



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

**POSGRADO EN CIENCIAS EN BIOLOGÍA MOLECULAR**

**Identificación de un elemento en *cis* que coopera con la  
maquinaria del silenciamiento para regular la expresión  
del gen *EPA1* de *Candida glabrata***

Tesis que presenta  
**Verónica Gallegos García**

Para obtener el grado de  
**Doctora en Ciencias en Biología Molecular**

Directores de Tesis:

**Dra. Irene Beatriz Castaño Navarro  
Dr. Alejandro De Las Peñas Nava**

San Luis Potosí, 20 de Abril de 2012



## Constancia de aprobación de la tesis

La tesis **Identificación de un elemento en *cis* que coopera con la maquinaria del silenciamiento para regular la expresión del gen *EPA1* de *Candida glabrata*** presentada para obtener el grado de Doctora en Ciencias en Biología Molecular fue elaborada por Verónica Gallegos García y aprobada el 13 de marzo de 2012 por los suscritos, designados por el Colegio de Profesores de la División de Biología Molecular del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica.

---

Dra. Irene Beatriz Castaño Navarro  
(Directora de tesis)

---

Dr. Alejandro De Las Peñas Nava  
(Director de tesis)

---

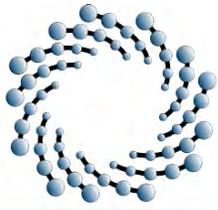
Dr. Christian García Sepúlveda

---

Dr. J. Sergio Casas Flores

---

Dr. Alejandro Juárez Reyes



IPICYT

## **Créditos Institucionales**

Esta tesis fue elaborada en el Laboratorio 6 de Microbiología Molecular de la División de Biología Molecular del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica (IPICYT) bajo la dirección de el Dr. Alejandro De Las Peñas Nava y la Dra. Irene Beatriz Castaño Navarro.

Durante la realización del trabajo la autora recibió una beca académica del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) con No. de registro 143037.

Este trabajo fue financiado con recursos de los donativos No. CB-2005-48279 y CB-2005-48304 de Alejandro De Las Peñas Nava e Irene Castaño Navarro, respectivamente.



**IPICYT**

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

## Acta de Examen de Grado

El Secretario Académico del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C., certifica que en el Acta 040 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 20 días del mes de abril del año 2012, se reunió a las 17:00 horas en las instalaciones del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C., el Jurado integrado por:

<b>Dr. J. Sergio Casas Flores</b>	<b>Presidente</b>	<b>IPICYT</b>
<b>Dr. Christian Alberto García Sepúlveda</b>	<b>Secretario</b>	<b>UASLP</b>
<b>Dr. Alejandro De Las Peñas Nava</b>	<b>Sinodal</b>	<b>IPICYT</b>
<b>Dr. Alejandro Juárez Reyes</b>	<b>Sinodal externo</b>	<b>CINVESTAV</b>
<b>Dra. Irene Beatriz Castaño Navarro</b>	<b>Sinodal</b>	<b>IPICYT</b>

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

**DOCTORA EN CIENCIAS EN BIOLOGÍA MOLECULAR**

sustentó la C.

**Verónica Gallegos García**

sobre la Tesis intitulada:

*Identificación de un elemento en cis que coopera con la maquinaria del silenciamiento para regular la expresión del gen EPA1 de Candida glabrata*

que se desarrolló bajo la dirección de

**Dra. Irene Beatriz Castaño Navarro**  
**Dr. Alejandro De Las Peñas Nava**

El Jurado, después de deliberar, determinó

**APROBARLA**

Dándose por terminado el acto a las 19:10 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 20 días del mes de abril de 2012.

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

**Dr. Marcial Bonilla Marín**  
Secretario Académico



*A mí amada familia*

## **AGRADECIMIENTOS**

Al Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología.

Al Dr. Alejandro De Las Peñas y a la Dra. Irene Castaño por la excelente dirección en este trabajo además de brindarme su amistad y confianza todo el tiempo.

Al Dr. Rubén López y al Dr. Luís Salazar, por las facilidades otorgadas en su laboratorio.

A mis padres que me han brindado su cariño todo el tiempo y además de ser un ejemplo en mi vida de superación, honestidad, inteligencia y respeto.

A mis hermanas, Monse y Saúl que me han motivado a seguir siempre adelante con su amor, amistad, conocimiento y serenidad ante la vida.

A la Dra. Lina Riego por su valiosa asesoría en el trabajo bioinformático.

Al Dr. Enrique Merino Pérez por el apoyo recibido durante la estancia realizada en su laboratorio del Instituto de Biotecnología de la UNAM en Cuernavaca, Morelos.

A todos los investigadores del IPICYT, UNAM y de la UAEM que generosamente colaboraron con material y reactivos en los inicios del proyecto.

Y a todos los que aportaron comentarios valiosos para enriquecer este trabajo así como a mis queridos amigos y compañeros del laboratorio No. 6 y a mi amigo Carlos Moreno.

## CONTENIDO

	Página
Constancia de aprobación de la tesis.....	ii
Créditos institucionales.....	iii
Dedicatorias.....	v
Agradecimientos.....	vi
LISTA DE TABLAS.....	viii
LISTA DE FIGURAS.....	ix
RESUMEN.....	1
ABSTRACT.....	2
<b>ANTECEDENTES GENERALES</b>	
1. Biología de <i>Candida glabrata</i> .....	3
2. Epidemiología.....	3
3. Factores de virulencia.....	4
3.1 Proteasas y Lipasas.....	4
3.2 Resistencia a especies reactivas de oxígeno.....	5
3.3 Resistencia a fluconazol.....	5
3.4 Adherencia.....	6
4. Silenciamiento Subtelomérico.....	8
5. Regulación subtelomérica de los genes <i>EPA</i> .....	11
<b>ANTECEDENTES DIRECTOS</b> .....	14
<b>PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA</b> .....	15
<b>HIPÓTESIS</b> .....	16
<b>OBJETIVO GENERAL</b> .....	16
<b>OBJETIVO PARTICULARES</b> .....	16
<b>DESCRIPCIÓN DEL TRABAJO REALIZADO EN ESTA TESIS</b> .....	16
<b>RESULTADOS</b> .....	18
Artículo: A novel downstream regulatory element cooperates with the silencing machinery to repress <i>EPA1</i> expression in <i>C. glabrata</i> .	
<b>DISCUSIÓN</b> .....	32
<b>REFERENCIAS</b> .....	37

## LISTA DE TABLAS

	Página
<b>Tablas del artículo:</b> A novel downstream regulatory element cooperates with the silencing machinery to repress <i>EPA1</i> expression in <i>C. glabrata</i> .	
<b>Table 1.</b> Strains used in this study .....	<b>21</b>
<b>Table 2.</b> Plasmids used in this study .....	<b>23</b>
<b>Table 3.</b> Oligonucleotides used in this study. ....	<b>24</b>
<b>Table 4.</b> Role of silencing proteins on NE function independently of telomere .....	<b>27</b>
<b>Table supplementary.</b> The NE is specific for the <i>EPA1</i> promoter.....	<b>31</b>

## LISTA DE FIGURAS

	Página
<b>Figura 1.</b> Relación filogenética entre <i>C. glabrata</i> y <i>S. cerevisiae</i> .....	3
<b>Figura 2.</b> Representación esquemática del cluster de <i>YPS</i> en <i>C. glabrata</i> .....	5
<b>Figura 3.</b> Adherencia <i>in vitro</i> de <i>C. glabrata</i> a células HEP2 . .....	7
<b>Figura 4.</b> Árbol filogenético de las 23 secuencias de proteínas <i>Epa</i> que se encuentran en la cepa BG2.....	8
<b>Figura 5.</b> Mapa esquemático del <i>locus EPA1</i> .....	9
<b>Figura 6.</b> Mecanismo del silenciamiento subtelomérico.....	10
<b>Figura 7.</b> Silenciamiento subtelomérico en <i>S. cerevisiae</i> .....	11
<b>Figura 8.</b> Silenciamiento del <i>locus EPA1</i> . .....	12
<b>Figura 9.</b> Participación de Rif1 y yKu70/yKu80 en el silenciamiento subtelomérico.....	13
<b>Figura 10.</b> Regulación de la expresión de los genes <i>EPA1-7</i> . .....	15
<b>Figuras del artículo:</b> A novel downstream regulatory element cooperates with the silencing machinery to repress <i>EPA1</i> expression in <i>C. glabrata</i> .	
<b>FIG. 1.</b> Regulation of the expression of <i>EPA1</i> . .....	20
<b>FIG. 2.</b> Mapping of the negative element (NE). .....	25
<b>FIG. 3.</b> NE effect on adherence. .....	25
<b>FIG. 4.</b> Silencing effect on the expression of <i>EPA1</i> .....	26
<b>FIG. 5.</b> Blast sequences analysis of the NE in the <i>C. glabrata</i> genome.....	28
<b>FIG. 6.</b> Model of <i>EPA1</i> regulation.....	29

## RESUMEN

### Identificación de un elemento en *cis* que coopera con la maquinaria del silenciamiento para regular la expresión del gen *EPA1* de *Candida glabrata*

*Candida glabrata* es un importante patógeno oportunista que causa candidiasis sistémica y en mucosas. *C. glabrata* es capaz de adherirse a células epiteliales de mamífero. En la cepa BG2, la adherencia está mediada principalmente a través de la adhesina Epa1. El gen *EPA1* pertenece a una familia compuesta de aproximadamente 23 parálogos que codifican potencialmente para adhesinas. Los genes *EPA* se encuentran localizados en regiones subteloméricas, lo que tiene como consecuencia una regulación negativa de la transcripción llamada silenciamiento subtelomérico similar al descrito en *S. cerevisiae*. En este estudio nos enfocamos en el estudio de la regulación de la transcripción del gen *EPA1*. Nuestros datos muestran que la expresión del gen *EPA1* se regula negativamente por dos mecanismos distintos. La activación del gen *EPA1* ocurre inmediatamente después de diluir las células de fase estacionaria en medio fresco, sin embargo la transcripción se reprime rápidamente, limitándose la expresión a la fase lag justo después de que salen de la fase estacionaria. La represión de la transcripción del gen *EPA1* se lleva a cabo por el silenciamiento subtelomérico donde participan el Complejo Sir (Sir2, Sir3 y Sir4), Rap1, Rif1, y yKu70 y yKu80. Para la represión se requiere también un elemento negativo (EN) regulador que actúa en *cis*, localizado en la región intergénica 3' entre *EPA1* y *EPA2* y su actividad es independiente de la proximidad al telómero. Un análisis bioinformático del EN muestra que hay 10 copias presentes en el genoma de *Candida glabrata* asociadas con otros genes *EPA* así como otro tipo de genes.

PALABRAS CLAVE: *Candida glabrata*, Complejo Sir, yKu70, yKu80, Epa1

## ABSTRACT

### **A novel downstream regulatory element cooperates with the silencing machinery to repress *EPA1* expression in *C. glabrata***

*Candida glabrata* is an important opportunistic pathogen causing both bloodstream and mucosal candidiasis. *C. glabrata* is able to adhere avidly to mammalian epithelial cells. In the BG2 strain background, adherence is mediated primarily by the Epa1 adhesin. *EPA1* is a member of a large gene family of about 23 paralogues that encode putative adhesins. The *EPA* genes are encoded at subtelomeric loci where they are subject to chromatin-based transcriptional silencing similar to the sub-telomeric silencing characterized in *S. cerevisiae*. In this study, we address how *EPA1* transcription is regulated. Our data show that *EPA1* expression is subject to two distinct negative regulatory mechanisms. *EPA1* transcription is repressed by sub-telomeric silencing: the Sir Complex (Sir2, Sir3 and Sir4), Rap1, Rif1, yKu70 and yKu80 are required for full repression. Activation of *EPA1* occurs immediately after dilution of stationary phase cells into fresh media; however, transcription is rapidly repressed again, limiting expression to lag phase, just as the cells exit stationary phase. This repression following lag phase requires a cis-acting regulatory negative element (NE) located in the *EPA1* 3' intergenic region, and is independent of telomere proximity. Bioinformatic analysis shows that there are 10 copies of the NE-like sequence in the *Candida glabrata* genome associated with other *EPA* genes as well as non-*EPA* genes.

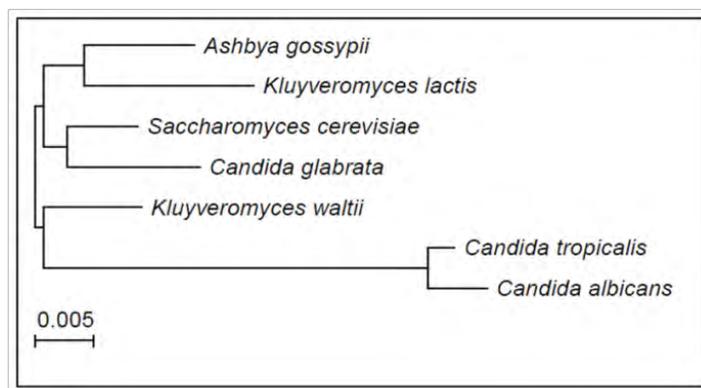
KEYWORDS: *Candida glabrata*, Sir complex, yKu70, yKu80, Epa1

## ANTECEDENTES GENERALES

### 1. Biología de *Candida glabrata*

*Candida glabrata* es un *Eucarionte* que pertenece al reino *Fungi*, phylum *Ascomycota*, subphylum *Saccharomycotina*, clase *Saccharomycetes*, orden *Saccharomycetales*, genero *Candida*, especie *glabrata*. Esta levadura mide de 1 a 4  $\mu\text{m}$ , es haploide, no dimórfica y presenta una relación filogenética estrecha con *Saccharomyces cerevisiae* (Figura 1) (Kaur et al., 2005; Wong et al., 2003). *C. glabrata* forma colonias de color crema, lisas y brillantes, que son relativamente indistinguibles de otras especies de *Candida* (Fidel et al., 1999).

El genoma de la cepa CBS138 de *C. glabrata* está secuenciado y disponible en la base de datos Genolevures (<http://www.genolevures.org>). El genoma es de 12.3Mb y esta organizado en 13 cromosomas, con un contenido de G+C de 38.8%. Contiene un total de 5,283 secuencias codificantes. Los genomas de *C. glabrata* y *S. cerevisiae* tienen un alto grado de sintenia y tienen en promedio de identidad de aminoácidos del 65% entre proteínas ortólogas (Kaur et al., 2005).



**Figura 1.** Relación filogenética entre *C. glabrata* y *S. cerevisiae*. Las secuencias 18S fueron alineadas por ClustalW y se generó un filograma con el método de neighbor-joining (MacVector) (modificado de (Kaur et al., 2005)).

### 2. Epidemiología

En general todo procedimiento que dañe mucosas o que tenga como efecto suprimir al sistema inmune, tiene como consecuencia el aumento en las infecciones ocasionadas por hongos del género *Candida*. Los factores que contribuyen significativamente a este aumento en la incidencia de las infecciones

invasivas por *Candida* son entre otros, el uso prolongado de antibióticos de amplio espectro, quimioterapia, tratamiento con inmunosupresores, cirugías, trasplantes, uso de catéteres e implante de dispositivos prostéticos (Gomez et al., 2010).

En los años 80s más del 75 % de las infecciones por levaduras eran causadas por *Candida albicans*. Sin embargo, recientemente las infecciones por otras especies de *Candida* han ido en aumento. Diferentes estudios en los Estados Unidos han determinado que *C. glabrata* es la segunda especie de *Candida* más frecuentemente aislada: *C. albicans* (63-70%), ***C. glabrata* (26%-44%)**, *Candida parapsilosis* (5%-15%), *Candida tropicalis* (6%-8%) y *Candida krusei* (2.5%) (Horn et al., 2009; Pfaller y Diekema, 2010).

### **3. Factores de virulencia**

El establecimiento de una infección exitosa es un proceso multifactorial que depende de eventos que se desencadenan tanto en el hospedero como en el hongo. En los últimos años se han descrito diversos factores en *C. glabrata* que le permiten infectar y persistir en el hospedero: capacidad de adherencia a células epiteliales y endoteliales, y alta resistencia a estrés oxidante y a xenobióticos.

#### **3.1 Proteasas y Lipasas**

El genoma de *C. glabrata* tiene ocho genes (*YPS*) que codifican para aspartil proteasas con un dominio para la adición del ancla GPI (Glicosilfosfatidilinositol) que les permite unirse covalentemente a la pared celular (Figura 2) (Gagnon-Arsenault et al., 2006; Kaur et al., 2005). Estos genes *YPS* de *C. glabrata* tienen un papel importante para la supervivencia dentro de los macrófagos, para mantener la integridad de la pared celular al igual que, para la adherencia a células de mamífero (Kaur et al., 2007).

*C. glabrata* tiene tres genes que codifican para fosfolipasas B (*PLB*) los cuales no han demostrado ser importantes para la virulencia.

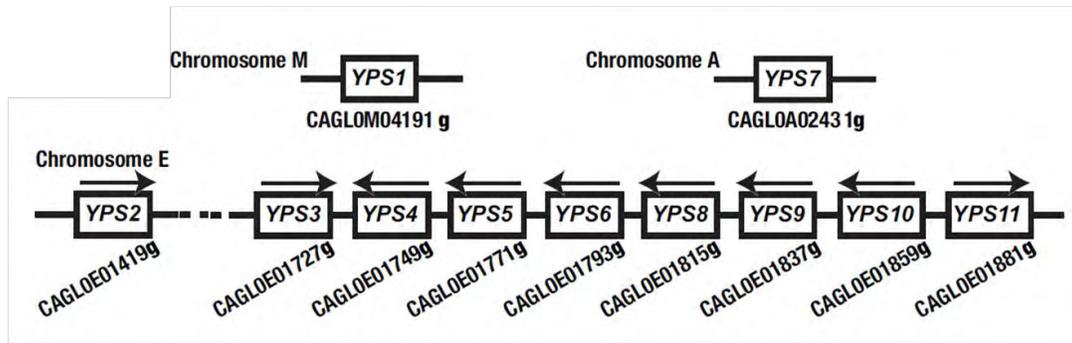


Figura 2. Representación esquemática del cluster de YPS en *C. glabrata* (Kaur et al., 2007).

### 3.2 Resistencia a especies reactivas de oxígeno

En condiciones *in vitro* *C. glabrata* es resistente a altos niveles de especies reactivas de oxígeno como el peróxido de hidrógeno (Cuellar-Cruz et al., 2008; Kaur et al., 2007). Además, *C. glabrata* sobrevive en el interior de algunas células fagocíticas en las que se producen altas concentraciones de especies oxidantes (Kaur et al., 2007). La resistencia a estrés oxidante *in vitro* depende casi en su totalidad de la catalasa Cta1, que se regula principalmente por los factores Yap1, Skn7, Msn2 y Msn4. Sin embargo, en experimentos *in vivo* en un modelo murino de infección sistémica, la Cta1 es dispensable, indicando que hay otros sistemas de la respuesta a estrés oxidante que compensan la ausencia de Cta1 (Cuellar-Cruz et al., 2008).

### 3.3 Resistencia a fluconazol

El incremento en la incidencia de candidiasis por *C. glabrata* correlaciona con el aumento en el uso de azoles, especialmente fluconazol. Este agente antifúngico es el más usado para tratar infecciones por *Candida*. *C. glabrata* es resistente de manera innata a este antimicótico (Hitchcock et al., 1993; Richardson, 2005; Sanglard et al., 2001).

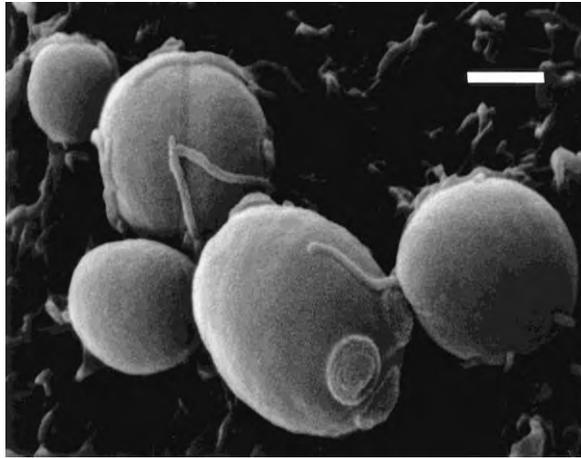
En *C. albicans*, los transportadores de la familia ABC (ATP-Binding Casset) Cdr1p y Cdr2p, así como el transportador Mdr1p de la familia MFS (Major Facilitator Superfamily) participan en la resistencia a los azoles. De manera similar, *C. glabrata* resiste a los azoles al incrementar la expresión de *CDR1*, *PDH1* (*CDR2*) y

*ERG11*. En *C. glabrata* un ortólogo de *MDR1* confiere resistencia a los azoles cuando se expresa en *S. cerevisiae* (Kaur et al., 2005; Morschhauser, 2010).

### 3.4 Adherencia

La adherencia de un microorganismo a las células del hospedero se considera un factor de virulencia importante dentro de las etapas del proceso infeccioso. Si bien varios hongos comparten la característica de adherencia, cada uno tiene diferentes adhesinas específicas que proporcionan a las células propiedades de adhesión particulares. En el hongo patógeno *Pneumocystis carinii* los genes *MSG* codifican para proteínas de la pared celular que son importantes para la adherencia a células y variación antigénica que ha sido propuesta como un sistema para evadir el sistema inmune del huésped (Stringer y Keely, 2001). La familia de adhesinas de *C. albicans* (*Als*, *Hwp*, *Hyr1* y *Eap1*) y *C. glabrata* (*Epa*) les confieren la capacidad de adherirse a células de mamíferos (De Groot et al., 2003; De Groot et al., 2003; Li y Palecek, 2003). El gen *HWP1* de *C. albicans* codifica una proteína de pared celular que actúa como sustrato de una transglutaminasa de las células de mamíferos. Esta enzima del hospedero une covalentemente el extremo amino-terminal de *Hwp1* a la superficie de las células epiteliales humanas. Mutantes en *HWP1* tienen reducida capacidad de adherencia y están atenuadas en virulencia en modelos animales de infección oral y sistémica (Staab et al., 1999; Sundstrom et al., 2002).

*C. glabrata* tiene la habilidad de adherirse a células epiteliales y a superficies de materiales de uso médico. Esta capacidad de adherencia está mediada por la expresión de varios miembros de la familia de genes *EPA* (por sus siglas en inglés epithelial adhesins) que codifican para proteínas de pared celular. *Epa1* es la principal adhesina que se expresa en la cepa BG2 *in vitro* y es responsable de mediar la adherencia a células epiteliales HEP2 (Figura 3). El gen *EPA1* se identificó inicialmente en un escrutinio de mutantes de *C. glabrata* incapaces de adherirse *in vitro* a células epiteliales. La cepa mutante en el gen *EPA1* redujo la adherencia de *C. glabrata* a células epiteliales *in vitro* en un 95% (Cormack et al., 1999).



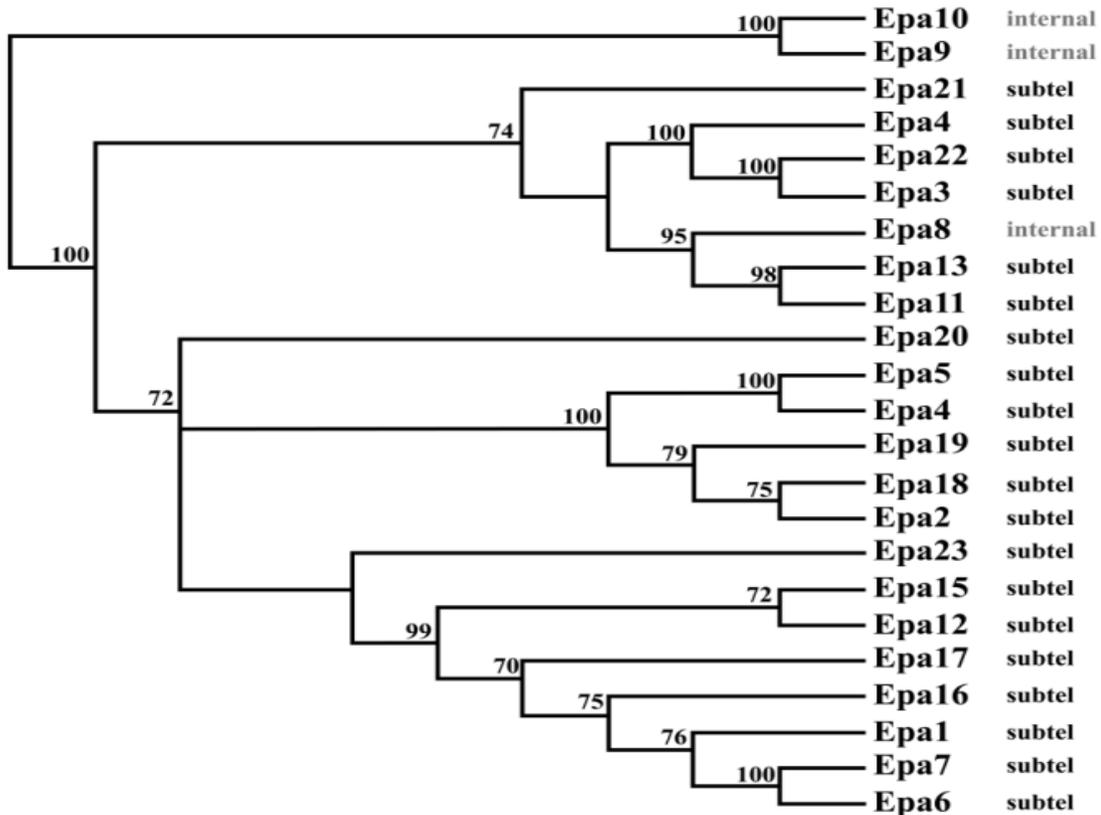
**Figura 3.** Adherencia *in vitro* de *C. glabrata* a células HEP2. Fotografía de microscopía de electrónica de barrido. Barra de escala 1  $\mu\text{m}$  (Cormack et al., 1999)

Epa1 es una lectina cuya función es dependiente de  $\text{Ca}^{2+}$  que reconoce en el hospedero glicoconjugados que contienen N-acetil-lactosamina (Cormack y Falkow, 1999). La estructura de la proteína cuenta con tres regiones: una secuencia N-terminal expuesta al ambiente extracelular que media interacciones específicas proteína-ligando, una región central que consta de tres repeticiones de una secuencia de 40 aminoácidos rica en serinas y treoninas que se glicosilan en las posiciones *N* y *O* en residuos de asparagina (*N*-glicosilación) y serinas y treoninas (*O*-glicosilación) (Cormack y Falkow, 1999; Frieman et al., 2002) y una secuencia hidrofóbica C-terminal donde se adiciona el grupo de unión a GPI.

Cepas mutantes *epa1* $\Delta$  de *C. glabrata*, pierden la capacidad de adherencia *in vitro*. Además, la expresión heteróloga de Epa1 en la levadura no adherente *Saccharomyces cerevisiae*, le confiere la capacidad de adhesión a células epiteliales tipo Lec2 (línea celular derivada de células epiteliales de ovario de hámster chino (CHO) deficiente en la producción de ácido siálico que presenta N-acetyl-lactosamina como azúcar terminal en los carbohidratos complejos ligados a las glicoproteínas a través de un enlace *N*). Estos experimentos muestran que Epa1 es una adhesina, y que al menos en la cepa BG2, es la única adhesina que se expresa *in vitro* (Castano et al., 2005; Cormack y Falkow, 1999).

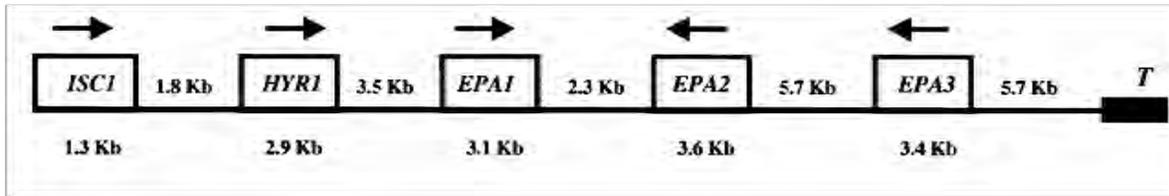
#### 4. Silenciamiento subtelomérico

El gen *EPA1* pertenece a una familia de aproximadamente 23 parálogos (Figura 4) que codifican para proteínas de pared celular y de los cuales, muchos de estos genes se encuentran localizados en regiones subteloméricas.



**Figura 4.** Árbol filogenético de las 23 secuencias de proteínas *Epa* que se encuentran en la cepa BG2. El dendograma se construyó a partir de las secuencias de aminoácidos del dominio de unión al ligando N-terminal (300 primeros aminoácidos), de las proteínas *Epa*, usando la metodología neighbor-joining. La mayoría de los genes *EPA* se encuentran localizados en regiones subteloméricas (Subtel). Los que se encuentran en regiones internas están marcados como “internal”

El locus *EPA1* se encuentra en la región subtelomérica del Cromosoma E Derecho (Cr-E-D) junto con otros tres genes que codifican para proteínas de pared celular. Los cuatro genes son *HYR1*, *EPA1*, *EPA2* y *EPA3* (Figura 5). A pesar de que este grupo de genes no se conserva entre *C. glabrata* y *S. cerevisiae*, río arriba de este grupo de genes si se conserva la sintenia con *S. cerevisiae* (De Las Penas et al., 2003).

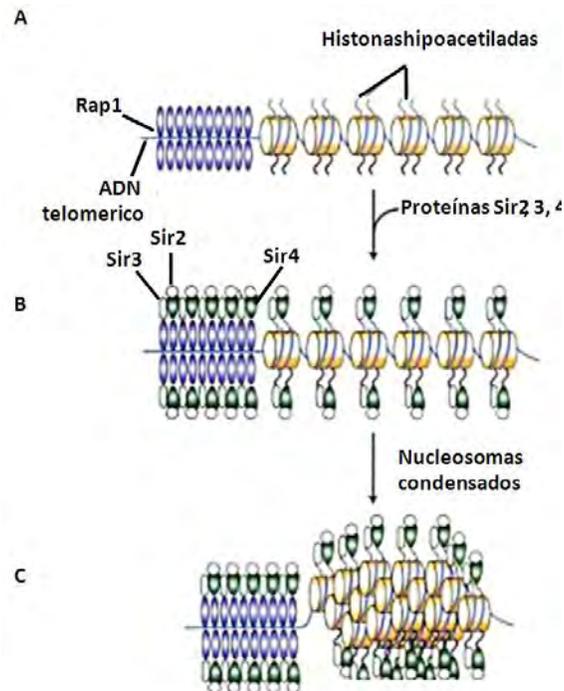


**Figura 5.** Mapa esquemático del *locus EPA1*. Los números muestran el tamaño en kilobases (Kb) de los genes y la distancia entre los genes y el telómero. Las flechas indican la dirección de la transcripción. *ISCI* codifica para una fosfolipasa C. Telómero (*T*).

La localización subtelomérica de los genes *EPA* tiene implicaciones importantes para su expresión. En la cepa BG2, ninguno de los genes *EPA*, excepto *EPA1*, se expresan debido, en parte, al silenciamiento subtelomérico. El silenciamiento subtelomérico crea una estructura de la cromatina que impide la transcripción de genes cercanos al telómero (Castano et al., 2005; De Las Penas et al., 2003).

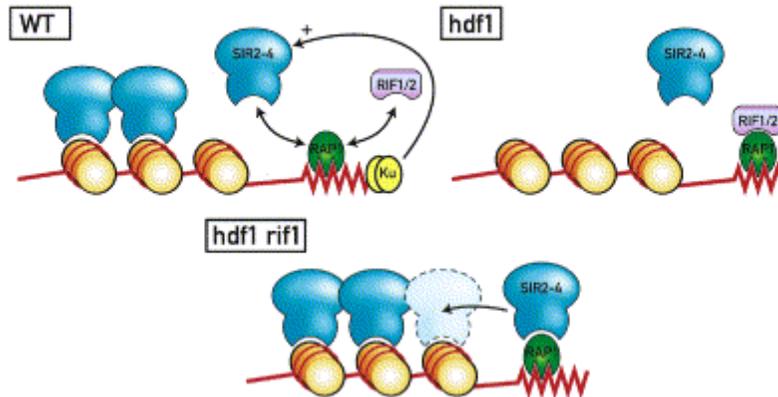
En *S. cerevisiae*, las principales proteínas que participan en el silenciamiento subtelomérico son: el complejo Sir (Sir2, Sir3, Sir4), Rap1, Ku70, Ku80 y Rif1 (Rusche et al., 2003). Se ha descrito en *S. cerevisiae* que el silenciamiento comienza cuando la proteína Rap1 (Repressor/Activator Protein 1) se une a las secuencias repetidas de los telómeros y recluta al complejo Sir (Silent Information Regulator). El complejo Sir se extiende hacia las regiones subteloméricas ya que la proteína Sir2 que es una desacetilasa de histonas dependiente de NAD<sup>+</sup>, desacetila las histonas H3 y H4 y se crean sitios de alta afinidad para las proteínas Sir3 y Sir4 (Figura 6). La desacetilación de las Histonas H3 y H4 condensa la cromatina y crea una estructura represiva para la transcripción denominada cromatina silenciosa (Moretti et al., 1994).

Los genes *HDF1* y *HDF2* (**H**igh **A**ffinity **D**NA **B**inding **F**actor) codifican respectivamente para yKu70 y yKu80 que forman un complejo heterodimérico. Estas proteínas participan en la reparación de rupturas de doble cadena en el ADN, ayudan a localizar a los telómeros en la periferia nuclear y se requieren para establecer y mantener el silenciamiento subtelomérico. yKu70 y yKu80 se unen al extremo del telómero y favorecen la interacción del complejo Sir3-Sir4 con la proteína Rap1 (Figura 7)(Boulton y Jackson, 1998; Downs y Jackson, 2004; Gasser et al., 2004; Hediger et al., 2002)



**Figura 6.** Mecanismo del silenciamiento subtelmérico. Múltiples copias de Rap1 se unen a una secuencia repetida simple en cada región telomérica, que carece de nucleosomas (A). Estas proteínas nuclean el ensamblaje del complejo Sir, (Sir2, Sir3, Sir4) a través de su unión con Sir3 y Sir4, las cuales interaccionan con Sir2 (B). Sir2 desacetila los residuos de lisina en los extremos N-terminal de las histonas H3 y H4 de los nucleosomas cercanos (C).

En *S. cerevisiae*, Rif1 (**R**AP1-**I**nteracting **F**actor) actúa como un regulador negativo del silenciamiento al unirse a Rap1 e impedir la interacción entre el complejo Sir3/Sir4 con Rap1. (Figura 7) (Hediger et al., 2002). Algunos de los fenotipos de la mutación nula en *RIF1* son el alargamiento de los telómeros, y el incremento del silenciamiento de genes reporteros adyacentes al telómero (Wottony Shore, 1997). En *C. glabrata*, en cambio, Rif1 tiene aparentemente una actividad distinta en el silenciamiento subtelmérico. Participa igualmente en la regulación de la longitud de los telómeros, pero actúa como un regulador positivo del silenciamiento (Castano et al., 2005). En la mutante nula *rif1* $\Delta$  en *C. glabrata* se desreprimen los genes *EPA* así como el gen reportero *URA3* insertado cerca de los telómeros estudiados. La diferencia en la regulación entre ambos organismos se puede deber a que las proteínas Rif en dichas levaduras no presentan un alto grado de identidad (24% identidad, 41% similitud) (Castano et al., 2005). Este porcentaje bajo en homología sugiere que las proteínas podrían tener diferente función.



**Figura 7.** Silenciamiento subtelomérico en *S. cerevisiae*. En una cepa silvestre (*Wild Type*) las proteínas Ku70 y Ku80 favorecen la interacción entre Rap1 y el complejo Sir3/4. Rif1 compete con el complejo Sir3/4 por la unión a Rap1. En una cepa *hdf1Δ* la mayoría de las proteínas Sir2/3/4p son desplazadas del telómero y los genes subteloméricos que permanecían reprimidos por las proteínas Sir2/3/4 ahora se pueden expresar. En una cepa *rif1Δ*, Rap1 recluta más eficientemente al complejo Sir3/4 (imagen no mostrada). La pérdida de silenciamiento en una cepa *hdf1Δ* se puede restaurar en una doble mutante *hdf1Δ rif1Δ*, debido a que se elimina el competidor de las proteínas Sir3/4p (Hediger et al., 2002).

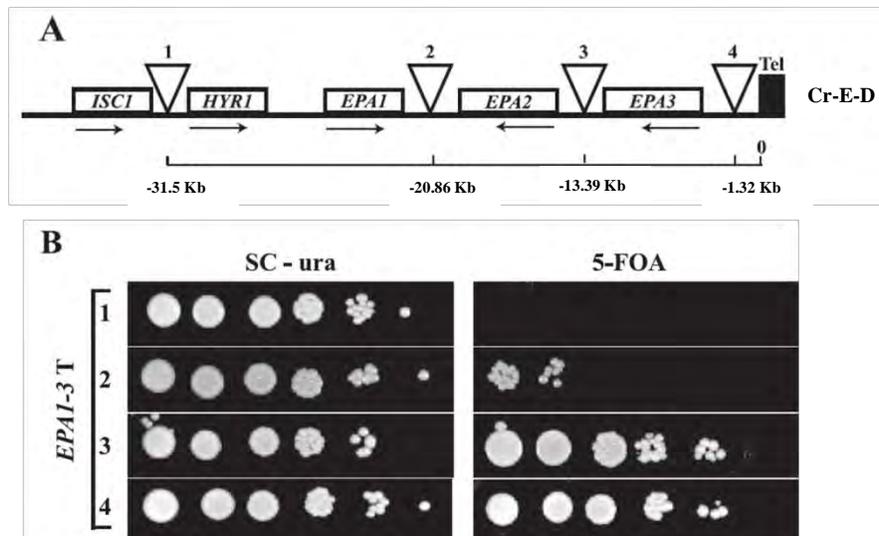
En *C. glabrata*, mutantes en cualquiera de los genes que codifican para proteínas del silenciamiento subtelomérico, son hiperadherentes. Esta hiperadherencia se debe a la activación de genes *EPA* subteloméricos como *EPA1*, *EPA6* y *EPA7*. En un experimento *in vivo*, en un modelo murino de infección de vías urinarias, una cepa mutante nula de los genes *EPA1*, *EPA6*, y *EPA7*, no coloniza eficientemente el riñón ni la vejiga (Domergue et al., 2005). Por otra parte una cepa mutante *sir3Δ*, en la que se encuentran sobre-expresados los genes *EPA1*, *EPA6* y *EPA7*, presenta un incremento de aproximadamente 3 veces en la colonización del riñón (Castano et al., 2005). Otra evidencia que apunta a la desrepresión de genes *EPA* en ausencia del complejo Sir, es la formación de biopelículas, probablemente debido a la inducción de *EPA6* en mutantes *sir4Δ* (Iraqui et al., 2005).

## 5. Regulación subtelomérica de los genes *EPA*

En *C. glabrata* el nivel y extensión del silenciamiento subtelomérico no es equivalente en los telómeros estudiados. Además los genes *EPA* asociados a los

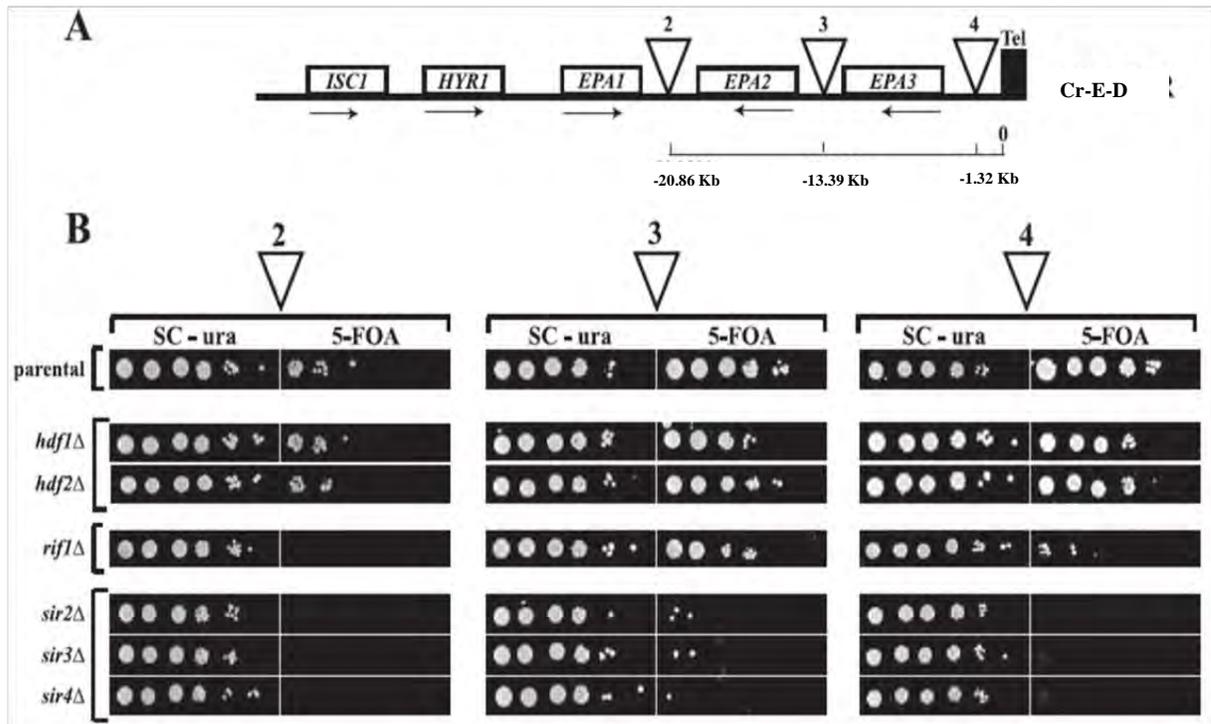
distintos telómeros se regulan diferencialmente por las principales proteínas de silenciamiento (Rosas-Hernandez et al., 2008).

Una característica del silenciamiento subtelomérico en *C. glabrata* es que puede propagarse a una distancia de entre 20 a 25 Kb a partir del telómero, en contraste con lo reportado en *S. cerevisiae* cuya extensión abarca de 4 a 8 Kb (Pryde y Louis, 1999; Rosas-Hernandez et al., 2008). Por ejemplo en la región subtelomérica Cr-E-D donde se encuentra el gen *EPA1* (Figura 8) y en la región subtelomérica Cr-I-D donde se encuentran *EPA4* y *EPA5*, el silenciamiento subtelomérico se extiende a más de 20Kb del telómero (Castano et al., 2005; De Las Penas et al., 2003).



**Figura 8.** Silenciamiento del locus *EPA1*. A) Mapa de la localización de las diferentes inserciones del gen reportero *URA3*, representadas por cada triángulo inverso (inserciones 1, 2, 3 y 4). La distancia de la inserción a partir del telómero se muestra en Kb. Las flechas indican la dirección de transcripción. B) La transcripción del gen reportero *URA3* está sujeta a silenciamiento subtelomérico cuando esta insertado en la región intergénica entre el gen *EPA3* y el telómero así como entre los genes *EPA2* y *EPA3*. Las cepas que contienen las inserciones del *URA3* se crecieron hasta fase estacionaria en medio YPD y se realizaron diluciones seriadas. Un número igual de células se sembraron en medio sintético completo sin uracilo (-Ura) y en uno con 5-FOA (5 Acido Fluorótico) para determinar el silenciamiento del gen reportero *URA3*. Las cepas que expresen el gen *URA3*, no pueden crecer en el medio con 5-FOA, únicamente crecen las células que no expresan el gen *URA3*, que se encuentra bajo silenciamiento (Rosas-Hernandez et al., 2008).

En las regiones donde se encuentran codificados los genes *EPA1*, *EPA2*, *EPA3*, *EPA6* y *EPA7*, las proteínas Sir2p, Sir3p y Sir4p son esenciales para mantener la estructura de la cromatina silenciada (Rosas-Hernandez et al., 2008) (Figura 9).



**Figura 9.** Participación de Rif1 y yKu70/yKu80 en el silenciamiento subtelo mérico. A) Mapa de la localización de las diferentes inserciones del gen reportero *URA3* en el telómero derecho del cromosoma E. Cada triángulo inverso representa la inserción del gen reportero *URA3* (inserciones 2, 3 y 4) en el telómero. B) Mutaciones nulas *hdf1Δ*, (*yKu70*), *hdf2Δ*, (*yKu80*), *rif1Δ*, *sir2Δ*, *sir3Δ*, y *sir4Δ*, se introdujeron en cada una de las cepas que tienen inserciones de *URA3* (2, 3 y 4, Panel A). (Rosas-Hernandez et al., 2008).

El silenciamiento subtelo mérico es un sistema global de regulación que permite que un solo sistema de regulación pueda regular varios genes simultáneamente. Sin embargo, al eliminar el silenciamiento subtelo mérico, no todos los genes *EPA* subtelo méricos se expresan. Esta regulación diferencial indica que además del silenciamiento subtelo mérico, existen sistemas adicionales de regulación específica para determinados genes *EPA* (Figura 10) (Castano et al., 2005).

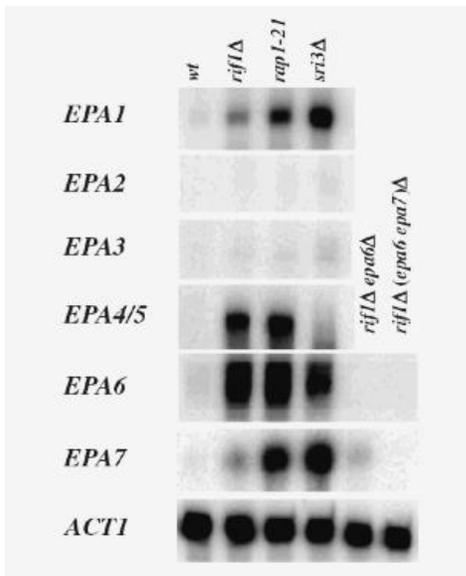
Se ha determinado que *EPA6* se induce en riñón y vejiga durante una infección de vías urinarias en ratón. En este caso, la señal importante para la desrepresión de *EPA6*, es la deficiencia de niacina o ácido nicotínico (NA) en orina (Domergue et

al., 2005). El NA es un precursor de NAD, que a su vez es necesario para la actividad de desacetilasa de histonas de Sir2. Por esta razón, en orina donde los niveles de NA son bajos, la actividad de Sir2 es menor y produce una inducción de *EPA6*.

## ANTECEDENTES DIRECTOS

En el locus *EPA1* hay dos aspectos importantes en cuanto a la regulación por silenciamiento subtelomérico. Primero, la inserción del gen reportero *URA3* entre *EPA1* y *EPA2* (20.8 Kb respecto del telómero) sugiere que el silenciamiento subtelomérico termina en este sitio (Figura 8) (Rosas-Hernandez et al., 2008). Sin embargo el análisis de la mutante *sir3Δ*, muestra que hay una inducción considerable de la expresión del gen *EPA1* (Figura 10). Además, datos que se presentan y se discuten en esta tesis indican claramente que la expresión del gen *EPA1* está regulada por silenciamiento dependiente del complejo Sir y de la cercanía al telómero, es decir, el silenciamiento subtelomérico debe de continuar hasta el promotor del gen *EPA1*. Segundo, las proteínas yKu70 y yKu80 de *C. glabrata* participan positivamente en el silenciamiento de las regiones subteloméricas de los cromosomas donde se encuentran *EPA4* y *EPA5*(Cr-I-D), *EPA6* (Cr-C-I), y *EPA7*(Cr-C-D) (Rosas-Hernandez et al., 2008) de forma probablemente similar a las proteínas yKu70/80 ortólogas de *S. cerevisiae*, sin embargo, las proteínas yKu70 y yKu80 no participan en el silenciamiento subtelomérico en el telómero del locus *EPA1* en el Cr-E-D (Figura 9). Creemos que la independencia de este telómero de yKu70 y yKu80 se debe a la presencia del silenciador que se encuentra entre *EPA3* y el telómero (Juarez-Reyes et al., 2012) y a un elemento en *cis*, localizado a 300pb del codón de término del gen *EPA1* y que se requiere para la regulación negativa del gen *EPA1*. Este elemento en *cis* sí depende de yKu70 y yKu80.

Un dato adicional demostró que una inserción de 4 Kb en la región intergénica 3' entre *EPA1* y *EPA2* induce la expresión de *EPA1* lo que vuelve a las células hiperadherentes.



**Figura 10.** Regulación de la expresión de los genes *EPA1-7*. Ensayo de protección a la nucleasa S1, donde se muestran los niveles de transcripción de los genes *EPA1-7* en una cepa silvestre (WT) y en las cepas *rif1Δ*, *rap1-21* y *sir3Δ* en cultivos en fase estacionaria. La mutación en *rap1-21* es una mutación en la que se eliminaron los últimos 28 aminoácidos del extremo carboxilo terminal de Rap1p, debido a que la mutación nula es letal. (Castano et al., 2005).

## PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Los datos previos obtenidos en el laboratorio, parecían indicar que el silenciamiento subtelmérico del telómero derecho del cromosoma E, terminaba en la región intergénica entre *EPA1* y *EPA2* (Figura 8); sin embargo, en cepas *sir3Δ* se induce fuertemente la expresión del gen *EPA1* (Figura 10), lo que sugiere que la transcripción del gen *EPA1* sí está sujeta a silenciamiento subtelmérico. Una posible explicación es que la inserción del reportero *URA3* entre *EPA1* y *EPA2* se realizó con una construcción en la cual la transcripción de *URA3* se origina en su propio promotor. El promotor de *URA3* podría ser más fuerte y por lo tanto menos sensible al efecto del silenciamiento que el del gen *EPA1*, como se ha propuesto (Rossmann et al., 2011).

Adicionalmente, los datos de la cepa que contiene una inserción de 4 Kb en la región intergénica 3' entre *EPA1* y *EPA2*, indican que este gen además está sujeto a otro tipo de regulación negativa que se pierde al insertar 4 Kb en la región intergénica 3' entre *EPA1* y *EPA2* y resulta en su sobre-expresión.

## HIPÓTESIS

La expresión del gen *EPA1* está controlada negativamente por dos mecanismos distintos y además existe un activador que induce su expresión bajo ciertas condiciones *in vitro*.

## OBJETIVO GENERAL

Analizar la regulación transcripcional del gen *EPA1*, que codifica para una adhesina en *Candida glabrata*.

## OBJETIVOS PARTICULARES

1. Caracterizar el papel regulador del silenciamiento subtelomérico en la expresión del gen *EPA1*.
2. Caracterizar el elemento en *cis* que regula la expresión del gen *EPA1*.
3. Caracterizar la participación de las proteínas del silenciamiento en la actividad del elemento negativo.

## DESCRIPCIÓN DEL TRABAJO REALIZADO EN ESTA TESIS

En este trabajo nos propusimos entender a detalle la regulación transcripcional del gen *EPA1*. *EPA1* como se ha descrito arriba, se encuentra localizado a 20.7 Kb del telómero del cromosoma E junto con otros 2 genes *EPA* (orden *EPA1*, *EPA2*, *EPA3* y Telómero). Nuestros datos indican que la expresión de *EPA1* esta reprimida por el complejo Sir (Sir 2, Sir3 y Sir4), Rap1, Rif1 y yKu70/80. La expresión del gen *EPA1* se induce inmediatamente después de diluir células de fase estacionaria en medio fresco y concomitantemente las células se vuelven adherentes. Descubrimos que la expresión del gen *EPA1* se limita a la fase lag y se regula negativamente de forma muy estricta durante la fase log y también en

fase estacionaria. Encontramos que existe un elemento negativo (EN) regulador en *cis*, localizado en la región intergénica entre *EPA1* y *EPA2*, a 300pb del codón de término del gen *EPA1*. Este EN tiene una participación muy importante en la represión de la expresión de *EPA1*. Además, la actividad del EN depende de las proteínas yKu70/yKu80. Este EN se encuentra presente en el genoma de *C. glabrata* asociado a genes *EPA* y a otros genes. Una pregunta que permanece abierta es si este modelo de regulación a través de un elemento en *cis* al 3' de un gen, se encuentra conservado en otras levaduras, ya que este es el primer ejemplo de este tipo de regulación para promotores controlados por la RNA Pol II.

## A Novel Downstream Regulatory Element Cooperates with the Silencing Machinery to Repress *EPA1* Expression in *Candida glabrata*

Verónica Gallegos-García,<sup>\*1,2</sup> Shih-Jung Pan,<sup>1,1</sup> Jacqueline Juárez-Cepeda,<sup>\*</sup> Candy Y. Ramirez-Zavaleta,<sup>\*</sup> Marcela Briones Martin-del-Campo,<sup>\*</sup> Verónica Martínez-Jiménez,<sup>\*</sup> Irene Castaño,<sup>\*</sup> Brendan Cormack,<sup>†</sup> and Alejandro De Las Peñas<sup>\*3</sup>

<sup>\*</sup>IPICYT, División de Biología Molecular, Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, San Luis Potosí, San Luis Potosí, 78216, México and <sup>†</sup>Department of Molecular Biology and Genetics, Johns Hopkins University School of Medicine, Baltimore, Maryland 21205

**ABSTRACT** *Candida glabrata*, an opportunistic fungal pathogen, adheres to mammalian epithelial cells; adherence is mediated primarily by the Epa1 adhesin. *EPA1* is a member of a large gene family of ~23 paralogues, which encode putative adhesins. In this study, we address how *EPA1* transcription is regulated. Our data show that *EPA1* expression is subject to two distinct negative regulatory mechanisms. *EPA1* transcription is repressed by subtelomeric silencing: the Sir complex (Sir2–Sir4), Rap1, Rif1, yKu70, and yKu80 are required for full repression. Activation of *EPA1* occurs immediately after dilution of stationary phase (SP) cells into fresh media; however, transcription is rapidly repressed again, limiting expression to lag phase, just as the cells exit stationary phase. This repression following lag phase requires a *cis*-acting regulatory negative element (NE) located in the *EPA1* 3'-intergenic region and is independent of telomere proximity. Bioinformatic analysis shows that there are 10 copies of the NE-like sequence in the *C. glabrata* genome associated with other *EPA* genes as well as non-*EPA* genes.

**C***CANDIDA glabrata*, an opportunistic fungal pathogen normally present in the mucosal flora, can cause severe disseminated infections. *C. glabrata* is the second most common agent of candidiasis, accounting for 15–20% of *Candida* bloodstream infections worldwide (Pfaller and Diekema 2010). Some traits of *C. glabrata* that allow it to cause disease have been described (Kaur *et al.* 2005; Roetzer *et al.* 2011). These include resistance to oxidative stress (Cuellar-Cruz *et al.* 2008, 2009) and adherence to epithelial cells (Cormack *et al.* 1999; Castaño *et al.* 2005).

Adherence to host cells has been proposed to be an important initial step for virulence. Additionally, the ability to adhere to abiotic substrates and the adherence between microbial cells are essential attributes for biofilm formation

in many pathogens. Adherence in pathogenic fungi has been shown to be mediated primarily by glycosylphosphatidylinositol-anchored cell wall proteins (GPI-CWPs) which are found broadly in different fungal species including *Saccharomyces cerevisiae*, *C. glabrata*, and *C. albicans* (Castaño *et al.* 2006). In *S. cerevisiae*, the *FLO* family of genes (*FLO1*, *FLO5*, and *FLO9–FLO11*) encode a group of (GPI-CWPs) that are required for flocculation, pseudohyphal growth, and biofilm formation on abiotic substrates (Kobayashi *et al.* 1998; Guo *et al.* 2000). *C. albicans* encodes ~104 putative GPI-CWPs including the Als family, the Hwp family, Hyr1, and Eap1 (De Groot *et al.* 2003a,b; Li and Palecek 2003), many of which are thought to mediate adhesion to host epithelial and endothelial cells as well as to extracellular matrix proteins (Hoyer 2001; Li and Palecek 2003; Sheppard *et al.* 2004; Klotz *et al.* 2004; Hoyer *et al.* 2008). *C. glabrata* can adhere to epithelial cells and also to inert surfaces. *EPA1* encodes the major epithelial adhesin in the BG2 strain, binding to *N*-acetyl lactosamine-containing glycoconjugates (Cormack *et al.* 1999; Zupancic *et al.* 2008). *EPA1* belongs to a large gene family (*EPA* family) of ~23 paralogues, of which *EPA6* and *EPA7* have also been shown to mediate

Copyright © 2012 by the Genetics Society of America

doi: 10.1534/genetics.111.138099

Manuscript received September 28, 2011; accepted for publication December 25, 2011

<sup>1</sup>These authors contributed equally to this work.

<sup>2</sup>Present address: Facultad de Enfermería, Universidad Autónoma de San Luis Potosí, San Luis Potosí, San Luis Potosí, 78240, México.

<sup>3</sup>Corresponding author: Camino a la Presa San José 2055, División de Biología Molecular, Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, San Luis Potosí, San Luis Potosí, 78216, México. E-mail: cano@ipicyt.edu.mx

**Table supplementary**  
**The NE is specific for the *EPA1* promoter**

	<b>Plasmid</b>	<b>Fold of repression</b>
<b>1</b>	pAP353	1.55
<b>2</b>	pAP354	1.22
<b>3</b>	pAP385	10.74
<b>4</b>	pSP21	14.27
<b>5</b>	pSP26	2.86
<b>6</b>	EGD1 + EN	1.10
<b>7</b>	EGD1 + UTR	1.20
<b>8</b>	HHT2 + EN	1.32
<b>9</b>	HHT2 + UTR	1.32
<b>10</b>	PDC1 + EN	1.35
<b>11</b>	PDC1 + UTR	1.29
<b>12</b>	MET3 + EN	1.70
<b>13</b>	MET3 + UTR	1.21
<b>14</b>	MET3 + EN	1.40
<b>15</b>	MET3 + UTR	1.13

**Fold of repression** is the maximal expression of GFP at 2 hours divided by the expression at 8 hours. **NE:** *EPA1* 3'UTR + 3' negative element. **UTR:** *EPA1* 3'UTR. Lines: 2-5: *EPA1* promoter, 6-11: constitutive promoter (*EGD1* (Subunit beta1 of the nascent polypeptide-associated complex (NAC)), *HHT2* (Histone H3), *PDC1* (Pyruvate decarboxylase), 12-15: inducible *MET3* promoter (sulfate adenylyltransferase), this promoter is induced by growing the cell in SE medium without met and cys. Experiments in line 12 and 13 are induced (without met and cys) and line 14 and 15 are cells grown in the presence of these aminoacids. pAP353, pAP354 and pAP385 were done as described in the legend to Fig. 1D, and pSP21 and pSP26 were done as described in Fig. 2.

## DISCUSIÓN

Una de las características más importantes para la virulencia en los agentes patógenos es la adherencia específica a células de tejidos. Dicha capacidad para adherirse a células y superficies abióticas, así como la habilidad de formar biopelículas a menudo están ligadas a la expresión de familias de proteínas de superficie cuya transcripción está finamente controlada. En *Candida glabrata* los genes *EPA* codifican para proteínas de pared celular a las que se une un grupo GPI, y al menos en el fondo genético de la cepa BG2, las adhesinas Epa1, Epa6 y Epa7 en condiciones *in vitro* son responsables de la adherencia a células epiteliales (Castano et al., 2005; Cormack y Falkow, 1999; De Las Penas et al., 2003; Domergue et al., 2005). La mayoría de los genes *EPA* están sujetos a silenciamiento subtelomérico. Esta regulación epigenética de las adhesinas es una ventaja ya que no compromete a toda la población de células a expresar una adhesina en particular, sino que en una población de células genéticamente idéntica, pueden existir células individuales que expresen distintas adhesinas, que les permitiría adherirse a otros nichos. Esto favorece un balance entre la adherencia, colonización y diseminación (De Las Penas et al., 2003; Domergue et al., 2005; Halme et al., 2004).

### **La expresión de *EPA1* está regulada negativamente por un elemento en *cis* localizado en la región intergénica 3' de *EPA1*.**

En este estudio, mostramos que la expresión del gen *EPA1* se regula negativamente por dos mecanismos independientes, primero el silenciamiento subtelomérico que depende de la cercanía al telómero y segundo, un mecanismo novedoso independiente del telómero. Esta regulación negativa se da a través de un elemento negativo en *cis* (EN) (por sus siglas en inglés *cis-acting negative element*). El EN es una secuencia de 200pb que se localiza a 300pb río abajo del codón de paro del gen *EPA1*, en la región intergénica entre *EPA1* y *EPA2*. El EN reprime la expresión independientemente del 3'UTR utilizado así como cuando se coloca río arriba del promotor del gen *EPA1*, lo que corrobora que la actividad del

EN esa nivel de la transcripción del gen *EPA1* y no a través de la traducción. Además el 3'UTR del gen *EPA1* tiene una contribución parcial en la expresión de *EPA1*.

En *S. cerevisiae* no se han descrito elementos reguladores de la transcripción mediada por la RNA polimerasa II, que actúen en *cis* y estén localizados fuera del promotor, al 3' del ORF; sin embargo, en esta levadura se han descrito elementos similares que actúan en *cis* los cuales regulan la transcripción de algunos genes dependientes de la RNA polimerasa III. En otros organismos, se han descrito elementos similares que se encuentran en intrones (Calderwood et al., 2003; Company et al., 1988; Company y Errede, 1988; Delaloy et al., 2008; Errede et al., 1987; Martin et al., 1999; Stark et al., 2001; Teague et al., 1986).

En levaduras los sitios de reconocimiento en *cis* de los activadores y represores (UAS ó operador respectivamente), generalmente están localizados a una distancia no mayor a 700pb río arriba del sitio de inicio de la transcripción (Guarente y Hoar, 1984; Keegan et al., 1986; Struhl, 1984). Sin embargo, cuando se insertan estos elementos heterológamente a una distancia mayor de 700pb en el extremo 3' de un gen reportero, la transcripción del reportero se puede activar o reprimir si el gen reportero y el elemento en *cis* están localizados cerca del telómero (De Bruin et al., 2001; Zaman et al., 2002). Una explicación es que los telómeros de las levaduras pueden doblarse y formar una estructura secundaria o bucle que acerca al promotor con el elemento en *cis*. Cuando el elemento en *cis*, recluta el factor transcripcional correspondiente, se favorece la interacción con la región del promotor, que se ha acercado una vez que se dobla el ADN, y de esta manera se activa o reprime la transcripción de estos genes. Un mecanismo similar podría ocurrir entre el EN y algún elemento en el promotor del gen *EPA1* a través de la formación de un bucle del ADN que podría establecer una interacción que conduce a la represión del gen *EPA1*. El hecho de que el EN no funciona como un represor transcripcional en presencia de promotores distintos al del gen *EPA1* ( $P_{HHT2}$ ,  $P_{MET3}$ ,  $P_{PGK1}$ ,  $P_{PDC1}$ ,  $P_{EGD1}$ , ver Tabla 5), apoya esta hipótesis.

No existen reportes en otras especies de *Candida* cuya regulación transcripcional sea dependiente de un elemento en *cis* al 3' del *ORF*. Sin embargo existe un claro

paralelismo de la regulación del gen *EPA1* con los genes *ALS1* y *ALS7* de *C. albicans* (que codifican para proteínas de adhesión). Estos genes *ALS1* y *ALS7*, se inducen también en fase lag (Green *et al.* 2005). Sin embargo no se ha probado si esta regulación depende de un elemento al 3´.

**La represión de la expresión en *EPA1* mediada por el EN depende de *HDF1* (yKu70) y *HDF2* (yKu80) pero es independiente del telómero.**

La represión del gen *EPA1* mediada por el EN, que se observa después de la inducción cuando la transcripción se produce en el contexto del cromosoma, se recapitula en plásmido. Esto indica que todos los elementos reguladores para una correcta expresión del gen *EPA1* están contenidos en el plásmido y que el EN es responsable de la represión transcripcional del gen *EPA1* e independiente del telómero. Esta regulación independiente del telómero de la expresión del gen *EPA1* debe coordinarse con el silenciamiento dependiente del telómero.

Nuestros datos genéticos muestran que la represión a través del EN depende de *HDF1* (yKu70) y *HDF2* (yKu80). yKu70 y yKu80 son esenciales para la reparación de doble cadena de ADN (Rosas-Hernandez *et al.*, 2008), previene la degradación y la fusión de los extremos de los cromosomas e inicia el silenciamiento mediante el reclutamiento de Sir4 al telómero (Tham y Zakian, 2002). En *C. glabrata* yKu70/yKu80 no se requieren para el silenciamiento en la región subtelomérica del telómero de *EPA1* (Rosas-Hernandez *et al.*, 2008). ¿Cómo puede yKu70/yKu80 reprimir la transcripción del gen *EPA1* a través del EN?. Dado que se ha demostrado que el complejo Ku70/80 también se asocia con las regiones subteloméricas (Martin *et al.*, 1999) y que puede nuclear silenciamiento cuando se recluta en algunas regiones del ADN (Rusche *et al.*, 2003; Tham y Zakian, 2002), un posible modelo es que Ku se asocie directamente con el EN lo que facilita interacciones entre el EN y el promotor del gen *EPA1* formando una estructura represiva de la cromatina.

### **La expresión de *EPA1* está sujeta a silenciamiento.**

La expresión del gen *EPA1* se regula por la maquinaria del silenciamiento (Castano et al., 2005; Domergue et al., 2005). Sin embargo el análisis de los genes reporteros *URA3* insertados entre los genes *EPA1*, *EPA2*, *EPA3* y el telómero sugiere que el silenciamiento subtelomérico termina en la región intergénica entre *EPA1* y *EPA2* (De Las Penas et al., 2003). Esto parece contradecir los datos nuevos presentados en este trabajo donde mostramos que la expresión del gen *EPA1* está sujeta a silenciamiento, y el promotor del gen *EPA1* está más lejos de lo que parecía indicar el estudio previo (De Las Penas et al., 2003; Rosas-Hernandez et al., 2008). Los nuevos experimentos genéticos mostrados en este trabajo confirman que Sir2, Sir3 y Sir4 silencian la expresión del gen *EPA1*. Nosotros sugerimos que la diferencia radica en que el gen reportero de las inserciones usadas afecta el ensayo de silenciamiento. El gen reportero *URA3* que se utilizó en los experimentos de silenciamiento se hicieron con dos promotores diferentes, el promotor del gen *EPA1* fusionado al gen *URA3* (este trabajo) y el gen *URA3* bajo su propio promotor en el análisis anterior (Castano et al., 2005; De Las Penas et al., 2003; Rosas-Hernandez et al., 2008). Sugerimos que la construcción de  $P_{EPA1}::URA3$  reporta de manera más fidedigna el silenciamiento que el gen *URA3* con su propio promotor debido a que el promotor del *EPA1* es más débil y más sensible al silenciamiento o bien porque tal vez el reportero *URA3* inherentemente no es un sistema perfecto para evaluar el silenciamiento (Rossmann et al., 2011).

Nuestros datos sugieren que hay dos mecanismos distintos que controlan estrictamente la expresión del gen *EPA1*: regulación negativa por el silenciamiento subtelomérico que depende del Complejo Sir y de la proximidad del telómero, y la represión a través del EN localizado en el extremo 3' de *EPA1*, la cual es independiente del telómero y del complejo Sir, pero que depende de yKu70 y yKu80. Estos dos mecanismos funcionan de forma independiente, pero en conjunto, establecen un estricto control de la expresión del gen *EPA1*. En nuestro modelo actual de la regulación transcripcional del *gen*, proponemos que existe un activador de la transcripción del gen *EPA1* que está presente durante toda la fase

logarítmica de crecimiento cuya actividad se contrarresta por ambos mecanismos descritos en este trabajo. Cuando las células provenientes de fase estacionaria se diluyen en medio fresco, se induce la expresión del gen *EPA1* debido a la acción del activador transcripcional propuesto. Después de la primera división celular, ambos mecanismos de silenciamiento (el dependiente del Complejo Sir y el del EN dependiente de yKu70/80), cooperan para reprimir la transcripción. Estos dos mecanismos reguladores contrarrestan al activador que está presente y activo a lo largo de la fase logarítmica y mantienen reprimida la expresión del gen *EPA1*. Este modelo de regulación mantiene la expresión del gen *EPA1* fuertemente reprimida, pero preparada para ser inducida transitoriamente en un medio ambiente adecuado. Aún no hemos identificado el activador, sin embargo, los factores de transcripción Flo8 y Mss1 son candidatos ya que ambos factores de transcripción se requieren normalmente para la expresión de *EPA6* bajo la inducción de condiciones ambientales de estrés (Mundy y Cormack, 2009).

## REFERENCIAS

Abasht, B., Sandford, E., Arango, J., Settar, P., Fulton, J.E., O'Sullivan, N.P., Hassen, A., Habier, D., Fernando, R.L., Dekkers, J.C., *et al.* (2009). Extent and consistency of linkage disequilibrium and identification of DNA markers for production and egg quality traits in commercial layer chicken populations. *BMC Genomics* 10 Suppl 2, S2.

Ausubel, F., R. Brent, R. E. Kingston, d. D. Moore, J. G. Seidman, J. A. Smith, and K. Struhl. (2001). *Current Protocols in Molecular Biology*. (New York, Wiley & Sons, Inc., New York, NY.).

Boulton, S.J., and Jackson, S.P. (1998). Components of the Ku-dependent non-homologous end-joining pathway are involved in telomeric length maintenance and telomeric silencing. *EMBO J* 17, 1819-1828.

Calderwood, M.S., Gannoun-Zaki, L., Wellems, T.E., and Deitsch, K.W. (2003). *Plasmodium falciparum* var genes are regulated by two regions with separate promoters, one upstream of the coding region and a second within the intron. *Journal of Biological Chemistry* 278, 34125-34132.

Calvin, N.M., and Hanawalt, P.C. (1988). High-efficiency transformation of bacterial cells by electroporation. *J Bacteriol* 170, 2796-2801.

Castano, I., De Las Penas, A., and Cormack, B. (2006). Function and Regulation of Adhesin Gene Families in *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida albicans* and *Candida glabrata*. In *Molecular Principles of Fungal Pathogenesis*, J. Heitman, Scott G. Filler, John E. Edwards, Jr., Aaron P. Mitchell, ed. (New York, ASM Press), p. 684.

Castano, I., Kaur, R., Pan, S., Cregg, R., De Las Penas, A., Guo, N., Biery, M.C., Craig, N.L., and Cormack, B.P. (2003). Tn7-based genome-wide random insertional mutagenesis of *Candida glabrata*. *Genome Res* 13, 905-915.

Castano, I., Pan, S.J., Zupancic, M., Hennequin, C., Dujon, B., and Cormack, B.P. (2005). Telomere length control and transcriptional regulation of subtelomeric adhesins in *Candida glabrata*. *Mol Microbiol* 55, 1246-1258.

Company, M., Adler, C., and Errede, B. (1988). Identification of a Ty1 regulatory sequence responsive to STE7 and STE12. *Mol Cell Biol* 8, 2545-2554.

Company, M., and Errede, B. (1988). A Ty1 cell-type-specific regulatory sequence is a recognition element for a constitutive binding factor. *Mol Cell Biol* 8, 5299-5309.

Cormack, B.P., and Falkow, S. (1999). Efficient homologous and illegitimate recombination in the opportunistic yeast pathogen *Candida glabrata*. *Genetics* 151, 979-987.

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

Cuellar-Cruz, M., Briones-Martin-del-Campo, M., Canas-Villamar, I., Montalvo-Arredondo, J., Riego-Ruiz, L., Castano, I., and 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, 814-825.

Cuellar-Cruz, M., Castano, I., Arroyo-Helguera, O., and De Las Penas, A. (2009). Oxidative stress response to menadione and cumene hydroperoxide in the opportunistic fungal pathogen *Candida glabrata*. *Memorias Do Instituto Oswaldo Cruz* 104, 649-654.

Chang, A.C., and Cohen, S.N. (1978). Construction and characterization of amplifiable multicopy DNA cloning vehicles derived from the P15A cryptic miniplasmid. *J Bacteriol* 134, 1141-1156.

de Bruin, D., Zaman, Z., Liberatore, R.A., and Ptashne, M. (2001). Telomere looping permits gene activation by a downstream UAS in yeast. *Nature* 409, 109-113.

De Groot, P.W., Hellingwerf, K.J., and Klis, F.M. (2003). Genome-wide identification of fungal GPI proteins. *Yeast* 20, 781-796.

De Groot, P.W.J., Dekker, H.L., De Boer, A.D., Hellingwerf, K.J., De Koster, C.G., and Klis, F.M. (2003). Identification of cell wall proteins of the fungal pathogen *Candida albicans* and other fungi using mass-spectrometric and genome-wide computational approaches. *Yeast* 20, S57-S57.

De Groot, P.W.J., Kraneveld, E.A., Yin, Q.Y., Dekker, H.L., Gross, U., Crielaard, W., de Koster, C.G., Bader, O., Klis, F.M., and Weig, M. (2008). The Cell Wall of the Human Pathogen *Candida glabrata*: Differential Incorporation of Novel Adhesin-Like Wall Proteins. *Eukaryotic Cell* 7, 1951-1964.

De Las Penas, A., Pan, S.J., Castano, I., Alder, J., Cregg, R., and Cormack, B.P. (2003). Virulence-related surface glycoproteins in the yeast pathogen *Candida glabrata* are encoded in subtelomeric clusters and subject to RAP1- and SIR-dependent transcriptional silencing. *Genes Dev* 17, 2245-2258.

Delaloy, C., Elvira-Matelot, E., Clemessy, M., Zhou, X.O., Imbert-Teboul, M., Houot, A.M., Jeunemaitre, X., and Hadchouel, J. (2008). Deletion of WNK1 First Intron Results in Misregulation of Both Isoforms in Renal and Extrarenal Tissues. *Hypertension* 52, 1149-U1197.

Domergue, R., Castano, I., De Las Penas, A., Zupancic, M., Lockett, V., Hebel, J.R., Johnson, D., and Cormack, B.P. (2005). Nicotinic acid limitation regulates silencing of *Candida* adhesins during UTI. *Science* 308, 866-870.

Downs, J.A., and Jackson, S.P. (2004). A means to a DNA end: the many roles of Ku. *Nat Rev Mol Cell Biol* 5, 367-378.

Errede, B., Company, M., and Hutchison, C.A., 3rd (1987). Ty1 sequence with enhancer and mating-type-dependent regulatory activities. *Mol Cell Biol* 7, 258-265.

Fidel, P.L., Jr., Cutright, J.L., Tait, L., and Sobel, J.D. (1996). A murine model of *Candida glabrata* vaginitis. *J Infect Dis* 173, 425-431.

Fidel, P.L., Jr., Vazquez, J.A., and Sobel, J.D. (1999). *Candida glabrata*: review of epidemiology, pathogenesis, and clinical disease with comparison to *C. albicans*. *Clin Microbiol Rev* 12, 80-96.

Frieman, M.B., McCaffery, J.M., and Cormack, B.P. (2002). Modular domain structure in the *Candida glabrata* adhesin Epa1p, a beta1,6 glucan-cross-linked cell wall protein. *Mol Microbiol* 46, 479-492.

Gagnon-Arsenault, I., Tremblay, J., and Bourbonnais, Y. (2006). Fungal yapsins and cell wall: a unique family of aspartic peptidases for a distinctive cellular function. *FEMS Yeast Res* 6, 966-978.

Gasser, S.M., Hediger, F., Taddei, A., Neumann, F.R., and Gartenberg, M.R. (2004). The function of telomere clustering in yeast: the circe effect. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 69, 327-337.

Gietz, R.D., and Sugino, A. (1988). New yeast-*Escherichia coli* shuttle vectors constructed with in vitro mutagenized yeast genes lacking six-base pair restriction sites. *Gene* 74, 527-534.

Gomez, J., Garcia-Vazquez, E., Hernandez, A., Espinosa, C., and Ruiz, J. (2010). [Nosocomial candidemia: new challenges of an emergent problem]. *Rev Esp Quimioter* 23, 158-168.

Green, C.B., Zhao, X., Yeater, K.M., and Hoyer, L.L. (2005). Construction and real-time RT-PCR validation of *Candida albicans* PALS-GFP reporter strains and their use in flow cytometry analysis of ALS gene expression in budding and filamenting cells. *Microbiology* 151, 1051-1060.

Guarente, L., and Hoar, E. (1984). Upstream activation sites of the *CYC1* gene of *Saccharomyces cerevisiae* are active when inverted but not when placed downstream of the "TATA box". *Proc Natl Acad Sci U S A* 81, 7860-7864.

Guo, B., Styles, C.A., Feng, Q.H., and Fink, G.R. (2000). A *Saccharomyces* gene family involved in invasive growth, cell-cell adhesion, and mating. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97, 12158-12163.

Halme, A., Bumgarner, S., Styles, C., and Fink, G.R. (2004). Genetic and epigenetic regulation of the *FLO* gene family generates cell-surface variation in yeast. *Cell* 116, 405-415.

Hediger, F., Neumann, F.R., Van Houwe, G., Dubrana, K., and Gasser, S.M. (2002). Live imaging of telomeres: yKu and Sir proteins define redundant telomere-anchoring pathways in yeast. *Curr Biol* 12, 2076-2089.

Hitchcock, C.A., Pye, G.W., Troke, P.F., Johnson, E.M., and Warnock, D.W. (1993). Fluconazole resistance in *Candida glabrata*. *Antimicrob Agents Chemother* 37, 1962-1965.

Horn, D.L., Neofytos, D., Anaissie, E.J., Fishman, J.A., Steinbach, W.J., Olyaei, A.J., Marr, K.A., Pfaller, M.A., Chang, C.H., and Webster, K.M. (2009).

Epidemiology and outcomes of candidemia in 2019 patients: data from the prospective antifungal therapy alliance registry. *Clin Infect Dis* 48, 1695-1703.

Hoyer, L.L. (2001). The ALS gene family of *Candida albicans*. *Trends Microbiol* 9, 176-180.

Hoyer, L.L., Green, C.B., Oh, S.H., and Zhao, X. (2008). Discovering the secrets of the *Candida albicans* agglutinin-like sequence (ALS) gene family--a sticky pursuit. *Med Mycol* 46, 1-15.

Iraqi, I., Garcia-Sanchez, S., Aubert, S., Dromer, F., Ghigo, J.M., d'Enfert, C., and Janbon, G. (2005). The Yak1p kinase controls expression of adhesins and biofilm formation in *Candida glabrata* in a Sir4p-dependent pathway. *Mol Microbiol* 55, 1259-1271.

Juarez-Reyes, A., Ramirez-Zavaleta, C.Y., Medina-Sanchez, L., De Las Penas, A., and Castano, I. (2012). A protosilencer of subtelomeric gene expression in *Candida glabrata* with unique properties. *Genetics* 190, 101-111.

Kaur, R., Domergue, R., Zupancic, M.L., and Cormack, B.P. (2005). A yeast by any other name: *Candida glabrata* and its interaction with the host. *Curr Opin Microbiol* 8, 378-384.

Kaur, R., Ma, B., and 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, 7628-7633.

Keegan, L., Gill, G., and Ptashne, M. (1986). Separation of DNA binding from the transcription-activating function of a eukaryotic regulatory protein. *Science* 231, 699-704.

Klotz, S.A., Gaur, N.K., Lake, D.F., Chan, V., Rauceo, J., and Lipke, P.N. (2004). Degenerate peptide recognition by *Candida albicans* adhesins Als5p and Als1p. *Infection and Immunity* 72, 2029-2034.

Kobayashi, O., Hayashi, N., Kuroki, R., and Sone, H. (1998). Region of Flo1 proteins responsible for sugar recognition. *Journal of Bacteriology* 180, 6503-6510.

Li, F., and Palecek, S.P. (2003a). *EAP1*, a *Candida albicans* gene involved in binding human epithelial cells. *Eukaryot Cell* 2, 1266-1273.

Martin, M.P., Gerlach, V.L., and Brow, D.A. (2001). A novel upstream RNA polymerase III promoter element becomes essential when the chromatin structure of the yeast U6 RNA gene is altered. *Molecular and Cellular Biology* 21, 6429-6439.

Martin, S.G., Laroche, T., Suka, N., Grunstein, M., and Gasser, S.M. (1999). Relocalization of telomeric Ku and SIR proteins in response to DNA strand breaks in yeast. *Cell* 97, 621-633.

Moretti, P., Freeman, K., Coodly, L., and Shore, D. (1994). Evidence that a complex of SIR proteins interacts with the silencer and telomere-binding protein RAP1. *Genes Dev* 8, 2257-2269.

Morschhauser, J. (2010). Regulation of multidrug resistance in pathogenic fungi. *Fungal Genet Biol* 47, 94-106.

Mundy, R.D., and Cormack, B. (2009). Expression of *Candida glabrata* adhesins after exposure to chemical preservatives. *J Infect Dis* 199, 1891-1898.

Pfaller, M.A., and Diekema, D.J. (2010). Epidemiology of invasive mycoses in North America. *Crit Rev Microbiol* 36, 1-53.

Pryde, F.E., and Louis, E.J. (1999). Limitations of silencing at native yeast telomeres. *EMBO J* 18, 2538-2550.

Richardson, M.D. (2005). Changing patterns and trends in systemic fungal infections. *J Antimicrob Chemother* 56 Suppl 1, i5-i11.

Roetzer, A., Gabaldon, T., and Schuller, C. (2011). From *Saccharomyces cerevisiae* to *Candida glabrata* in a few easy steps: important adaptations for an opportunistic pathogen. *Fems Microbiology Letters* 314, 1-9.

Rosas-Hernandez, L.L., Juarez-Reyes, A., Arroyo-Helguera, O.E., De Las Penas, A., Pan, S.J., Cormack, B.P., and Castano, I. (2008). yKu70/yKu80 and Rif1 regulate silencing differentially at telomeres in *Candida glabrata*. *Eukaryot Cell* 7, 2168-2178.

Rossmann, M.P., Luo, W., Tsaponina, O., Chabes, A., and Stillman, B. (2011). A common telomeric gene silencing assay is affected by nucleotide metabolism. *Mol Cell* 42, 127-136.

Rusche, L.N., Kirchmaier, A.L., and Rine, J. (2003). The establishment, inheritance, and function of silenced chromatin in *Saccharomyces cerevisiae*. *Annu Rev Biochem* 72, 481-516.

Sanglard, D., Ischer, F., and Bille, J. (2001). Role of ATP-binding-cassette transporter genes in high-frequency acquisition of resistance to azole antifungals in *Candida glabrata*. *Antimicrob Agents Chemother* 45, 1174-1183.

Sheppard, D.C., Yeaman, M.R., Welch, W.H., Phan, Q.T., Fu, Y., Ibrahim, A.S., Filler, S.G., Zhang, M., Waring, A.J., and Edwards, J.E. (2004). Functional and structural diversity in the Als protein family of *Candida albicans*. *Journal of Biological Chemistry* 279, 30480-30489.

Sherman, F., Fink, G. R., and Hicks, J. B. (1986). *Methods in Yeast Genetics* (New York, Cold Spring Harbor Laboratory Press).

Sikorski, R.S., and Hieter, P. (1989). A system of shuttle vectors and yeast host strains designed for efficient manipulation of DNA in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 122, 19-27.

Staab, J.F., Bradway, S.D., Fidel, P.L., and Sundstrom, P. (1999). Adhesive and mammalian transglutaminase substrate properties of *Candida albicans* Hwp1. *Science* 283, 1535-1538.

Stark, K., Kirk, D.L., and Schmitt, R. (2001). Two enhancers and one silencer located in the introns of *regA* control somatic cell differentiation in *Volvox carteri*. *Genes & Development* 15, 1449-1460.

Stillman, B., Rossmann, M.P., Luo, W.J., Tsaponina, O., and Chabes, A. (2011). A Common Telomeric Gene Silencing Assay Is Affected by Nucleotide Metabolism. *Molecular Cell* 42, 127-136.

Stringer, J.R., and Keely, S.P. (2001). Genetics of surface antigen expression in *Pneumocystis carinii*. *Infect Immun* 69, 627-639.

Struhl, K. (1984). Genetic properties and chromatin structure of the yeast gal regulatory element: an enhancer-like sequence. *Proc Natl Acad Sci U S A* 81, 7865-7869.

Sundstrom, P., Cutler, J.E., and Staab, J.F. (2002). Reevaluation of the role of *HWP1* in systemic candidiasis by use of *Candida albicans* strains with selectable marker *URA3* targeted to the *ENO1* locus. *Infect Immun* 70, 3281-3283.

Teague, M.A., Chaleff, D.T., and Errede, B. (1986). Nucleotide sequence of the yeast regulatory gene *STE7* predicts a protein homologous to protein kinases. *Proc Natl Acad Sci U S A* 83, 7371-7375.

Tham, W.H., and Zakian, V.A. (2002). Transcriptional silencing at *Saccharomyces* telomeres: implications for other organisms. *Oncogene* 21, 512-521.

Wong, S., Fares, M.A., Zimmermann, W., Butler, G., and Wolfe, K.H. (2003). Evidence from comparative genomics for a complete sexual cycle in the 'asexual' pathogenic yeast *Candida glabrata*. *Genome Biol* 4, R10.

Wotton, D., and Shore, D. (1997). A novel Rap1p-interacting factor, Rif2p, cooperates with Rif1p to regulate telomere length in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genes Dev* 11, 748-760.

Zaman, Z., Heid, C., and Ptashne, M. (2002). Telomere looping permits repression "at a distance" in yeast. *Curr Biol* 12, 930-933.

Zupancic, M.L., Frieman, M., Smith, D., Alvarez, R.A., Cummings, R.D., and Cormack, B.P. (2008). Glycan microarray analysis of *Candida glabrata* adhesin ligand specificity. *Mol Microbiol* 68, 547-559.