

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

POSGRADO EN CIENCIAS EN BIOLOGÍA MOLECULAR

**Expresión y localización intracelular de las proteínas
codificadas en los *loci* de apareamiento de *Candida
glabrata***

Tesis que presenta
Patricia Yáñez Carrillo

Para obtener el grado de
Doctora en Ciencias en Biología Molecular

Directora de tesis:
Dra. Irene Beatriz Castaño Navarro

San Luis Potosí, S.L.P, mayo de 2015



Constancia de aprobación de la tesis

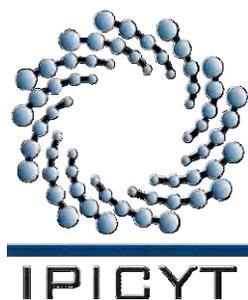
La tesis *“Expresión y localización intracelular de las proteínas codificadas en los loci de apareamiento de *Candida glabrata*”* presentada para obtener el Grado de Doctora en Ciencias en Biología Molecular fue elaborada por **Patricia Yáñez Carillo** y aprobada el veintiocho de mayo del dos mil quince 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
Director de la tesis

Dr. Rubén Hipólito López Revilla
Miembro del Comité Tutorial

Dr. Samuel Lara González
Miembro del Comité Tutorial

Dra. Margarita Rodríguez y Domínguez Kessler
Miembro del Jurado



Créditos Institucionales

Esta tesis fue elaborada en el Laboratorio de 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 B. Castaño Navarro.

El trabajo fue financiado por el proyecto CONACYT-CB-2010 No. 151517.

Durante la realización del trabajo el autor recibió una beca académica del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (270403) 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 078 del Libro Primero de Actas de Exámenes de Grado del Programa de Doctorado en Ciencias en Biología Molecular está asentado lo siguiente:

En la ciudad de San Luis Potosí a los 28 días del mes de mayo del año 2015, 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. Rubén Hipólito López Revilla	Presidente	IPICYT
Dr. Samuel Lara González	Secretario	IPICYT
Dr. Dra. Margarita Rodríguez y Domínguez Kessler	Sinodal externo	UASLP
Dra. Irene Beatriz Castaño Navarro	Sinodal	IPICYT

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

DOCTORA EN CIENCIAS EN BIOLOGÍA MOLECULAR

sustentó la C.

Patricia Yáñez Carrillo

sobre la Tesis intitulada:

*Expresión y localización intracelular de las proteínas codificadas en los loci de apareamiento de *Candida glabrata**

que se desarrolló bajo la dirección de

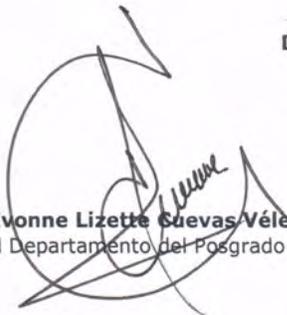
Dra. Irene Beatriz Castaño Navarro

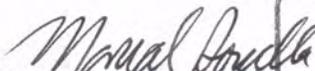
El Jurado, después de deliberar, determinó

APROBARLA

Dándose por terminado el acto a las 13:35 horas, procediendo a la firma del Acta los integrantes del Jurado. Dando fe el Secretario Académico del Instituto.

A petición de la interesada y para los fines que a la misma convengan, se extiende el presente documento en la ciudad de San Luis Potosí, S.L.P., México, a los 28 días del mes de mayo de 2015.


Mtra. Ivonne Lizette Cuevas Vélez
Jefa del Departamento del Posgrado


Dr. Mañcial Bonilla Marín
Secretario Académico



Dedicatorias

*A mi esposo Jesús y a mi hijo Eduardo
por su amor, paciencia y apoyo
en este proyecto.*

*A mis padres
por su apoyo incondicional
en cada paso de mi vida.*

Agradecimientos

A la Dra. Irene Castaño Navarro por su confianza en mí para realizar este proyecto. Por permitirme cumplir mis metas profesionales y personales, le estaré eternamente agradecida.

Al Dr. Alejandro de las Peñas Nava por sus valiosas aportaciones a este trabajo.

A la Dra. Lina Raquel Riego Ruiz por todo su apoyo académico y personal brindado en mi estancia en el IPICYT.

A la Dra. María Guadalupe Gutiérrez Escobedo por sus enriquecedores comentarios y su apoyo técnico en la realización de este trabajo.

A la Dra. Araceli Patrón Soberano por su invaluable apoyo técnico en el área de microscopía.

A mi comité tutorial por su tiempo para leer mi tesis.

A mis amigos del laboratorio 6: Eunice, Israel, Grecia, Marce, Karina, Jacky, Gehenna, Emmanuel, Norma, Osney, Cesia, Gloria A, gracias por todo.

A Gloria Lopez Niño por su apoyo técnico y personal en todo momento.

Al Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica por permitirme continuar mi formación académica.

Al CONACYT por la beca otorgada.

Contenido

Constancia de aprobación de la tesis	ii
Créditos institucionales	iii
Dedicatorias	v
Agradecimientos	vi
Lista de tablas	ix
Lista de figuras	x
Resumen	xi
Abstract	xii
1 Introducción	1
1.1 <i>Candida glabrata</i>	1
1.1.1 <i>Factores de virulencia de C. glabrata</i>	4
1.1.2 <i>Epidemiología de C. glabrata</i>	5
1.2. Reproducción sexual en hongos	6
1.2.1 <i>Reproducción sexual en S. cerevisiae</i>	7
1.2.2 <i>Apareamiento en otros hongos</i>	12
1.3 Loci MTL de C. glabrata	17
2 Antecedentes directos	19
3 Planteamiento del problema	20
4 Hipótesis	21
5 Estrategia	22
6 Objetivos	23
6.1 <i>Objetivo general</i>	23
6.2 <i>Objetivos particulares</i>	23
7 Materiales y métodos	24
7.1 <i>Medios de cultivo y cepas de Escherichia coli</i>	24
7.2 <i>Medios de cultivo y cepas de levaduras</i>	29
7.3 <i>Transformación de levaduras</i>	35
7.4 <i>Microscopía de fluorescencia</i>	36
7.5 <i>Tinción con DAPI</i>	36
7.6 <i>Western blot</i>	37
7.7 <i>Citometría de flujo</i>	37
7.8 <i>Complementación para el apareamiento en S. cerevisiae</i>	39
7 Resultados	40
8. 1 <i>C. glabrata</i> posee 2 variantes más del gen <i>alfa2</i> (<i>alfa3</i> y <i>alfa4</i>)	40
8.2 <i>Construcción de vectores de expresión para C. glabrata</i>	41
8.3 <i>Fusiones traduccionales de los genes de apareamiento de C. glabrata</i>	45
8.3.1 <i>Fusiones con su propio promotor en versión replicativa</i>	45
8.3.2 <i>Fusiones sobreexpresantes</i>	47
8.4 <i>Análisis de los promotores de los genes de apareamiento de C. glabrata</i>	48

8.5 Complementación para el apareamiento de los genes de <i>C. glabrata</i> en <i>S. cerevisiae</i>	53
9 Discusión	56
10 Conclusiones	65
11 Resultados adicionales	
11.1 Construcción de un vector replicativo sobreexpresante NAT^R	66
12 Referencias	68
13 Anexos	74

Lista de tablas

Tabla 1. Genes de apareamiento de las especies del clado <i>Candida</i>	16
Tabla 2. Cepa de <i>Escherichia coli</i> utilizada en este trabajo	24
Tabla 3. Vectores utilizados en este trabajo	24
Tabla 4. Primers utilizados en este trabajo	28
Tabla 5. Cepas de Levadura empleadas y construidas en este trabajo	30
Tabla 6. Fusiones traduccionales de genes de apareamiento de <i>C. glabrata</i> con fluoróforos y epítomos	45
Tabla 7. Cepas de <i>C. glabrata</i> utilizadas en el análisis de promotores	49
Tabla 8. Veces de represión de los promotores de los genes de apareamiento de <i>C. glabrata</i> .	53
Tabla 9. Vectores construidos y cepas transformantes obtenidas de <i>E. coli</i> DH10	78

Lista de figuras

Figura 1. Micrografía electrónica que muestra células de <i>C. glabrata</i> .	2
Figura 2. Cercanía filogenética de 22 especies de <i>Saccharomyces</i> .	3
Figura 3. Reproducción sexual en hongos.	7
Figura 4. <i>Locus MAT</i> de <i>S. cerevisiae</i> .	8
Figura 5. Circuitos de regulación del tipo de apareamiento en <i>S. cerevisiae</i> .	9
Figura 6. Regulación de los genes de apareamiento en <i>S. cerevisiae</i> .	11
Figura 7. Vía de señalización en respuesta a feromona en <i>S. cerevisiae</i> .	12
Figura 8. Configuración de los <i>loci</i> de apareamiento de <i>C. glabrata</i> .	17
Figura 9. Genes de información alfa contenidos en los <i>loci MTL</i> de cinco aislados clínicos de <i>C. glabrata</i> .	40
Figura 10. Secuencia en aminoácidos de los genes alfa.	41
Figura 11. Expresión transcripcional de las fusiones traduccionales bajo su propio promotor	46
Figura 12. Fluorescencia de los genes alfa1 y alfa2 con mCherry bajo su propio promotor.	47
Figura 13. Fluorescencia de la sobreexpresión de los genes alfa fusionados con distintos fluoróforos.	48
Figura 14. Construcción de fusiones transcripcionales para analizar promotores de los genes de apareamiento de <i>C. glabrata</i> .	49
Figura 15. Actividad de los promotores de los genes alfa1, alfa2 y a1 de <i>C. glabrata</i> en medio rico.	50
Figura 16. Actividad de los promotores de los genes alfa1, alfa2 y a1 de <i>C. glabrata</i> en medio rico con NaCl 1.6M.	51
Figura 17. Actividad de los promotores de los genes alfa1, alfa2 y a1 de <i>C. glabrata</i> en medio Spore.	52
Figura 18. Estrategia de complementación para el apareamiento en <i>S. cerevisiae</i> con los <i>loci MTL1a</i> y <i>MTL1alfa C. glabrata</i> .	54
Figura 19. Ensayo de apareamiento entre cepas <i>MATa</i> y <i>MATalfa</i> de <i>S. cerevisiae</i> en medio mínimo.	55
Figura 20. Vía HOG de señalización de <i>S. cerevisiae</i> .	61
Figura 21. Vector replicativo sobreexpresante con resistencia a NAT ^R .	66
Figura 22. Proteínas alfa1 y alfa2 etiquetadas con mCherry.	74
Figura 23. Sobreexpresión de la proteína alfa1 etiquetada con YFP y CFP.	75
Figura 24. Sobreexpresión de las proteínas alfa2 y alfa3 etiquetadas con YFP y CFP.	76
Figura 25. Sobreexpresión de la proteína alfa4 etiquetada con YFP y CFP.	77

Resumen

Expresión y localización intracelular de las proteínas codificadas en los *loci* de apareamiento de *Candida glabrata*

La reproducción sexual en hongos diploides es regulada por los genes codificados en el *locus* *MAT* (*mating type*), que determinan los tipos de apareamiento. A pesar de ser un organismo asexual, *Candida glabrata* posee tres *loci* de apareamiento: *MTL1*, *MTL2* y *MTL3* que contienen genes ortólogos a los necesarios para el apareamiento en *Saccharomyces cerevisiae*: alfa1, alfa2 y **a1**. Los genes alfa1 y alfa2 se encuentran en *MTL1*; alfa1 y alfa3 en *MTL3* y, en dos aislados clínicos que poseen información alfa en *MTL2*, se encuentran los genes alfa1 y alfa4. Hemos encontrado que en *C. glabrata* existen tres alelos del gen alfa2: alfa2, alfa3 y alfa4, los tres poseen la secuencia homeodominio que en *S. cerevisiae* permite a las proteínas unirse al DNA para la regulación de sus genes blanco. Para estudiar la función de los *loci* *MTL* y la localización de las proteínas que codifican hemos generado vectores de expresión para fusiones traduccionales de cualquier gen de *C. glabrata* con tres secuencias de fluoróforos o epítomos. Encontramos que las proteínas alfa1 y alfa2 de *C. glabrata* se localizan en el núcleo, lo cual es congruente con su posible función como factores transcripcionales como sucede en otras levaduras. Al sobreexpresar los genes alfa de *C. glabrata* encontramos que las proteínas correspondientes se localizan tanto en el núcleo como en el citoplasma. En *C. glabrata* los genes alfa1 y alfa2 se inducen en condiciones de limitación de nutrientes y durante estrés osmótico independientemente de la información de apareamiento de los *loci* *MTL*. El gen **a1** parece no expresarse en las condiciones de estrés nutricional de estrés osmótico. Los *loci* *MTL1a* y *MTL1alfa* de *C. glabrata* no complementan para el apareamiento en *S. cerevisiae*. La regulación de la expresión de los genes de apareamiento en *C. glabrata* es distinta a la descrita en *S. cerevisiae* y como trabajo futuro será determinar cuáles son los genes blanco que son regulados por genes codificados en los *loci* *MTL* de *C. glabrata*.

Palabras Clave: *Candida glabrata*, vectores de expresión, sobreexpresión, fluoróforos y epítomos, apareamiento, genes alfa.

Abstract

Expression and intracellular localization of the proteins encoded in the *Candida glabrata* mating loci

Sexual reproduction in fungi is regulated by the genes encoded in the *MAT* (mating type) *locus*. Despite being an asexual organism, *C. glabrata* has three mating loci: *MTL1*, *MTL2* and *MTL3* containing the orthologous genes to those required for mating in *Saccharomyces cerevisiae*: *alpha1*, *alpha2* y *a1*. *alpha* genes are distributed as follows in the genome: *alpha1* and *alpha2* are localized in *MTL1*; *alpha1* and *alpha3* in *MTL3*; and in only two clinical isolates in which we found *alpha* information in *MTL2* we have *alpha1* and *alpha4* genes. We found that in *C. glabrata* there are three *alpha2* alleles and all of them have a homeodomain sequences that allow DNA binding to regulate its target genes in the *S. cerevisiae* orthologues. To study the function of these genes and the localization of the respective proteins we generated expression vectors to generate translational fusions of any gene of *C. glabrata* with three fluorophores or epitopes sequences. *C. glabrata* *alpha1* and *alpha2* proteins are localized at the cell nucleus which is consistent with a possible role as transcriptional factors as in other yeasts. When *alpha1* and *alpha2* genes are overexpressed, we found that the proteins are localized not only in the nucleus but throughout the entire cell. In *C. glabrata* *alpha1* and *alpha2* genes are induced under conditions of nutrient limitation and during osmotic stress information regardless of the *MTL* *apareamiento* loci. The *a1* gene promoter appears to be inactive under conditions of nutrient limitation and osmotic stress. *C. glabrata* *MTL1a* and *MTL1alpha loci* do not complement mating in *S. cerevisiae*. The regulation of gene expression in *C. glabrata* mating differs from that described in *S. cerevisiae*. As a future work we will determine which target genes are regulated by the *MTL* genes of *C. glabrata*.

Key Words: *Candida glabrata*, expression vectors, overexpresssion, fluorophores and epitopes, mating, *alpha* genes.

1 Introducción

La mayoría de las especies de *Candida* son organismos que forman parte de la microbiota de las cavidades oral, gastrointestinal y vaginal en individuos sanos. Sin embargo, los pacientes críticos con un sistema inmune comprometido son susceptibles a infecciones fúngicas que ponen en riesgo la vida. Las especies de *Candida* son los patógenos más comunes en infecciones sistémicas nosocomiales a nivel mundial (Pfaller & Diekema, 2012; Yapar, 2014). En un estudio de poblaciones en Estados Unidos, la incidencia de hospitalizaciones debido a candidemias aumentó en un 50% de 2000 a 2005 (Zilberberg, Shorr, & Kollef, 2008), mientras en Europa la incidencia también ha aumentado considerablemente de 1999 a 2009 (Tortorano et al., 2013). Además, se ha documentado que la mortalidad asociada con candidiasis invasiva es muy alta, del 30 al 70% (Gudlaugsson et al., 2003; Horn et al., 2009; Lass-Flörl, 2009). El uso de inmunosupresores, procedimientos invasivos, nutrición parenteral, catéteres, quimioterapia y radioterapia y uso de antibióticos de amplio espectro, aumenta la frecuencia de mortalidad asociada a estas especies (Horn et al., 2009; Lass-Flörl, 2009; Pappas et al., 2004; Pfaller & Diekema, 2012; M. Richardson & Lass-Flörl, 2008; Wisplinghoff et al., 2004).

Aunque el género *Candida* está compuesto por más de 150 especies, el 65% no son capaces de crecer a 37°C, por lo cual no pueden colonizar a un hospedero mamífero. Sólo 17 especies de *Candida* se conocen como agentes etiológicos de infecciones humanas. La importancia de este género radica en que son agentes causales de más del 90% de las infecciones invasivas (Lass-Flörl, 2009; Pfaller & Diekema, 2007).

1.1 *Candida glabrata*

C. glabrata es un hongo levaduriforme cuyas blastoconidias son más pequeñas que las de otras especies de *Candida* pues miden de 1 a 4 µm (Fig. 1). *C. glabrata* posee un genoma haploide con 13 cromosomas (Fidel, Vazquez, & Sobel, 1999) que facilita su manipulación genética y la hace un buen modelo de estudio. A pesar de pertenecer al género *Candida*, *C. glabrata* tiene una relación filogenética más estrecha con la

levadura *Saccharomyces cerevisiae* que con *Candida albicans* lo cual permite utilizar las herramientas moleculares desarrolladas para *S. cerevisiae* (Fig. 2). Lo anterior se puede lograr debido también a la alta sintenia de genes e identidad entre proteínas ortólogas (<http://www.genolevures.org/yeastgenomes.html#>). A diferencia de otras especies de *Candida*, *C. glabrata* redujo su capacidad metabólica y sólo es capaz de fermentar y asimilar glucosa y trehalosa. Ha perdido genes necesarios para la asimilación de galactosa y sacarosa, el metabolismo de fosfato, nitrógeno y azufre y la biosíntesis de tiamina, piridoxina y ácido nicotínico (Kaur, Domergue, Zupancic, & Cormack, 2005). Aunque existen especies que han modificado su uso del codón CTG para serina en lugar de leucina, en *C. glabrata* se ha mantenido el uso de este codón para leucina.

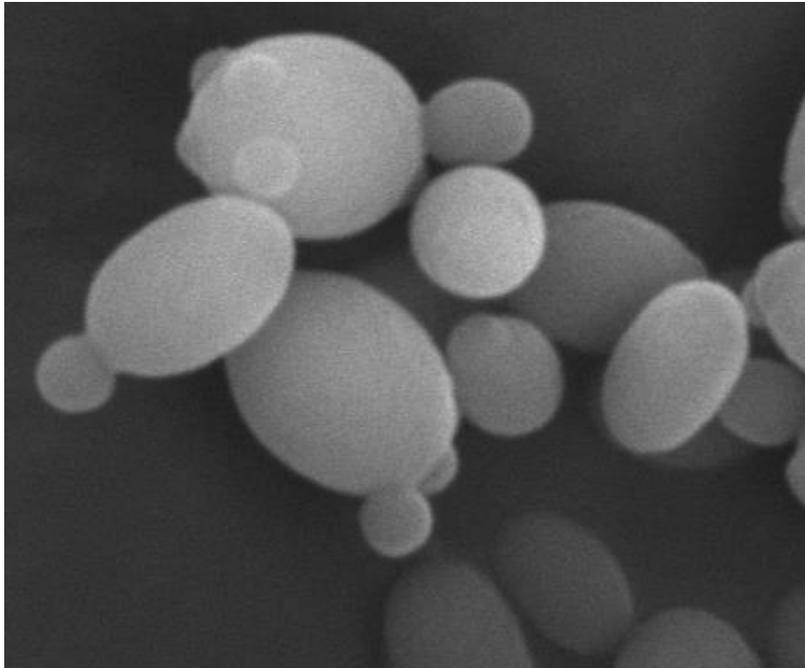


Figura 1. Micrografía electrónica que muestra células de *C. glabrata*.
IPICYT-LINAN (Araceli Patrón Soberano).

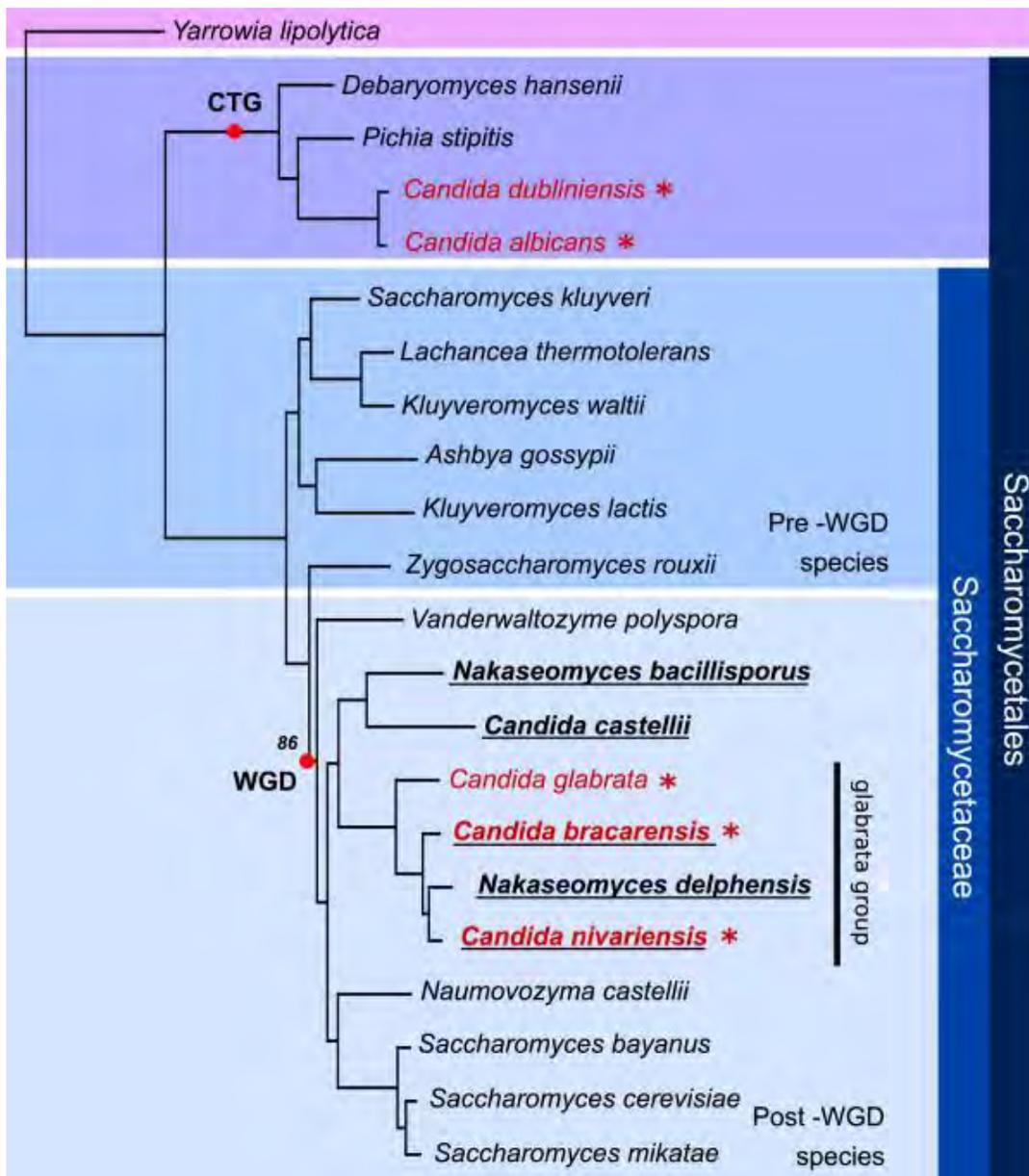


Figura 2. Cercanía filogenética de 22 especies de *Saccharomyces*.

Se muestra un árbol filogenético producto de un análisis de 603 genes. Los nombres de las especies que están escritos en rojo y con asterisco son patógenos de humanos. Las especies subrayadas corresponden a especies del clado *Nakaseomyces*. Se indica el cambio en el uso del codón CTG para serina en lugar de leucina y las especies que han sufrido una duplicación completa del genoma (WGD). Tomada de (Gabaldon et al., 2013).

La secuencia del genoma completo de la cepa CBS138 de *C. glabrata* se encuentra disponible desde 2004 en la base de datos Genolevures (<http://www.genolevures.org/yeastgenomes.html#>). Posee 13 cromosomas con 12.3 Mb y un contenido de GC de 38.8%. Consta de 5283 secuencias codificantes y el número promedio de codones de 493 por secuencia. Como lo muestra la Figura 2 los

genomas de *C. glabrata* y *S. cerevisiae* muestran cercanía filogenética y se ha reportado que ambas especies comparten un alto grado de sintenia con un promedio de 65% de identidad en aminoácidos entre proteínas ortólogas (Byrne & Wolfe, 2005).

1.1.1 Factores de virulencia de *C. glabrata*

A pesar de la alta frecuencia con que se detectan infecciones por *C. glabrata*, algunos de los factores de virulencia que se han descrito para *C. albicans* y otras especies de *Candida* no parecen ser necesarios para la virulencia de *C. glabrata*. Por ejemplo, se requiere la secreción de fosfolipasas para la virulencia de *C. albicans*, pero no parecen tener un papel prominente en *C. glabrata*. *C. albicans* secreta aspartil proteasas extracelulares para permitir su crecimiento invasivo, en cambio *C. glabrata* aunque contiene 11 genes que codifican para aspartil proteasas, parecen no secretarse al medio en aislados clínicos (Kantarcioglu & Yucel, 2002); sin embargo, estas enzimas sí son necesarias para la supervivencia en macrófagos y la virulencia en un modelo de candidemia en ratones (Kaur, Ma, & Cormack, 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, este crecimiento filamentoso no se ha asociado con la virulencia (Csank & Haynes, 2000).

La adherencia a células epiteliales de mamíferos *in vitro* y la formación de biopelículas son características requeridas para la colonización de ambos patógenos. 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, a plástico y para la formación de biopelículas. La mayoría de estos se localizan en regiones subteloméricas (Castano et al., 2003; Kaur et al., 2005; Pfaller & Diekema, 2004). En *C. albicans* las proteínas de pared celular Als están implicadas en adherencia, patogénesis y formación de biopelículas (Hoyer, Green, Oh, & Zhao, 2008)

De manera innata, *C. glabrata* tiene una alta resistencia a fluconazol, un antifúngico usado como profiláctico en pacientes inmunocomprometidos (Fidel et al., 1999). Los azoles inhiben la enzima demetilasa de lanosterol 14 α , codificada por el gen *ERG11* que participa en la biosíntesis de ergosterol (Kaur et al., 2005; Morschhauser, 2010).

C. glabrata es más resistente que *C. albicans* y *S. cerevisiae* a estrés oxidante por peróxido de hidrógeno (Cuellar-Cruz et al., 2008) y es capaz de replicarse en el interior de las células fagocíticas (Kaur et al., 2007). Tal resistencia a estrés oxidante está dada por los factores transcripcionales Yap1, Skn7, Msn2 y Msn4 (Cuellar-Cruz, Castano, Arroyo-Helguera, & De Las Penas, 2009).

Otra característica importante que le ha permitido a *C. glabrata* sobrevivir en ambientes desafiantes es la alta tasa de rearrreglos cromosómicos que muestran aislados de *C. glabrata* en estructura y organización. Es común encontrar translocaciones, duplicaciones y formación de nuevos cromosomas que contienen genes relacionados con virulencia. Tal plasticidad genómica de este organismo está relacionada con la resistencia a antifúngicos y constituye una ventaja para sobrevivir en el hospedero mamífero (Ahmad et al., 2013).

1.1.2 Epidemiología de *C. glabrata*

Las especies de *Candida* son la cuarta causa de infecciones sistémicas y desde hace 60 años ha aumentado significativamente la incidencia de candidosis sistémicas. Las infecciones por las especies de *Candida* colonizan el tracto gastrointestinal, la piel y las mucosas. Los principales factores de riesgo en infecciones por hongos son: inmunosupresión, ruptura de membranas como la piel, uso de catéteres y tratamiento con antibióticos por tiempo prologado (M. D. Richardson, 2005; Tang, Liu, Lin, & Lai, 2014).

C. albicans es el agente causal más común, sin embargo, debido al uso de antimicóticos de amplio espectro la frecuencia de otras especies se ha incrementado

y ahora *C. glabrata* es considerada el segundo patógeno del género *Candida* de mayor prevalencia pues es responsable del 15% al 26% de las infecciones por *Candida* a nivel mundial (Kaur et al., 2005; Pfaller & Diekema, 2012).

En México, las infecciones sistémicas nosocomiales causadas por especies de *Candida* representan el 3.8%, de las cuales *C. glabrata* representa el 13.5%. *C. glabrata* se aísla principalmente en personas mayores de 60 años que se encuentran hospitalizadas y/o que padecen diabetes mellitus (Corzo-Leon et al., 2014). Por lo tanto, este organismo resulta un problema de salud pública no solo en nuestro país sino también a nivel mundial.

1.2. Reproducción sexual en hongos

La reproducción sexual o apareamiento permite la recombinación genética y aumenta la biodiversidad; a pesar de significar un gran costo energético y ser un proceso relativamente lento, se considera un que es benéfico para la mayoría de los organismos (Goddard, Godfray, & Burt, 2005). El apareamiento es un proceso biológico en el que dos células especializadas haploides se fusionan para formar una célula diploide en la que el genoma de ambas progenitoras se duplica y posteriormente se recombina. Bajo ciertas condiciones específicas, la célula diploide se divide dos veces después de una sola ronda de replicación de su genoma para generar cuatro células haploides cuyo genoma es una mezcla de las progenitoras, proceso conocido como meiosis (Fig. 3) (Nielsen & Heitman, 2007).

Sin embargo, varios hongos patógenos de humanos presentan una reproducción principalmente asexual, esto posiblemente debido a que la recombinación genética durante la reproducción sexual puede resultar en la pérdida de la combinación de genes necesaria para la virulencia y la capacidad de colonizar tejidos en el hospedero mamífero (A. Johnson, 2003). La reproducción sexual en hongos se lleva a cabo por medio de la fusión de núcleos sexualmente compatibles, es decir, generalmente es necesario tipos de apareamiento (*mating type*) distintos los cuales están determinados

en el genoma por el *locus* *MAT* (o *MTL* en algunos hongos), como es el caso de *Candida albicans*, *Aspergillus fumigatus*, *S. cerevisiae* y *Neosartorva fischeri* (Bennett & Johnson, 2003; Hull, Raisner, & Johnson, 2000; Magee & Magee, 2000; Paoletti et al., 2005).

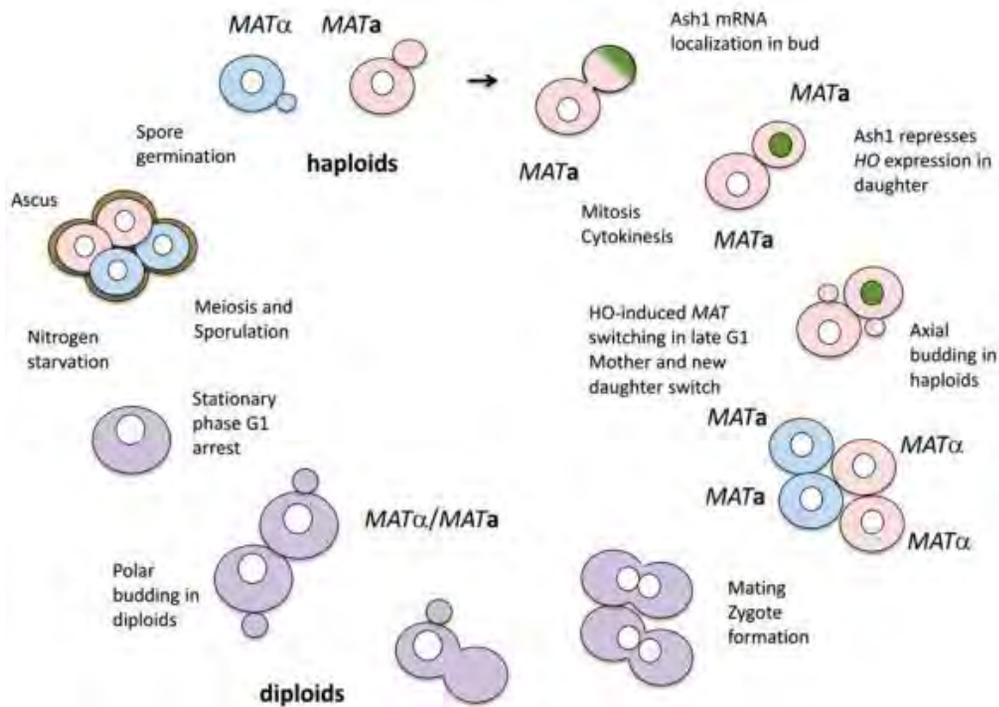


Figura 3. Reproducción sexual en hongos.
Tomado de (Haber, 2012)

1.2.1 Reproducción sexual en *S. cerevisiae*

S. cerevisiae es un hongo ampliamente estudiado que posee ciclos de reproducción tanto sexual como asexual. Los mecanismos de apareamiento y la genética de su ciclo sexual han servido para entender el proceso reproductivo de otros hongos.

El apareamiento es regulado por los genes codificados en el *locus* *MAT* (*mating_type*) ubicado en el cromosoma III de su genoma y puede contener genes **a** o alfa que codifican para factores transcripcionales que determinan el tipo celular sexual **a** o alfa (Fig. 4) En el mismo cromosoma se localizan dos *loci* cercanos a los telómeros que no se expresan llamados *HMR* y *HML* que contienen copias idénticas de los genes **a** y alfa, respectivamente. La región *MAT* puede cambiar del tipo celular **a** al tipo

celular alfa o viceversa por un mecanismo de recombinación sitio específica que se lleva a cabo por la endonucleasa Ho, que introduce cortes en las dos cadenas del DNA en cualquiera de los *loci* silenciosos *HM*. De tal manera que la información que se encuentra silenciada en estos *loci* se copia al *locus MAT* donde ahora puede ser expresada (Haber, 1998).

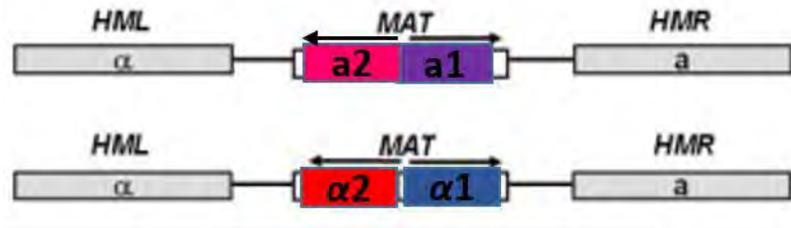


Figura 4. Locus *MAT* de *S. cerevisiae*.

Se muestran los tres *loci* de apareamiento en *S. cerevisiae*: *HML*, *HMR* y *MAT*. El *locus HML* con información alfa (α), el *locus HMR* con información *a* y el *locus MAT* con información *a* (gen *a1*) o información alfa (genes $\alpha 1$ y $\alpha 2$). Modificado de (Haber, 2012; Soll, 2004).

Los genes codificados en los *loci* de apareamiento de *S. cerevisiae* (*MAT*, *HML* y *HMR*) no solamente especifican el tipo de apareamiento sino también las proteínas codificadas en ellos (*a1*, $\alpha 1$ y $\alpha 2$) son proteínas de regulación transcripcional que permiten la activación y represión de ciertos grupos de genes que confieren “identidad celular sexual” como lo muestra la Figura 5 (Herskowitz, 1988). Los tres tipos celulares que presenta *S. cerevisiae* son células haploides tipo *a* o tipo alfa y células diploides *a/alfa* que son resultado del apareamiento de dos células haploides de tipo de apareamiento opuesto. Los genes específicos de células *a* (*asg*) se expresan sólo en células que contienen información de apareamiento tipo *a* en el *locus MAT* y los genes específicos de células alfa (*alfasg*) se expresan sólo en células que contienen información de apareamiento tipo alfa en el *locus MAT*. De esta manera se determinan los fenotipos de cada tipo celular que permiten que el apareamiento se lleve a cabo (Galgoczy et al., 2004).

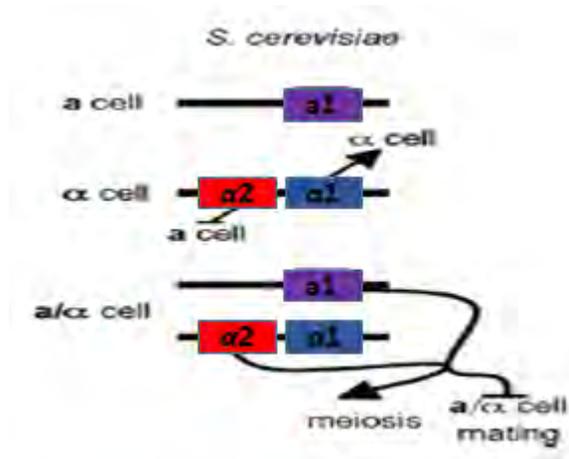


Figura 5. Circuitos de regulación del tipo de apareamiento en *S. cerevisiae*.

En *S. cerevisiae* el tipo celular por default es el tipo **a**, en una célula tipo alfa (α) es necesario un represor de genes específicos tipo **a**, que es la proteína alfa2 ($\alpha 2$) y un inductor de genes específicos de genes alfa que es la proteína alfa1 ($\alpha 1$); mientras que en una célula diploide, se forma el heterodímero represor **a1/alfa2** que reprime el apareamiento y la meiosis. Modificado de (!!! INVALID CITATION !!!).

Las proteínas **a1** y alfa2 son proteínas que contienen un homeodominio y forman parte de una familia de reguladores transcripcionales que controlan diversos procesos celulares. Se ha encontrado que su dominio de unión a DNA está conservado en hongos, plantas y humanos. Normalmente los homeodominios consisten en 60 residuos de aminoácidos que forman 3 alfa-hélices, una de las cuales es la hélice de reconocimiento de DNA (Gehring, Affolter, & Burglin, 1994; Mathias, Zhong, Jin, & Vershon, 2001).

Las células **a** y alfa producen sólo los factores de apareamiento que necesitan para aparearse. Las células **a/alfa** no se pueden aparear y no producen factores de apareamiento. De tal manera que los genes que se transcriben en células alfa (*MAT*_{alfa}) durante el apareamiento son llamados genes específicos de células alfa (*alfasg*), los transcritos en células **a** (*MAT*_a) durante el apareamiento, son llamados genes específicos de células **a** (*asg*), mientras que los transcritos en ambos tipos celulares haploides **a** y alfa (pero no en células **a/alfa**) se llaman genes específicos de haploidía (*hsg*) (Fig. 6) (Strathern, Hicks, & Herskowitz, 1981).

En muchas especies de hongos el reconocimiento celular y la fusión de núcleos está mediada por péptidos de apareamiento difusibles llamados feromonas que

desencadenan respuestas específicas a muy bajas concentraciones. Las células alfa contienen en el *locus MAT* alfa los genes alfa1 y alfa2 que les permite transcribir *alfasg* como son la feromona alfa y el receptor de la feromona **a** (Ste2). La proteína activadora alfa1 activa la transcripción de los *alfasg* (Sprague, Jensen, & Herskowitz, 1983) y la proteína represora alfa2 reprime la transcripción de *asg* e impide que las células alfa produzcan otro receptor y feromona (Hartig, Holly, Saari, & MacKay, 1986; Wilson & Herskowitz, 1984) (Fig. 6).

Las células **a** no poseen ni un represor ni un activador como sucede en las células alfa. Las células **a** son capaces de transcribir constitutivamente sólo los *asg* como el receptor de feromona alfa (Ste3) y el factor de apareamiento debido a que no poseen la proteína represora alfa2, ni el activador alfa1 que induciría la transcripción de *alfasg*.

Las células **a/alfa** no producen ningún receptor de feromona de apareamiento y por lo tanto son incapaces de aparearse. Puesto que poseen ambos tipos de información (**a** y alfa), forman el heterodímero represor **a1/alfa2** el cual reprime la transcripción de alfa1 (e impide que se transcriban los *alfasg*), reprime los *hsg* que son necesarios para el apareamiento (Herskowitz, 1989; A. D. Johnson, 1995).

En *S. cerevisiae* la vía de las MAP cinasas señalizan la respuesta a feromonas del exterior de la célula hacia el núcleo de células **a** y alfa para que se lleve a cabo el apareamiento (Elion, 2000; Lengeler et al., 2000; Schwartz & Madhani, 2004). La transducción de la señal inicia con la secreción de feromonas de los respectivos tipos celulares (**a** y alfa): feromona **a** secretada por células tipo **a** y feromona alfa secretada por células tipo alfa. Cada tipo celular expresa en su superficie el receptor de la feromona del tipo celular contrario, de tal forma que la unión de la feromona alfa, secretada por las células alfa, se une al receptor Ste2 en la superficie de células **a**, o bien, la feromona **a**, secretada por células **a**, se une al receptor Ste3 en la superficie de células alfa. La interacción de la feromona con el receptor activa una proteína G heterodimérica debido a que propicia la disociación de la subunidad alfa, lo cual

permite que las subunidades β y γ inicien la cascada de señalización de las MAP cinasas, como lo muestra la Figura 7.

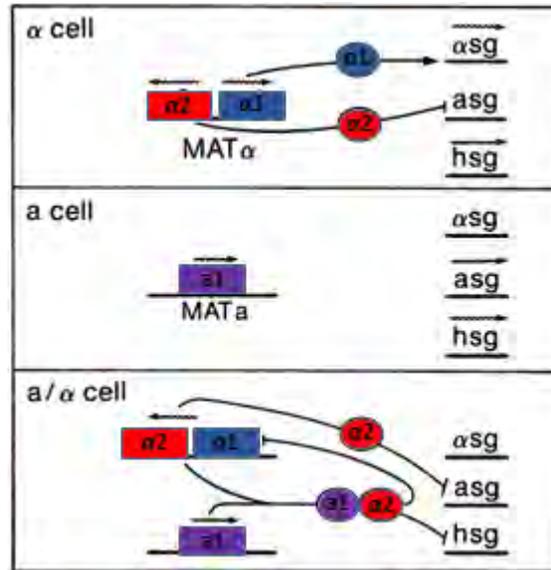


Figura 6. Regulación de los genes de apareamiento en *S. cerevisiae*. Las flechas onduladas indican transcripción. Las líneas con flechas indican activación de genes. Las líneas con extremos romos indican represión de genes. Genes y proteínas alfa1 ($\alpha 1$), alfa2 ($\alpha 2$) y **a1**. Modificado de (Herskowitz, 1988).

La cascada de señalización implica la activación de Ste20, lo cual permite la fosforilación de las cinasas Ste11, Ste7 y Fus3. Fus3 a su vez conduce a la activación de Ste12 que junto con Mcm1 activan genes específicos de apareamiento en respuesta a feromonas.

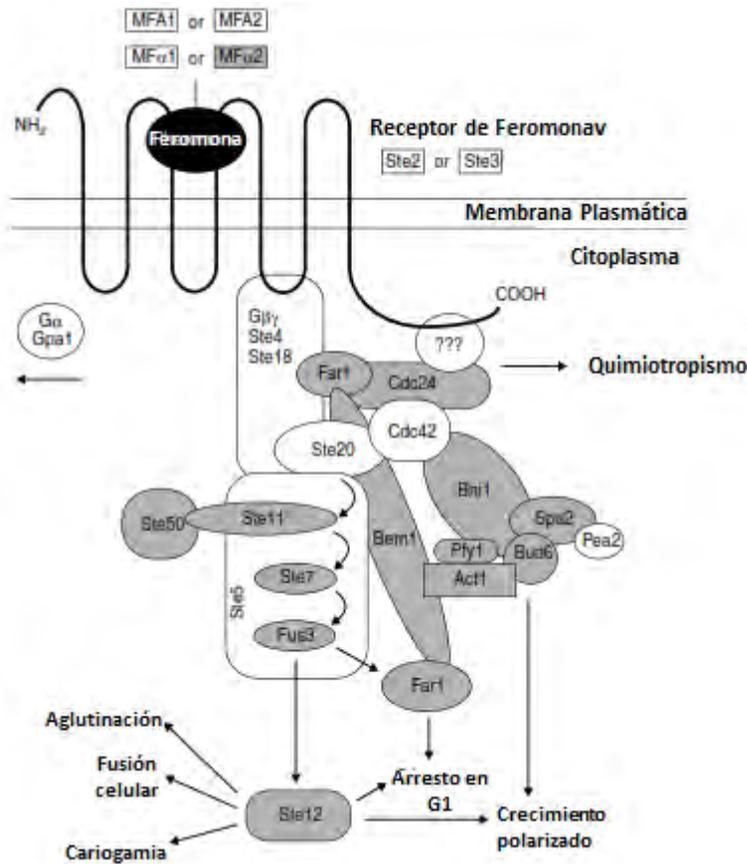


Figura 7. Vía de señalización en respuesta a feromona en *S. cerevisiae*. Esta vía se encuentra conservada en *C. glabrata*. Modificado de (Wong, Fares, Zimmermann, Butler, & Wolfe, 2003)

1.2.2 Apareamiento en otros hongos

Diversos sistemas genéticos han evolucionado para asegurar el mantenimiento de diferentes tipos sexuales. El apareamiento de dos células haploides involucra la expresión de genes necesarios para controlar la fusión celular y la cariogamia.

En *S. cerevisiae* las feromonas regulan el reconocimiento célula-célula pero en otros hongos como *S. pombe* y *U. maydis* también son necesarias para que se lleve a cabo la meiosis y para mantener el estado filamentoso, respectivamente (Bolker & Kahmann, 1993).

En *Schizosaccharomyces pombe* el tipo de apareamiento está determinado en los genes ubicados en el *locus mat1* (Kelly, Burke, Smith, Klar, & Beach, 1988). Los tipos

de apareamiento son plus (P) y minus (M). Cada tipo de apareamiento contiene dos genes: *mat1-Mc* y *mat1-Mm* en el *locus* M y *mat1-Pc* y *mat1-Pm* en el *locus* P. Los genes *mat1-Mc* y *mat1-Pc* son necesarios para la conjugación mientras que los genes *mat1-Mm* y *mat1-Pm* son esenciales para la meiosis. Los dos tipos celulares se aparean en carencia de nitrógeno y su apareamiento está mediado por feromonas que inducen la formación del tubo de conjugación y la fusión celular, a diferencia de *S. cerevisiae* donde inmediatamente se induce meiosis y esporulación. Aunque la función molecular concreta de los cuatro genes se desconoce, se cree que las proteínas *mat1-Mc* y *mat1-Pm* son reguladores de la transcripción por su similitud con proteínas de unión a DNA (Bolker & Kahmann, 1993; Hayles & Nurse, 1992).

En el ascomiceto filamentoso *Neurospora crassa* existen dos tipos de apareamiento: A y a. En este organismo los tipos de apareamiento opuesto no pueden fusionarse puesto que tienen funciones opuestas. Sin embargo cuando el hongo entra en su ciclo sexual, se forma un tricoginos ascogonio (una estructura de reproducción sexual femenina) de la cual emerge una prolongación llamada tricogina la cual es receptora de una célula de apareamiento masculina, que por lo general es un microconidio, aunque también se puede aceptar la información de un macroconio o de una hifa sexualmente compatible. La plasmogamia y posterior fusión nuclear es nuclear es mediada por feromonas (Bistis, 1996) que posteriormente sufre meiosis y forma ascosporas (Metzenberg & Glass, 1990). Los genes contenidos en el *locus* sexual de *N. crassa* son *mt A-1* y *mt a-1* que confieren identidad sexual celular y puesto que su secuencia aminoacídica es similar a los genes de apareamiento de otros hongos se sugiere que esos genes codifican para proteínas reguladoras del ciclo sexual aunque aún no se conoce el mecanismo.

El hongo patógeno oportunista *Cryptococcus neoformans* posee los tipos de apareamiento: *MAT_{alpha}* que es menos virulenta y *MAT_a* que es más virulenta. Después de la formación del dicarionte sigue la transición de levadura a hifa (Kwon-Chung, Edman, & Wickes, 1992).

El hongo basidiomiceto *Ustilago maydis* tiene un sistema de apareamiento tetrapolar

con los *loci* de apareamiento a y b. El *locus* a contiene los alelos a1 y a2 que controlan la fusión de células haploides; este *locus* es necesario para la fusión celular. El *locus* b codifica dos proteínas reguladoras del desarrollo sexual y del crecimiento filamentoso posterior a la formación del dicarion. Ambos *loci* controlan la transición de la forma levaduriforme de células haploides a hifas de células dicarióticas (Banuett, 1992).

El hongo patógeno *Aspergillus fumigatus* que hasta hace algunos años aún se consideraba un organismo asexual, ahora se sabe que posee una reproducción sexual. Posee los tipos de apareamiento *MAT-1* y *MAT-2*. El *locus MAT-2* contiene un gen que codifica para una proteína con el dominio HMG que en otras especies se requiere para la producción y detección de la feromona sexual. El *locus MAT-1* codifica una proteína con dominio alfa necesaria para la reproducción sexual (O'Gorman, Fuller, & Dyer, 2009).

El clado *Candida* posee *loci* de apareamiento con características distintivas cuyos componentes se ilustran en la Figura 7. El hecho de que las especies de *Candida* posean diferentes patrones de sexualidad y la composición de los *loci MTL* sea distinta sugiere que a lo largo de la evolución se han generado nuevos sistemas de regulación para el apareamiento en estos organismos. El ancestro común del *locus MAT* posee los genes **a1**, **a2**, alfa1 y alfa2. *S. cerevisiae* como ya se mostró anteriormente perdió el gen **a2**. Los genomas de las especies *C. guilliermondii*, *C. lusitaniae* y *D. hansenii* carecen del gen alfa2. *C. guilliermondii* carece además el gen **a1** (!!! INVALID CITATION !!!). Aun no se sabe cómo es posible el apareamiento en *C. lusitaniae* y *C. guilliermondii* sin la proteína alfa2 dado que el heterodímero **a1/alfa2** que se forma en *S. cerevisiae* es necesario para la meiosis. Dos especies diploides, *C. albicans* y *C. tropicalis* son capaces de reproducirse parasexual y asexualmente y poseen los cuatro genes de apareamiento. Mientras que *C. parapsilosis* sin reproducción sexual conocida, ha perdido los genes **a1**, alfa1 y alfa2. Por su parte *Lodderomyces elosgisporus* a pesar de no contar con genes de apareamiento es capaz de reproducirse sexualmente (Lee, Ni, Li, Shertz, & Heitman, 2010).

Candida albicans es un organismo cuya reproducción parasexual es regulada por los genes contenidos en los *loci MTL*: alfa1, alfa2, **a1** y **a2**. En éste organismo, al igual que en *S. cerevisiae*, se forma el heterodímero represor **a1/alfa2** que en células **a/alfa** regula el apareamiento pues reprime el cambio fenotípico de colonias blancas a opacas que es necesario para que se lleve a cabo el apareamiento (Miller & Johnson, 2002).

En la Tabla 1 se muestran los genes de apareamiento de las especies que conforman el clado *Candida*, si se aparean, el número de aminoácidos de cada gen de apareamiento, los genes que codifican para homeoproteínas, así como la similitud con las proteínas de *S. cerevisiae* (negro) y la similitud en la región homeodominio (rojo) (Barsoum, Martinez, & Astrom, 2010; Butler, 2010; Butler et al., 2004; Butler et al., 2009; Lee et al., 2010; Sherwood & Bennett, 2009).

Tabla 1. Genes de apareamiento de las especies del clado <i>Candida</i>										
ESPECIE	SEX	alfa1	alfa2	alfa3	alfa4	a1	a2	HD	SIMI	
<i>S. cerevisiae</i>	SI	 $\alpha 1$ 175 aa	 $\alpha 2$ 210 aa			 a1 124 aa		 $\alpha 2$		
<i>C. glabrata</i>	NO	 $\alpha 1$ 143 aa	 $\alpha 2$ 86 aa	 $\alpha 3$ 210 aa	 $\alpha 4$ 177 aa	 a1 130 aa		 a1	46% 59%	
								 $\alpha 2$	61% 66%	
									 $\alpha 3$	61% 66%
									 $\alpha 4$	58% 66%
<i>C. albicans</i>	SI	 $\alpha 1$ 193 aa	 $\alpha 2$ 186 aa			 a1 210 aa	 a2 201 aa	 a1	46% 69%	
								 $\alpha 2$	50% 89%	
<i>C. dubliniensis</i>	SI	 $\alpha 1$ 193 aa	 $\alpha 2$ 187 aa							
<i>C. tropicalis</i>	SI	 $\alpha 1$ 193 aa	 $\alpha 2$ 370 aa			 a1 849 aa	 a2 579 aa	 a1	7% 57%	
								 $\alpha 2$	18% 38%	
<i>D. hansenii</i>	SI	 $\alpha 1$ 212 aa				 a1 173 aa		 a1	58% 57%	
<i>C. lusitaniae</i>	SI	 $\alpha 1$ 155 aa								
<i>L. elongisporus</i>	SI									
<i>C. parapsilosis</i>	NO						 a2 201 aa			
<i>C. orthopsilosis</i>	NO					 a1 183 aa	 a2	 a1	40% 68%	
<i>K. lactis</i>	SI	 $\alpha 1$ 261 aa	 $\alpha 2$ 223 aa	 $\alpha 3$ 897 aa		 a1 288 aa	 a2 257 aa	 a1	26% 71%	
								 $\alpha 2$	53% 70%	

1.3 *Loci MTL* de *C. glabrata*

De forma interesante aunque *C. glabrata* carece de un ciclo sexual conocido, posee tres *loci* de apareamiento, al igual que *S. cerevisiae*. El *locus MTL1* se encuentra en el cromosoma B y puede contener información **a** o alfa. *MTL2* se encuentra a ~ 29.4 Kb del telómero izquierdo del cromosoma E y en ~97% de los aislados clínicos contiene información tipo **a** y el *locus MTL3* se encuentra a ~10.5 Kb del telómero izquierdo del cromosoma B y en ~97% de los aislados clínicos contienen información tipo alfa (Lavaniegos-Sobrino et al., 2009; Srikantha, Lachke, & Soll, 2003) (Fig. 8). Al comparar los *loci* de *C. glabrata* con los de *S. cerevisiae* podemos ver que existe concordancia en cuanto a la información de apareamiento que poseen. De tal forma que el *locus MTL1* corresponde al *locus MAT* puesto que puede contener información tipo **a** o alfa y se encuentra en un lugar interno del cromosoma B, además de un lado conserva la sintenia con *S. cerevisiae*. El *locus MTL2* corresponde al *locus HMR* con información **a** y el *locus MTL3* corresponde al *locus HML* con información alfa que también se encuentra silenciada, aunque en el mecanismo por el cual esta sujeto a silenciamiento es distinto y menos eficiente que el de *S. cerevisiae*. Los datos de nuestro laboratorio indican que tanto *MTL1* como *MTL2* son activos transcripcionalmente, mientras *MTL3* es el único *locus* que se encuentra silenciado, aunque no completamente (Ramirez-Zavaleta, Salas-Delgado, De Las Penas, & Castano, 2010).

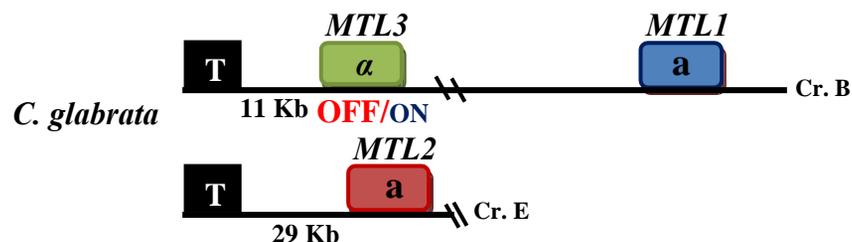


Figura 8. Configuración de los *loci* de apareamiento de *C. glabrata*.

Se muestra el tipo de información presente en cada *locus* y la distancia entre *MTL2* y *MTL3* a sus respectivos telómeros.

T = telómeros,

OFF = *Locus* transcripcionalmente silencioso.

Además de poseer *loci* de apareamiento en disposición similar a *S. cerevisiae*, *C. glabrata* posee en su genoma la mayoría de los genes ortólogos que en *S. cerevisiae* son necesarios para el apareamiento, meiosis y esporulación. En *C. glabrata* se conservan 234 genes ortólogos de 245 genes que están involucrados en apareamiento, meiosis y esporulación en *S. cerevisiae*, incluyendo los que están implicados en la vía de señalización de feromona alfa. De los 11 genes restantes, existen genes parálogos en *S. cerevisiae* cuya función está conservada y existen ortólogos de estos genes en *C. glabrata*. Los cinco genes ausentes en *C. glabrata* son: *MER1* y *REC104*, importantes en la recombinación meiótica; *SIR1*, necesario para el silenciamiento de los *loci HML* y *HMR*; *SPO20* y *SPO71* importantes para el proceso de esporulación.

En el caso de nuestra cepa silvestre (BG14) encontramos que el *locus MTL1* contiene información **a** y es activo transcripcionalmente, mientras el gen alfa2 del *locus MTL3*, que no está silenciado completamente, puede permitir la expresión de información alfa y **a** simultáneamente en algunas células que no tengan silenciado *MTL3*. Esto podría resultar en la formación del heterodímero **a1/alfa2**, similar al heterodímero presente tanto en *S. cerevisiae* como en *C. albicans*. Aunque se sabe que en *C. glabrata* estos genes se expresan, no se sabe si se produce la proteína y cuál es la función de cada uno.

2 Antecedentes directos

Datos generados en nuestro laboratorio indican que en *C. glabrata* el *locus MTL3* está sujeto a un silenciamiento que no es completo (!!! INVALID CITATION !!!), por lo que una población pequeña de células de *C. glabrata* pueden expresar información contenida en este *locus*, que en la mayoría de las cepas es información alfa. De esta manera es posible que en la cepa silvestre de nuestro laboratorio (BG14, (Cormack & Falkow, 1999)) se expresen ambos tipos de información de apareamiento: expresión y procesamiento de **a1** a partir del *locus MTL1* y en algunas células expresión de alfa1 y alfa2 a partir del *locus MTL3*.

También encontramos que en *C. glabrata* los genes ortólogos a los genes específicos del tipo de identidad sexual celular en *S. cerevisiae* (genes específicos de células **a** o **asg**; y genes específicos de células alfa o **alfasg**), no están regulados por la información contenida en los *loci MTL*, ya que todos los genes específicos del tipo de identidad sexual estudiados, se expresan independientemente del tipo de información presente en los *loci MTL*, e incluso se expresan también en cepas que no contienen ningún tipo de información de identidad del tipo celular sexual (una cepa triple mutante nula de los *loci MTL*).

Además, en un trabajo previo de nuestro grupo de trabajo hemos obtenido evidencia de que la información presente en los *loci MTL* de *C. glabrata* podría regular la respuesta a ciertos tipos de estrés. Encontramos que cepas que expresan de forma simultánea de los genes tipo **a** y tipo alfa son más sensibles a daño a DNA, respuesta a estrés osmótico y respuesta a estrés oxidante; mientras que las cepas que expresan sólo un tipo de información de apareamiento o ninguno eran más resistentes (Tesis de maestría, Patricia Yáñez Carrillo, 2010).

3 Planteamiento del problema

Hasta el momento no se conoce la función que tienen los genes de apareamiento en *C. glabrata*. Sin embargo, el hecho de que varios hongos patógenos de humanos (igual que *C. glabrata*) conserven la maquinaria genética para llevar a cabo la reproducción sexual y que de varios de ellos recientemente se haya encontrado evidencia de apareamiento, nos sugiere que *C. glabrata* podría contar con un ciclo sexual aún no descrito. También es posible que, como se ha encontrado en otros organismos, los genes de apareamiento hayan evolucionado hacia la regulación de vías diferentes a las que se conocen hasta el momento.

4 Hipótesis

La primera hipótesis de este trabajo es que los genes codificados en los *loci MTL* en *C. glabrata* son factores de transcripción que regulan un grupo de genes distintos de los que regulan en otros hongos y cuya regulación de expresión también difiere. Esta evolución ha sido importante para sobrevivir en el ambiente hostil en el hospedero mamífero.

La segunda hipótesis de trabajo es que las proteínas **a1** y alfa2 o alfa3 pueden interaccionar para formar un heterodímero similar al que se forma en *S. cerevisiae* y en *C. albicans*.

5 Estrategia

Con el fin de estudiar la regulación de la expresión de los genes de apareamiento y la posible interacción entre las proteínas codificadas por estos genes en *C. glabrata* hemos generado vectores de expresión que permitan construir fusiones traduccionales de los genes de estudio con fluoróforos o epítopos. Estos vectores de expresión nos permitirán generar cepas de *C. glabrata* en las que podamos estudiar el estado transcripcional/traduccional de los genes de estudio la localización/colocalización e interacción de las proteínas.

6 Objetivos

6.1 Objetivo general

Conocer la función y regulación de la expresión de los genes **a1**, alfa1, alfa2, alfa3 y alfa4 de *C. glabrata* con el uso de vectores de expresión diseñados para esta levadura.

6.2 Objetivos particulares

- a) Clonar y secuenciar los genes tipo “alfa2” de aislados clínicos que contienen información alfa en los *loci* *MTL1*, *MTL2* o *MTL3* para determinar cuál es el alelo que poseen en los distintos *loci*.
- b) Generar vectores de expresión para *C. glabrata* que permitan expresar fusiones traduccionales con fluoróforos y epítopos. Las fusiones traduccionales permitirán la expresión a partir del promotor nativo del gen de interés en versión replicativa o bien integrada en el genoma; así como sobreexpresarlo a partir de un plásmido replicativo.
- c) Generar fusiones traduccionales para determinar la transcripción, traducción y localización de la proteína.
- d) Determinar por RT-PCR la expresión transcripcional de las fusiones traduccionales.
- e) Evaluar la actividad de los promotores de los genes de apareamiento de *C. glabrata* en diferentes condiciones de crecimiento y en diferentes fondos genéticos.
- f) Determinar si los promotores de los genes de apareamiento de *C. glabrata* son activos en *S. cerevisiae* en diferentes condiciones.
- g) Evaluar si la expresión heteróloga los genes de apareamiento de *C. glabrata* pueden complementar para el apareamiento en mutantes *matΔ* de *S. cerevisiae*.

7 Materiales y métodos

7.1 Medios de cultivo y cepas de *Escherichia coli*

Se empleó la cepa de *E. coli* DH10 (Gibco BRL) como reservorios de plásmidos. Su almacenaje se realizó en 10% de glicerol a -80°C. Las bacterias se crecieron a 30°C en medio LB (extracto de levadura 5 g/L, triptona 10g/L, NaCl 5g/L) y 50 µg/ml de carbenicilina (A.G. Scientific. Inc. #C-1385) para selección. Todos los plásmidos se introdujeron a la cepa DH10 por electroporación como está descrito en (Dower, Miller, & Ragsdale, 1988). Para medio sólido LB se añadió 1.5% (w/v) de agar. Las purificaciones de gel y extracciones de plásmidos se realizaron con columnas Quiagen (Qiagen, QIAquick Gel Extraction Kit Cat. No. 28706; QIAprep Spin Miniprep Kit Cat. No. 27106). En la Tabla 2 se resumen las cepas de *E. coli* que se emplearon y se generaron en este trabajo.

Cepa	Genotipo	Referencia
H10B	F ⁻ <i>mcrA</i> Δ(<i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i>) φ80 <i>dlacZ</i> Δ <i>M15</i> Δ <i>lacX74 deoR recA1endA1</i> <i>araD139</i> Δ(<i>ara,leu</i>)7697 <i>galU galK</i> λ ⁻ <i>rpsL</i> <i>nupG</i>	(Calvin & Hanawalt, 1988)

La metodología empleada para generar los vectores descritos en la Tabla 3 se encuentra en el artículo que se anexa más adelante (Yáñez-Carrillo *et al*, 2015).

Vector	Número de cepa	Genotipo	Referencia
pMB11	1771	Vector de clonación replicativo <i>CgCEN/ARS</i> Cm ^R .	Colección del laboratorio
pRS416	1398	Vector de clonación replicativo. <i>ScCEN/ARS</i> <i>URA3 Amp</i> ^R .	(Sikorski & Hieter, 1989)

pGRB2.1	1381	Vector de clonación replicativo. <i>CgCEN/ARS</i> <i>^THIS3 URA3 Amp^R.</i>		(Zordan et al., 2013)
pMJ22	2650	Vector de clonación replicativo <i>CgCEN/ARS</i> <i>Cm^R NAT^R</i>		Colección del laboratorio
Vectores generados				
Vector	Cepa	Add Gene	Gen Bank	Genotipo relevante
Vectores sobreexpresantes				
pYC12	2785	63911	KP238570	Vector inicial sobreexpresante pGRB2.1::P _{TEF1} Amp ^R , URA3 ⁺
pYC16	2794	63913	KP238571	Vector receptor sobreexpresantes CFP pYC12::CFP Amp ^R , URA3 ⁺
pYC25	2847	63914	KP238572	Vector receptor sobreexpresante YFP pYC12::YFP Amp ^R , URA3 ⁺
pYC34	2891	63915	KP238573	Vector receptor sobreexpesante mCherry pYC12::mCherry Amp ^R , URA3 ⁺
pYC119	3099	63916	KP238587	Vector receptor sobreexpresante FLAG pYC12::FLAG Amp ^R , URA3 ⁺
pYC121	3103	63917	KP238588	Vector receptor sobreexpresante cMyc pYC12::cMyc Amp ^R , URA3 ⁺
Vectores replicativos				
pYC42	2942	63920	KP238574	Vector receptor replicativo mCherry pMJ22::mCherry Amp ^R , NAT ^R
pYC55	2972	63922	KP238581	Vector receptor replicativo YFP pMJ22::YFP Amp ^R , NAT ^R
pYC61	2978	63925	KP238583	Vector receptor replicativo CFP pMJ22::CFP Amp ^R , NAT ^R
pYC62	2979	63927	KP238584	Vector receptor replicativo HA pMJ22::HA Amp ^R , NAT ^R
pYC64	2981	63928	KP238585	Vector receptor replicativo FLAG pMJ22::FLAG Amp ^R , NAT ^R
pYC66	2983	63929	KP238586	Vector receptor replicativo cMyc pMJ22::cMyc Amp ^R , NAT ^R
Vectores integrativos				
pYC44	2944	63903	KP238575	Vector inicial integrativo pYC40::P _{CTA1} ::FRT Amp ^R NAT ^R URA3 ⁺

pYC46	2951	63904	KP238576	Vector receptor integrativo FLAG pYC44:FLAG Amp ^R NAT ^R URA3 ⁺
pYC48	2953	63905	KP238577	Vector receptor integrativo HA pYC44:HA Amp ^R NAT ^R URA3 ⁺
pYC50	2955	63906	KP238578	Vector receptor integrativo cMyc pYC44:cMyc Amp ^R NAT ^R URA3 ⁺
pYC52	2961	63908	KP238579	Vector receptor integrativo CFP pYC44:CFP Amp ^R NAT ^R URA3 ⁺
pYC54	2963	63909	KP238580	Vector receptor integrativo YFP pYC44:YFP Amp ^R NAT ^R URA3 ⁺
pYC56	2973	63910	KP238582	Vector receptor integrativo mCherry pYC44:mCherry Amp ^R NAT ^R URA3 ⁺
Vectores para secuenciar $\alpha 2$ en aislados clínicos				
Vector	Cepa	Genotipo		Referencia
pYC8	2775	pMB11:: <i>MTL2</i> MC16		Este trabajo
pYC9	2776	pMB11:: <i>MTL2</i> MC73		Este trabajo
Vector para generar mutante locus <i>MAT</i> <i>Saccharomyces cerevisiae</i>				
pAC5	3041	pYC44::5' <i>MAT</i> ::3' <i>MAT</i>		Este trabajo
Vectores para complementar para el apareamiento en <i>Saccharomyces cerevisiae</i>				
pYC172	3158	pRS416:: <i>CgMTL1α</i>		Este trabajo
pYC174	3177	pRS416:: <i>CgMTL1a</i>		Este trabajo
Vectores para análisis de promotores en <i>Candida glabrata</i>				
pYC177	3180	pYC55:: <i>P_{HIS3}</i>		Este trabajo
pYC181	3184	pYC55:: <i>P_{Cg$\alpha 2$}</i> :: <i>T_{CgHIS3}</i>		Este trabajo
pYC182	3185	pYC55:: <i>P_{Cg$\alpha 1$}</i> :: <i>T_{CgHIS3}</i>		Este trabajo
pYC184	3178	pYC55:: <i>P_{Cg$\alpha 1$}</i> :: <i>T_{CgHIS3}</i>		Este trabajo
Vectores para análisis de promotores en <i>Saccharomyces cerevisiae</i>				
pYC203	3242	pRS416:: <i>P_{Cga1}</i> :: <i>T_{CgHIS3}</i>		Este trabajo
pYC205	3244	pRS416:: <i>P_{Cga2}</i> :: <i>T_{CgHIS3}</i>		Este trabajo
pYC207	3246	pRS416:: <i>P_{Cg$\alpha 1$}</i> :: <i>T_{CgHIS3}</i>		Este trabajo
Vectores con fusiones traduccionales de los genes de apareamiento de <i>Candida glabrata</i>				

pYC100	3051	pYC64::P α 1:: α 1::T α 1	Este trabajo
pYC102	3053	pYC66::P α 1:: α 1::T α 1	Este trabajo
pYC105	3056	pYC42::P α 2:: α 2::T α 2	Este trabajo
pYC108	3059	pYC62::P α 2:: α 2::T α 2	Este trabajo
pYC118	3092	pYC16:: α 2	Este trabajo
pYC170	3156	pYC34:: α 1	Este trabajo
pYC187	3194	pYC34:: α 3	Este trabajo
pYC188	3195	pYC25:: α 1	Este trabajo
pYC190	3197	pYC16:: α 1	Este trabajo
pYC199	3226	pYC16:: α 4	Este trabajo
pYC201	3228	pYC25:: α 4	Este trabajo
Vectores con fusiones traduccionales de los genes <i>HIS3</i> y <i>TRP1</i>			
pYC122	3104	pYC16:: <i>HIS3</i>	Este trabajo
pYC124	3106	pYC25:: <i>HIS3</i>	Este trabajo
pYC126	3108	pYC34:: <i>HIS3</i>	Este trabajo
pYC128	3110	pYC119:: <i>HIS3</i>	Este trabajo
pYC130	3112	pYC121:: <i>HIS3</i>	Este trabajo
pYC132	3114	pYC25:: <i>TRP1</i>	Este trabajo
pYC134	3116	pYC34:: <i>TRP1</i>	Este trabajo
pYC136	3118	pYC119:: <i>TRP1</i>	Este trabajo
pYC138	3120	pYC121:: <i>TRP1</i>	Este trabajo
pYC153	3135	pYC139::P _{CgHIS3} ::T _{CgHIS3}	Este trabajo
pYC156	3138	pYC42::P _{CgHIS3} ::T _{CgHIS3}	Este trabajo
pYC159	3141	pYC62::P _{CgHIS3} ::T _{CgHIS3}	Este Trabajo
pYC161	3143	pYC66::P _{CgHIS3} ::T _{CgHIS3}	Este trabajo
pYC168	3152	pYC66::P _{CgHIS3} ::T _{CgHIS3}	Este trabajo
pYC186	3193	pYC61::P _{CgHIS3} ::T _{CgHIS3}	Este trabajo
pYC192	3204	pYC44 P _{CgHIS3} :: <i>HIS3</i> - MYC::T _{CgHIS3}	Este traabajo
pYC193	3213	pYC64::P _{CgHIS3} ::T _{CgHIS3}	Este trabajo
pYC197	3219	pYC46::P _{CgHIS3} ::T _{CgHIS3}	Este trabajo
pYC198	3225	pYC56::P _{CgHIS3} ::T _{CgHIS3}	Este trabajo

P = 5' UTR del gen que se indica.
 T = 3' UTR del gen que se indica.

Tabla 4. Primers utilizados en este trabajo		
Primer	Nombre	Secuencia
#1	pUC Fw	GCGATTAAGTTGGGTAACGCCA GGG
#2	pUC Rv	TATGTTGTGTGGAATTGTGAGCG GA
#351	CTA1@+290pb <i>Bgl</i> II Rv	GCGAGATCTCTATGAATTAAGAC ATAACATCAAGTCCC
#405	3HA TAG <i>Bam</i> HI/ <i>Bgl</i> II	GATCTTATACCCATACGATGTTCT CTGACTATGCGGGCTATCCGTAT GACGTCCCGGACTATGCAGGCT CCTATCCATATGACGTTCCAGAT TACGCTGCTCAGTGCTGAA
#406	3HA TAG <i>Bgl</i> II/ <i>Bam</i> HI	GATCTTCAGCACTGAGCAGCGTA ATCTGGAACGTCATATGGATAGG AGCCTGCATAGTCCGGGACGTC ATACGGATAGCCCGCATAGTCAG GAACATCGTATGGGTATAG
#465	CTA1@+1pb <i>Bam</i> HI FRT Fw	GCGGGATCCGAAGTTCCTATACT TTCTAGAGAATAGGAACTTCGTG CGCTTTTGAACCACGTAAAGTGC
#952	mCherry@1pb <i>Ba</i> <i>m</i> HI Fw	GCGGGATCCTAATGGTGAGCAA GGGCGAG
#954	mCherry@711pb <i>Bgl</i> II Rv	CGCAGATCTCTACTTGTACAGCT CGTCCATGC
#1097	NAT-FRT@+11 <i>Sal</i> I Fw	CATGTCGACCAGTACTGACAATA AAAAGATTCTTGTTTTTC
#1098	NAT-FRT@+287 Rv <i>Xho</i> I	CATCTCGAGGACGAAGTTCCTAT TCTCTAGAAAGTATAG
#1307	NAT-FRT@-391 Fw <i>Bam</i> HI	CTCGGATCCGCTTGCCCTCGTCCC CG
#1494	HIS3@-799 <i>Eco</i> RI Fw	TGAGAATTCAGCCAACAATAAAG GTTATGCGTCTG
#1495	HIS3@1aaa <i>Xba</i> I Fw	AAATCTAGAAAATGGCGTTTGTTA AGAGGGTTACGC
#1496	HIS3@607 <i>Bam</i> HI Rv	ATTAGGATCCCTGCTAGGACAGG GTTAGTGGATGG
#1497	HIS3@-743 <i>Sac</i> II Fw	CATACCGCGGTGCAGTTCTGCCA AG

#1498	3'UTR HIS3@+1 <i>Xba</i> I Fw	CAATCTAGAACACAGCCCACAGC TACCAC
#1499	3'UTR HIS3@+1 <i>Xho</i> I Fw	CAAACCTCGAGAACACAGCCCACA GCTACC
#1500	3'UTR HIS3@+527 <i>Xba</i> I Rv	TCTTCTAGACTTTGTTGCCCTTCA GGCATGG
#1501	3'UTR HIS3@+775 <i>Xho</i> I/ <i>Bsg</i> I Rv	AGTCTCGAGTGCAGCTGGAACGT GCTTGCCGTC
#1502	TRP1@-442 <i>Eco</i> RI Fw	TATGAATTCTTGGCCGCTATCCA CGC
#1503	TRP1@1aaa <i>Xba</i> I Fw	TGCTCTAGAAAATGTCATTTGATT CGTTACTCGACAAGAATG
#1504	TRP1@651 <i>Bam</i> HI Rv	GTTGGATCCCTTGTTTCTTTGCAT TTTGTACATATTTAATTATCTTGT CATTG
#1505	TRP1@-1033 <i>Sac</i> II/ <i>Bsg</i> I Fw	GATACCGCGGTGCAGGAGAGGA GGCGTTGCG

7.2 Medios de cultivo y cepas de levaduras

Las cepas de *C. glabrata* y *S. cerevisiae* se almacenaron en glicerol al 15%. Para su crecimiento se incubaron a 30°C en los siguientes medios de cultivo según fuera requerido en el experimento:

YPD: extracto de levadura 10 g/L, peptona 20 g/L, glucosa 20 g/L, uracilo 25 mg/L (Sigma Aldrich®). Cuando fue requerido se suplementó con nourseotricina 50 mg/mL.

YPG: extracto de levadura 10 g/L, peptona 20 g/L, glicerol 20 g/L, uracilo 25 mg/L (Sigma Aldrich®).

CAA: base nitrogenada de levadura 1.7 g/L, sulfato de amonio 5 g/L, glucosa 20 g/L.

YPD NaCl: extracto de levadura 10 g/L, peptona 20 g/L, glucosa 20 g/L, uracilo 25 mg/L (Sigma Aldrich®), NaCl 1.6M.

YPD H₂O₂: extracto de levadura 10 g/L, peptona 20 g/L, glucosa 20 g/L, uracilo 25 mg/L (Sigma Aldrich®), H₂O₂ 5 mM.

YNB (medio mínimo): base nitrogenada de levadura sin amonio 1.7g/L, acetato de amonio 5 g/L, sulfato de sodio 4.83g/L, glucosa 20g/L y uracilo 25mg/L.

YNB reducido en nitrógeno (YNBrN): base nitrogenada de levadura sin amonio 1.7g/L, sulfato de amonio 0.5g/L, sulfato de sodio 4.83g/L, glucosa 20g/L y uracilo 25mg/L.

YNB reducido en azufre (YNBrS): base nitrogenada de levadura sin amonio 1.7g/L, cloruro de amonio 4.046g/L, glucosa 20g/L y uracilo 25mg/L.

Spore: Acetato de potasio 10 g/L, extracto de levadura 1.3 g/L, agar 20 g/L.

En los medios sólidos se agregó agar 2% w/v.

PBS: NaCl 8g/L, KCl, 0.2 g/L, Na₂HPO₄ 1.44 g/L, KH₂PO₄ 0.24 g/L. Ajustado a pH 7.4 con HCl y aforar a 1 L con H₂O

Las cepas empleadas y generadas en este trabajo se muestran en la Tabla 5.

Tabla 5. Cepas de Levadura empleadas y construidas en este trabajo			
CEPA	PARENTAL	GENOTIPO	REF
Cepas de <i>Candida glabrata</i> utilizadas en este trabajo			
BG2	-	Clinical isolate (B Strain)	ormack & Falkow, 1999)
BG14	BG2	<i>ura3Δ::Tn903 G418^R</i>	Colección del laboratorio
CGM531	BG14	<i>mtl1Δ, mtl2Δ, mtl3Δ</i>	Colección del laboratorio
CGM707	CGM531	<i>Mtl1α, mtl2Δ, mtl3Δ</i>	Colección del laboratorio
CGM904	CGM531	<i>Mtl1a, mtl2Δ, mtl3Δ</i>	Colección del laboratorio
CGM1552	CGM531	<i>Mtl1a1::α2, mtl2Δ, mtl3Δ</i>	Colección del laboratorio
CGM1567	CGM531	<i>Mtl1a1::α3, mtl2Δ, mtl3Δ</i>	Colección del laboratorio
CGM1063	BG14	<i>his3Δ, NAT^R</i>	Colección del laboratorio
CGM99	BG14	<i>trp1Δ</i>	Colección del laboratorio
Cepas de <i>S. cerevisiae</i> utilizadas en este trabajo			
L20	W303	<i>MATα ura3-1, leu2-3, his3-11, 15, trp1-1(ade2-1) rDNA::ADE2</i>	Colección del laboratorio
L22	W303	<i>MATα (ura3-1), leu2-3, 112, his3-11, trp1-1, ade2-1 rDNA::URA3</i>	Colección del laboratorio
L13	L4263	Tester a <i>MATα lys9</i>	Colección del laboratorio

L14	L4267	Tester α MAT α lys9	Colección del laboratorio
L149	L22	MAT α <i>ura3-1, leu2-3, 112, his3-11, trp1-1, ade2-1</i>	Este trabajo
Cepas de <i>C. glabrata</i> generadas en este trabajo			
Controles positivos de fluorescencia			
CGM1570	CGM1	pP _{ScTEF1} ::CFP	Este trabajo
CGM1576	CGM1	pP _{ScTEF1}	Este trabajo
CGM1578	CGM1	pP _{ScTEF1} ::YFP	Este trabajo
CGM1623	CGM1	pP _{ScTEF1} ::mCherry	Este trabajo
Cepas con fusiones traduccionales con los genes de apareamiento de <i>C. glabrata</i>			
CGM1808	CGM531	pP α_1 :: α_1 -cMyc::T α_1	Este trabajo
CGM1810	CGM531	pP α_2 :: α_2 -mCherry::T α_2	Este trabajo
CGM1812	CGM531	pP α_1 ::: α_1 -mCherry::T α_1	Este trabajo
CGM1814	CGM531	pP α_2 ::: α_2 -HA::T α_2	Este trabajo
CGM1847	CGM531	pP _{ScTEF1} :: α_2 -CFP::T _{HIS3}	Este trabajo
CGM1971	CGM531	pP _{ScTEF1} :: α_1 -mCherry:: T _{CgHIS3}	Este trabajo
CGM2007	CGM531	pP _{ScTEF1} :: α_1 -CFP:: T _{CgHIS3}	Este trabajo
CGM2009	CGM531	pP _{ScTEF1} :: α_1 -YFP:: T _{CgHIS3}	Este trabajo
CGM2090	CGM531	pP _{ScTEF1} :: α_3 - mCherry::T _{CgHIS3}	Este trabajo
Cepas con fusiones transcripcionales para análisis de promotores de los genes de apareamiento de <i>C. glabrata</i>			
CGM1983	CGM1	pP _{Cgα_2} ::YFP:: T _{CgHIS3}	Este trabajo
CGM1981	CGM1	pP _{Cgα_1} ::YFP:: T _{Cg HIS3}	Este trabajo
CGM1989	CGM1	pP _{Cgα_1} ::YFP:: T _{CgHIS3}	Este trabajo
CGM1973	CGM1	pYFP::T _{CgHIS3}	Este trabajo

CGM1977	CGM531	pP _{Cga2} ::YFP::T _{CgHIS3}	Este trabajo
CGM1979	CGM531	pP _{Cga1} ::YFP::T _{CgHIS3}	Este trabajo
CGM1985	CGM531	pP _{Cga1} ::YFP::T _{CgHIS3}	Este trabajo
CGM1975	CGM531	pYFP::T _{CgHIS3}	Este trabajo
CGM1991	CGM904	pP _{Cga2} ::YFP::T _{CgHIS3}	Este trabajo
CGM1993	CGM904	pP _{Cga1} ::YFP::T _{CgHIS3}	Este trabajo
CGM1997	CGM904	pP _{Cga1} ::YFP::T _{CgHIS3}	Este trabajo
CGM1995	CGM904	pYFP::T _{CgHIS3}	Este trabajo
CGM1999	CGM707	pP _{Cga2} ::YFP::T _{CgHIS3}	Este trabajo
CGM2011	CGM707	pP _{Cga1} ::YFP::T _{CgHIS3}	Este trabajo
CGM2003	CGM707	pP _{Cga1} ::YFP::T _{CgHIS3}	Este trabajo
CGM2001	CGM707	pYFP::T _{CgHIS3}	Este trabajo
Cepas con fusiones traduccionales con los genes <i>HIS3</i> y <i>TRP1</i>			
<i>TRP1</i>			
CGM1849	CGM1	pP _{ScTEF1} ::FLAG::T _{CgHIS3}	Este trabajo
CGM1861	CGM99	pP _{ScTEF1} :: <i>TRP1</i> -FLAG::T _{CgHIS3}	Este trabajo
CGM1862	CGM99	pP _{ScTEF1} :: <i>TRP1</i> -YFP::T _{CgHIS3g}	Este trabajo
CGM1863	CGM99	pP _{ScTEF1} :: <i>TRP1</i> -mCherry::T _{CgHIS3}	Este trabajo
CGM1865	CGM1063	pP _{ScTEF1} :: <i>HIS3</i> -CFP::T _{CgHIS3}	Este trabajo
CGM1867	CGM1063	pP _{ScTEF1} :: <i>HIS3</i> -YFP::T _{CgHIS3}	Este trabajo
CGM1869	CGM1063	pP _{ScTEF1} :: <i>HIS3</i> -cMyc::T _{CgHIS3}	Este trabajo
CGM1871	CGM1063	pP _{ScTEF1} :: <i>HIS3</i> -mCherry::T _{CgHIS3}	Este trabajo
CGM1872	CGM1	pP _{ScTEF1} :: <i>HIS3</i> -FLAG::T _{CgHIS3}	Este trabajo
CGM1874	CGM1	pP _{ScTEF1} :: <i>HIS3</i> -mCherry::T _{CgHIS3}	Este trabajo
CGM1876	CGM1	pP _{ScTEF1} :: <i>HIS3</i> -YFP::T _{CgHIS3}	Este trabajo
CGM1878	CGM1	pP _{ScTEF1} :: <i>TRP1</i> -FLAG::T _{CgHIS3}	Este trabajo

CGM1879	CGM1	pP _{ScTEF1} ::TRP1-cMyc::T _{CgHIS3}	Este trabajo
CGM1881	CGM1	pP _{ScTEF1} ::TRP1-YFP::T _{CgHIS3}	Este trabajo
CGM1883	CGM1	pP _{ScTEF1} ::TRP1-mCherry::T _{CgHIS3}	Este trabajo
CGM1893	CGM99	pP _{ScTEF1} ::TRP1-cMyc::T _{CgHIS3}	Este trabajo
CGM1896	CGM1	pP _{ScTEF1} ::HIS3-cMyc::T _{CgHIS3}	Este trabajo
CGM1898	CGM1	pP _{ScTEF1} ::HIS3-CFP::T _{CgHIS3}	Este trabajo
CGM1901	CGM1063	pP _{ScTEF1} ::HIS3-FLAG::T _{CgHIS3}	Este trabajo
CGM1911	CGM1	pP _{CgHIS3} ::HIS3-cMyc::T _{CgHIS3}	Este trabajo
CGM1913	CGM1	pP _{CgHIS3} ::HIS3-mCherry::T _{CgHIS3}	Este trabajo
CGM1987	CGM1	pP _{CgHIS3} ::HIS3-CFP::T _{CgHIS3}	Este trabajo
CGM2020	CGM1063	<i>his3</i> Δ, NAT ^s	Este trabajo
CGM2084	CGM2020	pP _{CgHIS3} ::HIS3-mCherry::T _{CgHIS3}	Este trabajo
CGM2086	CGM2020	pP _{CgHIS3} ::HIS3-cMyc::T _{CgHIS3}	Este trabajo
CGM2088	CGM2020	pP _{CgHIS3} ::HIS3-CFP::T _{CgHIS3}	Este trabajo
CGM2240	CGM1	pP _{CgHIS3} ::HIS3-FLAG::T _{CgHIS3}	Este trabajo
CGM2242	CGM2020	pP _{CgHIS3} ::HIS3-FLAG::T _{CgHIS3}	Este trabajo
CGM2267	CGM2020	pP _{CgHIS3} ::HIS3-cMyc::T _{CgHIS3} Integrado y resuelto en el cromosoma	Este trabajo
Cepas de <i>S. cerevisiae</i> generadas en este trabajo			
L150	L20	<i>MAT</i> α <i>ura3-1, leu2-3, his3-11, 15, trp1-1(ade2-1)</i> rDNA::ADE2 <i>mat</i> Δ NAT ^R	Este trabajo
Cepas de <i>S. cerevisiae</i> para complementar para el apareamiento			

L138	L20	<i>MATα</i> <i>ura3-1,leu2-3, his3-11,15,trp1-1(ade2-1)</i> rDNA:: <i>ADE2</i> pRS416	Este trabajo
L140	L20	<i>MATα</i> <i>ura3-1,leu2-3, his3-11,15,trp1-1(ade2-1)</i> rDNA:: <i>ADE2</i> pRS416:: <i>MTL1</i> alfa	Este trabajo
L142	L20	<i>MATα</i> <i>ura3-1,leu2-3, his3-11,15,trp1-1(ade2-1)</i> rDNA:: <i>ADE2</i> pRS416:: <i>MTL1</i> a	Este trabajo
L144	L22	<i>MATα</i> <i>ura3-1,leu2-3, 112, his3-11,trp1-1,ade2-1</i> pRS416:: <i>MTL1</i> alfa	Este trabajo
L145	L22	<i>MATα</i> <i>ura3-1,leu2-3, 112, his3-11,trp1-1,ade2-1</i> pRS416	Este trabajo
L147	L22	<i>MATα</i> <i>ura3-1,leu2-3, 112, his3-11,trp1-1,ade2-1</i> pRS416:: <i>MTL1</i> a	Este trabajo
Cepas de <i>S. cerevisiae</i> para análisis de promotores de <i>C. glabrata</i>			
L151	L20	<i>MATα</i> <i>ura3-1,leu2-3, his3-11,15,trp1-1(ade2-1)</i> rDNA:: <i>ADE2</i> pRS416::P _{Cgα1} ::T _{CgHIS3}	Este trabajo
L153	L20	<i>MATα</i> <i>ura3-1,leu2-3, his3-11,15,trp1-1(ade2-1)</i> rDNA:: <i>ADE2</i> pRS416::P _{Cgα2} ::T _{CgHIS3}	Este trabajo
L138	L20	<i>MATα</i> <i>ura3-1,leu2-3, his3-11,15,trp1-1(ade2-1)</i> rDNA:: <i>ADE2</i> pRS416	Este trabajo
L168	L20	<i>MATα</i> <i>ura3-1,leu2-3, his3-11,15,trp1-1(ade2-1)</i> rDNA:: <i>ADE2</i> pRS416::P _{Cgα1} ::T _{CgHIS3}	Este trabajo

L145	L22	<i>MATa ura3-1,leu2-3,112, his3-11,trp1-1,ade2-1</i> pRS416	Este trabajo
L164	L22	<i>MATa ura3-1,leu2-3,112, his3-11,trp1-1,ade2-1</i> pRS416:: P _{Cg} a1 ::T _{CgHIS3}	Este trabajo
L162	L22	<i>MATa ura3-1,leu2-3,112, his3-11,trp1-1,ade2-1</i> pRS416:: P _{Cg} a2 ::T _{CgHIS3}	Este trabajo
L166	L22	<i>MATa ura3-1,leu2-3,112, his3-11,trp1-1,ade2-1</i> pRS416:: P _{Cg} a1 ::T _{CgHIS3}	Este trabajo
L154	L22	<i>MATa ura3-1,leu2-3,112, his3-11,trp1-1,ade2-1</i> pRS416	Este trabajo
L156	L22	<i>MATa ura3-1,leu2-3,112, his3-11,trp1-1,ade2-1</i> pRS416:: P _{Cg} a1 ::T _{CgHIS3}	Este trabajo
L158	L22	<i>MATa ura3-1,leu2-3,112, his3-11,trp1-1,ade2-1</i> pRS416:: P _{Cg} a2 ::T _{CgHIS3}	Este trabajo
L160	L22	<i>MATa ura3-1,leu2-3,112, his3-11,trp1-1,ade2-1</i> pRS416:: P _{Cg} a1 ::T _{CgHIS3}	Este trabajo

P = 5' UTR del gen que se indica.

T = 3' UTR del gen que se indica.

7.3 Transformación de levaduras

Para realizar las transformaciones en *C. glabrata* y *S. cerevisiae* usamos el método de transformación con acetato de litio (LiAc) (Gietz, St Jean, Woods, & Schiestl, 1992), en el cual crecimos las células en YPD líquido hasta llegar a una densidad óptica (OD) de 1.0, las cosechamos, lavamos con agua estéril y después con 1ml de LiAc

100 mM hasta resuspender en 300 μ l LiAc 100 mM. Tomamos alícuotas de esta suspensión celular y adicionamos una mezcla de 240 μ l de PEG al 50% (PM 4000), 36 μ L de LiAc 1 M, 50 μ g de ADN de esperma de salmón desnaturalizado por calor y aproximadamente 350 – 500 ng del fragmento digerido o DNA plasmídico plásmido según sea el caso. Incubamos esta mezcla a 30°C por 45 min, agregamos 43 μ l de DMSO y dimos un choque térmico a 42°C por 15 min. Estas células las centrifugamos, las resuspendimos en 900 μ l de agua estéril y plaqueamos alícuotas de 300 μ l en cajas con medio CAA. Si se plaquea en medio con antibiótico se resuspende las células en 1 ml de YPD, se incuba por 4 horas a 30°C y se procede a plaquear en el medio con el antibiótico. 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 en caso de integración genómica y las colonias positivas se sembraron por estría nuevamente en YPG para descartar las colonias con una función mitocondrial afectada.

7.4 Microscopía de fluorescencia

Para visualizar las cepas de levadura en el microscopio se incubaron cultivos líquidos por 48 h a 30°C en el medio apropiado. Los tiempos de excitación que se emplearon para cada fluoróforo fueron: mCherry 850 ms, YFP 750 ms, CFP 900 ms y DAPI 120 ms. Para visualizar las fusiones con su propio promotor y terminador en versión replicativa empleamos un mayor tiempo de excitación (1500 ms). Las células se visualizaron con el equipo Zeiss Axio Vision Blue edition.

7.5 Tinción con DAPI

La tinción de DNA nuclear se realizó con DAPI (4', 6'-diamidino-2-phenylindole) como ya se ha descrito en 2004 (Kaur, Castano, & Cormack, 2004). Se incubaron cultivos líquidos hasta fase estacionaria (48 h), 1mL de cultivo se lavó con PBS. Las células

se resuspendieron en 1 ml de p-formaldehído 4% y se incubó a temperatura ambiente por 2 h. Se lavaron las células con PBS tres veces y se resuspendieron en 1 mL of PBS. Se tomó 100 μ L de una suspensión celular y se incubó con 1 μ L de DAPI (0.2 mg/mL) por 1 h. Se lavaron las células con PBS y se visualizaron por microscopía de fluorescencia en un equipo Zeiss Axio Vision Blue edition.

7.6 Western blot

Para inmunodetectar las fusiones con epítomos las levaduras se incubaron a 30°C hasta fase estacionaria en el medio apropiado. Los extractos celulares se realizaron como se ha descrito anteriormente (Orta-Zavalza et al., 2013): se colectaron las células y se resuspendieron en 500 μ L de buffer de lisis (HEPES-KOH 45 mM [Promega®], pH 7.5], acetato de potasio 400 mM, EDTA 1 mM, Nonidet P-40 substitute 0.5% [Fluka Biochemica®], DTT 1 mM, glicerol 10%, PMSF 1 mM inhibidor de proteasas y una tableta cOMplete ULTRA Tablet Mini/10mL (EASYpack [ROCHE®]). Se añadieron 100 μ L de perlas de zirconia (BioSpec®) y se lisaron las células con el Fast Prep. El lisado se centrifugó a 15,000 rpm por 40 min a 4°C. El sobrenadante de cada muestra se colectó y se cuantificó la proteína del extracto por el ensayo de Bradford (Fermentas®). Los extractos protéicos se analizaron por electroforesis en un gel SDS-PAGE al 12%, se transfirió a una membrana PVDF (BIO-RAD®) y se incubó ya sea con el anticuerpo de ratón anti anti-cMyc (dilución 1:10, Millipore®) o anti-FLAG (Sigma®). Se lavaron las membranas con amortiguador TRIS salino con leche y Tween20®) y se retaron con el anticuerpo secundario de cabra anti-mouse conjugado a la peroxidasa (Amersham®) por una hora con agitación constante a temperatura ambiente. Se detectó la señal con reactivos ECL de quimioluminiscencia (Amersham®) y películas de revelado X-OMAT (Kodak®).

7.7 Citometría de flujo

La actividad de los promotores se evaluó en el equipo FACScalibur. Se incubaron

cultivos en medio líquido por 48 h. Se mide la OD₆₀₀ y se inocula el medio requerido nuevo para una OD₆₀₀=0.5. Para leer en el citómetro en las primeras mediciones se toma directamente del tubo recién inoculado y se agrega en el tubo para medir en el citómetro, en horas posteriores, cuando la OD aumenta se realizan diluciones para que OD se encuentre en el intervalo de 0.2-2.0. El aparato grafica el número de eventos vs la media geométrica de las unidades de fluorescencia. Se empleó como control cada fondo genético transformado con el vector vacío, este valor se establece con un valor de 10 de media geométrica en cada grupo de mediciones (por día, por hora, por medio). Para determinar la actividad del promotor; el valor de la fluorescencia de cada cepa con la fusión transcripcional en estudio se le resta la media geométrica de fluorescencia de cada cepa con el vector vacío. La represión se obtiene al dividir el la actividad de un promotor determinado en fase logarítmica entre la actividad de ese mismo promotor en tiempo 0 (T0) que corresponde a fase estacionaria en medio

rico. Los cálculos se realizaron como se muestran a continuación:

$$Ap = Mge - Mgc$$

Ap = Actividad del promotor

Mge = Media geométrica de estudio

Mgc = Media geométrica del control

$$Rep = \frac{ApFl}{ApT0}$$

Rep = Veces de represión

ApFl = Actividad del promotor en fase logarítmica

ApT0 = Actividad del promotor en tiempo 0

7.8 Complementación para el apareamiento en *S. cerevisiae*

Se crecen en medio sólido las cepas que se desee cruzar hasta formar un tapiz celular de blastoconidios. Se toma de cada tapiz células suficientes para mezclarlas en

una nueva placa con medio sólido rico y se incuba por 48 horas. Se toma una asada de cada cruce y se inocula en medio rico YPD, se incuba por 24 horas. Se ajusta a OD de

0.5 y se realizan diluciones logarítmicas seriadas en medio mínimo de cada cruce. Se incuban por 48 horas a 30°C. Las cruces celulares que se hayan apareado serán capaces de crecer en medio mínimo sólido. El medio mínimo es un medio carente de aminoácidos en el cual no pueden crecer las cepas que contengan auxotrofías, por lo que las células que logren crecer en este medio serán producto del apareamiento de las cepas parentales que contienen auxotrofías.

7 Resultados

8. 1 *C. glabrata* posee 2 variantes más del gen alfa2 (alfa3 y alfa4)

A diferencia de *S. cerevisiae* donde la información tipo **a** y tipo alfa que se encuentra en los *loci* *HMR*, *HML* y *MAT* es idéntica y la información alfa está codificada por los genes alfa1 y alfa2; en *C. glabrata* el *locus* *MTL1* alfa posee los genes alfa1 y alfa2, mientras que el *locus* *MTL3* posee los genes alfa1 y alfa3. Nuestra primera pregunta fue si el gen alfa3 era una característica exclusiva de nuestra cepa de laboratorio o si en aislados clínicos de *C. glabrata* el *locus* *MTL3* también contenía el gen alfa3 y en el *locus* *MTL1* el gen alfa2.

Al secuenciar los genes “alfa2” de distintos aislados clínicos, encontramos que en tres aislados (AC25, AC29 y AC73) con información alfa en el *locus* *MTL3* posee el gen alfa3 (y no alfa2) y en los dos únicos aislados (AC16 y AC27) con información alfa en el *locus* *MTL2*, poseen un alelo diferente a alfa2 y alfa3. A este segundo alelo diferente lo llamamos alfa4. (Fig.9)



Figura 9. Genes de información alfa contenidos en los *loci* *MTL* de cinco aislados clínicos de *C. glabrata*.

Se presenta información de apareamiento contenida en cada *loci* (*MTL1/MTL2/MTL3*). Los aislados clínicos (AC)

25, 29 y 73 poseen el alelo alfa3 en el *locus* *MTL3* y el alelo alfa2 en el *locus* *MTL1* (excepto en el AC29 que posee información **a** en este *locus*). Mientras que los aislados 16 y 27 poseen el alelo alfa4 en el *locus* *MTL2*.

Los resultados que obtuvimos nos indican que en la naturaleza, *C. glabrata* presenta tres tipos de genes alfa2 según el *locus* en donde se encuentre la información tipo alfa: alfa2 en el *locus* *MTL1*, alfa3 en el *locus* *MTL3* y alfa4 en el *locus* *MTL2*, los cuales no son una característica de las cepas de laboratorio BG14 y CBS138 sino que se encuentran presentes en todos los aislados que secuenciamos así como en secuencias del *locus* *MTL3* depositadas en el GenBank. (Figura 10). Los tres genes

conservan la región homeodominio de unión a DNA descrita anteriormente.

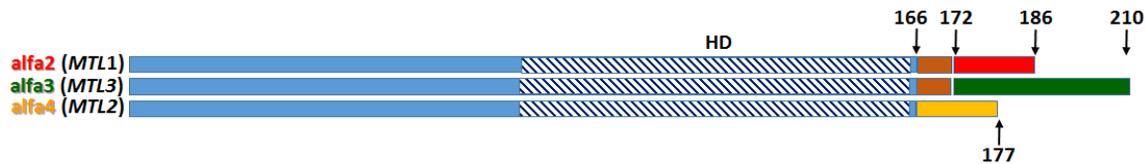


Figura 10. Secuencia en aminoácidos de los genes alfa.

Secuencia en aminoácidos de los tres genes alfa. En la zona azul claro se muestra la longitud idéntica en secuencia entre los tres genes, en la región naranja la secuencia compartida sólo entre *alfa2* y *alfa3*. La zona roja es específica de *alfa2*, la zona verde es específica de *alfa3* y la zona amarilla es específica de *alfa4*. Los 60 amino ácidos que conforman el homeodominio (HD) están indicados por la parte rellena con rayas inclinadas. El ORF de cada gen tiene una longitud en nucleótidos de 559 nt para *alfa2*, 631 nt para *alfa3* y 532 nt para *alfa4*.

8.2 Construcción de vectores de expresión para *C. glabrata*

Debido a la cercanía filogenética con el modelo de estudio *S. cerevisiae*, *C. glabrata* resulta ser un organismo cuyo estudio resulta accesible pues es posible emplear con este organismo los métodos de biología molecular que se han diseñado para la levadura *S. cerevisiae*. Sin embargo no existen suficientes vectores disponibles para generar proteínas de fusión que nos permitan estudiar la regulación traduccional y transcripcional de cualquier gen codificante, interacciones proteína-proteína y localización celular de las proteínas.

En biología molecular es importante contar con un sistema de selección en levadura que sea claro, que no permita un crecimiento de fondo y sea consistente para poder asegurar que las colonias transformantes posean la información deseada. En nuestro grupo de trabajo hemos utilizado higromicina para seleccionar, sin embargo es un antibiótico que permite un considerable crecimiento de fondo y algunos aislados clínicos de *C. glabrata* son claramente resistentes a altas concentraciones de higromicina aún en ausencia del gen de resistencia *hph*. Por lo cual hemos decidido emplear un mejor marcador de selección como es el caso de nourseotricina para el cual las cepas que no contienen el casete de selección son completamente sensibles y nos permite realiza una mejor selección.

Por lo anterior generamos vectores de expresión que nos permitieran generar fusiones

Expresión y localización intracelular de las proteínas codificadas en los *loci* de apareamiento de *C. glabrata* traduccionales al 3' de cualquier gen de *C. glabrata* con tres fluoróforos o tres epítomos de manera independiente. Estas fusiones pueden expresarse a partir de su propio promotor o sobreexpresarlo con un promotor fuerte del gen *TEF1* de *S. cerevisiae* ($P_{S.cTEF1}$), en versiones episomal e integrada en el genoma de la levadura (Yanez-Carrillo, et al, 2015 aceptado).

En el artículo que a continuación se muestra se describe la generación de los vectores replicativos, sobreexpresantes e integrativos y las características de cada vector. Este artículo puede ser consultado en la siguiente liga: www.elsevier.com.

1 Expression vectors for C-terminal fusions with fluorescent proteins and epitope tags in *Candida*
2 *glabrata*

3

4 Patricia Yáñez-Carrillo^a, Emmanuel Orta-Zavalza^a, Guadalupe Gutiérrez-Escobedo^a, Araceli Patrón-
5 Soberano^a, Alejandro De Las Peñas^a, Irene Castaño^a, *

6

7 ^a IPICYT. Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica.

8 Camino a la Presa San José # 2055 Lomas 4a sección. División de Biología Molecular

9 Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica. San Luis Potosí, San Luis Potosí

10 78216, México

11

12

13 * Corresponding author

14 Email: icastano@ipicyt.edu.mx

15 Mailing address: Camino a la Presa San José # 2055. Lomas 4a Sección, San Luis Potosí, SLP.

16 78216, México.

17 División de Biología Molecular

18 IPICYT. Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica. San Luis Potosí, San Luis Potosí

19 Phone (52) 444-834-2038

20 Fax: (52) 444-834-2010

21

22

23 Running Title: Vectors for tag fusions in *C. glabrata*

24 **ABSTRACT**

25 *Candida glabrata* is a haploid yeast considered the second most common of the *Candida* species found
26 in nosocomial infections, accounting for approximately 18% of candidemias worldwide. Even though
27 molecular biology methods are easily adapted to study this organism, there are not enough vectors that
28 will allow probing the transcriptional and translational activity of any gene of interest in *C. glabrata*. In
29 this work we have generated a set of expression vectors to systematically tag any gene of interest at the
30 carboxy-terminus with three different fluorophores (CFP, YFP and mCherry) or three epitopes (HA,
31 FLAG or cMyc) independently. This system offers the possibility to generate translational fusions in
32 three versions: under the gene's own promoter integrated in its native locus in genome, on a replicative
33 plasmid under its own promoter, or on a replicative plasmid under a strong promoter to overexpress the
34 fusions. The expression of these translational fusions will allow determining the transcriptional and
35 translational activity of the gene of interest as well as the intracellular localization of the protein. We
36 have tested these expression vectors with two biosynthetic genes, *HIS3* and *TRP1*. We detected
37 fluorescence under the microscope and we were able to immunodetect the fusions using the three
38 different versions of the system. These vectors permit coexpression of several different fusions
39 simultaneously in the same cell, which will allow determining protein-protein and protein-DNA
40 interactions. This set of vectors adds a new toolbox to study expression and protein interactions in the
41 fungal pathogen *C. glabrata*.

42

43 **Keywords:** *Candida glabrata*; translational fusion; fluorescent tag; epitope tag; overexpression vector;
44 integrative vector.

45

46

47

48

8.3 Fusiones traduccionales de los genes de apareamiento de *C. glabrata*

Una vez que generamos el sistema de vectores de expresión y lo validamos, lo empleamos para desarrollar fusiones traduccionales que nos permitieran estudiar los genes de apareamiento alfa1, alfa2, alfa3 y alfa4 de *C. glabrata*. Construimos fusiones traduccionales replicativas con el promotor nativo y sobreexpresantes (Tabla 6).

Tabla 6. Fusiones traduccionales de genes de apareamiento de <i>C. glabrata</i> con fluoróforos y epítopos						
Fusiones sobreexpresantes						
	CHERRY	YFP	CFP	HA	FLAG	MYC
alfa1	●	●	●			
alfa2			●			
alfa3	●					
alfa4		●	●			
Fusiones episomales bajo su propio promotor						
alfa1	●					●
alfa2	●			●		

Se indican con punto rojo las fusiones traduccionales que ya se han generado. Los recuadros vacíos indican las fusiones que faltan generar.

8.3.1 Fusiones con su propio promotor en versión replicativa

Por datos de nuestro grupo de trabajo sabemos que los genes **a1**, alfa1 y alfa2 de *C. glabrata* se expresan normalmente en fase estacionaria (48 hrs). Sin embargo, para confirmar que los genes involucrados en las fusiones traduccionales se transcriben normalmente realizamos un RT-PCR donde logramos detectar transcrito de todos las fusiones traduccionales en su versión replicativa (Fig. 11).

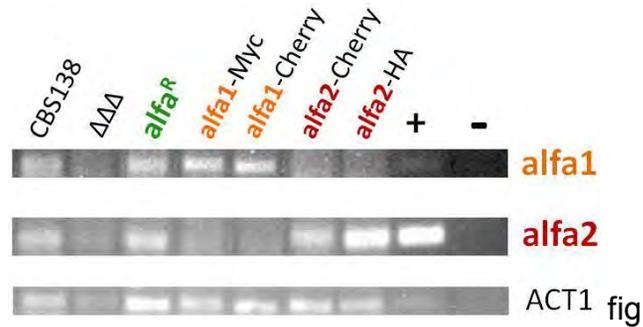


Figura 11. Expresión transcripcional de las fusiones traduccionales bajo su propio promotor

La cepa secuenciada CBS138 y la cepa reconstituída con información alfa en el locus *MTL1* (alfa^R) poseen los genes *alfa1* y *alfa2*. La cepa triple mutante nula ($\Delta\Delta\Delta$) no posee información de apareamiento. La cepa triple mutante que posee cualquiera de las fusiones traduccionales de los genes alfa expresa transcrito del gen con el cual se transformó. Los plásmidos que contienen las cepas analizadas son los siguientes: *alfa1*-Myc, pYC102), *alfa1*-Cherry (pYC100), *alfa2*-Cherry (pYC105), *alfa2*-HA, (pYC108).

Al observar bajo el microscopio de fluorescencia las cepas que contienen plásmidos con las fusiones con fluoróforos, detectamos que la señal de fluorescencia colocaliza con la tinción de DAPI que corresponde al núcleo celular. Esto ocurre tanto para *alfa1* como para *alfa2* (Fig. 12).

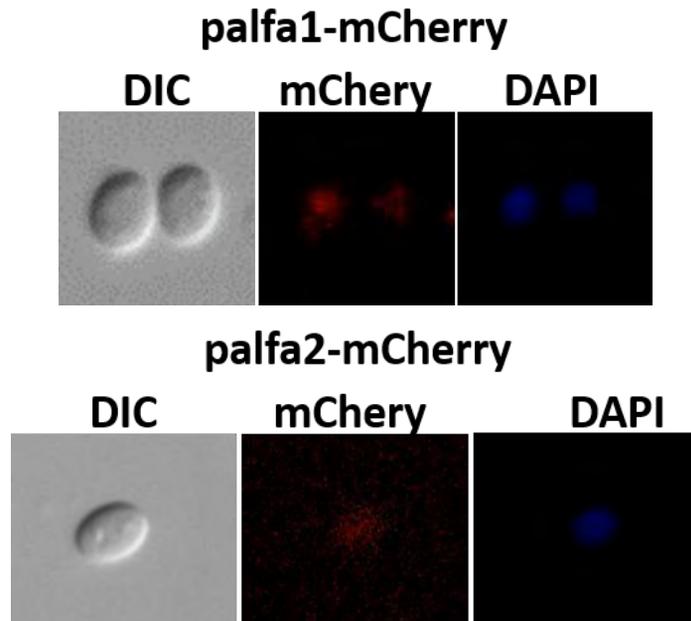


Figura 12. Fluorescencia de los genes alfa1 y alfa2 con mCherry bajo su propio promotor. La fluorescencia colocaliza con la ubicación nuclear. Los plásmidos que contienen las cepas son los siguientes alfa1-Cherry, (pYC100) y alfa2-Cherry (pYC105).

Sin embargo en las cepas de *C. glabrata* que contenían fusiones traduccionales con epítomos con su propio promotor no inmunodetectamos proteína en un ensayo de Westernblot (datos no mostrados).

8.3.2 Fusiones sobreexpresantes

Es posible sobreexpresar los genes alfa fusionados traduccionalmente a distintos fluoróforos. Como se observa en la Figura 13, la sobreexpresión de estas fusiones genera señal de fluorescencia en toda la célula y no sólo se localiza en el núcleo.

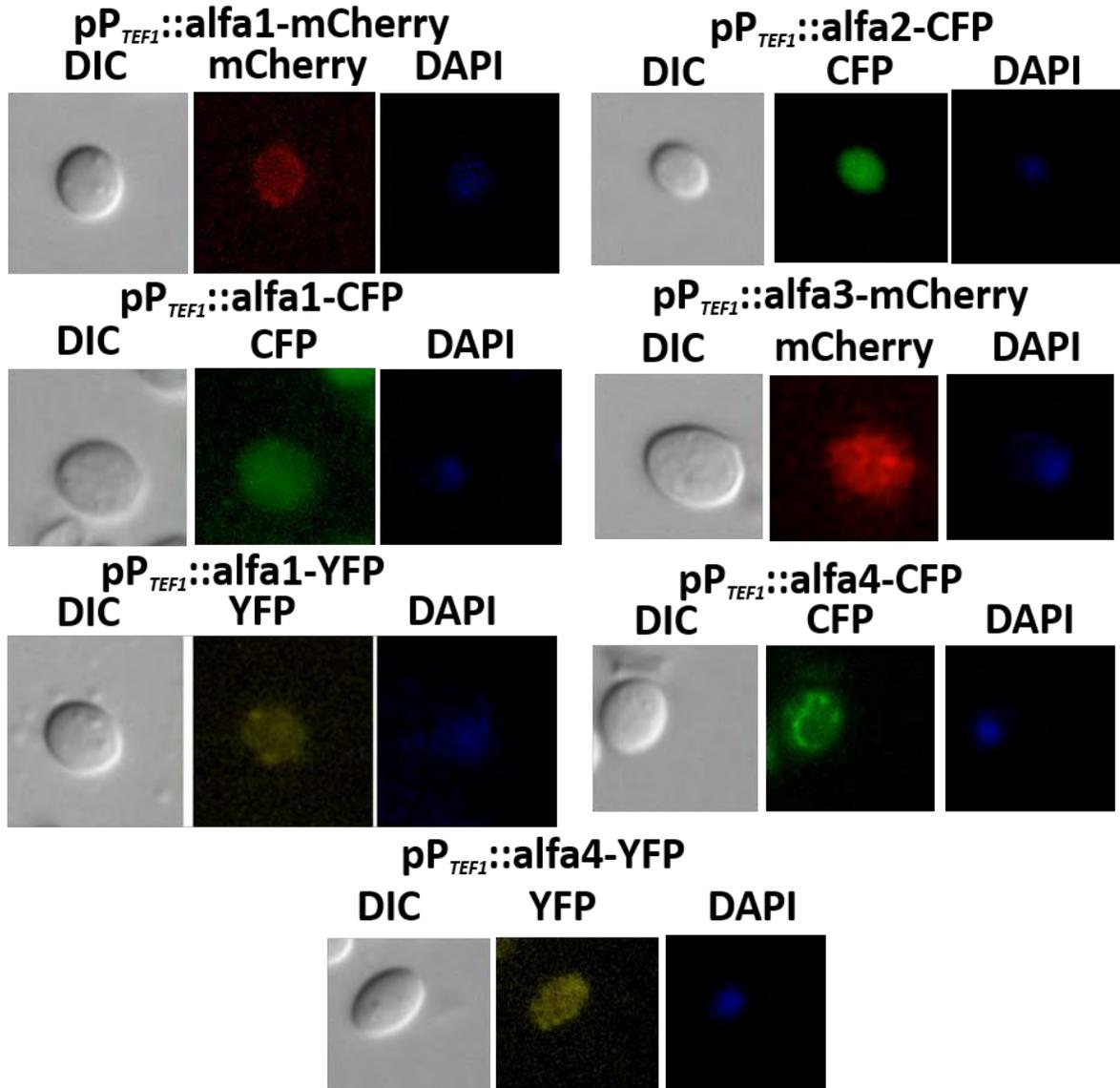


Figura 13. Fluorescencia de la sobreexpresión de los genes alfa fusionados con distintos fluoróforos. La fluorescencia localiza en toda la célula. Los plásmidos sobreexpresantes que contienen las cepas son los siguientes alfa1-Cherry, (pYC170), alfa2-CFP (pYC118), alfa1-CFP (pYC190), alfa3-Cherry (pYC187), alfa1-YFP (pYC188), alfa4-CFP (pYC199), alfa4-YFP (pYC201).

8.4 Análisis de los promotores de los genes de apareamiento de *C. glabrata*

Con el objeto de identificar cuáles son las señales que inducen la expresión de los genes de apareamiento en *C. glabrata* construimos fusiones transcripcionales de los

promotores de los genes de apareamiento con la secuencia del fluoróforo YFP como se muestra en la Figura 14. Los plásmidos con estas fusiones transcripcionales los transformamos en los distintos fondos genéticos que se resumen en la Tabla 7.

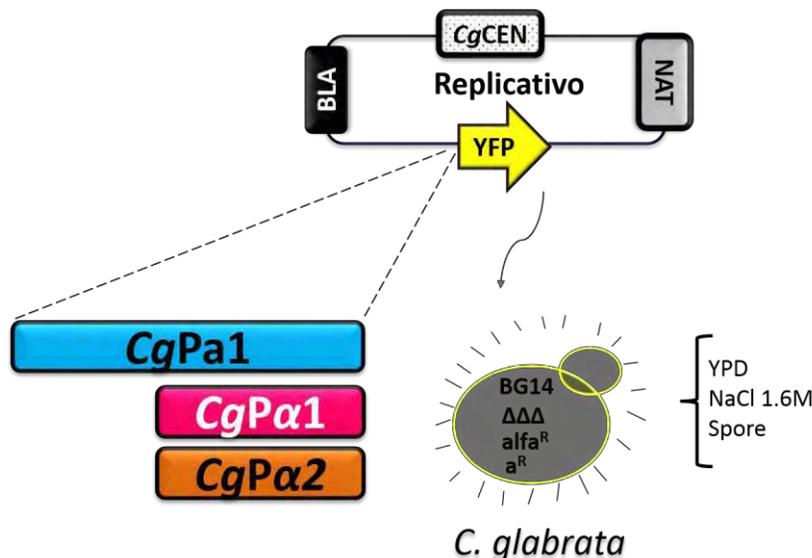


Figura 14. Construcción de fusiones transcripcionales para analizar promotores de los genes de apareamiento de *C. glabrata*.

Se empleó el vector replicativo pYC55 para construir estas fusiones en el cual el gen YFP es el gen reportero de la actividad del promotor. Transformamos cada una de las construcciones en seis fondos genéticos y se midió la actividad del cada promotor a lo largo del tiempo.

Tabla 7. Cepas de <i>C. glabrata</i> utilizadas en el análisis de promotores		
CEPA	GENOTIPO	INFORMACIÓN DE APAREAMIENTO
BG14	<i>ura3Δ::Tn903 G418^R</i>	<i>MTL1a</i> / <i>MTL2a</i> / <i>MTL3alfa</i>
ΔΔΔ	<i>mtl1Δ, mtl2Δ, mtl3Δ</i>	-
alfa ^R	<i>MTL1alfa, mtl2Δ, mtl3Δ</i>	<i>MTL1alfa</i>
a ^R	<i>MTL1a, mtl2Δ, mtl3Δ</i>	<i>MTL1a</i>

Como se muestra en la Figura 15, encontramos que en medio rico los promotores de los genes alfa1 y alfa2 disminuyen su expresión desde la primer hora de crecimiento en este medio y hasta las 24 horas. En fase estacionaria de 48 horas en todos los fondos genéticos se induce la expresión de los dos promotores y esta inducción es mayor en el fondo reconstituido con información a. Por su parte el promotor del gen a1 no muestra actividad a través del tiempo en este medio en ningún fondo genético que probamos.

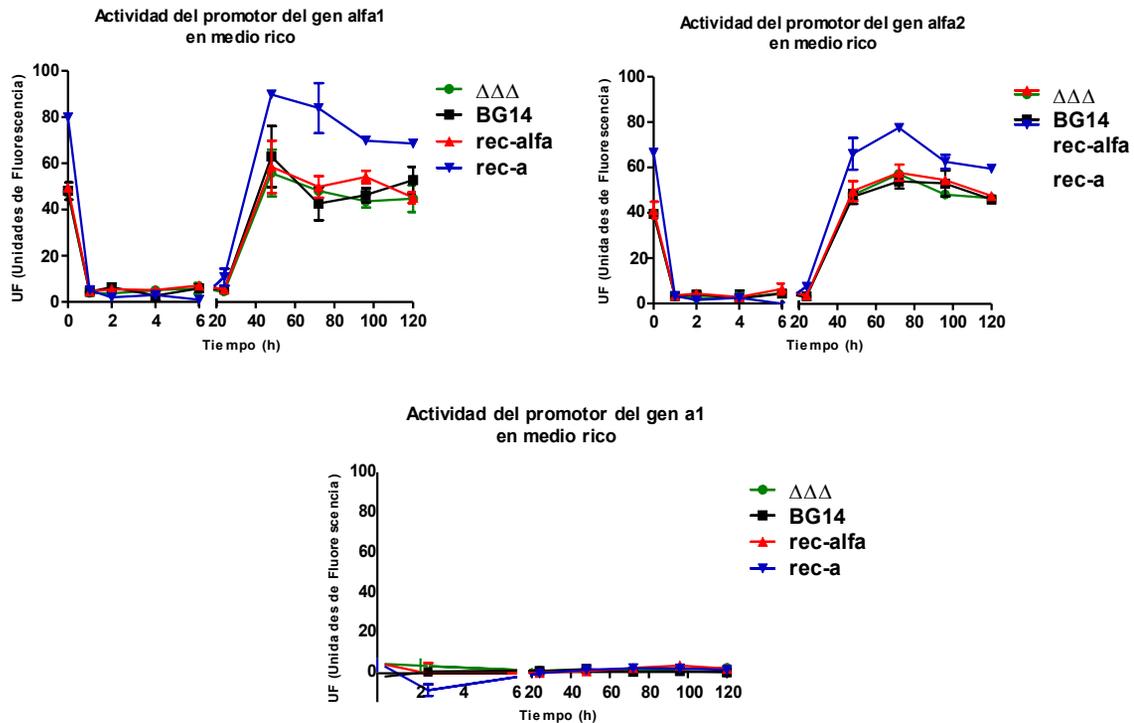


Figura 15. Actividad de los promotores de los genes *alfa1*, *alfa2* y *a1* de *C. glabrata* en medio rico. Se evaluaron los tres promotores en cuatro distintos fondos genéticos: Triple mutante nula de los *loci* de apareamiento ($\Delta\Delta\Delta$), parental (BG14), reconstituída con información *alfa* (*alfa-R*) y reconstituída con información *a* (*a-R*).

En medio rico YPD con NaCl 1.6M observamos que en todos los fondos genéticos los promotores de los genes *alfa1* y *alfa2* se mantienen expresados en las primeras horas de crecimiento en fase logarítmica y a las 6 horas disminuye su expresión y permanece así en todo el experimento en todos los fondos genéticos. El gen *a1* no muestra actividad (Fig. 16).

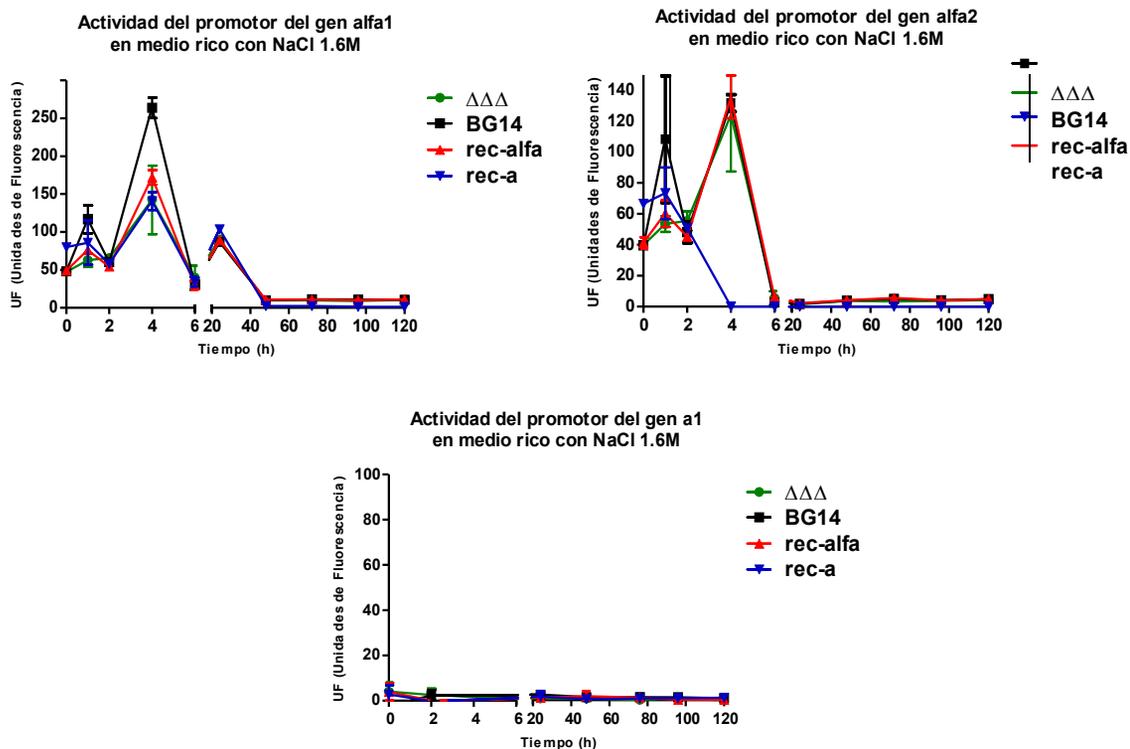


Figura 16. Actividad de los promotores de los genes alfa1, alfa2 y a1 de *C. glabrata* en medio rico con NaCl 1.6M. Se evaluaron los tres promotores en cuatro distintos fondos genéticos: Triple mutante nula de los *loci* de apareamiento ($\Delta\Delta\Delta$), parental (BG14), reconstituída con información alfa (alfa-R) y reconstituída con información a (a-R).

En medio spore, que es un medio de limitación de nitrógeno y carbono (tiene una fuente pobre de carbono), la actividad de los promotores de los genes alfa1 y alfa2 se mantiene alta hasta las 48 horas, tiempo al cual se observa que disminuye su expresión. En el fondo reconstituído con información a la expresión de ambos genes en fase logarítmica es mayor que en el resto de los fondos genéticos. El promotor del gen a1 continúa sin expresarse (Fig. 17).

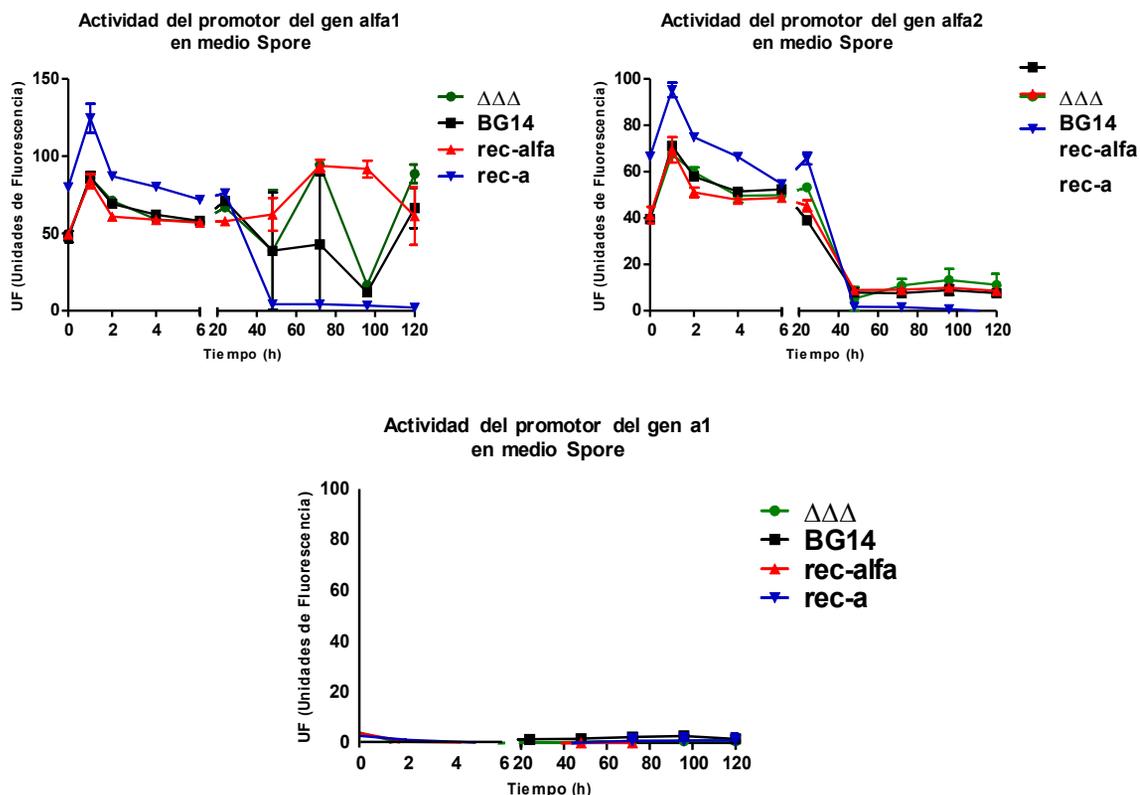


Figura 17. Actividad de los promotores de los genes alfa1, alfa2 y a1 de *C. glabrata* en medio Spore.

Se evaluaron los tres promotores en cuatro distintos fondos genéticos en medio spore: Triple mutante nula de los *loci* de apareamiento ($\Delta\Delta\Delta$), parental (BG14), reconstituída con información alfa (alfa-R) y reconstituída con información a (a-R).

En la Tabla 8 se resumen las veces de represión que muestran los promotores de los genes alfa1, alfa2 y a1 de *C. glabrata* respecto a la expresión en fase estacionaria en medio rico (que es el punto de mayor expresión). Se muestra que en medio rico se reprime la expresión de los genes alfa1 y alfa2 durante la fase logarítmica de crecimiento independientemente de la información de apareamiento presente en la célula. Tanto en medio rico con NaCl como en medio Spore la expresión del gen alfa1 se mantiene elevada y se reprime la expresión del gen alfa2. El promotor del gen a1 se mantiene inactivo en todas las condiciones probadas.

Tabla 8. Veces de represión de los promotores de los genes de apareamiento de <i>C. glabrata</i> .			
MEDIO	FONDO	P α 1	P α 2
YPD	$\Delta\Delta\Delta$	12.1	12.5
	BG14	10.9	11.8
	alfa-R	10.6	11.7
	a-R	15.6	20
YPD NaCl	$\Delta\Delta\Delta$	0.7	0.7
	BG14	0.9	1.7
	alfa-R	0.7	0.7
	a-R	1.2	0.8
SPORE	$\Delta\Delta\Delta$	0.7	1.4
	BG14	0.7	0.9
	alfa-R	0.8	0.8
	a-R	1.4	0.6

No detectamos actividad del promotor del gen $\alpha 1$ de *C. glabrata*.

8.5 Complementación para el apareamiento de los genes de *C. glabrata* en *S. cerevisiae*

Nos preguntamos si los genes de *C. glabrata* son capaces de complementar para el apareamiento en *S. cerevisiae*. Para contestar esta pregunta realizamos un primer experimento donde clonamos independientemente los *loci* *MTL1a* y *MTL1*alfa en un vector replicativo para *S. cerevisiae*. Ambos tipos de vectores los transformamos en dos fondos genéticos de *S. cerevisiae*: *MATa* y *MATalfa*.

Realizamos cruza entre las cepas que contienen el vector con cada tipo de información de apareamiento de *C. glabrata* y las cepas “tester” a /”tester” alfa que son cepas de *S. cerevisiae* que tienen un marcador de auxotrofia distinto de las cepas en las que transformamos los plásmidos que contienen el *locus* *MTL1* de *C. glabrata* como lo muestra la Figura 18. Las cruza que produzcan células producto de apareamiento (diploides) habrá recombinación genética con la cual las auxotrofías que contienen las cepas se complementarían y permitirán su crecimiento en medio mínimo.

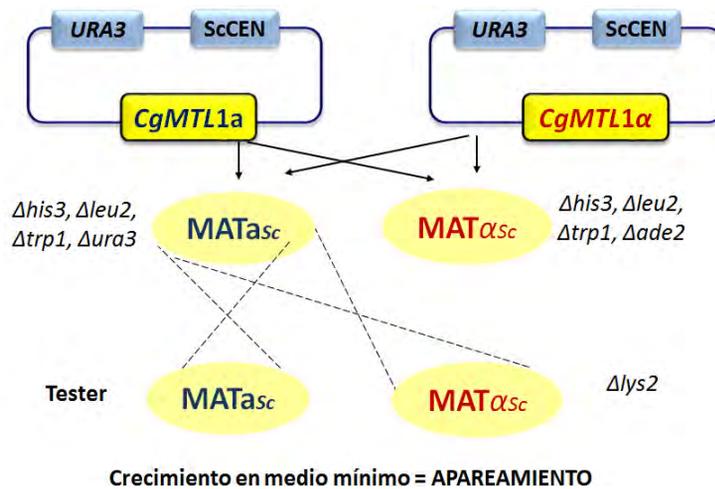


Figura 18. Estrategia de complementación para el apareamiento en *S. cerevisiae* con los *loci* *MTL1a* y *MTL1alfa* *C. glabrata*. Cada cepa que contiene el vector con los *loci* *MTL1a* o *MTL1alfa* es auxótrofa a histidina, leucina, triptófano y adenina; mientras que las cepas “tester” a y “tester” alfa son auxótrofas de lisina por lo cual sólo los productos de apareamiento que logren complementar las auxotrofias de las cepas parentales podrán crecer en medio mínimo.

En *S. cerevisiae* no es necesario inducción ni represión de genes para que las células se comporten como células tipo *MATa*. Si los genes de *C. glabrata* pueden complementar las funciones de los de *S. cerevisiae*, esperaríamos que cuando transformamos cepas de *S. cerevisiae* *MATa* con un vector replicativo que contiene el *locus* *MTL1a* de *C. glabrata* esperamos que siga manteniendo su tipo de apareamiento a y pueda aparearse como lo hace normalmente con las células “tester” alfa. Sin embargo, cuando las transformamos con un vector replicativo con el *locus* *MTL1alfa* de *C. glabrata*, y si estos genes tienen la misma función que en *S. cerevisiae*, esperamos que la cepa sea incapaz de aparearse puesto que en *S. cerevisiae* las células que expresan ambos tipos de información no son capaces de aparearse.

En el caso de las células *MATalfa* transformadas con un vector replicativo que contiene el *locus* *MTL1a* esperamos que ahora sean incapaces de aparearse. Al transformarlas con un vector replicativo que contiene el *locus* *MTL1alfa* esperamos que mantengan la capacidad de aparearse con las células “tester” a puesto que estaríamos introduciendo el gen ortólogo con la misma función.

Como esperábamos, al cruzar la cepa “tester” alfa o la cepa “tester” **a** con la cepa de su mismo tipo de apareamiento, estas no se aparean. Sin embargo al cruzar la cepa “tester” alfa con la cepa *MATa* mantienen su capacidad de aparearse sin importar la información de apareamiento de *C. glabrata* que contenga el vector replicativo con la cual se transformó. Lo mismo sucede con la cepa “tester” **a**, la cual conserva su capacidad de aparearse con la cepa *MATalfa* sin importar la información de *C. glabrata* que contenga en el vector replicativo (Fig. 19).

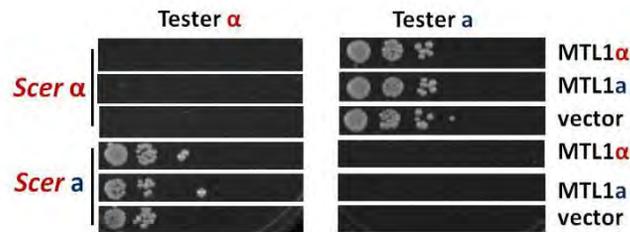


Figura 19. Ensayo de apareamiento entre cepas *MATa* y *MATalfa* de *S. cerevisiae* en medio mínimo. Diluciones logarítmicas seriadas del crecimiento en medio mínimo de las cruces. La cepa tester alfa es incapaz de aparearse con la cepa *MATalfa* pero sí con la cepa *MATa* sin importar la información de *C. glabrata* que contenga. La cepa tester a es incapaz de aparearse con la cepa *MATa* pero sí con la cepa *MATalfa* sin importar la información de *C. glabrata* que contenga.

9 Discusión

Debido a la relevancia epidemiológica que han tomado las infecciones causadas por algunas especies del género *Candida*, en las últimas décadas se han incrementado los esfuerzos por comprender los mecanismos moleculares que les permiten ser patógenos de gran éxito en mamíferos.

Aunque el término *Candida* fue anteriormente utilizado para referirse a las levaduras que se reproducían de manera asexual, actualmente en éste género existen varias especies en las que se ha descubierto un ciclo sexual o parasexual como es el caso de *C. tropicalis* (Seervai, Jones, Hirakawa, Porman, & Bennett, 2013) y *C. albicans* (Bennett & Johnson, 2005) que hasta entonces se habían considerado organismos asexuales.

El hecho de que *C. glabrata* cuente con la maquinaria genética para llevar a cabo el apareamiento abre la posibilidad de que también posea un ciclo sexual aunque aún no haya sido descrito. Sin embargo también es posible que estos genes si bien no funcionan para regular el apareamiento como sucede en otros organismos, en *C. glabrata* podrían regular otros procesos importantes para la colonización y virulencia. Por lo anterior, son necesarios experimentos genéticos y bioquímicos que nos permitan determinar la función de estos genes llamados “de apareamiento” en *C. glabrata*.

Los genes de *C. glabrata* difieren en los distintos *loci* de apareamiento

En ascomicetos, las secuencias en los *loci* de apareamiento que no muestran homología entre cepas de distinto tipo de apareamiento se les denomina ideomorfo (Froeliger & Leong, 1991). En *C. albicans* y *C. tropicalis* los tipos de apareamiento pueden ser **a** o alfa y los ideomorfos involucrados son **a1**, **a2**, alfa1 y alfa2. Sin embargo, en varias especies algunos ideomorfos se han perdido como es el caso de *S. cerevisiae* que carece de **a2** o *C. lusitanae*, *D. hansenii*, *C. parapsilosis* y *C. guilliermondii* que han perdido el gen alfa2 (Lee, Ni, Li,

Shertz, & Heitman, 2010) pero conservan la capacidad de aparearse. Hay evidencia que indica que la regulación de la reproducción sexual ha sido reorganizada (“rewired”) en especies de *Candida*; pues aunque carezcan de algunos genes de apareamiento son capaces de llevar a cabo la meiosis y esporulación (Ene & Bennett, 2014). Está descrito que en *C. glabrata* sólo se conservan los genes **a1** para el tipo de apareamiento **a** y los genes alfa1 y alfa2 para el tipo de apareamiento alfa (Srikantha, Lachke, & Soll, 2003). Nosotros hemos encontrado que en *C. glabrata* existen cinco genes de apareamiento: **a1**, alfa1, alfa2, alfa3 y alfa4. A diferencia de lo que sucede en otros organismos, en *C. glabrata* los genes que determinan la información de apareamiento alfa difieren en los tres *loci* de apareamiento de la levadura. De tal manera que la información tipo alfa contenida en el *locus MTL1* corresponde a los genes alfa1 y alfa2, en el *locus MTL2* corresponde a los genes alfa1 y alfa4 (en los dos aislados clínicos que hemos encontrado que contienen información alfa en *MTL2*) y en el *locus MTL3* corresponde a los genes alfa1 y alfa3 (Fig. 9). Esto no ha sido reportado en otros *loci* de apareamiento en otras levaduras donde los genes de un tipo de apareamiento son idénticos independientemente del *locus* donde se encuentren como en la levadura modelo *S. cerevisiae* que la información de apareamiento **a** y alfa en el *locus* de expresión *MAT* es idéntica a la que se encuentra en los *loci* silenciosos *HMR* y *HML*, respectivamente (Herskowitz, 1988).

Los tres genes: alfa2, alfa3 y alfa4 conservan la región homeodominio que en *S. cerevisiae* es necesaria para que el gen alfa2 funcione como un represor de genes específicos de células **a** (Herskowitz, 1988). Esto nos sugiere que estos genes también podrían unirse a secuencias de DNA y regular genes blanco aún no identificados. Al comparar las secuencias de aminoácidos de los tres genes (alfa1, alfa2, alfa3 y alfa4) de *C. glabrata* vemos que el gen alfa3 del *locus MTL3* tiene una similitud mayor (46%) (SGD.YCR039C.chrIII:200178..199546) e incluso tiene la misma longitud que el gen alfa2 de *S. cerevisiae* (210 aminoácidos), mientras que los genes alfa2 del *locus MTL1* y alfa4 del *locus MTL2* tienen una longitud menor (186 aminoácidos y 177 aminoácidos, respectivamente).

Igual que en *S. cerevisiae* y *C. glabrata*, *Kluyveromyces lactis* posee tres *loci* de apareamiento: *HML*, *HMR* y *MAT*. El *locus* de expresión *MAT*alfa de *K. lactis* contiene los

genes alfa1, alfa2 y alfa3 contiguos (Barsoum, Martinez, & Astrom, 2010); a diferencia de *C. glabrata* donde la información alfa consta del gen alfa1 y sólo uno de los demás genes (alfa2, alfa3 o alfa4). Y aunque en *C. glabrata* aún se desconoce la función de los genes alfa, incluyendo el gen alfa3, en *K. lactis* el gen alfa3 codifica para una transposasa que permite el cambio del tipo de apareamiento (“mating type switch”) de *MATa* a *MATalfa*; es decir, alfa3 de *C. glabrata* y de *K. Lactis* no son ortólogos (Curcio & Derbyshire, 2003).

Generación de herramientas moleculares para *C. glabrata*

Para poder realizar estudios bioquímicos y genéticos de los genes de apareamiento en *C. glabrata* nos propusimos diseñar un sistema de vectores que nos permitiera etiquetar estos genes con tres fluoróforos (CFP, YFP o mCherry) o con tres epítomos (HA, FLAG o cMYC) de manera independiente. Hemos demostrado la eficiencia del sistema que generamos que permite realizar fusiones traduccionales en el 3' de manera sistemática de cualquier gen codificante de *C. glabrata* en tres versiones: replicativo, sobreexpresante e integrativo (Yanez-Carrillo, et al, 2015 sometido).

Recientemente otros grupos de investigación han desarrollado vectores replicativos que permiten estudiar genes de esta levadura bajo un promotor constitutivo o bien, bajo promotores inducibles en *C. glabrata* (Zordan et al., 2013). Sin embargo, el etiquetar los genes de interés con fluoróforos o epítomos constituye una valiosa herramienta que facilita el estudio de la expresión genética e interacción de proteínas en este patógeno oportunista.

Localización nuclear de las proteínas codificadas en los genes de apareamiento de *C. glabrata*

En nuestro grupo de trabajo habíamos reportado anteriormente que los genes codificados en los *loci* *MTL1* y *MTL2* de *C. glabrata* son activos transcripcionalmente, mientras que los genes que se encuentran en el *locus* *MTL3* están sujetos a un silenciamiento incompleto y sólo se expresa en una población pequeña de un cultivo celular dado (Ramirez-

fusiones traduccionales que generamos de los genes de apareamiento con fluoróforos y epítomos bajo el promotor nativo se transcriben desde un vector replicativo. Detectamos transcrito en todas las fusiones traduccionales que evaluamos por lo que sabemos que la fusión traduccional se expresa de manera episomal (Fig. 11).

Sabemos que en *S. cerevisiae* las proteínas **a1**, alfa1 y alfa2 funcionan como factores transcripcionales (<http://www.yeastgenome.org/>, <http://www.candidagenome.org/>). En *C. glabrata* no pudimos inmunodetectar las proteínas de fusión con epítomos, aunque sí detectamos el transcrito (Fig. 11). El hecho de no haber inmunodetectado las fusiones traduccionales con epítomos apoya la idea que de, al igual que en *S. cerevisiae*, estos genes podrían actuar como factores transcripcionales, de los cuales la cantidad de proteína que se produce puede ser tan baja que no podemos detectarla o bien que estén sometidos a un mecanismo de regulación traduccional o post-traduccional que regule la cantidad de proteína presente. Otra evidencia que sugiere que estos genes podrían actuar como factores transcripcionales es que las fusiones con fluoróforos bajo su propio promotor colocalizan con el núcleo (Fig. 12).

No existen reportes de sobreexpresión de los genes de apareamiento en *S. cerevisiae*, sólo se ha reportado que la sobreexpresión del gen alfa2 es letal (Sopko et al., 2006). Sin embargo, nosotros hemos podido sobreexpresar fusiones traduccionales de los genes alfa1, alfa2, alfa3 y alfa4 de *C. glabrata* fusionados a distintos fluoróforos. La señal de fluorescencia en las cepas sobreexpresantes se observa en toda la célula, a diferencia de las fusiones bajo su propio promotor donde se observa que colocaliza con el núcleo celular. Aunque se sabe que funcionan como factores transcripcionales y se unen a secuencias de DNA, no existen reportes de la ubicación nuclear de estos genes en *S. cerevisiae*; sin embargo en *C. glabrata* al expresar bajo el promotor nativo los genes alfa de apareamiento se observa una localización nuclear de la proteína, mientras que al sobreexpresar algunos genes (alfa1, alfa3 y alfa4), se observan cúmulos discretos de fluorescencia en la periferia nuclear o bien en zonas que parecen ser mitocondrias (Fig. 13), aunque son necesarios más experimentos para asegurarlo.

Expresión de los genes de apareamiento en *C. glabrata*

El estrés osmótico en levaduras 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, Cherkasova, Elion, Gustin, & Winter, 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, Hog1. En respuesta a alta osmolaridad, Hog1 se activa, entra al núcleo y fosforila varios reguladores transcripcionales que controlan genes necesarios para permitir a la célula sobrevivir a este ambiente (Gustin, Albertyn, Alexander, & Davenport, 1998).

Como se muestra en la Figura 20, la cinasa Hog1 es necesaria para la respuesta a estrés osmótico y arresto celular, lo cual concuerda con nuestros hallazgos en *C. glabrata*, pues encontramos que los promotores de los genes *alfa1* y *alfa2* se mantienen expresados desde fase estacionaria y en las primeras horas de crecimiento en condiciones tanto de estrés osmótico (YPD-NaCl 1.6M) como de limitación de nutrientes (fase estacionaria y medio Spore). Lo anterior nos sugiere que estos genes podrían estar involucrados en esta respuesta.

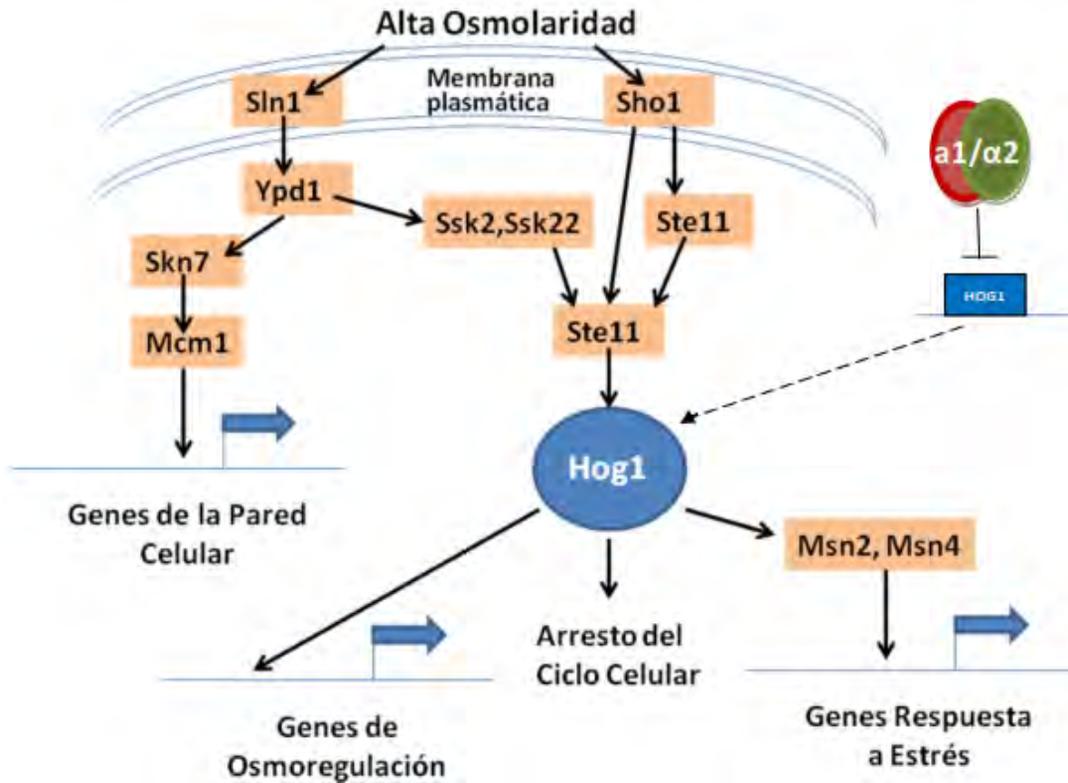


Figura 20. Vía HOG de señalización de *S. cerevisiae*.
Se muestra la represión del gen *HOG1* y las vías en las cuales participa esta cinasa.
Modificado de (Gustin et al., 1998)

Se sabe que en *S. cerevisiae*, la inducción de la meiosis depende de múltiples señales como tipos de apareamiento, ausencia de glucosa, carencia nutricional y estrés. La presencia de una fuente de carbono y nitrógeno permite el crecimiento levaduriforme; la limitación de nitrógeno y glucosa induce a las células a sufrir meiosis y esporulación; mientras que carencia de nitrógeno pero en presencia de glucosa, induce la formación de pseudohifas (Kahana-Edwin, Stark, & Kassir, 2013) Estas señales se transmiten al activador transcripcional *IME1* que es el regulador maestro de la meiosis (Kassir et al., 2003).

Tanto en *S. cerevisiae* como en *S. pombe* la limitación de nutrientes es una señal necesaria para inducir meiosis durante el ciclo sexual (Harigaya & Yamamoto, 2007; Herskowitz, 1989). En *S. cerevisiae* está descrito que las células son arrestadas en fase G1 del ciclo celular por dos razones: debido a la presencia del tipo celular contrario (**a** o alfa) para permitir la fusión celular o a causa de una deprivación nutricional que les permite sobrevivir

hasta que haya nutrientes disponibles (Herskowitz, 1989). Nosotros encontramos que tanto el promotor del gen alfa1 como de alfa2 de *C. glabrata* se inducen en condiciones de carencia nutricional (fase estacionaria tardía y medio Spore) en todos los fondos genéticos. Debido a que en *C. glabrata* no se ha descrito un ciclo sexual es posible que estos genes participen en la respuesta a este tipo de estrés nutricional al activar la vía de HOG e inducir el arresto celular como sucede en otras levaduras (Gustin et al., 1998).

En *S. cerevisiae* para entrar en meiosis deben encontrarse en un ambiente carente de nitrógeno y glucosa, y en presencia de una fuente no fermentable de carbono, lo que causa que las células se arreten en fase G1. Sin embargo, se ha descrito que esto puede ser distinto en otras especies como es el caso de *Candida lusitanae* en donde tanto la meiosis como la esporulación ocurre en presencia de glucosa (Francois et al., 2001). Podría ser que en *C. glabrata* las condiciones en las que se inducen los genes también sean distintas como sucede con otras especies y que estos genes estén llevando a cabo funciones distintas a la regulación del apareamiento.

Está reportado que en células alfa de *S. cerevisiae*, alfa2 reprime genes específicos de células **a** y en células **a/alfa** se forma un heterodímero represor con **a1** que reprime el apareamiento, meiosis y genes de respuesta a estrés (Galgoczy et al., 2004; Herskowitz, 1989). Mientras que en *C. albicans* el heterodímero impide el cambio fenotípico necesario para el apareamiento (Miller & Johnson, 2002). Sin embargo en nuestro análisis encontramos que el promotor de los genes alfa1 y alfa2 de *C. glabrata* se induce en fase estacionaria tardía en medio rico YPD (Figura 15). Lo anterior podría sugerir que tanto el gen alfa1 como alfa2 participan en el arresto celular producido por la limitación de nutrientes y en la respuesta a estrés osmótico.

El gen **a1** parece ser un gen que no responde a los estímulos que hemos probado y no parece ser regulado por las proteínas codificadas en los *loci* de apareamiento de los fondos genéticos que estudiamos (Fig. 15, 16, 17), aunque hemos detectado por medio de RT-PCR el transcrito proveniente de *MTL1* y *MTL2* en condiciones de fase estacionaria (Ramirez-Zavaleta et al., 2010).

En *C. glabrata* como en otras especies de levaduras, las señales a las cuales responde la expresión de estos genes puede ser distinta a lo reportado en la levadura modelo *S. cerevisiae*. Aunque los genes blanco de las proteínas codificadas por estos genes son aún desconocidos, ésta área de investigación parece ser prometedora y los vectores que hemos generado constituyen unas valiosas herramientas moleculares para llevarlo a cabo.

Expresión heteróloga de los genes de apareamiento de *C. glabrata* en *S. cerevisiae*

Con la finalidad de conocer el potencial de apareamiento de algunas especies sin ciclo sexual conocido se han generado experimentos de expresión inter-especies donde se ha reportado la comunicación entre *S. cerevisiae* y *S. pombe* pues encuentran que el sobrenadante de cultivos de *S. pombe* que expresen factor alfa es capaz de arrestar en G1, inducir cambios en la morfología y en la expresión en respuesta a feromonas en *S. cerevisiae* (Hennig, Clemens, Rodel, & Ostermann, 2015). También se ha descrito que la expresión heteróloga de genes de apareamiento de especies de *Paracoccidioides* en *S. cerevisiae* demuestra que la señalización de apareamiento en *Paracoccidioides* es funcional (Gomes-Rezende et al., 2012). Incluso han logrado generar productos del apareamiento inter-especies entre *C. dubliniensis* y *C. albicans* (Pujol et al., 2004), entre *Aspergillus fumigatus* y *A. nidulans* (Pyrzak, Miller, & Miller, 2008) aunque no se hubiera descrito ciclo sexual en cada especie y entre *S. ovarum* y *S. cerevisiae* (Pfliegler, Antunovics, & Sipiczki, 2012). Esto pone en evidencia que es posible evaluar la capacidad de la maquinaria celular de un organismo en otro donde se sabe que efectivamente sucede el apareamiento. Es posible determinar entonces si las especies involucradas poseen una maquinaria genética similar o que puede complementarse para completar un ciclo sexual.

Aunque *C. glabrata* posee la maquinaria genética necesaria para llevar a cabo el apareamiento (Wong, Fares, Zimmermann, Butler, & Wolfe, 2003), no se ha encontrado evidencia de una reproducción sexual. Por lo cual nos propusimos expresar de manera heteróloga los genes de *C. glabrata* en *S. cerevisiae* y determinar si son capaces de

complementar para el apareamiento que ésta última. En caso de que los genes de *C. glabrata* tuvieran una función similar a los ortólogos de *S. cerevisiae* esperábamos que al expresar los genes de los *loci MTL1a y MTL1alfa* de *C. glabrata* en los fondos *MATa* o *MATalfa* de *S. cerevisiae*, de sintetizarse las proteínas de *C. glabrata*, cambiaran la identidad celular sexual de las células receptoras y afectarían su capacidad de apareamiento; pero no fue así. Este resultado pudo deberse a dos razones: que los genes de apareamiento codificados en los *loci MTL* de *C. glabrata* no complementan para el apareamiento en *S. cerevisiae* (no tendrían la misma función), o debido a que las regiones regulatorias de *C. glabrata* no sean reconocidas por los factores transcripcionales de *S. cerevisiae* y que por lo tanto no se hayan expresado los genes de *C. glabrata* en *S. cerevisiae*.

10 Conclusiones

- Hemos generado un grupo de vectores de expresión que permitirán el estudio sistemático de cualquier gen codificante de *Candida glabrata* y arrojarán información sobre su transcripción genética, localización e interacción de la proteína.
- *C. glabrata* posee los genes alfa1, alfa2, alfa3 y alfa4 distribuidos de la siguiente manera: alfa1 y alfa2 en *MTL1*; alfa1 y alfa4 en *MTL2* y alfa1 y alfa3 en *MTL3*. Los tres alelos de “alfa2” poseen el homeodominio que en *S. cerevisiae* le permite la unión a DNA para la regulación de sus genes blanco.
- Las proteínas alfa1 y alfa2 de *C. glabrata* se localiza el núcleo celular lo cual sugiere una posible función como factor transcripcional como sucede en otras levaduras. Al sobreexpresar los genes alfa de apareamiento de *C. glabrata*, las proteínas se localiza no sólo en el núcleo sino en toda la célula.
- En *C. glabrata* los genes alfa1 y alfa2 se expresa en condiciones de estrés nutricional y estrés osmótico.
- El promotor del gen **a1** no parece ser activo en condiciones de estrés conutricional y estrés osmótico.
- Los *loci MTL1a* y *MTL1alfa* de *C. glabrata* no complementan para el apareamiento en *S. cerevisiae*.

11 Resultados adicionales

11.1 Construcción de un vector replicativo sobreexpresante NAT^R

En este trabajo ya hemos generado un vector sobreexpresante con el casete *URA3* de selección. Sin embargo, para nuestro grupo de trabajo era necesario generar un vector con resistencia a nourseotricina (NAT^R).

Para construir este vector de expresión partimos del vector pMJ22 en el cual clonamos el promotor del gen *PGK1* de *S. cerevisiae* y el terminador del gen *HIS3* de *C. glabrata* (Fig. 21).

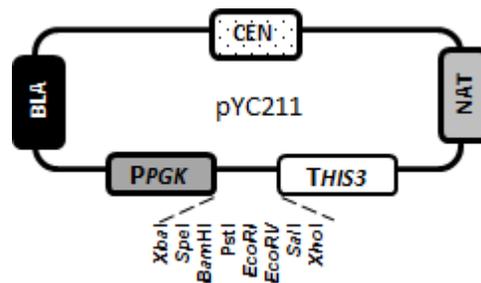


Figura 21. Vector replicativo sobreexpresante con resistencia a NAT^R. Se muestran los sitios de restricción que están disponibles para clonar el ORF de los genes de interés.

Este siguiente artículo puede ser consultado en la siguiente liga:
<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1130-1406%2813%2900113-7>



Mycologic Forum

The mating type-like loci of *Candida glabrata*



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

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

article info

Article history:

Received 16 August 2013

Accepted 27 September 2013

Available online 16 November 2013

Keywords: *Candida glabrata* Mating type-like loci Subtelomeric silencing Cell type identity

abstract

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

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

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

Los loci de apareamiento de *Candida glabrata*

resumen

Candida glabrata, una levadura patógena haploide y oportunista, que carece de ciclo sexual conocido (asexual), conserva la mayoría de genes ortólogos requeridos en los procesos de apareamiento, esporulación y la identidad del tipo celular. El genoma de *C. glabrata* contiene 3 loci de apareamiento llamados MTL1, MTL2 y MTL3 que codifican los presuntos factores de transcripción $a1$, 1 y 2 que controlan la reproducción sexual e identidad celular en otros hongos, como *Saccharomyces cerevisiae* con el cual tiene una estrecha relación filogenética. MTL1 puede contener información a o ; MTL2 contiene información a, y MTL3 que contiene información 1 y 2 son loci próximos a 2 telómeros. MTL1 y MTL2 son activos transcripcionalmente mientras que MTL3 está sujeto a un silenciamiento que no es completo, que proviene del telómero y depende de las proteínas Sir2, Sir3, Sir4, $yKu70/80$, Rif1, Rap1 y Sum1. *C. glabrata* parece no mantener identidad de tipo celular ya que varios genes específicos de un tipo celular se expresan en todas las células con independencia del tipo de información de apareamiento en los loci MTL, o incluso, en su ausencia. Estos datos ilustran varias diferencias importantes entre la levadura no patógena *S. cerevisiae* y *C. glabrata* que podrían explicar la característica asexual en esta última. El hecho de que en *C. glabrata* se hayan conservado los genes necesarios para el apareamiento podría indicar que es posible que algunos de estos genes se hayan «reorganizado» para controlar otros procesos importantes en la supervivencia de *C. glabrata* en su huésped, como comensal o como patógeno.

Este artículo forma parte de una serie de estudios presentados en el «V International Workshop: Molecular genetic approaches to the study of human pathogenic fungi» (Oaxaca, México, 2012).

© 2013 Revista Iberoamericana de Micología. Publicado por Elsevier España, S.L. Todos los derechos reservados.

Palabras clave:

Candida glabrata

Loci similares a los de apareamiento

Silenciamiento subtelomérico

Identidad del tipo celular

* Corresponding author.

E-mail address: icastano@ipicyt.edu.mx (I. Castaño).

¹ Current address: Department of Biomolecular Chemistry, School of Medicine and Public Health, University of Wisconsin-Madison, Madison, USA.

12 Referencias

- Ahmad, K. M., Ishchuk, O. P., Hellborg, L., Jorgensen, G., Skvarc, M., Stenderup, J., . . . Piskur, J. (2013). Small chromosomes among Danish *Candida glabrata* isolates originated through different mechanisms. *Antonie Van Leeuwenhoek*, *104*(1), 111-122. doi: 10.1007/s10482-013-9931-3
- Banuett, F. (1992). *Ustilago maydis*, the delightful blight. *Trends Genet*, *8*(5), 174-180.
- Barsoum, E., Martinez, P., & Astrom, S. U. (2010). Alpha3, a transposable element that promotes host sexual reproduction. *Genes Dev*, *24*(1), 33-44. doi: 10.1101/gad.557310
- Bennett, R. J., & Johnson, A. D. (2003). Completion of a parasexual cycle in *Candida albicans* by induced chromosome loss in tetraploid strains. *EMBO J*, *22*(10), 2505-2515. doi: 10.1093/emboj/cdg235
- Bistis, G. N. (1996). Trichogynes and Fertilization in Uni- and Bimating Type Colonies of *Neurospora tetrasperma*. *Fungal Genet Biol*, *20*(1), 93-98.
- Bolker, M., & Kahmann, R. (1993). Sexual pheromones and mating responses in fungi. *Plant Cell*, *5*(10), 1461-1469. doi: 10.1105/tpc.5.10.1461
- Butler, G. (2010). Fungal sex and pathogenesis. *Clin Microbiol Rev*, *23*(1), 140-159. doi: 10.1128/CMR.00053-09
- Butler, G., Kenny, C., Fagan, A., Kurischko, C., Gaillardin, C., & Wolfe, K. H. (2004). Evolution of the MAT locus and its Ho endonuclease in yeast species. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *101*(6), 1632-1637. doi: 10.1073/pnas.0304170101
- Butler, G., Rasmussen, M. D., Lin, M. F., Santos, M. A., Sakthikumar, S., Munro, C. A., . . . Cuomo, C. A. (2009). Evolution of pathogenicity and sexual reproduction in eight *Candida* genomes. *Nature*, *459*(7247), 657-662. doi: 10.1038/nature08064
- Byrne, K. P., & Wolfe, K. H. (2005). The Yeast Gene Order Browser: combining curated homology and syntenic context reveals gene fate in polyploid species. *Genome Res*, *15*(10), 1456-1461. doi: 10.1101/gr.3672305
- Calvin, N. M., & Hanawalt, P. C. (1988). High-efficiency transformation of bacterial cells by electroporation. *J Bacteriol*, *170*(6), 2796-2801.
- Castano, I., Kaur, R., Pan, S., Cregg, R., Penas Ade, L., Guo, N., . . . Cormack, B. P. (2003). Tn7-based genome-wide random insertional mutagenesis of *Candida glabrata*. *Genome Res*, *13*(5), 905-915. doi: 10.1101/gr.848203
- Cormack, B. P., & Falkow, S. (1999). Efficient homologous and illegitimate recombination in the opportunistic yeast pathogen *Candida glabrata*. *Genetics*, *151*(3), 979-987.
- Corzo-Leon, D. E., Alvarado-Matute, T., Colombo, A. L., Cornejo-Juarez, P., Cortes, J., Echevarria, J. I., . . . Sifuentes-Osornio, J. (2014). Surveillance of *Candida* spp bloodstream infections: epidemiological trends and risk factors of death in two Mexican tertiary care hospitals. *PLoS One*, *9*(5), e97325. doi: 10.1371/journal.pone.0097325
- Csank, C., & Haynes, K. (2000). *Candida glabrata* displays pseudohyphal growth. *FEMS Microbiol Lett*, *189*(1), 115-120.
- Cuellar-Cruz, M., Briones-Martin-del-Campo, M., Canas-Villamar, I., Montalvo-Arredondo, J., Riego-Ruiz, L., Castano, I., & De Las Penas, A. (2008).

- High resistance to oxidative stress in the fungal pathogen *Candida glabrata* is mediated by a single catalase, Cta1p, and is controlled by the transcription factors Yap1p, Skn7p, Msn2p, and Msn4p. *Eukaryot Cell*, 7(5), 814-825. doi: 10.1128/EC.00011-08
- Cuellar-Cruz, M., Castano, I., Arroyo-Helguera, O., & De Las Penas, A. (2009). Oxidative stress response to menadione and cumene hydroperoxide in the opportunistic fungal pathogen *Candida glabrata*. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 104(4), 649-654.
- Dower, W. J., Miller, J. F., & Ragsdale, C. W. (1988). High efficiency transformation of *E. coli* by high voltage electroporation. *Nucleic Acids Res*, 16(13), 6127-6145.
- Elion, E. A. (2000). Pheromone response, mating and cell biology. *Curr Opin Microbiol*, 3(6), 573-581.
- Fidel, P. L., Jr., Vazquez, J. A., & Sobel, J. D. (1999). *Candida glabrata*: review of epidemiology, pathogenesis, and clinical disease with comparison to *C. albicans*. *Clin Microbiol Rev*, 12(1), 80-96.
- Gabalton, T., Martin, T., Marcet-Houben, M., Durrens, P., Bolotin-Fukuhara, M., Lespinet, O., . . . Fairhead, C. (2013). Comparative genomics of emerging pathogens in the *Candida glabrata* clade. *BMC Genomics*, 14, 623. doi: 10.1186/1471-2164-14-623
- Galgoczy, D. J., Cassidy-Stone, A., Llinas, M., O'Rourke, S. M., Herskowitz, I., DeRisi, J. L., & Johnson, A. D. (2004). Genomic dissection of the cell-type-specification circuit in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 101(52), 18069-18074. doi: 10.1073/pnas.0407611102
- Gehring, W. J., Affolter, M., & Burglin, T. (1994). Homeodomain proteins. *Annu Rev Biochem*, 63, 487-526. doi: 10.1146/annurev.bi.63.070194.002415
- Gietz, D., St Jean, A., Woods, R. A., & Schiestl, R. H. (1992). Improved method for high efficiency transformation of intact yeast cells. *Nucleic Acids Res*, 20(6), 1425.
- Goddard, M. R., Godfray, H. C., & Burt, A. (2005). Sex increases the efficacy of natural selection in experimental yeast populations. *Nature*, 434(7033), 636-640. doi: nature03405 [pii] 10.1038/nature03405
- Gudlaugsson, O., Gillespie, S., Lee, K., Vande Berg, J., Hu, J., Messer, S., . . . Diekema, D. (2003). Attributable mortality of nosocomial candidemia, revisited. *Clin Infect Dis*, 37(9), 1172-1177. doi: 10.1086/378745
- Haber, J. E. (1998). Mating-type gene switching in *Saccharomyces cerevisiae*. *Annu Rev Genet*, 32, 561-599. doi: 10.1146/annurev.genet.32.1.561
- Haber, J. E. (2012). Mating-type genes and MAT switching in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*, 191(1), 33-64. doi: 10.1534/genetics.111.134577
- Hartig, A., Holly, J., Saari, G., & MacKay, V. L. (1986). Multiple regulation of STE2, a mating-type-specific gene of *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol*, 6(6), 2106-2114.
- Hayles, J., & Nurse, P. (1992). Genetics of the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Annu Rev Genet*, 26, 373-402. doi: 10.1146/annurev.ge.26.120192.002105
- Herskowitz, I. (1988). Life cycle of the budding yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol Rev*, 52(4), 536-553.

- Herskowitz, I. (1989). A regulatory hierarchy for cell specialization in yeast. *Nature*, 342(6251), 749-757. doi: 10.1038/342749a0
- Horn, D. L., Neofytos, D., Anaissie, E. J., Fishman, J. A., Steinbach, W. J., Olyaei, A. J., . . . Webster, K. M. (2009). Epidemiology and outcomes of candidemia in 2019 patients: data from the prospective antifungal therapy alliance registry. *Clin Infect Dis*, 48(12), 1695-1703. doi: 10.1086/599039
- Hoyer, L. L., Green, C. B., Oh, S. H., & Zhao, X. (2008). Discovering the secrets of the *Candida albicans* agglutinin-like sequence (ALS) gene family--a sticky pursuit. *Med Mycol*, 46(1), 1-15. doi: 10.1080/13693780701435317
- Hull, C. M., Raisner, R. M., & Johnson, A. D. (2000). Evidence for mating of the "asexual" yeast *Candida albicans* in a mammalian host. *Science*, 289(5477), 307-310. doi: 8669 [pii]
- Johnson, A. (2003). The biology of mating in *Candida albicans*. *Nat Rev Microbiol*, 1(2), 106-116. doi: 10.1038/nrmicro752
- Johnson, A. D. (1995). Molecular mechanisms of cell-type determination in budding yeast. *Curr Opin Genet Dev*, 5(5), 552-558.
- Kantarcioglu, A. S., & Yucel, A. (2002). Phospholipase and protease activities in clinical *Candida* isolates with reference to the sources of strains. *Mycoses*, 45(5-6), 160-165.
- Kaur, R., Castano, I., & Cormack, B. P. (2004). Functional genomic analysis of fluconazole susceptibility in the pathogenic yeast *Candida glabrata*: roles of calcium signaling and mitochondria. *Antimicrob Agents Chemother*, 48(5), 1600-1613.
- Kaur, R., Domergue, R., Zupancic, M. L., & Cormack, B. P. (2005). A yeast by any other name: *Candida glabrata* and its interaction with the host. *Curr Opin Microbiol*, 8(4), 378-384. doi: 10.1016/j.mib.2005.06.012
- Kaur, R., Ma, B., & Cormack, B. P. (2007). A family of glycosylphosphatidylinositol-linked aspartyl proteases is required for virulence of *Candida glabrata*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 104(18), 7628-7633. doi: 10.1073/pnas.0611195104
- Kelly, M., Burke, J., Smith, M., Klar, A., & Beach, D. (1988). Four mating-type genes control sexual differentiation in the fission yeast. *EMBO J*, 7(5), 1537-1547.
- Kwon-Chung, K. J., Edman, J. C., & Wickes, B. L. (1992). Genetic association of mating types and virulence in *Cryptococcus neoformans*. *Infect Immun*, 60(2), 602-605.
- Lass-Florl, C. (2009). The changing face of epidemiology of invasive fungal disease in Europe. *Mycoses*, 52(3), 197-205.
- Lavaniegos-Sobrino, M. T., Ramirez-Zavaleta, C. Y., Ponce de Leon, A., Sifuentes-Osornio, J., Bobadilla-Del Valle, M., Rangel-Cordero, A., . . . Castano, I. (2009). Genotyping of the MTL loci and susceptibility to two antifungal agents of *Candida glabrata* clinical isolates. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 104(5), 775-782.
- Lee, S. C., Ni, M., Li, W., Shertz, C., & Heitman, J. (2010). The evolution of sex: a perspective from the fungal kingdom. *Microbiol Mol Biol Rev*, 74(2), 298-340. doi: 10.1128/MMBR.00005-10
- Lengeler, K. B., Davidson, R. C., D'Souza, C., Harashima, T., Shen, W. C., Wang, P., . . . Heitman, J. (2000). Signal transduction cascades regulating fungal development and virulence. *Microbiol Mol Biol Rev*, 64(4), 746-785.

- Magee, B. B., & Magee, P. T. (2000). Induction of mating in *Candida albicans* by construction of MTL α and MTL α strains. *Science*, 289(5477), 310-313. doi: 8662 [pii]
- Mathias, J. R., Zhong, H., Jin, Y., & Vershon, A. K. (2001). Altering the DNA-binding specificity of the yeast Matalpha 2 homeodomain protein. *J Biol Chem*, 276(35), 32696-32703. doi: 10.1074/jbc.M103097200
- Metzenberg, R. L., & Glass, N. L. (1990). Mating type and mating strategies in *Neurospora*. *Bioessays*, 12(2), 53-59. doi: 10.1002/bies.950120202
- Miller, M. G., & Johnson, A. D. (2002). White-opaque switching in *Candida albicans* is controlled by mating-type locus homeodomain proteins and allows efficient mating. *Cell*, 110(3), 293-302.
- Morschhauser, J. (2010). Regulation of multidrug resistance in pathogenic fungi. *Fungal Genet Biol*, 47(2), 94-106. doi: 10.1016/j.fgb.2009.08.002
- Nielsen, K., & Heitman, J. (2007). Sex and virulence of human pathogenic fungi. *Adv Genet*, 57, 143-173. doi: 10.1016/S0065-2660(06)57004-X
- O'Gorman, C. M., Fuller, H., & Dyer, P. S. (2009). Discovery of a sexual cycle in the opportunistic fungal pathogen *Aspergillus fumigatus*. *Nature*, 457(7228), 471-474. doi: 10.1038/nature07528
- Orta-Zavalza, E., Guerrero-Serrano, G., Gutierrez-Escobedo, G., Canas-Villamar, I., Juarez-Cepeda, J., Castano, I., & De Las Penas, A. (2013). Local silencing controls the oxidative stress response and the multidrug resistance in *Candida glabrata*. *Mol Microbiol*, 88(6), 1135-1148. doi: 10.1111/mmi.12247
- Paoletti, M., Rydholm, C., Schwier, E. U., Anderson, M. J., Szakacs, G., Lutzoni, F., . . . Dyer, P. S. (2005). Evidence for sexuality in the opportunistic fungal pathogen *Aspergillus fumigatus*. *Curr Biol*, 15(13), 1242-1248. doi: S0960-9822(05)00560-9 [pii]
10.1016/j.cub.2005.05.045
- Pappas, P. G., Rex, J. H., Sobel, J. D., Filler, S. G., Dismukes, W. E., Walsh, T. J., . . . Infectious Diseases Society of America. (2004). Guidelines for treatment of candidiasis. *Clin Infect Dis*, 38(2), 161-189. doi: 10.1086/380796
- Pfaller, M. A., & Diekema, D. J. (2004). Rare and emerging opportunistic fungal pathogens: concern for resistance beyond *Candida albicans* and *Aspergillus fumigatus*. *J Clin Microbiol*, 42(10), 4419-4431. doi: 10.1128/JCM.42.10.4419-4431.2004
- Pfaller, M. A., & Diekema, D. J. (2007). Epidemiology of invasive candidiasis: a persistent public health problem. *Clin Microbiol Rev*, 20(1), 133-163. doi: 10.1128/CMR.00029-06
- Pfaller, M. A., & Diekema, D. J. (2012). Progress in antifungal susceptibility testing of *Candida* spp. by use of Clinical and Laboratory Standards Institute broth microdilution methods, 2010 to 2012. *J Clin Microbiol*, 50(9), 2846-2856. doi: 10.1128/JCM.00937-12
- Ramirez-Zavaleta, C. Y., Salas-Delgado, G. E., De Las Penas, A., & Castano, I. (2010). Subtelomeric silencing of the MTL3 locus of *Candida glabrata* requires yKu70, yKu80, and Rif1 proteins. *Eukaryot Cell*, 9(10), 1602-1611. doi: 10.1128/EC.00129-10

- Richardson, M. D. (2005). Changing patterns and trends in systemic fungal infections. *J Antimicrob Chemother*, *56 Suppl 1*, i5-i11. doi: 10.1093/jac/dki218
- Richardson, M., & Lass-Flörl, C. (2008). Changing epidemiology of systemic fungal infections. *Clin Microbiol Infect*, *14 Suppl 4*, 5-24. doi: 10.1111/j.1469-0691.2008.01978.x
- Schwartz, M. A., & Madhani, H. D. (2004). Principles of MAP kinase signaling specificity in *Saccharomyces cerevisiae*. *Annu Rev Genet*, *38*, 725-748. doi: 10.1146/annurev.genet.39.073003.112634
- Sherwood, R. K., & Bennett, R. J. (2009). Fungal meiosis and parasexual reproduction--lessons from pathogenic yeast. *Curr Opin Microbiol*, *12(6)*, 599-607. doi: 10.1016/j.mib.2009.09.005
- Sikorski, R. S., & Hieter, P. (1989). A system of shuttle vectors and yeast host strains designed for efficient manipulation of DNA in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*, *122(1)*, 19-27.
- Soll, D. R. (2004). Mating-type locus homozygosity, phenotypic switching and mating: a unique sequence of dependencies in *Candida albicans*. *Bioessays*, *26(1)*, 10-20. doi: 10.1002/bies.10379
- Sprague, G. F., Jr., Jensen, R., & Herskowitz, I. (1983). Control of yeast cell type by the mating type locus: positive regulation of the alpha-specific STE3 gene by the MAT alpha 1 product. *Cell*, *32(2)*, 409-415.
- Srikantha, T., Lachke, S. A., & Soll, D. R. (2003). Three mating type-like loci in *Candida glabrata*. *Eukaryot Cell*, *2(2)*, 328-340.
- Strathern, J., Hicks, J., & Herskowitz, I. (1981). Control of cell type in yeast by the mating type locus. The alpha 1-alpha 2 hypothesis. *J Mol Biol*, *147(3)*, 357-372.
- Tang, H. J., Liu, W. L., Lin, H. L., & Lai, C. C. (2014). Epidemiology and prognostic factors of candidemia in cancer patients. *PLoS One*, *9(6)*, e99103. doi: 10.1371/journal.pone.0099103
- Tortorano, A. M., Prigitano, A., Lazzarini, C., Passera, M., Deiana, M. L., Cavinato, S., . . . Montagna, M. T. (2013). A 1-year prospective survey of candidemia in Italy and changing epidemiology over one decade. *Infection*, *41(3)*, 655-662. doi: 10.1007/s15010-013-0455-6
- Wilson, K. L., & Herskowitz, I. (1984). Negative regulation of STE6 gene expression by the alpha 2 product of *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol*, *4(11)*, 2420-2427.
- Wisplinghoff, H., Bischoff, T., Tallent, S. M., Seifert, H., Wenzel, R. P., & Edmond, M. B. (2004). Nosocomial bloodstream infections in US hospitals: analysis of 24,179 cases from a prospective nationwide surveillance study. *Clin Infect Dis*, *39(3)*, 309-317. doi: 10.1086/421946
- Wong, S., Fares, M. A., Zimmermann, W., Butler, G., & Wolfe, K. H. (2003). Evidence from comparative genomics for a complete sexual cycle in the 'asexual' pathogenic yeast *Candida glabrata*. *Genome Biol*, *4(2)*, R10.
- Yapar, N. (2014). Epidemiology and risk factors for invasive candidiasis. *Ther Clin Risk Manag*, *10*, 95-105. doi: 10.2147/TCRM.S40160
- Zilberberg, M. D., Shorr, A. F., & Kollef, M. H. (2008). Growth and geographic

variation in hospitalizations with resistant infections, United States, 2000-2005.
Emerg Infect Dis, 14(11), 1756-1758. doi: 10.3201/eid1411.080337

Zordan, R. E., Ren, Y., Pan, S. J., Rotondo, G., De Las Penas, A., Iluore, J., &
Cormack, B. P. (2013). Expression plasmids for use in *Candida glabrata*. *G3*
(Bethesda), 3(10), 1675-1686. doi: 10.1534/g3.113.006908

13 Anexos

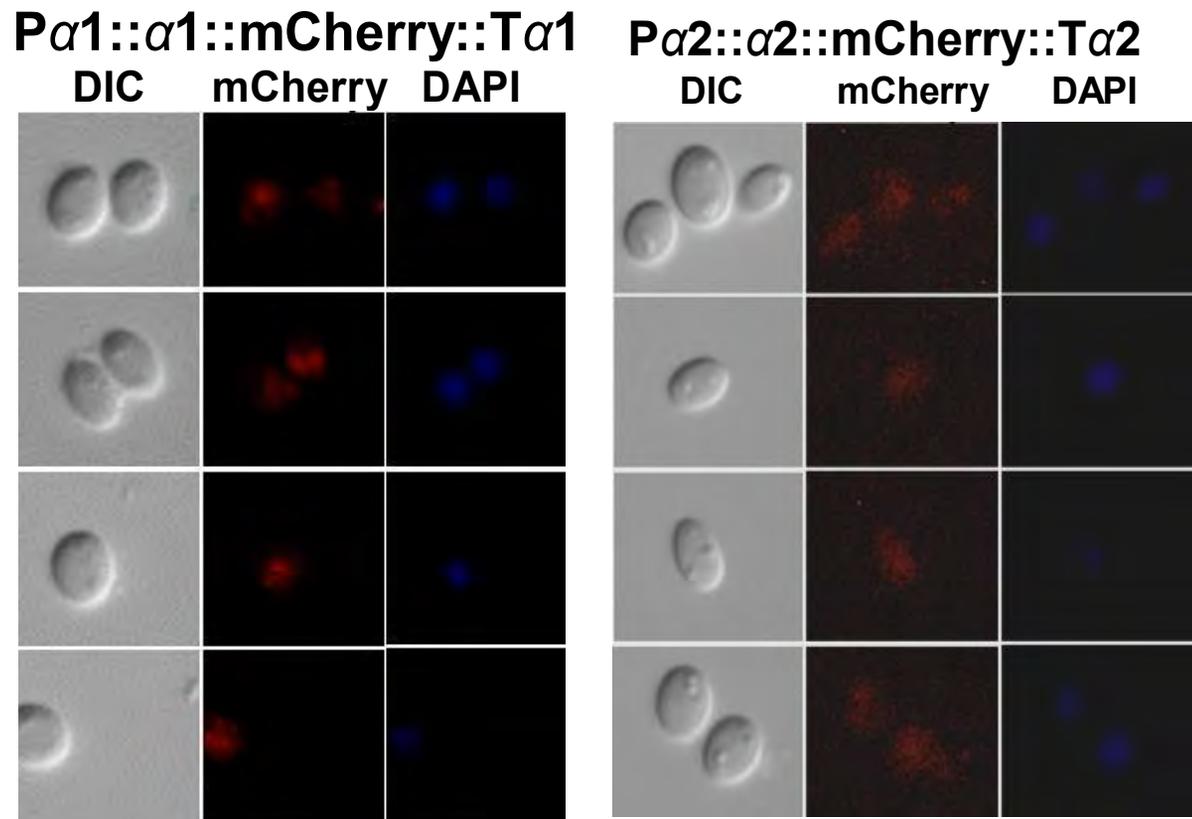


Figura 22. Proteínas alfa1 y alfa2 etiquetadas con mCherry.

La fusión traduccional está dirigida bajo el promotor nativo de cada gen. La fluorescencia de mCherry colocaliza con la tinción nuclear (DAPI). La fusión alfa1-cherry se encuentra contenida en el vector pYC100. La fusión alfa2-cherry se encuentra en el vector pYC105.

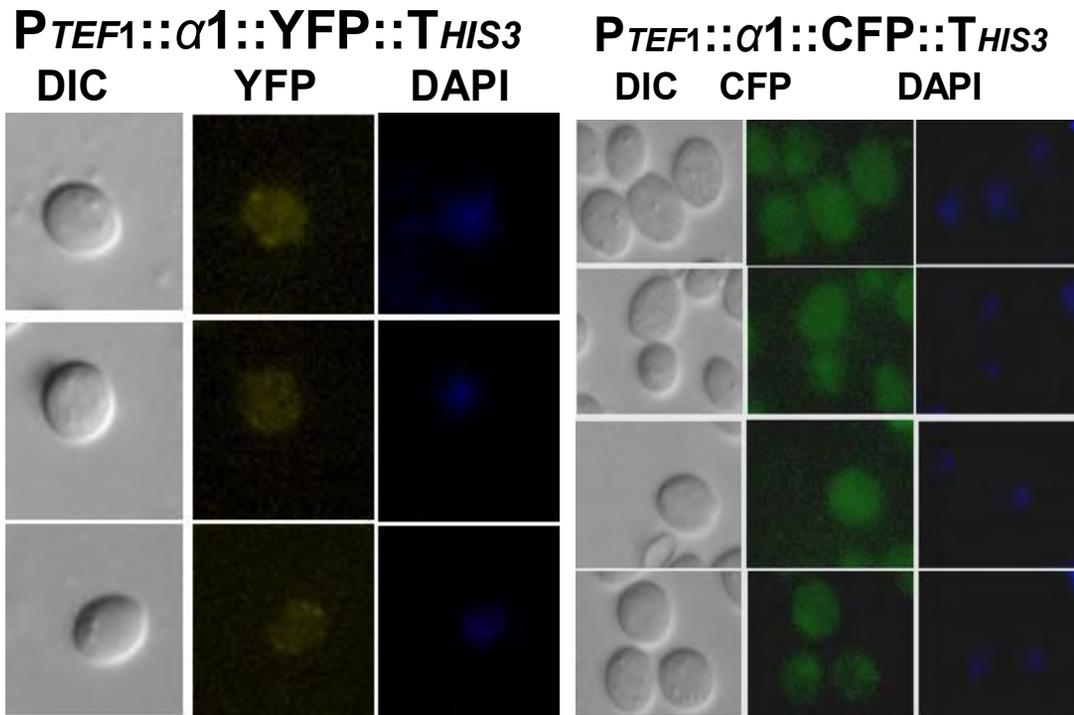


Figura 23. Sobreexpresión de la proteína alfa1 etiquetada con YFP y CFP. Las fusiones traduccionales se encuentran bajo el promotor constitutivo *TEF1* de *S. cerevisiae*. La señal de fluorescencia se encuentra distribuida en toda la célula. La fusión alfa1-YFP se encuentra contenida en el vector pYC188. La fusión alfa1-CFP se encuentra en el vector pYC190.

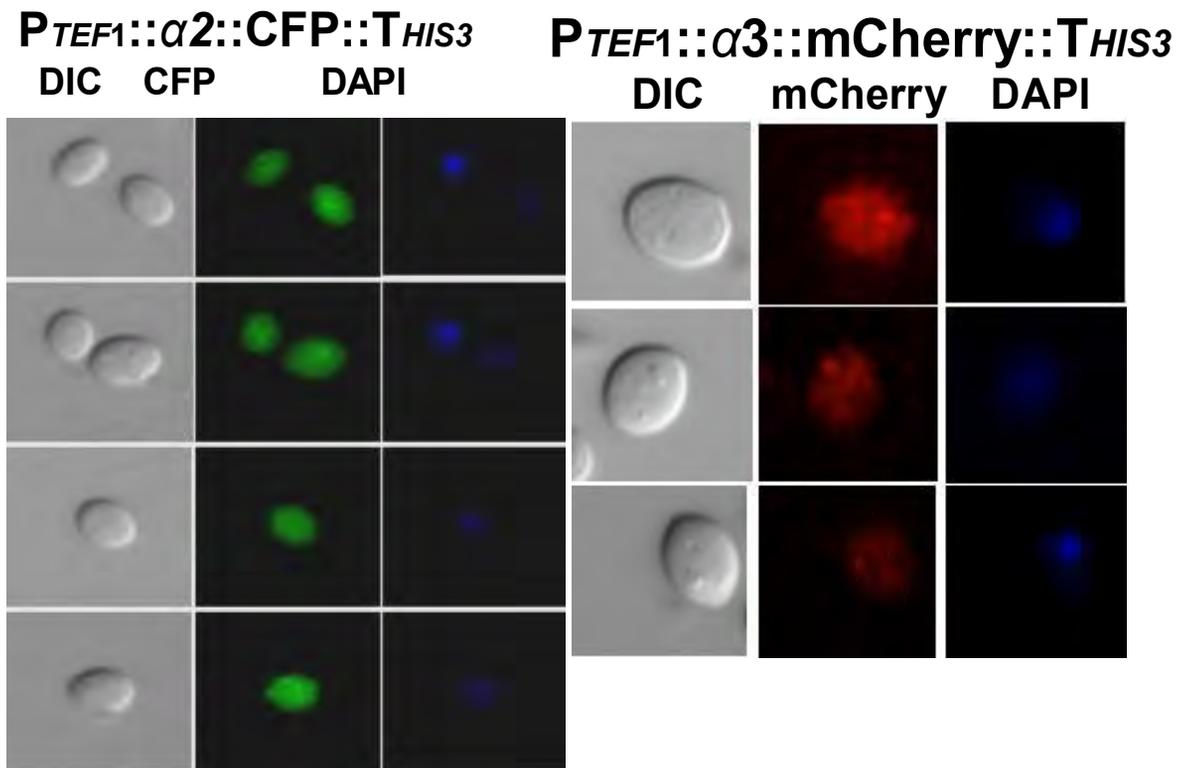


Figura 24. Sobreexpresión de las proteínas alfa2 y alfa3 etiquetadas con YFP y CFP. Las fusiones traduccionales se encuentran bajo el promotor constitutivo *TEF1* de *S. cerevisiae*. La señal de fluorescencia se encuentra distribuida en toda la célula. La fusión alfa2-CFP se encuentra contenida en el vector pYC118. La fusión alfa3-Cherry se encuentra contenida en el vector pYC187.

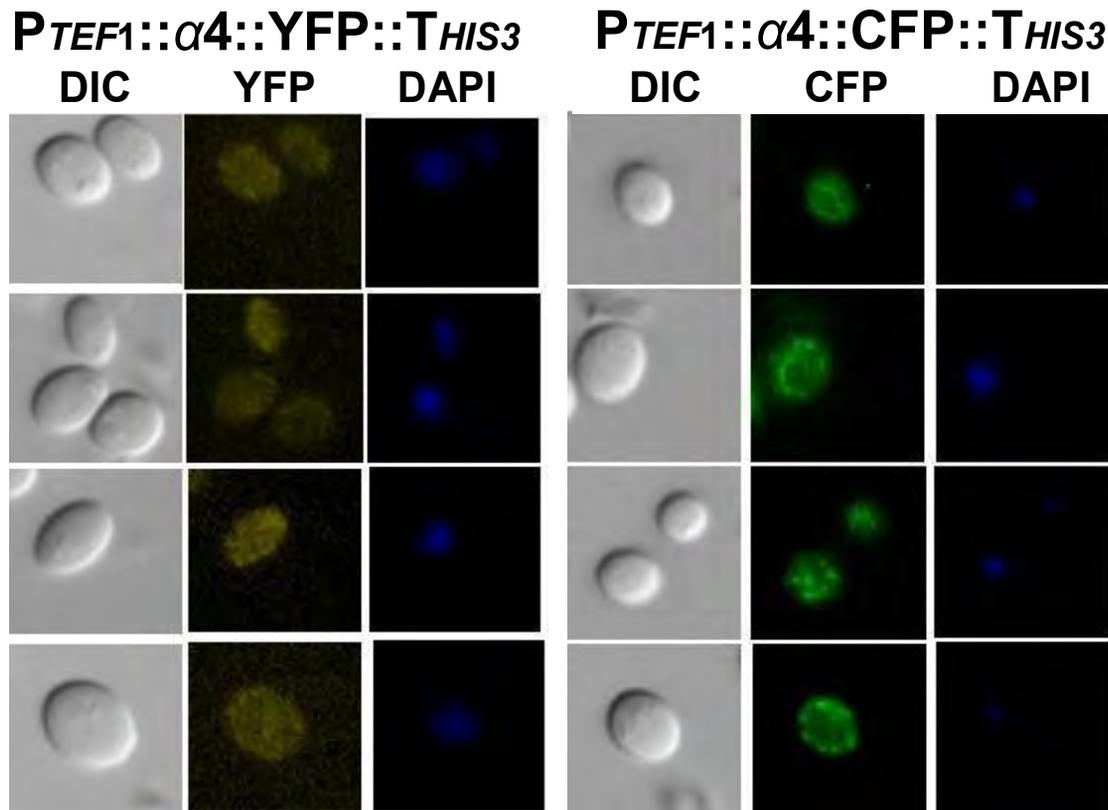


Figura 25. Sobreexpresión de la proteína alfa4 etiquetada con YFP y CFP. Las fusiones traduccionales se encuentran bajo el promotor constitutivo *TEF1* de *S. cerevisiae*. La señal de fluorescencia se encuentra distribuída en toda la célula. La fusión sobreexpresante alfa4-YFP se encuentra en el vector pYC201. La fusión alfa4-CFP se encuentra en el vector pYC190.

Tabla 9. Vectores construidos y cepas transformantes de <i>E. coli</i> DH10 obtenidas							
NOMBRE DEL VECTOR	NÚMERO DE CEPA	TIPO DE BACTE	Clona	VECTOR BASE	INSERTO	RE	NOTA
pYC8	2775	DH10	9	pMB11-Stu	MTL2 AC16 (#774,#181) 1.9 Kb	Cm	Para secuenciar MTL2 de AC16
pYC9	2776	DH10	9	pMB11-Stu	MTL2 AC73 (#774,#181) 1.9 Kb	Cm	Para secuenciar MTL2 de AC73
pYC10 pYC11	2777 2778	DH10	18 17	pCRTOPO-NAT-Sac/Spe/T4		Amp	Para eliminar un sitio BamHI del casete de NAT
pYC12 pYC13	2785 2786	DH10	20 21	pGRB2.1 Sac/Xba	Fragmento PTEF de pTP3 Sac/Xba/pg	Amp	Vector base para construir los vectores sobreexpresantes
pYC14 pYC15	2792 2793	DH10	28 30	pYC10 Bam/T4		Amp	Para eliminar el segundo sitio BamHI del casete de NAT
pYC16 pYC17	2794 2795	DH10	1 3	pYC12 BamHI/CIP/pg	Fragmento CFP de pMB79 Bam/Bgl2/pg	Amp	Vector sobreexpresante de CFP. Sí es funcional
pYC18 pYC19	2796 2797	DH10	5 6	pYC12 BamHI/CIP/pg	Fragmento (GA)5 CFP de pMB76 Bam/Bgl2/pg	Amp	Vector sobreexpresante de (GA)5 CFP. No es funcional
pYC20 pYC21	2814 2815	DH10	6 7	pYC12 BamHI/CIP/pg	Fragmento (GA)5 YFP de pMB76 Bam/Bgl2/pg	Amp	Vector sobreexpresante de (GA)5 YFP. No es funcional
pYC22 pYC27	2816 2857	DH10	8 16	pYC14 Sal/T4		Amp	Para eliminar sitio Sal del casete de NAT
pYC23 pYC24	2839 2840	DH10	2 10	pYC22 XhoI/CIP/pg	Fragmento PTEF-3UTR de Ashbya amplificado de pYC22 (#1097, #1098) Sal/Xho/pg	Amp	Vector molde del casete de NAT modificado
pYC25 pYC26	2847 2848	DH10	1 2	pYC12 BamHI/CIP/pg	Fragmento YFP de pMB74 Bam/Bgl2/pg	Amp	Vector sobreexpresante de YFP. Sí es funcional
pYC28 pYC29	2871 2872	DH10	12 30	pMB11-Stu	Fragmento (GA)5 cherry amplificado de pBS34 (#953,#954)	Cm	Vector para subconar GA-cherry
pYC30 pYC31	2873 2874	DH10	21 26	pMB11-Stu	Fragmento cherry amplificado de pBS34 (#952,#954)	Cm	Vector para subconar cherry
pYC32 pYC33	2889 2890	DH10	6 14	pYC12 BamHI/CIP/pg	Fragmento GA-cherry de pYC28 Bam/Bgl2/pg	Amp	Vector sobreexpresante de GA-cherry. No es funcional
pYC34 pYC35	2891 2892	DH10	8 17	pYC12 BamHI/CIP/pg	Fragmento cherry de pYC30 Bam/Bgl2/pg	Amp	Vector sobreexpresante de cherry. Sí es funcional

Expresión y localización intracelular de las proteínas codificadas en los *loci* de apareamiento de *C. glabrata*
 Patricia Yáñez Carrillo

pYC36 pYC37	2916 2917	DH10	6 9	pMB11-Stu	Fragmento NAT modificado (#1307,#1098)	Cm	Vector para subconar NAT modificado
pYC38 pYC39	2924 2925	DH10	17 20	pGRB2.0- Xho/Bam	Fragmento NAT modificado de pYC36 (Bam/Xho)	Amp	Vector episomal con NAT modificado
pYC40 pYC41	2926 2927	DH10	2 3	pRS306 Bam/Xho	Fragmento NAT modificado de pYC36 (Bam/Xho)	Amp	Vector integrativo con NAT modificado
pYC42 pYC43	2942 2943	DH10	3 2	pMJ22 Bam/CIP/pg	Fragmento cherry de pYC30 (Bam/Bgl2)	Amp Nat	Vector episomal para fusiones traduccionales con cherry en el C terminal
pYC44 pYC45	2944 2945	DH10	1 3	pYC40 Bam/CIP/pg	Fragmento 3UTR-FRT- CTA amplificado de pOZ12 (#351,#465)	Amp Nat	Vector integrativo receptor de fluoróforos y tags con NAT modificado
pYC46 pYC47	2951 2952	DH10	1 3	pYC44 Bam/Nhe/pg	Fragmento FLAG-3UTR- FRT- CTA dig de pGE36 Bam/Nhe	Amp Nat	Vector integrativo para fusiones con FLAG
pYC48 pYC49	2953 2954	DH10	5 8	pYC44 Bam/Nhe/pg	Fragmento HA-3UTR- FRT- CTA dig de pGE36 Bam/Nhe	Amp Nat	Vector integrativo para fusiones con HA
pYC50 pYC51	2955 2956	DH10	1 4	pYC44 Bam/Nhe/pg	Fragmento Myc-3UTR- FRT- CTA dig de pGE36 Bam/Nhe	Amp Nat	Vector integrativo para fusiones con MYC
pYC52 pYC53	2961 2962	DH10	1 2	pYC44 Bam/CIP/pg	Fragmento CFP Bam/Bgl2 de pMB79	Amp Nat	Vector integrativo para fusiones con CFP
pYC54	2963	DH10	4	pYC44 Bam/CIP/pg	Fragmento YFP Bam/Bgl2 de pMB79	Amp Nat	Vector integrativo para fusiones con YFP
pYC55 pYC58 pYC59 pYC60	2972 2975 2976 2977	DH10	6 31 34 42	pMJ22 Bam/CIP/pg	Fragmento YFP Bam/Bgl2/pg de pMB74	Amp Nat	Vector replicativo para fusiones con YFP
pYC56 pYC57	2973	DH10	15	pYC44 Bam/CIP/pg	Fragmento cherry Bam/Bgl2 de pYC30	Amp Nat	Vector integrativo para fusiones con Cherry
pYC61	2978	DH10	2	pMJ22 Bam/CIP/pg	Fragmento CFP Bam/Bgl2/pg de pMB79	Amp Nat	Vector replicativo para fusiones con CFP
pYC62 pYC63	2979 2980	DH10	1 6	pMJ22 Bam/Xba/pg	Fragmento HA Bam/Xba/pg de pGE33	Amp Nat	Vector replicativo para fusiones con HA
pYC64 pYC65	2981 2982	DH10	1 2	pMJ22 Bam/Xba/pg	Fragmento FLAG Bam/Xba/pg de pGE36	Amp Nat	Vector replicativo para fusiones con FLAG
pYC66 pYC67	2983 2984	DH10	1 2	pMJ22 Bam/Xba/pg	Fragmento Myc Bam/Xba/pg de pOZ18	Amp Nat	Vector replicativo para fusiones con MYC

Expresión y localización intracelular de las proteínas codificadas en los *loci* de apareamiento de *C. glabrata*
 Patricia Yáñez Carrillo

pYC68 pYC69	2987 2988	DH10	3 7	pYC55 Bam/EcoRI/ pg	Fragmento ALFA2 (#1387 #890) Bam/EcoRI/pg de CBS138	Amp Nat	Vector replicativo con la fusión YFP-ALFA2
pYC70 pYC71	2989 2990	DH10	4 6	pYC61 Bam/EcoRI/ pg	Fragmento ALFA2 (#1387 #890) Bam/EcoRI/pg de CBS138	Amp Nat	Vector replicativo con la fusión CFP-ALFA2
pYC72 pYC73	2991 2992	DH10	1 5	pYC55 Bam/EcoRI/ pg	Fragmento ALFA3 (#1387 #897) Bam/EcoRI/pg de CGM1	Amp Nat	Vector replicativo con la fusión YFP-ALFA3
pYC74 pYC75	2993 2994	DH10	3 4	pYC61 Bam/EcoRI/ pg	Fragmento ALFA3 (#1387 #897) Bam/EcoRI/pg de CGM1	Amp Nat	Vector replicativo con la fusión CFP-ALFA3
pYC76 pYC77	2995 2996	DH10	1 3	pYC42 Bam/EcoRI/ pg	Fragmento ALFA3 (#1387 #897) Bam/EcoRI/pg de CBS138	Amp Nat	Vector replicativo con la fusión CHERRY-ALFA3
pYC78 pYC79	2997 2998	DH10	1 2	pYC55 Bam/EcoRI/ pg	Fragmento ALFA4 (#1336 #1392) Bam/EcoRI/pg de AC16	Amp Nat	Vector replicativo con la fusión YFP-ALFA4
pYC80 pYC81	2999 3000	DH10	3 4	pYC61 Bam/EcoRI/ pg	Fragmento ALFA4 (#1336 #1392) Bam/EcoRI/pg de AC16	Amp Nat	Vector replicativo con la fusión CFP-ALFA4
pYC82 pYC83	3001 3002	DH10	2 5	pYC42 Bam/EcoRI/ pg	Fragmento ALFA4 (#1336 #1392) Bam/EcoRI/pg de AC16	Amp Nat	Vector replicativo con la fusión CHERRY-ALFA4
pYC84 pYC85	3003 3004	DH10	1 6	pYC42 Bam/EcoRI/ pg	Fragmento ALFA2 (#1387 #890) Bam/EcoRI/pg de CBS138	Amp Nat	Vector replicativo con la fusión CHERRY-ALFA2
pYC86 pYC87	3005 3006	DH10	8 1	pYC62 Bam/EcoRV/ pg	Fragmento ALFA1 (#882 #883) Bam/pg de CGM1	Amp Nat	Vector replicativo con la fusión HA-ALFA1
pYC88 pYC89	3007 3008	DH10	9 1	pYC66 Bam/EcoRV/ pg	Fragmento ALFA1 (#882 #883) Bam/EcoRV/p g de CGM1	Amp Nat	Vector replicativo con la fusión MYC-ALFA1
pYC90 pYC91	3009 3010	DH10	4 7	pYC42 Bam/EcoRV/ pg	Fragmento ALFA1 (#882 #883) Bam/pg de CGM1	Amp Nat	Vector replicativo con la fusión CHERRY-ALFA1
pYC92	3011	DH10	8	pYC64 Bam/EcoRV/ pg	Fragmento ALFA1 (#882 #883) Bam/pg de CGM1	Amp Nat	Vector replicativo con la fusión FLAG-ALFA1
pYC93 pYC94 pYC95	3018 3019 3020	DH10	8 4 1	pYC62 Bam/EcoRI/ pg	Fragmento ALFA2	Amp Nat	Vector replicativo con la fusión HA-ALFA2

Expresión y localización intracelular de las proteínas codificadas en los *loci* de apareamiento de *C. glabrata*
 Patricia Yáñez Carrillo

					(#1387 #890) Bam/pg de CBS138		
pYC97	3021	DH10	1	pYC62 Bam/EcoRI/ pg	Fragmento ALFA4 (#1392 #1336) Bam/RI/pg de AC16	Amp Nat	Vector replicativo con la fusión HA-ALFA4
pYC98 pYC99	3022 3023	DH10	5 6	pYC64 Bam/EcoRI/ pg	Fragmento ALFA4 (#1392 #1336) Bam/RI/pg de AC16	Amp Nat	Vector replicativo con la fusión FLAG-ALFA4
pAC1 pAC2	3035 3036	DH10	5 8	pYC44 Bam/Spel/p g	5'MAT #1407 y #1406 Bam/Spe cepa L20 (alfa)	Amp NAT	Vector integrativo para construir mutante del <i>locus</i> MAT alfa (SOLO 5')
pAC3 pAC4	3037 3038	DH10	9 11	pYC44 Bam/Spe/pg	5'MAT #1407 y #1406 Xho/Kpn cepa L22 (a)	Amp NAT	Vector integrativo para construir mutante del <i>locus</i> MAT a (SOLO 5')
pAC5 pAC6	3041 3042	DH10	7 13	pAC1 Xho/Kpn/pg	3'MAT #1408 y #1409 Xho/Kpn cepa L20 (alfa)	Amp NAT	Vector integrativo para construir mutante del <i>locus</i> MAT alfa (con 5' y 3')
pAC7 pAC8	3043 3044	DH10	5 11	pAC3 Xho/Kpn/pg	3'MAT #1408 y #1409 Xho/Kpn cepa L22 (a)	Amp NAT	Vector integrativo para construir mutante del <i>locus</i> MAT a (con 5' y 3')
pYC100 pYC101	3051 3052	DH10	17 20	pYC90 Xba/CIP/pg	3UTR alfa1 #320 #1386 Xba/pg	Amp NAT	Vector replicativo de la fusión traduccional cherry-alfa1
pYC102 pYC103 pYC104	3053 3054 3055	DH10	24 26 29	pYC88 Xba/CIP/pg	3UTR alfa1 #320 #1386 Xba/pg	Amp NAT	Vector replicativo de la fusión traduccional MYC-alfa1
pYC105 pYC106 pYC107	3056 3057 3058	DH10	1 5 9	pYC84 Xba/CIP/pg	3UTR alfa2 #1389 #1388 Xba/pg	Amp NAT	Vector replicativo de la fusión traduccional cherry-alfa2
pYC108	3059	DH10	44	pYC93 Xba/CIP/pg	3UTR alfa2 #1389 #1388 Xba/pg	Amp NAT	Vector replicativo de la fusión traduccional HA- alfa2
pYC109 pYC110 pYC111	3060 3061 3062	DH10	1 3 8	pYC55 Bam/RV/pg	Fragmento alfa1 #882 #883 Bam/pg	Amp NAT	Vector replicativo de la fusión traduccional YFP- alfa1 sin terminador
pYC112 pYC113 pYC114	3063 3064 3065	DH10	21 22 37	pYC61 Bam/RV/pg	Fragmento alfa1 #882 #883 Bam/pg	Amp NAT	Vector replicativo de la fusión traduccional CFP- alfa1 sin terminador
pYC115 pYC116	3066 3067	DH10	1 2	pYC64 Bam/RI/pg	Fragmento alfa 1 #1387 #890 Bam/RI/pg	Amp NAT	Vector replicativo de la fusión traduccional FLAG-alfa2 sin terminador
pYC117	3068	DH10	8	pYC64 Bam/RI/pg	Fragmento alfa3 #1387 #897 Bam/RI/pg	Amp NAT	Vector replicativo de la fusión traduccional FLAG-alfa3 sin terminador
pYC118	3092	DH10	7	pYC16 Spe/Klenow/ CIP/bam/pg	Fragmento alfa2 #334 #890 Bam/pg	Amp URA3 NAT	Vector sobreexpresante de la fusión traduccional alfa2-CFP
pYC119 pYC120	3099 3100	DH10	10 48	pYC12 Bam/CIP/pg	Fragmento FLAG #405 #406 Bam/Bgl2/pg	Amp URA3 NAT	Vector base sobreexpresante de FLAG. Revisada orientación por secuencia.
pYC121	3103	DH10	46	pYC12 Sma/Bam/p g	Fragmento Myc producto de la digestión	Amp URA3 NAT	Vector base sobreexpresante de MYC. Revisada

Expresión y localización intracelular de las proteínas codificadas en los *loci* de apareamiento de *C. glabrata*
 Patricia Yáñez Carrillo

					de pYC66 Xba/klenow/B am/pg		orientación por DIGESTIÓN
pYC122 pYC123	3104 3105	DH10	1 2	pYC16 Xba/Bam/pg	Fragmento HIS3 #1495 Y #1496 Xba/Bam/pg	Amp URA3 NAT	Vector sobreexpresante de la fusión HIS3::CFP
pYC124 pYC125	3106 3107	DH10	9 10	Pyc25 Xba/Bam/pg	Fragmento HIS3 #1495 Y #1496 Xba/Bam/pg	Amp URA3 NAT	Vector sobreexpresante de la fusión HIS3::YFP
pYC126 pYC127	3108 3109	DH10	17 18	pYC34 Xba/Bam/pg	Fragmento HIS3 #1495 Y #1496 Xba/Bam/pg	Amp URA3 NAT	Vector sobreexpresante de la fusión HIS3::Cherry
pYC128 pYC129	3110 3111	DH10	25 26	pYC119 Xba/Bam/pg	Fragmento HIS3 #1495 Y #1496 Xba/Bam/pg	Amp URA3 NAT	Vector sobreexpresante de la fusión HIS3::FLAG
pYC130 pYC131	3112 3113	DH10	36 37	pYC121 Xba/Bam/pg	Fragmento HIS3 #1495 Y #1496 Xba/Bam/pg	Amp URA3 NAT	Vector sobreexpresante de la fusión HIS3::MYC
pYC132 pYC133	3114 3115	DH10	13 15	pYC25 Xba/Bam/pg	Fragmento TRP1 #1503 Y #1504 Xba/Bam/pg	Amp URA3 NAT	Vector sobreexpresante de la fusión TRP1::YFP
pYC134 pYC135	3116 3117	DH10	24 75	Pyc34 Xba/bam/pg	Fragmento TRP1 #1503 Y #1504 Xba/Bam/pg	Amp URA3 NAT	Vector sobreexpresante de la fusión TRP1::Cherry
pYC136 pYC137	3118 3119	DH10	27 30	pYC119 Xba/bam/pg	Fragmento TRP1 #1503 Y #1504 Xba/Bam/pg	Amp URA3 NAT	Vector sobreexpresante de la fusión TRP1::FLAG
pYC138	3120	DH10	37	pYC121 Xba/bam/pg	Fragmento TRP1 #1503 Y #1504 Xba/Bam/pg	Amp URA3 NAT	Vector sobreexpresante de la fusión TRP1::MYC
pYC139 pYC140	3121 3122	DH10	1 11	pYC42 RV/bam/pg	Fragmento P+his3 #1494 Y #1496 Bam/pg	Amp NAT	Vector replicativo con la fusión HIS3::CHERRY
pYC141	3123	DH10	16	pYC61 RV/bam/pg	Fragmento P+his3 #1494 Y #1496 Bam/pg	Amp NAT	Vector replicativo con la fusión HIS3::CFP
pYC142 pYC143	3124 3125	DH10	19 22	pYC62 RV/bam/pg	Fragmento P+his3 #1494 Y #1496 Bam/pg	Amp NAT	Vector replicativo con la fusión HIS3::HA
pYC144 pYC145	3126 3127	DH10	42 48	pYC64 RV/bam/pg	Fragmento P+his3 #1494 Y #1496 Bam/pg	Amp NAT	Vector replicativo con la fusión HIS3::FLAG
pYC146 pYC147	3128 3129	DH10	63 64	pYC66 RV/bam/pg	Fragmento P+his3 #1494 Y #1496 Bam/pg	Amp NAT	Vector replicativo con la fusión HIS3::MYC
pYC148	3130	DH10	6	pYC42 RV/Bam/pg	Fragmento P+TRP #1502 Y #1504 Bam/pg	Amp NAT	Vector replicativo con la fusión TRP::cherry
pYC149 pYC150 pYC151	3131 3132 3133	DH10	7 12 13	pYC61 RV/Bam/pg	Fragmento P+TRP #1502 Y #1504 Bam/pg	Amp NAT	Vector replicativo con la fusión TRP::CFP

Expresión y localización intracelular de las proteínas codificadas en los *loci* de apareamiento de *C. glabrata*
 Patricia Yáñez Carrillo

pYC152	3134	DH10	18	pYC66 RV/Bam/pg	Fragmento P+TRP #1502 Y #1504 Bam/pg	Amp NAT	Vector replicativo con la
pYC153 pYC154 pYC155	3135 3136 3137	DH10	2 4 7	pYC139 Xba/CIP/pg	Fragmento terminador de HIS3 #1498 Y #1500 Xba/pg	Amp NAT	Vector replicativo con la fusión HIS::CHERRY::Th
pYC156 pYC157 pYC158	3138 3139 3140	DH10	4 5 8	pYC42 Xba/CIP/pg	Fragmento terminador de HIS3 #1498 Y #1500 Xba/pg	Amp NAT	Vector replicativo base para fusiones con
pYC159 pYC160	3141 3142	DH10	32 19	pYC62 Xba/CIP/pg	Fragmento terminador de HIS3 #1498 Y #1500 Xba/pg	Amp NAT	Vector replicativo base para fusiones con
pYC161	3143	DH10	35	pYC66 Xba/CIP/pg	Fragmento terminador de HIS3 #1498 Y #1500 Xba/pg	Amp NAT	Vector replicativo base para fusiones con MYC con
pYC162 pYC163	3144 3145	DH10	3 8	pYC50 Bam/Sac2/p g	Fragmento región 5'HIS3- HIS3 #1496 Y #1497 Bam,Sac2/pg	Amp NAT	Vector integrativo con fusión HIS3-MYC
pYC164 pYC165	3146 3147	DH10	18 23	pYC56 Bam/Sac2/p g	Fragmento región 5'HIS3- HIS3 #1496 Y #1497 Bam,Sac2/pg	Amp NAT	Vector integrativo con fusión HIS3- CHERRY
pYC166 pYC167	3148 3149	DH10	1 8	pYC50 Bam/Sac2/p g	Fragmento región 5'TRP1-TRP1 #1504 Y #1505 Bam,Sac2/pg	Amp NAT	Vector integrativo con fusión TRP1-MYC
pYC168 pYC169	3152 3153	DH10	24 27	pYC146 Xba/CIP/pg	Fragmento terminador de HIS3 #1498 Y #1500 Xba/pg	Amp NAT	Vector replicativo con la fusión
pYC170 pYC171	3156 3157	DH10	8 34	pYC34 Bam/Xba/pg	Fragmento alfa1 amplificado con oligos #597 Y #883 de CGM1 dig Bam/Xba	Amp Nat	Vector replicativo sobrexpresant e de la fusión Ptef::cherry::alfa1 ... This
pYC172 pYC173	3158 3159	DH10	1 2	pRS416 EcoRI/Xba/p g	Fragmento MTL1alfa subclonado de pLS7 EcoRI/Xba/pg	Amp Nat	Vector replicativo de <i>S. cerevisiae</i> con el <i>locus</i> MTL1alfa de <i>C.</i>
pYC174	3177	DH10	2	pRS416 EcoRI/Xba/p g	Fragmento MTL1a subclonado de pLS5 EcoRI/Xba/pg	Amp Nat	Vector replicativo de <i>S. cerevisiae</i> con el <i>locus</i>
pYC175 pYC176	3178 3179	DH10	4 7	pYC55 EcoRI/Bam/ pg	Fragmento de región intergenica entre alfa1 y alfa2 oligos #1539 y #1536 dig EcoRI/Bam	Amp Nat	Vector replicativo con la región intergenica entre alfa1 y alfa2 fusionada a YEP SIN
pYC177	3180	DH10	11	pYC55 Xba/CIP/pg	Fragmento terminador de HIS3 oligos	Amp Nat	Vector replicativo base para hacer

Expresión y localización intracelular de las proteínas codificadas en los *loci* de apareamiento de *C. glabrata*
 Patricia Yáñez Carrillo

					#1498 y #1500 dig Xba		
pYC178	3181	DH10	2	pYC55 EcoRI/Bam/ pg	Fragmento de región intergenica entre alfa2 y alfa1 oligos #1538 y #1537 dig EcoR1/Bam	Amp Nat	Vector replicativo con la región intergenica entre alfa2 y alfa1 fusionada a YFP SIN TERMINADOR
pYC179 pYC180	3182 3183	DH10	8 13	pYC55 EcoRI/Bam/ pg	Fragmento de región promotora de a1 oligos #1535 y #1532 dig EcoR1/Bam	Amp Nat	Vector replicativo con la región promotora de a1 fusionada a YFP SIN TERMINADOR
pYC181	3184	DH10	1	pYC175 Xba/CIP/pg	Fragmento terminador de HIS3 oligos #1498 y #1500 dig Xba	Amp Nat	Vector replicativo FINAL con la región intergenica entre alfa1 y alfa2 fusionada a YFP CON TERMINADOR
pYC182 pYC183	3185 3186	DH10	1 2	pYC177 EcoRI/Bam/ pg	Fragmento región intergenica alfa2-alfa1 #1538 y #1537 dig EcoRI/Bam	Amp Nat	Vector replicativo FINAL con la región intergenica entre alfa2 y alfa1 fusionada a YFP CON TERMINADOR
pYC184 pYC185	3187 3188	DH10	11 12	pYC177 EcoRI/Bam/ pg	Fragmento región promotora de a1 #1538 y #1537 dig EcoRI/Bam	Amp Nat	Vector replicativo FINAL con la región promotora de a1 fusionada a YFP CON TERMINADOR
pYC186	3193	DH10	2	pYC141 Xba/CIP/pg	Fragmento terminador de HIS3 #1498 y #1500 dig Xba	Amp Nat	Vector replicativo FINAL con la fusión HIS3::CFP con su propio promotor
pYC187	3194	DH10	2	pYC34 Spe/T4 POL/Bam/pg	Fragmento alfa3 #334 y #897 dig Bam	Amp Ura3+	Vector replicativo sobreexpresante con la fusión ALFA3::CHERRY
pYC188 pYC189	3195 3196	DH10	8 12	pYC25 Xba/Bam/pg	Fragmento alfa1 #883 y #597 dig Bam/Xba	Amp Ura3+	Vector replicativo sobreexpresante con la fusión ALFA1::YFP
pYC190 pYC191	3197 3198	DH10	22 25	pYC16 Xba/Bam/pg	Fragmento alfa1 #883 y #597 dig Bam/Xba	Amp Ura3+	Vector replicativo sobreexpresante con la fusión ALFA1::CFP
pYC192	3204	DH10	10	pYC162 Xho/CIP/pg	Fragmento región 3 UTR HIS3 #1499 y #1501 dig Xho	Amp Ura3+ NAT r	Vector integrativo FINAL con la fusión HIS3::MYC
pYC193 pYC194	3213 3214	DH10	2 8	pYC144 Xba/CIPpg	Fragmento región 3 UTR HIS3 #1498 y #1500 dig Sac2/Xho	Amp NAT r	Vector replicativo con la fusión HIS3::FLAG
pYC195 pYC196	3217 3218	DH10	1 4	pYC46 Xba/CIPpg	Fragmento región 5 UTR HIS3 #1497 y #1496 dig Sac2/Xho	Amp NAT r	Vector integrativo FINAL con la fusión HIS3::MYC

Expresión y localización intracelular de las proteínas codificadas en los *loci* de apareamiento de *C. glabrata*
 Patricia Yáñez Carrillo

pYC197	3219	DH10	23	pYC195 Xho/CIP/pg	Fragmento región 3 UTR HIS3 #1499 y #1501 dig Xho	Amp Ura3+ NAT r	Vector integrativo FINAL con la fusión HIS3::ELAC
pYC198	3225	DH10	11	pYC164 Xho/CIP/pg	Fragmento región 3 UTR HIS3 #1499 y #1501 dig Xho	Amp Ura3+ NAT r	Vector integrativo FINAL con la fusión HIS3::CHEPPY
pYC199 pYC200	3226 3227	DH10	6 9	pYC16 Spe/T4/Bam HI/pg	Fragmento alfa4 #334 y #1336 dig BamHI	Amp Ura3+	Vector replicativo sobrexpresante con la fusión ALEA4::CFP
pYC201 pYC202	3228 3229	DH10	13 17	pYC25 Spe/T4/Bam HI/pg	Fragmento alfa4 #334 y #1336 dig BamHI	Amp Ura3+	Vector replicativo sobrexpresante con la fusión ALEA4::YFP
pYC203 pYC204	3242 3243	DH10	11 12	pRS416 RI/Xba/pg	Fragmento Pa1::YFP::Thi s3 subclonado de digestión parcial de pYC184 RI/Xba/pg	Amp Ura3+	Vector replicativo para S. cerevisiae para evaluar el promotor de a1 fusionado con
pYC205 pYC206	3244 3245	DH10	22 23	pRS416 RI/Xba/pg	Fragmento Palfa2::YFP::T his3 subclonado de digestión parcial de pYC181 RI/Xba/pg	Amp Ura3+	Vector replicativo para S. cerevisiae para evaluar el promotor de alfa2 fusionado con YFP
pYC207 pYC208	3246 3247	DH10	51 52	pRS416 RI/Xba/pg	Fragmento Palfa1::YFP::T his3 subclonado de digestión parcial de pYC182 RI/Xba/pg	Amp Ura3+	Vector replicativo para S. cerevisiae para evaluar el promotor de alfa1 fusionado con YFP
pYC209 pYC210	3399 3400	DH10	1 2	pRS416 RI/Xba/pg	Fragmento Palfa1-alfa2 de S. cer amplificado de L20 con oligos #1575 y #1576 dig EcoR1/Xba	Amp Ura3+	Vector replicativo para S. cerevisiae con el promotor de alfa1-alfa2 de S. cerevisiae
pYC211				pMJ22 Kpn/Sac1	Fragmento pGRB2.2 Kpn/Sac1	AmpR NatR	Vector sobrexpresante con el ptomotor