. *Science*, 285(5427), pp.578-582.

Courchesne, W.E. and Magasanik, B., 1988. 'Regulation of nitrogen assimilation in *Saccharomyces cerevisiae*: roles of the *URE2* and *GLN3* genes'. *Journal of Bacteriology*, 170(2), pp.708-713.

*csbprotocols.cshlp.org*. 2016. *Lb Liquid Medium*. [online] Available at: <<http://csbprotocols.cshlp.org/content/2016/9/pdb.rec090928.full?sid=0c06a25e-ccc9-4ecc-9d1e-1a982f11f06f>> [Accessed 2 April 2020].

*csbprotocols.cshlp.org*/. 2018. *SOC Medium*. [online] Available at: <<http://csbprotocols.cshlp.org/content/2018/3/pdb.rec098863.short?cited-by=yes&legid=protocols;2018/3/pdb.rec098863#cited-by>> [Accessed 2 April 2020].

Descorps-Declère, S., Saguez, C., Cournac, A., Marbouty, M., Rolland, T., Ma, L., Bouchier, C., Moszer, I., Dujon, B., Koszul, R. and Richard, G.F., 2015. 'Genome-wide replication landscape of *Candida glabrata*'. *BMC Biology*, 13(1), p.69.

Dower, W.J., Miller, J.F. and Ragsdale, C.W., 1988. 'High efficiency transformation of *E. coli* by high voltage electroporation', *Nucleic Acids Research*, 16(13), pp.6127-6145.

Eide, D.J., Clark, S., Nair, T.M., Gehl, M., Gribskov, M., Guerinot, M.L. and Harper, J.F., 2005. 'Characterization of the yeast ionome: a genome-wide analysis of nutrient mineral and trace element homeostasis in *Saccharomyces cerevisiae*'. *Genome Biology*, 6(9), p.R77.

Fredriksson, S. and Bülow, L., 2001. *Encyclopedia of Genetics*. 1st ed. Lund: Academic Press, pp.333-334.

Förg, T., Ponce, L., Tomsche, A., Holloschi, A., Lux, A. and Hafner, M., 2010. 'Bimolecular fluorescence complementation (BiFC): Investigation of composition and cellular localization of homo- and heterodimeric transmembrane receptors and intracellular signalling pathways'. *Microscopy: Science, Technology, Application and Education*, pp.737-746.

- Georis, I., Feller, A., Vierendeels, F. and Dubois, E., 2009. 'The yeast GATA factor Gat1 occupies a central position in nitrogen catabolite repression-sensitive gene activation', *Molecular and Cellular Biology*, 29(13), pp.3803-3815.
- Hensel, M., Arst Jr, H.N., Aufauvre-Brown, A. and Holden, D.W., 1998. 'The role of the *Aspergillus fumigatus* areA gene in invasive pulmonary aspergillosis'. *Molecular and General Genetics MGG*, 258(5), pp.553-557.
- Hu, C.D., Chinenov, Y. and Kerppola, T.K., 2002. 'Visualization of interactions among bZIP and Rel family proteins in living cells using bimolecular fluorescence complementation'. *Molecular Cell*, 9(4), pp.789-798.
- Keleher, C.A., Goutte, C. and Johnson, A.D., 1988. 'The yeast cell-type-specific repressor  $\alpha 2$  acts cooperatively with a non-cell-type-specific protein'. *Cell*, 53(6), pp.927-936.
- Ko, L.J. and Engel, J.D., 1993. 'DNA-binding specificities of the GATA transcription factor family'. *Molecular and Cellular Biology*, 13(7), pp.4011-4022.
- Kodama, Y. and Hu, C.D., 2012. 'Bimolecular fluorescence complementation (BiFC): a 5-year update and future perspectives'. *Biotechniques*, 53(5), pp.285-298.
- Lee, I.R., Morrow, C.A. and Fraser, J.A., 2013. 'Nitrogen regulation of virulence in clinically prevalent fungal pathogens'. *FEMS Microbiology Letters*, 345(2), pp.77-84.
- Liao, W.L., Ramón, A.M. and Fonzi, W.A., 2008. '*GLN3* encodes a global regulator of nitrogen metabolism and virulence of *C. albicans*', *Fungal Genetics and Biology*, 45(4), pp.514-526.
- Ljungdahl, P.O. and Daignan-Fornier, B., 2012. 'Regulation of amino acid, nucleotide, and phosphate metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*'. *Genetics*, 190(3), pp.885-929.
- Magasanik, B. and Kaiser, C.A., 2002. 'Nitrogen regulation in *Saccharomyces cerevisiae*'. *Gene*, 290(1-2), pp.1-18.
- Magasanik, B., 2003. 'Ammonia assimilation by *Saccharomyces cerevisiae*'. *Eukaryotic Cell*, 2(5), pp.827-829.
- Mascorro-Gallardo, J.O., Covarrubias, A.A. and Gaxiola, R., 1996. 'Construction of a *CUP1* promoter-based vector to modulate gene expression in *Saccharomyces cerevisiae*'. *Gene*, 172(1), pp.169-170.
- Miller, K.E., Kim, Y., Huh, W.K. and Park, H.O., 2015. 'Bimolecular fluorescence complementation (BiFC) analysis: advances and recent applications for genome-wide interaction studies'. *Journal of Molecular Biology*, 427(11), pp.2039-2055.

- Monahan, B.J., Askin, M.C., Hynes, M.J. and Davis, M.A., 2006. 'Differential expression of *Aspergillus nidulans* ammonium permease genes is regulated by GATA transcription factor AreA'. *Eukaryotic Cell*, 5(2), pp.226-237.
- Muller, H., Hennequin, C., Gallaud, J., Dujon, B. and Fairhead, C., 2008. 'The asexual yeast *Candida glabrata* maintains distinct a and  $\alpha$  haploid mating types'. *Eukaryotic Cell*, 7(5), pp.848-858.
- Murakami, C.J., Burtner, C.R., Kennedy, B.K. and Kaerberlein, M., 2008. 'A method for high-throughput quantitative analysis of yeast chronological life span'. *The Journals of Gerontology Series A: Biological Sciences and Medical Sciences*, 63(2), pp.113-121.
- Nagai, T., Iyata, K., Park, E.S., Kubota, M., Mikoshiba, K. and Miyawaki, A., 2002. 'A variant of yellow fluorescent protein with fast and efficient maturation for cell-biological applications'. *Nature Biotechnology*, 20(1), pp.87-90.
- Ngamskulrungrroj, P., Chang, Y., Hansen, B., Bugge, C., Fischer, E. and Kwon-Chung, K.J., 2012. '*Cryptococcus neoformans* Yop1, an endoplasmic reticulum curvature-stabilizing protein, participates with Sey1 in influencing fluconazole-induced disomy formation'. *FEMS Yeast Research*, 12(7), pp.748-754.
- Oldfield, C.J. and Dunker, A.K., 2014. 'Intrinsically disordered proteins and intrinsically disordered protein regions'. *Annual Review of Biochemistry*, 83, pp.553-584.
- Pérez-Delos Santos, F. J. and Riego-Ruiz, L., 2016. 'Gln3 is a main regulator of nitrogen assimilation in *Candida glabrata*', *Microbiology (United Kingdom)*, 162(8), pp. 1490–1499.
- Rai, R., Tate, J.J. and Cooper, T.G., 2016. 'Multiple targets on the Gln3 transcription activator are cumulatively required for control of its cytoplasmic sequestration'. *G3: Genes, Genomes, Genetics*, 6(5), pp.1391-1408.
- Ries, L.N.A., Beattie, S., Cramer, R.A. and Goldman, G.H., 2018. 'Overview of carbon and nitrogen catabolite metabolism in the virulence of human pathogenic fungi'. *Molecular Microbiology*, 107(3), pp.277-297.
- Robledo Márquez, K., 2016, '*Candida glabrata* contiene una variante más larga del gen de apareamiento Cgalfa2 en el locus *MTL3* el cual puede formar homodímeros', Tesis doctoral, Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica (IPICYT), San Luis Potosí, pp. 65-83.
- Rutherford, J.C., Lin, X., Nielsen, K. and Heitman, J., 2008. 'Amt2 permease is required to induce ammonium-responsive invasive growth and mating in *Cryptococcus neoformans*'. *Eukaryotic Cell*, 7(2), pp.237-246.

Sambrook, J., Fritsch, E.F. and Maniatis, T., 1989. *Molecular Cloning: a Laboratory Manual* (No. Ed. 2). Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Schmitt, M.E., Brown, T.A. and Trumppower, B.L., 1990. 'A rapid and simple method for preparation of RNA from *Saccharomyces cerevisiae*'. *Nucleic Acids Research*, 18(10), p.3091.

Sung, M.K. and Huh, W.K., 2007. 'Bimolecular fluorescence complementation analysis system for in vivo detection of protein–protein interaction in *Saccharomyces cerevisiae*'. *Yeast*, 24(9), pp.767-775.

Tate, J.J. and Cooper, T.G., 2013. 'Five conditions commonly used to down-regulate tor complex 1 generate different physiological situations exhibiting distinct requirements and outcomes'. *Journal of Biological Chemistry*, 288(38), pp.27243-27262.

Tate, J.J., Rai, R. and Cooper, T.G., 2018. 'More than one way in: three Gln3 sequences required to relieve negative Ure2 regulation and support nuclear Gln3 import in *Saccharomyces cerevisiae*'. *Genetics*, 208(1), pp.207-227.

Taylor, R.G., Walker, D.C. and McInnes, R.R., 1993. '*E. coli* host strains significantly affect the quality of small scale plasmid DNA preparations used for sequencing'. *Nucleic Acids Research*, 21(7), p.1677.

ter Schure, E.G., van Riel, N.A. and Verrips, C.T., 2000. 'The role of ammonia metabolism in nitrogen catabolite repression in *Saccharomyces cerevisiae*'. *FEMS Microbiology Reviews*, 24(1), pp.67-83.

Thual, C., Bousset, L., Komar, A.A., Walter, S., Buchner, J., Cullin, C. and Melki, R., 2001. 'Stability, folding, dimerization, and assembly properties of the yeast prion Ure2p'. *Biochemistry*, 40(6), pp.1764-1773.

VanGuilder, H.D., Vrana, K.E. and Freeman, W.M., 2008. 'Twenty-five years of quantitative PCR for gene expression analysis'. *Biotechniques*, 44(5), pp.619-626.

Vidal Aguiar, Y 2016, 'Expresión inducible de fusiones traduccionales de los genes MTL de *Candida glabrata*', Tesis de Maestría, Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica (IPICYT), San Luis Potosí, pp. 33-35.

Wong, K.H., Hynes, M.J., Todd, R.B. and Davis, M.A., 2007. 'Transcriptional control of nmrA by the bZIP transcription factor MeaB reveals a new level of nitrogen regulation in *Aspergillus nidulans*'. *Molecular Microbiology*, 66(2), pp.534-551.

Xing, S., Wallmeroth, N., Berendzen, K.W. and Grefen, C., 2016. 'Techniques for the analysis of protein-protein interactions in vivo', *Plant Physiology*, 171(2), pp.727-758.

Zhang, W., Du, G., Zhou, J. and Chen, J., 2018. 'Regulation of sensing, transportation, and catabolism of nitrogen sources in *Saccharomyces cerevisiae*'. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 82(1), pp. 1-29.

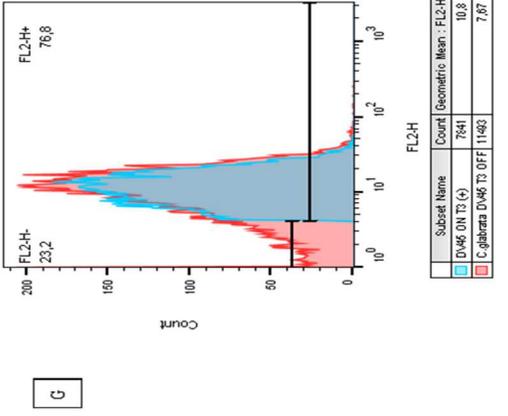
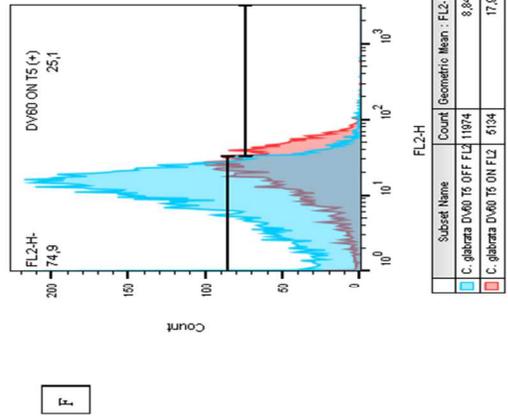
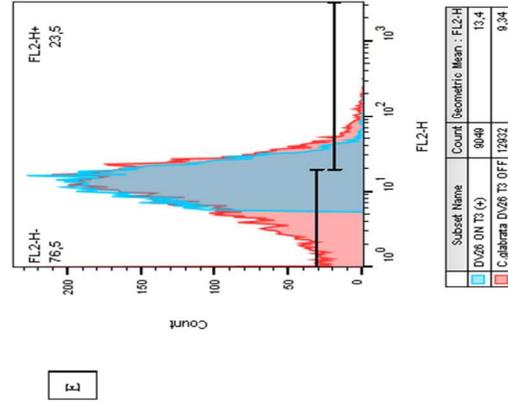
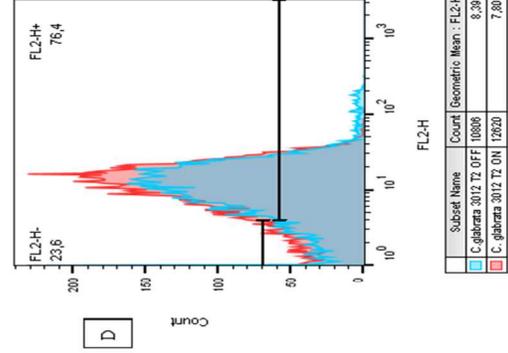
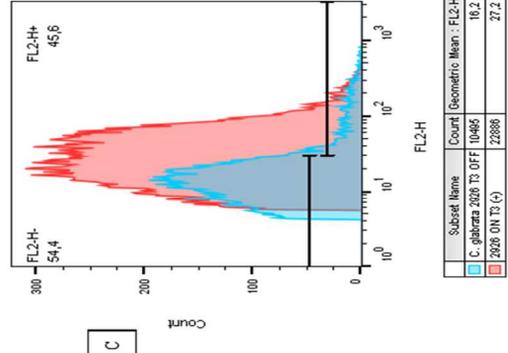
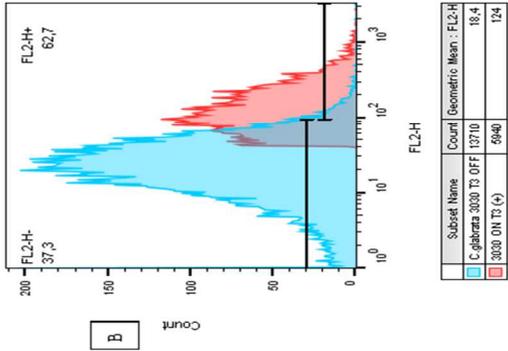
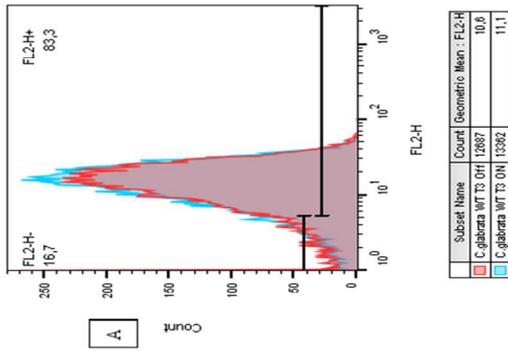
## 7. ANEXOS

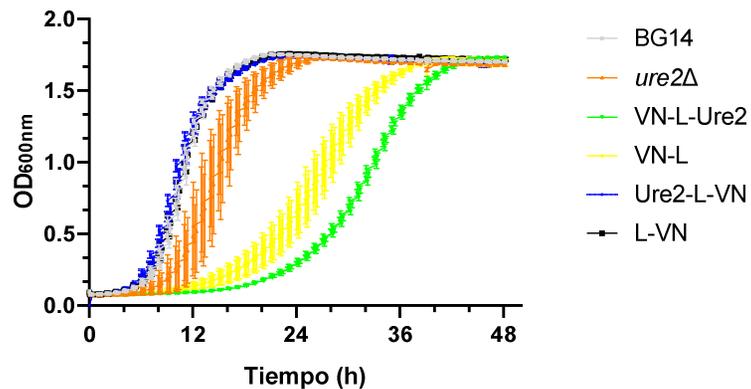
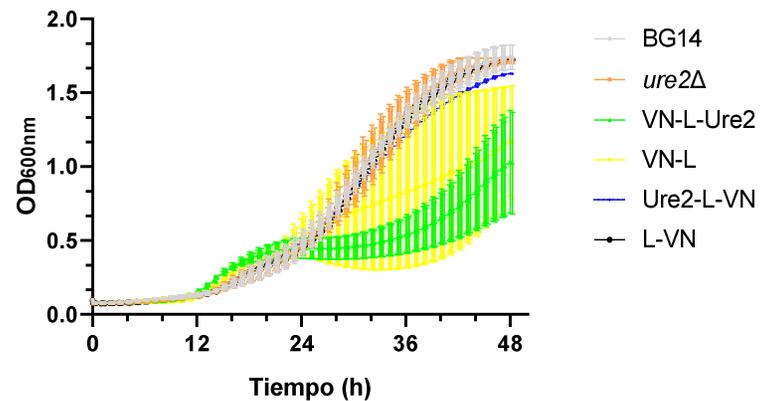
### Figura S1. Histogramas de fluorescencia de las cepas BiFC.

Histograma de fluorescencia de las cepas en estudio obtenido a las 3 y 5 horas luego de la inoculación de medios ON y OFF con la cepa correspondiente. Se presenta la media geométrica que representa la tendencia de fluorescencia de las células de cada cepa luego de diez mil eventos. Las cepas en medio OFF se presentan en azul, las cepas en medio ON se presentan en rojo.

FL2H+ representa el porcentaje de la población que presenta fluorescencia en comparación con la misma cepa en medio OFF.

- A) BG14 (WT) utilizado para ajustar la fluorescencia a 10 unidades.
- B) *C. glabrata* 3030, cepa que contiene un plásmido que codifica para la proteína amarilla fluorescente bajo un promotor inducible *MT1*.
- C) *C. glabrata* 2926, cepa que contiene un par de plásmidos que codifican las quimeras de las proteínas de apareamiento alfa2 unidas a fracciones de Venus VN y VC. (Control positivo de interacción).
- D) *C. glabrata* 3012, control negativo que contiene un par de plásmidos que codifican las quimeras de las proteínas alfa2 unidas a la fracción VC de Venus.
- E) DV26 cepa que contiene par de plásmidos que codifican para las proteínas quiméricas Gln3-L-VC y Ure2-L-VN.
- F) DV45 cepa control de las fracciones de Venus L-VN y VC-L.
- G) DV60 cepa que contiene el par de plásmidos que codifican para las proteínas quiméricas VC-L-Gln3 y Ure2-L-VN.



**A)****B)**

**Figura S2. Curvas de crecimiento de las cepas de *ure2Δ* transformadas con los plásmidos para el análisis por BiFC.**

Curva de crecimiento de la cepa de *C. glabrata* silvestre (BG14, gris), cepa mutante *ure2Δ* (naranja), cepas de *ure2Δ* que codifican para las quimeras de Ure2, Ure2-L-VN (DV13, azul), L-VN (DV23, negro), VN-L-Ure2 (DV15, verde) y VN-L (DV9, amarillo) en medio mínimo con amonio (A) o prolina (B) como única fuente de nitrógeno.

Las curvas representan la OD<sub>600nm</sub> promedio de 3 duplicados biológicos ± desviación standard.