

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

POSGRADO EN CIENCIAS EN BIOLOGÍA MOLECULAR

**Caracterización de los genes *MTL* de *Candida
glabrata* en *Saccharomyces cerevisiae***

Tesis que presenta

Karen Julia Nuñez Reza

Para obtener el grado de

Maestra en Ciencias en Biología Molecular

Directora de la Tesis:

Dr. Irene Castaño Navarro

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



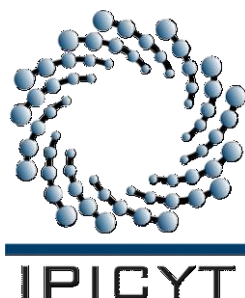
Constancia de aprobación de la tesis

La tesis "**Caracterización de los genes MTL de *Candida glabrata* en *Saccharomyces cerevisiae***" presentada para obtener el Grado de Maestra en Ciencias en Biología Molecular fue elaborada por **Karen Julia Nuñez Reza** y aprobada el **doce de agosto del dos mil dieciséis** por los suscritos, designados por el Colegio de Profesores de la División de Biología Molecular del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C.

Dra. Irene Beatriz Castaño Navarro
Directora de la tesis

Dr. Ángel Gabriel Alpuche Solís
Miembro del Comité Tutorial

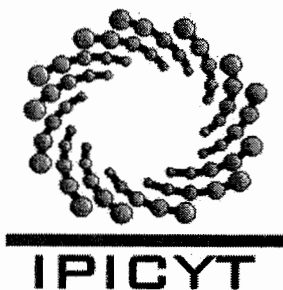
Dr. Juan Francisco Jiménez Bremont
Miembro del Comité Tutorial



Créditos Institucionales

Esta tesis se elaboró 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. Este trabajo fue apoyado por el proyecto CB 2014 No. 239629 del Fondo de Ciencia Básica, SEP-CONACYT otorgado a ICN.

Durante la realización del trabajo el autor recibió una beca académica otorgada por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (No.331823) y del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C.



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

Acta de Examen de Grado

El Secretario Académico del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C., certifica que en el Acta 158 del Libro Primero de Actas de Exámenes de Grado del Programa de Maestría en Ciencias en Biología Molecular está asentado lo siguiente:

En la ciudad de San Luis Potosí a los 12 días del mes de agosto del año 2016, se reunió a las 12:00 horas en las instalaciones del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C., el Jurado integrado por:

Dr. Ángel Gabriel Alpuche Solís	Presidente	IPICYT
Dr. Alejandro De Las Peñas Nava	Secretario	IPICYT
Dra. Irene Beatriz Castaño Navarro	Sinodal	IPICYT

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

MAESTRA EN CIENCIAS EN BIOLOGÍA MOLECULAR

sustentó la C.

Karen Julia Nuñez Reza

sobre la Tesis intitulada:

Caracterización de los genes MTL de Candida glabrata en Saccharomyces cerevisiae

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 13:28 horas, procediendo a la firma del Acta los integrantes del Jurado. Dando fe el Secretario Académico del Instituto.

A petición de la interesada y para los fines que a la misma convengan, se extiende el presente documento en la ciudad de San Luis Potosí, S.L.P., México, a los 12 días del mes de agosto de 2016.


Mtra. Ivonne Lizette Cuevas Vélez
Jefa del Departamento del Posgrado


Dr. Marcial Bonilla Marín
Secretario Académico



A la memoria de mi padre.

A mi madre y mi hermana por ser mi más grande apoyo y fuente de amor
infinito.

Agradecimientos

Toda mi gratitud para la Dra. Irene Castaño Navarro y el Dr. Alejandro De Las Peñas Nava por su invaluable enseñanza y confianza.

A mis asesores al Dr. Ángel Alpuche y al Dr. Juan Francisco Jiménez, por sus acertadas opiniones, sugerencias y apoyo.

A la Dra. Ma. Guadalupe Gutiérrez Escobedo por su asistencia técnica.

Al LANBAMA en especial a la Técnico Verónica Zárate y al Dr. Alpuche Solis por los servicios de secuenciación prestados.

A Ernesto Mascot por mostrarme una perspectiva diferente de la vida.

A mis colegas Marcela Briones, Eunice López, Osney Leyva, Norma Vázquez, Gabriel Luna, Jefe Rodríguez por su invaluable amistad y por todos los momentos maravillosos que pasamos juntos en esta etapa.

A todos mis compañeros de laboratorio de Microbiología Molecular del IPICYT y a mis amigos de generación: Clara, Julián y Marco.

Contenido

Constancia de aprobación de la tesis	ii
Créditos institucionales	iii
Acta de examen	iv
Dedicatorias	v
Agradecimientos	vi
Lista de figuras	viii
Anexos	ix
Resumen	x
Abstract	xi
Introducción	1
Material y métodos	5
Resultados	9
Discusión	16
Referencias	24
Pies de figura	28
Figuras	31
Anexos	37

Lista de figuras

1. Fusiones transcripcionales de los promotores de los genes alfa1, alfa2 y a1 de *C. glabrata* con YFP transformados en *S. cerevisiae* 31
2. La información genética codificada en los loci MTL1a y MTL1 α no complementa el apareamiento en *Saccharomyces cerevisiae* 33
3. La información de los genes estructurales *Cgalfa1*, *Cgalfa2*, *Cgalfa3* y *Cga1* de *C. glabrata* no complementa para la función de apareamiento en *Saccharomyces cerevisiae* 34
4. Fusiones transcripcionales de los promotores de los genes *Cgalfa1*, *Cgalfa2* y *Cga1* de *C. glabrata* que fueron transformados en *C. glabrata* 35

Anexos

Tabla S1. Cepas de <i>C. glabrata</i>	37
Tabla S2. Cepas de <i>S. cerevisiae</i>	39
Tabla S3. Plásmidos	43
Tabla S4. Oligonucleótidos	45
Fig. S1 Circuito de regulación del tipo celular en <i>S. cerevisiae</i>	49
Fig. S2 Alineamiento de los promotores alfa1, alfa2 y a1 de <i>C. glabrata</i> con <i>S. cerevisiae</i>	50
Fig. S3 Región promotora de los genes <i>Cgalfa1</i> , <i>Cgalfa2</i> y <i>Cga1</i> de <i>C.</i> <i>glabrata</i>	52
Fig. S4 Actividad de los promotores de los genes <i>Cgalfa1</i> , <i>Cgalfa2</i> y <i>Cga1</i> de <i>C. glabrata</i> en <i>S. cerevisiae</i> en medio de cultivo CAA.	53
Fig. S5 Posibles factores transcripcionales encontrados en la región promotora de los genes alfa1-alfa2 de <i>C. glabrata</i>	54
Fig. S6 Posibles factores transcripcionales encontrados en la región promotora del gen <i>a1</i> de <i>C. glabrata</i>	55
Fig. S7 Posibles factores transcripcionales encontrados en la región promotora de los genes alfa1-alfa2 de <i>S. cerevisiae</i>	56
Fig. S8 Posibles factores transcripcionales encontrados en la región promotora del gen <i>a1</i> de <i>S. cerevisiae</i>	57

Resumen

Caracterización de los genes *MTL* de *Candida glabrata* en *Saccharomyces cerevisiae*

La reproducción sexual se ha descrito como una ventaja evolutiva debido a la recombinación genética que podría favorecer una mejor adaptación. Por ello es importante el estudio de la regulación de la expresión de los genes que controlan el apareamiento, y la función de las proteínas codificadas por estos genes (*Cgalfa1*, *Cgalfa2*, *Cgalfa3* y *Cga1*). Nuestro modelo de estudio, *Candida glabrata*, es una levadura patógena y asexual, que posee tres loci ortólogos (*MTL1*, *MTL2* y *MTL3*) a los loci que regulan el apareamiento en la levadura sexual *Saccharomyces cerevisiae*. En este trabajo nos propusimos determinar si los genes codificados en los loci *MTL* de *C. glabrata* pueden complementar para la función de apareamiento, a mutantes de los genes ortólogos en *S. cerevisiae*. Mediante ensayos de complementación heteróloga observamos que las proteínas *Cgalfa1*, *Cgalfa2*, *Cgalfa3* y *Cga1* de *C. glabrata* no conservan la función para apareamiento de *S. cerevisiae*. Además, determinamos la actividad de los promotores de estos genes tanto en *S. cerevisiae* como en *C. glabrata*. Para ello construimos vectores que contienen fusiones transcripcionales de los promotores de los genes de *C. glabrata* con la proteína fluorescente YFP y encontramos que estos promotores se reconocen en *S. cerevisiae*. También determinamos que son activos en *C. glabrata*. Sin embargo, la actividad de estos promotores es menor en *C. glabrata* que en *S. cerevisiae*. Nuestros datos sugieren que la regulación y la función de las proteínas *Cgalfa1*, *Cgalfa2*, *Cgalfa3* y *a1* de *C. glabrata* podría ser diferente a la de *S. cerevisiae*.

PALABRAS CLAVE. Apareamiento, actividad de promotores, complementación heteróloga, *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida glabrata*.

Abstract

Characterization of *Candida glabrata* *MTL* genes in *Saccharomyces cerevisiae*

Sexual reproduction is thought to provide evolutionary advantage due to genetic recombination, which could provide better adaptation to environmental conditions. Therefore, it is important to study the regulation of expression of the genes that control mating, as well as the function of the proteins encoded in these genes (*Cgalpha1*, *Cgalpha2*, *Cgalpha3* and *Cga1*). Our model organism, *Candida glabrata*, is an asexual fungal pathogen that contains three orthologous loci to the loci that control mating in the sexual yeast *Saccharomyces cerevisiae* (*MTL1*, *MTL2* and *MTL3*). In this work we wanted to determine whether the genes encoded in the *C. glabrata* *MTL* loci complement the mating function in *S. cerevisiae*. We performed heterologous complementation assays and we found that the *Cgalpha1*, *Cgalpha2*, *Cgalpha3* and *Cga1* genes, are unable to complement, the mating function in mating-deficient *S. cerevisiae* strains. We also determine the promoter activity of these genes both in *S. cerevisiae* and in *C. glabrata*. To this end we made replicative vectors containing transcriptional fusions of each promoter with the yellow fluorescent protein YFP and found that the *C. glabrata* promoters are recognized in *S. cerevisiae* and they are also functional in *C. glabrata*, although the activity is higher in *S. cerevisiae*. Our data suggests that the regulation and the function of *Cgalpha1*, *Cgalpha2*, *Cgalpha3* and *Cga1* proteins are different from the role they have in mating in *S. cerevisiae*.

KEY WORDS. mating, promoter activity, heterologous complementation, *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida glabrata*.

1 **Introducción**

2 El apareamiento es un proceso por el cual dos células haploides con tipo celular
3 complementario, por ejemplo, una célula tipo **a** con una célula tipo alfa, se
4 reconocen e inician la fusión celular y fusión nuclear para dar lugar a células
5 diploides que posteriormente transitan por el proceso de meiosis. Las células
6 diploides tienen ventajas evolutivas de las cuales las células haploides carecen;
7 algunas de estas ventajas la son la recombinación genética durante la meiosis y la
8 variabilidad que ésta le confiere y la formación de esporas en respuesta a
9 condiciones de limitación nutricional como forma de supervivencia (Phi 1995;
10 Johnson et al. 1998; McDonald et al. 2016), entre otras.

11 El apareamiento es un proceso estrictamente controlado donde, la regulación
12 transcripcional está bien definida, ya que es costosa por la energía que se emplea
13 para realizar este proceso (Kahana-Edwin et al. 2013). Esta regulación no se
14 encuentra totalmente descrita en todos los modelos de estudio de hongos; sin
15 embargo, en la levadura que más se conoce es *Saccharomyces cerevisiae*
16 (Mazurie et al. 2005).

17 Los genes implicados directamente en la regulación del apareamiento en *S.*
18 *cerevisiae* son los que se encuentran en el locus de apareamiento llamado *MAT*,
19 que regula genes que se requieren para la reproducción sexual. Además, los
20 genes localizados en el locus *MAT* también controlan la expresión de otros genes
21 no relacionados con la reproducción sexual, sino con la respuesta a ciertos tipos
22 de estrés (Fig. S1) (Galgoczy et al. 2004).

23 *S. cerevisiae* presenta tres tipos celulares bien diferenciados que están
24 determinados por el alelo que se expresa a partir del locus de apareamiento *MAT*.
25 La información de los genes presentes en este locus pueden ser tipo **a** o alfa que
26 codifican para el gen *Sca1* (información **a**), o para los genes *Scalfa1* y *Scalfa2*
27 (información tipo alfa); y debido a estos genes los tipos celulares pueden ser **a**,
28 alfa, o **a/alfa**. Los tipos celulares **a** y alfa son haploides; el tercer tipo celular resulta
29 del apareamiento de los dos tipos celulares haploides, lo que da lugar a una célula
30 diploide (Haber 1998; Soll et al. 2009) (Fig. S1).

31 La proteína *Scalfa1* de *S. cerevisiae* se une directamente a los promotores de los
32 genes específicos de alfa y reconoce una región específica de ADN en los genes
33 específicos de células alfa (α sg, por sus siglas en inglés). En ausencia de esta
34 proteína los genes regulados por la misma no se expresan. Las células de tipo **a**
35 no expresan el gen *Scalfa1*, y por lo tanto no pueden expresar genes específicos
36 de células alfa (Hagen et al. 1993).

37 Las células de tipo celular **a/alfa** (diploides) no pueden aparearse, pero pueden
38 realizar meiosis y esporular bajo ciertas condiciones de limitación de nutrientes
39 (Wu et al. 1996). Estas células expresan los genes que codifican para las
40 proteínas *Scalfa2* y *Sca1*. La proteína *Scalfa2* forma un heterodímero con la
41 proteína *Sca1* y ambas reprimen el gen *Scalfa1*, y por esta razón los genes
42 específicos de las células de tipo alfa no se expresan. Además, la proteína *Scalfa2*
43 es capaz de reprimir los genes específicos de las células **a** (Fig. S1) (Galgoczy et
44 al. 2004; Zhong et al. 1999).

45 La mayoría de los hongos patógenos de humanos clásicamente se han
46 considerado asexuales, pero recientemente se ha descubierto que pueden tener
47 ciclos sexuales crípticos o ciclos parasexuales lo que podría impactar en su
48 patogénesis. En la reproducción parasexual la transferencia de material genético y
49 recombinación ocurre independientemente del proceso de meiosis, un ejemplo
50 representativo de un organismo que tiene reproducción parasexual es *Candida*
51 *albicans* (Ene & Bennett 2014).

52 *Candida glabrata* es una levadura patógena, haploide y asexual, que tiene una
53 relación filogenética más estrecha con *S. cerevisiae* que cualquier otra especie
54 perteneciente al clado *Candida*. *C. glabrata* es la segunda especie más
55 comúnmente aislada después de *C. albicans* en infecciones hospitalarias
56 (Gabaldón et al. 2013). Los procesos de apareamiento y de meiosis no se han
57 descrito en esta especie, a pesar de tener tres loci de apareamiento, homólogos a
58 los presentes en *S. cerevisiae*, que codifican los ortólogos de los genes que
59 controlan el apareamiento y la identidad del tipo celular sexual en *S. cerevisiae*.
60 Estos loci son *CgMTL1*, *CgMTL2* y *CgMTL3*, estos dos últimos podrían ser los loci
61 ortólogos a los loci *HMR* y *HML* en *S. cerevisiae* y tener un papel equivalente
62 (Srikantha et al. 2003; Brockert et al. 2003). El locus *CgMTL1* en la cepa de
63 laboratorio (BG14) tiene información α , y también en el locus *CgMTL2*, en cambio
64 en el *CgMTL3* tiene información de tipo alfa, con una variante del gen *Cgalfa2*,
65 llamado *Cgalfa3* (Yáñez-Carrillo et al. 2014; Robledo-Márquez et al. Sometido).

66 El caso de *C. glabrata* es particular, ya que a pesar de la cercana relación
67 filogenética entre *S. cerevisiae* y *C. glabrata*, los genes que codifican las

68 feromonas de *C. glabrata* no se expresan en la mayoría de los aislados clínicos,
69 tampoco se ha visto respuesta a la feromona por ninguno de los dos tipos
70 celulares **a** o alfa. Además, en *C. glabrata* no existe la regulación de genes
71 específicos de células **a** o alfa, ya que los genes ortólogos correspondientes se
72 expresan en todas las cepas, independientemente del tipo de información (**a** o
73 alfa) que expresan en el locus *CgMTL1*, o incluso en ausencia de información de
74 apareamiento (Ramírez-Zavaleta et al. 2010). De hecho, aún no se ha encontrado
75 evidencia de reproducción sexual en esta especie (Muller et al. 2008; Ene &
76 Bennett 2014).

77 Dado que la reproducción sexual es ventajosa para la evolución de numerosas
78 especies, en este trabajo decidimos realizar experimentos para entender mejor la
79 función y estudiar la regulación de la expresión de los genes codificados en los loci
80 *MTL* de *C. glabrata*. Para ello realizamos ensayos de complementación heteróloga
81 y observamos que dichas proteínas no conservan la función de apareamiento en
82 *S. cerevisiae*. Además, construimos fusiones transcripcionales de los promotores
83 de estos genes con la proteína amarilla fluorescente (YFP) y determinamos la
84 actividad de cada promotor en *S. cerevisiae* y en *C. glabrata*. Encontramos que la
85 actividad de estos promotores fue más alta en *S. cerevisiae* que en *C. glabrata*, lo
86 que nos hace pensar que la regulación de la expresión es diferente en ambos
87 organismos.

88

89 **Material y métodos**

90 ***Cepas, plásmidos y oligonucleótidos***

91 Las cepas utilizadas en este trabajo están descritas en las Tablas S1 y S2, los
92 plásmidos usados en este trabajo están descritos en la Tabla S3, los
93 oligonucleótidos usados en este trabajo están descritos en la Tabla S4 (Material
94 Suplementario).

95 ***Medios de cultivo***

96 El medio de cultivo utilizado para bacterias fue Luria-Bertani (LB) el cual contiene
97 extracto de levadura 5g/L y triptona 10g/L, NaCl 10g/L, para medio sólido añadir
98 agar 15g/L. Cuando fue necesario se suplementó con carbenicilina 100µg/ml. Para
99 recuperar las bacterias recién transformadas con ADN se utilizó el medio de
100 cultivo SOC, el cual contiene extracto de levadura 5g/L, triptona 20g/L, NaCl
101 10mM, KCl 2.5mM, MgSO₄ 10mM y MgCl₂ 10mM, después de esterilizarlo se
102 suplementó con glucosa 0.2%.

103 Los medios de cultivo para levadura utilizados en este trabajo fueron: medio YPD
104 que contiene extracto de levadura 10 g/L, peptona 20 g/L y suplementado con
105 glucosa 2%, para medio solido se añadió agar 2% y se suplementaron con
106 nourseotricina (Werner agentes biológicos) 100 mg/L (Nat100). El medio completo
107 sintético (SC) se compone de YNB sin sulfato de amonio, (NH₄)₂SO₄ 5g/L,
108 suplementado con casaminoácidos 0.6% y glucosa 2%. El medio SPORE contiene
109 acetato de potasio 10 g/L y extracto de levadura 1.3g/L. De ser necesario se le
110 añadió uracilo 25 mg/L, ácido 5-fluoroorótico (5-FOA, Toronto Research

111 Chemicals) 1.1g/L para cajas de 5-FOA. El medio SD está constituido por base de
112 nitrógeno de levadura sin sulfato de amonio, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 5g/L, y se suplementó con
113 glucosa 2% y, cuando fue necesario, con uracilo 25 mg/ L y/o leucina (30 o 120
114 mg/L, Sigma Aldrich).

115 ***Transformaciones***

116 Todos los plásmidos construidos se introdujeron en *Escherichia coli* DH10 por
117 electroporación (Ausubel, 2000). Las transformaciones de levadura con ADN de
118 plásmido lineal o superenrollado se realizaron con el método de acetato de litio
119 como se describe a continuación: las cepas a transformar con ADN se crecieron
120 durante una noche en medio YPD. Con estos cultivos se inoculó 50mL de medio
121 fresco (YPD) hasta llegar a una $\text{OD}_{600\text{nm}}$ de 1. Se centrifugaron y se lavaron con
122 agua grado mQ y acetato de litio 0.1M para obtener un botón de células
123 competentes para transformación resuspendidas en 300 μL de acetato de litio
124 0.1M. Además, se preparó la mezcla de transformación la cual consta de: 240 μL
125 de polietilenglicol 50%, 36 μL de acetato de litio 1M, 25 μL de esperma de salmón
126 de cadena sencilla 2mg/mL desnaturalizado con calor y el ADN a transformar
127 (alrededor de 500 μg). Se mezclaron 50 μL de las células competentes y con la
128 suspensión de ADN y se incubó a 30°C durante 45 min. Al término de la
129 incubación se añadió 43 μL de DMSO y se incubó nuevamente a 42°C, 15 min. La
130 suspensión de transformación se centrifugó y el botón de células transformadas
131 con el ADN se resuspendió en 600 μL de agua mQ (para seleccionar Ura+) o en
132 1mL de YPD (recuperación por 4 h a 30°C para seleccionar resistencia a
133 antimicóticos). Para seleccionar las transformantes, se sembraron en medio sólido

134 SC (transformantes Ura+) o en medio solido YPD Nat100. Incubar a 30°C durante
135 2 días. Las transformantes obtenidas se estrían en medio sólido de selección
136 correspondiente para ser purificadas. Para diagnosticar que la transformación del
137 ADN fue exitosa, se lleva a cabo una PCR de colonia o a partir de ADN extraído
138 de cultivos de las transformantes. Se seleccionan dos clonas diferentes para cada
139 transformación y se guardaron a -80°C en glicerol al 10%.

140 ***Extracción de ADN plasmídico***

141 Los plásmidos de cultivos bacterianos se extrajeron y purificaron con el kit de
142 Qiagen Mini Prep o con el kit Wizard ADN purification®. Para extraer ADN de
143 geles de agarosa, se usó el kit Gel Extraction QIAquick®. Para purificar productos
144 de PCR, se usó el kit PCR Purification QIAquick®.

145 ***Extracción de DNA genómico de C. glabrata y S. cerevisiae.***

146 Para obtener el DNA genómico de levadura, crecimos la cepa de interés en medio
147 YPD líquido por 12 horas a 30°C, centrifugamos el cultivo, lo resuspendimos en
148 500µL de buffer A con detergente (Tris 50mM, EDTA 10mM, NaCl 150mM, Tritón
149 1% y SDS 1%) y añadimos otro volumen igual de fenol:cloroformo:isoamílico,
150 agitamos vigorosamente e incubamos a 44°C por 15 minutos. Volvimos a
151 centrifugar para separar la fase acuosa a la cual le agregamos 500µL de buffer A
152 sin detergente (Tris 50mM, EDTA 10mM y NaCl 150mM) e incubamos por 15 min
153 a 44°C. Agregamos 15µL de cloruro de sodio 5M y 2 volúmenes de etanol al
154 100%. Centrifugamos y lavamos el pellet con etanol al 70% para finalmente

155 resuspender el DNA genómico en 250µL de TER (Tris 10mM, EDTA 50mM y
156 RNasa).

157 ***Expresión de YFP por análisis de FACS***

158 Cultivos saturados de las cepas en medio SC o YPD-Nat crecieron hasta fase
159 estacionaria (FE) y se diluyeron en medio fresco a una OD_{600nm} de 0.5 (inicio de la
160 fase logarítmica o FL). YFP se utilizó como gen reportero para medir la actividad
161 de los promotores de los genes relacionados con el apareamiento *Cgalfa1*,
162 *Cgalfa2* y *Cga1* de *Candida glabrata*. Se tomaron muestras de 300µL de las
163 células de levadura, la fluorescencia se evaluó por citometría de flujo (FACS)
164 utilizando un citometro de flujo Beckman Coulter. Se realizaron mediciones a las 0,
165 2, 4, 6, 12, 24 y 48 h de incubación. La fluorescencia indicada es el valor de la
166 salida directa del canal FL2 (detección de fluorescencia verde) sin compensación.
167 Se analizaron un total de 10,000 células por cada muestra y se tomó el valor de la
168 media geométrica del pico correspondiente. El análisis de todos los experimentos
169 se realizó con el programa ©FlowJo.

170 **Resultados**

171 ***Los promotores de los genes Cgalfa1, Cgalfa2 y Cga1 de Candida***
172 ***glabrata son activos en Saccharomyces cerevisiae***

173

174 Realizamos ensayos de actividad de los promotores de los genes *Cgalfa1*, *Cgalfa2*
175 y *Cga1* de *C. glabrata* en *S. cerevisiae*. Para ello construimos vectores replicativos
176 en *S. cerevisiae* que contienen cada promotor fusionado transcripcionalmente a la
177 proteína amarilla fluorescente (YFP) y los transformamos en *S. cerevisiae*. Estos
178 plásmidos son: pYC203 que contiene el promotor del gen *Cga1* (P_{Cga1}), pYC205 el
179 del gen *Cgalfa1* ($P_{Cgalfa1}$), pYC207 el del gen *Cgalfa2* ($P_{Cgalfa2}$) y el vector vacío
180 pRS416. Utilizamos 3 cepas distintas de *S. cerevisiae* para transformar cada uno
181 de estos plásmidos: la cepa *MATa*, la *MATalfa* y la *matΔ* (Fig. 1A). Cada una de
182 estas cepas transformantes se cultivaron en medio rico YPD y se incubaron hasta
183 fase estacionaria tardía (72 h) a 30°C. A partir de estos cultivos se inició una
184 cinética de expresión en distintos medios: CAA y medio limitante de nutrientes que
185 se utiliza para inducir la esporulación en *S. cerevisiae* (ver Material y Métodos).

186 Como se muestra en la Fig. 1B, los tres promotores de los genes relacionados con
187 el apareamiento de *C. glabrata* son activos en *S. cerevisiae*, pues presentan
188 actividad en los dos medios de cultivo y en los tres fondos genéticos probados, se
189 observó mayor actividad en el medio SPORE sin importar el tipo de información
190 genética presente en el locus *MAT*.

191 La actividad máxima del promotor del gen *Cgalfa1* en el medio SPORE que
192 observamos fue de ~200 unidades de fluorescencia relativas (UFR) a las 24 h (Fig.
193 1B). En la Fig. 1C se puede observar que no todas las células de esta población
194 de *S cerevisiae* tienen activo dicho promotor, aunque la mayoría sí lo expresan
195 (67%), y presentó esta actividad.

196 El promotor del gen *Cgalfa2* en el medio SPORE a las 24 h presentó ~100 U, en
197 aproximadamente la mitad de las células de este cultivo (46%), el resto de las
198 células no presentó fluorescencia (Fig. 1C).

199 El promotor del gen *Cga1* tiene mayor actividad también en medio SPORE a las
200 24 h con ~60U (Fig. 1B); pero en este caso, sólo un 18% de la población presentó
201 esta actividad y el resto de las células no presentaron fluorescencia (Fig. 1C).

202 Realizamos un ensayo de pérdida de plásmido para determinar el porcentaje de la
203 población que perdió el plásmido a lo largo del experimento. Al inicio del
204 experimento después de 72 h de incubación en CAA, el 60% de la población
205 perdió el plásmido a pesar de haber crecido en medio selectivo para la presencia
206 del plásmido; esto puede deberse a la cantidad y la estabilidad de la proteína
207 Ura3, donde al estar repletas las pozas de esta proteína el plásmido puede
208 perderse (Brachmann et al. 2006). Al hacer una dilución en medio fresco se
209 seleccionan las células que aún conservan el plásmido para crecer en medio
210 SPORE, que carece de uracilo. Con base en los datos del ensayo de pérdida de
211 plásmido, se puede calcular que el 92% de la población presentó actividad del
212 promotor de *Cgalfa1*, el 63% de la población exhibió actividad del promotor del
213 gen *Cgalfa2* y 27% de la población mostró actividad del promotor del gen *Cga1*.

214 Por lo tanto, los promotores de los genes *Cgalfa1*, *Cgalfa2* y *Cga1* de *C. glabrata*
215 son reconocidos en *S. cerevisiae*. El promotor del gen *Cgalfa1* es el más fuerte
216 (presenta la mayor actividad de los tres promotores) y además es el que se
217 expresa en un mayor porcentaje de la población (~92% si se corrige por la pérdida
218 de plásmido).

219

220 ***Los loci MTL de C. glabrata no complementan la función de***
221 ***apareamiento en S. cerevisiae***

222

223 Las proteínas relacionadas con el apareamiento de *C. glabrata* tienen en promedio
224 un 55% de similitud con las proteínas ortólogas de *S. cerevisiae*; sin embargo, en
225 *C. glabrata* no se mantiene identidad celular sexual ni se ha descrito un ciclo
226 sexual (Angoulvant et al. 2016; Ramírez-Zavaleta et al. 2010). Por esta razón es
227 interesante determinar si las proteínas de *C. glabrata* pueden complementar la
228 función de apareamiento en *S. cerevisiae* mediante ensayos de complementación
229 heteróloga, con base en que determinamos que los promotores de *C. glabrata* son
230 activos en *S. cerevisiae*.

231 Para la complementación heteróloga realizamos cruzas con cepas control de tipo
232 de apareamiento definido (tester *MATa* y tester *MATalfa*) las cuales tienen una
233 auxotrofia distinta a las auxotrofías de nuestra cepa silvestre de *S. cerevisiae*. De
234 manera que solamente si existe apareamiento, se complementan las auxotrofías
235 de ambas cepas parentales de la crusa y podrán crecer en medio mínimo.

236 Se usaron tres cepas de *S. cerevisiae* con diferente información de apareamiento:
237 **a** (*MATa*), alfa (*MATalfa*) o sin información de apareamiento (*matΔ*), a las cuales
238 se les transformó con dos vectores replicativos que contienen los loci de *C.*
239 *glabrata* completos: *CgMTL1a* (pYC174) y *CgMTL1alfa* (pYC172) así como el
240 vector vacío (pRS416). Una vez obtenidas las cepas transformantes se procedió a
241 realizar las mezclas para favorecer el apareamiento. Se mezclaron cada una de
242 las cepas con los plásmidos con cada cepa tester de *S. cerevisiae* (*MATa* y
243 *MATalfa*), las mezclas se emplearon para realizar diluciones logarítmicas y se
244 sembraron igual número de células en placas de Petri con medio mínimo YNB
245 (para selección de cepas diploides protótrofas) y YPD (como control de
246 crecimiento). Se registró fotográficamente a las 48 h de la incubación a 30°C.

247 Las tres cepas de *S. cerevisiae* complementadas con los plásmidos con los genes
248 de *C. glabrata* se pudieron aparear con la cepa tester con información
249 complementaria, independientemente del tipo de información de apareamiento de
250 *C. glabrata* que contienen los plásmidos. Incluso la cepa *matΔ* con información **a** o
251 alfa de *C. glabrata* se apareó con el tester alfa, ya que la cepa *matΔ* se comporta
252 como una cepa *MATa* (Fig. 2)

253 Para descartar que la expresión de los genes codificados en el locus *CgMTL1* de
254 *C. glabrata* no se regule correctamente en *S. cerevisiae* y esa fuera la razón de la
255 falta de complementación heteróloga, realizamos el mismo experimento de
256 complementación heteróloga, pero en lugar de utilizar todo el locus *MTL* de *C.*
257 *glabrata*, utilizamos vectores en los que clonamos solamente los genes
258 estructurales de las proteínas *Cgalfa1*, *Cgalfa2* y *Cgalfa3* (para la información alfa)

259 y *Cga1* (para la información **a**) de *C. glabrata*, bajo la propia regulación
260 transcripcional de *S. cerevisiae*, es decir los propios promotores y la región y 3'
261 UTR de *S. cerevisiae* de cada gen) (Fig. 3). Los vectores se transformaron en la
262 cepa *matΔ* y se realizaron los ensayos de apareamiento. Encontramos que, sin
263 importar la información presente en los vectores transformados, la cepa *matΔ* se
264 apareó con el tester alfa como se esperaba, ya que la cepa *matΔ* se comporta
265 como *MATa*. Usamos como control positivo la cepa *MATalfa* con el vector
266 replicativo pRS416 (Fig. 3).

267 Para asegurarnos que las cepas diploides resultantes del apareamiento tuvieran el
268 plásmido transformado realizamos PCR de colonia amplificando los genes
269 estructurales de *C. glabrata*, en donde obtuvimos los amplicones correspondientes
270 (datos no mostrados), corroborando la presencia del plásmido. Por lo tanto, la
271 información genética de los loci *CgMTL* de *C. glabrata* no complementa para el
272 apareamiento en *S. cerevisiae*.

273

274 ***Actividad de los promotores de los genes Cgalfa1, Cgalfa2 y Cga1 en***

275 ***Candida glabrata***

276

277 Para determinar cuál es la regulación transcripcional de los genes relacionados
278 con el apareamiento de *C. glabrata* en su propio contexto genético, transformamos
279 por separado los vectores replicativos en *C. glabrata* que contienen cada uno de
280 los promotores de los genes *Cga1*, *Cgalfa1* y *Cgalfa2* fusionados con YFP, así

281 como su propia región 3'UTR (pKN1, pKN3 y pKN20). En este caso, también
282 utilizamos las cepas de *C. glabrata* con información **a** o alfa en el locus *CgMTL1* y
283 la cepa que no tiene ninguna información de apareamiento (*mtl1,2,3*) Δ (Fig. 4A).
284 Cada una de estas cepas transformantes se cultivaron en medio rico YPD a partir
285 del resguardo congelado y de ahí se cultivaron en medio YPD (medio completo
286 con NAT 50 μ g/mL, para seleccionar la presencia del plásmido), y se incubaron
287 hasta fase estacionaria (48 h) a 30°C. A partir de estos cultivos se inició una
288 cinética de expresión en distintos medios: CAA-NAT 50 μ g/mL y medio SPORE-
289 NAT 25 μ g/mL (fuentes limitantes de carbono y de nitrógeno).

290 El promotor del gen *Cgalfa1* se expresó en los tres fondos genéticos,
291 aparentemente sin presentar ninguna diferencia en los fondos genéticos probados;
292 pero la actividad del promotor es ligeramente más alta en medio CAA que en
293 medio SPORE ($\sim 45 \pm 2.91$ URF y $\sim 30 \pm 2.62$ UFR respectivamente, Fig. 4), y el
294 porcentaje de la población que mostró actividad de este promotor es el $\sim 24\%$.

295 El promotor del gen *Cgalfa2* también presento actividad indistinta en los tres
296 fondos y la actividad del promotor es muy similar en ambos medios probados
297 ($\sim 60 \pm 6.48$ URF en medio CAA y $\sim 50 \pm 2.23$ URF en medio SPORE) y el porcentaje
298 de la población que tuvo activo este promotor es el $\sim 36\%$.

299 El promotor del gen *Cga1* se encontró activo en el tiempo cero (Fase estacionaria:
300 48 h de cultivo) en los tres fondos genéticos en ambos medios (CAA 25 ± 4.35 y
301 SPORE 25 ± 2.72). En el medio SPORE decae su actividad a las 2 h y no se
302 recupera en ninguno de los tres fondos genéticos; a las 12 h presentó un pico de
303 actividad en el fondo genético con información alfa en el locus *MTL1* (26 ± 2.2). En

304 el medio CAA la actividad decayó inmediatamente después de la dilución en
305 medio fresco y no se recuperó hasta las 48 h, cuando las células alcanzaron la
306 fase estacionaria de crecimiento. El porcentaje de la población que expresó el
307 promotor a las 48 h en medio CAA es el ~12% (Figs. 4B y 4C).

308 Por lo tanto, la actividad de los promotores de los genes de los loci *MTL* en *C.*
309 *glabrata* es independiente del tipo de información **a** o alfa presente en el locus
310 *MTL1* en ambos medios de cultivo. Además, un mayor porcentaje de la población
311 tiene activo el promotor del gen *Cgalfa2* que las que tienen el promotor del gen
312 *Cgalfa1* cuando se expresan en *C. glabrata* (36% vs 24% en medio CAA) (Fig. 4B
313 y 4C).

314 Los niveles de expresión de los promotores de los genes *Cgalfa1*, *Cgalfa2* y *Cga1*
315 en *C. glabrata* son menores a los que se observaron en *S. cerevisiae* (~200 URF
316 en *S. cerevisiae* vs ~60 URF en *C. glabrata*), así como el porcentaje de la
317 población que expresa estos promotores es mayor en *S. cerevisiae* (Fig. 4B y 4C).

318 **Discusión**

319 *C. glabrata* guarda una relación filogenética cercana con *S. cerevisiae*, y conserva
320 los genes relacionados con el apareamiento que son ortólogos en *S. cerevisiae*. A
321 pesar de esto, en *C. glabrata* no se ha descrito apareamiento, pero sí bajos
322 niveles de recombinación genética (Dodgson et al. 2005; Gabaldón et al. 2013;
323 Roy & Thompson 2015).

324 ***Los promotores de los genes codificados en los loci MTL de C.***
325 ***glabrata no están conservados con los de S. cerevisiae, pero tienen cajas***
326 ***TATA consenso.***

327 Es interesante el hecho de que los promotores de *C. glabrata* sean reconocidos
328 por la maquinaria de transcripción de *S. cerevisiae*, esto podría explicarse por la
329 cercanía filogenética que presentan dichos organismos (Gabaldón et al. 2013).
330 Hicimos un alineamiento de los promotores de estos genes de ambos organismos
331 y no existe una alta similitud entre las regiones promotoras de *C. glabrata* con *S.*
332 *cerevisiae* (Fig. S2) y si hacemos la comparación de esa región promotora de *C.*
333 *glabrata* contra todo el genoma de *S. cerevisiae* no existe ninguna región parecida
334 en su genoma.

335 Aoyama y colaboradores en 2014 describieron que aproximadamente el 91% de
336 los genes de *C. glabrata* necesitan de 200 pb río arriba del sitio de inicio de la
337 traducción, que es donde se encuentra el sitio de inicio de la transcripción, que es
338 similar a lo que ocurre en *S. cerevisiae*, a su vez describieron que varios genes

339 pueden tener más de un sitio de inicio de la transcripción que también es
340 consistente en *S. cerevisiae* (Aoyama et al. 2014).

341 El promotor de los genes *Cgalfa1* y *Cgalfa2* (307 pb) de *C. glabrata* tienen cajas
342 TATA consenso (TATAWAWR) (Basehoar et al. 2004), *Cgalfa1* tiene al menos 3
343 cajas TATA-consenso y dos cajas TATA-parecidas; *Cgalfa2* tiene al menos 3 cajas
344 TATA-consenso (Fig. S3), esta podría ser una de las razones por la cual estos
345 promotores son reconocidos en *S. cerevisiae*, y que el promotor del gen *Cgalfa1*
346 es el que tiene mayor actividad, seguido del promotor del gen de *Cgalfa2*. El
347 promotor del gen *Cga1* (261pb) no posee ninguna caja TATA consenso, pero a
348 -564 pb presenta una caja TATA-parecida con secuencia consenso “TATAWAD”
349 (descrita para el promotor del gen *CYC1* de *S. cerevisiae*), la caja tiene la
350 secuencia “TATATAG” que se describió como una secuencia TATA funcional
351 (Watanabe et al. 2015). Sin embargo, esta secuencia no está presente en
352 nuestras construcciones ya que sólo se clonaron 261pb en estos plásmidos y a
353 esto podría deberse el hecho su baja actividad y del bajo porcentaje de la
354 población que presenta actividad de este promotor. Se ha descrito que la
355 regulación de los genes depende de la presencia o ausencia de la caja TATA en la
356 región promotora (Basehoar et al. 2004), y esto podría explicar la expresión
357 diferencial que tienen estos genes en *S. cerevisiae* (Fig. S3).

358 ***Los promotores de los genes MTL de C. glabrata son reconocidos en***
359 ***S. cerevisiae y presentan posibles cajas de reconocimiento para diversos***
360 ***factores de transcripción.***

361 En *S. cerevisiae* la actividad mayor de los tres promotores se observa en el medio
362 SPORE (Fig. S4) que se utiliza para inducir la meiosis y esporulación, por su baja
363 concentración de nitrógeno y una fuente no óptima de carbono, lo cual puede
364 indicar que estos tres promotores responden a limitación de nutrientes (tanto de
365 carbono como de nitrógeno) (Gimeno et al. 1992). Esto correlaciona con el hecho
366 de que en la región promotora de los genes *Cgalfa1* y *Cgalfa2* se encuentran
367 posibles cajas de unión a factores transcripcionales similares a los reconocidos en
368 *S. cerevisiae*.

369 Realizamos un análisis en el servidor de la página Yeabstract para encontrar
370 posibles cajas de unión a factores transcripcionales, éste análisis se realiza con
371 las secuencias consenso descritas en *S. cerevisiae*, en la región promotora de los
372 genes *Cgalfa1* y *Cgalfa2*. Encontramos 11 posibles cajas de unión a ocho factores
373 transcripcionales reconocidos y caracterizados en *S. cerevisiae* que pueden
374 controlar la transcripción de estos genes cuando los expresamos en *S. cerevisiae*
375 (Fig. S5); Azf1 (1), Fkh1(2), Fkh2 (2), Mcm1 (3), Mot3 (2), Rtg1 (1), Rtg3 (1) y
376 Tec1 (2).

377 En la región promotora del gen *Cga1* se encontraron 13 posibles cajas de unión a
378 factores transcripcionales, reconocidos y caracterizados en *S. cerevisiae* (Fig. S6),
379 para ocho proteínas: Ash1 (3), Fkh1 (1), Fkh2 (1), Mot3 (3), Rgt1 (1), Stb5 (3),
380 Xbp1 (1), Haa1 (1).

381 El promotor que exhibe mayor actividad en *S. cerevisiae* es el de *Cgalfa1*,
382 recordemos que este promotor es divergente, la cadena en sentido 5'-3' posee las
383 cajas de reconocimiento para la transcripción del gen *Cgalfa1*, y en esta cadena

384 encontramos las posibles cajas de unión para los factores transcripcionales Fkh1,
385 Fkh2 y Mot3; la proteína Fkh1 se une al enhancer de *HML* en la región del
386 promotor de recombinación y regula la preferencia de los donantes durante el
387 cambio de tipo de apareamiento. Fkh2 regula negativamente el silenciamiento de
388 la cromatina en los loci *HML* y *HMR* y la proteína Mot3 en general es un represor
389 de varios promotores (*Saccharomyces* genome database). El promotor del gen
390 *Cgalfa1* es el que se expresa por el mayor porcentaje de la población, que es el
391 67%, pero si consideramos que el porcentaje de la población que pierde el
392 plásmido que es del 27%, aproximadamente el 92% de la población tiene actividad
393 de éste promotor.

394 En el análisis de la región promotora del gen *Cgalfa2* encontramos 11 posibles
395 cajas de unión a ocho factores transcripcionales reconocidos y caracterizados en
396 *S. cerevisiae* (Fig. S5); Azf1 (1), Fkh1(2), Fkh2 (2), Mcm1 (3), Mot3 (2), Rtg1 (1),
397 Rtg3 (1) y Tec1 (2). Azf1 activa la transcripción de genes involucrados en el
398 crecimiento y el metabolismo de carbono. Mcm1 está involucrado en
399 desencadenar la señal en respuesta a la feromona y determinar la identidad
400 celular. Rtg1 y Rtg3 son blanco de Hog1 y son activados en pulsos estocásticos
401 de localización nuclear. Tec1 participa en la activación de Ste12 (*Saccharomyces*
402 genome database). El promotor del gen *Cgalfa2* es el segundo con mayor
403 expresión, con un 46% de la población que presenta actividad de este promotor.
404 Considerando el porcentaje de la población que pierde el plásmido (que es el
405 27%), calculamos que aproximadamente el 63% de la población tiene actividad de
406 éste promotor. Prácticamente todos los factores transcripcionales que podrían

407 participar en la regulación de la expresión de estos genes están relacionados con
408 condiciones de apareamiento o controlando genes relacionados con el
409 apareamiento.

410 Los posibles sitios de unión de factores transcripcionales encontrados en la región
411 promotora del gen *Cga1* (Fig. S6) están involucrados en: Ash1 (3) reprime la
412 expresión de la endonucleasa HO, Fkh1 (1), Fkh2 (1), Mot3 (3), Rgt1 (1); Stb5 (3)
413 regula la resistencia a multidrogas y la respuesta a estrés oxidante, Xbp1 (1) es un
414 represor transcripcional y Haa1 (1) es un activador transcripcional
415 (*Saccharomyces* genome database).

416 Entre los promotores de los genes *Cgalfa1* y *Cgalfa2*, y *Cga1* comparten posibles
417 regiones de unión para varios factores de transcripción, se quiere de un estudio
418 más profundo de estas secuencias para saber si esas secuencias consenso son
419 funcionales.

420 Además, la actividad de los promotores de *C. glabrata* en *S. cerevisiae* es
421 independiente de la información del locus *MAT*.

422 ***Los promotores de los genes MTL de C. glabrata tienen menor***
423 ***actividad en C. glabrata que en S. cerevisiae***

424 La actividad de los promotores de los genes *Cgalfa1*, *Cgalfa2* y *Cga1* de *C.*
425 *glabrata* en su propio contexto genético es menor a la observada en *S. cerevisiae*,
426 eso puede deberse a que *C. glabrata* posee una regulación más estricta o que los
427 genes se expresan bajo diferentes condiciones a las probadas, ya que aún no se
428 conoce su papel en *C. glabrata*. En este trabajo logramos ver la actividad del

429 promotor del gen *Cga1* tanto en *S. cerevisiae* como en *C. glabrata*, esto fue
430 posible por la delimitación de la región promotora a -261pb del sitio de inicio de la
431 traducción, en experimentos previos usando como región promotora la región
432 intergénica completa de 715 pb no fue posible detectar actividad de este promotor
433 en *C. glabrata*, tal vez por la presencia de elementos en *cis* que actúan como
434 reguladores negativos. La actividad de este promotor de 261pb sólo se observa a
435 las 48hrs de incubación en fase estacionaria en medio CAA. En medio SPORE no
436 se recupera la actividad, ya que las células no llegan a fase estacionaria, por la
437 limitación de nutrientes del medio. Además, como no se encontró una caja TATA
438 conservada cerca de este promotor, esto podría explicar la baja actividad de este
439 promotor tanto en *S. cerevisiae* como en *C. glabrata*.

440 El promotor del gen *Cgalfa1* presenta mayor actividad en el medio CAA en
441 comparación con SPORE, en comparación *Cgalfa2* donde prácticamente
442 presentan la misma actividad en los dos medios.

443 En *C. glabrata*, el promotor del gen *Cgalfa2* tiene mayor actividad que el promotor
444 del gen *Cgalfa1*.

445 La baja actividad de los promotores de *C. glabrata* en su propio contexto no es tan
446 sorprendente ya que en un reciente estudio por Sorrells et al., encontraron en *C.*
447 *glabrata* en los genes relacionados con el apareamiento menos secuencias
448 regulatorias para factores transcripcionales como Ste12 en comparación con *S.*
449 *cerevisiae* (Sorrells et al. 2015).

450 Además, la actividad de los promotores de *C. glabrata* en *C. glabrata* es
451 independiente de la información **a** o alfa presente en *CgMTL1* o en ausencia de
452 información en los tres loci. Además, el porcentaje de la población y el nivel de
453 expresión de los promotores de los genes *Cgalfa1* y *Cgalfa2* en *C. glabrata* es
454 menor que la observada en *S. cerevisiae*.

455 ***Los genes MTL de C. glabrata no complementan la función de***
456 ***apareamiento en mutantes estériles de S. cerevisiae***

457 A pesar del ±55% de similitud que comparten las proteínas alfa1, alfa2 y **a1** de
458 ambos organismos (*C. glabrata* y *S. cerevisiae*), las proteínas de *C. glabrata*
459 aparentemente perdieron la función relacionada al apareamiento que tienen en *S.*
460 *cerevisiae*, pues con los vectores replicativos de expresión heteróloga no
461 observamos complementación de la función en la cepa *matΔ* de *S. cerevisiae*. La
462 cepa *matΔ* se comporta como una cepa con información **a**, ya que las proteínas
463 que activan los genes específicos de células **a** se encuentran presentes. Los
464 vectores de expresión heteróloga tienen los ORF de los genes *Cgalfa1*, *Cgalfa2*,
465 *Cgalfa3* y *Cga1* de *C. glabrata* bajo el control de las secuencias promotoras y
466 3'UTR de *S. cerevisiae* para cada gen (*Scalfa1*, *Scalfa2* y *Sca1*). Con estos
467 vectores transformados en la cepa *matΔ* y estas cepas nos permitieron probar la
468 función de las proteínas y su papel en el apareamiento, ya que, si la función de las
469 proteínas de *C. glabrata* complementaran para el apareamiento de acuerdo a la
470 información del vector transformado, dicha cepa se comportaría como **a** o como
471 alfa. Esto no ocurrió por lo que *Sc matΔ* se pudo aparear con la cepa tester alfa
472 independientemente de la información de apareamiento presente de *C. glabrata*,

473 incluso con los genes de *C. glabrata* bajo las propias secuencias de regulación de
474 *S. cerevisiae*. Es posible que las proteínas relacionadas con el apareamiento de *C.*
475 *glabrata* tengan otra función, aún no se ha descartado la posibilidad de que sean
476 factores transcripcionales o que formen heterodímeros.

477 Por otro lado, La información genética codificada en los loci *MTL* de *C. glabrata*
478 (genes *Cga1*, *Cgalfa1*, *Cgalfa2* y *Cgalfa3*), no complementa la función de
479 apareamiento en *Saccharomyces cerevisiae*.

480 De acuerdo con los datos obtenidos en el presente trabajo podemos concluir que
481 los genes *Cgalfa1*, *Cgalfa2*, *Cgalfa3* y *Cga1* de *C. glabrata* no conservan la
482 función de apareamiento de sus ortólogos en *S. cerevisiae*, ni tampoco la
483 regulación de la expresión de estos genes se conserva en ambos organismos. Se
484 requieren de más experimentos para determinar la función de éstas proteínas
485 codificadas en estos genes para determinar si son factores de transcripción, y de
486 ser así, encontrar qué genes regulan. También es importante determinar si los
487 sitios putativos de unión de factores de transcripción encontrados son funcionales,
488 lo que nos permitiría conocer las proteínas responsables de la regulación de los
489 genes *Cgalfa1*, *Cgalfa2*, *Cgalfa3* y *Cga1*.

490

491 **Referencias**

- 492 Angoulvant, A., Guitard, J. & Hennequin, C., 2016. Old and new pathogenic
493 Nakaseomyces species: Epidemiology, biology, identification, pathogenicity
494 and antifungal resistance. *FEMS Yeast Research*, 16(2).
- 495 Aoyama, T. et al., 2014. Genome-wide survey of transcriptional initiation in the
496 pathogenic fungus , *Candida glabrata*. , 1, pp.478–503.
- 497 Basehoar, A.D., Zanton, S.J. & Pugh, B.F., 2004. Identification and distinct
498 regulation of yeast TATA box-containing genes. *Cell*, 116(5), pp.699–709.
- 499 Brachmann, A., Toombs, J.A. & Ross, E.D., 2006. Reporter assay systems for
500 [URE3] detection and analysis. *Methods*, 39(1), pp.35–42.
- 501 Brockert, P.J. et al., 2003. Phenotypic Switching and Mating Type Switching of
502 *Candida glabrata* at Sites of Colonization. *Infection and Immunity*, 71(12),
503 pp.7109–7118.
- 504 Dodgson, A.R. et al., 2005. Evidence for recombination in *Candida glabrata*.
505 *Fungal Genetics and Biology*, 42(3), pp.233–243.
- 506 Ene, I. V & Bennett, R.J., 2014. The cryptic sexual strategies of human fungal
507 pathogens. *Nature reviews. Microbiology*, 12(4), pp.239–51. Available at:
508 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24625892>.
- 509 Gabaldón, T. et al., 2013. Comparative genomics of emerging pathogens in the
510 *Candida glabrata* clade. *BMC Genomics*, 14, p.623. Available at:
511 <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3847288&tool=pmc>

512 entrez&rendertype=abstract.

513 Galgoczy, D.J. et al., 2004. Genomic dissection of the cell-type-specification circuit
514 in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proceedings of the National Academy of*
515 *Sciences of the United States of America*, 101(52), pp.18069–18074.
516 Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijid.2010.04.006>.

517 Gimeno, C.J. et al., 1992. Unipolar cell divisions in the yeast *S. cerevisiae* lead to
518 filamentous growth: Regulation by starvation and RAS. *Cell*, 68(6), pp.1077–
519 1090.

520 Haber, J.E., 1998. Mating-type gene switching in *Saccharomyces cerevisiae*.
521 *Annu. Rev. Genet.*, pp.561–99. Available at:
522 [http://biology.hunter.cuny.edu/molecularbio/Class_Materials_Spring_2011](http://biology.hunter.cuny.edu/molecularbio/Class_Materials_Spring_2011/Biol302/Lecture_2/Biol602_students_to_Read/Yeast_Mating_Switch_Review.pdf)
523 *Biol302/Lecture_2/Biol602_students_to_Read/Yeast_Mating_Switch_Review.pdf*
524 [Accessed September 10, 2015].

525 Hagen, D.C. et al., 1993. Transcription of alfa-Specific Genes in *Saccharomyces*
526 *cerevisiae* : DNA sequence requirements for activity of the coregulator alpha1.
527 *Society*, 13(11), pp.6866–6875.

528 Johnson, P.R. et al., 1998. Degradation signal masking by heterodimerization of
529 MATalpha2 and MATa1 blocks their mutual destruction by the ubiquitin-
530 proteasome pathway. *Cell*, 94(2), pp.217–227.

531 Kahana-Edwin, S., Stark, M. & Kassir, Y., 2013. Multiple MAPK cascades regulate
532 the transcription of IME1, the master transcriptional activator of meiosis in
533 *Saccharomyces cerevisiae*. *PLoS ONE*, 8(11), pp.1–12.

534 Lee, S.C. et al., 2010. The evolution of sex: a perspective from the fungal kingdom.
535 *Microbiology and Molecular Biology Reviews : MMBR*, 74(2), pp.298–340.

536 Mazurie, A., Bottani, S. & Vergassola, M., 2005. An evolutionary and functional
537 assessment of regulatory network motifs. *Genome Biology*, 6(4), p.R35.

538 McDonald, M.J., Rice, D.P. & Desai, M.M., 2016. Sex speeds adaptation by
539 altering the dynamics of molecular evolution. *Nature*, 531(7593), pp.233–6.
540 Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26909573>.

541 Muller, H. et al., 2008. The asexual yeast *Candida glabrata* maintains distinct a and
542 α haploid mating types. *Eukaryotic Cell*, 7(5), pp.848–858.

543 Phi, E.L., 1995. Matalpha1 can mediate gene activation by a-mating factor. *Genes
544 and Development*, 105, pp.95–104.

545 Ramírez-Zavaleta, C.Y. et al., 2010. Subtelomeric silencing of the MTL3 locus of
546 *Candida glabrata* requires yKu70, yKu80, and Rif1 proteins. *Eukaryotic Cell*,
547 9(10), pp.1602–1611.

548 Roy, S. & Thompson, D., 2015. Evolution of regulatory networks in *Candida
549 glabrata* : learning to live with the human host. , (April), pp.1–17.

550 Soll, D.R., Pujol, C. & Srikantha, T., 2009. Sex: deviant mating in yeast. *Current
551 Biology*, 19(13), pp.R509–R511. Available at:
552 <http://dx.doi.org/10.1016/j.cub.2009.05.026>.

553 Sorrells, T.R. et al., 2015. Intersecting transcription networks constrain gene
554 regulatory evolution. *Nature*, 523(7560), pp.361–365.

- 555 Srikantha, T., Lachke, S.A. & Soll, D.R., 2003. Three mating type-like loci in
556 *Candida glabrata*. *Eukaryotic Cell*, 2(2), pp.328–340.
- 557 Watanabe, K. et al., 2015. A Random Screen Using a Novel Reporter Assay
558 System Reveals a Set of Sequences That Are Preferred as the TATA or
559 TATA-Like Elements in the CYC1 Promoter of *Saccharomyces cerevisiae*.
560 *PLoS one*, 10(6), p.e0129357. Available at:
561 <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4457894&tool=pmc>
562 [entrez&rendertype=abstract](http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4457894&tool=pmc&rendertype=abstract).
- 563 Wu, X., Moore, J.K. & Haber, J.E., 1996. Mechanism of MAT alpha donor
564 preference during mating-type switching of *Saccharomyces cerevisiae*.
565 *Molecular and Cellular Biology*, 16(2), pp.657–668.
- 566 Yáñez-Carrillo, P. et al., 2014. The mating type-like loci of *Candida glabrata*.
567 *Revista Iberoamericana de Micología*, 31(1), pp.30–34. Available at:
568 <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1130140613001137>.
- 569 Zhong, H., McCord, R. & Vershon, A.K., 1999. Identification of target sites of the
570 alpha2-Mcm1 repressor complex in the yeast genome. *Genome Research*,
571 9(11), pp.1040–1047.

572

573 **Pies de figura**

574 **Fig. 1 Fusiones transcripcionales de los promotores de los genes**
575 **Cgalfa1, Cgalfa2 y Cga1 de *C. glabrata* con YFP y transformados en *S.***
576 ***cerevisiae***

577 a) Esquema de los plásmidos contruidos para medir la actividad de los
578 promotores de los genes Cgalfa1, Cgalfa2 y Cga1 de *C. glabrata* en *S.*
579 *cerevisiae*.

580 b) Actividad de los promotores de los genes Cgalfa1, Cgalfa2 y Cga1 de
581 *Candida glabrata* en *Saccharomyces cerevisiae* en medio de cultivo
582 SPORE.

583 **1.** Actividad de los promotores de los genes Cgalfa1, Cgalfa2 de *C. glabrata*
584 en *S. cerevisiae matΔ*. **2.** Actividad del promotor del gen Cga1 de *C.*
585 *glabrata* en *S. cerevisiae matΔ*. Se muestran los valores promedio de tres
586 repeticiones independientes.

587 c) Porcentaje de la población que presenta actividad de los promotores de los
588 genes Cgalfa1, Cgalfa2 y Cga1 de *Candida glabrata* en *Saccharomyces*
589 *cerevisiae*. **1.** El 67% de la población con información alfa presenta
590 actividad del promotor del gen Cgalfa1. **2.** El 46% de la población con
591 información alfa tiene activo el promotor del gen Cgalfa2. **3.** El 18% de la
592 población con información alfa tiene activo el promotor del gen Cga1. Estos
593 datos son representativos de los experimentos realizados en *S. cerevisiae*
594 *matΔ* en medio SPORE. La Tabla muestra el porcentaje de las células que

595 perdieron el plásmido que expresa el promotor del gen *Cgalfa2* a las 48
596 horas de incubación.

597 **Fig. 2 La información genética codificada en los loci *CgMTL1a* y**
598 ***CgMTL1alfa* no complementa el apareamiento en *Saccharomyces cerevisiae***

599 Las tres cepas de *S. cerevisiae* transformadas con los plásmidos indicados se
600 aparearon con las cepas que tienen el tipo celular complementario sin importar el
601 tipo de información de *C. glabrata* que contienen en el plásmido.

602 **Fig. 3 La información de los genes estructurales *Cgalfa1*, *Cgalfa2*,**
603 ***Cgalfa3* y *Cga1* de *C. glabrata* no complementa para la función de**
604 **apareamiento en *Saccharomyces cerevisiae***

605 Las dos cepas de *S. cerevisiae* transformadas con los plásmidos indicados se
606 aparearon con las cepas que presentan el tipo celular complementario sin importar
607 el tipo de información de *C. glabrata* que contienen en el plásmido de expresión
608 heteróloga.

609 **Fig. 4 Fusiones transcripcionales de los promotores de los genes**
610 ***Cgalfa1*, *Cgalfa2* y *Cga1* de *C. glabrata* que fueron transformados en *C.***
611 ***glabrata***

612 a) Esquema de los plásmidos contruidos para medir la actividad de los
613 promotores de *Cgalfa1*, *Cgalfa2* y *Cga1* de *Candida glabrata* y las cepas de
614 *C. glabrata* usadas.

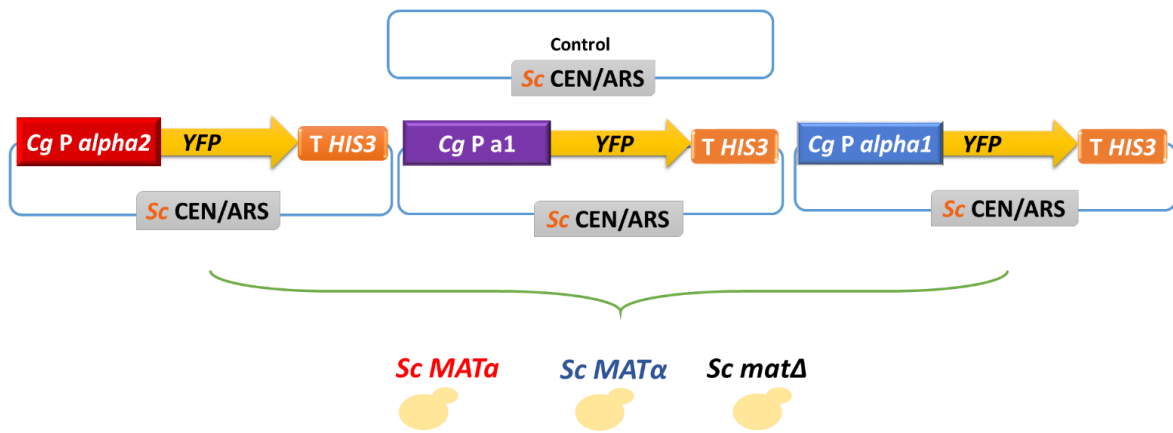
615 b) Actividad de los promotores de los genes *Cgalfa1*, *Cgalfa2* y *Cga1* de
616 *Candida glabrata* en su propio contexto genético. 1. Actividad del promotor

617 alfa1 en los medios CAA y SPORE. **2.** Actividad del promotor alfa2 en los
618 medios CAA y SPORE. **3.** Actividad del promotor **a1** en los medios CAA y
619 SPORE, para la construcción del PCga1 se utilizó un fragmento intergénico
620 de 256 pb. Se muestran los valores promedio de tres repeticiones
621 independientes.

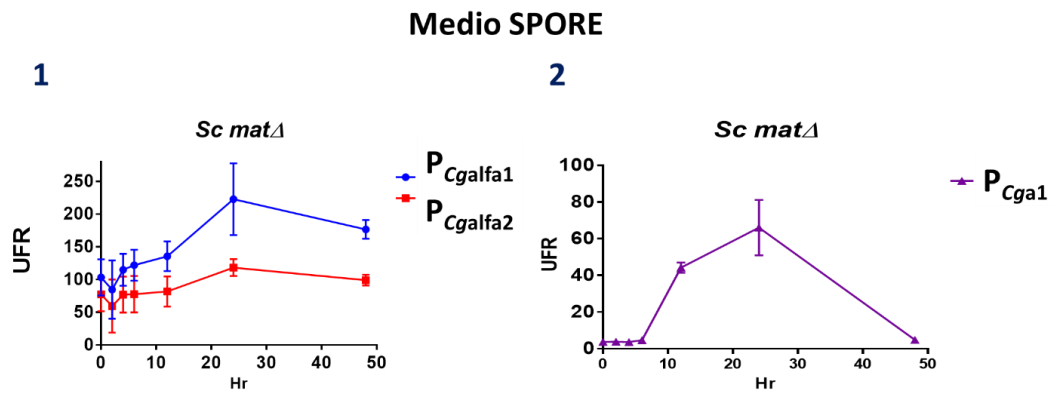
622 c) Porcentaje de la población que presenta actividad de los promotores de los
623 genes Cgalfa1, Cgalfa2 y Cga1 de *Candida glabrata*. **1.** El 24% de la
624 población con información alfa en el locus *MTL1* tiene activo el promotor del
625 gen Cgalfa1. **2.** El 36% de la población con información alfa en el locus
626 *MTL1* tiene activo el promotor del gen Cgalfa2. **3.** El 12% de la población
627 con información alfa en el locus *MTL1* tiene activo el promotor del gen
628 Cga1. Estos datos son representativos de los experimentos realizados en
629 los 3 fondos genéticos de *C. glabrata* y de dos medios utilizados.

630

a)

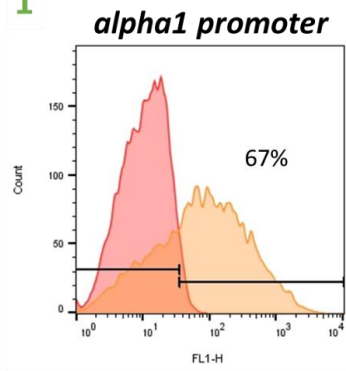


b)



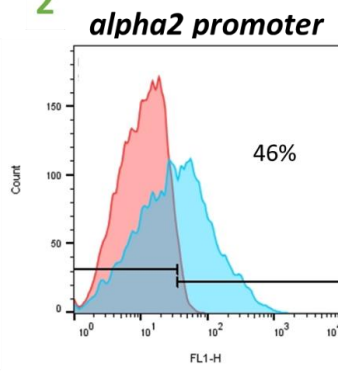
c)

1



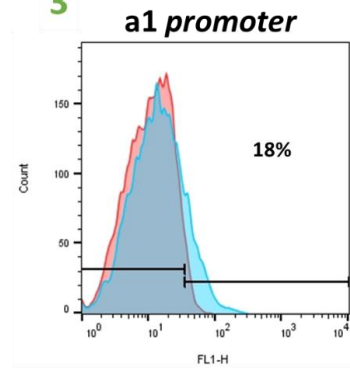
Sc
matΔ

2



Sc
matΔ

3



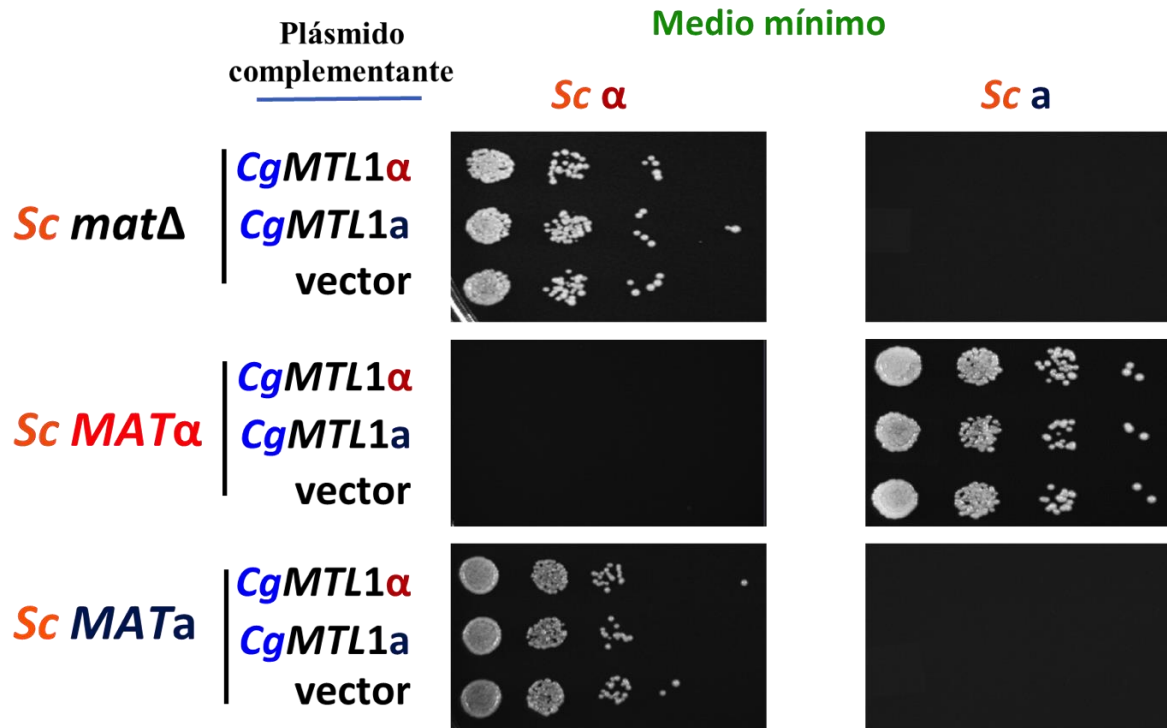
Sc
matΔ

Perdida de plásmido	
Tiempo	% de perdida
T0	60%
T48	27%

633

634 Fig. 1

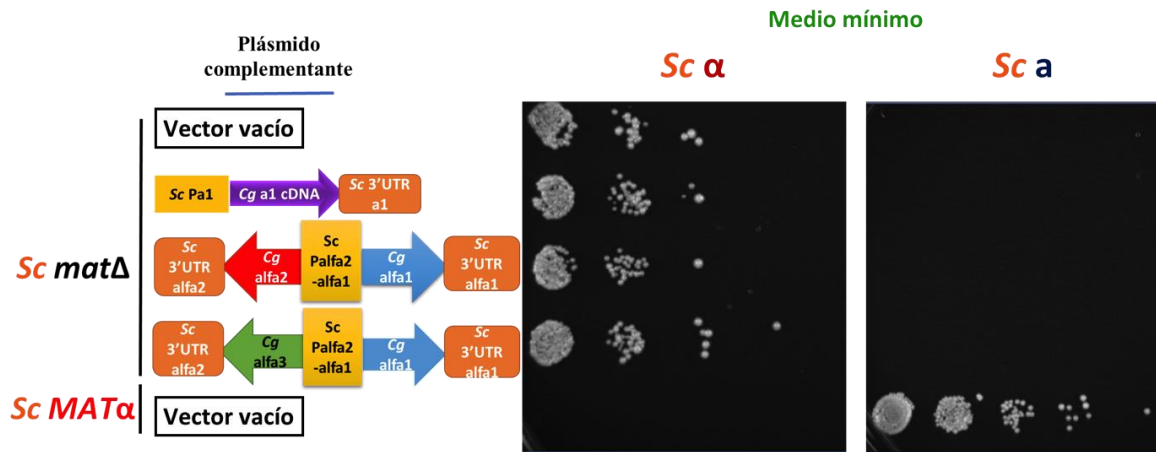
635



636

637 Fig. 2

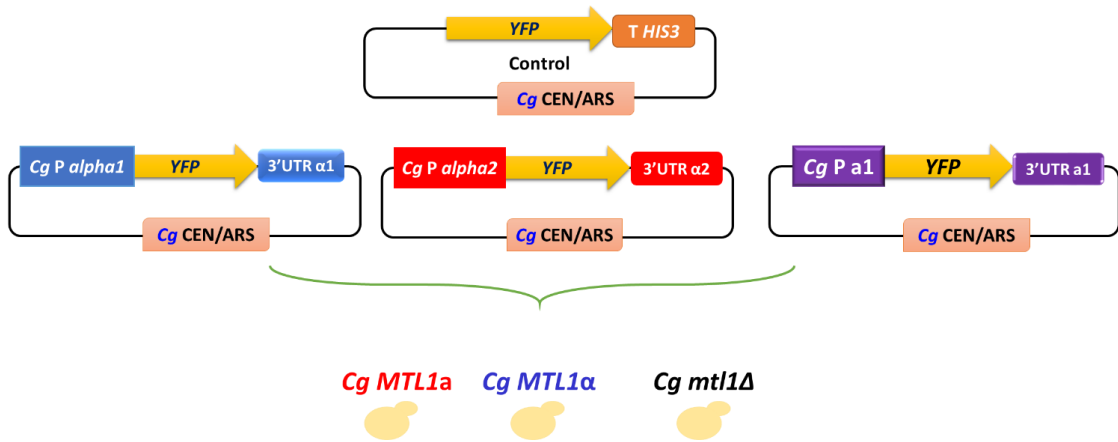
638



639

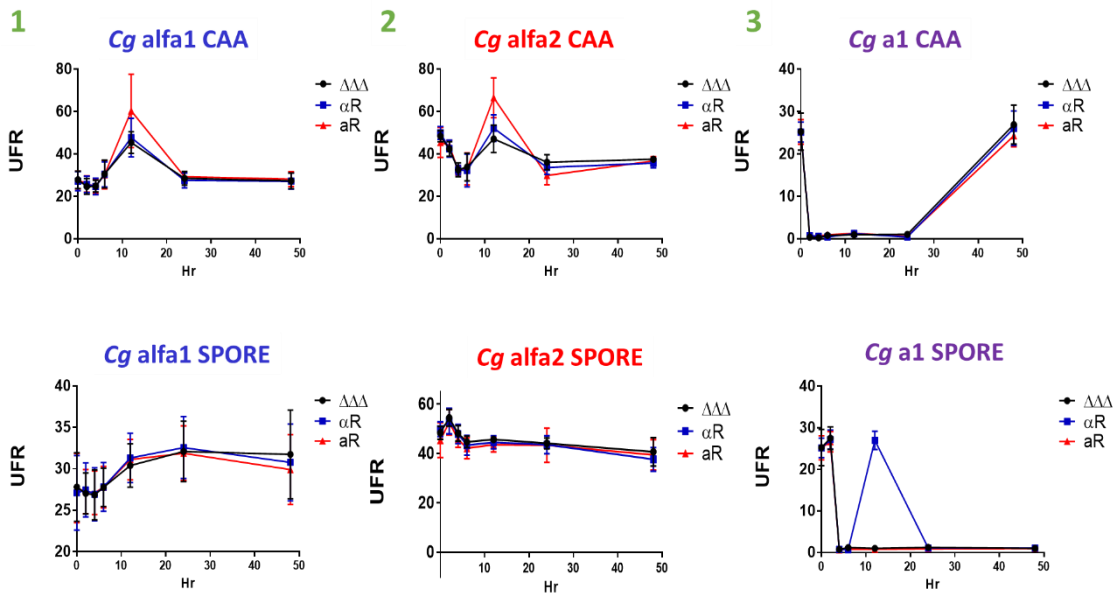
640 Fig. 3

a)



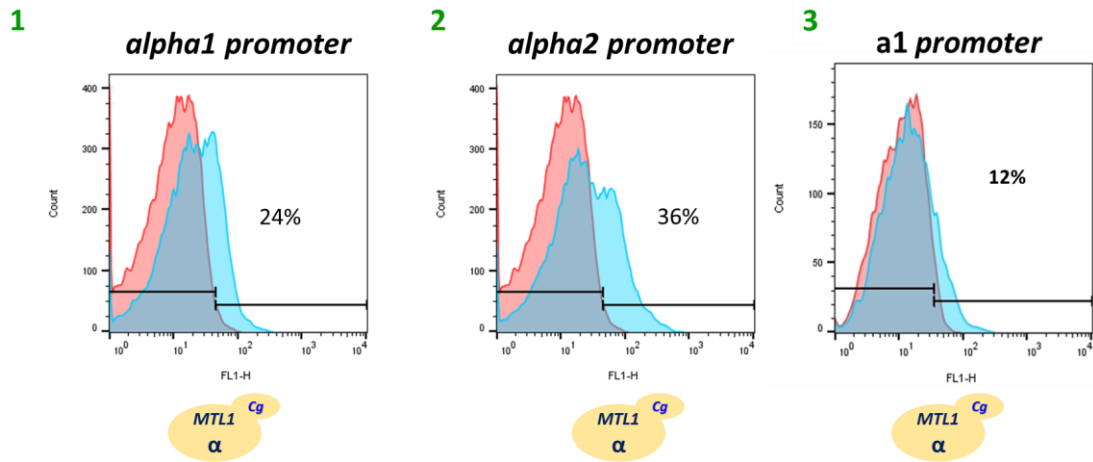
641

b)



642

c)



Perdida de plásmido	
Tiempo	% de perdida
T0 (48hrs de incubación en CAA)	22%
T48 (48hrs de incubación en CAA)	15%
T48 (48hrs de incubación en SPORE)	56%

643

644 Fig. 4

645

Cepa	Parental	Genotipo relevante	Referencia
CGM1975	CGM531	<i>mtl1</i> Δ , <i>mtl2</i> Δ , <i>mtl3</i> Δ /pYC177::YFP (YFP sin promotor)	Colección del laboratorio.
CGM1995	CGM904	<i>mtl1</i> Δ :: <i>MTL1a</i> , <i>mtl2</i> Δ , <i>mtl3</i> Δ /pYC177::YFP (sin promotor)	Colección del laboratorio.
CGM2001	CGM707	<i>mtl1</i> Δ :: <i>MTL1</i> alfa, <i>mtl2</i> Δ , <i>mtl3</i> Δ / pYC177::YFP (sin promotor)	Colección del laboratorio.
CGM2642	CGM531	<i>mtl1</i> Δ , <i>mtl2</i> Δ , <i>mtl3</i> Δ / pKN1 <i>P_{alfa2}</i> ::YFP::3' UTR <i>alfa2</i>	Este trabajo
CGM2644	CGM531	<i>mtl1</i> Δ , <i>mtl2</i> Δ , <i>mtl3</i> Δ /pKN3 <i>P_{alfa1}</i> ::YFP::3' UTR <i>alfa 1</i>	Este trabajo
CGM2645	CGM904	<i>mtl1</i> Δ :: <i>MTL1a</i> , <i>mtl2</i> Δ , <i>mtl3</i> Δ /pKN3 <i>P_{alfa1}</i> ::YFP::3' UTR <i>alfa 1</i>	Este trabajo
CGM2646	CGM707	<i>mtl1</i> Δ :: <i>MTL1</i> α , <i>mtl2</i> Δ , <i>mtl3</i> Δ / pKN1 <i>P_{alfa2}</i> ::YFP:: 3' UTR <i>alfa2</i>	Este trabajo
CGM2648	CGM707	<i>mtl1</i> Δ :: <i>MTL1</i> α , <i>mtl2</i> Δ , <i>mtl3</i> Δ / pKN3 <i>P_{alfa1}</i> ::YFP:: 3' UTR <i>alfa 1</i>	Este trabajo
CGM2650	CGM904	<i>mtl1</i> Δ :: <i>MTL1a</i> , <i>mtl2</i> Δ , <i>mtl3</i> Δ /pKN1 <i>P_{alfa2}</i> ::YFP::3' UTR <i>alfa2</i>	Este trabajo
CGM3016	CGM531	<i>mtl1</i> Δ , <i>mtl2</i> Δ , <i>mtl3</i> Δ /pKN20 <i>P_{a1}</i> ::YFP::3' UTR <i>a 1</i>	Este trabajo
CGM3040	CGM707	<i>mtl1</i> Δ :: <i>MTL1</i> α , <i>mtl2</i> Δ , <i>mtl3</i> Δ / pKN20 <i>P_{a1}</i> ::YFP:: 3' UTR <i>a 1</i>	Este trabajo

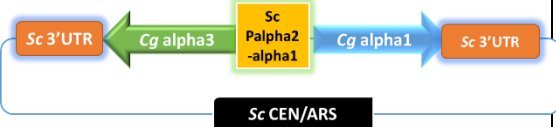
CGM3042	CGM904	<i>mtl1</i> Δ :: <i>MTL1a</i> , <i>mtl2</i> Δ , <i>mtl3</i> Δ / pKN20 <i>P_{a1}</i> ::YFP:: 3' <i>UTR a1</i>	Este trabajo
----------------	--------	--	--------------

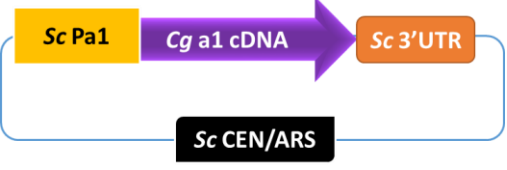
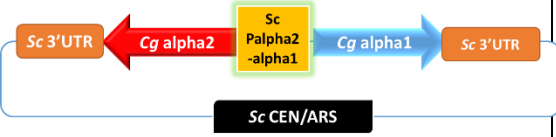
648

649 **Tabla S2. Cepas de *Saccharomyces cerevisiae*.**

Cepa	Parental	Genotipo	Comentario	Referencia
L13		<i>MATa lys9Δ</i>	<i>MATa</i> Lis ⁻ tester	Lab Fink
L14		<i>MATα lys9Δ</i>	<i>MATα</i> Lis ⁻ tester	Lab Fink
L120	BY4741	<i>MATa his3Δ0, leu2Δ0, met15Δ0, ura3Δ0.</i>	Ura ⁻	Lab Alexander de Luna
L244	BY4741	<i>MATa his3Δ0, leu2Δ0, met15Δ0, ura3Δ0.</i>	Ura ⁻	Lab Alexander de Luna
L245	BY4742	<i>MATα his3Δ0, leu2Δ0, met15Δ0, ura3Δ0.</i>	Ura ⁻	Lab Alexander de Luna
L247	L120	BY4741 <i>his3Δ0, leu2Δ0, met15Δ0, ura3Δ0. (mata)Δ::Nat</i>	Ura ⁻ , Nat ^R	Este trabajo
L257	L247	BY4741 <i>his3Δ0, leu2Δ0, met15Δ0, ura3Δ0. (mata)Δ::Nat/pYC172 – CgMTL1α</i>	Nat ^R , Ura ⁺	Este trabajo
L259	L247	BY4741 <i>his3Δ0, leu2Δ0, met15Δ0, ura3Δ0. (mata)Δ::Nat/pYC174 – CgMTL1a</i>	Nat ^R , Ura ⁺	Este trabajo
L261	L247	BY4741 <i>his3Δ0, leu2Δ0, met15Δ0, ura3Δ0. (mata)Δ::Nat/pYC203 –</i>	Nat ^R , Ura ⁺	Este trabajo

		$P_{Cga1}::YFP$		
L263	L247	BY4741 <i>his3</i> Δ 0, <i>leu2</i> Δ 0, <i>met15</i> Δ 0, <i>ura3</i> Δ 0. (<i>mata</i>) Δ ::Nat/pYC205 – $P_{Cgalfa1}::YFP$	Nat ^R , Ura ⁺	Este trabajo
L265	L247	BY4741 <i>his3</i> Δ 0, <i>leu2</i> Δ 0, <i>met15</i> Δ 0, <i>ura3</i> Δ 0. (<i>mata</i>) Δ ::Nat/pYC207 – $P_{Cgalfa2}::YFP$	Nat ^R , Ura ⁺	Este trabajo
L267	L247	BY4741 <i>his3</i> Δ 0, <i>leu2</i> Δ 0, <i>met15</i> Δ 0, <i>ura3</i> Δ 0. (<i>mata</i>) Δ ::Nat::Nat/pRS416	Nat ^R , Ura ⁺	Este trabajo
L269	L244	BY4741 <i>MATa</i> <i>his3</i> Δ 0, <i>leu2</i> Δ 0, <i>met15</i> Δ 0, <i>ura3</i> Δ 0 /pYC172 – <i>CgMTL1</i> alfa	Ura ⁺	Este trabajo
L271	L244	BY4741 <i>MATa</i> <i>his3</i> Δ 0, <i>leu2</i> Δ 0, <i>met15</i> Δ 0, <i>ura3</i> Δ 0 /pYC174 – <i>CgMTL1a</i>	Ura ⁺	Este trabajo
L273	L244	BY4741 <i>MATa</i> <i>his3</i> Δ 0, <i>leu2</i> Δ 0, <i>met15</i> Δ 0, <i>ura3</i> Δ 0 / pYC203 – $P_{Cga1}::YFP$	Ura ⁺	Este trabajo
L275	L244	BY4741 <i>MATa</i> <i>his3</i> Δ 0, <i>leu2</i> Δ 0, <i>met15</i> Δ 0, <i>ura3</i> Δ 0 / pYC205 – $P_{Cgalfa1}::YFP$	Ura ⁺	Este trabajo
L277	L244	BY4741 <i>MATa</i> <i>his3</i> Δ 0, <i>leu2</i> Δ 0, <i>met15</i> Δ 0, <i>ura3</i> Δ 0 / pYC207 – $P_{Cgalfa2}::YFP$	Ura ⁺	Este trabajo




L279	L244	BY4741 <i>MATa his3Δ0, leu2Δ0, met15Δ0, ura3Δ0</i> / pRS416	Ura ⁺	Este trabajo
L281	L245	BY4742 <i>MATalfa his3Δ0, leu2Δ0, met15Δ0, ura3Δ0</i> / pYC172 – <i>CgMTL1alfa</i>	Ura ⁺	Este trabajo
L283	L245	BY4742 <i>MATalfa his3Δ0, leu2Δ0, met15Δ0, ura3Δ0</i> / pYC174 – <i>CgMTL1a</i>	Ura ⁺	Este trabajo
L285	L245	BY4742 <i>MATalfa his3Δ0, leu2Δ0, met15Δ0, ura3Δ0</i> / pYC203 – <i>P_{Cga1}::YFP</i>	Ura ⁺	Este trabajo
L287	L245	BY4742 <i>MATalfa his3Δ0, leu2Δ0, met15Δ0, ura3Δ0</i> / pYC205 – <i>P_{Cgalfa1}::YFP</i>	Ura ⁺	Este trabajo
L289	L245	BY4742 <i>MATalfa his3Δ0, leu2Δ0, met15Δ0, ura3Δ0</i> / pYC207 – <i>P_{Cgalfa2}::YFP</i>	Ura ⁺	Este trabajo
L291	L245	BY4742 <i>MATalfa his3Δ0, leu2Δ0, met15Δ0, ura3Δ0</i> / pRS416	Ura ⁺	Este trabajo
L295	L247	BY4741 <i>his3Δ0, leu2Δ0, met15Δ0, ura3Δ0. (mata)Δ::Nat</i> /pKN16 	Ura ⁺	Este trabajo

L297	L247	BY4741 <i>his3Δ0</i> , <i>leu2Δ0</i> , <i>met15Δ0</i> , <i>ura3Δ0</i> . (<i>mata</i>) Δ ::Nat/pKN18 	Ura ⁺	Este trabajo
L295	L247	BY4741 <i>his3Δ0</i> , <i>leu2Δ0</i> , <i>met15Δ0</i> , <i>ura3Δ0</i> . (<i>mata</i>) Δ ::Nat/pKN24 	Ura ⁺	Este trabajo

650

651 **Tabla S3. Plásmidos**

Plásmido	Descripción y/o genotipo relevante	Referencia
pRS416	Vector replicativo, CEN/ARS de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> , URA3, Ap ^R	Christianson, T.W. et al. 1992.
pYC172	Vector replicativo <i>MTL1</i> alfa <i>EcoRI/XbaI</i> clonado en pRS416	Colección del laboratorio.
pYC174	Vector replicativo <i>MTL1a</i> <i>EcoRI/XbaI</i> clonado en pRS416	Colección del laboratorio.
pYC55	Vector base replicativo para <i>Cg</i> para determinar actividad de promotores con YFP, Nat ^R	Colección del laboratorio.
pYC181	Fragmento con el promotor de alfa2 clonado en pMJ22 (Nat) P _{Cgalfa2} ::YFP::T _{HIS3}	Colección del laboratorio.
pYC182	Fragmento con el promotor de alfa1 clonado en pMJ22 (Nat) P _{Cgalfa1} ::YFP::T _{HIS3}	Colección del laboratorio.
pYC203	Fragmento con el promotor de a1 clonado en pRS416 P _{Cga1} ::YFP::T _{HIS3}	Colección del laboratorio.
pYC205	Fragmento con el promotor de alfa1 clonado en pRS416 P _{Cgalfa1} ::YFP::T _{HIS3}	Colección del laboratorio.
pYC207	Fragmento con el promotor de alfa2 clonado en pRS416 P _{Cgalfa2} ::YFP::T _{HIS3}	Colección del laboratorio.
pKN01	Fragmento <i>Cg3'UTR alfa2</i> clonado en pYC182 (P _{Cgalfa2} ::YFP), digerido con <i>XbaI</i> .	Este trabajo
pKN03	Fragmento <i>Cg3'UTR alfa1</i> clonado en pYC181 (P _{Cgalfa1} ::YFP), digerido con <i>XbaI</i> .	Este trabajo

<p>pKN16</p>	<p>Fragmento Cg3'UTR a1 de 141 pb digerido con XbaI clonado en pKN08 (P_{Cga1}::YFP) cortado con XbaI.</p>	<p>Este trabajo</p>
<p>pKN18</p>	<p>Vector replicativo, CEN/ARS de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>, URA3, Ap^R</p> 	<p>Este trabajo</p>
<p>pKN20</p>	<p>Vector replicativo, CEN/ARS de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>, URA3, Ap^R</p> 	<p>Este trabajo</p>
<p>pKN24</p>	<p>Vector replicativo, CEN/ARS de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>, URA3, Ap^R</p> 	<p>Este trabajo</p>

652

#	Nombre	Secuencia	Sitios
13	Universal 1505	ggcgattaagttgggtaacgccaggg	-
14	Universal 1504	tatgttggtggaattgtgagcgga	-
320	EMG1@135XbaFw MTL1	cgc TCTAGA ctgctgaactgtgacgaccatc	XbaI
334	alfa2@nt1aaaR1 Fw	gg GAATTC aaaatgtcaaagaaatcaagaattagattac g	EcoRI
569	Nat-FRT@551 Rv	tacaaagcttgtcaccatcggaagc	-
597	alpha1@1aaaXba Rv	gag TCTAGA aaaatgttaactgaaacactgactatgaagta tactgc	XbaI
1097	Nat-FRT@+11 Fw Sall	cat GTCGAC cagtagtgacaataaaaagattcttgttttc	SaII
1386	alpha1@+1 MTL1 Xba Fw	caa TCTAGA cagaacttgagcaggcgacg	XbaI
1388	alpha2@+3 Xba Fw	gac TCTAGA caaacatatacatttctctttg	XbaI
1389	BUD5@-35 Xba Rv	caa TCTAGA gcgtctttcctgtgattatgatg	XbaI
1399	a1@+1 Xba Fw	cac TCTAGA ctatagttcctccttactctttatag	XbaI
1400	a1@+140 Xba Rv	cac TCTAGA caaaccacaccgaggactc	XbaI
1410	Diag Sc alpha1@+330 Rv	ccaacaacaacctagagtaatgg	-
1411	Diag Sc BUD5@618 Rv	gctgtattagtgcttgaccc	-
1532	a1MTL1@-39 Bam	tca GGATCC ttattgattgtctaaagatttgaatagtaatga	Bam

	Rv	cacaag	HI
2008	Cgalpha1@576Not Rv	ttt GCGGCCGC tcatggcgctgaggacgcatg	<i>NotI</i>
2009	Cgalpha2@561Xho Rv	tat CTCGAG tcaagtgtcgaggctgttttg	<i>XhoI</i>
2010	Cgalpha3@633 Xho Rv	tat CTCGAG ttatgtaagacaactcaaagaaaagacc	<i>XhoI</i>
2011	Sc3'UTR alpha1@+1 Not Fw	tat GCGGCCGC agtggtgctgtggcggag	<i>NotI</i>
2012	Sc3'UTR alpha1@+198 Not Rv	tag GCGGCCGC gcttgagtctgagtaatatcatattttatac	<i>NotI</i>
2013	Scalpha2@+1 Xho Fw	tat CTCGAG gcccgaaaaacaaatgtatatac	<i>XhoI</i>
2014	Scalpha2@+252Xho Rv	tat CTCGAG tgaattgtttagaaggacgctc	<i>XhoI</i>
2015	Cg a1@393 cDNA Xba Rv	tca TCTAGA gctagtcacgattgttagatctttcg	<i>XbaI</i>
2016	Cga1@1 AAA cDNA Bam Fw	cat GGATCC aaaatgatgacagtagaccaatacaag	<i>BamHI</i>
2017	Cga1@-262 R1 Fw	cat GAATTC cgatctcatgctcccgtag	<i>EcoRI</i>
2018	Sc a1 @+1 Xba Fw	tac TCTAGA aattcgtttcaatgattaaaatagc	<i>XbaI</i>
2019	Sc a1@+294 3' UTR Sac1 Rv	tac GAGCTC atgagtgataaacaacattggg	<i>EcoRV</i>
2020	Sc a1@-1 Bam Rv	tac GGATCC gttgctcttctgatttcttg	<i>BamHI</i>
2021	Sc a1@-296 R1 Fw	tac GAATTC ttctttgagtaatacagtaatggtagtagtg	<i>EcoRI</i>

654

655 **Pies de figuras suplementarias**

656 ***Fig. S1 Circuito de regulación del tipo celular en S. cerevisiae***

657 Se muestra la regulación a la que son sujetos los genes que determinan el
658 tipocelular (Madhani 2006). En las células tipo **a** la expresión de los genes
659 específicos de células **a** es activada por los factores transcripcionales Ste12 y
660 Mcm1; y a su vez la proteína Mcm1 reprime la transcripción de los genes
661 específicos de células **alfa** y Ste 12 activa la expresión de genes específicos de
662 haploidia. En las células de tipo **alfa**, los factores transcripcionales Scalfa2 y Mcm1
663 reprimen la expresión de los genes específicos de células **a**, de la activación de
664 los genes específicos de células **alfa** se encargan las proteínas Scalfa1, Ste12 y
665 Mcm1, así como Ste12 activa los genes específicos de haploidia. Cuando las
666 células son diploides los genes específicos de células **a** son reprimidos por las
667 proteínas Scalfa2 y Mcm1, los genes específicos de células **alfa** son reprimidos
668 por el dímero de Mcm1 y los genes de haploidia son reprimidos por el
669 heterodímero de las proteínas Sca1-Scalfa2.

670 ***Fig. S2 Alineamiento de los promotores alfa1, alfa2 y a1 de C. glabrata***

671 ***con S. cerevisiae***

672 **A.** Alineamiento del promotor *Cgalfa1* de *C. glabrata* con el promotor Scalfa1
673 de *S. cerevisiae*. **B.** Alineamiento del promotor *Cgalfa2* de *C. glabrata* con el
674 promotor Scalfa2 de *S. cerevisiae*. **C.** Alineamiento del promotor *Cga1* de *C.*
675 *glabrata* con el promotor **Sca1** de *S. cerevisiae*. Realizado con el programa
676 Mega 6 por el programa Muscle.

677 **Fig. S3 Región promotora de los genes Cgalfa1, Cgalfa2 y Cga1 de C.**
678 **glabrata**

679 En rojo se señalan las cajas TATA-consenso y en morado se marca cajas TATA-
680 parecidas.

681 **Fig. S4 Actividad de los promotores de los genes Cgalfa1, Cgalfa2 y**
682 **Cga1 de C. glabrata en S. cerevisiae en medio de cultivo CAA**

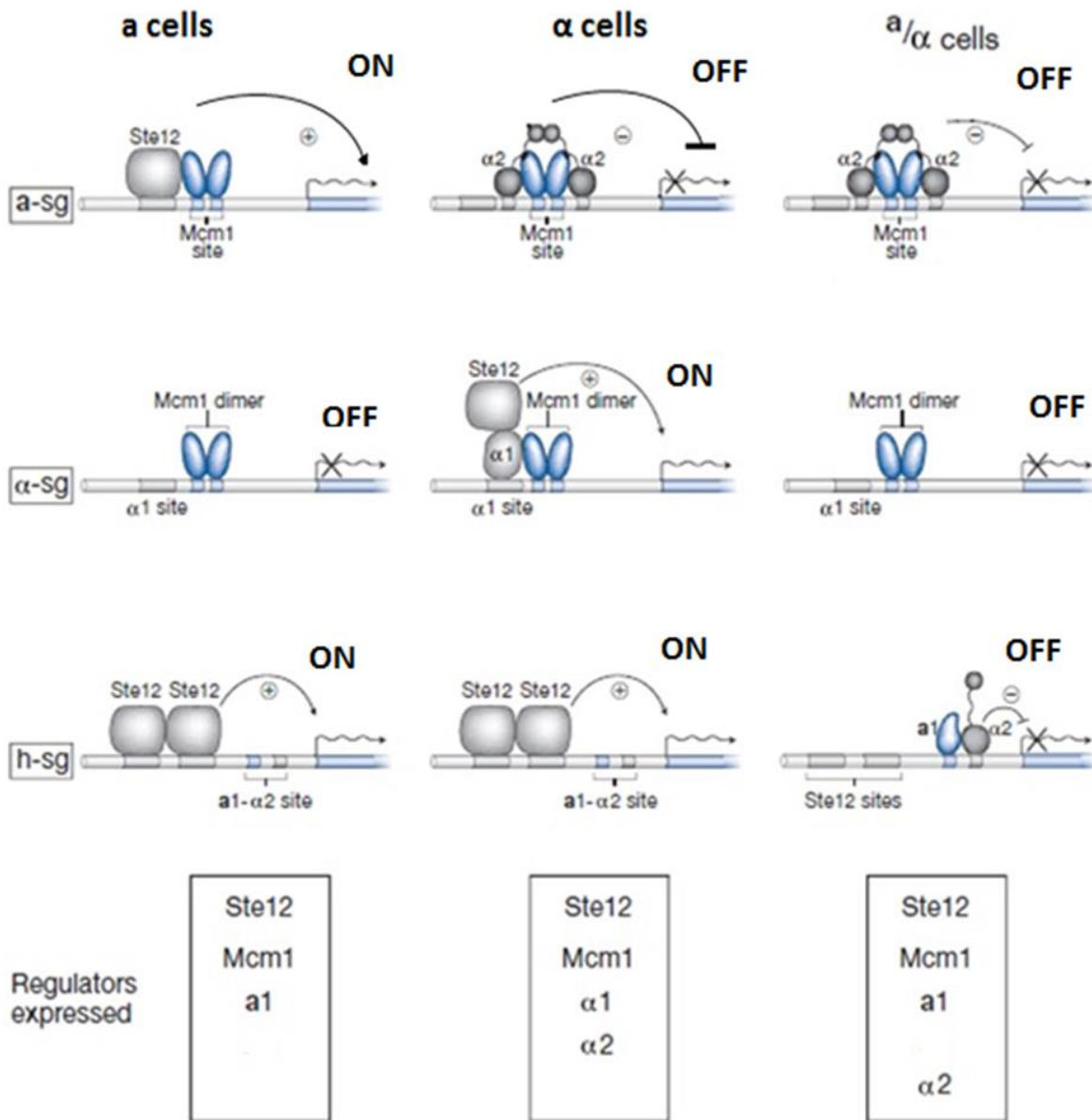
683 Actividad del promotor del gen Cgalfa1 en el medio de cultivo CAA. **b)** Actividad
684 del promotor del gen Cgalfa2 en el medio de cultivo CAA. **c)** Actividad del
685 promotor del gen Cga1 en el medio de cultivo CAA, para la construcción del
686 PCga1 se utilizó un fragmento intergénico de 715 pb. Se muestran los valores
687 promedio de tres repeticiones independientes.

688 **Fig. S5 Posibles sitios de unión de factores transcripcionales**
689 **encontrados en la región promotora de los genes Cgalfa1-Cgalfa2 de C.**
690 **glabrata**

691 **Fig. S6 Posibles sitios de unión de factores transcripcionales**
692 **encontrados en la región promotora del gen Cga1 de C. glabrata**

693 **Fig. S7 Posibles sitios de unión de factores transcripcionales**
694 **encontrados en la región promotora de los genes Scalfa1-Scalfa2 de S.**
695 **cerevisiae**

696 **Fig. S8 Posibles sitios de unión de factores transcripcionales**
697 **encontrados en la región promotora del gen Sca1 de S. cerevisiae**

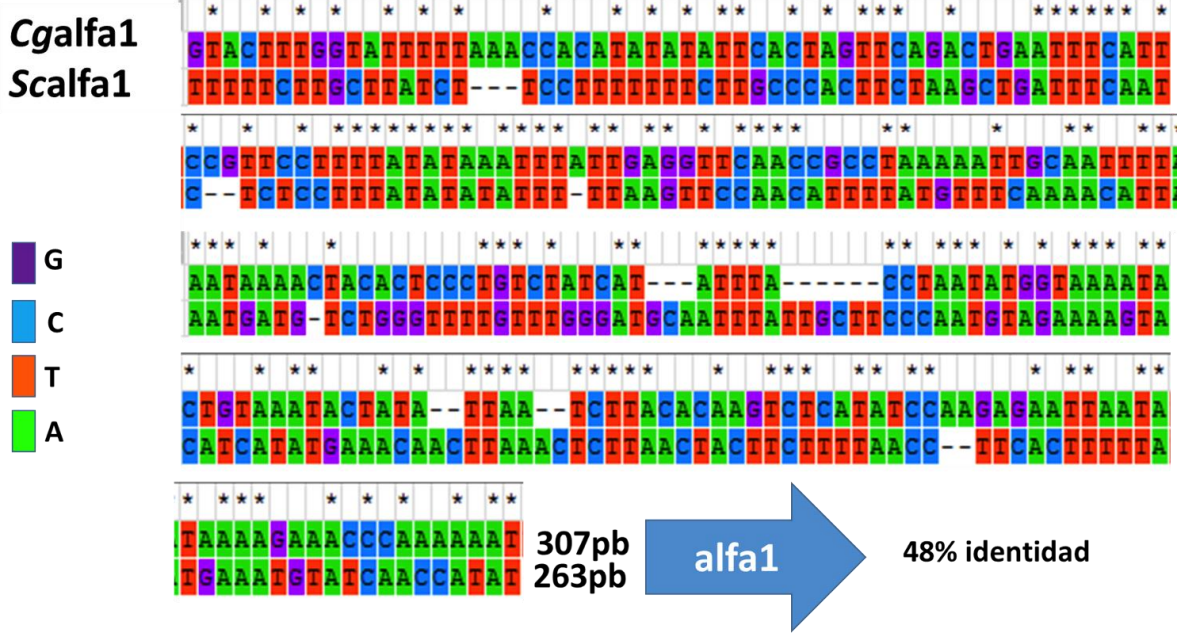


699

700 Fig. S1

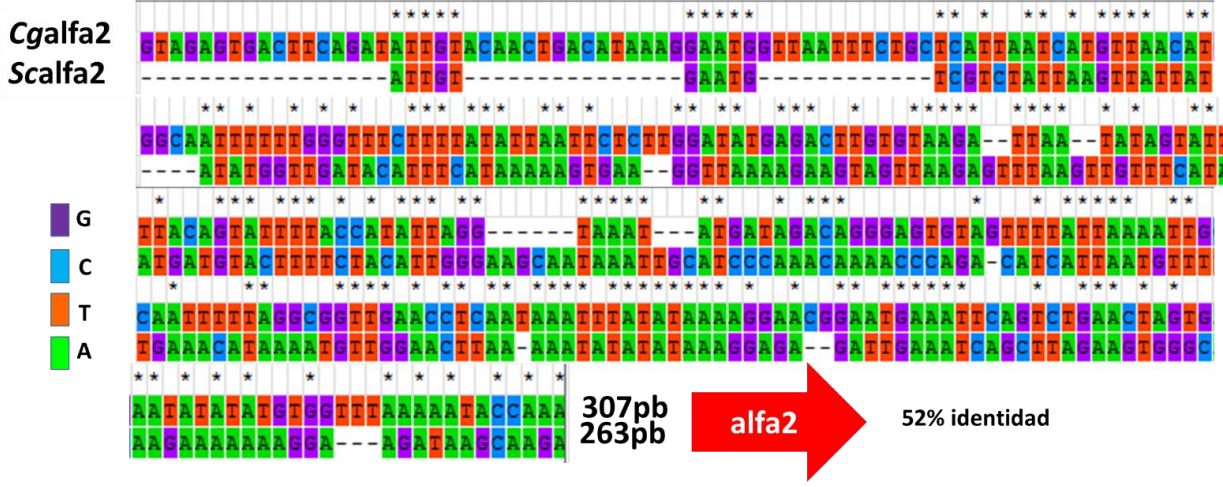
701

A



702

B

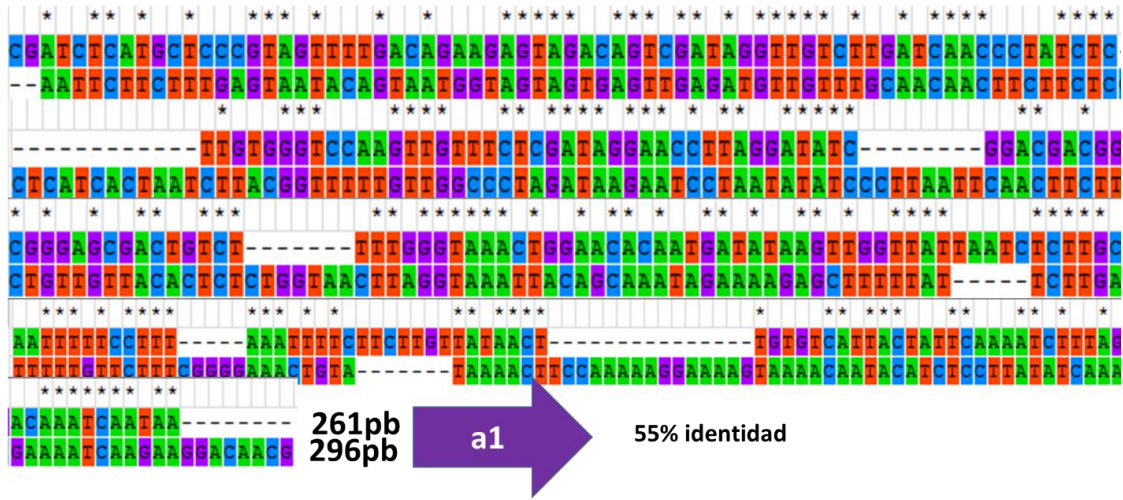


703

C

Cga1
Sca1

G
C
T
A




704


705 Fig. S2

706


Cg P alfa1

gtactttggtatTTTTaaaccaca**TATATATT**cactagttcagactgaatttcattccgttc
cttt**TATATAAA**tttattgaggttcaaccgcctaaaaattgcaattt**TAATAAAA**ctac
actccctgtctatcatatttacctaataatggtaaaatactgtaaatac**TATATTAA**tctta
cacaagtctcatatccaagagaattaa**TATAAAAG**aaacccaaaaaattgccatgta
acatgattaatgagcagaaattaaccattcctttatgtcagttgtacaatatctgaagtcac
tctac  **alfa1**

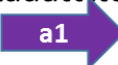
Cg P alfa2

gtagagtgacttcagatattgtacaactgacataaaggaatggtaatttctgctcattaat
catgtaacatggcaatttttgggttcttt**TATATTAA**ttctcttgatagagacttg
taagattaatagatttacagatatttaccatattaggtaaatatgatagacaggagtg
tagttttataaaattgcaatttttaggcggtgaacctcaataaatt**TATATAAA**agga
acggaatgaaattcagctgaactagtgaa**TATATATG**tggttaaaaataccaaagta
c  **alfa2**

Cg P a1 construcción para Sc

cgcttggtttatTTTTggatgtttatcgttatacaaactgtcctcaagggttgatctca
gtttcattctttgctcttcaactcaacgtactcctgatctatgtaatagttactattctaattg
agatccgaaaca**TATATAG**actttggtaaggtttgattgtcccggaaaatcaaatg
aacagtgtgggccctttctttacaaattgtttcttctctgttgctaccagttttgatct
gtatTTTgagaggttgcctctgtgctagatattgctggctggtggtcagaggtatgggtt
gtcgataggttgcggtaccaggtcttagtatctgtacgtttccctgtgaagcgggtggcc
tcgataggaagcggcatagtgattggggacgcctttttaagcagatggtctttgtaacc
acattgaatacgaatctcatgctcccgtagttttgacagaagagtagacagtcgataggtg
tcttgatcaaccctatctcttggtgggtccaagttgttctcgataggaaccttaggatatcgg
acgacggccccgggagcgactgtctttgggtaaactggaacacaatga**TATAAGTT**
ggttattaatctcttgcaattttccttaaatTTTcttctgt**TATAACTT**gtgtcattactat
tcaaatctttagacaaatcaataa  **a1**

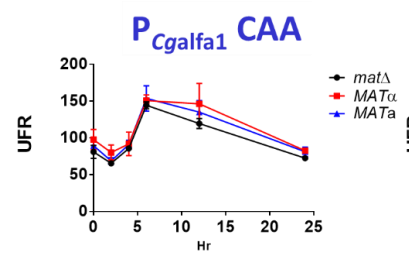
Cg P a1 construcción para Cg

cgatctcatgctcccgtagttttgacagaagagtagacagtcgataggttgccttgatcaac
cctatctcttggtggtccaagttgttctcgataggaaccttaggatatcggacgacggccc
cgggagcgactgtctttgggtaaactggaacacaatga**TATAAGTT**ggttattaatct
cttgcaattttccttaaatTTTcttctgt**TATAACTT**gtgtcattactattcaaatctt
agacaaatcaataa  **a1**

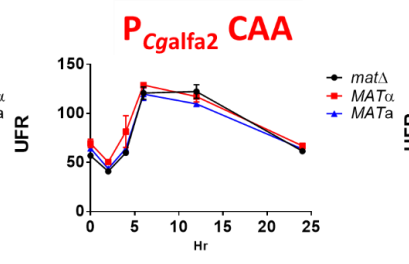
707

708 Fig. S3

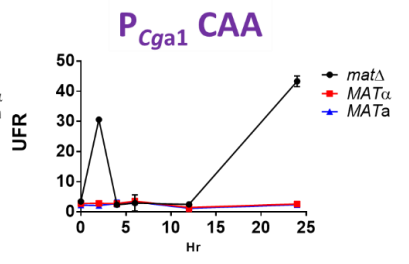
a)



b)



c)



709
710

Fig. S4

Región promotora de los genes alfa1-alfa2 de *C. glabrata*

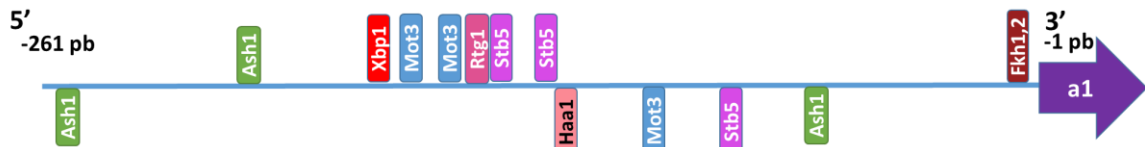


Transcription Factor	Consensus	Position	Strand
Target Sequence: miscuecia (size 307)			
Back to top ▲			
Azf1p	AAAAGAAA	-212	R
Fkh1p, Fkh2p	RYMAAYA	-143	F
Fkh1p, Fkh2p	RYMAAYA	-161	R
Mcm1p	TTWCCYAAWNNGGWAAWW	-139	R
Mcm1p	DCCYWWWNNRG	-141	R
Mcm1p	CCYWWWNNRG	-142	R
Mot3p	WAGGTA	-146	F
Mot3p	TAGGTA	-146	F
Rtg1p, Rtg3p	GTCAC	-297	R
Tec1p	CATTCC	-52	R
Tec1p	CATTCC	-265	R

711

712 Fig. S5

Región promotora del gen a1 de *C. glabrata*

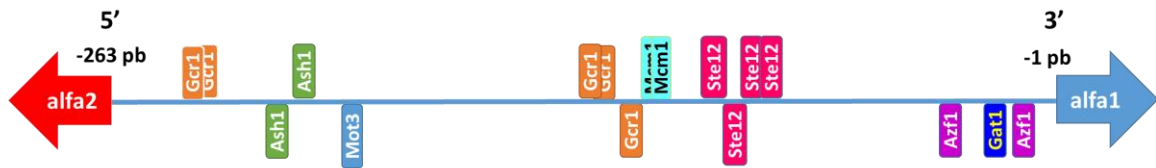


Transcription Factor	Consensus	Position	Strand
Target Sequence: miscuecia (size 261)			
Back to top ▲			
Ash1p	YTGAT	-208	F
Ash1p	YTGAT	-3	R
Ash1p	YTGAT	-200	R
Fkh1p, Fkh2p	RYMAAYA	-8	F
Mot3p	TAGGAT	-158	F
Mot3p	TMGGAA	-167	F
Mot3p	AAGGWT	-157	R
Rgt1p	CGGANNA	-150	F
Stb5p	CGGNS	-150	F
Stb5p	CGGNS	-143	F
Stb5p	CGGNS	-135	R
Xbp1p	CTCGA	-172	F
Haa1p	SMGGSG	-134	R

713

714 Fig. S6

Región promotora de los genes alfa1-alfa2 de *S. cerevisiae*

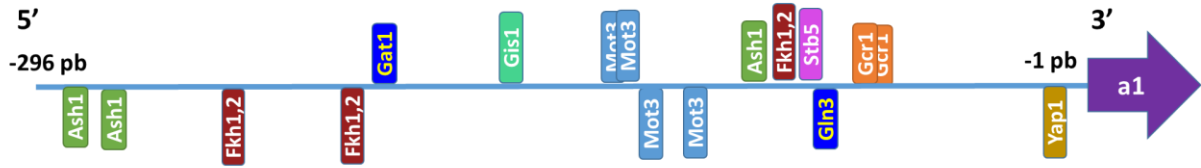


Transcription Factor	Consensus	Position	Strand
Target Sequence: miscuecia (size 263)			
Back to top			
Ash1p	YTGAT	-221	F
Ash1p	YTGAT	-35	R
Azf1p	AAGAAAA	-234	R
Azf1p	AAGAAAA	-255	R
Gat1p, Gln3p, Gzf3p	GATAAG	-248	R
Gcr1p	CTTCC	-249	F
Gcr1p	CTTCC	-122	F
Gcr1p	CWTCC	-249	F
Gcr1p	CWTCC	-122	F
Gcr1p	CWTCC	-132	R
Mcm1p	DCCYWWNNRG	-120	F
Mcm1p	CCYWWNNRG	-119	F
Mot3p	AAGGWT	-57	R
Ste12p	TGAAACA	-95	F
Ste12p	TGAAACA	-166	R
Ste12p	MTGAAACA	-96	F
Ste12p	ATGAAACA	-96	F

715

716 Fig. S7

Región promotora del gen a1 de *S. cerevisiae*



Transcription Factor	Consensus	Position	Strand
Target Sequence: miscuecia (size 296)			
Back to top ^			
Ash1p	YTGAT	-97	F
Ash1p	YTGAT	-10	R
Ash1p	YTGAT	-20	R
Fkh1p, Fkh2p	RYMAAYA	-122	F
Fkh1p, Fkh2p	RYMAAYA	-203	R
Fkh1p, Fkh2p	RYMAAYA	-247	R
Gat1p, Gln3p, Gzf3p	GATAAG	-199	F
Gcr1p	CTTCC	-63	F
Gcr1p	CWTCC	-63	F
Gis1p	TWAGGGAT	-174	R
Gln3p	GATTAG	-220	R
Mot3p	WAGGTA	-135	F
Mot3p	TAGGTA	-135	F
Mot3p	TAGGAT	-186	R
Mot3p	AAGGKA	-175	R
Stb5p	CGGNS	-81	F
Yap1p	TTACTCA	-284	R

717

718 Fig. S8