

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

**POSGRADO EN CIENCIAS EN BIOLOGÍA MOLECULAR**

**Los factores transcripcionales  $\alpha 1$ ,  $\alpha 1$  y  $\alpha 2$  de *Candida glabrata* participan en la respuesta y adaptación al estrés**

Tesis que presenta

**Patricia Yáñez Carrillo**

Para obtener el grado de

**Maestra en Ciencias en Biología Molecular**

Director de Tesis

**Dra. Irene Castaño Navarro**

San Luis Potosí, S. L. P., Julio 2010



## Constancia de aprobación de la tesis

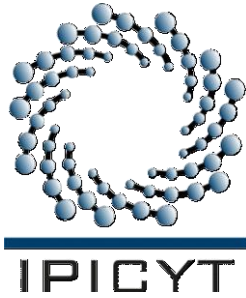
La tesis “**Los factores transcripcionales  $\alpha 1$ ,  $\alpha 1$  y  $\alpha 2$  de *Candida glabrata* participan en la respuesta y adaptación al estrés**” presentada para obtener el Grado de de Maestro(a) en Ciencias en Biología Molecular fue elaborada por **Patricia Yáñez Carrillo** y aprobada el **30 de junio de 2010** por los suscritos, designados por el Colegio de Profesores de la División de Biología Molecular del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C.

Dra. Irene Castaño Navarro  
Director de la tesis

P.A.

Dr. Rubén López Revilla  
Asesor de la tesis

Dr. Juan Francisco Jiménez Bremont  
Asesor de la tesis



## Créditos Institucionales

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

Durante la realización del trabajo la autora recibió una beca académica del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología con el número de registro: 270403.



# 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 071 del Libro Primero de Actas de Exámenes de Grado del Programa de Maestría en Ciencias en Biología Molecular esta asentado lo siguiente:

En la ciudad de San Luis Potosí a los 12 días del mes de julio del año 2010, 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. Luis Antonio Salazar Olivo</b>	<b>Presidente</b>	<b>IPICYT</b>
<b>Dra. Irene Beatriz Castaño Navarro</b>	<b>Secretaria</b>	<b>IPICYT</b>
<b>Dr. Juan Francisco Jiménez Bremont</b>	<b>Sinodal</b>	<b>IPICYT</b>

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

**MAESTRÍA EN CIENCIAS EN BIOLOGÍA MOLECULAR**

sustenta la C.

**Patricia Yáñez Carrillo**

sobre la Tesis intitulada:

*Los factores transcripcionales  $\alpha 1$ ,  $\alpha 1$  y  $\alpha 2$  de *Candida glabrata* participan en la respuesta y adaptación al estrés*

que se desarrolló bajo la dirección de

**Dra. Irene Beatriz Castaño Navarro**

El Jurado, después de deliberar, determino

**APROBARLA**

Dándose por terminado el acto a las 11:40 horas, procediendo a la firma del Acta los integrantes del Jurado. Dando fe el Secretario Académico del Instituto.

A petición de la interesada y para los fines que a la misma correspondan, se extiende el presente documento en la ciudad de San Luis Potosí, S.L.P., México, a los 12 días del mes de julio de 2010.

**Mtra. Ivonne Lizette Cuevas Vélez**  
Jefa del Departamento de Asuntos Escolares

**Dr. Marcial Bonilla Marín**  
Secretario Académico

**IPICYT**  
SECRETARIA ACADEMICA

## **DEDICATORIAS**

Dedico este trabajo a la persona que desde siempre me ha brindado su apoyo y amor incondicional. A mi compañero de vida, mi esposo el Ing. Jesús Zapata Urquieta.

A mis padres Martín y Ma. Luisa por ser más que mis padres, mis mejores amigos. Por sus valiosas enseñanzas de vida, creer siempre en mí e impulsarme a lograr mis sueños.

A mi hermano Martín porque todos los días me demuestra que nada es imposible y que la vida es hermosa por los pequeños detalles que muchas veces pasamos de largo.

## **AGRADECIMIENTOS**

Quiero agradecer a la Dra. Irene Castaño Navarro por darme la oportunidad de trabajar con ella en este proyecto. Porque con su extraordinario entusiasmo y entrega ha fomentado en mi un gran interés y amor por la ciencia.

Gracias al Dr. Alejandro de las Peñas por los valiosos comentarios y aportaciones a este trabajo.

Al Dr. Omar E. Arroyo Helguera y a la M.C. Candy Y. Ramírez Zavaleta por el apoyo técnico e importantes aportaciones para este proyecto.

A la Biol. Mireya G. Sánchez Garza por las facilidades brindadas para el desarrollo experimental de este trabajo.

Al Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica A. C. por abrirme las puertas y permitirme continuar mi formación profesional.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por la beca otorgada durante el desarrollo de este proyecto.

## ÍNDICE

	Pág.
Constancia de aprobación de tesis	ii
Créditos institucionales	iii
Acta de Examen	iv
Dedicatorias	v
Agradecimientos	vi
Lista de Tablas y Figuras	x
RESUMEN	xiv
ABSTRACT	xv
INTRODUCCIÓN	1
1. Generalidades de <i>Candida glabrata</i>	1
2. Reproducción sexual en hongos patógenos	2
2.1. <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	3
2.2. <i>Candida albicans</i>	5
3. Circuito regulatorio controlado por los factores transcripcionales codificados en los loci <i>MAT</i> y <i>MTL</i>	8
4. Configuración de los loci de apareamiento en <i>C. glabrata</i>	10
ANTECEDENTES DIRECTOS	11
1. Actividad transcripcional de los loci <i>MTL</i> en <i>C. glabrata</i>	11
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	13
HIPÓTESIS	14
ESTRATEGIA	15
OBJETIVO GENERAL	16
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	16
MATERIALES Y MÉTODOS	17
1. Cepas, plásmidos y oligonucleótidos	17

	Pág.
2. Soluciones	18
3. Medios de cultivo para <i>E. coli</i>	19
4. Medios de cultivo para <i>C. glabrata</i>	19
5. Extracción de DNA plasmídico de <i>E. coli</i>	20
6. Transformación de <i>C. glabrata</i>	21
7. Obtención de la cepa de <i>C. glabrata</i> sobreexpresante de información $\alpha$	21
8. Cepa de <i>C. glabrata</i> sobreexpresante de información $\alpha$	23
9. Extracción de DNA genómico de <i>C. glabrata</i>	24
10. Conservación de plásmidos y cepas	24
11. Obtención de curvas de crecimiento de cepas de <i>C. glabrata</i>	24
12. Análisis fenotípico de las cepas de <i>C. glabrata</i> en diferentes medios	25
13. Análisis de expresión de $\alpha 1$	26
14. Exposición a radiación ultravioleta	26
15. Evaluación del crecimiento de colonias aisladas	27
<b>RESULTADOS</b>	<b>28</b>
1. Generación de la cepa de <i>C. glabrata</i> sobreexpresante de información $\alpha$	28
2. Obtención de curvas de crecimiento y tiempos de duplicación de cepas de <i>C. glabrata</i> que contienen distinta información de apareamiento	28
2.1. En medio enriquecido (YPD)	29
2.2. En medio mínimo (MM)	33
3. Expresión del gen $\alpha 1$	35
4. Evaluación fenotípica de las cepas de <i>C. glabrata</i> en diferentes condiciones	36
4.1. Por pH	37
4.2. Otras fuentes de carbono	38
4.3. Fluconazol (FLC)	39
4.4. Medio Spore (baja concentración de nitrógeno)	40
4.5. Medio mínimo (MM)	41
4.6. Casaminoácidos (CAA+ura)	42
4.7. Rojo congo (RC)	42
4.8. Anaerobiosis	43
4.9. Radiación ultravioleta (UV)	44
4.10. Hidroxiurea (HU)	46
4.11. Cloruro de sodio (NaCl)	47
4.12. Peróxido de hidrógeno (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> )	49
<b>DISCUSIÓN</b>	<b>53</b>



	<b>Pág.</b>
<b>1. Crecimiento en medio líquido</b>	<b>54</b>
<b>2. Los factores transcripcionales <math>\alpha 1</math>, <math>\alpha 1</math> y <math>\alpha 2</math> participan en la respuesta a ciertos tipos de estrés</b>	<b>55</b>
<b>2.1. Estrés durante la replicación del DNA</b>	<b>56</b>
<b>2.2. Estrés osmótico</b>	<b>57</b>
<b>2.3. Estrés oxidante</b>	<b>58</b>
<b>PERSPECTIVAS</b>	<b>61</b>
<b>REFERENCIAS</b>	<b>62</b>
<b>ANEXOS</b>	<b>68</b>

## Lista de Tablas y Figuras

	Pág.
<b>Figura 1.</b> El ciclo diploide-tetraploide de <i>C. albicans</i> .	20
<b>Figura 2.</b> Loci de apareamiento de la levadura haploide <i>S. cerevisiae</i> .	20
<b>Figura 3.</b> Ciclo de vida de <i>S. cerevisiae</i> .	21
<b>Figura 4.</b> Locus de apareamiento <i>MTL</i> de la levadura diploide <i>C. albicans</i> .	22
<b>Figura 5.</b> Cambio fenotípico en <i>C. albicans</i> de células blancas a opacas.	23
<b>Figura 6.</b> Pasos del apareamiento de <i>C. albicans</i> .	24
<b>Figura 7.</b> Circuitos de regulación del tipo de apareamiento en <i>S. cerevisiae</i> y <i>C. albicans</i> .	26
<b>Figura 8.</b> Configuración de los loci de apareamiento en <i>S. cerevisiae</i> , <i>C. albicans</i> y <i>C. glabrata</i> .	27
<b>Figura 9.</b> Esquema del método de transformación de <i>C. glabrata</i> de dos pasos.	40
<b>Figura 10.</b> Crecimiento de cepas mutantes en los loci <i>MTL</i> a 30°C en caldo YPD.	47
<b>Figura 11.</b> Crecimiento de cepas mutantes en los loci <i>MTL</i> a 37°C en caldo YPD.	48
<b>Figura 12.</b> Crecimiento de cepas mutantes en los loci <i>MTL</i> a 42°C en caldo YPD.	49
<b>Figura 13.</b> Crecimiento de cepas mutantes en los loci <i>MTL</i> a 30°C en medio mínimo.	50
<b>Figura 14.</b> Crecimiento de cepas mutantes en los loci <i>MTL</i> a 37°C en medio mínimo.	51
<b>Figura 15.</b> Crecimiento de cepas mutantes en los loci <i>MTL</i> a 42°C en medio mínimo.	51

	<b>Pág.</b>
<b>Figura 16.</b> Procesamiento del transcrito del gen <b>a1</b> en las cepas de <i>C. glabrata</i> con información <b>a</b> reconstituida en el locus <i>MTL1</i> .	53
<b>Figura 17.</b> Evaluación del crecimiento de las cepas de <i>C. glabrata</i> mutantes en los loci <i>MTL</i> en agar YPD en a pH 4.5 y 7.	55
<b>Figura 18.</b> Evaluación del crecimiento de las cepas de <i>C. glabrata</i> mutantes en los loci <i>MTL</i> en agar YP con diferentes fuentes de carbono.	56
<b>Figura 19.</b> Evaluación del crecimiento de las cepas de <i>C. glabrata</i> mutantes en los loci <i>MTL</i> en agar YPD con fluconazol.	57
<b>Figura 20.</b> Evaluación del crecimiento de las cepas de <i>C. glabrata</i> mutantes en los loci <i>MTL</i> en agar spore.	58
<b>Figura 21.</b> Evaluación del crecimiento de las cepas de <i>C. glabrata</i> mutantes en los loci <i>MTL</i> en medio mínimo.	58
<b>Figura 22.</b> Evaluación del crecimiento de las cepas de <i>C. glabrata</i> mutantes en los loci <i>MTL</i> en medio CAA	59
<b>Figura 23.</b> Evaluación del crecimiento de las cepas de <i>C. glabrata</i> mutantes en los loci <i>MTL</i> en agar YPD con rojo congo.	60
<b>Figura 24.</b> Evaluación del crecimiento de las cepas de <i>C. glabrata</i> mutantes en los loci <i>MTL</i> en diferentes condiciones en anaerobiosis	61
<b>Figura 25.</b> Evaluación de la sensibilidad a la luz UV de las cepas de <i>C. glabrata</i> mutantes en los loci <i>MTL</i> .	63
<b>Figura 26.</b> Evaluación del crecimiento de las cepas de <i>C. glabrata</i> mutantes en los loci <i>MTL</i> en agar YPD con hidroxurea	64
<b>Figura 27.</b> Evaluación del crecimiento de las cepas de <i>C. glabrata</i> mutantes en los loci <i>MTL</i> en agar YPD con cloruro de sodio.	65
<b>Figura 28.</b> Evaluación de las colonias aisladas de las cepas de <i>C. glabarata</i> mutanes en los loci <i>MTL</i> cultivados en agar YPD cloruro de sodio 1.5 M.	66
<b>Figura 29.</b> Evaluación del crecimiento de las cepas de <i>C. glabrata</i> mutantes en los loci <i>MTL</i> en agar YPD con peróxido de hidrógeno	68

	<b>Pág.</b>
<b>Figura 30.</b> Evaluación del crecimiento de la cepa estándar CBS138 de <i>C. glabrata</i> cultivada en agar YPD con cloruro de sodio 0.5 M.	69
<b>Figura 31.</b> Via HOG en <i>S. cerevisiae</i> .	75
<b>Figura 32.</b> Modelo propuesto en este trabajo.	77
<b>Tabla 1.</b> Cepas y plásmidos utilizados en <i>E. coli</i>	34
<b>Tabla 2.</b> Cepas utilizadas y generadas en <i>C. glabrata</i> .	34
<b>Tabla 3.</b> Oligonucleótidos utilizados.	35
<b>Tabla 4.</b> Genotipo e información de apareamiento de las cepas utilizadas.	46
<b>Tabla 5.</b> Tiempos de duplicación en minutos de cepas de <i>C. glabrata</i> en caldo YPD a tres temperaturas.	49
<b>Tabla 6.</b> Tiempos de duplicación en minutos de cepas de <i>C. glabrata</i> en medio mínimo a tres temperaturas.	52
<b>ANEXOS</b>	
<b>Figura S1.</b> Crecimiento y tiempos de duplicación de la cepa estándar CBS138 en caldo YPD a 30°C, 37°C y 42°C.	85
<b>Figura S2.</b> Crecimiento y tiempos de duplicación de la cepa estándar CBS138 en medio mínimo a 30°C, 37°C y 42°C.	85
<b>Figura S3.</b> Evaluación del crecimiento de las cepas de <i>C. glabrata</i> mutantes en los loci <i>MTL</i> en medio CAA a diferentes pH.	86
<b>Figura S4.</b> Evaluación del crecimiento de las cepas de <i>C. glabrata</i> mutantes en los loci <i>MTL</i> en agar YPD con fluconazol.	87
<b>Figura S5.</b> Evaluación de la sensibilidad a la luz UV de las cepas de <i>C. glabrata</i> mutantes en los loci <i>MTL</i> .	88
<b>Figura S6.</b> Evaluación del crecimiento de las cepas de <i>C. glabrata</i> mutantes en los loci <i>MTL</i> en agar YPD con hidroxurea.	89

	<b>Pág.</b>
<b>Figura S7.</b> Evaluación del crecimiento de las cepas de <i>C. glabrata</i> mutantes en los loci <i>MTL</i> en agar YPD con cloruro de sodio.	90
<b>Figura S8.</b> Evaluación de las colonias aisladas de las cepas de <i>C. glabrata</i> mutantes en los loci <i>MTL</i> cultivados en agar YPD con cloruro de sodio 1.5 M a 30°C.	91
<b>Figura S9.</b> Evaluación de las colonias aisladas de las cepas de <i>C. glabrata</i> mutantes en los loci <i>MTL</i> cultivados en agar YPD con cloruro de sodio 1.5 M a 37°C.	92
<b>Figura S10.</b> Evaluación de las colonias aisladas de las cepas de <i>C. glabrata</i> mutantes en los loci <i>MTL</i> cultivados en agar YPD cloruro de sodio 1.5 M a 45°C.	93
<b>Figura S11.</b> Evaluación del crecimiento de la cepa estándar CBS138 de <i>C. glabrata</i> cultivada en agar YPD con peróxido de hidrógeno.	94
<b>Figura S12.</b> Comprobación por PCR de la integración de la cepa de <i>C. glabrata</i> sobreexpresante de información $\alpha$ .	95
<b>Figura S13.</b> Plásmido pYC7 empleado para la construcción de la cepa de <i>C. glabrata</i> sobreexpresante de información $\alpha$ .	96
<b>Figura S14.</b> Estrategia de construcción de la cepa sobreexpresante de información $\alpha$ .	96
<b>Figura S15.</b> Colonias obtenidas de la transformación de pYC7 en la cepa triple mutante en los loci <i>MTL</i> de <i>C. glabrata</i>	97
<b>Figura S16.</b> Mapa del plásmido integrativo hipotético para la construcción de la cepa que exprese $\alpha 1$ y $\alpha 2$ a partir de <i>MTL1</i> .	97
<b>Figura S17.</b> Geles de RT-PCR de cepas de <i>C. glabrata</i> con información alfa.	98
<b>Figura S18.</b> Evaluación del crecimiento de las cepas de <i>C. glabrata</i> mutantes en los loci <i>MTL</i> en agar YPD tras diferentes estímulos agudos.	99

## RESUMEN

### Los factores transcripcionales **a1**, $\alpha 1$ y $\alpha 2$ de *Candida glabrata* participan en la respuesta y adaptación al estrés

PALABRAS CLAVE: *Candida glabrata*, apareamiento, loci *MTL*.

*Candida glabrata* es una levadura patógena oportunista considerada la segunda especie del género *Candida* de mayor prevalencia después de *Candida albicans*. Es un organismo haploide considerado asexual, aunque conserva genes ortólogos a los de *Saccharomyces cerevisiae* involucrados en los procesos de apareamiento, meiosis y esporulación. *C.glabrata* posee tres loci de apareamiento, llamados *MTL* (*mating type like*). En nuestra cepa silvestre de laboratorio tanto *MTL1* como *MTL2* poseen información de apareamiento tipo **a** pues contiene el gen **a1** y en el locus *MTL3* información tipo  $\alpha$  que contiene los genes  $\alpha 1$  y  $\alpha 2$ . Estos genes codifican factores transcripcionales cuyo circuito de regulación es conocido en *S. cerevisiae* y *C. albicans*, pero en *C. glabrata*, se desconoce su función. En este trabajo nos propusimos identificar la posible función de estos genes mediante la evaluación fenotípica de una batería de cepas mutantes de *C. glabrata* en los loci *MTL* y un cepa sobreexpresante de información **a** en el locus *MTL1* que nos permitiera determinar una posible función de estos factores transcripcionales en respuesta a diferentes tipos de estrés. Evaluamos el fenotipo de cada una de las cepas en respuesta a estrés. En la mayoría de los medios utilizados encontramos un fenotipo similar de nuestras cepas mutantes en los loci *MTL* respecto a la cepa silvestre (WT), excepto en los medios con hidroxiduro (HU), cloruro de sodio (NaCl) y peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) que producen estrés durante la replicación del DNA, osmótico y oxidativo respectivamente, donde las cepas que con sólo un tipo de información de apareamiento o ninguno, son más resistentes que la cepa silvestre (WT). Proponemos que en la cepa WT una proporción de células que expresan ambos tipos de información de apareamiento (**a** y  $\alpha$ ) debido a un silenciamiento incompleto de uno de los loci “silenciosos” y se produce la formación del heterodímero **a1**/ $\alpha 2$  que podría no participar en un ciclo sexual pero sí en otros procesos de adaptación y resistencia a distintos tipos de estrés importantes para la sobrevivencia de *C. glabrata* en el hospedero mamífero.

## ABSTRACT

### **a1, $\alpha$ 1 and $\alpha$ 2 transcription factors participate in stress response in *Candida glabrata***

KEY WORDS: *Candida glabrata*, mating, *MTL* loci.

*Candida glabrata* is an opportunistic pathogenic yeast that is the second most frequent *Candida* species isolated from bloodstream infections worldwide. *C. glabrata* is a haploid organism that has been considered asexual, even though it retains orthologues to the majority of *S. cerevisiae* genes involved in mating, meiosis and sporulation. *C. glabrata* contains three mating loci called *MTL* (*mating type like*) organized in a similar configuration to that of *S. cerevisiae*. In our wild-type strain both *MTL1* and *MTL2* contain the **a1** gene and *MTL3* locus contains  $\alpha$ 1 and  $\alpha$ 2 genes. The transcriptional circuit controlled by the orthologues of these transcription factors in *S. cerevisiae* and *Candida albicans* is well described, however in *C. glabrata* its role is not clear. In order to assess whether these transcription factors participate in response to stress, or are important for growth under specific conditions, we set out to determine the phenotype of a collection of single, double and the triple null mutants in the *MTL* loci in *C. glabrata* as well as a strain over expressing type a information. We evaluated the growth phenotype of this set of mutants in response to different types of stress, on different media and temperatures. In the majority of media and temperatures used, we found no difference in the growth phenotype between the mutant strains and the wild-type. However, under osmotic and oxidative and replicational stress, strains that contain either no mating-type information, or only one type (either **a** or  $\alpha$ ) are more resistant than the wild type strain. We interpret this to mean that in our wild-type strain of *C. glabrata* some cells can form the **a1**/ $\alpha$ 2 heterodimer that represses some genes involved in the response to some types of stress. It is possible therefore that in *C. glabrata* the genes contained in the *MTL* loci participate in the response to certain types of stress which could allow *C. glabrata* to be a successful pathogen, that has recently acquired greater importance in the mammalian hosts.

## INTRODUCCIÓN

Las levaduras del género *Candida* se encuentran como comensales en mucosas del tracto gastrointestinal y vaginal en individuos sanos, sin embargo son patógenos oportunistas comunes en pacientes inmunocomprometidos, en los cuales causan candidosis sistémicas con altos índices de morbilidad y mortalidad (GUDLAUGSSON *et al.* 2003).

### 1. Generalidades de *Candida glabrata*

*Candida glabrata* es una levadura haploide, que se considera el segundo patógeno del género *Candida* de mayor prevalencia después de *Candida albicans*, la cual es una levadura diploide oportunista (KAUR *et al.* 2005). Se ha propuesto que uno de los factores que ha contribuido a la alta prevalencia de *C. glabrata* es su resistencia innata a los azoles (PFALLER *et al.* 2004). A pesar de la frecuencia con que se detectan infecciones por *C. glabrata*, algunos de los factores de virulencia que se han descrito para *C. albicans*, no parecen ser tan importantes para la virulencia de *C. glabrata*. Por ejemplo, la secreción de fosfolipasas que son importantes para la virulencia de *C. albicans*, no parecen tener un papel tan prominente en *C. glabrata*. *C. albicans* presenta secreción de aspartil proteasas extracelulares, y en cambio en *C. glabrata* que contiene 11 genes que codifican para aspartil proteasas, parecen no secretarse al medio en aislados clínicos (KANTARCIOGLU and YUCEL 2002); sin embargo, estas enzimas sí son importantes para la supervivencia en macrófagos y la virulencia en un modelo de candidemia en ratones (KAUR *et al.* 2007). Otra característica importante para la virulencia de *C. albicans*, es la formación de hifas, y en *C. glabrata* se ha descrito que si bien puede formar pseudohifas en condiciones extremas de limitación de nitrógeno, ésta no se ha asociado con la virulencia (CSANK and HAYNES 2000). Un factor que es importante para la virulencia de ambos patógenos es la alta capacidad de adherencia a células epiteliales de mamíferos *in vitro* y la formación de biopelículas. En *C. glabrata*, la adherencia está dada por una familia de genes que codifican para proteínas de pared celular llamados genes *EPA* que median la

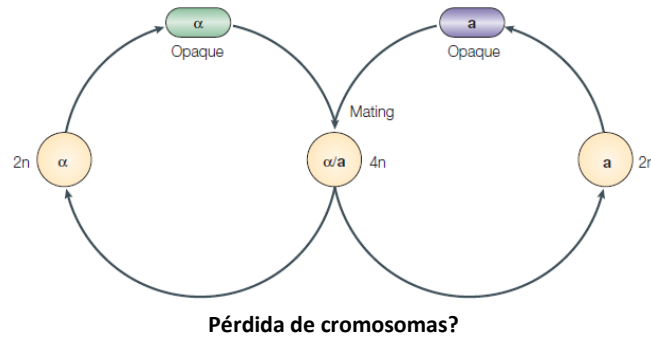


adherencia a células epiteliales, la mayoría de los cuales se localizan en regiones subtelméricas (CASTANO *et al.* 2005; DE LAS PENAS *et al.* 2003). Mientras que en *C. albicans* las proteínas Als están implicadas en patogénesis y formación de biopelículas (HOYER *et al.* 2008).

## 2. Reproducción sexual en hongos patógenos

La reproducción sexual permite la recombinación genética y aumenta la biodiversidad y a pesar de que signifique un gran costo energético se considera un proceso benéfico para la mayoría de los organismos (GODDARD *et al.* 2005). Aunque la mayoría de los hongos patógenos de plantas presentan una reproducción sexual, como *Magnaporthe oryzae* y *Leptosphaeria maculans* (SEXTON and HOWLETT 2006), no pasa lo mismo con los hongos patógenos de humanos los cuales presentan principalmente una reproducción asexual, pues se cree que la recombinación genética que se da durante la reproducción sexual puede resultar en pérdida de combinaciones de genes necesarios para la virulencia y la capacidad para colonizar tejidos en el hospedero mamífero (JOHNSON 2003). Sin embargo, en los últimos años varios estudios han mostrado que algunos patógenos de humanos pueden aparearse bajo condiciones específicas como es el caso de *C. albicans*, *Aspergillus fumigatus* y *Neosartorva fischeri* (BENNETT and JOHNSON 2003; HULL and JOHNSON 1999; HULL *et al.* 2000; MAGEE and MAGEE 2000; PAOLETTI *et al.* 2005).

Cabe mencionar que *C. albicans* no es considerado un organismo sexual, sino parasexual porque para que los productos tetraploides de su proceso de apareamiento, vuelvan a su estado diploide no sufren meiosis como lo hace *S. cerevisiae*, sino una pérdida al azar de la mitad de sus cromosomas, aunque también existe un pequeño grado de recombinación genética (ALBY *et al.* 2009) (Fig.1).

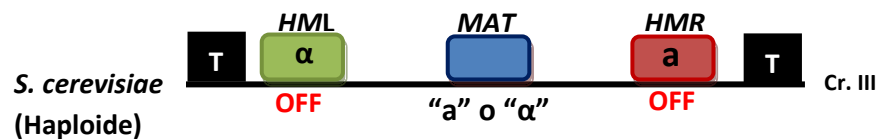


**Figura 1. El ciclo diploide-tetraploide de *C. albicans*.**  
 Modificado de Johnson, 2003.

*C. glabrata* es un hongo filogenéticamente más cercano a *S. cerevisiae*, una levadura haploide no patógena, que a *C. albicans*. A pesar de que aparentemente *C. glabrata* no se reproduce sexualmente, este hongo contiene los genes ortólogos a los que controlan el ciclo sexual en *S. cerevisiae* y el ciclo parasexual en *C. albicans* (SRIKANTHA *et al.* 2003), además de poseer la gran mayoría de los demás genes necesarios para la reproducción sexual, incluyendo meiosis y esporulación.

### 2.1. *Saccharomyces cerevisiae*

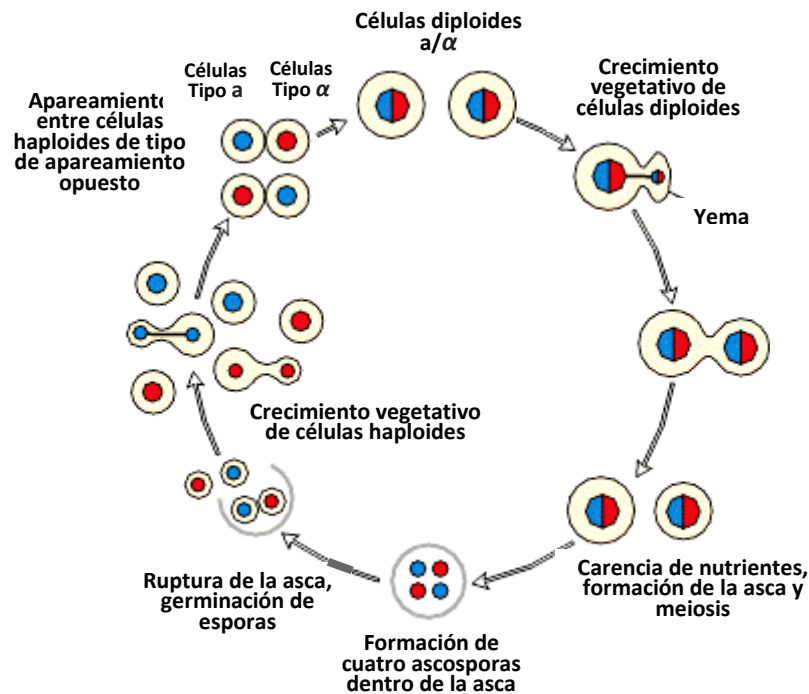
Los genes que controlan el apareamiento en *S. cerevisiae* se encuentran en el locus llamado *MAT*. Además, *S. cerevisiae* contiene otros dos loci que se mantienen silenciosos llamados *HMR* y *HML* que generalmente contienen información tipo  $a$  y tipo  $\alpha$ , respectivamente, y el locus *MAT* que puede contener ya sea información  $a$  o información  $\alpha$  y es el único locus que se encuentra activo transcripcionalmente (Fig. 2).



**Figura 2. Loci de apareamiento de la levadura haploide *S. cerevisiae***  
 Los tres loci se localizan en el cromosoma III. Los loci *HML* y *HMR* se encuentran silenciosos (OFF) y generalmente contienen información  $\alpha$  y  $a$ , respectivamente. El locus *MAT* contiene información ya sea tipo  $a$  o  $\alpha$  y es el locus de expresión.

De esta manera una célula que expresa información **a** se aparea con una célula que expresa información  $\alpha$  y da lugar a una célula diploide con información **a**/ $\alpha$ , la cual es capaz de sufrir meiosis y formar esporas en condiciones de carencia nutricional.

Para que sea posible el apareamiento en *S. cerevisiae*, las células tipo **a** producen feromona **a** que es reconocida por las células  $\alpha$  y las células tipo  $\alpha$  producen feromona tipo  $\alpha$  que es reconocida por las células tipo **a**, lo que ocasiona un arresto en el ciclo celular y la fusión de los núcleos de tipos celulares distintos para generar una célula diploide heterocigota (**a**/ $\alpha$ ) como se muestra en la Figura 3 (HERSKOWITZ 1988).



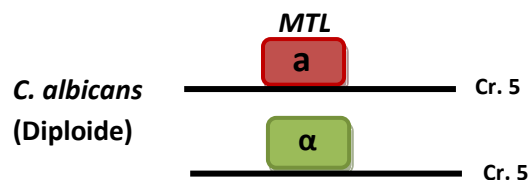
**Figura 3. Ciclo de vida de *S. cerevisiae*.**

Apareamiento de células haploides **a** o  $\alpha$  produce células diploides que en condiciones carentes de nutrientes sufre meiosis y forma esporas para producir una ascogonia que contiene cuatro esporas haploides las cuales son liberadas en condiciones de abundancia de nutrientes.

*S. cerevisiae* posee un mecanismo de conversión génica muy eficiente para cambiar el tipo de apareamiento de *MATa* a *MAT $\alpha$*  y viceversa. En este mecanismo se reemplaza la información contenida en los loci *HMR* o *HML* hacia el locus de expresión *MAT*, mediante la recombinasa HO (STRATHERN *et al.* 1982).

## 2.2. *Candida albicans*

Por su parte, *C. albicans* es una levadura patógena diploide que hasta hace poco se consideraba un organismo asexual, puesto que tradicionalmente se encontraron solamente poblaciones clonales. Sin embargo se descubrió evidencia de un limitado intercambio de información genética en su población (GRASER *et al.* 1996) y además se encontró que contiene genes ortólogos a los de *S. cerevisiae*, que son necesarios para el apareamiento y algunos que se requieren para la meiosis (Fig. 4) (HULL and JOHNSON 1999; TZUNG *et al.* 2001).

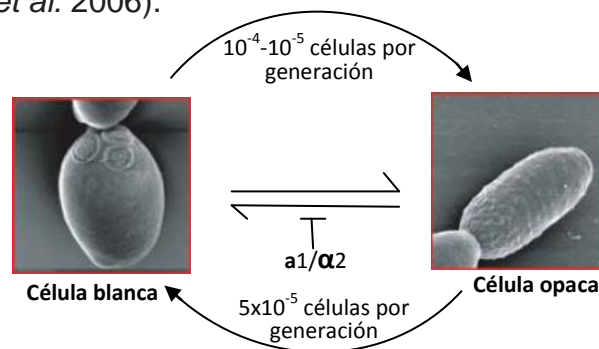


**Figura 4. Locus de apareamiento *MTL* de la levadura diploide *C. albicans*.**  
Se encuentran en el cromosoma 5.

Debido a que la mayoría de los aislados clínicos de *C. albicans* son heterocigotos para el locus *MTL* y por lo tanto expresan los dos tipos de información ( $a$  y  $\alpha$ ), se pensó que ésta era la razón por la cual no se había observado un ciclo sexual en este organismo. Por lo tanto en la búsqueda del ciclo sexual, Hull *et al.* (2000) construyeron cepas homocigotas  $a/a$  o  $\alpha/\alpha$  y Magee *et al.* (2000), crearon cepas  $a/\Delta$  y  $\alpha/\Delta$  que solamente expresan un tipo de información de apareamiento. Con estas cepas lograron inducir el apareamiento tanto *in vivo* (utilizando modelos de infección sistémica en ratones), como *in vitro*.

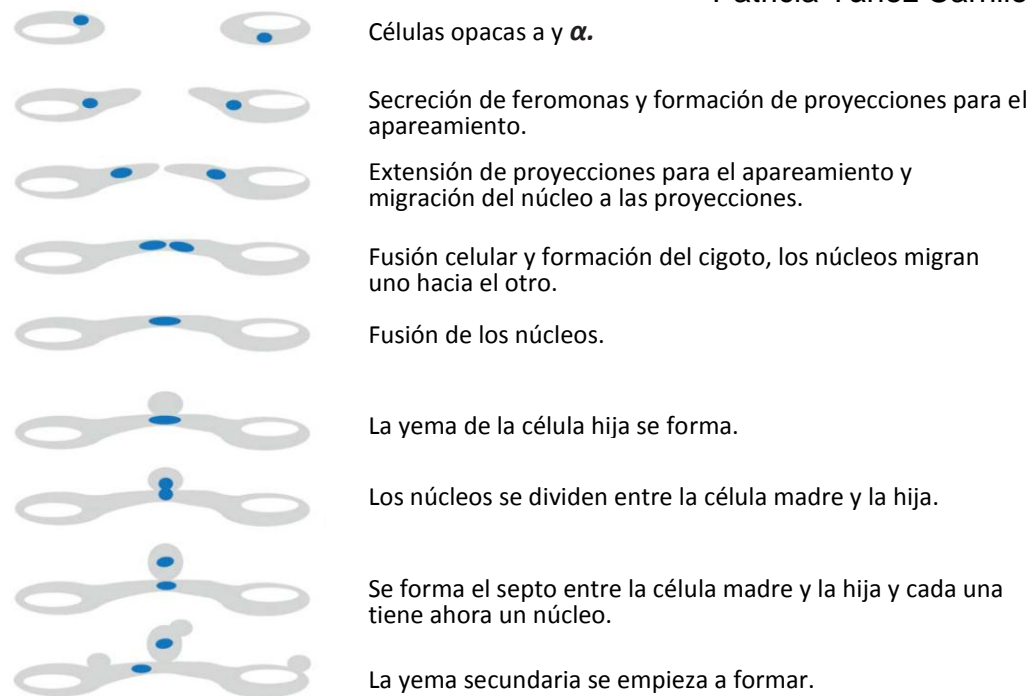
La homocigosis del locus *MTL* de *C. albicans* no es suficiente para que se dé el apareamiento. Se ha descrito que es necesario un cambio fenotípico reversible de células blancas y lisas a células opacas y rugosas, y solo estas últimas son  $10^6$  veces más eficientes para el apareamiento que las células blancas. Este cambio de fase se mantiene en las células hijas por varias generaciones y conlleva una reprogramación genética que involucra aproximadamente 400 genes y produce células competentes para el apareamiento (MILLER and JOHNSON 2002; SLUTSKY *et al.* 1987).

El locus *MTL* de *C. albicans* regula el cambio fenotípico de colonias blancas a opacas, pues en células diploides, es decir que expresan tanto información  $a$  como  $\alpha$ , el heterodímero  $a1/\alpha2$  es un represor que bloquea este cambio y por lo tanto el apareamiento al impedir la producción de células opacas (Fig. 5) (MILLER and JOHNSON 2002). Se sabe que este cambio fenotípico que produce células competentes para el apareamiento es controlado por mecanismos epigenéticos que involucran a los reguladores transcripcionales del locus *MTL* y estos regulan la expresión del gen *WOR1*, necesario para inducir el cambio. Wor1p está presente a muy bajos niveles en células blancas, mientras que en células opacas su expresión aumenta ya que Wor1p se auto-regula activando su propia transcripción al unirse a su promotor, por lo que en este tipo de células, Wor1p se acumula (ZORDAN *et al.* 2006).



**Figura 5. Cambio fenotipo en *C. albicans* de células blancas a opacas.**  
Modificado de Bennett and Johnson, 2005.

El apareamiento en *C. albicans* solo es posible entre células opacas, sin embargo, este tipo de células solo son estables a bajas temperaturas ( $25^{\circ}\text{C}$ ), lo cual pone en duda la posibilidad de que *C. albicans* pueda aparearse dentro del hospedero mamífero y sugiere que las células opacas pueden limitar el apareamiento para ambientes fuera de él, como en la piel, donde se ha encontrado una mayor eficiencia de apareamiento (Fig. 6). Las células blancas en cambio son más virulentas en ciertos modelos de infección sistémica en parte porque son estables a  $37^{\circ}\text{C}$  (KVAAL *et al.* 1999; MAGEE and MAGEE 2000).



**Figura 6. Pasos del apareamiento de *C. albicans*.**

Los núcleos se marcan en color azul y las vacuolas en blanco, las cuales no se indican en las células hijas.

Modificado de Bennett and Johnson, 2005.

El patrón de expresión de genes de las células opacas incluye los necesarios para la respuesta a feromonas, lo que puede explicar porqué solo las células opacas sean susceptibles a aparearse. Sin embargo, es posible que sea ventajoso para *C. albicans* mantener la heterocigosidad en el locus *MTL* pues son estas células las que han demostrado ser más virulentas y con mayor capacidad de colonización de tejidos respecto a las cepas que son homocigotas para el locus *MTL*. Es posible que estos factores transcripcionales regulen vías implicadas en virulencia, aunque también la homocigosis del locus *MTL* abarca una gran cantidad de genes que lo flanquean que también son homocigotos en las cepas más virulentas de *C. albicans* y podrían ser los responsables de esta mayor virulencia (LOCKHART *et al.* 2005; NIELSEN and HEITMAN 2007; WU *et al.* 2007).

Igual que en *S. cerevisiae*, para el apareamiento en *C. albicans* es necesaria la producción de feromonas por parte de las células, de esta manera las células tipo **a** producen feromona tipo **a** que es reconocida por células tipo  $\alpha$  y éstas producen feromona tipo  $\alpha$  que es reconocida por células tipo **a**. Sin embargo son las células

opacas tipo **a** las que responden a la feromona tipo  $\alpha$  y reprograman la expresión genética para inducir genes involucrados en apareamiento (DIGNARD *et al.* 2007; PANWAR *et al.* 2003). Además en *C. albicans* la feromona  $\alpha$  producida por células tipo  $\alpha$  induce 62 genes, 7 de los cuales codifican para proteínas de pared celular y aspartil proteasas secretadas importantes tanto para el apareamiento como para la virulencia (BENNETT *et al.* 2003). Esto pone en evidencia la función de estas feromonas tanto en la interacción célula-célula de *C. albicans* como células de *C. albicans* con las células del hospedero.

### 3. Circuito regulatorio controlado por los factores transcripcionales codificados en el locus *MAT* y *MTL*

Tanto *C. albicans* como *S. cerevisiae* poseen proteínas de regulación transcripcional codificadas en sus loci *MTL* y *MAT*, respectivamente, las cuales no sólo especifican el tipo de apareamiento sino también permiten la activación y la represión de ciertos grupos de genes; algunos de los cuales confieren “identidad celular”, es decir que células que expresan información de apareamiento tipo **a** también expresan un grupo de genes específicos de células **a** (**asg**, por sus siglas en inglés), y las células que expresan información tipo  $\alpha$  expresan un grupo de genes específicos de células  $\alpha$  ( **$\alpha$ sg** por sus siglas en inglés). Aunque estas dos levaduras presentan los mismos tres reguladores transcripcionales **a1**,  $\alpha1$  y  $\alpha2$  (a excepción de *C. albicans* que posee también **a2**) la regulación del circuito transcripcional en cada organismo es diferente.

En células haploides tipo  $\alpha$  de *S. cerevisiae*,  $\alpha1$  activa genes específicos  $\alpha$  e induce a la célula a aparearse como una célula  $\alpha$  mientras que  $\alpha2$  reprime genes específicos de células **a**. En células haploides **a**, la proteína **a1** no tiene una función conocida pero que el tipo celular por default es el tipo **a**, es decir la célula se comporta como tipo **a** en mutantes que no contienen información de apareamiento (Fig. 7). Las células de *S. cerevisiae* que se han apareado y que por lo tanto expresan tanto información **a** como información  $\alpha$ , se forma el heterodímero **a1**/ $\alpha2$  que reprime genes de apareamiento (Fig. 5) y permite la

meiosis en condiciones de limitación de nutrientes a través de la represión de un regulador negativo de la meiosis (VAN DYK *et al.* 2003). También se ha descrito que el heterodímero **a1/α2** controla otros genes específicos de células α y algunos relacionados con otros procesos (GALGOCZY *et al.* 2004).

Por su parte en *C. albicans* se encuentra el gen **a2**, que codifica para un cuarto regulador transcripcional aparte de los tres ya descritos en *S. cerevisiae* (TSONG *et al.* 2003). Aunque el resultado final de los circuitos reguladores en estos dos organismos son idénticos, hay varias diferencias notables (Fig. 7): 1) En *C. albicans* el circuito es principalmente positivo donde se requiere un regulador positivo para activar los genes específicos de células **a**, y otro para activar los específicos de células α. En cambio, en *S. cerevisiae* no se requiere activación para la expresión de genes específicos de células **a**, y es necesario un represor para mantener silenciosos los genes tipo **a** en células tipo α (TSONG *et al.* 2006), 2) Existen genes individuales que son controlados por los reguladores del tipo de apareamiento solo en uno de los organismos, como es el caso del gen *NEJ1* solo en *S. cerevisiae* (VALENCIA *et al.* 2001) y el gen *RAM2* solo en *C. albicans* (SONG and WHITE 2003), 3) El locus *MAT* de *C. albicans* tiene un activador de genes **a** que no se encuentra en *S. cerevisiae* (el gen **a2**) y 4) El cambio fenotípico de colonias blancas a opacas en *C. albicans* se controla por el locus de apareamiento y a su vez se requiere para que ocurra el ciclo sexual, cambio que no sucede en *S. cerevisiae* (Fig. 7) (GALGOCZY *et al.* 2004; JOHNSON 1995).

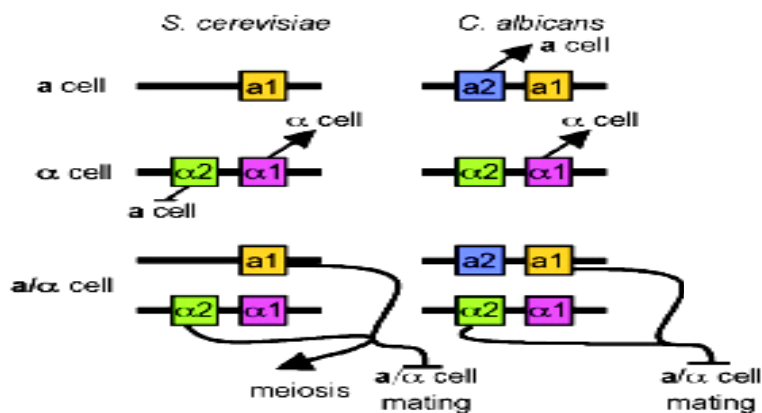


Figura 7. Circuitos de regulación del tipo de apareamiento en *S. cerevisiae* y *C. albicans*. Modificado de Reedy, 2009



#### 4. Configuración de los loci de apareamiento en *C. glabrata*

*C. glabrata* cuenta con tres loci de apareamiento: *MTL1* que puede contener información **a** o  $\alpha$ , pero en nuestra cepa de laboratorio BG14, (CORMACK and FALKOW 1999) contiene información **a**, *MTL3* que generalmente contiene información  $\alpha$  (también es el caso de nuestra cepa), estos dos loci se encuentran en el cromosoma B y *MTL2* que generalmente contiene información **a** y que se encuentra en el cromosoma E. Tanto por datos del laboratorio (Ramírez *et al.*, 2010, sometido), como también datos publicados (MULLER *et al.* 2008) sabemos que tanto *MTL1* como *MTL2* son activos transcripcionalmente, mientras *MTL3* está silencioso.

En la Figura 8 se muestra un esquema comparativo de la distribución de los loci de apareamiento de *C. glabrata* conservados respecto a los dos hongos con los que generalmente se compara a este organismo; un hongo haploide no patógeno, *S. cerevisiae*, y un hongo diploide patógeno, *C. albicans*.

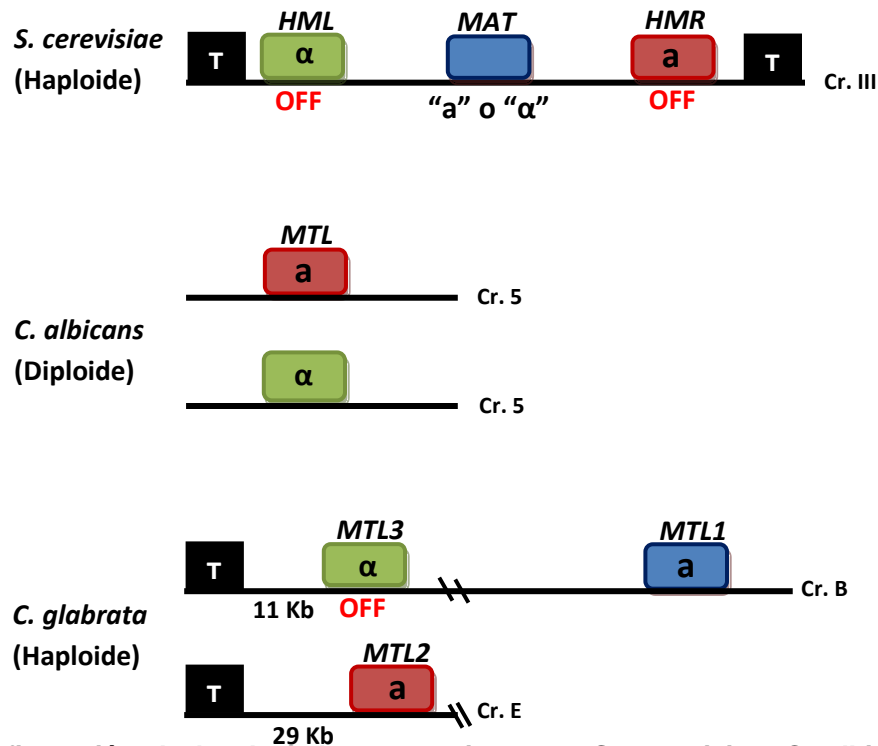


Figura 8. Configuración de los loci de apareamiento en *S. cerevisiae*, *C. albicans* y *C. glabrata*.

T = telómeros, OFF = Locus transcripcionalmente silencioso.

Modificado de Bennett and Johnson, 2005

## ANTECEDENTES DIRECTOS

Desde 2003 se describió que *C. glabrata* contiene tres loci de apareamiento: *MTL1* y *MTL3* en el cromosoma B y *MTL3* en el cromosoma E, los cuales contienen los genes ya sea  $\alpha 1$  y  $\alpha 2$  o el gen **a1**, igual que en *S. cerevisiae* como mostramos en la Figura 8 (SRIKANTHA *et al.* 2003). A pesar de que *C. glabrata* es un hongo del género *Candida*, filogenéticamente es más cercana a *S. cerevisiae* y cuenta con ortólogos para la gran mayoría de los genes ortólogos a los implicados en apareamiento, meiosis y esporulación en *S. cerevisiae*: 235 de un total de 246 genes (datos no publicados) (WONG *et al.* 2003).

### 1. Actividad transcripcional de los loci *MTL* en *C. glabrata*

Anteriormente se pensaba que solo el locus *MTL1* era el que se expresaba, sin embargo por datos tanto de nuestro laboratorio como de otro grupo (MULLER *et al.* 2008) sabemos que tanto el locus *MTL1* como *MTL2* son activos transcripcionalmente y en nuestra cepa (CGM1) ambos contienen información **a**. Sin embargo, la proteína **a1** codificada por el gen **a1** sólo es funcional si se expresa a partir de *MTL1*, pues en este caso su transcrito se procesa completamente los dos intrones localizados al nucleótido 105 y 404 respectivamente en este gen, igual que en *S. cerevisiae*. Mientras que cuando la información se transcribe a partir del locus *MTL2* no se detecta procesamiento del transcrito de **a1**, en cuyo caso no se produce la proteína funcional porque se produce una proteína truncada en al encontrar un codón de paro en el primer intrón (MULLER *et al.* 2008) (Ramirez *et al.*, 2010 sometido).

Por su parte *MTL3* está sujeto a un silenciamiento que no es tan eficiente como el que reprime la expresión de los loci silenciosos (*HM*) en *S. cerevisiae* (MULLER *et al.* 2008). Por esta razón en una población pequeña de nuestras células de *C. glabrata* se expresa la información de apareamiento a partir de este locus, que en la mayoría de las cepas es información tipo  $\alpha$ . De esta manera en la cepa silvestre de nuestro laboratorio es posible que se expresen entonces ambos tipos de

información de apareamiento (expresión y procesamiento de  $a1$  a partir de *MTL1* y expresión de algunas células de  $\alpha1$  y  $\alpha2$  a partir de *MTL3*).

Ya se ha descrito que el locus *MAT* de *S. cerevisiae* codifica para reguladores transcripcionales que le permite determinar el tipo celular ( $a$  o  $\alpha$ ) como explicamos anteriormente. Sin embargo, en una célula diploide ( $a/\alpha$ ), donde se expresan ambos tipos de información  $a1$  y  $\alpha2$  se unen para formar un heterodímero que reprime la expresión de genes específicos de haploidía (DRANGINIS 1990; GOUTTE and JOHNSON 1988) entre los que se encuentran genes necesarios para apareamiento, resistencia a estrés osmótico y reparación de cortes de doble cadena (DSBR) (GALGOCZY *et al.* 2004). Esta misma situación puede ocurrir en cepas de *S. cerevisiae* que contengan mutaciones en las proteínas del silenciamiento que mantienen silenciosos los loci *HM* y por lo tanto expresen ambos tipos de información.

## PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Aunque *C. glabrata* cuenta con la mayoría de los genes implicados en apareamiento, meiosis y esporulación, y se hayan identificado los loci de apareamiento *MTL1*, *MTL2* y *MTL3*; no se ha identificado un ciclo sexual en este hongo que produce poblaciones principalmente clonales.

Lo anterior pone en duda la ausencia de un ciclo sexual en este organismo y nos lleva a cuestionarnos si los factores transcripcionales codificados en estos loci pueden estar implicados en otras funciones celulares. Es posible que la reproducción sexual se lleve a cabo en condiciones que no han sido identificadas o el hecho de que todos estos genes se hayan conservado podría indicar que cumplen una función adicional independientemente si se requiere para el proceso de apareamiento, la cual podría ser importante para su supervivencia como patógeno.

Para analizar en qué vías metabólicas participan los reguladores transcripcionales codificados en los loci *MTL* de *C. glabrata* evaluamos el fenotipo de mutantes en estos loci en diferentes condiciones.

## HIPÓTESIS

La hipótesis que planteamos en este trabajo es que algunas células de *C. glabrata* pueden expresar ambos tipos de información de apareamiento y por lo tanto pueden formar el heterodímero  $\alpha 1/\alpha 2$ , el cual podría funcionar como represor de genes de la respuesta a estrés osmótico, estrés oxidativo y el que causa disminuir la tasa de replicación del DNA (estrés durante la replicación del DNA).

## ESTRATEGIA

Para identificar la posible función de los genes  $\alpha 1$ ,  $\alpha 1$  y  $\alpha 2$  en otros procesos celulares distintos al apareamiento utilizamos una batería de cepas mutantes de los loci *MTL* de manera que utilicemos cepas que: sólo expresen un tipo de información ya sea tipo  $\alpha$  y otra tipo **a**, la cepa mutante nula en los tres loci de apareamiento, es decir que no exprese ningún tipo de información de apareamiento (Ramírez-Zavaleta et al., sometido; Salas-Delgado, Tesis de Maestría, 2008). Además, a partir de la cepa mutante nula en los tres loci de apareamiento, reconstituimos el locus de expresión *MTL1* ya sea con información tipo **a** o información tipo  $\alpha$ ; así mismo construimos una cepa sobreexpresante de información **a** (Tabla 2).

Utilizamos esta batería de cepas, además de las cepas control: nuestra cepa silvestre (WT) y la cepa de referencia cuyo genoma se secuenció (CBS138), para caracterizar el fenotipo *in vitro* utilizando diferentes medios de cultivo, respuesta a distintos tipos de estrés y a diferentes temperaturas.

## OBJETIVO GENERAL

Por lo anterior nuestro objetivo general es determinar si los genes de apareamiento participan en la respuesta a estrés en la levadura haploide *C. glabrata* que hasta el momento se ha considerado un organismo asexual.

## OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Construir cepas que a partir del locus de expresión *MTL1* sobreexpresen información tipo  $a$  o tipo  $\alpha$ .
- Evaluar el crecimiento de cada cepa en medio enriquecido (YPD) y en medio mínimo, a diferentes temperaturas.
- Evaluar la respuesta de cada cepa a diferentes tipos de estrés en diferentes temperaturas.
- Construir un modelo hipotético de la posible función de los genes de apareamiento en *C. glabrata*.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### 1. Cepas, plásmidos y oligonucleótidos

Las cepas de *Escherichia coli* que se utilizaron para la construcción, así como el plásmido utilizado se muestran en la Tabla 1. La cepa utilizada de *Candida glabrata* y la generada a partir de esta se muestra en la Tabla 2.

**Tabla 1. Cepas y plásmidos utilizados en *E. coli*.**

CEPA	NOMBRE	GENOTIPO	RESISTENCIA	REFERENCIA
<b>Cepas utilizadas</b>				
1396	DH10	$F^- mcrA \Delta(mrr-hsdRMS-mcrBC)$ $\phi 80dlacZ\Delta M15 \Delta lacX74 deoR recA1$ $endA1 araD139 \Delta(ara, leu) 7697 galU$ $galK\lambda^- rpsL nupG$	-	Calvin N M et al, 1988
1410	pcnB	DH10 $pcnB^-$	-	Colección del laboratorio
<b>Plásmidos utilizados</b>				
2974	pTP7	Ylp $lac211$ , 5':P $_{PGK}$ ::a1	Amp <sup>R</sup> , Ura <sup>+</sup>	Tovar, 2008 (dato no publicado)

**Tabla 2. Cepas utilizadas y generadas en *C. glabrata*.**

CEPA	NOMENCLATURA EN ESTE TRABAJO	GENOTIPO	RESISTENCIA	REFERENCIA
<b>Cepas utilizadas</b>				
CGM1	WT	Bg14, $ura3\Delta(-85$ a $+932)::Tn903$ , derivada del aislado clínico BG2	Kan	Cormack et al. 1999
CGM531	$(mtl1,2,3)\Delta$	CGM1, $(mtl1, mtl2, mtl3)\Delta$	-	Salas, 2008
CBS138	CBS138	Cepa estándar, aislado clínico secuenciado	-	<a href="http://www.genol&lt;br/&gt;evures.org/cagl.&lt;br/&gt;html#">http://www.genol evures.org/cagl. html#</a>



CGM312	<i>sir3</i> $\Delta$	CGM1, <i>sir3</i> $\Delta$	<i>Hyg</i> <sup>R</sup>	Colección del laboratorio
CGM460	<i>mtl3</i> $\Delta$	CGM1, <i>mtl3</i> $\Delta$	<i>Hyg</i> <sup>R</sup>	Colección del laboratorio
CGM707	MTL1 $\alpha$ -R	CGM531:: <i>MTL1</i> $\alpha$	-	Colección del laboratorio
CGM904	MTL1 <b>a</b> -R	CGM531:: <i>MTL1</i> <b>a</b>	-	Colección del laboratorio
CGM905	MTL1 <b>a</b> -R2	Igual que CGM904, otro aislado	-	Colección del laboratorio
CGM978	MTL1 <b>a</b> -SE	CGM531:: <i>PPGK</i> :: <b>a1</b>	-	<b>ESTE TRABAJO</b>

Los oligonucleótidos utilizados se muestran a continuación en la Tabla 3.

**Tabla 3. Oligonucleótidos utilizados.**

#	Secuencia	Nombre
288	ATTAGAGAAGAAAGGATGAAAC	ALFA1@63MTL3Fw
289	GATGGAAGTATTGAAGTGATG	ALFA1@179MTL3Rv
290	TCAAGAATTAGTATTACGCATC	ALFA2@12MTL3Fw
291	AACTGGAACACAATGATATAAG	ALFA2@93MTL3 Rv
468	GACCCAATACAAGATCTACGC	A1@12MTL1Fw
469	AGATCTTTCGATCTCTTGCGC	A1@506MTL1Rv

## 2. Soluciones

TE: Tris 10 mM-EDTA 0.1 mM; NaOAc 3M; glicógeno 20  $\mu$ g/ml; etanol 100%, 70%; TER 10 mM: Tris 10 mM, EDTA 0.1 mM, RNasa 5  $\mu$ l; GTE: glucosa 50 mM, Tris-Cl pH8 25 mM, EDTA 10 mM; NaOH/SDS: NaOH 0.2 N, SDS 1%; Acetato de potasio: ácido acético glacial 29.5 ml, aforar a 100 ml con KOH; PEG 50% (PM4000); LiOAc 1 M; esperma de salmón, ssDNA, 2 mg/ml desnaturalizado; buffer A: Tris 50 mM, EDTA 10 mM, NaCl 150 mM, Triton 1%, SDS 1%, buffer A

sin detergente: Tris 50 mM, EDTA 10 mM, NaCl 15 mM; glicerol 15%, 60%; LiOAc 1M; Dimetilsulfóxido DMSO; fenol:cloroformo:isoamílico (24:24:1); cloruro de sodio 5 M; cloruro de Sodio 4 M; rojo congo 10000 µg/ml; hidroxiurea 2 M, h<sub>2</sub>o<sub>2</sub> 1.1633 M, fluconazol 2000 µg/ml, hidroperóxido de cumeno 50 mM, menadiona 10 mM, etanol absoluto.

### **3. Medios de cultivo para *E. coli***

Caldo LB: triptona 10 g/L, NaCl 2 g/L, extracto de levadura 5 g/L, Agar LB-carbenicilina: triptona 10 g/L, cloruro de sodio 5 g/L, extracto de levadura 5 g/L, agar 15 g/L, carbenicilina 100 µg/ml; SOB: extracto de levadura 5 g/L, triptona 20 g/L, cloruro de sodio 10mM, cloruro de potasio 2.5 g/L; SOC: SOB 10ml, sulfato de magnesio 10 mM, cloruro de magnesio 10 mM, glucosa 4%.

### **4. Medios de cultivo para *C. glabrata***

Caldo YPD: extracto de levadura 10 g/L, peptona 20 g/L, uracilo 50 mg/ml, glucosa 2%; Agar YPD: al YPD líquido se le adiciona agar 20 g/L; Agar YPD-pH 4.5 y Agar YPD-pH 7 : YPD adicionado con MOPS y se utiliza HCl 1 N o NaOH 0.5 M para establecer el pH deseado; Agar YPE: extracto de levadura 10 g/L, peptona 20 g/L, uracilo 50mg/ml, etanol absoluto 2%; Agar YPG sólido: extracto de levadura 10 g/L, peptona 20 g/L, uracilo 50 mg/ml, glicerol 3%, agar 20 g/L; Agar YPD-NaCl 0.5 M: YPD adicionado con 29 g/L de cloruro de sodio; Agar YPD-NaCl 1.5 M: YPD adicionado con 87 g/L de cloruro de sodio; Agar YPD-NaCl 1.6 M: YPD adicionado con 92.8 g/L de cloruro de sodio; Agar YPD-NaCl 2 M: YPD adicionado con 10.44 g/L de cloruro de sodio; Agar YPD-RC250: YPD adicionado con 25 ml/L de Rojo Congo 2000 µg/ml; Agar YPD-RC300: YPD adicionado con 30 ml/L de Rojo Congo a 2000 µg/ml; Agar YPD-RC400: YPD adicionado con 40 ml/L de Rojo Congo 2000 µg/ml; Agar YPD-RC500: YPD adicionado con 50 ml/L de Rojo Congo 2000 µg/ml; Agar YPD-RC2000: YPD adicionado con 200 ml/L de Rojo Congo 2000 µg/ml; Agar YPD-HU200: YPD adicionado con 100 ml/L de hidroxiurea 2 M; Agar YPD-HU250: YPD adicionado con 125 ml/L de hidroxiurea 2 M; Agar 5-FOA:

agar 20 g/L, casaminoácidos 6 g/L, sulfato de amonio 5 g/L, uracilo 5 mg/ml, 5-FOA 0.9 g/L, base nitrogenada de levadura 1.7 g/L, glucosa 2%; Agar CAA o SC-ura: base nitrogenada de levadura 1.7 g/L, sulfato de amonio 5 g/L, casaminoácidos 6 g/L, agar 20 g/L, glucosa 2%; Agar YPD-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>20: YPD adicionado con 17.2 ml/L de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 1.1633 M; Agar YPD-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>25: YPD adicionado con 21.46 ml/L de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 1.1633 M; Agar YPD-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>30: YPD adicionado con 25.8 ml/L de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 1.1633M; Agar YPD-FLC16: YPD adicionado con 8 ml/l de fluconazol a 2000 µg/ml ; Agar YPD-FLC32: YPD adicionado con 16 ml/L de fluconazol a 2000 µg/ml; Agar YPD-FLC64: YPD adicionado con 32 ml/L de fluconazol a 2000 µg/ml; Agar YPD-FLC128: YPD adicionado con 64 ml/L de fluconazol a 2000 µg/ml; Agar YPD-CUM0.6: YPD adicionado con 10 ml/Lde cumeno 50 mM; Agar YPD-CUM0.8: YPD adicionado con 13.3 ml/Lde cumeno 50 mM; Agar YPD-CUM1: YPD adicionado con 16.6 ml/L de cumeno 50 mM; Agar YPD-CUM1.2: YPD adicionado con 20 ml/Lde cumeno 50 mM; Agar YPD-MEN0.01: YPD adicionado con 1 ml/L de menadiona 10 mM; Agar YPD-MEN0.03: YPD adicionado con 3 ml/L de menadiona 10 mM; Agar YPD-MEN0.05: YPD adicionado con 5 ml/Lde menadiona 10 mM; Agar YPD-MEN0.06: YPD adicionado con 6 ml/L de menadiona 10 mM; Agar YPD-MEN0.08: YPD adicionado con 8 ml/L de menadiona 10 mM; Agar YPD-MEN0.11: YPD adicionado con 11 ml/Lde menadiona 10 mM; Agar SC-ura pH 4.5 y SC-ura pH 7: SC-ura con MOPS y se utiliza HCl 1 N o NaOH 0.5 M para establecer el pH deseado; Agar SC+ura: SC-ura adicionado con uracilo 50 mg/ml; Agar MM líquido+uracilo: base nitrogenada de levadura 1.7 g/L, sulfato de amonio 5 g/L, uracilo 50 mg/ml, glucosa 2%; Agar MM sólido+uracilo: base nitrogenada de levadura 1.7 g/L, sulfato de amonio 5 g/L, uracilo 50 mg/ml, glucosa 2%, agar 20 g/L; Agar Spore: acetato de potasio 10 g/L, extracto de levadura 1.3 g/L, agar 20 g/L.

## 5. Extracción de DNA plasmídico de *E. coli*.

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

## 6. Transformación genética de *C. glabrata*.

Para realizar las transformaciones en *C. glabrata* usamos el método de transformación con acetato de litio (LiAc) (GIETZ *et al.* 1992), en el cual crecimos las células en YPD líquido hasta llegar a una densidad óptica ( $OD_{600}$ ) de 1.0, las cosechamos, lavamos con agua estéril y después con 1ml de LiAc 100 mM hasta resuspender en 300  $\mu$ l LiAc 100 mM. Tomamos alícuotas de esta suspensión celular y adicionamos una mezcla de 240  $\mu$ l de PEG al 50% (PM 4000), 36  $\mu$ L de LiAc 1 M, 50  $\mu$ g de ADN de esperma de salmón desnaturalizado por calor y aproximadamente 350 – 500 ng del plásmido digerido pTP7 (Tovar, 2008) que se desea introducir al genoma de la levadura. Incubamos esta mezcla a 30°C por 45 min, agregamos 43  $\mu$ l de DMSO y dimos un choque térmico a 42°C por 15 min. Estas células las centrifugamos, las resuspendimos en 900  $\mu$ l de agua estéril y plaqueamos alícuotas de 300  $\mu$ l en cajas con medio CAA. Aproximadamente 72 h después crecieron las colonias transformantes con la información genética deseada, sembramos por estría en cajas con medio CAA dos veces para obtener colonias aisladas y purificarlas. Analizamos la integración correcta de ambos extremos por PCR y las colonias positivas se sembraron por estría nuevamente en YPG para descartar las colonias con una función mitocondrial afectada.

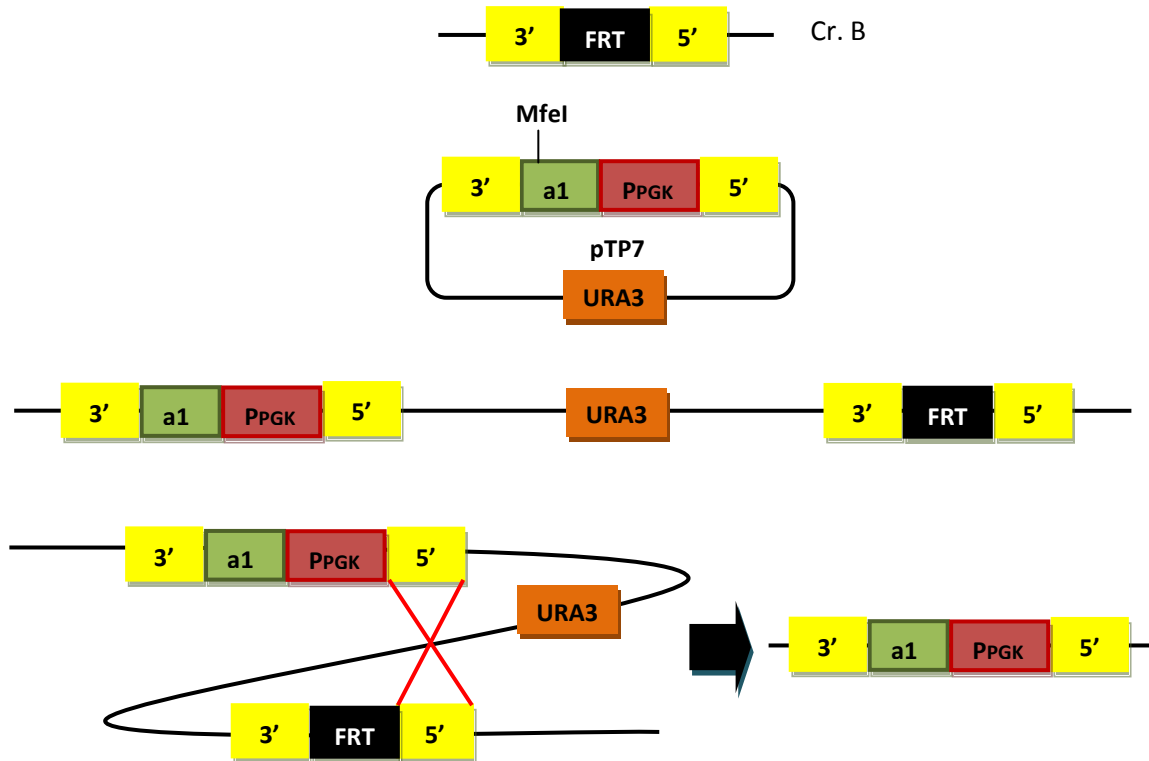
## 7. Obtención de la cepa de *C. glabrata* sobreexpresante de información *a*.

La cepa sobreexpresante de información *a* la obtuvimos utilizando como receptora la cepa triple mutante en los loci *MTL* (Salas, 2008) por el método de dos pasos (pop in-pop out) (Ver Figura 10). En el primer paso transformamos con un plásmido linealizado con una enzima de restricción que corte dentro de la región de homología que flanquea la información que deseamos insertar en el genoma de *C. glabrata* (pTP7 en este caso). El plásmido linealizado se integra por recombinación homóloga en el genoma de *C. glabrata* en el sitio donde se linealizó de tal manera que recombine en la región homóloga del genoma y se integre el plásmido completo. De esta manera la levadura contiene el gen *URA3* y es capaz de crecer en un medio sin uracilo (SC-ura), en el cual seleccionamos las

colonias. En el segundo paso crecimos a la levadura en medio en el cual no necesitara la expresión del gen *URA3*, es decir, en un medio enriquecido y adicionado con uracilo (YPD) para eliminar la presión selectiva e inducir la escisión del gen *URA3* por medio de la recombinación entre las regiones que se duplicaron de las secuencias flanqueantes al integrar el plásmido en el genoma. Según el punto donde se produzca esta recombinación, se pueden obtener dos tipos de recombinantes, aquellas en las que se escinda el gen *URA3* y la construcción del plásmido (se regresa al genoma original) y aquellas en las que en el genoma de la levadura permanezca solamente la información que deseamos introducir y se escinda el gen *URA3* y el alelo original *mtl1* $\Delta$ , de manera que la cepa se vuelve a un fenotipo Ura<sup>-</sup>. Para esto crecemos alícuotas de un cultivo en medio YPD fresco y se diluye con más medio fresco consecutivamente para propiciar la duplicación en medio sin presión selectiva e inducir la pérdida del gen *URA3*. Del cultivo final con 6 diluciones aproximadamente, hicimos diluciones y las plaqueamos en medio con el compuesto 5-FOA, SC-ura y YPD. Las colonias que crecen en 5-FOA, se debe a la pérdida del gen *URA3*. Las células que conservan y expresan el gen *URA3* generan un compuesto tóxico para la célula y por lo tanto no pueden crecer en este medio, pero si pueden crecer en SC-ura. Este tipo de colonias (capaces de crecer en SC-ura y no en 5-FOA) por lo tanto son las que aún contienen el gen *URA3* y las desechamos.

Todas las colonias crecerán en YPD, por lo que para confirmar las colonias que carecen del gen *URA3*, se utiliza el método de Replica en Placa, en el que se utiliza como molde la caja de YPD para pasar las colonias a un terciopelo y de ahí se pasan a su vez a 5-FOA, SC-ura y nuevamente YPD (en ese orden). Las colonias que crezcan en 5-FOA, pero no en SC-ura, las tomamos de la caja de YPD para identificarlas por medio de 3 reacciones de PCR de diagnostico que comprueba los extremos que flanquean el sitio de recombinación y otra que amplifica la región completa. La colonia que efectivamente contiene la delección del gen *URA3* y la construcción que se introdujo del plásmido (el gen **a1** bajo el

control del promotor fuerte constitutivo del gen *PGK1*), y no la configuración inicial triple mutante en los loci *MTL* (*mtl1,2,3*) $\Delta$  es la colonia deseada.



**Figura 9. Esquema del método de transformación de *C. glabrata* de dos pasos.** La cepa receptora es la triple mutante en los loci *MTL* (*mtl1,2,3*) $\Delta$ , CGM531 (Salas, 2008).

## 8. Cepa de *C. glabrata* sobreexpresante de información $\alpha$ .

Inicialmente tratamos de construir otra cepa sobreexpresante de información  $\alpha$  pero no lo logramos, posiblemente porque la sobreexpresión del gen  $\alpha 2$  sea tóxica ya que incluso en *E. coli* donde realizamos las clonaciones necesarias para integrar la construcción en el locus *MTL1* de *C. glabrata*, no obtuvimos colonias con el plásmido sobreexpresante hasta que disminuimos el número de copias del vector. Cuando lo integramos en el genoma de la levadura sólo obtuvimos colonias WT.

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

Para obtener el DNA genómico de levadura, crecimos la cepa de interés en medio YPD líquido por 12 horas a 30°C, centrifugamos el cultivo, lo resuspendimos en 500µl de buffer A con detergente y añadimos otro volumen igual de fenol:cloroformo:isoamílico, agitamos vigorosamente e incubamos a 44°C por 30 minuto. Volvimos a centrifugar para separar la fase acuosa a la cual le agregamos 500µl de buffer A sin detergente e incubamos por 30 min a 44°C. Agregamos 15µl de cloruro de sodio 5M y 2 volúmenes de etanol al 100%. Centrifugamos y lavamos el pellet con etanol al 70% para finalmente resuspender el DNA genómico en 250µl de TER.

## 10. Conservación de plásmidos y cepas.

Los plásmidos los conservaron en las cepas de *E. coli* en glicerol al 10% y las cepas de *C. glabrata* en glicerol al 15%. Ambas cepas a una temperatura de -80°C.

## 11. Obtención de curvas de crecimiento de cepas de *C. glabrata*.

Una característica importante de las cepas es su velocidad de crecimiento y la obtuvimos evaluando su crecimiento tanto en medio líquido enriquecido (YPD), como en medio mínimo líquido (MM) a diferentes temperaturas 30°C, 37°C y 42°C.

Utilizamos un precultivo de cada cepa de 12 h incubado a 30°C con agitación en YPD líquido, del cual tomamos 5µl para inocularlos en 5ml de medio nuevo YPD y los inoculamos a 30°C con agitación por 48 h para llegar a fase estacionaria. Leímos las densidades ópticas ( $OD_{600}$ ) para determinar el volumen necesario del cultivo (YPD o MM) para llevar un volumen de 50ml a una densidad óptica de 0.05 mantuvimos los matraces con los 50 ml de medio sin inocular toda una noche anterior en la temperatura a la cual se evaluaría el crecimiento de la cepa (30°C, 37°C o 42°C). Tomamos 1ml de cada cepa después de inocularlo para confirmar que iniciamos en una densidad óptica de 0.05 y posteriormente cada hora por 12

h. Cuando la densidad óptica se aproximó a 0.5 hicimos diluciones 1:2, 1:5, 1:20, 1:100 según era necesario. Utilizamos medio nuevo (YPD o MM) como blanco. Mantuvimos los matraces en agitación durante todo el experimento.

Para calcular el tiempo de duplicación ( $td$ ) de cada cepa se tomaron de 3 a 5 puntos de la curva de crecimiento en fase logarítmica, calculamos la pendiente ( $m$ ) y utilizamos la fórmula  $td = \ln 2/m$  para obtener el tiempo de duplicación en horas.

## 12. Análisis fenotípico de las cepas de *C. glabrata* en diferentes medios.

- **Crónico**

Crecimos las cepas en medio YPD líquido a 30°C con agitación por 12 h, inoculamos 5  $\mu$ l en 5 ml de YPD líquido a 30°C con agitación por 48 h para llevar el cultivo a fase estacionaria. Leímos la densidad óptica ( $OD_{600}$ ) de cada cepa y preparamos una solución de cada cepa con una densidad óptica de 1. En una placa de 96 pozos hicimos diluciones logarítmicas seriadas y posteriormente con el replicador goteamos estas diluciones en diferentes medios sólidos y las incubamos en 3 diferentes temperaturas. Tomamos fotografías cada día a partir de los dos días para evaluar el crecimiento en cada medio.

Una de las condiciones evaluadas fue la anaerobiosis; utilizamos una cámara de anaerobiosis en la cual se extrae el aire en su interior con una bomba de vacío y posteriormente se introduce una mezcla de  $H_2$  y  $CO_2$  en una proporción de 5% y 95%, respectivamente. Este procedimiento se realiza tres veces para asegurar la ausencia de oxígeno.

- **Agudo**

Para evaluar el fenotipo de cada cepa al recibir un estímulo externo crecimos las cepas en medio líquido enriquecido (YPD) a 30°C con agitación por 12 h y con este cultivo inoculamos 75 ml de YPD y lo incubamos a 30°C por 48 h para llevar el cultivo a fase estacionaria. Centrifugamos el total del cultivo, medimos el



volumen del medio usado y lo inoculamos para obtener una densidad óptica de 1. Tomamos 5ml de la suspensión para cada uno de los tratamientos utilizados, así como para el control sin tratamiento. Agregamos a cada tubo el tratamiento al cual sería sometida la suspensión celular y fueron incubados en su respectiva temperatura 30°C o 42°C por 3 h. Transcurrido el tiempo del tratamiento volvimos a leer la densidad óptica de cada cepa para tomar el volumen necesario para obtener una densidad óptica de 1 al resuspender en 1 ml. En una placa de 96 pozos hicimos diluciones logarítmicas seriadas y posteriormente con el replicador goteamos estas diluciones en diferentes medios sólidos y las incubamos en 3 diferentes temperaturas. Tomamos fotografías cada día a partir de los dos días para evaluar el crecimiento en cada medio.

### **13. Análisis de expresión de $\alpha 1$ .**

Para confirmar que nuestras cepas expresan solo el tipo de información deseada y que nuestra cepa efectivamente es sobreexpresante de información **a** realizamos un análisis de los transcritos mediante RT-PCR.

Extrajimos el RNA de nuestras cepas en fase estacionaria, lo tratamos con DNAasa para eliminar los restos de DNA. Posteriormente generamos la primera cadena de cDNA y a partir de este una reacción de PCR en la cual amplificamos secuencias internas de los genes de interés utilizando oligonucleótidos internos de  $\alpha 1$  (468/469),  $\alpha 1$  (288/289) y de  $\alpha 2$  (290/291).

Posteriormente realizamos un análisis semicuantitativo en el que cuantificamos los pixeles de las bandas en el programa Quantity One© y normalizamos la expresión de la cepa WT y determinamos la expresión relativa de las demás cepas.

### **14. Exposición a radiación ultravioleta.**

Después de gotear las diluciones celulares en medio sólido enriquecido (YPD) y una vez secas, introdujimos las cajas abiertas en el entrecruzador y las expusimos a diferentes dosis de luz UV, la cual determinamos en el aparato en  $\mu\text{J}/\text{cm}^2 \times 100$

(que son las unidades que se nos permite establecer en el aparato). Puesto que al introducir "100"  $\mu\text{J}/\text{cm}^2$  y multiplicado por 100 y exponer por 1 s era igual a 1  $\text{J}/\text{m}^2$ , para utilizar mayores dosis, alargamos la exposición los segundos necesarios según sean los  $\text{J}/\text{m}^2$  a los que deseábamos exponer nuestras cepas.

Terminado el tiempo de exposición sacamos las cajas, las cerramos y las envolvimos en papel aluminio para evitar que radiaciones ambientales extras pudieran afectar el fenotipo. Finalmente las incubamos a diferentes temperaturas.

#### **15. Evaluación del crecimiento de colonias aisladas.**

Crecimos las cepas de interés en caldo YPD por 12 h, después de las cuales inoculamos con 5  $\mu\text{l}$ , un tubo con 5ml de medio nuevo y lo incubamos a 30°C por 48 h para llevar a las células a fase estacionaria. Medimos la densidad óptica y preparamos una suspensión con una  $\text{OD}_{600}=1$  a partir de la cual preparamos diluciones  $10^{-4}$  y  $10^{-5}$ . De estas suspensiones tomamos 100  $\mu\text{l}$  y los sembramos en cajas de con diferentes medios e incubamos a diferentes temperaturas: 30°C, 37°C y ~45°C.

## RESULTADOS

### 1. Generación de la cepa de *C. glabrata* sobreexpresante de información $\alpha$ .

Para construir la cepa sobreexpresante de información  $\alpha$  a partir de *MTL1*, utilizamos el método de dos pasos (Fig. 9) en el cual utilizamos el plásmido pTP7 que contiene el gen  $\alpha 1$  bajo el promotor del gen *PGK1* que es un promotor constitutivo fuerte que proviene de *S. cerevisiae* y funciona de igual manera en *C. glabrata*. Esta construcción está flanqueada por regiones de homología presentes en el locus *MTL1*. El plásmido se insertó por recombinación homóloga en el cromosoma de la cepa triple mutante en el locus *MTL1* de *C. glabrata*. Después de la transformación en la cepa (*mtl1,2,3*) $\Delta$  seleccionamos las colonias Ura3<sup>+</sup>, es decir las capaces de crecer en SC-ura. Posteriormente realizamos la resolución de la integración para escindir el cassette de *URA3*, al crecerla en medio enriquecido (YPD). De esta manera recuperamos cepas transformantes que ahora contienen insertado en el locus *MLT1* el gen  $\alpha 1$  bajo el promotor fuerte *PGK1* y mutaciones nulas en los loci *mtl2* $\Delta$  y *mtl3* $\Delta$ . Los fenotipos que se obtuvieron se muestran en las siguientes secciones.

### 2. Obtención de curvas de crecimiento y tiempos de duplicación de cepas de *C. glabrata* que contienen distinta información de apareamiento.

Evaluamos el crecimiento de siete cepas en medio líquido enriquecido (YPD) y en medio mínimo (MM) a tres diferentes temperaturas: 30°C, 37°C y 42°C. Tomando en cuenta que la temperatura óptima de crecimiento de la esta levadura es de 37°C, evaluamos también temperaturas por encima y por debajo de esta, como describimos en materiales y métodos.

Las cepas que analizamos se presentan en la siguiente tabla:

Tabla 4. Genotipo e información de apareamiento de las cepas utilizadas.

CEPA	GENOTIPO	MTL1	MTL2	MTL3
CGM1	WT	<b>a</b>	<b>a</b>	<b><math>\alpha</math></b>
CGM531	<i>(mtl1,2,3)</i> $\Delta$	-	-	-
CGM707	MTL1 $\alpha$ -R	$\alpha$	-	-
CGM904	MTL1 <b>a</b> -R	<b>a</b>	-	-
CGM905	MTL1 <b>a</b> -R2	<b>a</b>	-	-
CGM978	MTL1 <b>a</b> -SE	<b>a</b>	-	-
CGM460	<i>mtl3</i> $\Delta$	<b>a</b>	<b>a</b>	-
CBS138	Cepa estándar (silvestre secuenciada)	<b><math>\alpha</math></b>	<b>a</b>	<b><math>\alpha</math></b>

### 2.1. EN MEDIO ENRIQUECIDO (YPD)

A 30°C el crecimiento es similar en la mayoría de las cepas, sólo la cepa mutante en el locus *mtl3* $\Delta$  se observa un crecimiento ligeramente más rápido según los tiempos de duplicación promedio (54 min) comparadas con las demás cepas que conservan unos tiempos de duplicación promedio de 65 min en promedio, incluyendo a la cepa WT del laboratorio (Fig. 10) (Tabla 5).

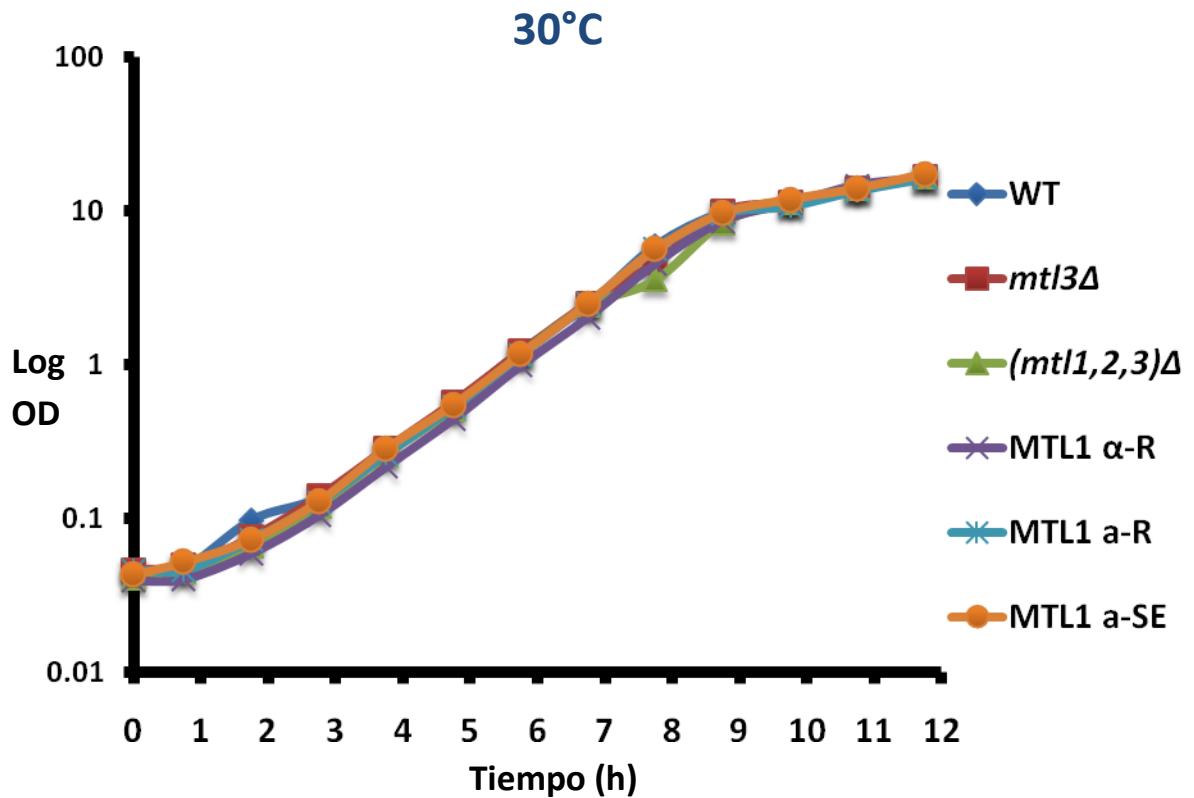


Figura 10. Crecimiento de cepas mutantes en los loci *MTL* a 30°C en caldo YPD.

La velocidad de crecimiento a 37°C en la mayoría de las cepas fue mayor que a 30°C, excepto por la cepa mutante en *mtl3*Δ y la cepa sobreexpresante de información **a**, las cuales muestran un crecimiento ligeramente más lento a esta temperatura (Fig. 11) (Tabla 5).

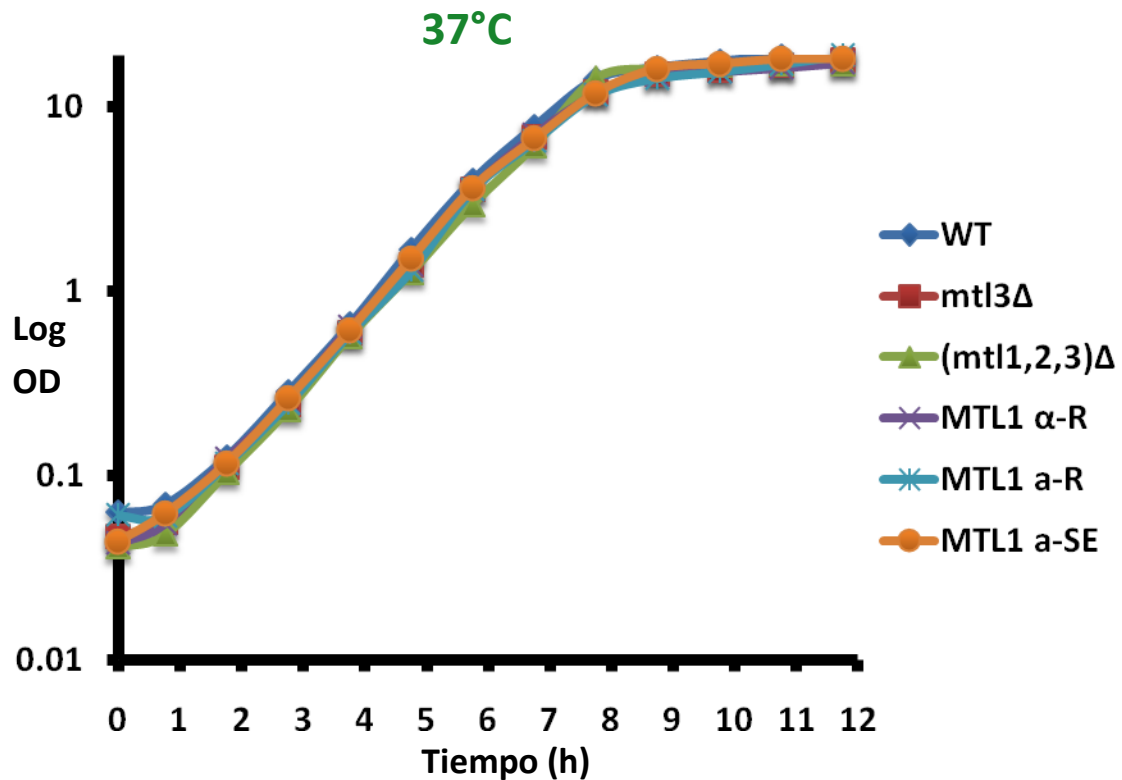


Figura 11. Crecimiento de cepas mutantes en los loci *MTL* a 37°C en caldo YPD.

A 42°C en general nuestras cepas mostraron un crecimiento más rápido que a 37°C en medio enriquecido pues en general mantienen un tiempo de duplicación promedio de 48 min. Este fenotipo es menos marcado en la cepa sobreexpresante de información *a*, pues aunque tiene menor tiempo de duplicación que a 37°C, es más alto que a 30°C, lo cual no sucede en las demás cepas. (Fig. 12) (Tabla 5).

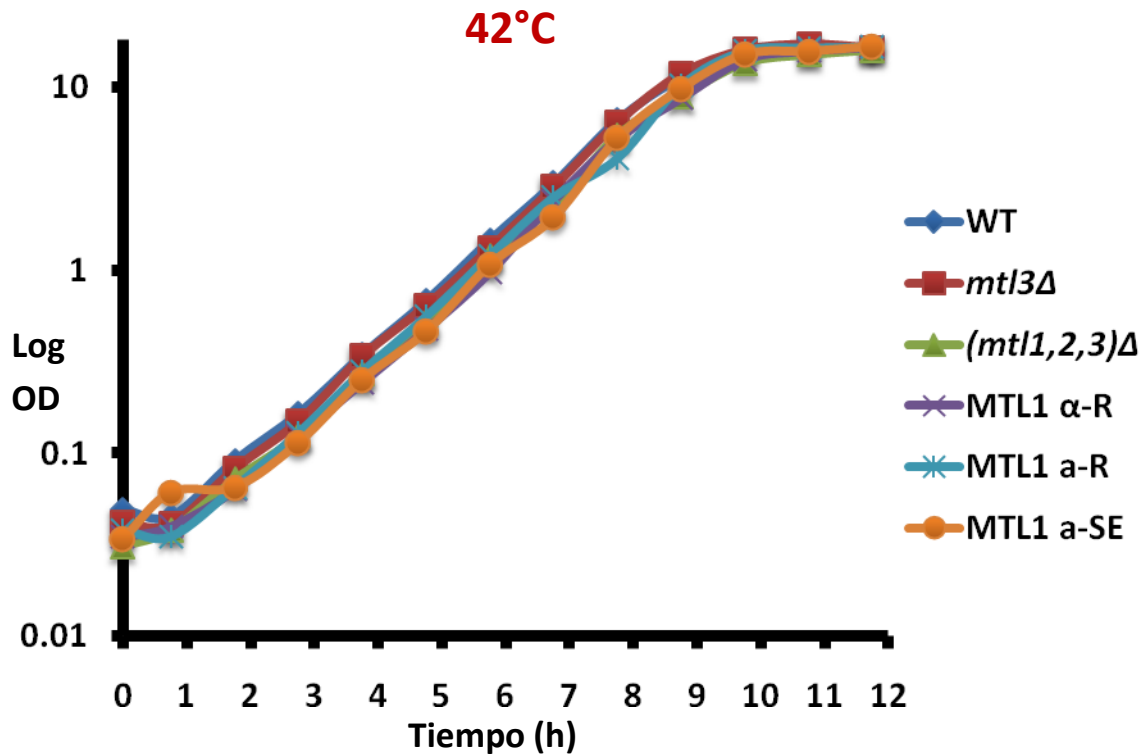


Figura 12. Crecimiento de cepas mutantes en los loci *MTL* a 42°C en caldo YPD.

Es importante mencionar que en las Figuras 10, 11 y 12 solo se muestra una gráfica de un experimento y los tiempos de duplicación mostrados en la Tabla 5 son un promedio y desviaciones estándar de dos experimentos, excepto por las cepas *mtl3* $\Delta$  y MTL1 a-SE, las cuales sólo fueron evaluadas una vez.

Tabla 5. Tiempos de duplicación en minutos de cepas de *C. glabrata* en caldo YPD a tres temperaturas.

CEPAS	30°C	37°C	42°C
WT	68±5	61±4	68±7
$(mtl3\Delta)$	54	69	58
$(mtl1,2,3)\Delta$	64±6	51±6	64±6
MTL1 $\alpha$ -R	65±11	62±8	65±6
MTL1 a-R	68±8	58±0.5	59±3
MTL1 a-SE	62	70	61

## 2.2. EN MEDIO MÍNIMO (MM)

También evaluamos el crecimiento de nuestras cepas en medio mínimo líquido a estas tres temperaturas. En este medio todas nuestras cepas disminuyeron la velocidad de crecimiento debido a la limitación nutricional propia del medio, sin embargo la cepa triple mutante, la reconstituida con información **a** y la cepa sobreexpresante de información **a** son ligeramente más rápidas en su crecimiento pues tienen un tiempo de duplicación promedio menor (85 min) respecto a la WT (91 min), mientras que la cepa reconstituida con información  $\alpha$  parece ser ligeramente más lenta en este medio pues requiere 100 min para duplicarse (Fig. 13) (Tabla 6).

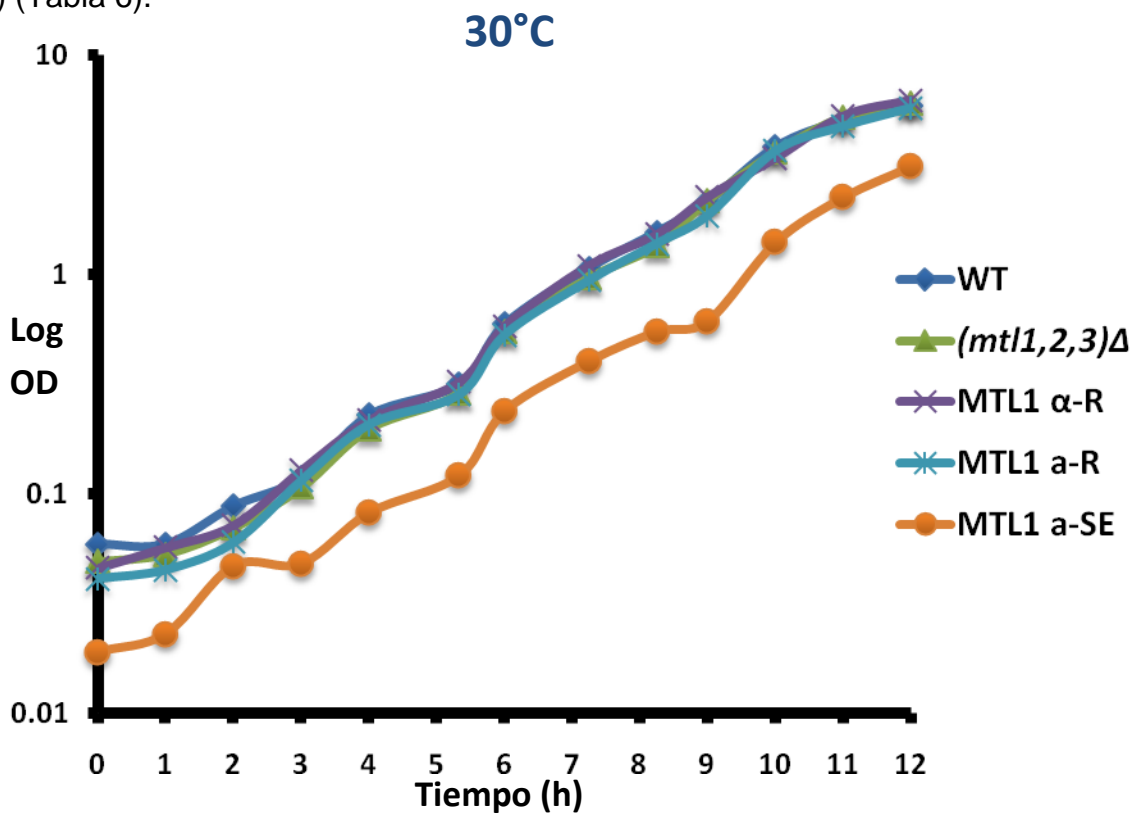


Figura 13. Crecimiento de cepas mutantes en los loci *MTL* a 30°C en medio mínimo.

A 37°C en medio mínimo claramente se observa que el crecimiento de todas las cepas es más lento, incluyendo a nuestra cepa WT, pues su tiempo de duplicación disminuye hasta 107 min en promedio (Fig. 14) (Tabla 6). Éste mismo fenotipo se



observó a 42°C, donde también mantienen en general ese crecimiento lento (Fig. 14) (Tabla 6).

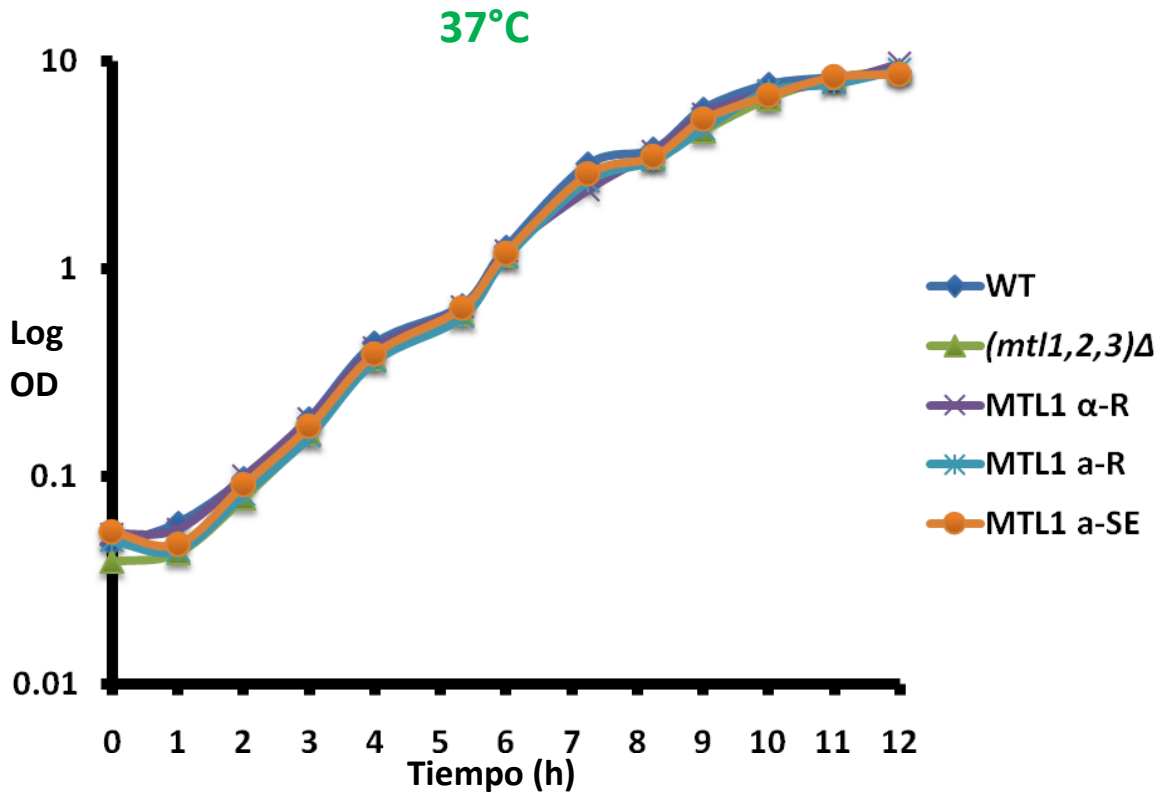


Figura 14. Crecimiento de cepas mutantes en los loci *MTL* a 37°C en medio mínimo.

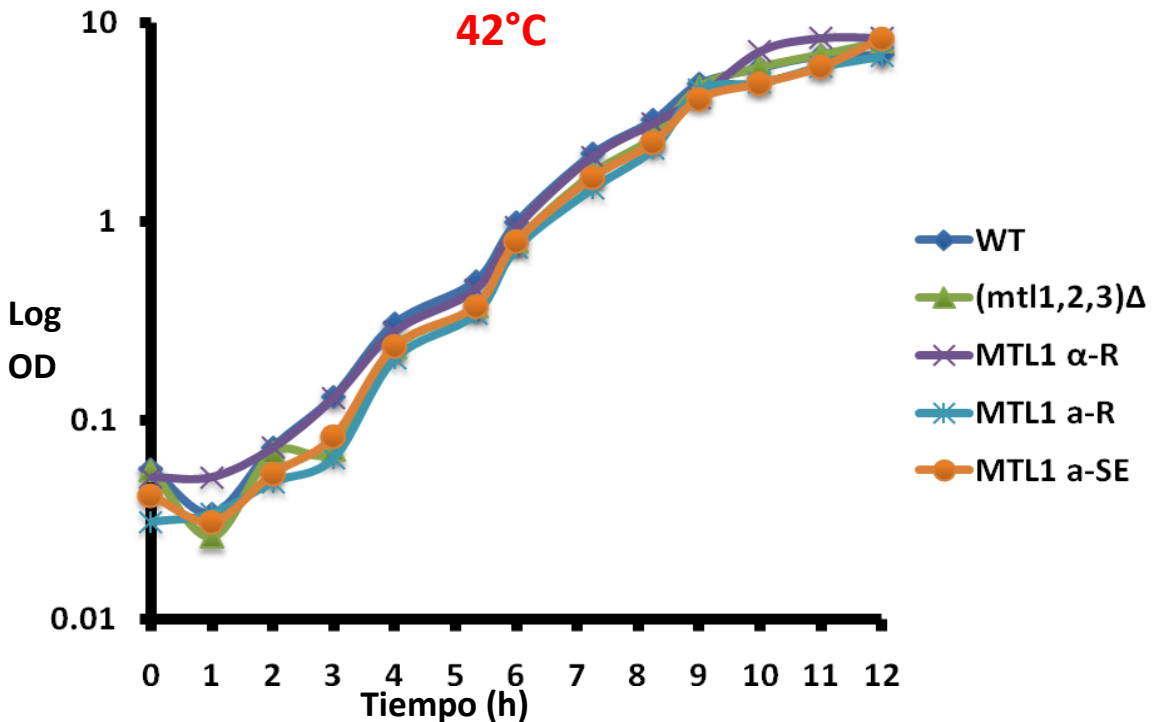


Figura 15. Crecimiento de cepas mutantes en los loci *MTL* a 42°C en medio mínimo.

**Tabla 6. Tiempos de duplicación en minutos de seis cepas de *C. glabrata* en medio mínimo a tres temperaturas.**

CEPAS	30°C	37°C	42°C
WT	91±3	108±15	102±8
( <i>mtl1,2,3</i> ) $\Delta$	84±10	108±2	98±0
MTL1 $\alpha$ -R	100±2	109±7	102±10
MTL1 $a$ -R	88±11	102±9	108±11
MTL1 $a$ -SE	84±4	111±7	106±0.7

### 3. Expresión del gen $a1$

Para confirmar que nuestra cepa sobreexpresante de información **a** y que las cepas reconstituidas con esta información efectivamente expresan y procesan correctamente esta información en los niveles deseables, realizamos una RT-PCR como describimos en Materiales y Métodos.

La cepa CBS138, que es la cepa de referencia secuenciada de *C. glabrata* expresa el gen **a1** (a partir del locus *MTL2*) en un nivel un poco menor al de la cepa control WT, pero el transcrito no se procesa. Sin embargo, ambas cepas reconstituidas con información **a**, expresan el gen **a1** y lo procesan en un nivel similar a la cepa WT, pero no así el transcrito semi procesado y no procesado, los cuales presentan un nivel de expresión menor que en la cepa WT (Fig. 16).

Por su parte la cepa sobreexpresante mostró una expresión del transcrito totalmente procesado mucho mayor que la cepa WT, así como el transcrito semi procesado con una expresión medianamente mayor, mientras que el transcrito no procesado tiene un nivel de expresión similar en la cepa WT (Fig. 16).

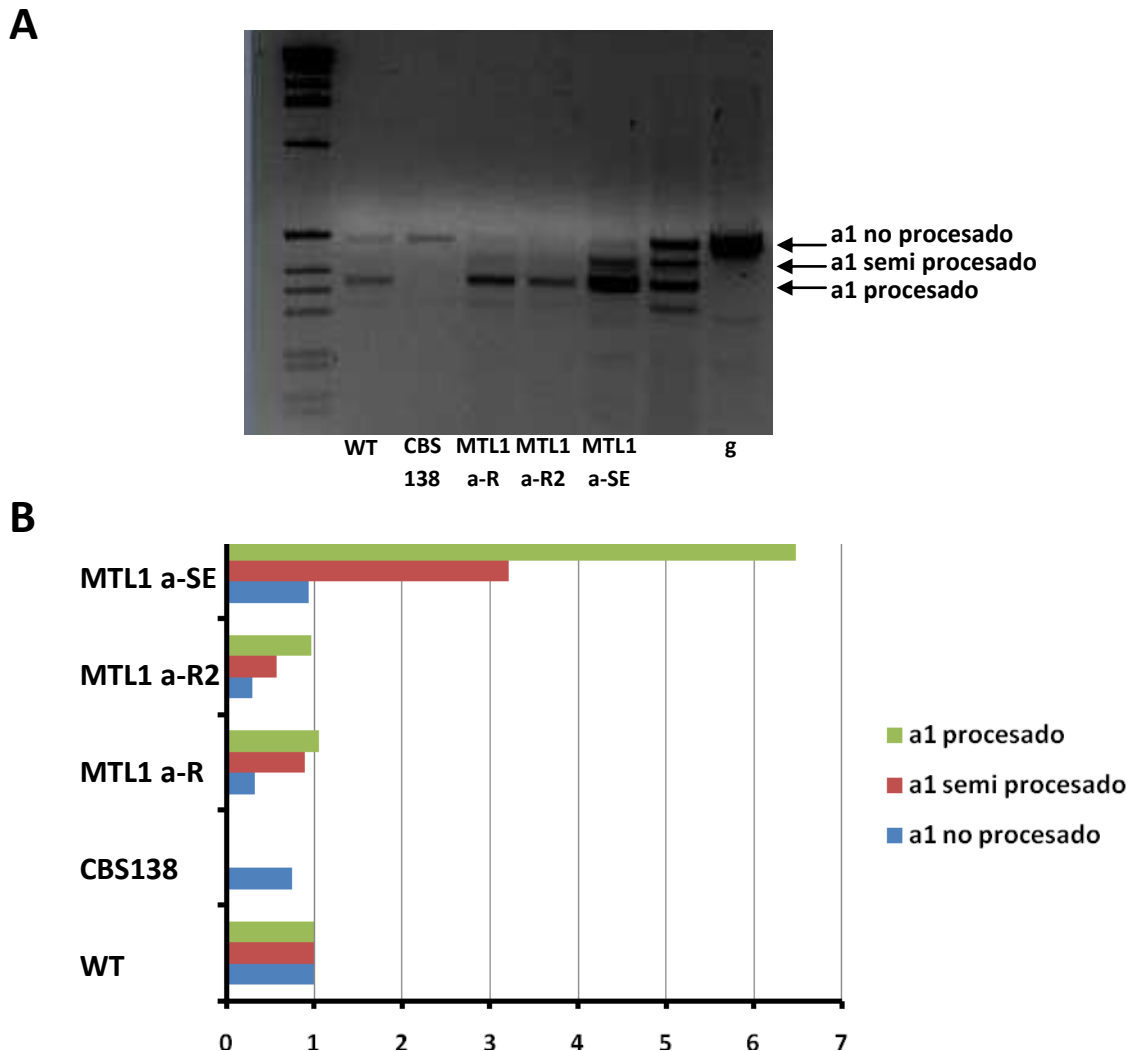


Figura 16. Procesamiento del transcrito del gen  $\alpha 1$  en las cepas de *C. glabrata* con información  $\alpha$  reconstituida en el locus *MTL1*.

A) Se muestra el gel de la RT-PCR donde se indican los tres productos del procesamiento del transcrito del gen  $\alpha 1$  que es posible detectar. B) Cuantificación relativa de los tres tipos de transcritos del gen  $\alpha 1$  en cada cepa comparada con la cepa WT.

#### 4. Evaluación fenotípica de las cepas de *C. glabrata* en diferentes condiciones

Como mencionamos anteriormente creemos que en algunas células de nuestra cepa silvestre se están expresando tanto información  $\alpha$  como  $\alpha$  (de *MTL3*) y se sabe que las proteínas  $\alpha 1$  y  $\alpha 2$  codificadas en estos genes son factores transcripcionales que al unirse forman un heterodímero represor de varias vías

metabólicas (GALGOCZY *et al.* 2004), es por eso que nos preguntamos si la expresión ya sea de solo uno o ningún tipo de información de apareamiento, o la sobreexpresión de **a1** puede tener efecto en alguna de estas vías. Para ello evaluamos el fenotipo en respuesta a doce estímulos estresantes y a tres temperaturas diferentes: 30°C, 37°C y 46±1°C. Este rango de temperatura se debió a que en algunos experimentos nos fue imposible estabilizar la temperatura de incubación debido a las variaciones de la incubadora y a la temperatura ambiental.

De los doce estímulos a los cuales fueron expuestas nuestras cepas, no encontramos ningún fenotipo diferencial en nueve de ellos, los cuales son descritos a continuación.

#### **4.1. Por pH**

Para evaluar el fenotipo de nuestras cepas a diferentes pHs tomando en cuenta que el pH óptimo del crecimiento de las levaduras del género *Candida* oscila entre 4.5 y 7, utilizamos estos valores extremos en los medios que generalmente se utilizan para su cultivo y amortiguando los medios al pH correspondiente: YPD que es un medio enriquecido y SC un medio con aminoácidos, nitrógeno, azufre y fósforo, pero carece de uracilo, por lo que debemos adicionarlo con esta pirimidina puesto que nuestras cepas son *ura3Δ*. En la Figura 17 mostramos un ejemplo del crecimiento en medio enriquecido (YPD) a pH 4.5 y 7 pero el fenotipo que observamos fue igual en medio CAA en ambos valores de pH, los cuales se muestran en Anexos.

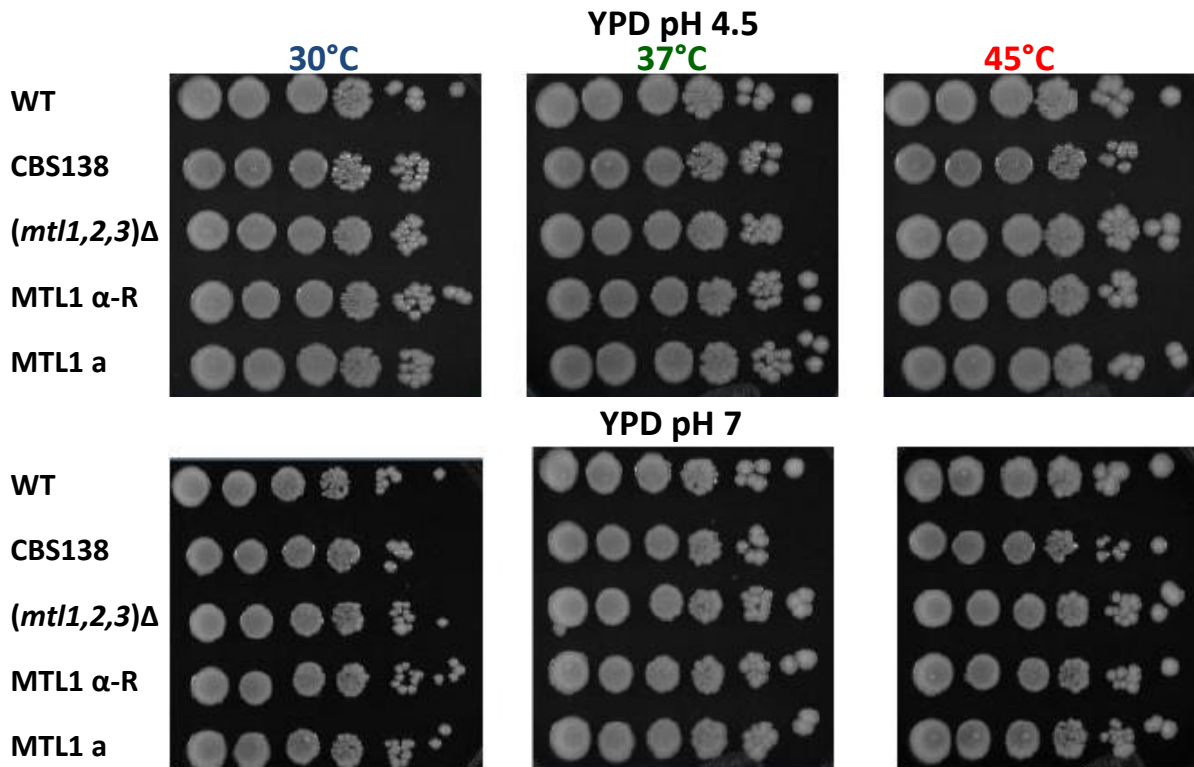


Figura 17. Evaluación del crecimiento de las cepas de *C. glabrata* mutantes en los loci *MTL* en agar YPD a pH 4.5 y 7.

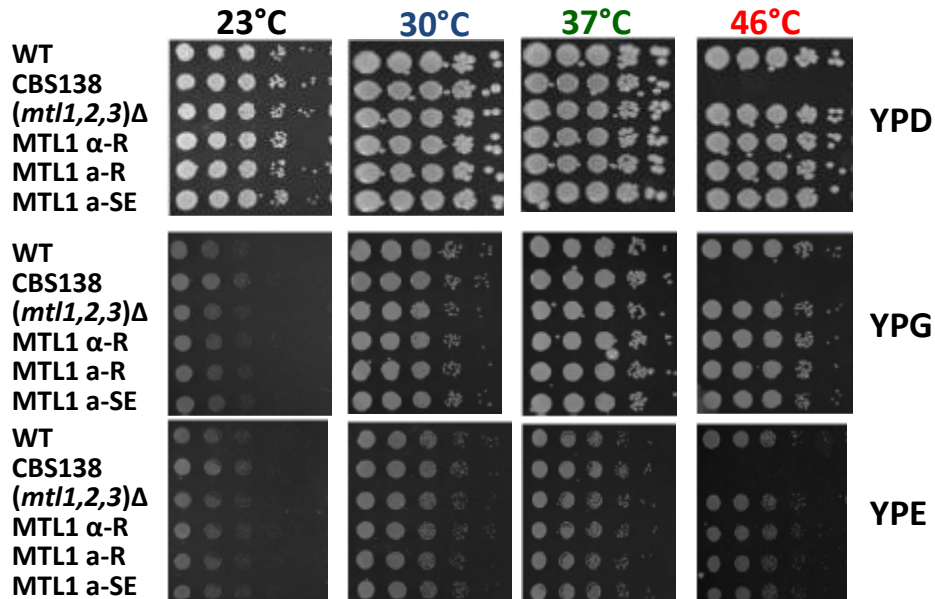
Realizamos diluciones logarítmicas seriadas de suspensiones celulares y se depositaron 5  $\mu$ l de cada dilución en el medio de crecimiento. Incubamos las cajas a las temperaturas indicadas y se fotografiaron a las 48 h.

#### 4.2. Otras fuentes de carbono

Por otro lado nos preguntamos si los factores transcripcionales  $\alpha 1$ ,  $\alpha 1$  y  $\alpha 2$  están involucrados en el metabolismo fermentativo u oxidativo. Utilizamos medio enriquecido (YP) adicionado con glucosa (YPD) como control, así como glicerol (YPG) y etanol (YPE) como fuentes de carbono no fermentables. Además de las tres temperaturas antes mencionadas, utilizamos una menor la cual fluctuaba entre los 22°C y 26°C, pues para evaluar esta temperatura más baja colocamos las cajas en la mesa del laboratorio, por lo que la temperatura variaba a lo largo del experimento, pero la mencionaremos como 23°C.

Todas las cepas mostraron un mejor crecimiento en el medio con glucosa como fuente de carbono y el crecimiento fue más lento en los medios con glicerol y etanol como se esperaba. También observamos que la temperatura a la cual todas las cepas crecen mejor es a 37°C.

La cepa CBS138 no tiene la capacidad de crecer en ninguna de las tres condiciones a 46°C. Sin embargo, entre las demás cepas no hubo diferencias en su crecimiento bajo ninguna condición.



**Figura 18. Evaluación del crecimiento de las cepas de *C. glabrata* mutantes en los loci *MTL* en agar YP con diferentes fuentes de carbono.**

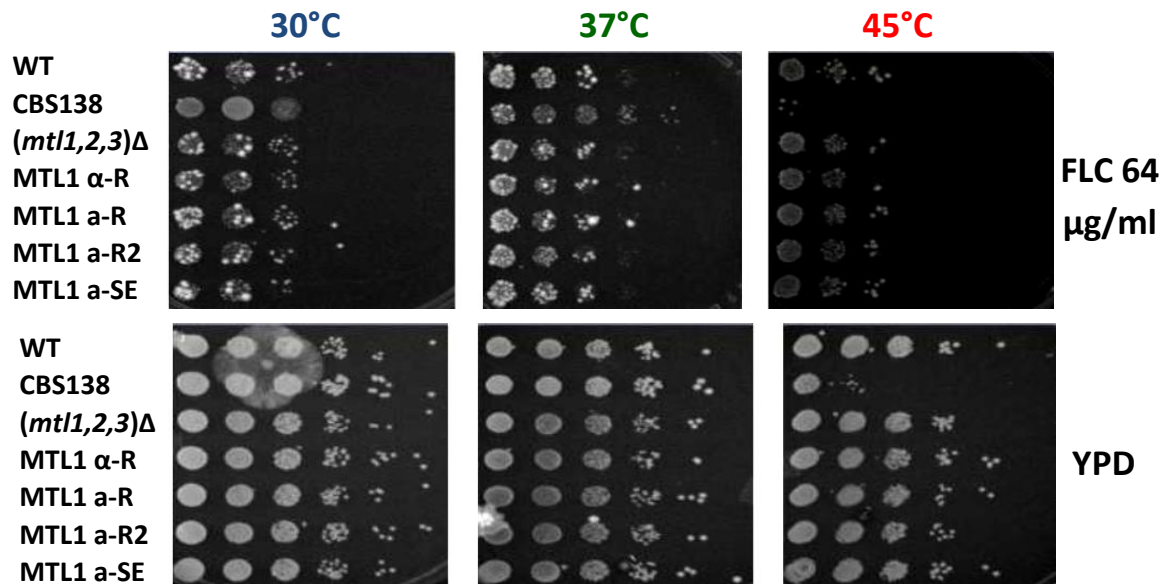
Realizamos diluciones logarítmicas seriadas de suspensiones celulares y se depositaron 5  $\mu$ l de cada dilución en el medio de crecimiento. Incubamos las cajas a las temperaturas indicadas y se fotografiaron a las 48 h.

#### 4.3. Fluconazol (FLC)

Debido a que *C. glabrata* tiene una resistencia innata a los azoles (PFALLER *et al.* 2004), quisimos evaluar si el hecho de contener uno, ambos o ningún tipo de información de apareamiento podría ser determinante para conservar dicho fenotipo. Para lo cual utilizamos cajas con medio enriquecido adicionado con fluconazol (FLC) en concentraciones desde 16  $\mu$ g/ml hasta 128  $\mu$ g/ml y las incubamos a tres temperaturas mencionadas. Este antifúngico inhibe la síntesis de la membrana celular al inhibir la actividad del producto del gen *ERG11*, indispensable en este proceso.

Cabe mencionar que se consideran cepas resistentes a fluconazol cuando se observa crecimiento en el medio con 64  $\mu$ g/ml o más de fluconazol (SANGUINETTI *et al.* 2005). Como se muestra en la Figura 18, a excepción de la cepa CBS138, la

cual a 30°C y 37°C parece ser mucho más resistente a fluconazol y a 45°C es mucho más sensible, que las demás, posiblemente debido a la alta temperatura a la que es sensible aún en medio sin fluconazol. Sin embargo, todas las cepas muestran una resistencia menor a la cepa CBS138 pero similar entre sí en todo el intervalo de concentraciones evaluadas. Los experimentos de las otras concentraciones se encuentran en Anexos.



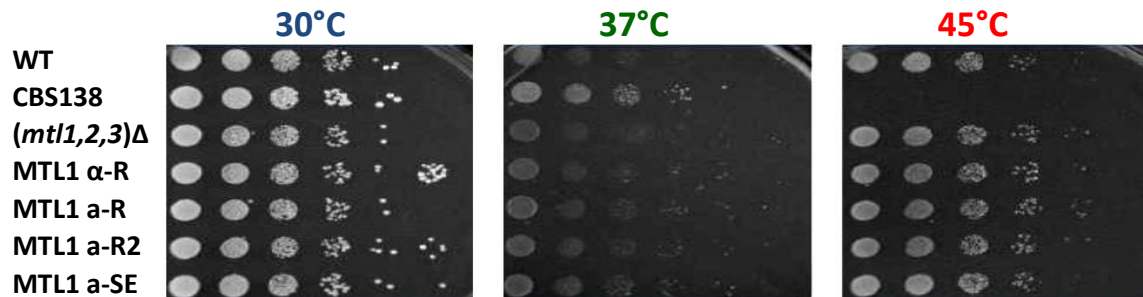
**Figura 19. Evaluación del crecimiento de las cepas de *C. glabrata* mutantes en los loci *MTL* en agar YPD con fluconazol.**

Realizamos diluciones logarítmicas seriadas de suspensiones celulares y se depositaron 5 µl de cada dilución en el medio de crecimiento. Incubamos las cajas las temperaturas indicadas y se fotografiaron a las 72 h.

#### 4.4. Medio Spore (baja concentración de nitrógeno)

El medio Spore es un medio mínimo, pero su característica principal es que tiene solo un 0.1% de la concentración normal de la fuente de nitrógeno. Se sabe que en *Saccharomyces cerevisiae*, es posible inducir pseudohifas en células diploides *a/a* en condiciones de depleción de nitrógeno y en presencia de una fuente fermentable de carbono como la glucosa (GIMENO *et al.* 1992). Por lo cual investigamos si nuestras cepas que solo expresan un solo tipo de información o ninguno son capaces de inducir fermentación o presentar un fenotipo de crecimiento diferencial respecto a la cepa silvestre que pudiera expresar ambos tipos de información.

Como se observa en la Figura 20, excepto por la cepa CBS138 la cual presenta un fenotipo de crecimiento relativamente más rápido a 37°C (y sensibilidad a la alta temperatura de 45°C); la mayoría de las cepas no presentan un fenotipo diferencial entre sí y además al observarlas al microscopio no observamos crecimiento filamentososo.

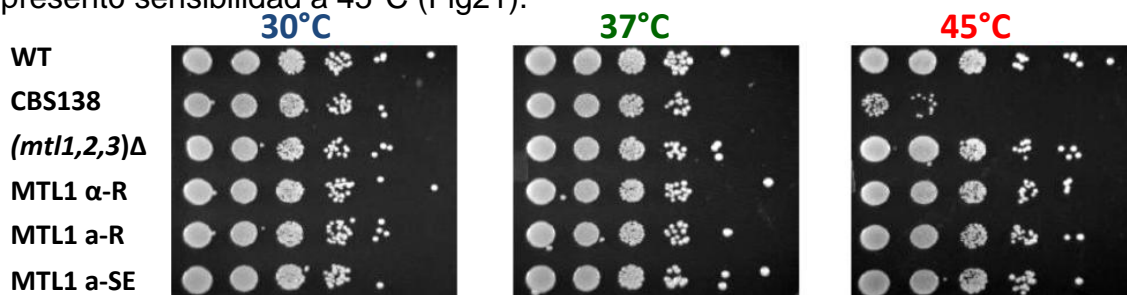


**Figura 20. Evaluación del crecimiento de las cepas de *C. glabrata* mutantes en los loci *MTL* en agar Spore.**

Realizamos diluciones logarítmicas seriadas de suspensiones celulares y se depositaron 5  $\mu$ l de cada dilución en el medio de crecimiento. Incubamos las cajas a las temperaturas indicadas y se fotografiaron a los 6 d.

#### 4.5. Medio Mínimo (MM + ura)

Este es un medio mínimo carente de aminoácidos, contiene sulfato de amonio como fuente de nitrógeno. Generalmente en este medio se muestran fenotipos que en medio enriquecido no son visibles. Sin embargo, no obtuvimos ningún fenotipo en este medio. Como control de temperatura, la cepa CBS138 que presentó sensibilidad a 45°C (Fig21).



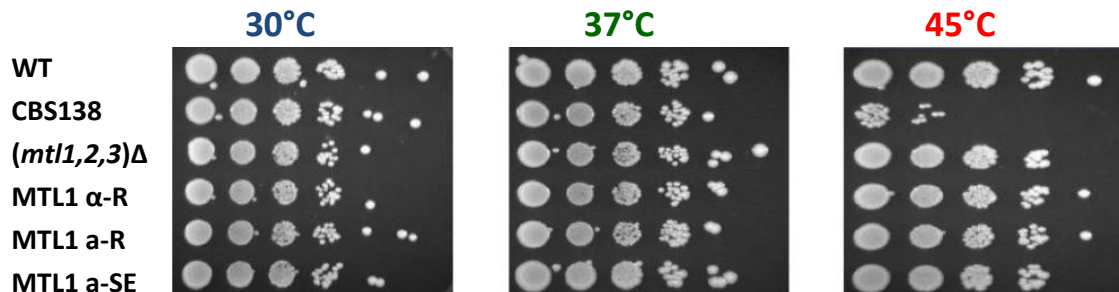
**Figura 21. Evaluación del crecimiento de las cepas de *C. glabrata* mutantes en los loci *MTL* en medio mínimo.**

Realizamos diluciones logarítmicas seriadas de suspensiones celulares y se depositaron 5  $\mu$ l de cada dilución en el medio de crecimiento. Incubamos las cajas a las temperaturas indicadas y se fotografiaron a las 48 h.



#### 4.6. Casaminoácidos (CAA + ura)

El medio CAA es similar al medio mínimo, en este caso el medio CAA contiene aminoácidos y debido a que nuestras cepas son *ura<sup>-</sup>* contienen la mutación *ura3 $\Delta$*  le añadimos uracilo para que puedan crecer. Tampoco observamos un fenotipo diferencial en nuestras cepas, solo en la cepa CBS138 a 45°C (Fig. 22).



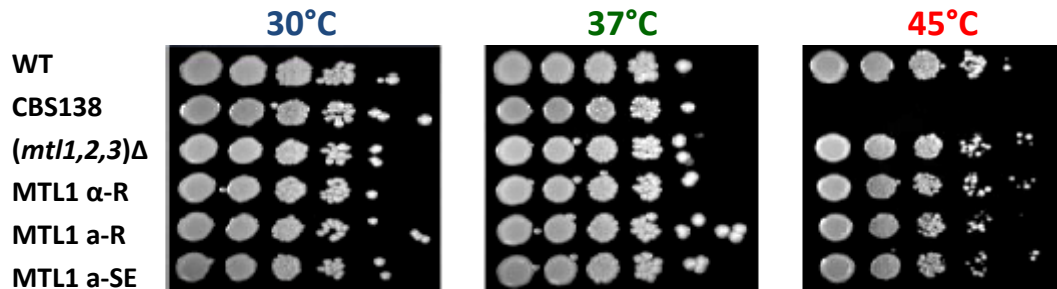
**Figura 22. Evaluación del crecimiento de las cepas de *C. glabrata* mutantes en los loci *MTL* en medio CAA.**

Realizamos diluciones logarítmicas seriadas de suspensiones celulares y se depositaron 5  $\mu$ l de cada dilución en el medio de crecimiento. Incubamos las cajas a las temperaturas indicadas y se fotografiaron a las 48 h.

#### 4.7. Rojo Congo (RC)

Para evaluar si los factores transcripcionales  $\alpha 1$ ,  $\alpha 1$  y  $\alpha 2$  están involucrados en la resistencia o sensibilidad a estrés en la pared celular utilizamos el compuesto rojo congo. Es un colorante aniónico que se utiliza para teñir la pared celular de los hongos, sin embargo provoca la inhibición del correcto ensamble de la pared celular puesto que interfiere con la formación de fibras de polisacáridos al unirse a la red de 1,3  $\beta$  glucano y esto disminuye la rigidez de la membrana celular (KOPECKA and GABRIEL 1992).

Utilizamos las concentraciones de 250, 300, 400, 500 y 2000  $\mu$ g/ml de rojo congo a las tres diferentes temperaturas que se han mencionado antes. Sin embargo, en ninguna concentración encontramos ningún fenotipo diferencial. La cepa CBS138, presentó un fenotipo de sensibilidad a 45°C independientemente de la presencia de rojo congo (Fig. 23).



**Figura 23. Evaluación del crecimiento de las cepas de *C. glabrata* mutantes en los loci *MTL* en agar YPD con rojo congo.**

Realizamos diluciones logarítmicas seriadas de suspensiones celulares y se depositaron 5  $\mu$ l de cada dilución en el medio de crecimiento. Incubamos las cajas a las temperaturas indicadas y se fotografiaron a las 48 h.

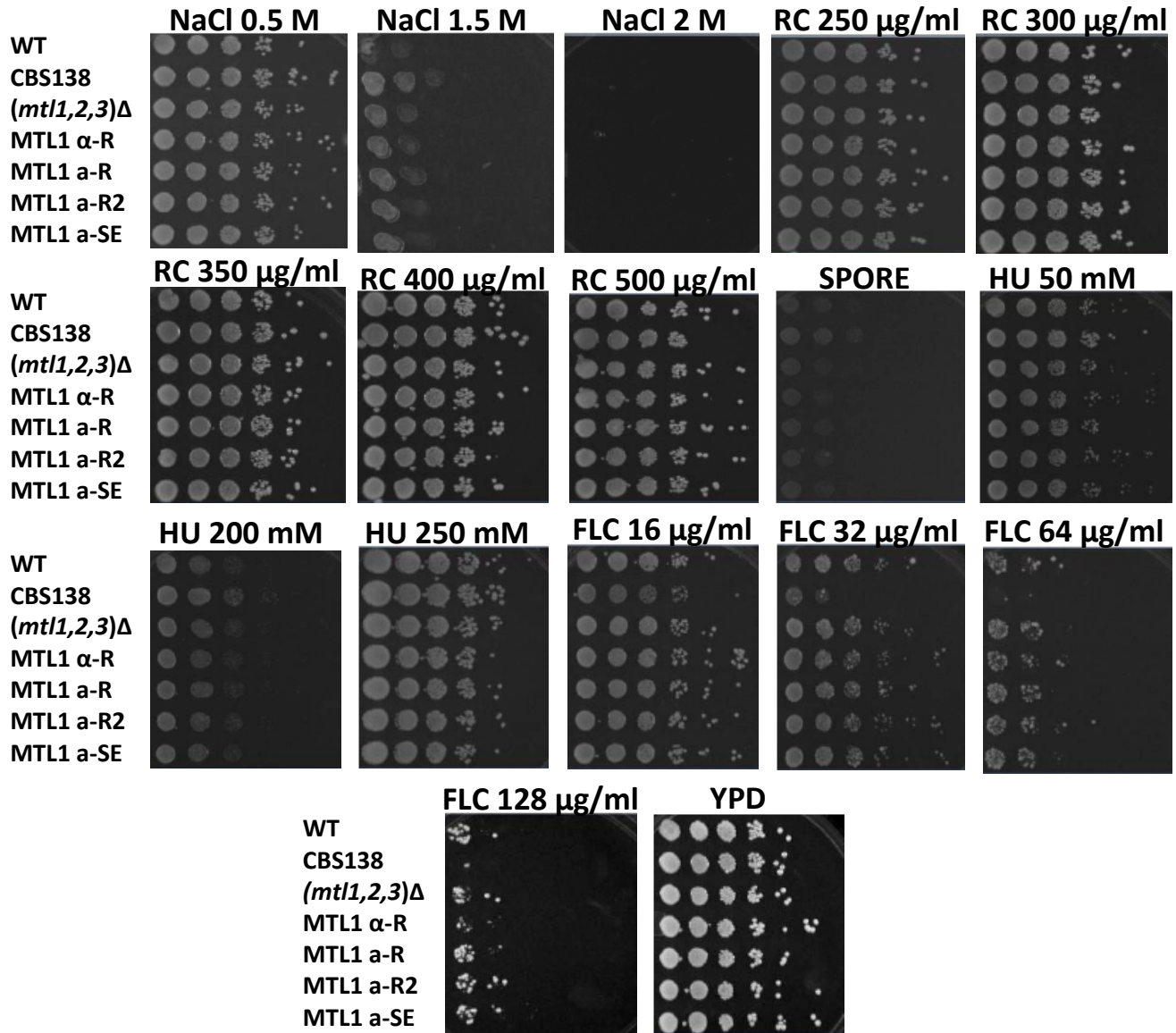
#### 4.8. Anaerobiosis

Se ha descrito anteriormente que las condiciones anaerobias pueden inducir el cambio fenotípico en *C. albicans* de colonias blancas a opacas y que posiblemente esta es la condición por la cual es posible que haya células competentes para el apareamiento dentro del hospedero mamífero y no debido a la temperatura (HUANG *et al.* 2009). Por lo anterior decidimos evaluar cuál era el fenotipo de nuestras cepas en condiciones anaeróbicas en diferentes medios a una temperatura variable entre 23°C y 26°C.

Evaluamos el fenotipo de nuestras cepas en 17 medios en condiciones de anaerobiosis, como se describe en materiales y métodos. Los medios utilizados fueron: NaCl como un agente que produce estrés osmótico, rojo congo (RC) como agente que interfiere en la construcción de la pared celular, medio Spore que contiene cantidades muy limitantes de nitrógeno y en hongos filamentosos induce la filamentación, hidroxihurea (HU) que inhibe la enzima ribonucleótido reductasa indispensable para la síntesis de nucleótidos y por lo tanto interfiere en la síntesis de DNA, fluconazol (FLC) que es un antifúngico que inhibe la síntesis de ergosterol, componente de la membrana celular y el medio enriquecido (YPD) que es nuestro medio control.

Como se muestra en la Figura 24, excepto por la cepa CBS138 la cual mostró una mayor resistencia en NaCl 1.5 M y en medio Spore, así como una mayor

sensibilidad en presencia de fluconazol; en ningún medio encontramos un fenotipo diferencial de alguna de nuestras cepas analizadas.



**Figura 24. Evaluación del crecimiento de las cepas de *C. glabrata* mutantes en los loci *MTL* en diferentes condiciones anaerobias.**

Realizamos diluciones logarítmicas seriadas de suspensiones celulares y se depositaron 5  $\mu$ l de cada dilución en el medio de crecimiento. Incubamos las cajas a una temperatura fluctuante entre 23°C y 26°C y se fotografiaron a las 72 h.

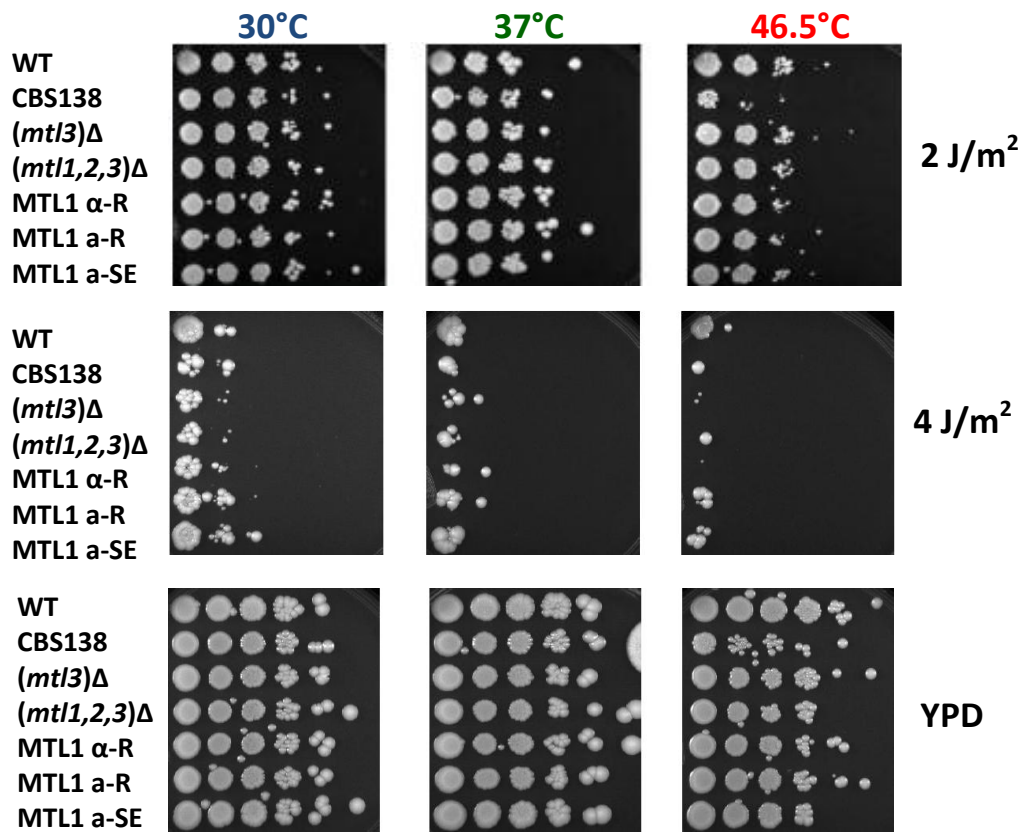
#### 4.9. Radiación ultravioleta (UV)

La radiación ultravioleta induce la formación de dímeros de timina y en menor proporción también forma dímeros de timina y citocina, así como dímeros de

citocinas; lo cual produce una distorsión en el enlace fosfodiéster entre las dos cadenas de DNA (BEUKERS and BERENDS 1960). También existen otros fotoproductos llamados hidratadas de ácido citidílico, así como el entrecruzamiento entre DNA y proteínas (SINSHEIMER 1957; SMITH 1962). Esos cambios en la conformación de los enlaces fosfodiéster, así como en la estructura del DNA provocan una desestabilización de su estructura que pueden propiciar la ruptura del DNA.

Puesto que en 1999 se demostró que el heterodímero  $\alpha 1/\alpha 2$  en *S. cerevisiae* reprime la reparación de cortes de doble cadena (LEE *et al.* 1999), nosotros quisimos evaluar si al exponer nuestras cepas a radiación ultravioleta podíamos observar diferencia en la respuesta de las cepas que solo expresan un tipo de información de apareamiento o ninguno, así como en la cepa WT en la cual creemos que una población expresa ambos tipos de información.

Debido a que en *S. cerevisiae* se han realizado estudios para evaluar la reparación de daño a DNA y se han utilizado dosis de 2 a 21 J/m<sup>2</sup> (ERLICH *et al.* 2008; SCOTT and PLON 2003; SPICAKOVA *et al.* 2008) y en *C. glabrata* se ha evaluado el efecto de la luz UV en un rango de 20 a 60 J/m<sup>2</sup> (UENO *et al.* 2007). Nosotros decidimos utilizar un rango de 1 a 50 J/m<sup>2</sup>. Observamos que a partir de 8 J/m<sup>2</sup> disminuyó significativamente la viabilidad de todas nuestras cepas y no encontramos un fenotipo diferencial entre ellas, excepto por la cepa CBS138 que muestra sensibilidad a alta temperatura (46±1°C). En la Figura 25 se muestra el efecto de 2 J/m<sup>2</sup> a las tres temperaturas empleadas, los experimentos a mayores dosis de UV se muestran en Anexos.



**Figura 25. Evaluación de la sensibilidad a la luz UV de las cepas de *C. glabrata* mutantes en los loci *MTL*.**

Realizamos diluciones logarítmicas seriadas de suspensiones celulares y se depositaron 5  $\mu$ l de cada dilución en el medio de crecimiento. Incubamos las cajas a las temperaturas indicadas y se fotografiaron a las 48 h.

A continuación se describen los tres tipos de estrés en los cuales sí observamos un fenotipo diferencial en nuestras cepas que fueron: daño durante la replicación del DNA, estrés osmótico y estrés oxidante.

#### 4.10. Hidroxiurea (HU)

Para analizar otro tipo de daño al DNA diferente al producido tras la exposición a luz ultravioleta, evaluamos el daño producido con hidroxiurea que como ya mencionamos es un agente que inhibe la enzima ribonucleótido reductasa indispensable para la síntesis de nucleótidos e interfiere en la síntesis de DNA. Evaluamos el fenotipo en concentraciones de hidroxiurea de 200 mM y 250 mM.

Observamos que al crecer en hidroxiurea 200mM a 45°C, solo las cepas que no contienen información de apareamiento o que contienen sólo un tipo fueron

capaces de crecer (hasta cuatro diluciones) y no así la cepa silvestre (solo hasta la segunda dilución) (Fig. 26). Los experimentos a las distintas temperaturas y en hidroxurea 250 mM se muestran en Anexos.

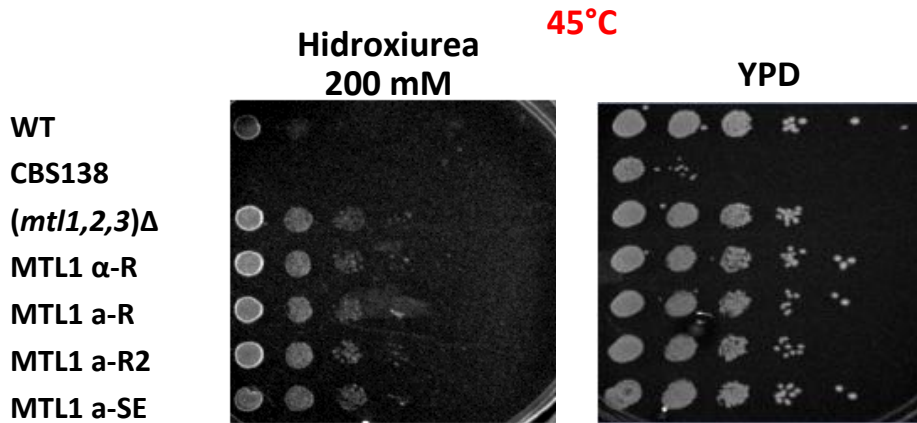


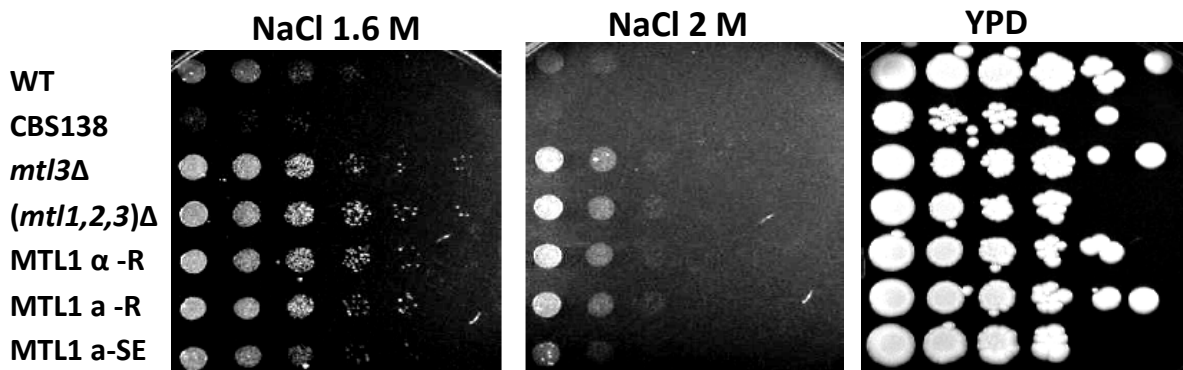
Figura 26. Evaluación del crecimiento de las cepas de *C. glabrata* mutantes en los loci *MTL* en agar YPD con hidroxurea.

Realizamos diluciones logarítmicas seriadas de suspensiones celulares y se depositaron 5  $\mu$ l de cada dilución en el medio de crecimiento. Incubamos las cajas a 45°C y se fotografiaron a las 48 h.

#### 4.11. Cloruro de Sodio (NaCl)

Debido a que uno de los genes que reprime el heterodímero  $\alpha 1/\alpha 2$  en *S. cerevisiae* es el gen *HOG1*, que codifica para la proteína Hog1p, indispensable en la respuesta a estrés osmótico (GALGOCZY *et al.* 2004) nos propusimos evaluar el estrés salino utilizando concentraciones de 0.5, 1.5, 1.6 y 2 M de NaCl de a las tres temperaturas empleadas.

De igual manera observamos que a concentraciones de 1.6 y 2 M de NaCl a 46.5°C de incubación, las cepas que solo contienen un tipo de información de apareamiento o ninguno muestran una mayor resistencia al estrés salino que la cepa WT (Fig. 27). La cepa que sobreexpresa la información **a** es ligeramente más resistente a estrés por NaCl que la cepa WT. Los experimentos en 1.5 M de NaCl y a otras temperaturas se muestran en Anexos.

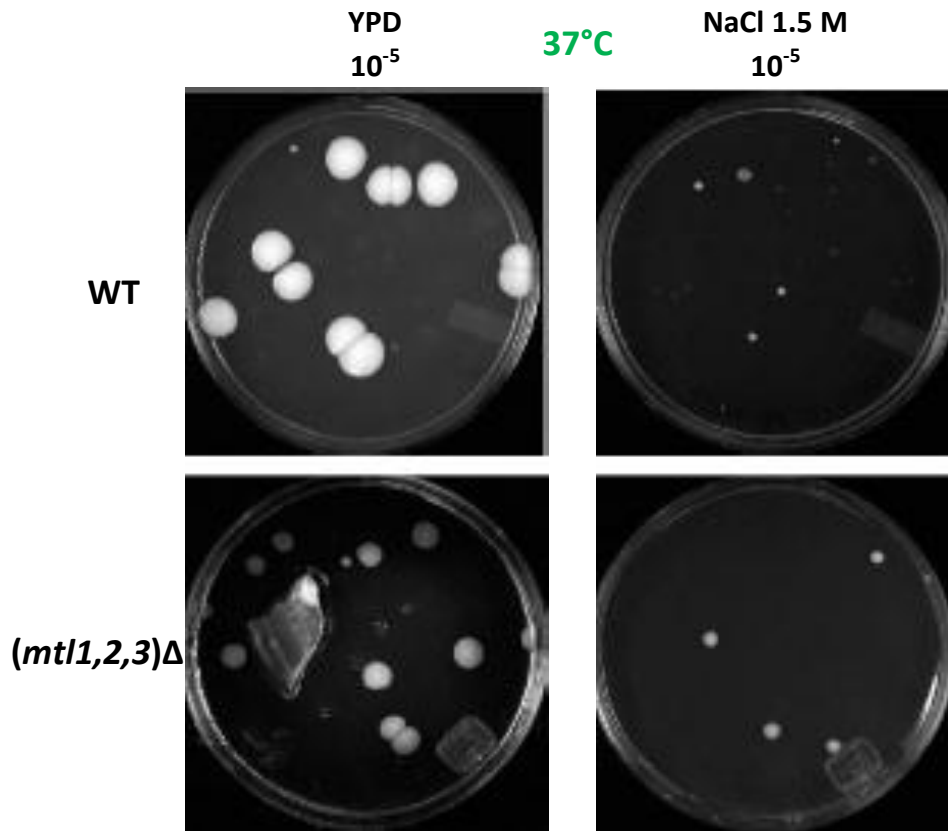


**Figura 27. Evaluación del crecimiento de las cepas de *C. glabrata* mutantes en los loci *MTL* en agar YPD con cloruro de sodio.**

Realizamos diluciones logarítmicas seriadas de suspensiones celulares y se depositaron 5 $\mu$ l de cada dilución en el medio de crecimiento. Incubamos las cajas a  $\sim 46.5^{\circ}\text{C}$  y se fotografiaron a los 6 d.

Otra manera por la cual evaluamos la resistencia de las cepas a distintos medios y la influencia que tiene la temperatura en su crecimiento, fue realizar diluciones a partir de una suspensión celular para obtener colonias aisladas de cada cepa analizada y poder observar la diferencia en el tamaño de las colonias generadas, como describimos en Materiales y Métodos.

Solamente a  $37^{\circ}\text{C}$  de incubación observamos un ligero fenotipo de la cepa triple mutante en los loci de apareamiento pues al crecerla en medio con 1.5 M de NaCl sus colonias fueron más grandes en este medio respecto a la cepa WT (nuestra cepa control). Mientras que en medio YPD esta misma dilución celular presenta colonias más pequeñas que la cepa WT. Esto indica que la cepa triple mutante de los loci MTL crece mucho más rápidamente en presencia de NaCl a  $37^{\circ}\text{C}$  que la cepa WT en este medio. Con esto se puede concluir, que la diferencia relativa en el tamaño de las colonias crecidas en NaCl con respecto a YPD es mucho mayor en la cepa WT que en la triple mutante (Fig. 28). Los resultados a otras temperaturas y de otras cepas se muestran en Anexos.



**Figura 28. Evaluación de las colonias aisladas de la cepa WT y la triple mutante en los loci *MTL* en agar YPD con cloruro de sodio.**

Realizamos diluciones  $10^{-5}$  a partir de una solución con una densidad óptica de 1 y sembramos 100  $\mu$ l. Incubamos las cajas por seis d a  $37^{\circ}\text{C}$ .

#### 4.12. Peróxido de hidrógeno ( $\text{H}_2\text{O}_2$ )

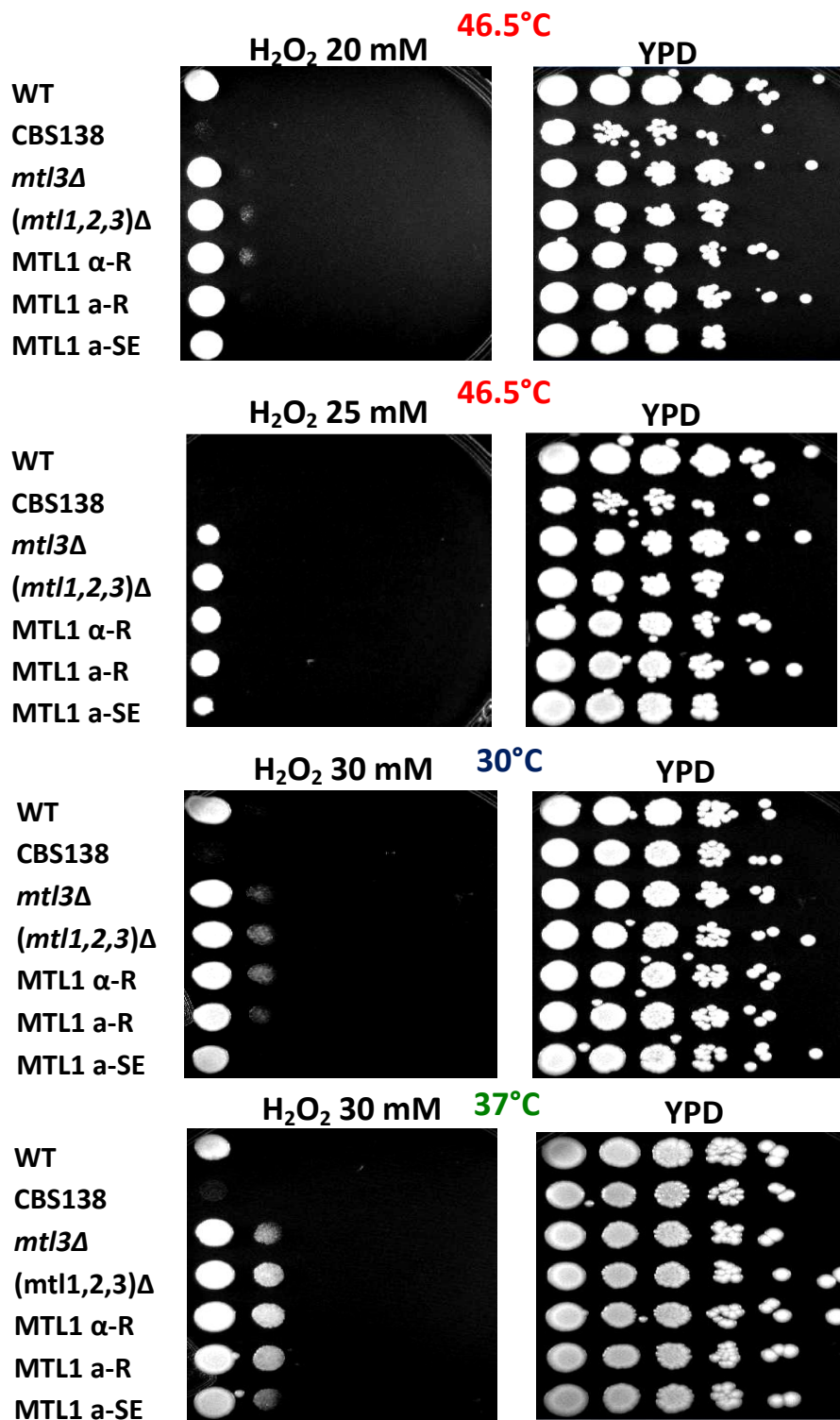
Existen evidencias que indican que en *S. cerevisiae* la exposición a la feromona  $\alpha$  induce muerte celular programada, cuyo principal mecanismo es la producción de especies reactivas de oxígeno (ERO). De esta manera las células capaces de aparearse son susceptibles a sufrir muerte celular programada, mientras que las células que finalmente se aparean se vuelven insensibles a la feromona  $\alpha$ , cesan la producción de ERO y por lo tanto no sufren muerte celular programada (SEVERIN and HYMAN 2002).

Evaluamos la sensibilidad de nuestras cepas al peróxido de hidrógeno ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ), que es una de las ERO que normalmente son producidas durante el proceso de



muerte celular programada. Utilizamos 20, 25 y 30 mM de  $H_2O_2$  a las temperaturas que ya mencionamos.

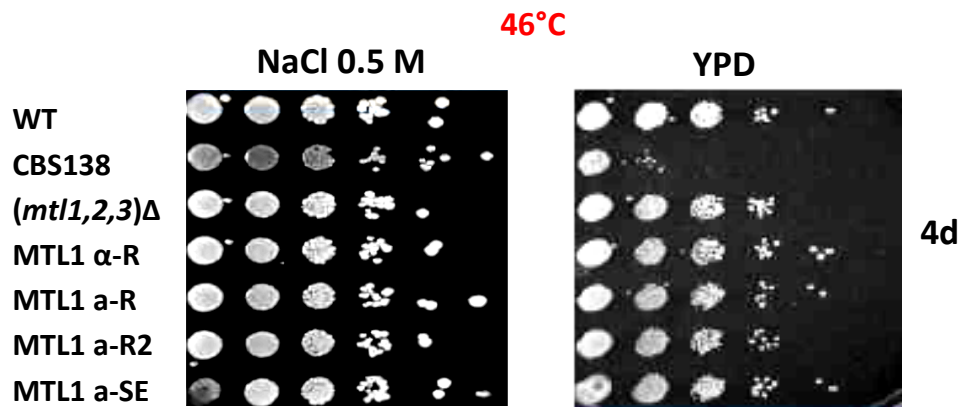
Como se muestra en la Figura 29, a 20 mM de  $H_2O_2$  las cepas mutantes que solo tienen un tipo de información de apareamiento o ninguno exhiben una resistencia ligeramente mayor a 46.5°C respecto a la cepa WT, y a 25 mM de  $H_2O_2$  a esta misma temperatura este fenotipo se acentúa. Sorprendentemente también a 30mM de  $H_2O_2$  se observa una mayor resistencia de las cepas que solo expresan un tipo de información de apareamiento o ninguno que es evidente a 30°C y a 37°C. Los experimentos completos a otras concentraciones de  $H_2O_2$  y a otras temperaturas se muestran en Anexos.



**Figura 29. Evaluación del crecimiento de las cepas de *C. glabrata* mutantes en los loci *MTL* en agar YPD con peróxido de hidrógeno.**

Realizamos diluciones logarítmicas seriadas de suspensiones celulares y se depositaron 5  $\mu$ l de cada dilución en el medio de crecimiento. Incubamos las cajas a las temperaturas indicadas y se fotografiaron a las 48 h.

Una característica importante de la cepa secuenciada CBS138 es que al crecer en medio enriquecido sólido (YPD) muestra menor crecimiento a una temperatura alta de 45°C respecto a las otras cepas evaluadas. Sin embargo, al crecerla en YPD con 0.5M de NaCl e incubarla a esta misma temperatura, el fenotipo termosensible se suprime y esta cepa crece de la misma manera que la cepa WT (Fig. 30).



**Figura 30. Evaluación del crecimiento de las cepas de *C. glabrata* mutantes en los loci *MTL* en agar YPD con cloruro de sodio.**

Realizamos diluciones logarítmicas seriadas de suspensiones celulares y se depositaron 5  $\mu$ l de cada dilución en el medio de crecimiento. Incubamos las cajas a 46°C y se fotografiaron a los cuatro d.

## DISCUSIÓN

La reproducción sexual favorece la evolución, pues gracias a la recombinación de los genomas de las células parentales es posible eliminar mutaciones deletéreas, sin embargo también es posible que durante el proceso de recombinación, estos organismos puedan perder genes importantes para su supervivencia (HSUEH and HEITMAN 2008) o bien generar cambios genéticos que le permitan una mejor adaptación al medio. En el caso de hongos patógenos de humanos es posible que al poseer un ciclo sexual se conviertan en organismos más susceptibles de perder genes indispensables para su supervivencia dentro del hospedero mamífero y por lo tanto disminuir su virulencia (JOHNSON 2003). Esta puede ser la razón por la que la mayoría de hongos patógenos de humanos no poseen un ciclo sexual.

*Candida glabrata* es una levadura haploide que se encuentra como comensal en mucosas de mamíferos, las cuales hasta ahora son los únicos hospederos conocidos. Desde hace dos décadas se ha considerado la especie de mayor prevalencia en candidosis sistémicas después de *C. albicans* (TRICK *et al.* 2002).

Inicialmente *C. glabrata* se consideraba un patógeno oportunista asexual, sin embargo en 2003, se descubrió que al igual que *S. cerevisiae*, un hongo sexual no patógeno y que *C. albicans*, un hongo parasexual patógeno, *C. glabrata* posee tres loci de apareamiento: *MTL1*, *MTL2* y *MTL3* (SRIKANTHA *et al.* 2003), así como genes implicados en meiosis y esporulación, y presenta un cambio fenotípico similar al necesario en *C. albicans* para llevar a cabo el apareamiento (WONG *et al.* 2003). Por lo anterior, es posible que este patógeno oportunista presente un ciclo sexual que aún no ha sido identificado.

En el laboratorio estamos interesados en determinar si efectivamente *C. glabrata* es capaz de llevar a cabo el proceso de apareamiento, o bien si es que en *C. glabrata* estos genes se han adaptado para cumplir otras funciones y por esta razón se hayan conservado. Específicamente en este trabajo nos preguntamos si es que los factores transcripcionales  $\alpha 1$ ,  $\alpha 1$  y  $\alpha 2$ , codificados en los loci de

apareamiento *MTL1*, *MTL2* y *MTL3* de *C. glabrata* pudieran tener otras funciones importantes para la respuesta a diferentes tipos de estrés.

Una estrategia muy eficiente para determinar la función de un gen, es evaluar el fenotipo de las cepas que carecen de él en determinadas condiciones de crecimiento. En este caso puesto que nuestro objetivo es conocer la función de los factores transcripcionales  $\alpha 1$ ,  $\alpha 1$  y  $\alpha 2$  en *C. glabrata*, utilizamos una batería de cepas que nos permitiera evaluar la función de cada factor transcripcional: utilizamos una cepa que contiene mutaciones nulas en los tres loci de apareamiento, es decir nuestra cepa triple mutante (*mtl1,2,3*) $\Delta$  (Salas, 2008); dos cepas construidas a partir de la triple mutante, que contienen reconstituida sólo la información tipo **a** o bien la información  $\alpha$  en el locus de expresión *MTL1* (Lavaniegos, 2009); una cepa que contiene una mutación nula del locus *MTL3*, que es el locus silenciado que contiene información  $\alpha$ . Es importante recalcar que algunas células no contienen totalmente silenciado el locus *MTL3* y expresan información tipo  $\alpha$ , por lo que la cepa *mtl3* $\Delta$  es otra cepa que sólo puede expresar información tipo **a**. Además construimos una cepa que sobreexpresa la información **a** e intentamos construir otra que sobreexprese la información  $\alpha$ . Sin embargo, no pudimos construir ésta última, debido probablemente a que la sobreexpresión del gen  $\alpha 2$  es tóxico para la célula (tanto para *Escherichia coli* como para *C. glabrata*). De manera que sólo trabajamos con la cepa sobreexpresante de información **a**.

También utilizamos en algunos experimentos la cepa CBS138, por ser el aislado clínico secuenciado de *C. glabrata* y puesto que encontramos que esta cepa es sensible a altas temperaturas, fue útil como un control de temperatura. Su fenotipo de crecimiento en medio enriquecido y mínimo líquido se muestra en Anexos.

## 1. Crecimiento en medio líquido

En total evaluamos el crecimiento de ocho cepas en diferentes medios y temperaturas. Decidimos utilizar 37°C puesto que a esta temperatura se encuentra

normalmente *C. glabrata* en el hospedero mamífero y también evaluar su crecimiento a una temperatura más baja de 30°C que son las condiciones que rutinariamente se utilizan *in vitro* para el crecimiento de levaduras, así como una más alta de 45°C en sólido y a 42°C en medio líquido, éstas últimas son las temperaturas de crecimiento de *C. glabrata* más altas que se han probado en nuestro grupo de investigación.

En medio líquido, en términos generales, no vimos ninguna diferencia significativa en el tiempo de duplicación de ninguna de nuestras cepas con respecto a la cepa silvestre en ninguno de los medios ni temperaturas utilizadas. El crecimiento en medio enriquecido es más rápido para todas las cepas a 37°C que a 30°C.

Lo que se observó en medio enriquecido para todas las cepas, es que a 37°C disminuyen su tiempo de duplicación aproximadamente un 10 a 15%, excepto las cepas que solamente realizamos un experimento y por lo tanto no tienen desviación estándar (*mtl3* $\Delta$  y la cepa que sobreexpresa la información **a**). Sin embargo, a 42°C, todas las cepas crecen a la misma velocidad que a 30°C.

En medio mínimo, se observó lo contrario, es decir, todas las cepas crecen de 15 a 20% más lento a 37°C y a 42°C, independientemente del tipo de información de apareamiento que expresen.

## **2. Los factores transcripcionales $\alpha 1$ , $\alpha 1$ y $\alpha 2$ participan en la respuesta a ciertos tipos de estrés**

Si bien en *C. glabrata* el locus *MTL3* se encuentra inactivo transcripcionalmente, en nuestro laboratorio hemos detectado transcripción de información  $\alpha$  proveniente de este locus en un bajo nivel en nuestra cepa WT (Ramírez, datos no publicados). Esto nos lleva a pensar que posiblemente existe una pequeña población que expresa tanto información tipo **a** proveniente de *MTL1* y *MTL2* como información tipo  $\alpha$  proveniente de *MTL3*, permitiendo que en estas células se forme el heterodímero  $\alpha 1/\alpha 2$  que ya se ha descrito en *S. cerevisiae* que reprime

algunos genes de apareamiento, meiosis y reparación de DNA (GALGOCZY *et al.* 2004) y en *C. albicans* impide el cambio fenotípico necesario para el apareamiento (MILLER and JOHNSON 2002).

### **2.1. Estrés durante la replicación del DNA**

La hidroxiurea es un agente que inhibe la enzima ribonucleótido reductasa que es necesaria para la síntesis de nucleótidos, por lo tanto se produce una disminución de estos lo que hace más lenta la replicación del DNA y ésta se reanuda en la fase G2 del ciclo celular, en donde la célula para reparar este daño utiliza el sistema de reparación de cortes de doble cadena del DNA (LI *et al.* 2009; SLATER 1973; TYLER *et al.* 1999). Por lo cual el daño producido por la hidroxiurea es un daño que mimetiza el producido por cortes de doble cadena.

El hecho de que las cepas que muestran una mayor resistencia a este agente sean las que solo expresan un tipo de información de apareamiento o ninguno nos sugiere que es posible que se forme el heterodímero  $\alpha 1/\alpha 2$  en algunas células de la cepa WT y que funcione como represor de la transcripción de genes que permiten la reparación de DNA como se ha descrito en *S. cerevisiae* (LEE *et al.* 1999). En levadura se ha descrito un grupo de genes que participan en la respuesta al daño a DNA que se inducen por radiación ultravioleta e hidroxiurea como los genes *RAD51* y *RAD54*, que también están involucrados en la recombinación homóloga y en la reparación de cortes de doble cadena del DNA (BUDD and CAMPBELL 1995); el gen *DIN7* que codifica para una proteína homóloga a una nucleasa la cual se propone está localizada y funciona en la mitocondria; el gen *PLM2* tiene homología con una proteína de unión a la horquilla de replicación que se ha encontrado en factores de transcripción y cinasas involucradas en el mantenimiento del plásmido  $2\mu$  en levadura (MIECZKOWSKI *et al.* 1997) (FIKUS *et al.* 2000); otro gen es el *YEROO4W* que tiene homología con la proteína Tip30 de humano y que es una proteína supresora de tumores pero no se conoce su función en levadura (XIAO *et al.* 1998) y el gen *DUN1* el cual es autorregulado y promueve la señalización a través de la vía Mec1 (GASCH *et al.* 2001). Es posible

que algunos de estos sean genes blanco del heterodímero represor  $\alpha 1/\alpha 2$  en *C. glabrata*, pues con excepción del gen *YEROO4W*, los demás genes se encuentran en *C. glabrata*.

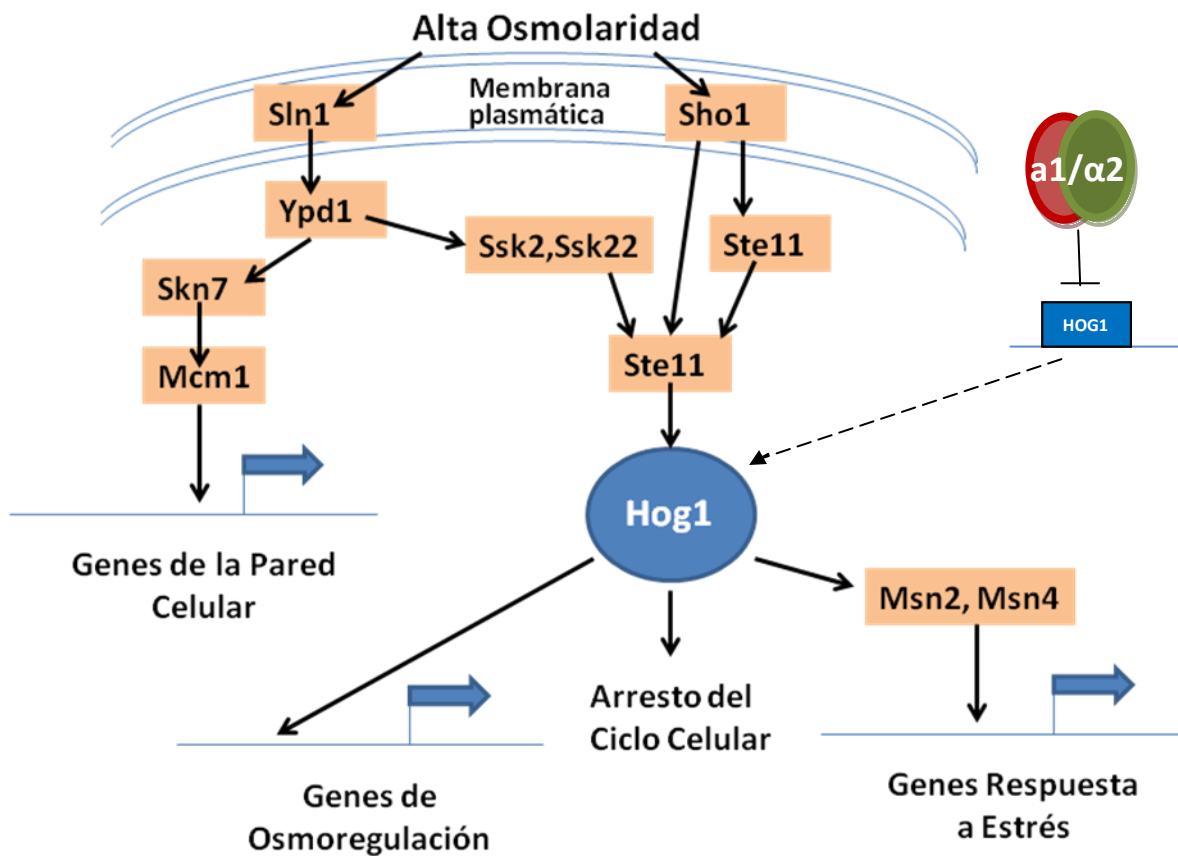
## 2.2. Estrés osmótico

El aumento en la osmolaridad externa es estresante para la levadura e induce cambios fisiológicos como; colapso en el gradiente osmótico, cese temporal del crecimiento, pérdida de organización del citoesqueleto de actina, aumento de proteínas de choque térmico y aumento de la concentración de solutos y macromoléculas intracelulares (HALL *et al.* 1996). La vía HOG es una cascada de MAP cinasas (MAPK) presente en levaduras que permite a la célula adaptarse al estrés hiperosmótico. Consiste en cinco proteínas cinasas que activan una MAP cinasa, Hog1p (Fig. 31). En respuesta a alta osmolaridad, Hog1p se activa, entra al núcleo y fosforila varios reguladores transcripcionales que controlan genes necesarios para permitir a la célula sobrevivir a este ambiente (GUSTIN *et al.* 1998). Debido a que en *S. cerevisiae*, *HOG1* es uno de los genes reprimidos por el heterodímero  $\alpha 1/\alpha 2$ , proponemos que en nuestra cepa WT de *C. glabrata* sucede lo mismo en la pequeña población de células en la que se expresa tanto información tipo  $\alpha$  de *MTL1* y *MTL2* como  $\alpha$  del locus *MTL3*. En estas células se formaría el heterodímero represor y se esperaría que sean más sensibles a altas concentraciones de NaCl. Las cepas que sólo expresan un tipo de información de apareamiento o ninguno como en nuestra cepa triple mutante, fueron más resistentes a altas concentraciones de NaCl. Este fenotipo también se observa cuando se plaquean colonias aisladas de la cepa triple mutante comparada con la cepa WT a 1.5 M y en YPD a 37°C (Fig. 28). En este experimento la cepa triple mutante presenta colonias más grandes que las de la cepa WT a 1.5M de NaCl, a pesar de que en YPD las colonias son más pequeñas. Estos datos sugieren que la cepa que no contiene información de apareamiento se adapta mejor que la cepa WT a condiciones de estrés osmótico y sugiere que en *S. cerevisiae* y en *C.*



*glabrata* el papel que juegan los loci *MTL* en respuesta a estrés osmótico puede ser similar.

El aislado clínico secuenciado CBS138 a lo largo de este trabajo mostró un fenotipo de termosensibilidad en todos los medios excepto NaCl 0.5 M, donde esta cepa muestra un crecimiento casi igual que la cepa WT. Este fenotipo característico nos sugiere que en esta cepa el NaCl puede inducir genes de respuesta a estrés, permitiéndole una mayor resistencia a altas temperaturas.



**Figura 31. Vía HOG en *S. cerevisiae*.**  
 Modificado de Gustin, et al. 1998.

### 2.3. Estrés oxidante

La muerte celular programada o apoptosis, incluye la activación de MAPK, liberación de citocromo C de la mitocondria hacia el citoplasma y acumulación de especies reactivas de oxígeno (ERO) (SKULACHEV 1996). Una de las principales

ERO producida tanto en células del hospedero mamífero como en las levaduras es el peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) y se sabe que cuando células de *S. cerevisiae* son expuestas a feromona  $\alpha$  se induce la producción de  $H_2O_2$  y de esta manera las células que finalmente no se aparean mueren mientras las células que logran llevar a cabo el apareamiento pierden la sensibilidad a la feromona  $\alpha$  y disminuyen sus niveles de  $H_2O_2$  (SEVERIN and HYMAN 2002). El hecho de que en *S. cerevisiae* el apareamiento exitoso prevenga o impida la muerte celular programada inducida por  $H_2O_2$  puede deberse a que en este organismo sexual este es un proceso que asegura el apareamiento a lo largo de sus generaciones. De manera contrastante en *C. glabrata* cuando las células se encuentran en un ambiente con  $H_2O_2$  elevado (20 mM a 30 mM) las células que resultan ser más resistentes a este estímulo estresante son las que solo tienen un tipo de información de apareamiento o las que carecen de información de apareamiento y no las células que expresan los dos tipos de información (como pasa en *S. cerevisiae*). Es posible que en las cepas en las que se puede formar el heterodímero  $\alpha 1/\alpha 2$ , éste reprima factores transcripcionales necesarios para la transcripción de genes de resistencia al estrés oxidante. Lo anterior nos puede indicar que los genes que en *S. cerevisiae* y *C. albicans* son principalmente para apareamiento, por el contrario en *C. glabrata* han adquirido otras funciones que tienen que ver con estrategias para poder sobrevivir en el ambiente hostil que hay dentro del hospedero mamífero. Es importante resaltar que en varios experimentos observamos que las cepas que tienen una mayor resistencia es la triple mutante y la cepa reconstituida con información  $\alpha$ , esto nos puede indicar que para poder resistir mejor ambientes tan extremos es preferible solo expresar niveles normales del factor transcripcional  $\alpha 1$  y no de  $\alpha 1$  y  $\alpha 2$ .

Por todo lo anterior podemos concluir que si bien *C. glabrata* comparte varias semejanzas genéticas con *S. cerevisiae*, los genes que para ésta tienen función principalmente en apareamiento y mantenimiento de una identidad celular, en *C. glabrata* cumplen funciones que posiblemente están relacionadas con su prevalencia dentro del hospedero mamífero. Esto último no descarta que también

en *S. cerevisiae* estos factores transcripcionales tengan otras funciones aún no identificadas.

En este trabajo proponemos un modelo en el cual la expresión simultánea de los genes tipo  $\alpha$  y tipo  $\alpha$  en la célula producen la represión transcripcional de genes de respuesta a reparación de ciertos tipos de daño a DNA, respuesta a estrés osmótico y respuesta a estrés oxidante (Fig. 32).

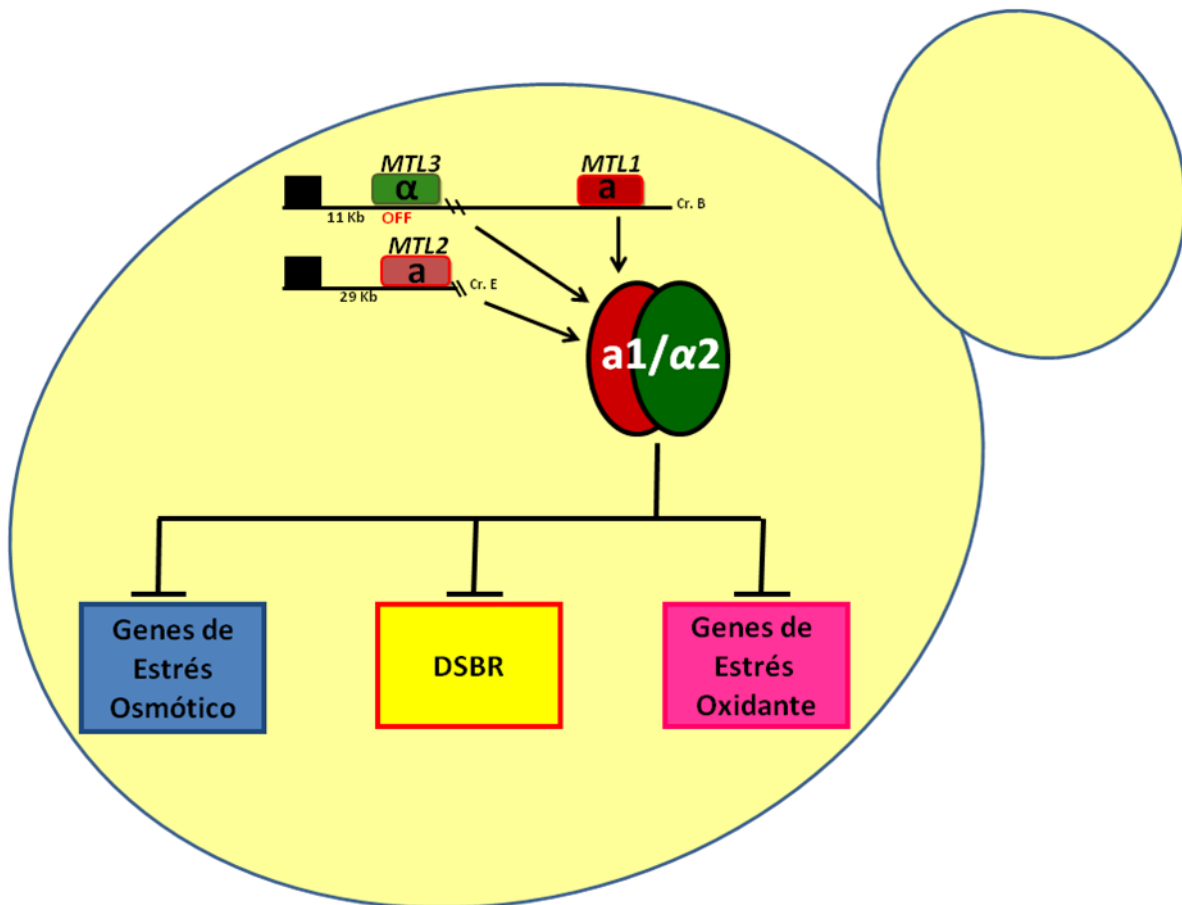


Figura 32. Modelo propuesto en este trabajo.

## PERSPECTIVAS

Para continuar este trabajo y conocer mejor el papel de los factores transcripcionales  **$\alpha 1$** ,  $\alpha 1$  y  $\alpha 2$ , proponemos realizar lo siguiente:

- Construcción de una cepa que exprese simultáneamente los genes  **$\alpha 1$**  y  $\alpha 2$  al mismo nivel de expresión que la cepa WT, y una cepa que sobreexpresa información  $\alpha$ .
- Realizar ensayos de microarreglos para obtener el patrón global de expresión genética de la cepa triple mutante en los loci *MTL* comparada con la cepa WT y también con las cepas que solamente expresan un tipo de información y la que expresa  **$\alpha 1/\alpha 2$**  simultáneamente a partir del locus *MTL1*.
- Realizar ensayos de virulencia *in vivo* en un modelo murino para evaluar la capacidad de colonización y virulencia de las cepas mutantes respecto a la cepa WT.

## REFERENCIAS

- ALBY, K., D. SCHAEFER and R. J. BENNETT, 2009 Homothallic and heterothallic mating in the opportunistic pathogen *Candida albicans*. *Nature* **460**: 890-893.
- BENNETT, R. J., and A. D. JOHNSON, 2003 Completion of a parasexual cycle in *Candida albicans* by induced chromosome loss in tetraploid strains. *EMBO J* **22**: 2505-2515.
- BENNETT, R. J., M. A. UHL, M. G. MILLER and A. D. JOHNSON, 2003 Identification and characterization of a *Candida albicans* mating pheromone. *Mol Cell Biol* **23**: 8189-8201.
- BEUKERS, R., and W. BERENDS, 1960 Isolation and identification of the irradiation product of thymine. *Biochim Biophys Acta* **41**: 550-551.
- BUDD, M. E., and J. L. CAMPBELL, 1995 DNA polymerases required for repair of UV-induced damage in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* **15**: 2173-2179.
- CASTANO, I., S. J. PAN, M. ZUPANCIC, C. HENNEQUIN, B. DUJON *et al.*, 2005 Telomere length control and transcriptional regulation of subtelomeric adhesins in *Candida glabrata*. *Mol Microbiol* **55**: 1246-1258.
- CORMACK, B. P., and S. FALKOW, 1999 Efficient homologous and illegitimate recombination in the opportunistic yeast pathogen *Candida glabrata*. *Genetics* **151**: 979-987.
- CSANK, C., and K. HAYNES, 2000 *Candida glabrata* displays pseudohyphal growth. *FEMS Microbiol Lett* **189**: 115-120.
- DE LAS PENAS, A., S. J. PAN, I. CASTANO, J. ALDER, R. CREGG *et al.*, 2003 Virulence-related surface glycoproteins in the yeast pathogen *Candida glabrata* are encoded in subtelomeric clusters and subject to RAP1- and SIR-dependent transcriptional silencing. *Genes Dev* **17**: 2245-2258.
- DIGNARD, D., A. L. EL-NAGGAR, M. E. LOGUE, G. BUTLER and M. WHITEWAY, 2007 Identification and characterization of MFA1, the gene encoding *Candida albicans*  $\alpha$ -factor pheromone. *Eukaryot Cell* **6**: 487-494.
- DRANGINIS, A. M., 1990 Binding of yeast  $\alpha 1$  and  $\alpha 2$  as a heterodimer to the operator DNA of a haploid-specific gene. *Nature* **347**: 682-685.
- ERLICH, R. L., R. C. FRY, T. J. BEGLEY, D. L. DAEE, R. S. LAHUE *et al.*, 2008 Anc1, a protein associated with multiple transcription complexes, is involved in postreplication repair pathway in *S. cerevisiae*. *PLoS One* **3**: e3717.
- FIKUS, M. U., P. A. MIECZKOWSKI, P. KOPROWSKI, J. RYTKA, E. SLEDZIEWSKA-GOJSKA *et al.*, 2000 The product of the DNA damage-inducible gene of *Saccharomyces cerevisiae*, DIN7, specifically functions in mitochondria. *Genetics* **154**: 73-81.

- GALGOCZY, D. J., A. CASSIDY-STONE, M. LLINAS, S. M. O'ROURKE, I. HERSKOWITZ *et al.*, 2004 Genomic dissection of the cell-type-specification circuit in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**: 18069-18074.
- GASCH, A. P., M. HUANG, S. METZNER, D. BOTSTEIN, S. J. ELLEDGE *et al.*, 2001 Genomic expression responses to DNA-damaging agents and the regulatory role of the yeast ATR homolog Mec1p. *Mol Biol Cell* **12**: 2987-3003.
- GIETZ, D., A. ST JEAN, R. A. WOODS and R. H. SCHIESTL, 1992 Improved method for high efficiency transformation of intact yeast cells. *Nucleic Acids Res* **20**: 1425.
- GIMENO, C. J., P. O. LJUNGDAHL, C. A. STYLES and G. R. FINK, 1992 Unipolar cell divisions in the yeast *S. cerevisiae* lead to filamentous growth: regulation by starvation and RAS. *Cell* **68**: 1077-1090.
- GODDARD, M. R., H. C. GODFRAY and A. BURT, 2005 Sex increases the efficacy of natural selection in experimental yeast populations. *Nature* **434**: 636-640.
- GOUTTE, C., and A. D. JOHNSON, 1988  $\alpha 1$  protein alters the DNA binding specificity of alpha 2 repressor. *Cell* **52**: 875-882.
- GRASER, Y., M. VOLOVSEK, J. ARRINGTON, G. SCHONIAN, W. PRESBER *et al.*, 1996 Molecular markers reveal that population structure of the human pathogen *Candida albicans* exhibits both clonality and recombination. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**: 12473-12477.
- GUDLAUGSSON, O., S. GILLESPIE, K. LEE, J. VANDE BERG, J. HU *et al.*, 2003 Attributable mortality of nosocomial candidemia, revisited. *Clin Infect Dis* **37**: 1172-1177.
- GUSTIN, M. C., J. ALBERTYN, M. ALEXANDER and K. DAVENPORT, 1998 MAP kinase pathways in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol Mol Biol Rev* **62**: 1264-1300.
- HALL, J. P., V. CHERKASOVA, E. ELION, M. C. GUSTIN and E. WINTER, 1996 The osmoregulatory pathway represses mating pathway activity in *Saccharomyces cerevisiae*: isolation of a FUS3 mutant that is insensitive to the repression mechanism. *Mol Cell Biol* **16**: 6715-6723.
- HERSKOWITZ, I., 1988 Life cycle of the budding yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol Rev* **52**: 536-553.
- HOYER, L. L., C. B. GREEN, S. H. OH and X. ZHAO, 2008 Discovering the secrets of the *Candida albicans* agglutinin-like sequence (ALS) gene family--a sticky pursuit. *Med Mycol* **46**: 1-15.
- HSUEH, Y. P., and J. HEITMAN, 2008 Orchestration of sexual reproduction and virulence by the fungal mating-type locus. *Curr Opin Microbiol* **11**: 517-524.
- HUANG, G., T. SRIKANTHA, N. SAHNI, S. YI and D. R. SOLL, 2009 CO(2) regulates white-to-opaque switching in *Candida albicans*. *Curr Biol* **19**: 330-334.

- HULL, C. M., and A. D. JOHNSON, 1999 Identification of a mating type-like locus in the asexual pathogenic yeast *Candida albicans*. *Science* **285**: 1271-1275.
- HULL, C. M., R. M. RAISNER and A. D. JOHNSON, 2000 Evidence for mating of the "asexual" yeast *Candida albicans* in a mammalian host. *Science* **289**: 307-310.
- JOHNSON, A., 2003 The biology of mating in *Candida albicans*. *Nat Rev Microbiol* **1**: 106-116.
- JOHNSON, A. D., 1995 Molecular mechanisms of cell-type determination in budding yeast. *Curr Opin Genet Dev* **5**: 552-558.
- KANTARCIOGLU, A. S., and A. YUCEL, 2002 Phospholipase and protease activities in clinical *Candida* isolates with reference to the sources of strains. *Mycoses* **45**: 160-165.
- KAUR, R., R. DOMERGUE, M. L. ZUPANCIC and B. P. CORMACK, 2005 A yeast by any other name: *Candida glabrata* and its interaction with the host. *Curr Opin Microbiol* **8**: 378-384.
- KAUR, R., B. MA and B. P. CORMACK, 2007 A family of glycosylphosphatidylinositol-linked aspartyl proteases is required for virulence of *Candida glabrata*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**: 7628-7633.
- KOPECKA, M., and M. GABRIEL, 1992 The influence of congo red on the cell wall and (1----3)-beta-D-glucan microfibril biogenesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Arch Microbiol* **158**: 115-126.
- KVAAL, C., S. A. LACHKE, T. SRIKANTHA, K. DANIELS, J. MCCOY *et al.*, 1999 Misexpression of the opaque-phase-specific gene PEP1 (SAP1) in the white phase of *Candida albicans* confers increased virulence in a mouse model of cutaneous infection. *Infect Immun* **67**: 6652-6662.
- LEE, S. E., F. PAQUES, J. SYLVAN and J. E. HABER, 1999 Role of yeast SIR genes and mating type in directing DNA double-strand breaks to homologous and non-homologous repair paths. *Curr Biol* **9**: 767-770.
- LI, Q., A. M. FAZLY, H. ZHOU, S. HUANG, Z. ZHANG *et al.*, 2009 The elongator complex interacts with PCNA and modulates transcriptional silencing and sensitivity to DNA damage agents. *PLoS Genet* **5**: e1000684.
- LOCKHART, S. R., W. WU, J. B. RADKE, R. ZHAO and D. R. SOLL, 2005 Increased virulence and competitive advantage of *a/alpha* over *a/a* or *alpha/alpha* offspring conserves the mating system of *Candida albicans*. *Genetics* **169**: 1883-1890.
- MAGEE, B. B., and P. T. MAGEE, 2000 Induction of mating in *Candida albicans* by construction of MTL $\alpha$  and MTL $\alpha$  strains. *Science* **289**: 310-313.
- MIECZKOWSKI, P. A., M. U. FIKUS and Z. CIESLA, 1997 Characterization of a novel DNA damage-inducible gene of *Saccharomyces cerevisiae*, DIN7, which is a structural homolog of the RAD2 and RAD27 DNA repair genes. *Mol Gen Genet* **253**: 655-665.

- MILLER, M. G., and A. D. JOHNSON, 2002 White-opaque switching in *Candida albicans* is controlled by mating-type locus homeodomain proteins and allows efficient mating. *Cell* **110**: 293-302.
- MULLER, H., C. HENNEQUIN, J. GALLAUD, B. DUJON and C. FAIRHEAD, 2008 The asexual yeast *Candida glabrata* maintains distinct a and alpha haploid mating types. *Eukaryot Cell* **7**: 848-858.
- NIELSEN, K., and J. HEITMAN, 2007 Sex and virulence of human pathogenic fungi. *Adv Genet* **57**: 143-173.
- PANWAR, S. L., M. LEGRAND, D. DIGNARD, M. WHITEWAY and P. T. MAGEE, 2003 MFalpha1, the gene encoding the alpha mating pheromone of *Candida albicans*. *Eukaryot Cell* **2**: 1350-1360.
- PAOLETTI, M., C. RYDHOLM, E. U. SCHWIER, M. J. ANDERSON, G. SZAKACS *et al.*, 2005 Evidence for sexuality in the opportunistic fungal pathogen *Aspergillus fumigatus*. *Curr Biol* **15**: 1242-1248.
- PFALLER, M. A., S. A. MESSER, L. BOYKEN, S. TENDOLKAR, R. J. HOLLIS *et al.*, 2004 Geographic variation in the susceptibilities of invasive isolates of *Candida glabrata* to seven systemically active antifungal agents: a global assessment from the ARTEMIS Antifungal Surveillance Program conducted in 2001 and 2002. *J Clin Microbiol* **42**: 3142-3146.
- SANGUINETTI, M., B. POSTERARO, B. FIORI, S. RANNO, R. TORELLI *et al.*, 2005 Mechanisms of azole resistance in clinical isolates of *Candida glabrata* collected during a hospital survey of antifungal resistance. *Antimicrob Agents Chemother* **49**: 668-679.
- SCOTT, K. L., and S. E. PLON, 2003 Loss of Sin3/Rpd3 histone deacetylase restores the DNA damage response in checkpoint-deficient strains of *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* **23**: 4522-4531.
- SEVERIN, F. F., and A. A. HYMAN, 2002 Pheromone induces programmed cell death in *S. cerevisiae*. *Curr Biol* **12**: R233-235.
- SEXTON, A. C., and B. J. HOWLETT, 2006 Parallels in fungal pathogenesis on plant and animal hosts. *Eukaryot Cell* **5**: 1941-1949.
- SINSHEIMER, R. L., 1957 The photochemistry of cytidylic acid. *Radiat Res* **6**: 121-125.
- SKULACHEV, V. P., 1996 Why are mitochondria involved in apoptosis? Permeability transition pores and apoptosis as selective mechanisms to eliminate superoxide-producing mitochondria and cell. *FEBS Lett* **397**: 7-10.
- SLATER, M. L., 1973 Effect of reversible inhibition of deoxyribonucleic acid synthesis on the yeast cell cycle. *J Bacteriol* **113**: 263-270.
- SLUTSKY, B., M. STAEBELL, J. ANDERSON, L. RISEN, M. PFALLER *et al.*, 1987 "White-opaque transition": a second high-frequency switching system in *Candida albicans*. *J Bacteriol* **169**: 189-197.



- SMITH, K. C., 1962 Dose dependent decrease in extractability of DNA from bacteria following irradiation with ultraviolet light or with visible light plus dye. *Biochem Biophys Res Commun* **8**: 157-163.
- SONG, J. L., and T. C. WHITE, 2003 RAM2: an essential gene in the prenylation pathway of *Candida albicans*. *Microbiology* **149**: 249-259.
- SPICAKOVA, T., K. MCCANN and J. M. BROWN, 2008 A role for Lsm1p in response to ultraviolet-radiation damage in *Saccharomyces cerevisiae*. *Radiat Res* **170**: 411-421.
- SRIKANTHA, T., S. A. LACHKE and D. R. SOLL, 2003 Three mating type-like loci in *Candida glabrata*. *Eukaryot Cell* **2**: 328-340.
- STRATHERN, J. N., A. J. KLAR, J. B. HICKS, J. A. ABRAHAM, J. M. IVY *et al.*, 1982 Homothallic switching of yeast mating type cassettes is initiated by a double-stranded cut in the MAT locus. *Cell* **31**: 183-192.
- TRICK, W. E., S. K. FRIDKIN, J. R. EDWARDS, R. A. HAJJEH and R. P. GAYNES, 2002 Secular trend of hospital-acquired candidemia among intensive care unit patients in the United States during 1989-1999. *Clin Infect Dis* **35**: 627-630.
- TSONG, A. E., M. G. MILLER, R. M. RAISNER and A. D. JOHNSON, 2003 Evolution of a combinatorial transcriptional circuit: a case study in yeasts. *Cell* **115**: 389-399.
- TSONG, A. E., B. B. TUCH, H. LI and A. D. JOHNSON, 2006 Evolution of alternative transcriptional circuits with identical logic. *Nature* **443**: 415-420.
- TYLER, J. K., C. R. ADAMS, S. R. CHEN, R. KOBAYASHI, R. T. KAMAKAKA *et al.*, 1999 The RCAF complex mediates chromatin assembly during DNA replication and repair. *Nature* **402**: 555-560.
- TZUNG, K. W., R. M. WILLIAMS, S. SCHERER, N. FEDERSPIEL, T. JONES *et al.*, 2001 Genomic evidence for a complete sexual cycle in *Candida albicans*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**: 3249-3253.
- UENO, K., J. UNO, H. NAKAYAMA, K. SASAMOTO, Y. MIKAMI *et al.*, 2007 Development of a highly efficient gene targeting system induced by transient repression of YKU80 expression in *Candida glabrata*. *Eukaryot Cell* **6**: 1239-1247.
- VALENCIA, M., M. BENTELE, M. B. VAZE, G. HERRMANN, E. KRAUS *et al.*, 2001 NEJ1 controls non-homologous end joining in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nature* **414**: 666-669.
- VAN DYK, D., G. HANSSON, I. S. PRETORIUS and F. F. BAUER, 2003 Cellular differentiation in response to nutrient availability: The repressor of meiosis, Rme1p, positively regulates invasive growth in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* **165**: 1045-1058.
- WONG, S., M. A. FARES, W. ZIMMERMANN, G. BUTLER and K. H. WOLFE, 2003 Evidence from comparative genomics for a complete sexual cycle in the 'asexual' pathogenic yeast *Candida glabrata*. *Genome Biol* **4**: R10.

WU, W., S. R. LOCKHART, C. PUJOL, T. SRIKANTHA and D. R. SOLL, 2007 Heterozygosity of genes on the sex chromosome regulates *Candida albicans* virulence. *Mol Microbiol* **64**: 1587-1604.

XIAO, H., Y. TAO, J. GREENBLATT and R. G. ROEDER, 1998 A cofactor, TIP30, specifically enhances HIV-1 Tat-activated transcription. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**: 2146-2151.

ZORDAN, R. E., D. J. GALGOCZY and A. D. JOHNSON, 2006 Epigenetic properties of white-opaque switching in *Candida albicans* are based on a self-sustaining transcriptional feedback loop. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**: 12807-12812.

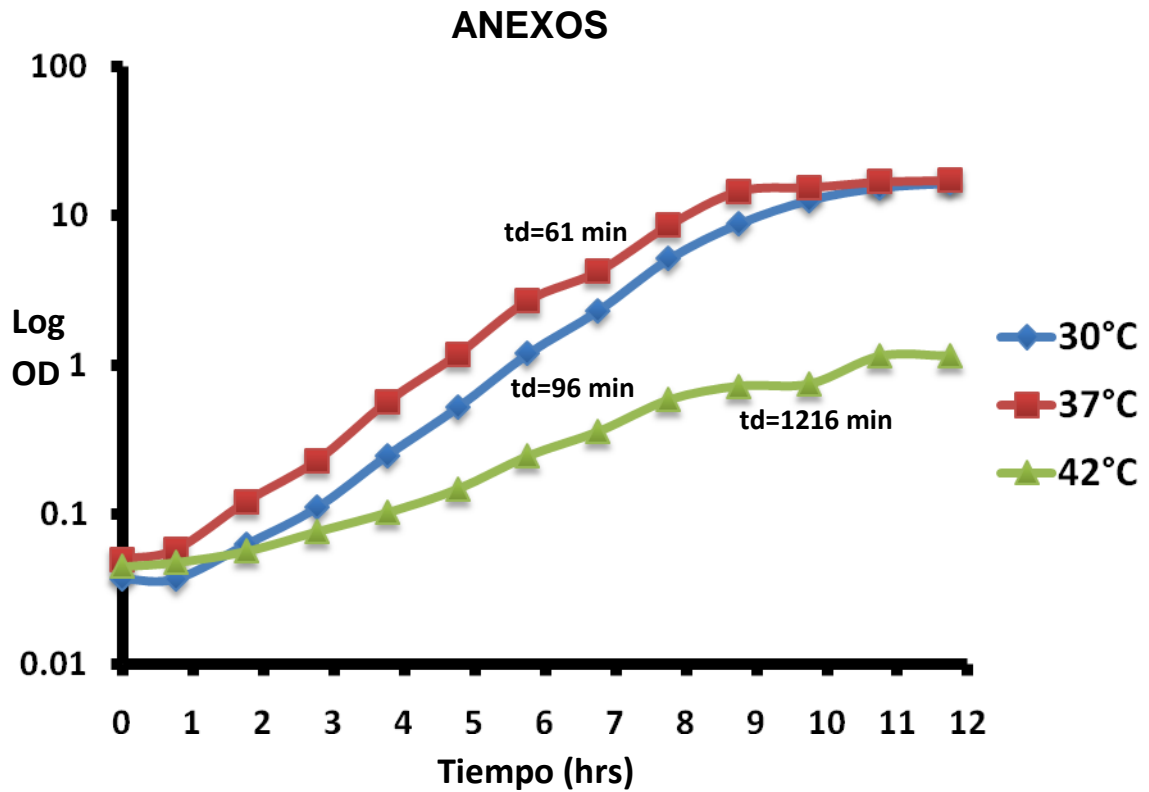


Figura S1. Crecimiento y tiempos de duplicación de la cepa estándar CBS138 en caldo enriquecido a 30°C, 37°C y 42°C.

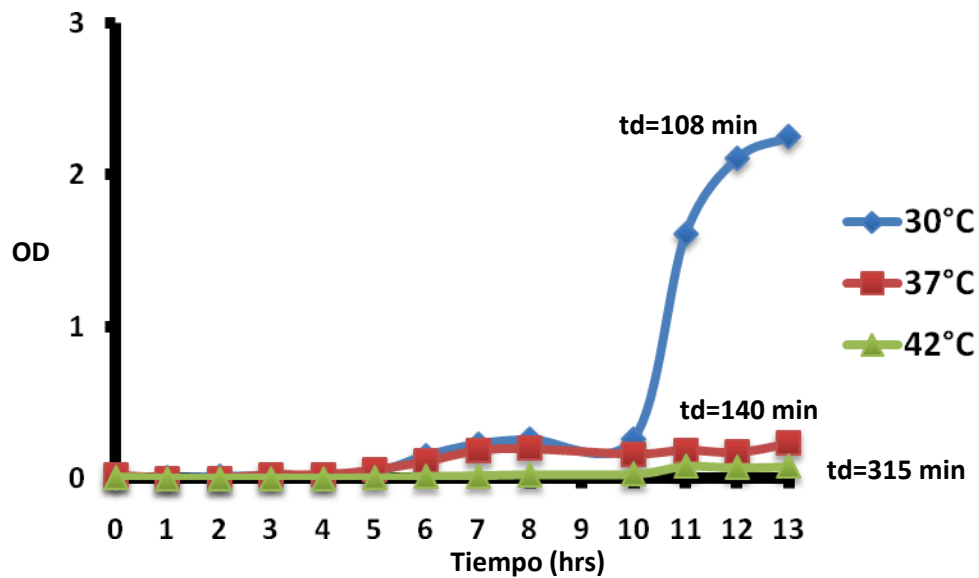
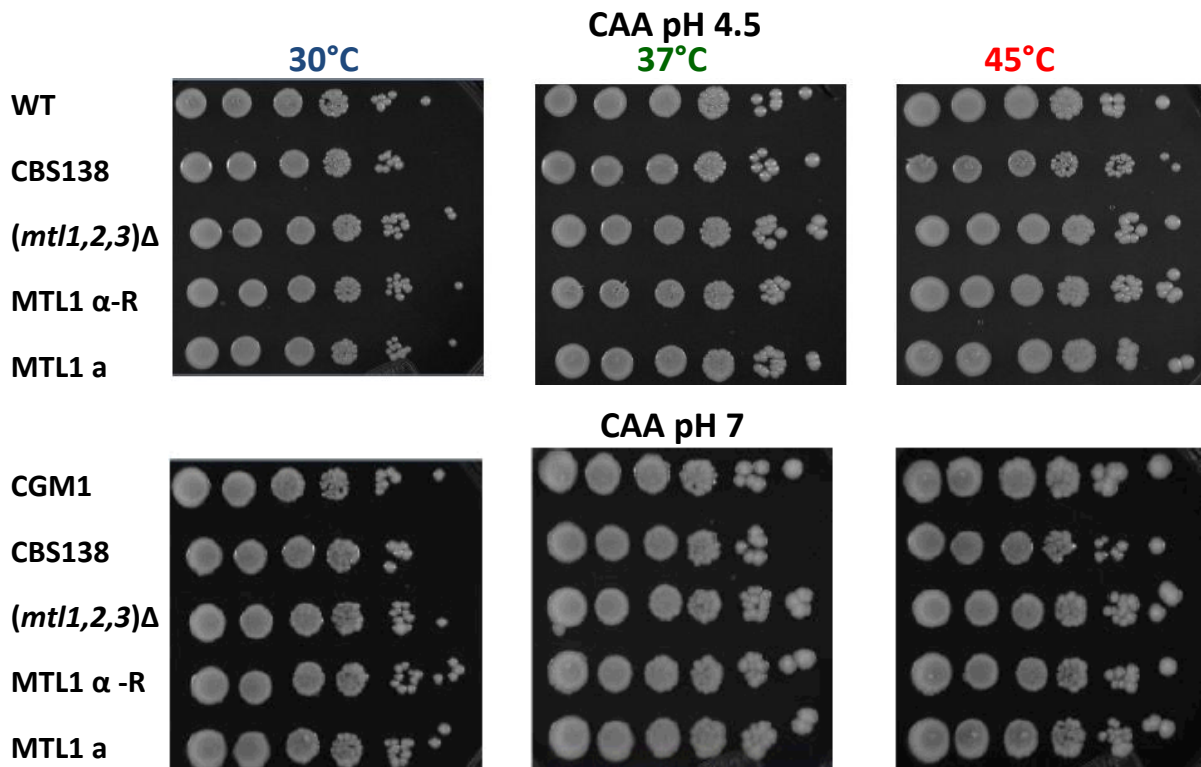
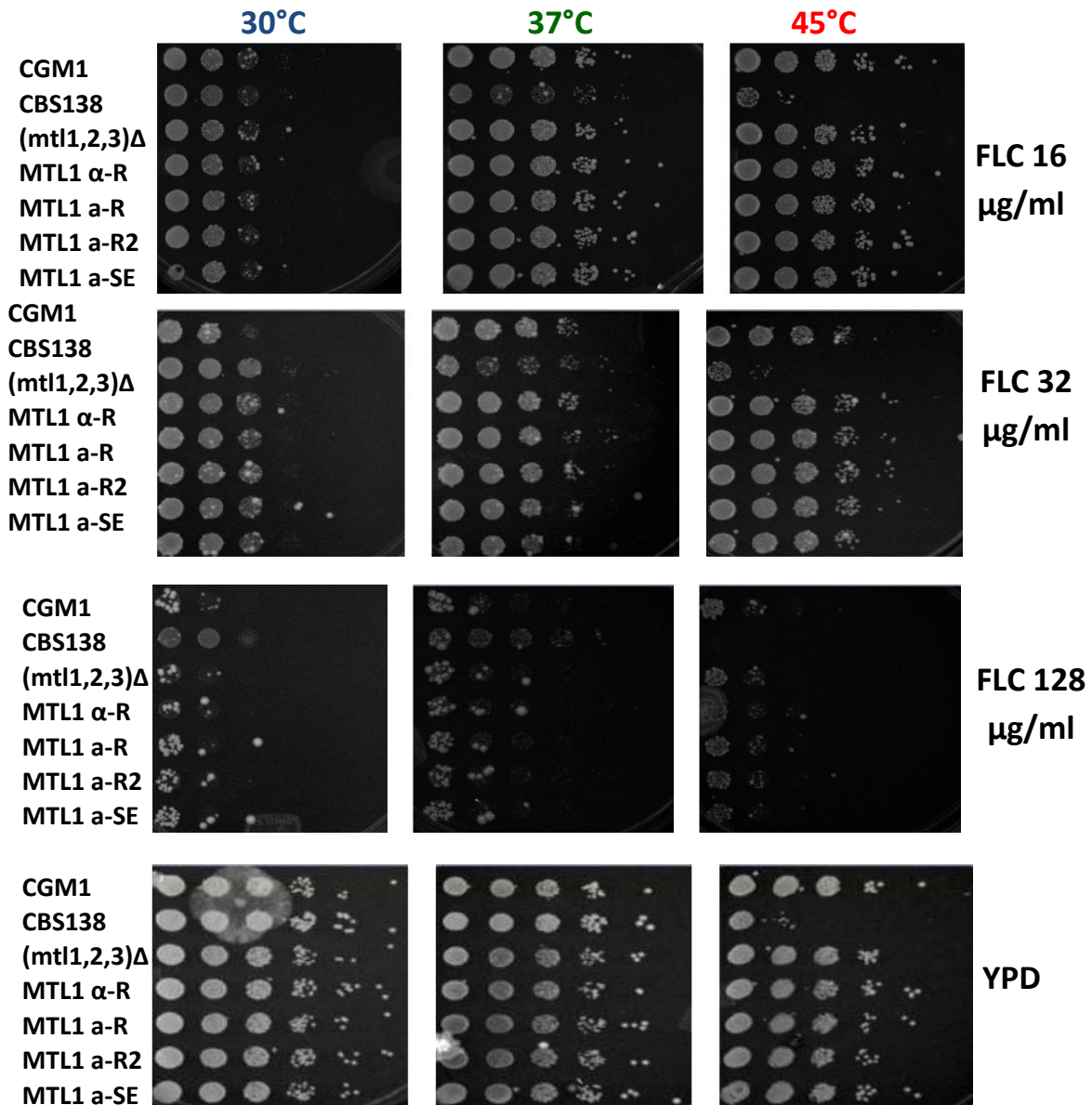


Figura S2. Crecimiento y tiempos de duplicación de la cepa estándar CBS138 en medio mínimo a 30°C, 37°C y 42°C.



**Figura S3. Evaluación del crecimiento de las cepas de *C. glabrata* mutantes en los loci *MTL* en medio CAA a pH 4.5 y 7.**

Realizamos diluciones logarítmicas seriadas de suspensiones celulares y se depositaron 5  $\mu$ l de cada dilución en el medio de crecimiento. Incubamos las cajas a las temperaturas indicadas y se fotografiaron a las 48 h.



**Figura S4. Evaluación del crecimiento de las cepas de *C. glabrata* mutantes en los loci *MTL* en agar YPD con fluconazol.**

Realizamos diluciones logarítmicas seriadas de suspensiones celulares y se depositaron 5 µl de cada dilución en el medio de crecimiento. Las cajas se incubadas a las temperaturas indicadas y se fotografiaron a las 72 h, excepto las cajas con 16 µg/ml de fluconazol que solo tienen 48 h de incubación.

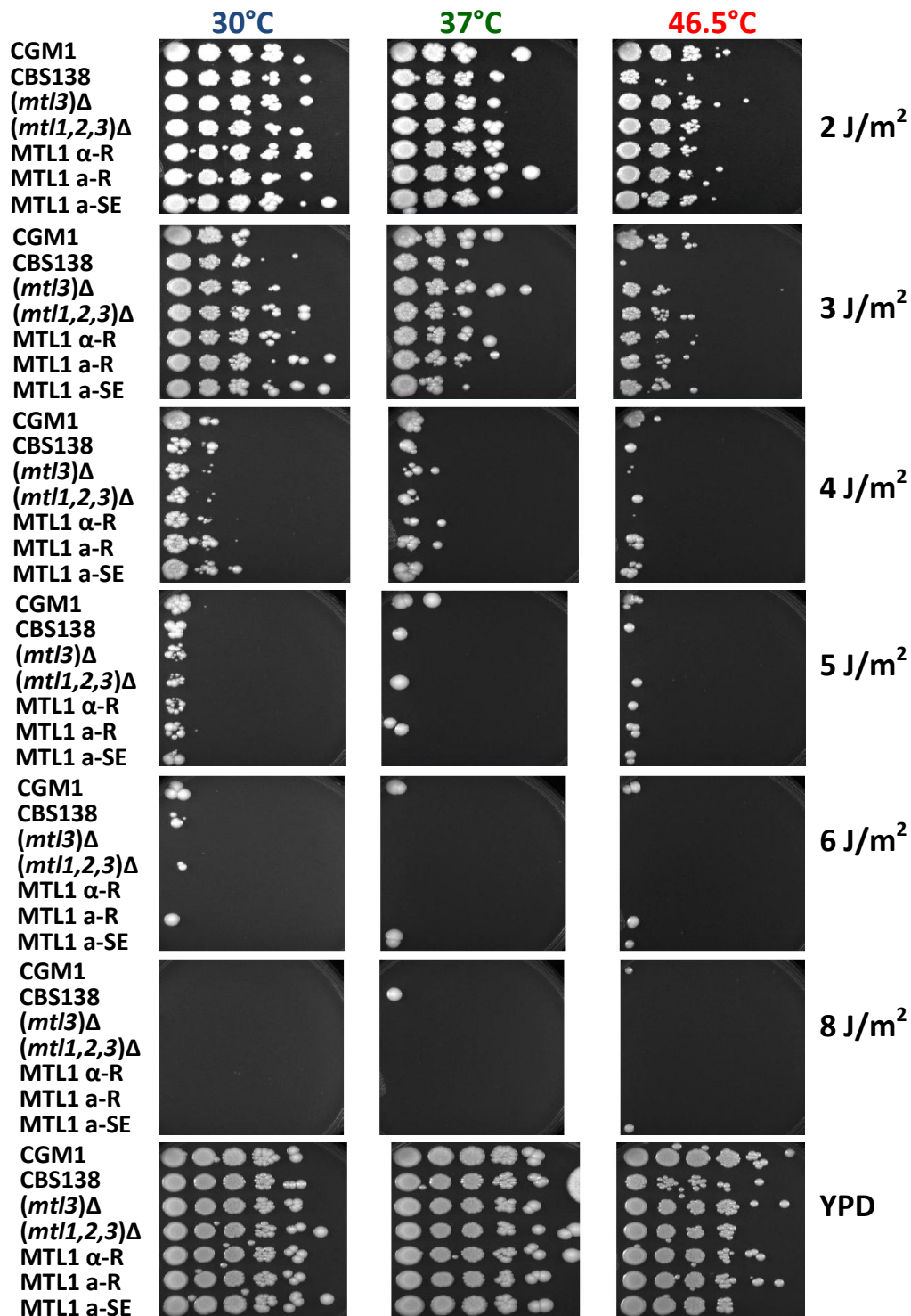
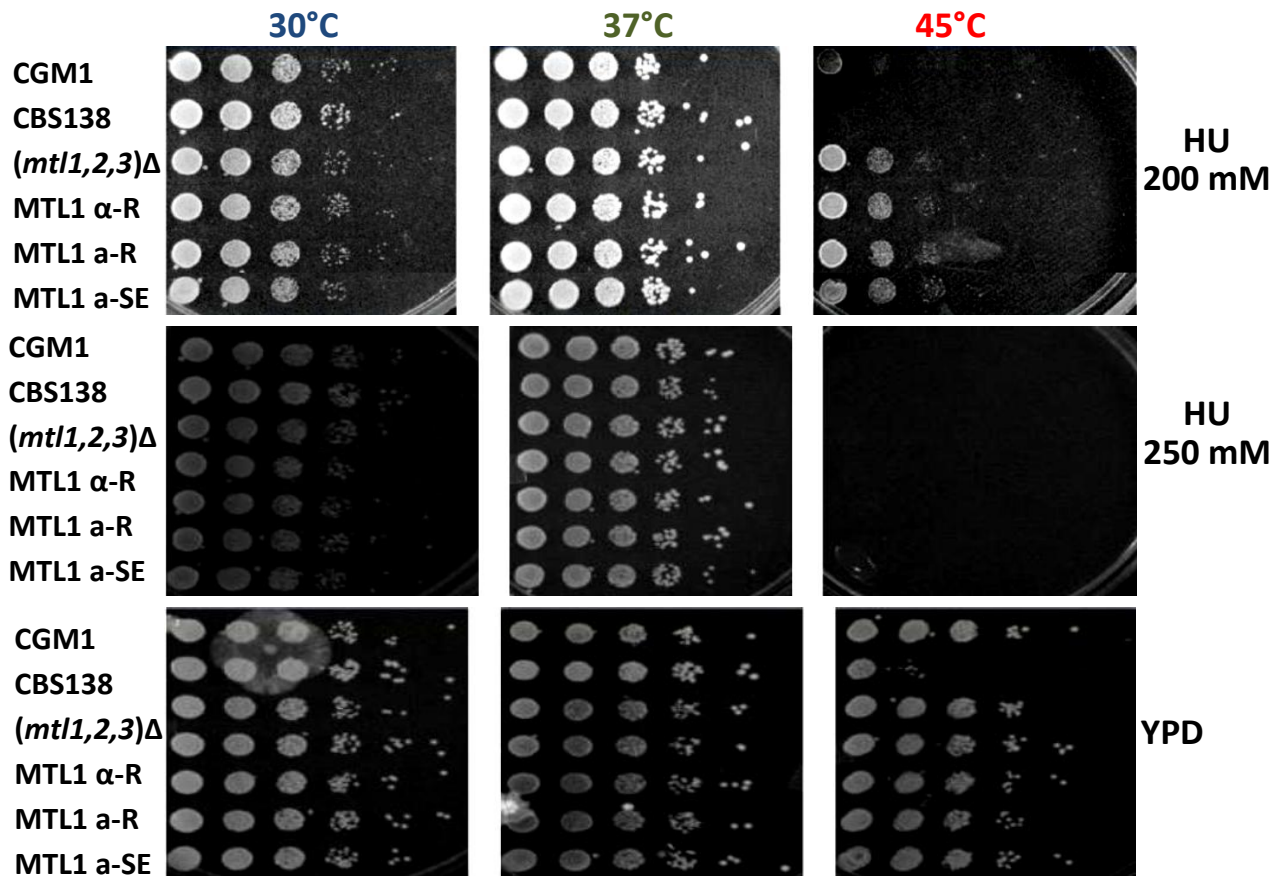


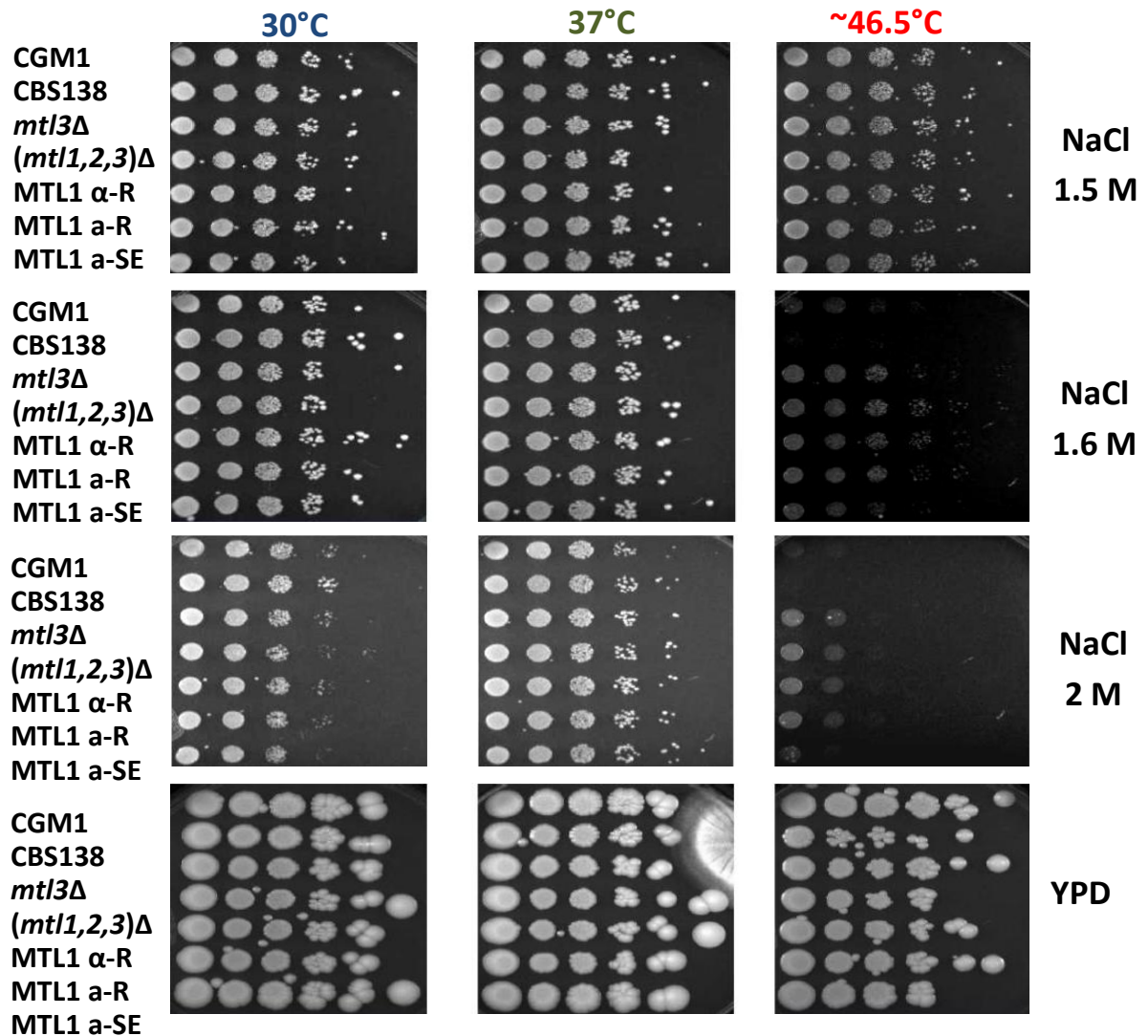
Figura S5. Evaluación de la sensibilidad a la luz UV de las cepas de *C. glabrata* mutantes en los loci *MTL*.

Realizamos diluciones logarítmicas seriadas de suspensiones celulares y se depositaron 5  $\mu$ l de cada dilución en el medio de crecimiento. Incubamos las cajas a las temperaturas indicadas y se fotografiaron a las 72 h.



**Figura S6. Evaluación del crecimiento de las cepas de *C. glabrata* mutantes en los loci *MTL* en medio agar YPD con hidroxurea**

Realizamos diluciones logarítmicas seriadas de suspensiones celulares y se depositaron 5  $\mu$ l de cada dilución en el medio de crecimiento. Incubamos las cajas a las temperaturas indicadas y se fotografiaron a las 72 h.



**Figura S7. Evaluación del crecimiento de las cepas de *C. glabrata* mutantes en los loci *MTL* en agar YPD con NaCl.**

Realizamos diluciones logarítmicas seriadas de suspensiones celulares y se depositaron 5  $\mu$ l de cada dilución en el medio de crecimiento. Incubamos las cajas a las temperaturas indicadas y se fotografiaron a los 6 d



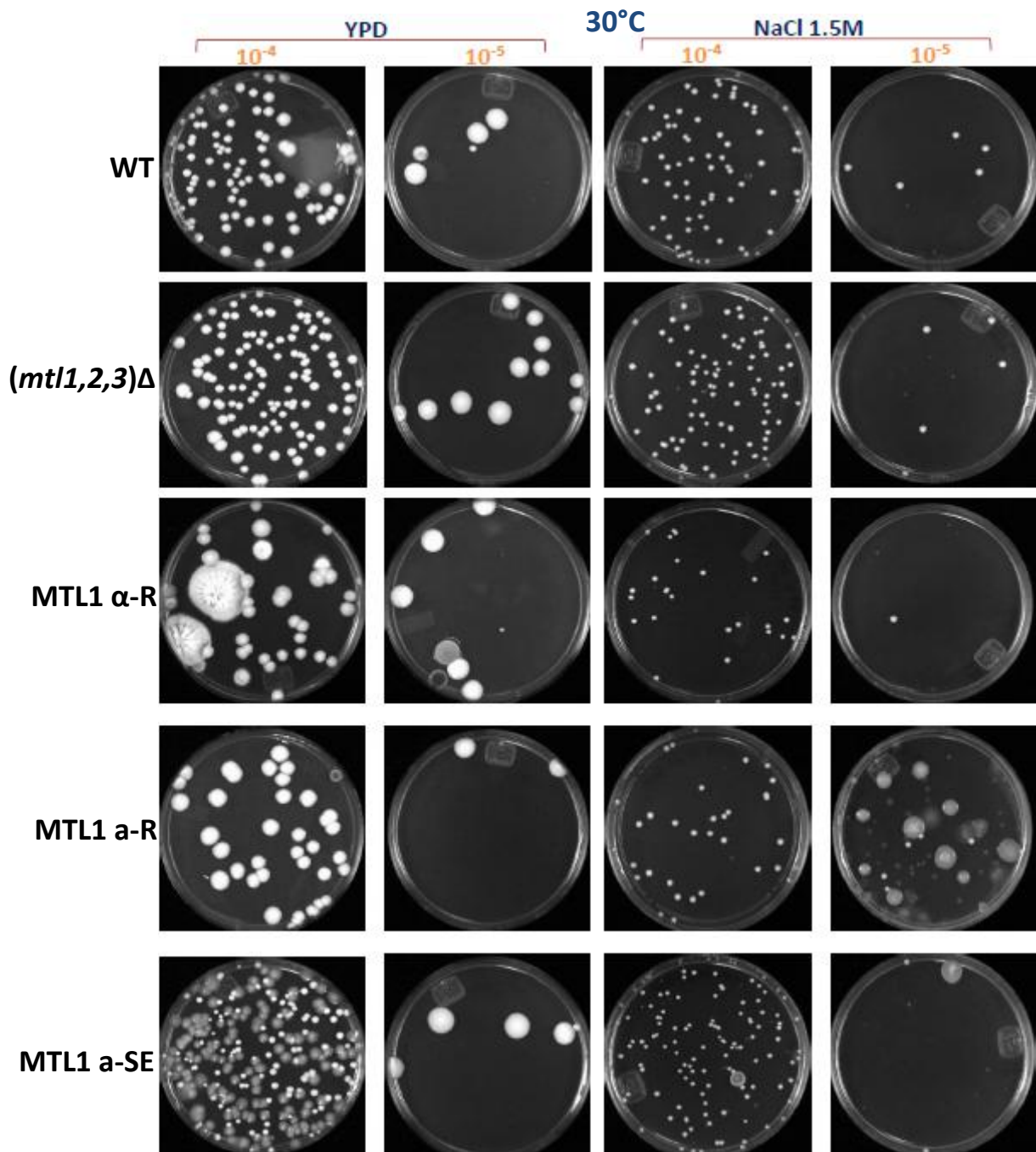


Figura S8. Evaluación de las colonias aisladas de las cepas de *C. glabrata* mutantes en los loci *MTL* en agar YPD con NaCl 1.5M. Realizamos diluciones  $10^{-5}$  a partir de una solución con una densidad óptica de 1 y sembramos 100  $\mu$ l y se incubaron por seis días a 30°C.

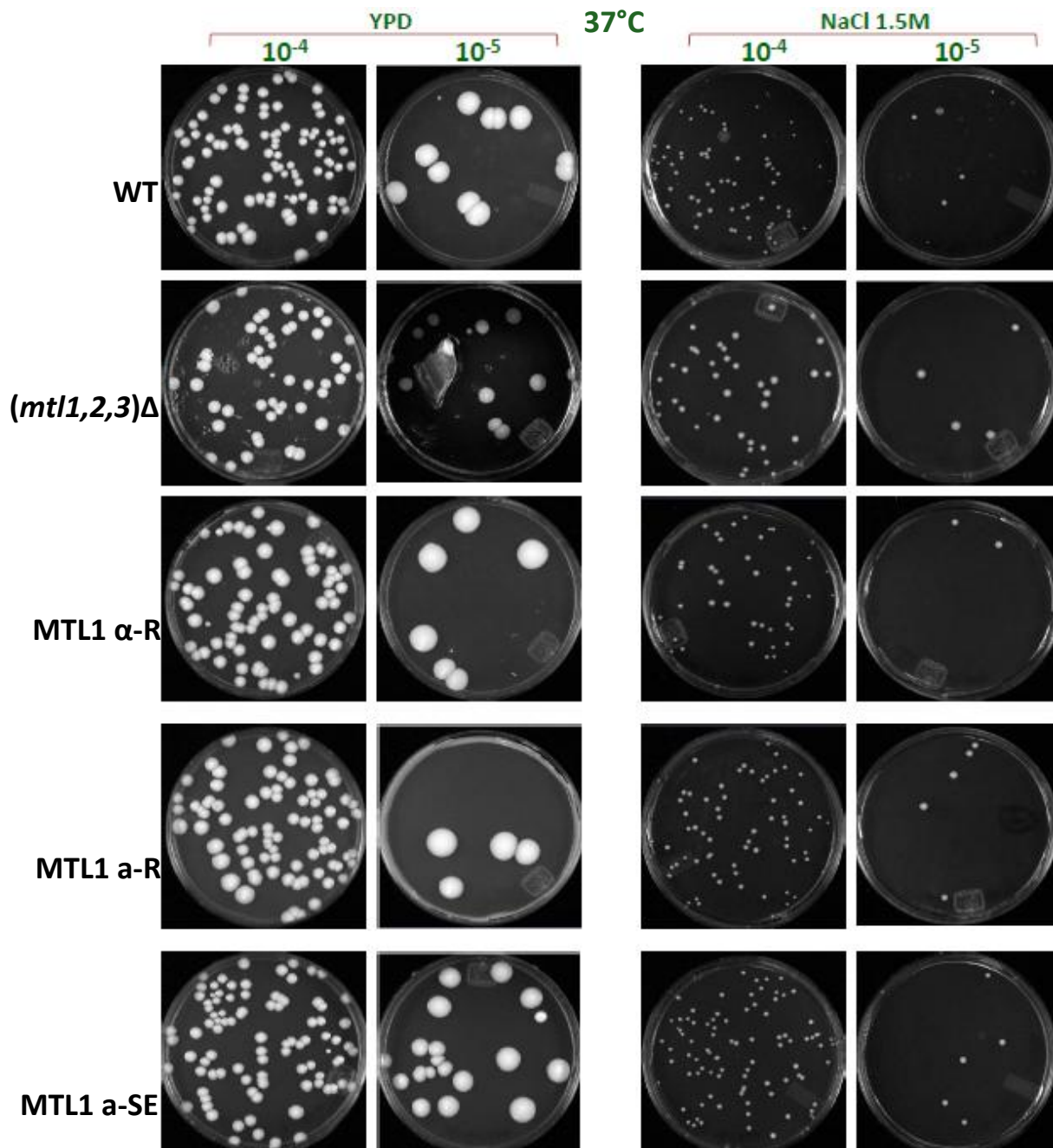


Figura S9. Evaluación de las colonias aisladas de las cepas de *C. glabrata* mutantes en los loci *MTL* en agar YPD con NaCl 1.5M.

Realizamos diluciones  $10^{-5}$  a partir de una solución con una densidad óptica de 1 y sembramos 100  $\mu$ l. Las cajas se incubaron por seis días a 37°C.

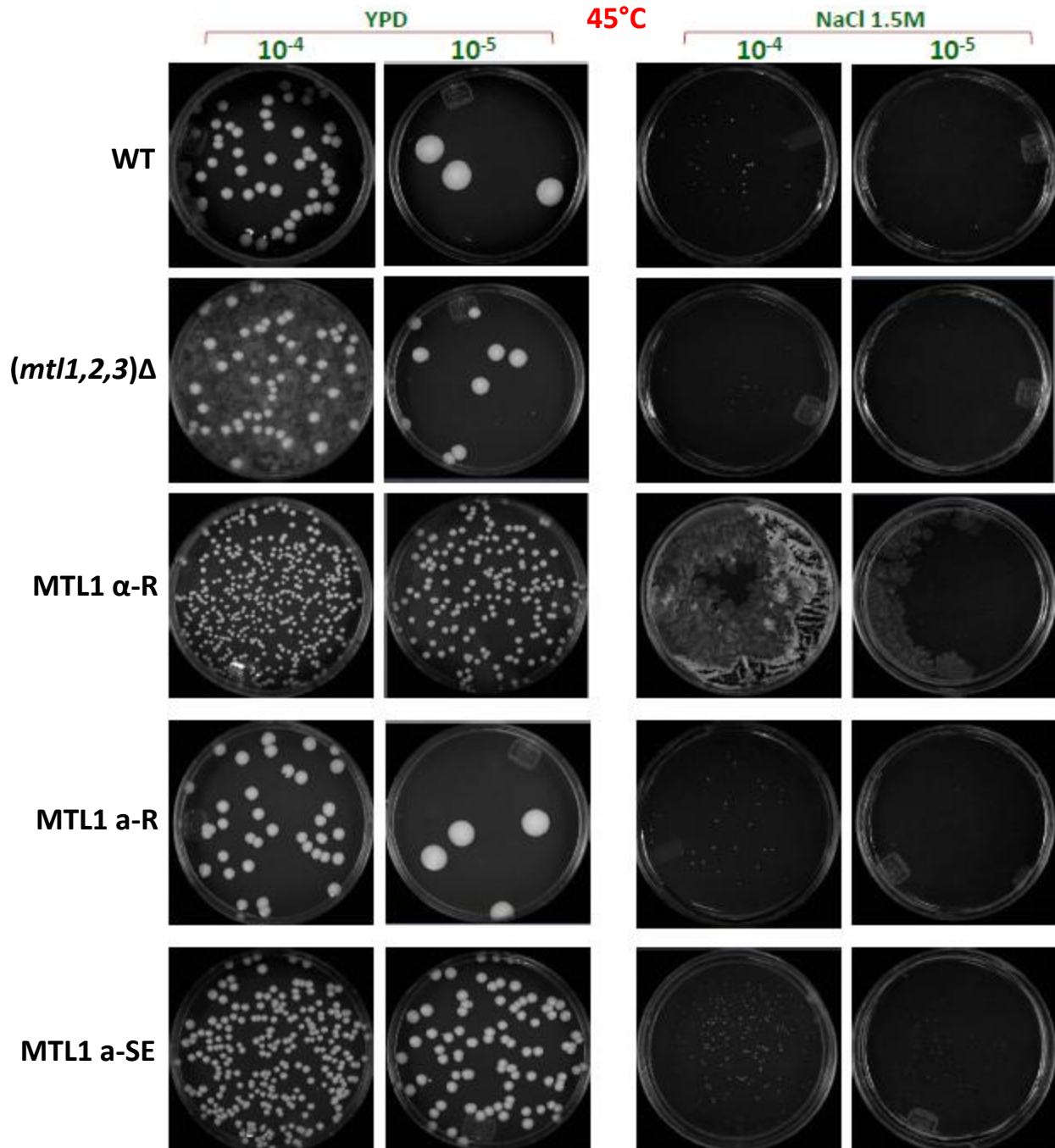


Figura S10. Evaluación de las colonias aisladas de las cepas de *C. glabrata* mutantes en los loci *MTL* en agar YPD con NaCl 1.5M.

Realizamos diluciones 10<sup>-5</sup> a partir de una solución con una densidad óptica de 1 y sembramos 100  $\mu$ l. Las cajas se incubaron por seis días a 45°C.

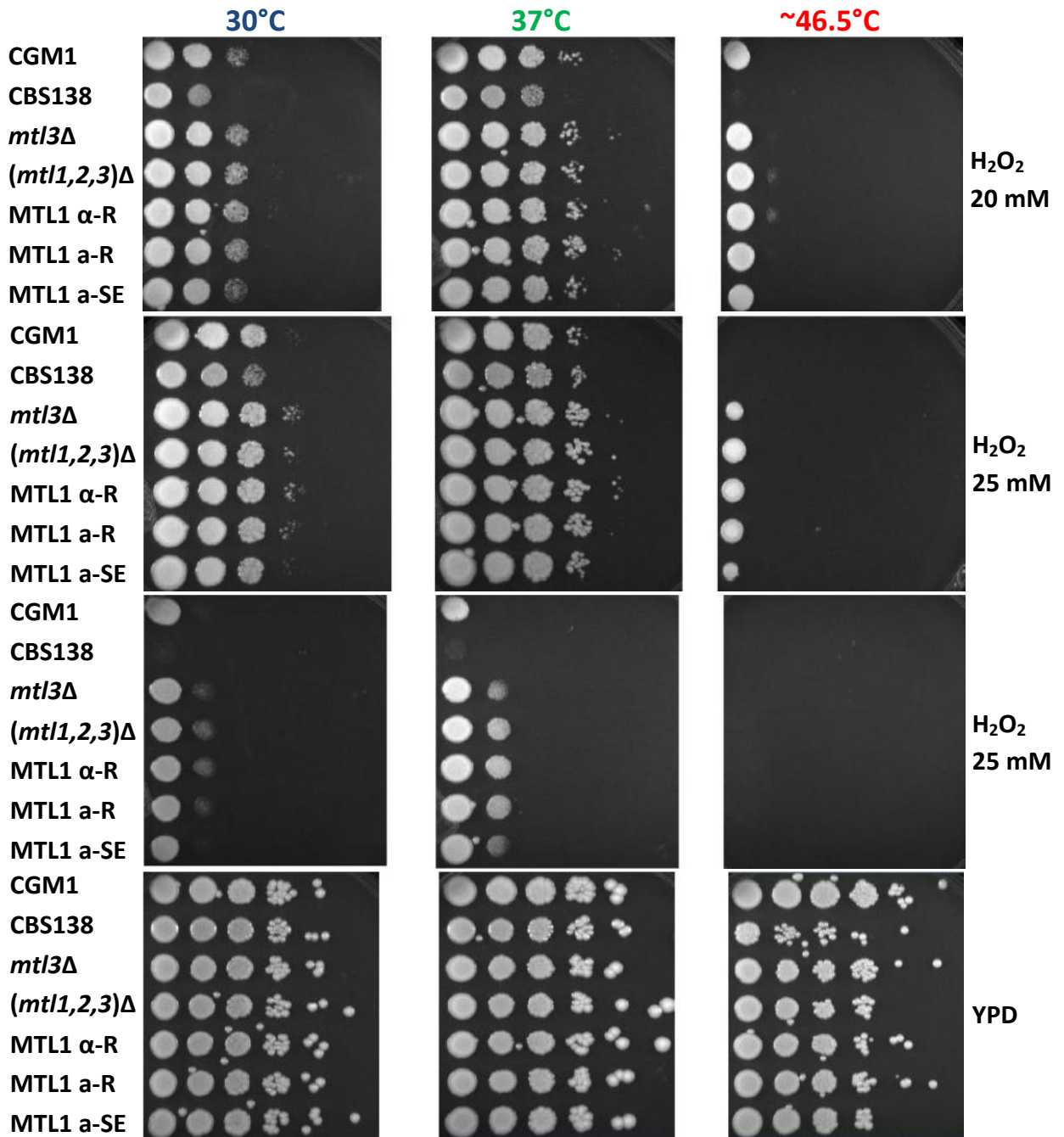
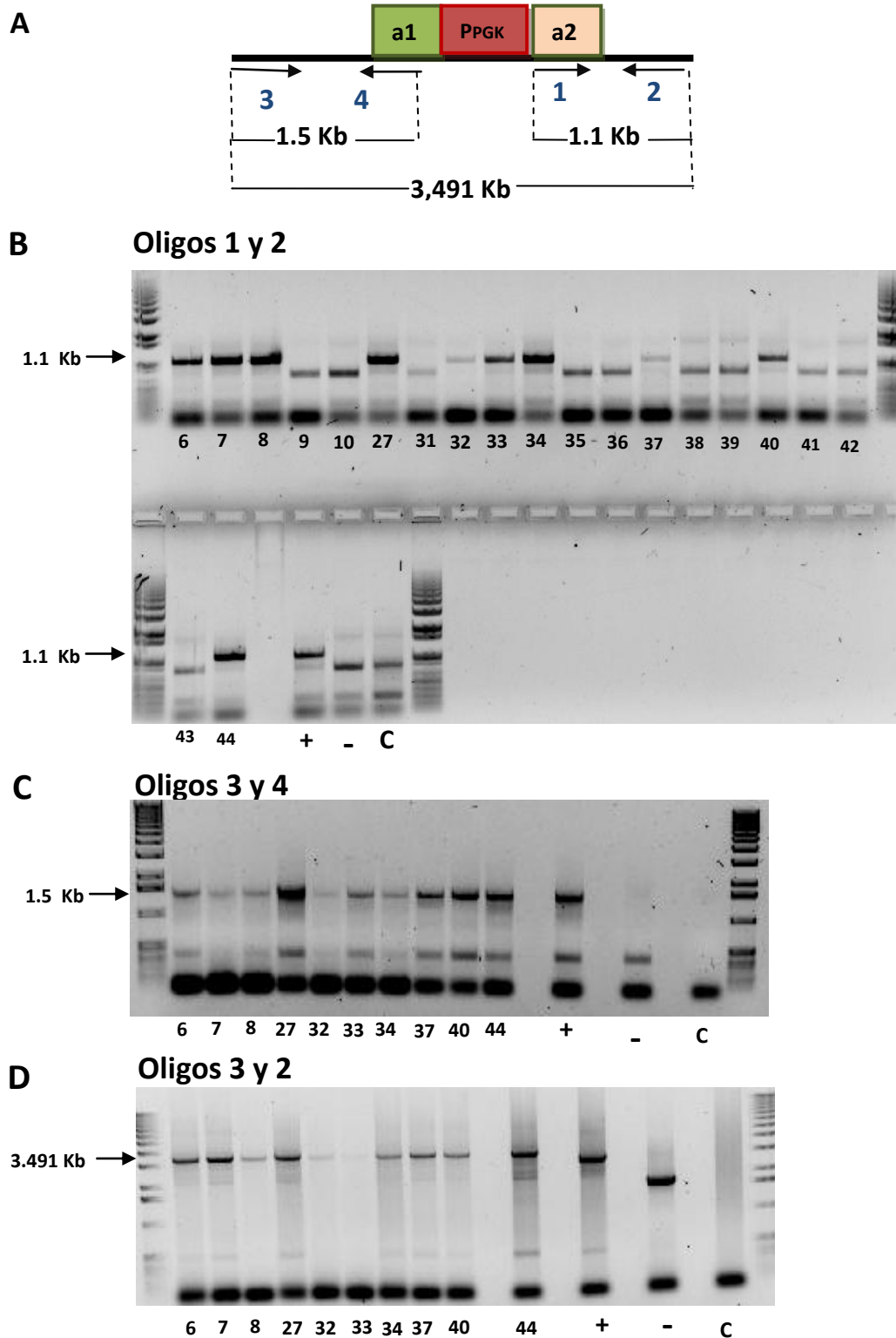


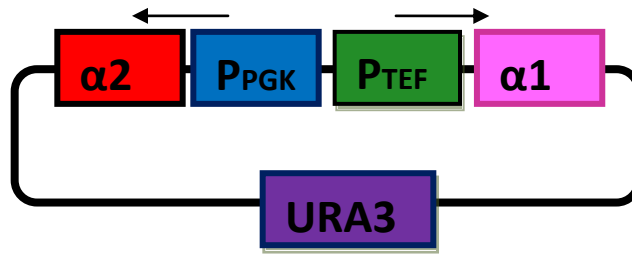
Figura S11. Evaluación del crecimiento de las cepas de *C. glabrata* mutantes en los loci *MTL* en agar YPD con peróxido de hidrógeno.

Incubamos las cajas por 48 h a las temperaturas indicadas.



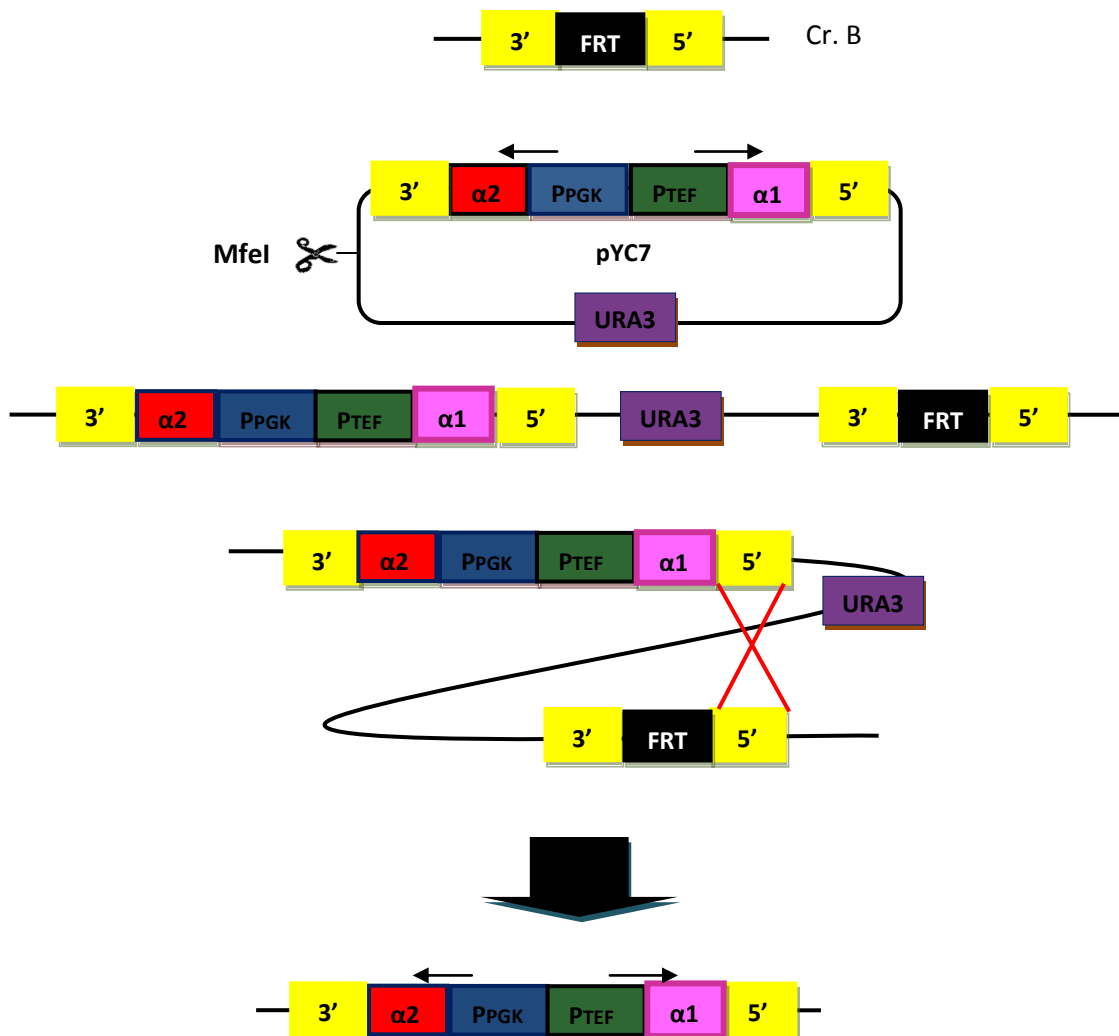
**Figura S12. Comprobación por PCR de la integración de la cepa de *C. glabrata* sobreexpresante de información  $\alpha$ .**

A) Gel diagnóstico de uno de los extremos de la integración del plásmido pTP7 utilizando los oligos 199 y 161. B) Gel diagnóstico del otro extremo de la integración del plásmido utilizando los oligos 160 y 201. C) PCR across de la integración y resolución utilizando los oligos 160 y 161.

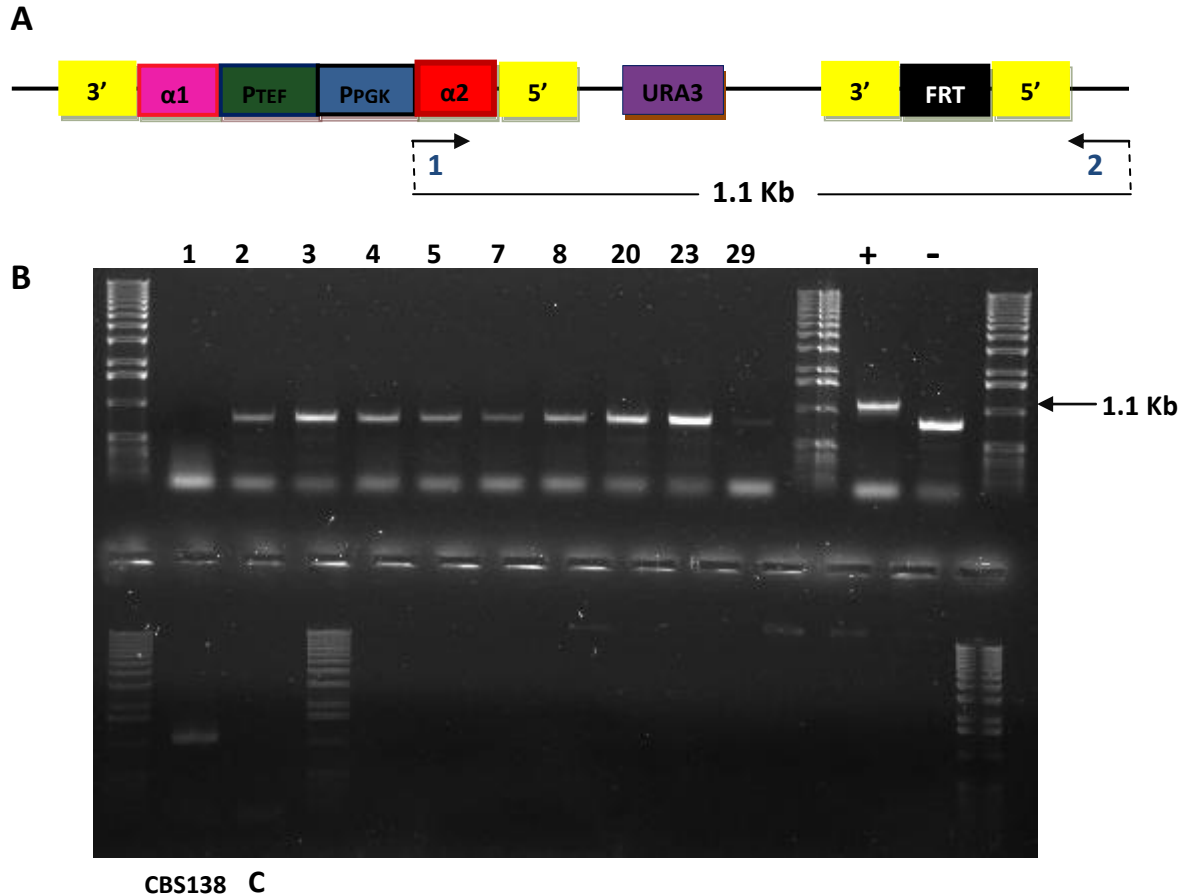


**Figura S13. Plásmido pYC7 empleado para la construcción de la cepa de *C. glabrata* sobreexpresante de información  $\alpha$ .**

El gen  $\alpha 2$  se encuentra bajo el promoto del gen *PGK*, mientras que el gen  $\alpha 1$  bajo el promotor del gen *TEF*. El plásmido contiene el gen de auxotrofia *URA3*. Se indica el sitio *MfeI* que se utilizó para digerir el plásmido e integrar en el genoma de la cepa triple mutante en los loci *MTL*.

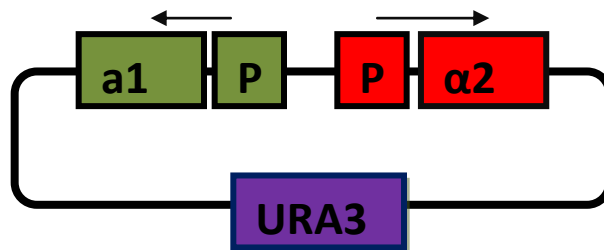


**Figura S14. Estrategia de construcción de la cepa sobreexpresante de información  $\alpha$ .** Digerimos el plásmido pYC7 con *MfeI* para linearizarlo e integrarlo en el genoma de la cepa triple mutante en los locus *MTL*. Posteriormente al eliminar la presión selectiva que demande la presencia del gen *URA3* se resuelve la integración y ahora nuestra cepa antes carente de los tres loci *MTL*, contiene el locus *MTL1* con información de apareamiento tipo  $\alpha$  bajo promotores fuertes.



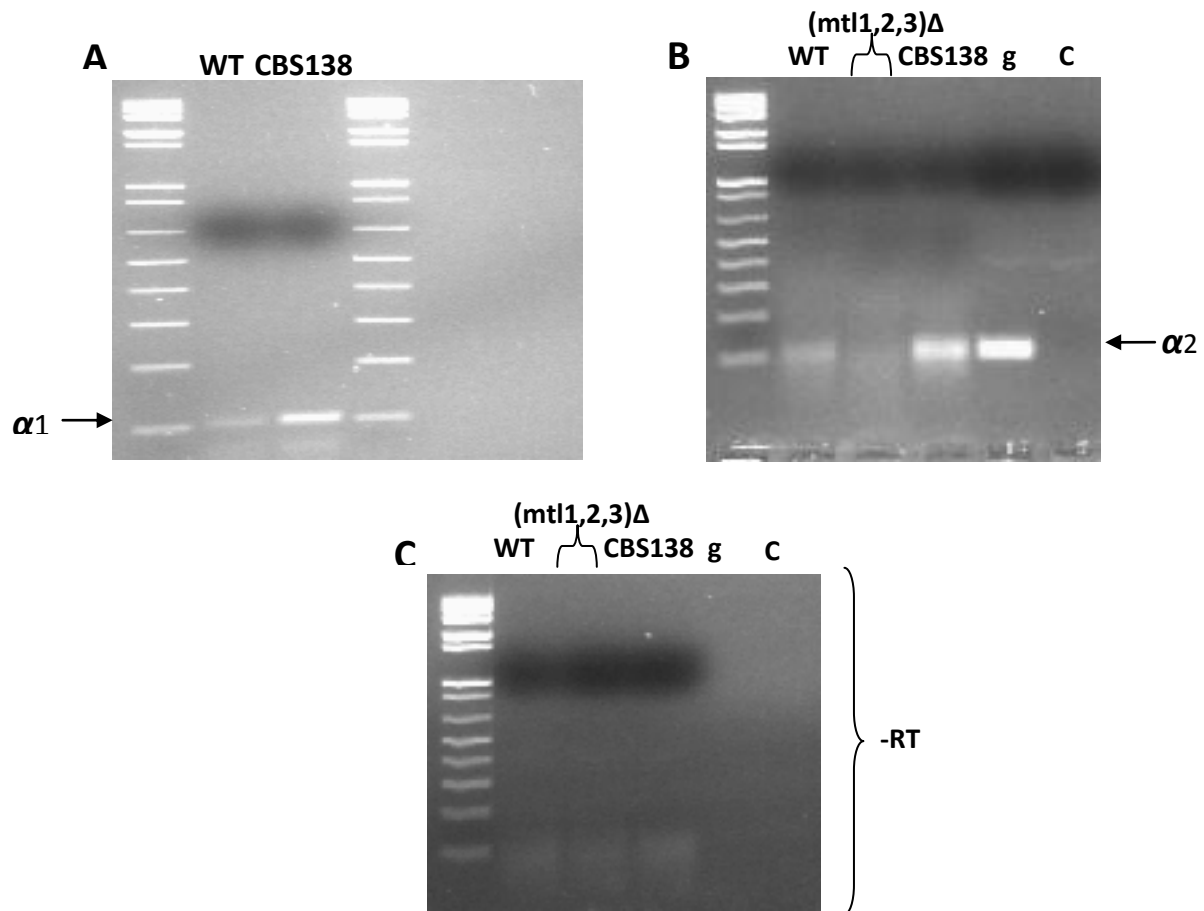
**Figura S15. Colonias obtenidas de la transformación de pYC7 en la cepa triple mutante en los loci *MTL* de *C. glabrata***

A) Ubicación de los oligos empleados para el diagnóstico de la cepa transformante. B) Gel de la reacción de PCR en la cual se utilizó la cepa CGM1 y la CBS138 como control positivo, la cepa triple mutante en los loci *MTL* como control negativo. Ninguna colonia fue positiva en esta integración.



**Figura S16. Plásmido integrativo planeado para la construcción de la cepa que exprese  $\alpha 1$  y  $\alpha 2$  a partir de *MTL1*.**

La transcripción de estos dos genes es divergente y cada uno se encuentra bajo su propio promotor para obtener niveles de expresión similares a los de la cepa WT. Contiene también el gen URA3 de selección en levadura. Las flechas indican la dirección de la transcripción.



**Figura S17. Geles de RT-PCR de cepas de *C. glabrata* con información alfa.**

A) Expresión del gen  $\alpha 2$  en la cepa WT y la cepa estándar CBS138, B) Expresión del gen  $\alpha 2$  de la cepa WT en la cual se observa un poco de expresión de  $\alpha 2$  que proviene de un silenciamiento incompleto de *MTL3*, triple mutante en los loci MTL que no expresa  $\alpha 2$  (ni ningún gen de apareamiento), la cepa estándar que contiene información  $\alpha$  tanto en *MTL1* como en *MTL3*, el control de DNA genómico y sin DNA ni RNA, C) Control sin transcriptasa reversa que indica ausencia de DNA en el RNA utilizado (C. Ramírez, datos no publicados).



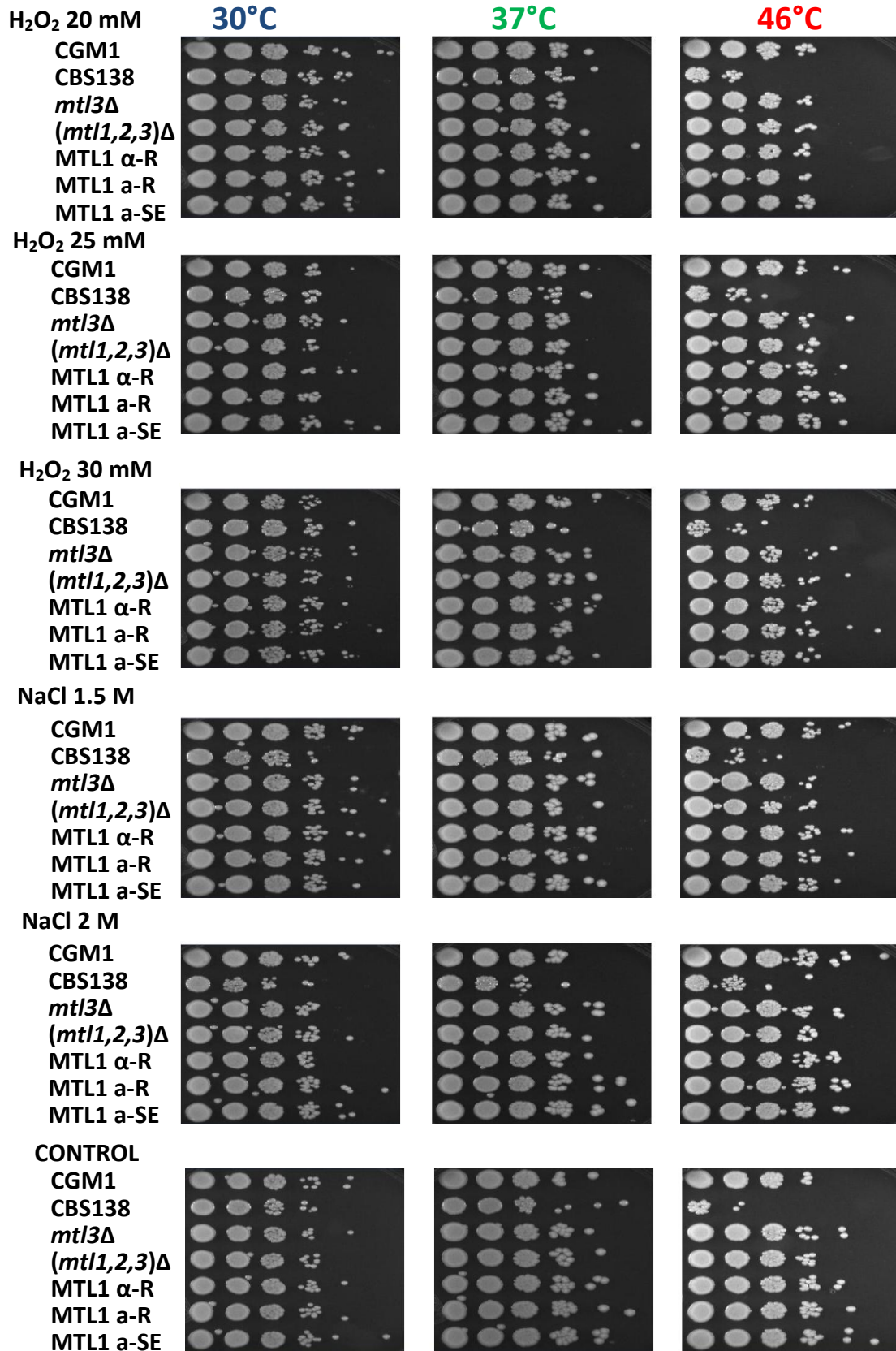


Figura S18. Evaluación del crecimiento de las cepas de *C. glabrata* mutantes en los loci *MTL* en agar YPD tras diferentes estímulos por tres horas. Las cajas se incubaron por 48 h.