



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

POSGRADO EN CIENCIAS EN BIOLOGÍA MOLECULAR

**Las proteínas de silenciamiento Sir2-4, Ku70, Ku80 y
Rif1 regulan negativamente la expresión del locus
MTL3 de *Candida glabrata***

Tesis que presenta

Candy Yuriria Ramírez Zavaleta

Para obtener el grado de

Doctora en Ciencias en Biología Molecular

Directora de la Tesis:

Dra. Irene Beatriz Castaño Navarro

San Luis Potosí, S.L.P., noviembre de 2010



Constancia de aprobación de la tesis

La tesis "Las proteínas de silenciamiento Sir2-4, Ku70, Ku80 y Rif1 regulan negativamente la expresión del locus *MTL3* de *Candida glabrata*" presentada para obtener el grado de Doctora en Ciencias en Biología Molecular fue elaborada por Candy Yuriria Ramirez Zavaleta y aprobada el 12 de noviembre de 2010 por los suscritos, designados por el Colegio de Profesores de la División de Biología Molecular del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C.

Dra. Irene Beatriz Castaño Navarro
Directora de la tesis

Dr. Ángel Gabriel Alpuche Solís
Asesor de la tesis

Dr. J. Sergio Casas Flores
Asesor de la tesis

Dr. Roberto Coria Ortega
Asesor de la tesis



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), A.C., bajo la dirección de 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 164574.

Este trabajo fue financiado con recursos del donativo CB-2005-48304 del CONACyT, otorgado a la Dra. Irene Castaño, y del donativo CN-06-53 de UC-MEXUS CONACyT, otorgado a la Dra. Irene Castaño y al Dr. Alexander D. Johnson.



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 028 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 12 días del mes de noviembre del año 2010, se reunió a las 12:00 horas en las instalaciones del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C., el Jurado integrado por:

Dr. Ángel Gabriel Alpuche Solís	Presidente	IPICYT
Dr. J. Sergio Casas Flores	Secretario	IPICYT
Dra. Irene Beatriz Castaño Navarro	Sinodal	IPICYT
Dr. Roberto Coria Ortega	Sinodal externo	UNAM

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

DOCTORA EN CIENCIAS EN BIOLOGÍA MOLECULAR

sustentó la C.

Candy Yuriria Ramírez Zavaleta

sobre la Tesis intitulada:

Las proteínas de silenciamiento Sir2-4, Ku70, Ku80 y Rif1 regulan negativamente la expresión del locus MTL3 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 14:00 horas, procediendo a la firma del Acta los integrantes del Jurado. Dando fe el Secretario Académico del Instituto.

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

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

Dr. Marcial Bonilla Marín
Secretario Académico



Dedicada a Josefát, papá y mamá

Agradecimientos

A Irene Castaño, por aceptarme y confiar en mí como tu estudiante. Fue un placer trabajar con una investigadora y ser humano de primer nivel que me ha dado enseñanzas muy valiosas para empezar mi desarrollo en la investigación. Agradezco infinitamente tu apoyo, confianza, entusiasmo y motivación que son clave para las personas que iniciamos en la investigación. Finalmente te agradezco por sentar las bases de mi vocación.

A Alejandro De Las Peñas, por enseñarme que la crítica y el cuestionamiento riguroso de los datos que generamos son clave para generar conocimiento de calidad. Gracias por no escatimar recursos, aunque bien cuidados, para realizar experimentos y por enseñarnos a pensar en grande. Agradezco tus ideas y sugerencias para mejorar mi trabajo, y al igual que Irene, agradezco tu confianza y apoyo.

A Josefát Gregorio, estudiante brillante y ser humano excepcional, por influir tan positivamente en mi vida académica y personal; compartimos el sueño y el compromiso de generar conocimiento, la pasión por la cultura y la forma de ver la vida. Gracias por cuestionarme aspectos que no había considerado, por tus ideas innovadoras y por tus comentarios acerca de este proyecto. Te admiro y respeto como profesional y como persona.

A mis padres y mejores amigos, Fernando Ramírez y Amada Zavaleta, por su amor incondicional, sabiduría, apoyo y motivación para realizar mis estudios de licenciatura y de posgrado, así como por todos los valores humanos y éticos que me han enseñado.

A mis sinodales, Dr. Ángel Alpuche y Dr. Sergio Casas, por sus valiosas enseñanzas como profesores de la División de Biología Molecular del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica (IPICyT). Agradezco sus atinados comentarios y cuestionamientos con un enfoque distinto al microbiológico en mis seminarios de avances, ya que mejoraron significativamente los experimentos y la escritura de esta tesis.

Al Dr. Roberto Coria, por haber aceptado amablemente ser mi sinodal externo y viajar a San Luis Potosí para asistir a mi examen de grado. Le agradezco infinitamente por sus comentarios que enriquecieron en gran medida mi escrito de tesis.

A la Dra. Lina Riego, por sus valiosas sugerencias, durante los seminarios de grupo, avances y club de hongos, para el mejoramiento de mi trabajo de tesis y apoyo para su publicación.

A Edith Uresti, por su valiosísimo apoyo teórico y técnico para realizar el ensayo de Southern blot, que fue clave para que aceptaran el artículo de esta tesis.

A los Doctores David Ríos y Marcial Bonilla, por su valioso e incondicional apoyo para la obtención de la extensión, por tres meses más, de mi beca de doctorado.

Al IPICYT, por permitirme realizar mis estudios de maestría y doctorado en sus instalaciones, así como por proporcionar la infraestructura necesaria para realizar investigación de calidad.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT), por otorgarme la beca académica no. 164574 para cursar mis estudios de doctorado en el IPICYT y la beca mixta no. 164574 para realizar una estancia de investigación en University of California, San Francisco (UCSF).

A mis compañeros del Laboratorio 6 de Microbiología Molecular por los momentos y experiencias que compartimos durante mi estancia en el laboratorio.

CONTENIDO

	Página
Constancia de aprobación de la tesis	i
Créditos institucionales	ii
Dedicatorias	iv
Agradecimientos.....	v
LISTA DE TABLAS	ix
LISTA DE FIGURAS	x
RESUMEN.....	1
ABSTRACT.....	2
ANTECEDENTES GENERALES	
1. <i>Candida glabrata</i> como modelo de estudio.....	3
2. Epidemiología de <i>C. glabrata</i>	4
3. Factores de virulencia de <i>C. glabrata</i>	5
3.1 Resistencia a fluconazol	5
3.2 Resistencia a especies reactivas de oxígeno	6
3.3 Adherencia.....	6
3.4 Formación de bio-películas.....	7
3.5 Hidrolasas	7
3.6 Cambios de morfología.....	8
3.7 Rearreglos cromosómicos.....	8
4. Apareamiento (reproducción sexual) y su costo-beneficio	9
4.1 Varios hongos patógenos de humanos carecen de un ciclo sexual.....	10
5. La vía de respuesta a feromonas de <i>S. cerevisiae</i> y <i>C. albicans</i>	12
6. Relación entre apareamiento y virulencia	13
7. El apareamiento en <i>S. cerevisiae</i>	15
7.1 Circuito regulador del apareamiento de <i>S. cerevisiae</i>	17
8. El apareamiento en <i>C. albicans</i>	20
8.1 Circuito regulador del apareamiento de <i>C. albicans</i>	23
9. Las regiones cromosómicas <i>MTL</i> de <i>C. glabrata</i>	24
10. El silenciamiento de los loci <i>HM</i> de <i>S. cerevisiae</i>	26
10.1 Los silenciadores y las proteínas que inician el silenciamiento en <i>HM</i>	26

10.2 Las proteínas Sir propagan el silenciamiento en <i>HM</i>	27
10.3 Las proteínas Ku participan modestamente en el silenciamiento de los loci <i>HM</i>	28
11. El silenciamiento subtelomérico de <i>S. cerevisiae</i>	28
11.1 Las proteínas Ku y Rif	30
12. El silenciamiento subtelomérico de <i>C. glabrata</i>	31
ANTECEDENTES DIRECTOS	32
Tabla 1. Genes involucrados en el apareamiento de <i>S. cerevisiae</i> que no se encuentran en el genoma de <i>C. glabrata</i>	33
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	34
HIPÓTESIS	35
ESTRATEGIA	35
OBJETIVO GENERAL	36
OBJETIVOS PARTICULARES	36
RESULTADOS	
Artículo: Subtelomeric silencing of the <i>MTL3</i> locus of <i>Candida glabrata</i> requires yKu70, yKu80 and Rif1 proteins	38
TABLAS SUPLEMENTARIAS DEL ARTÍCULO	
Supplementary Table 1. <i>E. coli</i> and <i>C. glabrata</i> strains used in this work.....	48
Supplementary Table 2. Plasmids used in this work.....	54
Supplementary Table 3. Oligonucleotides used in this work.....	60
Supplementary Table 4. Nucleotide positions of the insertions of Tn7 throughout the mating loci <i>MTL1</i> , <i>MTL2</i> and <i>MTL3</i>	64
FIGURAS DE LOS DATOS ADICIONALES	65
Tabla 2. El remplazo de varias inserciones <i>mtl::URA3</i> por <i>mtlΔ::hph</i> causa la pérdida del gen <i>URA3</i> generando células Ura ⁻ (datos adicionales).....	74
TABLAS DE LOS DATOS ADICIONALES	
Tabla 3. Cepas de <i>C. glabrata</i> utilizadas en este trabajo (datos adicionales).....	77
Tabla 4. Oligonucleótidos utilizados en este trabajo (datos adicionales)	79
DISCUSIÓN	81
CONCLUSIONES Y APORTACIONES DEL TRABAJO	98
PARTICIPACIÓN EN OTROS TRABAJOS	97
REFERENCIAS	98

LISTA DE TABLAS

	Página
Tabla 1. Genes involucrados en el apareamiento de <i>S. cerevisiae</i> que no se encuentran en el genoma de <i>C. glabrata</i>	33
Supplementary Table 1. <i>E. coli</i> and <i>C. glabrata</i> strains used in this work	48
Supplementary Table 2. Plasmids used in this work	54
Supplementary Table 3. Oligonucleotides used in this work	60
Supplementary Table 4. Nucleotide positions of the insertions of Tn7 throughout the mating loci <i>MTL1</i> , <i>MTL2</i> and <i>MTL3</i>	64
Tabla 2. El remplazo de varias inserciones <i>mtl::URA3</i> por <i>mtlΔ::hph</i> causa la pérdida del gen <i>URA3</i> generando células Ura ⁻ (datos adicionales)	74
Tabla 3. Cepas de <i>C. glabrata</i> utilizadas en este trabajo (datos adicionales)	77
Tabla 4. Oligonucleótidos utilizados en este trabajo (datos adicionales).....	79

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Morfología de <i>C. glabrata</i> y su relación filogenética con otras levaduras	4
Figura 2. El apareamiento en hongos correlaciona con su patogenicidad.....	10
Figura 3. La vía de señalización de las cinasas MAP transduce la señal de la feromona al núcleo.....	13
Figura 4. Genes relacionados con la virulencia de <i>C. albicans</i> que son inducidos por la feromona α	14
Figura 5. El locus <i>MAT</i> de <i>S. cerevisiae</i> controla el proceso de apareamiento.....	16
Figura 6. Circuito regulador del tipo de apareamiento a y α en <i>S. cerevisiae</i>	18
Figura 7. El locus <i>MTL</i> de <i>C. albicans</i> controla el proceso de apareamiento.....	20
Figura 8. El locus <i>MTL</i> de <i>C. albicans</i> controla el cambio morfológico requerido para el apareamiento.....	21
Figura 9. Comparación de los circuitos reguladores del tipo de apareamiento de <i>S. cerevisiae</i> y <i>C. albicans</i>	23
Figura 10. Configuración similar de los loci de apareamiento de <i>C. glabrata</i> (<i>MTL</i>) y <i>S. cerevisiae</i> (<i>MAT</i> y <i>HM</i>)	25
Figura 11. Maquinaria de silenciamiento de genes subteloméricos de <i>S. cerevisiae</i> y <i>C. glabrata</i> y de los loci de apareamiento <i>HM</i> de <i>S. cerevisiae</i>	29
Figuras del artículo: Subtelomeric silencing of the <i>MTL3</i> locus of <i>Candida glabrata</i> requires yKu70, yKu80 and Rif1 proteins	
FIG. 1. <i>MTL3</i> is the only <i>MTL</i> locus subject to silencing in <i>C. glabrata</i>	41
FIG. 2. $a1$ transcript, which contains two introns, is processed only when transcription comes from <i>MTL1</i> but not when it is initiated at <i>MTL2</i>	42
FIG. 3. Analysis of the expression of several cell type-specific genes by RT-PCR	43
FIG. 4. Silencing at <i>MTL3</i> depends on the silencing proteins Sir2, Sir3, Sir4, yKu70, yKu80, and Rif1.....	44
FIG. 5. Silencing at <i>MTL3</i> requires the telomere context	45
Figuras de los datos adicionales	
Figura 12. El silenciamiento fuerte de la región entre los genes $\alpha1$ y $\alpha2$, ubicada a 29 nucleótidos del codón de inicio de $\alpha2$, también depende de las proteínas Sir2, Sir3, Sir4, yKu70, yKu80 y Rif1	65
Figura 13. El silenciamiento subtelomérico de la cromatina de <i>MTL3</i> es el mecanismo principal de represión de los genes $\alpha1$ y $\alpha2$	66

Figura 14. Las regiones intergénicas de los genes <i>tRNA</i> y $\alpha 1$, entre $\alpha 1$ y $\alpha 2$, y entre $\alpha 2$ y <i>CHA1</i> contienen posibles sitios de unión a proteínas que nucleon el silenciamiento	68
Figura 15. En <i>C. glabrata</i> Sum1p no regula genes específicos del tipo sexual α (α sg) como sucede en <i>S. cerevisiae</i> , ni genes específicos del tipo sexual a (a sg).....	69
Figura 16. (A) El silenciamiento de los genes $\alpha 1$ y $\alpha 2$ de <i>MTL3</i> también depende de la proteína Rap1. (B) Las cepas con un solo locus <i>MTL 1a</i> y una cepa sobre expresante de a transcriben correctamente la información del tipo de apareamiento.....	70
Figura 17. La información contenida en los loci <i>MTL</i> no afecta la expresión de genes relacionados con la virulencia de <i>C. glabrata</i>	71
Figura 18. La información <i>MTL</i> no determina la capacidad de adherencia de <i>C. glabrata</i> , en fase estacionaria, a células HeLa <i>in vitro</i>	72
Figura 19. Cepas reporteras de <i>C. glabrata</i> contienen solo un gen <i>URA3</i> integrado en el genoma.....	73
Figura 20. Generación de un producto de PCR de fusión para el remplazo, por eliminación/inserción, del gen <i>BAR1</i>	75

RESUMEN

Candida glabrata es una levadura patógena oportunista relacionada filogenéticamente con *Saccharomyces cerevisiae*. Aunque en *C. glabrata* no se ha encontrado un ciclo de reproducción sexual, contiene tres loci similares a los del tipo de apareamiento de *S. cerevisiae* (*MTL*), denominados *MTL1*, *MTL2* y *MTL3*, así como los genes requeridos para el apareamiento, meiosis y esporulación. *MTL1* se localiza en una región interna del cromosoma B y se propuso como el ortólogo del locus *MAT* de *S. cerevisiae*. *MTL2* y *MTL3* se localizan cerca de los telómeros de cromosomas diferentes: a 29.4 kb del telómero izquierdo en el cromosoma E y a 10.5 kb del telómero izquierdo en el cromosoma B, respectivamente. Por medio de inserciones del gen reportero *URA3* a lo largo de los tres loci *MTL*, encontramos que en contraste con *S. cerevisiae*, el locus *MTL3* está sujeto a silenciamiento transcripcional mientras que el locus *MTL2* es activo para la transcripción, lo que apoya datos publicados previamente. Determinamos que la represión de la transcripción de los genes $\alpha 1$ y $\alpha 2$ ubicados en *MTL3* se lleva a cabo por dos mecanismos. Primero, encontramos que la represión de los genes $\alpha 1$ y $\alpha 2$ se debe principalmente al silenciamiento de *MTL3*, que se inicia en el telómero del cromosoma B y se propaga a una distancia de 12 kb hasta *MTL3*, en lugar de iniciarse en silenciadores como los que flanquean los loci *HMR* y *HML* de *S. cerevisiae*. Sorprendentemente, y en contraste con el silenciamiento de los loci *HM* de *S. cerevisiae*, el silenciamiento de *MTL3* depende absolutamente de las proteínas Ku70, Ku80 y Rif1. Por otra parte, encontramos que los genes $\alpha 1$ y $\alpha 2$, pero no el gen reportero *URA3* insertado a lo largo de este locus, están reprimidos por las proteínas Hst1, Sum1 y Rfm1, que forman parte de un complejo represor de genes específicos de *S. cerevisiae*. Estos datos indican que $\alpha 1$ y $\alpha 2$ también están sujetos a represión específica de promotor además del silenciamiento regional proveniente del telómero. Adicionalmente, *C. glabrata* se adhiere *in vitro* a células HeLa y expresa varios genes específicos del tipo sexual y genes relacionados con la virulencia independientemente de la presencia o ausencia de la información \mathbf{a} o α en cualquiera de los loci *MTL*.

ABSTRACT

Candida glabrata is an opportunistic pathogenic yeast phylogenetically related to *Saccharomyces cerevisiae*. Even though *C. glabrata* has no known sexual cycle it contains, like *S. cerevisiae*, three mating type-like loci (*MTL*) called *MTL1*, *MTL2* and *MTL3* as well as most of the genes required for mating, meiosis and sporulation. *MTL1* is localized at an internal region on chromosome B and is thought to be the locus corresponding to the *MAT* locus in *S. cerevisiae*. *MTL2* and *MTL3* are localized close to two telomeres on different chromosomes: 29.4 kb from the left telomere on chromosome E and 10.5 kb from the left telomere on chromosome B respectively. By using *URA3* reporter gene insertions at the three *MTL* loci, we found that in contrast to *S. cerevisiae*, only the *MTL3* locus is subject to transcriptional silencing while the *MTL2* locus is transcriptionally active, and this is in agreement with previously reported data. We determined that transcriptional repression of $\alpha 1$ and $\alpha 2$ genes localized at *MTL3* is achieved by two mechanisms. First, we found that repression of $\alpha 1$ and $\alpha 2$ genes is mainly due to the silencing of *MTL3* that is nucleated at the left telomere of chromosome B and spreads over 12 kb to *MTL3*, rather than nucleating at flanking, closely positioned cis-acting silencers, like those flanking *HMR* and *HML* of *S. cerevisiae*. Interestingly, silencing of *MTL3* absolutely requires the Ku70, Ku80 and Rif1 proteins, in sharp contrast to silencing of the *HM* loci of *S. cerevisiae*. On the other hand, we found that $\alpha 1$ and $\alpha 2$ genes, but not the *URA3* reporter gene inserted throughout *MTL3*, are also repressed by Hst1, Sum1 and Rfm1 proteins, which form a repressor complex of specific genes in *S. cerevisiae*. This indicates that $\alpha 1$ and $\alpha 2$ are also subject to promoter-specific repression, in addition to regional silencing nucleated at the telomere. We also found that *C. glabrata* adheres *in vitro* to HeLa cells and expresses several cell-type specific genes and virulence-related genes regardless of the presence, or even absence, of mating-type information at any of the *MTL* loci.

ANTECEDENTES GENERALES

1. *Candida glabrata* como modelo de estudio

Candida glabrata es una levadura no dimórfica, considerada asexual, con forma de blastoconidia (Figura 1A) y es la única especie del género *Candida* que no forma pseudo-hifas a más de 37°C, aunque puede formarlas en respuesta a limitación de nitrógeno, una condición ambiental extrema (Csank y Haynes, 2000). Las blastoconidias de *C. glabrata* miden de 1 a 4 µm y son más pequeñas que las de *Candida albicans*, que miden de 4 a 5 µm, y de las demás especies de *Candida*. *C. glabrata* forma colonias de color crema, lisas y brillantes, que son relativamente indistinguibles de las colonias de otras especies de *Candida*, excepto por su tamaño menor (Fidel *et al.*, 1999).

En contraste con *C. albicans* y varias especies de *Candida no albicans* con genoma diploide, *C. glabrata* posee un genoma haploide con 13 cromosomas (Fidel *et al.*, 1999) que facilita su manipulación genética para la construcción de mutantes y la hace un buen modelo de estudio. *C. glabrata* es filogenéticamente más cercana a *Saccharomyces cerevisiae* que a *C. albicans* y especies de *Candida no albicans* (Figura 1B), lo que permite utilizar en *C. glabrata* varias herramientas moleculares desarrolladas para *S. cerevisiae*. El genoma de *C. glabrata* y el de *S. cerevisiae* son relativamente sinténicos y en promedio 65% de los aminoácidos son idénticos entre proteínas ortólogas de ambas levaduras (Kaur *et al.*, 2005).

En contraste con otras especies de *Candida* que fermentan y asimilan varios azúcares, *C. glabrata* solo fermenta y asimila glucosa y trehalosa (Fidel *et al.*, 1999). Aunque la gran mayoría de los genes de *C. glabrata* tienen ortólogos en *S. cerevisiae*, *C. glabrata* redujo su capacidad metabólica, posiblemente debido a su asociación íntima con su hospedero, pues ha perdido genes para la asimilación de galactosa y sacarosa, el metabolismo de fosfato, nitrógeno y azufre, y para la biosíntesis de tiamina, piridoxina y ácido nicotínico (Kaur *et al.*, 2005).

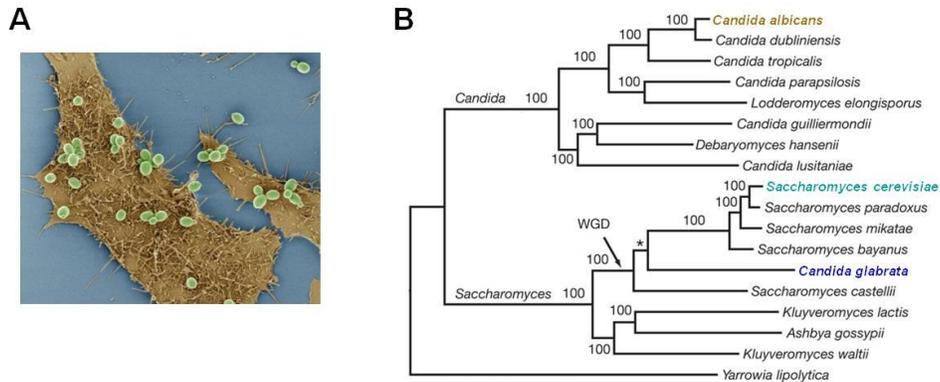


Figura 1. Morfología de *C. glabrata* y su relación filogenética con otras levaduras. (A) Células de *C. glabrata* (en verde) adheridas a una célula epitelial (cortesía de Brendan P. Cormack). (B) Filogenia de los clados de *Candida* y *Saccharomyces* (Modificada de Butler *et al.*, 2009).

En la naturaleza, *C. glabrata* y *C. albicans* solo se asocian con mamíferos (Kaur *et al.*, 2005). *Candida glabrata* es un organismo comensal en las mucosas de individuos sanos, sin embargo, cuando se atenúa el sistema inmunológico por quimioterapias, cirugías o trasplantes de órganos, puede colonizar otros tejidos y causar enfermedades graves (Castano *et al.*, 2006).

2. Epidemiología de *C. glabrata*

Las levaduras del género *Candida* son la causa más común de infecciones por hongos oportunistas en el mundo (Butler *et al.*, 2009). Adicionalmente, las especies de *Candida* son la cuarta causa de infecciones en el torrente sanguíneo. Desde hace cinco décadas la incidencia de candidosis sistémicas ha aumentado drásticamente y se pronostica que esta incidencia seguirá incrementando. Las infecciones por *Candida* generalmente colonizan la piel, el tracto gastrointestinal y genitourinario y la superficie de las mucosas. Los factores de riesgo principales de las candidosis son la inmunosupresión, la ruptura de la piel (por ejemplo pacientes post-operatorios) y el tratamiento con antibióticos (Fidel *et al.*, 1999; Richardson, 2005).

C. albicans, *C. glabrata*, *C. tropicalis* y *C. parapsilosis* causan el 95% de las candidosis diagnosticadas (Butler *et al.*, 2009; Richardson y Lass-Flörl, 2008).

Aunque *C. albicans* es el agente causal más común, su incidencia está disminuyendo, debido al uso elevado de antimicóticos de amplio espectro, y la frecuencia de otras especies está incrementando, como la de *C. glabrata* que es responsable del 26% de las infecciones por *Candida*, ocupando el segundo lugar (Pfaller y Diekema, 2010). En México, particularmente, se ha reportado que el 12% de las vulvovaginitis y el 13% de las infecciones sistémicas por *Candida* se deben a *C. glabrata* (Manzano-Gayosso *et al.*, 2000).

3. Factores de virulencia de *C. glabrata*

Aunque *C. glabrata* es un patógeno nosocomial importante, se conoce poco sobre los mecanismos moleculares que la hacen un patógeno exitoso. Recientemente, se han identificado algunos factores de virulencia que le permiten a *C. glabrata* sobrevivir como comensal o patógeno en su hospedero humano. Estos factores se describen a continuación.

3.1 Resistencia a fluconazol

Debido en parte a la presión selectiva de los agentes anti fúngicos, recientemente han emergido poblaciones de levaduras resistentes a estos compuestos. Comparada con *C. albicans* y otras especies de *Candida*, *C. glabrata* es más resistente a los azoles. Intrínsecamente, *C. glabrata* tiene alta resistencia a fluconazol, un agente fungistático tipo azol, usado como profiláctico en pacientes inmunocomprometidos (Fidel *et al.*, 1999). La resistencia de *C. glabrata* a fluconazol probablemente contribuye a su prevalencia clínica en países donde el uso del fluconazol es prolongado. En *C. albicans* y en *C. glabrata* 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).

En *C. albicans*, los transportadores de la familia ABC (ATP-Binding Cassette) 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). Adicionalmente, el ortólogo en *C. glabrata* de *PDR1*, que es un factor de transcripción pleiotrópico de resistencia a fármacos que participa en la resistencia a estos compuestos en *S. cerevisiae*, incrementa la expresión de *CDR1* y *PDH1* (Kaur *et al.*, 2005; Morschhauser, 2010).

3.2 Resistencia a especies reactivas de oxígeno

Algunos patógenos tienen la capacidad de evadir el ataque oxidativo de las células fagocíticas, por especies reactivas de oxígeno (ERO), mediante mecanismos enzimáticos y no enzimáticos que le sirven para mantener niveles bajos de las ERO producidas naturalmente durante la respiración aeróbica. *In vitro*, *C. glabrata* es mucho más resistente que *Candida albicans* y *S. cerevisiae* a altos niveles de peróxido de hidrógeno (Cuellar-Cruz *et al.*, 2008) y puede evadir la muerte por células fagocíticas (Kaur *et al.*, 2007). Esta resistencia a estrés oxidativo depende de los factores de transcripción relacionados con estrés Yap1p, Skn7p, Msn2 y Msn4p (Cuellar-Cruz *et al.*, 2008).

3.3 Adherencia

La adherencia de las especies de *Candida* al tejido epitelial del hospedero es una característica importante de su virulencia. *C. albicans* se adhiere a células de mamífero por medio de las proteínas de pared celular que contienen sitio de ancla de glucosilfosfatidilinositol (GPI-CWPs, por sus siglas en inglés) Hwp1 (Hyphal cell wall protein) y Als1 (Agglutinin-like sequence) (Kaur *et al.*, 2005).

C. glabrata se adhiere eficientemente a células epiteliales de mamíferos. *In vitro*, esta capacidad depende de la proteína de pared celular Epa1 (Epithelial adhesin 1), codificada por el gen *EPA1*, que pertenece al grupo de las GPI-CWPs. El genoma de *C. glabrata* tiene más de 20 genes parálogos de *EPA1*, algunos de estos codifican adhesinas y la mayoría se ubican en regiones cercanas a los telómeros o subteloméricas. Con excepción de *EPA1*, todos los demás genes subteloméricos cuya expresión se ha evaluado *in vitro*, están silenciados por un mecanismo denominado efecto por posición cercana al telómero (TPE por sus siglas en inglés), que se describirá más adelante (Castano *et al.*, 2005; De Las Penas *et al.*, 2003).

Los genes *EPA1* a 7 se ubican en cuatro telómeros de *C. glabrata* y están sujetos a silenciamiento subtelomérico controlado por las proteínas Sir, Rap1 y Rif1 (Castano *et al.*, 2005; De Las Penas *et al.*, 2003). Mutantes de los genes *SIR*, *RAP1* y *RIF1* eliminan el silenciamiento subtelomérico de algunos genes *EPA*, y las células se vuelven hiper adherentes debido a la expresión de varios genes *EPA* (Castano *et al.*, 2005; Rosas-Hernandez *et al.*, 2008).

La expresión de las adhesinas es importante para la virulencia de *C. glabrata in vivo*, pues al utilizar un modelo murino de infección sistémica, se observó que una mutante nula del gen *SIR3* coloniza mejor el riñón que la cepa silvestre (Castano *et al.*, 2005). Además, una cepa que carece de los genes *EPA1*, 6 y 7 no coloniza eficientemente el riñón y la vejiga de ratones infectados en vías urinarias (Domergue *et al.*, 2005). Finalmente, debido a la deficiencia de ácido nicotínico (precursor de NAD⁺) en la orina, el gen *EPA6* se induce en la vejiga y el riñón durante una infección de vías urinarias de ratón. Este efecto se debe a que la desacetilasa de histonas Sir2 requiere como cofactor NAD⁺ para silenciar las regiones subteloméricas donde se encuentra *EPA6* (Domergue *et al.*, 2005).

3.4 Formación de bio-películas

Otra característica que podría contribuir a la virulencia de *C. glabrata* es su alta capacidad para formar bio-películas en superficies de plástico debido a la expresión de los genes *EPA*. Mutantes del gen *SIR4*, que codifica para una de las proteínas que controlan el silenciamiento subtelomérico, muestran inducción transcripcional de los genes *EPA6* y *EPA7* y una capacidad muy elevada para formar bio-películas *in vitro*. La falta del gen *EPA6*, pero no de los genes *EPA1-5*, disminuye la formación de bio-películas *in vitro*. Estos resultados podrían tener implicaciones clínicas importantes, debido a que las infecciones por *C. glabrata* están asociadas con catéteres implantados (Iraqi *et al.*, 2005).

3.5 Hidrolasas

En *C. albicans* algunas hidrolasas secretadas participan en su virulencia, sin embargo, hasta hace poco estas enzimas parecían ser menos importantes en la virulencia de *C. glabrata*. Las aspartil proteasas secretadas (SAPs, por sus siglas en inglés) de *C. albicans* se expresan durante la infección y se requieren

para la virulencia en modelos de infecciones de mucosas y diseminadas (Naglik *et al.*, 2004). El genoma de *C. glabrata* codifica varios ortólogos de los genes que codifican aspartil proteasas asociadas a glicosil fosfatidilinositol (GPI, por sus siglas en inglés) en *S. cerevisiae*. Recientemente se mostró que células de *C. glabrata* en el interior de macrófagos incrementan la expresión de genes que codifican aspartil proteasas asociadas a GPI denominadas yapsinas (*YPS*, por sus siglas en inglés). Los genes *YPS* de *C. glabrata* participan en la integridad de la pared celular, adherencia a células de mamíferos y supervivencia en el interior de macrófagos (Kaur *et al.*, 2007).

En *C. albicans*, la actividad de fosfolipasa B está implicada en su diseminación en el tracto gastrointestinal y en la sangre. El genoma de *C. glabrata* codifica tres genes de fosfolipasa B (*PBL*) con ortólogos en *S. cerevisiae*. *C. glabrata* posee actividad de fosfolipasa B (Kantarcioglu y Yucel, 2002), sin embargo, aún no se ha determinado su función en la virulencia.

3.6 Cambios de morfología

Un factor de virulencia para *C. albicans* es que bajo ciertas condiciones cambia su morfología de levadura a hifa, pero en *C. glabrata* se desconoce si cambios de morfología similares, o bien, cambios en el color de sus colonias tienen implicaciones en su virulencia. En respuesta a limitación de nitrógeno, *C. glabrata* forma estructuras parecidas a pseudo-hifas (Csank y Haynes, 2000).

En *C. glabrata* se han caracterizado componentes de la vía de las cinasas MAP (proteínas activadas por mitógeno) que controlan la formación de pseudo-hifas en *S. cerevisiae*, tal es el caso del factor de transcripción Ste12. Células de *C. glabrata* que carecen de *STE12* sobreviven menos que células silvestres en un modelo de candidosis diseminada en ratones (Calcagno *et al.*, 2003). Adicionalmente, *C. glabrata* forma colonias con tonalidades diferentes de café en cajas de medio de cultivo con sulfato de cobre que correlaciona con la expresión de metalotioneínas (Lachke *et al.*, 2002).

3.7 Rearreglos cromosómicos

En general en eucariontes, la pérdida y ganancia de cromosomas es poco frecuente, por lo que conservan bien su número y organización, sin embargo, en

algunos parásitos protozoarios como *Leishmania* la pérdida y ganancia de cromosomas está relacionada con eventos patogénicos. Los cromosomas de aislados clínicos de *C. glabrata* difieren drásticamente en su estructura y organización, mostrando translocaciones en los brazos cromosómicos, duplicaciones de segmentos grandes y ocasionalmente cromosomas nuevos que incluyen genes relacionados con virulencia (Polakova *et al.*, 2009).

La plasticidad que presenta el genoma de los aislados de *C. glabrata* correlaciona con su resistencia a anti fúngicos y se propone que la plasticidad es una ventaja para sobrevivir en un ambiente cambiante como su hospedero humano (Polakova *et al.*, 2009). En las especies sexuales, los rearrreglos cromosómicos pueden ocasionar aislamiento sexual y especiación subsecuente (Delneri *et al.*, 2003), por lo que la dinámica cromosómica no es compatible con ciclos de vida sexuales, pero sí con la adaptación a ambientes cambiantes. Dado que no se ha identificado un ciclo sexual en *C. glabrata*, entonces se podría pensar que para tolerar las consecuencias de su dinámica genómica que le dan mejor adaptación a su hospedero, *C. glabrata* prescinde del apareamiento (Polakova *et al.*, 2009).

4. Apareamiento (reproducción sexual) y su costo-beneficio

El apareamiento o reproducción sexual 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. Posteriormente, la célula diploide se divide dos veces sin replicar su genoma para generar cuatro células haploides cuyo genoma es una mezcla del de las progenitoras (Figura 2A) (Nielsen y Heitman, 2007).

El apareamiento tiene un costo evolutivo mayor que la reproducción asexual. La población sexual consta de dos géneros que contribuyen para producir descendencia, este tipo de reproducción genera menos descendientes, requiere más energía y es un proceso más lento, pues se necesita que los dos compañeros sexuales se encuentren (Nielsen y Heitman, 2007).

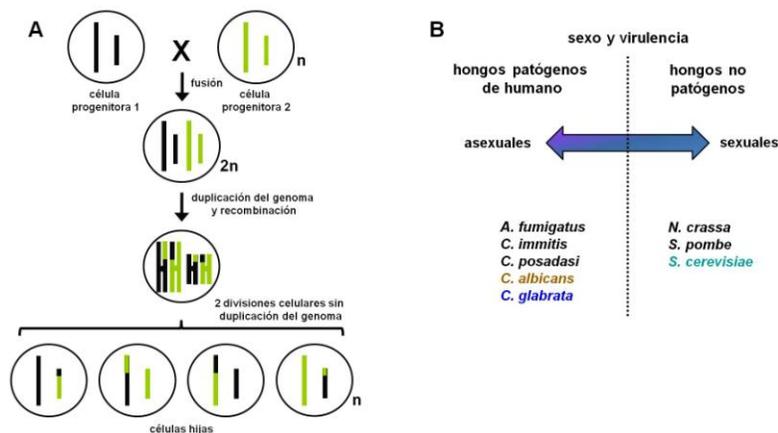


Figura 2. El apareamiento en hongos correlaciona con su patogenicidad. (A) Proceso de apareamiento (reproducción sexual) de dos células progenitoras haploides (n). (B) Correlación de la falta de un ciclo sexual (o limitación del apareamiento) con la patogenicidad de los hongos que causan enfermedades en humanos (modificada de Nielsen y Heitman, 2007).

Aunque la reproducción sexual es un proceso costoso, se ha mantenido en la mayoría de los organismos a lo largo de la evolución. Desde hace más de un siglo se ha pensado que la recombinación llevada a cabo durante la reproducción sexual permite librar al genoma de mutaciones perjudiciales, así como producir descendencia recombinante mejor adaptada a su medio ambiente (Nielsen y Heitman, 2007).

4.1 Varios hongos patógenos de humanos carecen de un ciclo sexual

Conforme se han secuenciado los genomas de más especies de hongos es claro que la gran mayoría han conservado los genes que participan en el apareamiento (Butler, 2010; Butler *et al.*, 2009). El apareamiento se ha documentado en varias especies de hongos no patógenos como *Neurospora crassa*, *S. cerevisiae*, y *Schizosaccharomyces pombe* entre otros. Sin embargo, varios hongos patógenos de humanos como *C. glabrata*, *Coccidioides immitis* y *Coccidioides posadasii* entre otros no se aparean, o bien, lo hacen muy rara vez, como *Aspergillus fumigatus*, *C. albicans* y *Cryptococcus neoformans* (Figura 2B),

que son los tres hongos patógenos predominantes en humanos (Nielsen y Heitman, 2007).

Tradicionalmente, *C. glabrata* y *C. albicans* se han considerado organismos asexuales debido a que presentan una población principalmente clonal. Sin embargo, recientemente se describió en *C. albicans* y *A. fumigatus* un ciclo sexual críptico (Hull *et al.*, 2000; Magee y Magee, 2000; O'Gorman *et al.*, 2009), e inclusive apareamiento entre el mismo tipo sexual (Alby *et al.*, 2009). A pesar de que en *C. glabrata* no se ha encontrado un ciclo de apareamiento, como los demás hongos, contiene la mayoría de los genes requeridos para el apareamiento y la determinación de la identidad sexual (Kaur *et al.*, 2005).

Se piensa que la reproducción sexual en hongos patógenos de humanos podría causar la pérdida de las combinaciones complejas de genes necesarios para la virulencia, y por lo tanto, se comprometería su supervivencia en el hospedero (Nielsen y Heitman, 2007). De manera que al limitar la reproducción sexual, se permitiría la proliferación de los hongos patógenos en sus nichos. Por otra parte, si la reproducción sexual pudiera ocurrir en condiciones de estrés, como ambientes nuevos, hospederos distintos o cambios en el hospedero humano, los patógenos podrían intercambiar material genético. Este intercambio permitiría la selección de poblaciones que se adapten mejor a las nuevas condiciones de su hospedero (Nielsen y Heitman, 2007).

A pesar de que *C. glabrata* y *C. albicans* son levaduras filogenéticamente lejanas, ambas son comensales en las mucosas de mamíferos, por lo que ocupan el mismo nicho. *C. glabrata* y *C. albicans* presentan similitud con respecto a su patogenicidad: ambas son patógenos oportunistas de individuos inmunosuprimidos que causan infecciones en el tracto gastrointestinal, genitourinario y sistémicas. Adicionalmente, ambas levaduras presentan características similares relacionadas con su virulencia como la capacidad de adherirse a células de mamíferos (Kaur *et al.*, 2005), la resistencia a ERO (Cuellar-Cruz *et al.*, 2008), la formación de bio-películas y la actividad de hidrolasas (Kaur *et al.*, 2005). Debido a las similitudes que presentan *C. glabrata* y *C. albicans* con respecto al nicho que ocupan y sus factores de virulencia, se describirán aspectos del apareamiento de *C. albicans*

como la señalización por feromonas y la regulación de genes que le confieren identidad sexual. Asimismo, dado que *C. glabrata* y *S. cerevisiae* son cercanas filogenéticamente y de que el apareamiento de *S. cerevisiae* está bien caracterizado, se describirá también la vía de respuesta a feromonas y la regulación de los genes específicos del tipo sexual de *S. cerevisiae*.

5. La vía de respuesta a feromonas de *S. cerevisiae* y *C. albicans*

En *S. cerevisiae* una vía conservada de las cinasas MAP transforma la señal de feromonas, que estimulan células **a** y α para el apareamiento, del exterior celular en una respuesta transcripcional en el núcleo (Elion, 2000; Lengeler *et al.*, 2000; Schwartz y Madhani, 2004). En *S. cerevisiae* la unión de la feromona α , secretada por las células α , al receptor Ste2p en la superficie de células **a** o de la feromona **a**, secretada por las células **a**, al receptor Ste3p en la superficie de células α , activa una proteína G heterotrimérica, mediante la disociación de la subunidad α (Gpa1p), lo que permite que las subunidades β y γ inicien la cascada de las cinasas MAP (Figura 3).

La cascada de las cinasas MAP involucra la activación de Ste20p, que conduce a la fosforilación de Ste11p, Ste7p y finalmente de Fus3p. Fus3p fosforilada activa a la proteína de unión a DNA Ste12 que junto con Mcm1p activa los genes de respuesta a feromonas para el apareamiento (Figura 3).

Genes ortólogos de los componentes de la vía de respuesta a feromonas en *S. cerevisiae* se han identificado en *C. albicans*, y varios de ellos se requieren para el apareamiento, tal es el caso de *CST20*, ortólogo de *STE20*; *HST7*, ortólogo de *STE7*; *CEK2*, ortólogo de *FUS3* y *CPH1*, ortólogo de *STE12* (Chen *et al.*, 2002; Magee *et al.*, 2002) (Figura 3). Una diferencia entre *C. albicans* y *S. cerevisiae* es que *C. albicans* carece de la proteína adaptadora Ste5p, que actúa para mantener cercanos los componentes de la vía de las cinasas MAP. Como en otros hongos, los componentes centrales de la vía de las cinasas MAP en *C. albicans* funcionan para señalar apareamiento y filamentación (Figura 3), aunque también existen

otras vías independientes a la de las cinasas MAP que señalizan la formación de filamentos.

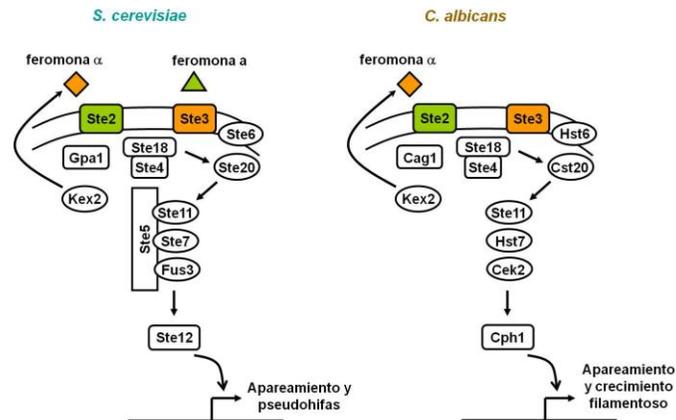


Figura 3. La vía de señalización de las cinasas MAP transduce la señal de la feromona al núcleo. *S. cerevisiae* y *C. albicans* comparten la mayoría de los componentes de la vía de las cinasas MAP acoplada a la proteína G trimérica formada por Gpa1p (Cag1p), Ste4p y Ste18p. En los dos organismos la feromona α secretada se procesa proteolíticamente por Kex2p. La unión de la feromona α al receptor Ste2p, en la superficie de las células a , o de la feromona a a Ste3p, en la superficie de las células α , activa el dímero formado por Ste4p y Ste18p que subsecuentemente activa la cascada de las cinasas MAP. Fus3p (en *S. cerevisiae*) y Cek2p (en *C. albicans*) son las cinasas que se activan más río abajo en la vía. La proteína adaptadora Ste5 no se ha identificado en *C. albicans*. Los genes específicos de células a se indican en verde, mientras que los genes específicos de células α se indican en naranja, los demás genes, sin color, se expresan en ambos tipos de células (modificada de Bennett y Johnson, 2005).

6. Relación entre apareamiento y virulencia

La era genómica ha expandido el conocimiento sobre los hongos patógenos. Todos los hongos patógenos de humanos con genomas secuenciados tienen los loci para el control del tipo de apareamiento, sin embargo, no se conoce el papel que tiene el apareamiento de algunos de estos hongos en su ciclo de vida, ya que no se ha identificado un ciclo sexual. Estudios de genética de población han sugerido que varios hongos patógenos de humanos considerados

asexuales recombinan su material genético, sugiriendo que en condiciones muy especiales podrían llevar a cabo el apareamiento (Figura 2B) (Nielsen y Heitman, 2007).

En *C. albicans*, que es en términos de patogenicidad similar a *C. glabrata*, algunos datos sugieren una relación entre genes de apareamiento y de virulencia. *C. albicans* presenta un cambio de morfología de células blancas a opacas, que se describirá más adelante, y solamente las células opacas son competentes para aparearse (Miller y Johnson, 2002). En un trabajo para la caracterización funcional de la feromona α de *C. albicans* generaron cepas homocigotas **a/a** opacas y compararon su perfil de expresión en respuesta a la feromona α . Estas células responden a la feromona α sobre expresando 62 genes (Figura 4A), de los que destacan siete genes que codifican para proteínas secretadas y adhesinas de pared celular, previamente implicadas en la virulencia de *C. albicans* en un modelo murino de candidosis diseminada (Figura 4B), lo que sugiere que algunas de las proteínas que permiten la comunicación celular en el apareamiento también permiten interacciones con su hospedero (Bennett *et al.*, 2003).

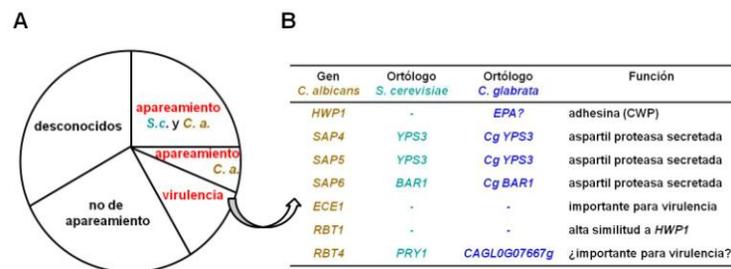


Figura 4. Genes relacionados con la virulencia de *C. albicans* que son inducidos por la feromona α . (A) Gráfica de pastel de 62 genes inducidos por la feromona α en células opacas tipo **a** de *C. albicans* (*C.a.*). La cuarta parte de los genes inducidos por la feromona α en *C. albicans* se inducen también por la misma feromona de *S. cerevisiae* (*S.c.*) (modificada de Bennett *et al.*, 2003). (B) Siete genes inducidos por feromona α en *C. albicans*, que no se inducen por feromona α o están ausentes en *S. cerevisiae*, codifican para proteínas de pared celular y proteasas secretadas que se requieren para la capacidad invasiva de *C. albicans* en modelos murinos (Bennett *et al.*, 2003).

En *C. albicans* la doble mutante nula de los genes, *RBT1* (muy similar a *HWP1*) y *HWP1* (que codifica para una adhesina importante para la virulencia) se aparean con mucho menor eficiencia que la silvestre (Bennett R.J. y Johnson A.D., datos no publicados). *S. cerevisiae* no tiene los genes *RBT1* ni *HWP1*, lo que sugiere que desde que *C. albicans* y *S. cerevisiae* divergieron, hace ~100 a 200 millones de años, *C. albicans* adaptó componentes estructurales del apareamiento para su interacción con el hospedero mamífero.

Adicionalmente, células opacas de *C. albicans* liberan feromonas que inducen en células opacas con tipo de apareamiento opuesto la polarización celular (formación de shmoo), el arresto en la fase G1 del ciclo celular y la formación de tubos de conjugación (Lockhart *et al.*, 2003), todas estas características están relacionadas con el apareamiento. Sin embargo, recientemente se mostró que en respuesta a feromona α , las células blancas de *C. albicans*, que no se aparean, sobre expresan genes que participan en la formación de bio-películas (Sahni *et al.*, 2009), lo que sugiere, una vez más, una relación entre procesos de apareamiento y factores de virulencia en esta levadura.

7. . El apareamiento en *S. cerevisiae*

S. cerevisiae es una levadura con ciclos de reproducción asexual y sexual que puede ser haploide o diploide, aunque el estado diploide predomina en la naturaleza. Debido a que *S. cerevisiae* es el hongo más estudiado, su apareamiento y genética sexual han establecido las bases para entender la reproducción sexual en otros hongos (Lee *et al.*, 2010).

En *S. cerevisiae* la reproducción sexual está controlada por los genes que se ubican en el locus genético *MAT* (mating type) (Figura 5A) del cromosoma III. Los genes **a** o α que se ubican en este locus codifican factores de transcripción que determinan el tipo celular sexual **a** o α . Además de la región *MAT*, en el cromosoma III de *S. cerevisiae* se localizan dos loci silenciosos *HM* (homólogos a *MAT*): *HMR* y *HML*, que contienen copias de los genes **a** y α respectivamente (Figura 5A). La región *MAT* puede cambiar reversiblemente del tipo celular **a** al

tipo α , o vice versa, por un mecanismo de recombinación sitio específica, llevado a cabo por la endonucleasa Ho, con cualquiera de los loci silenciosos *HM* (Haber, 1998).

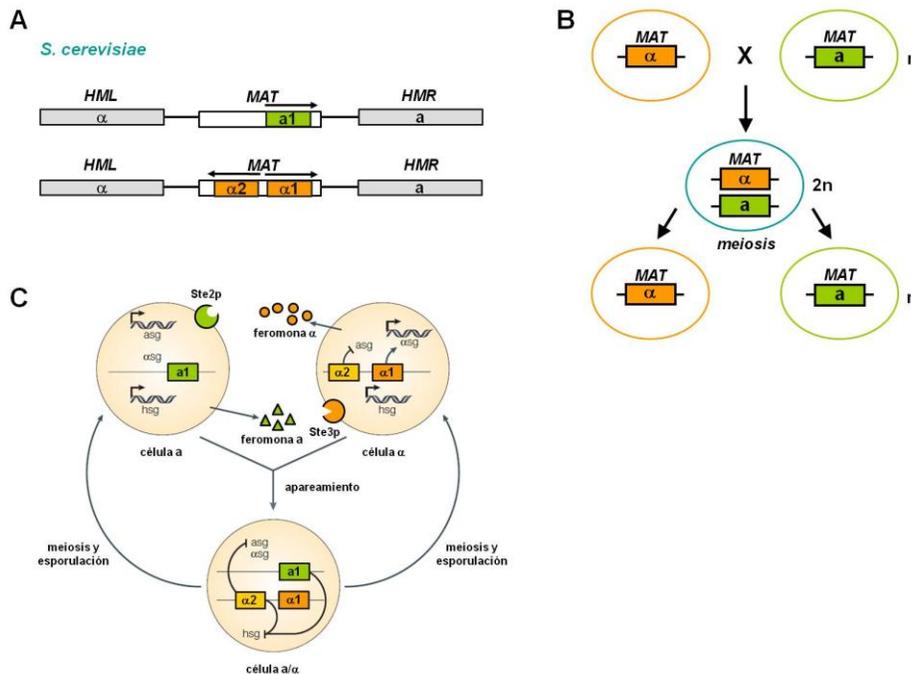


Figura 5. El locus *MAT* de *S. cerevisiae* controla el proceso de apareamiento. (A) Representación esquemática del locus *MAT* de *S. cerevisiae*. (B) Ciclo de apareamiento entre células haploides (n) *MATa* y *MAT α* de *S. cerevisiae* (modificada de Soll, 2004). (C) Determinación del tipo sexual en *S. cerevisiae*. En las células **a** los genes específicos del tipo sexual **a**, como los que codifican Ste2p y la feromona **a**, se expresan por default, pero en las células α están reprimidos por $\alpha 2$. En las células α , la proteína $\alpha 1$ activa los genes específicos del tipo sexual α , como los que codifican Ste3p y la feromona α . Finalmente, en las diploides **a**/ α , el complejo **a1**- $\alpha 2$ reprime genes del tipo **a**, genes del tipo α y genes del estado haploide **a** o α (modificada de Johnson, 2003).

Células haploides que contienen el alelo *MATa* se denominan tipo **a**. En el locus *MATa* se ubica el gen **a1**, que codifica el factor de transcripción con homeodominio HD2, (Figuras 5A y 5C). Por su parte, células haploides que contienen el alelo *MAT α* se denominan tipo α . En la región *MAT α* se localizan los

genes $\alpha 1$, que codifica un factor de transcripción de dominio α que activa genes específicos del tipo celular α (α sg), y $\alpha 2$, que codifica un factor de transcripción con homeodominio HD1 que reprime genes específicos del tipo celular **a** (**asg**) (Johnson, 2003; Lee *et al.*, 2010) (Figuras 5A y 5C).

El apareamiento ocurre cuando células con tipo de apareamiento opuesto se encuentran (Figura 5B). Células haploides tipo **a** secretan feromona **a** que es reconocida por el receptor Ste3p en la superficie de las células α . Por el contrario, células haploides tipo α producen feromona α detectada por el receptor Ste2p en la superficie de las células **a** (Figura 5C) (Bennett y Johnson, 2005). Luego de la estimulación por feromonas, las células **a** se fusionan con las células α formando células diploides **a**/ α que contienen tanto el alelo *MATa* como el alelo *MAT α* (Figura 5B). Las células diploides *MATa*/ α producen los tres factores de transcripción **a1**, $\alpha 1$ y $\alpha 2$. Las proteínas **a1** y $\alpha 2$ forman un heterodímero que reprime **asg**, α sg y genes específicos de células haploides (hsg), por lo que estas células son incapaces de aparearse. En respuesta a limitación de nitrógeno y glucosa las diploides sufren meiosis y esporulación para formar un asca con cuatro células haploides, dos de ellas con información **a** y dos con α (Figura 5B, simplifica a dos células **a** y α) (Johnson, 2003; Lee *et al.*, 2010).

7.1 Circuito regulador del apareamiento de *S. cerevisiae*

La especificación de tipos celulares se basa en circuitos de transcripción, en los que combinaciones de proteínas reguladoras determinan el patrón de expresión génica apropiado para un tipo celular. Los tres tipos celulares que presenta *S. cerevisiae* son células haploides tipo **a** o tipo α y células diploides **a**/ α , resultado del apareamiento de dos haploides con tipo de apareamiento opuesto. Dos conjuntos de genes, los genes específicos del tipo **a** (**asg**) y los genes específicos del tipo α (α sg), se transcriben diferencialmente en las células **a** y en las α , respectivamente, para determinar los fenotipos de apareamiento (Galgoczy *et al.*, 2004) y cuyo patrón de expresión está dictado por el alelo presente en el locus *MAT*. En el modelo estándar la expresión de los **asg** en células **a** es un

estado default, que se consigue solamente por la ausencia de las proteínas $\alpha 1$ y $\alpha 2$ (Figura 6A) (Strathern *et al.*, 1981).

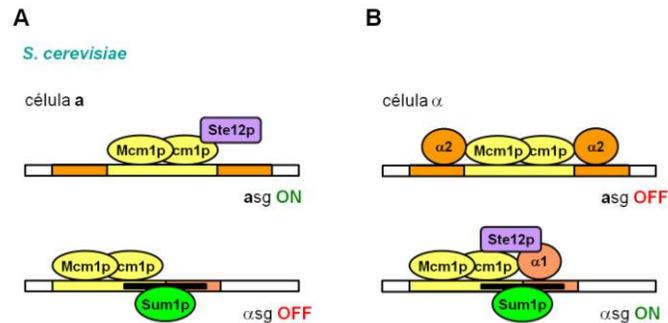


Figura 6. Circuito regulador del tipo de apareamiento **a** (A) y α en (B) *S. cerevisiae*. En células **a**, Ste12p y un homodímero de Mcm1p interactúan para activar genes específicos del tipo sexual **a** (*asg*), adicionalmente, Sum1p reprime genes específicos del tipo sexual α (α sg). No obstante, Mcmp se une a algunos promotores de α sg. En células α el homodímero de Mcm1p forma un complejo con $\alpha 1$ y Ste12p para activar α sg en niveles altos, los cuales se requieren para superar la represión de Sum1p, que permanece asociado a los α sg. En células α el homodímero de Mcm1p también interactúa con $\alpha 2$ para reprimir *asg* (modificada de Zill y Rine, 2008).

Tanto en las células **a** como en las α , además de las proteínas $\alpha 1$ y $\alpha 2$, también se necesitan dos factores de transcripción adicionales, denominados Ste12p y Mcm1p, para la expresión apropiada de genes del tipo de apareamiento. Ste12p se requiere para la transcripción basal de *asg* y α sg en ausencia de feromonas de apareamiento, y para su inducción adicional en respuesta a feromonas (Figura 3) (Fields y Herskowitz, 1985; Kirkman-Correia *et al.*, 1993). Mcm1p es un factor de transcripción, que contiene una caja MADS, que actúa formando homodímeros tanto en células **a** como en células α . En células **a**, Ste12p y un homodímero de Mcm1p interactúan entre sí para activar *asg* (Figura 6A), o bien en células α el homodímero de Mcm1p forma un complejo con $\alpha 1$ y Ste12p para activar α sg (Figura 6B) (Bruhn y Sprague, 1994; Sengupta y Cochran,

1990; Yuan *et al.*, 1993). En células α el homodímero de Mcm1p también interacciona con $\alpha 2$ para reprimir *asg* (Figura 6B) (Smith y Johnson, 1992).

Las sirtuinas son una familia de desacetilasas de proteínas dependientes de NAD^+ que se encuentran en todos los organismos. Los eucariontes poseen varias sirtuinas, por ejemplo, *S. cerevisiae* contiene cinco sirtuinas, Hst1 a 4p y Sir2p. Las sirtuinas controlan el tiempo de vida y la respuesta a estrés en varios organismos, por solo mencionar algunos procesos. En levaduras, las sirtuinas regulan el silenciamiento de genes al desacetilar histonas, una reacción que consume NAD^+ y genera nicotinamida, O-acetil ADP ribosa y la histona desacetilada; de aquí que la actividad de las estas enzimas está muy relacionada con el estado metabólico de las células (Sauve *et al.*, 2006).

Las funciones de Sir2p y Hst1p están bien caracterizadas en *S. cerevisiae*. Como se describirá más adelante, Sir2p interactúa con las proteínas Sir3 y Sir4 para silenciar dominios cromosómicos relativamente grandes, como las regiones subteloméricas y los loci *HM* (silenciamiento regional), propagándose a partir de un sitio de nucleación (revisado por Rusche *et al.*, 2003). A diferencia de Sir2p, Hst1p no se propaga, sino que se asocia con las proteínas Sum1 y Rfm1, en un complejo represor de genes específicos (McCord *et al.*, 2003). El complejo de proteínas Sum1-Rfm1-Hst1 reprime ~50 genes involucrados en la esporulación, biosíntesis de NAD^+ y, como se describe a continuación, también reprime αsg (Bedalov *et al.*, 2003; McCord *et al.*, 2003; Xie *et al.*, 1999; Zill y Rine, 2008).

El papel de Hst1p en la represión de los αsg se descubrió después de 20 años de haber identificado los componentes centrales del circuito regulador del apareamiento de *S. cerevisiae*, cuando se identificó que Sum1p forma parte de este circuito. Sum1p a su vez se asocia, por medio de la proteína adaptadora Rfm1p, a Hst1p para reprimir la transcripción (Zill y Rine, 2008).

En contraste con el modelo estándar de regulación del tipo de apareamiento, se encontró que para la identidad celular tipo **a**, Sum1p reprime los αsg mediante su unión a los sitios consenso de $\alpha 1$ y Mcm1p, o bien, a sitios cercanos (Figura 6A). La represión de la transcripción de los αsg por Sum1p, evita

que las células tipo **a** produzcan grandes cantidades de feromona α ; que las auto estimularía para la reproducción homosexual. En células α , $\alpha 1$ induce altos niveles de α sg que se requieren para superar la represión por Sum1p. A pesar de que en las células α se producen niveles altos de transcritos de α sg, Sum1p permanece asociado a los α sg (Figura 6B) (Zill y Rine, 2008).

8. El apareamiento en *C. albicans*

Durante más de un siglo se consideró a *C. albicans* como una levadura estrictamente asexual, sin embargo, el descubrimiento de un locus genético similar al locus *MAT* de *S. cerevisiae*, denominado *MTL* (mating-type like) (Figura 7A) (Hull y Johnson, 1999), despertó el interés en la búsqueda de un ciclo sexual en *C. albicans*. A diferencia de *S. cerevisiae* que es una levadura haploide, *C. albicans* es un organismo diploide y 97% de sus aislados son heterocigotos en la región *MTL*. El locus *MTLa* de *C. albicans* contiene los genes **a1**, ortólogo al de *S. cerevisiae*, y **a2**, que codifica un factor de transcripción de la familia HMG (High Mobility Group). Por su parte, en el locus *MTL α* se ubican los genes $\alpha 1$ y $\alpha 2$, ortólogos a los de *S. cerevisiae* (Figura 7A).

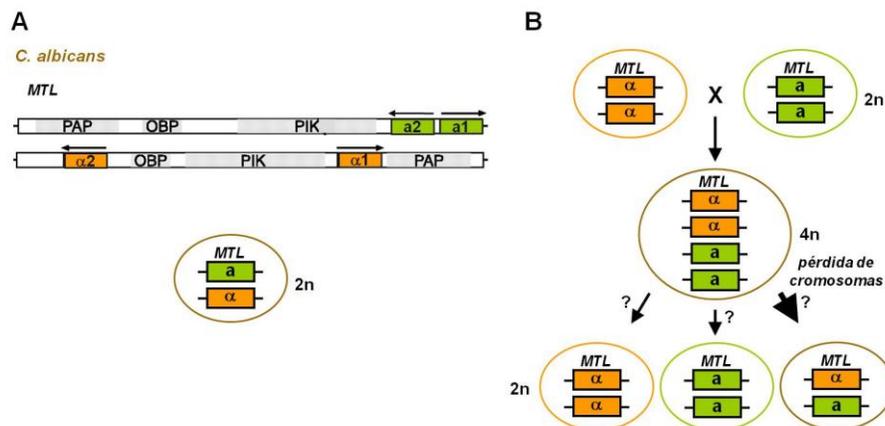


Figura 7. El locus *MTL* de *C. albicans* controla el proceso de apareamiento. (A) Representación esquemática del locus *MAT* de *S. cerevisiae*. (A) Representación esquemática del locus *MTL* de *C. albicans* (modificada de Hull y Johnson, 1999). (B) Ciclo

de apareamiento entre células diploides ($2n$) homocigotas $MTLa$ y $MTL\alpha$ de *C. albicans* (modificada de Soll, 2004).

De acuerdo con el sistema de apareamiento en *S. cerevisiae*, se pensó que una célula a/α sería incapaz de aparearse, por lo que se construyeron cepas con tipo de apareamiento a , al eliminar el locus $MTL\alpha$, o bien, los genes $\alpha1$ y $\alpha2$, y cepas tipo α eliminando el locus $MTLa$ o el gen $a1$ (Figura 8A). Sorprendentemente, después de coinfectar ratones con estas cepas tipo a y α , se recuperaron células a/α con cariotipos mayores a los diploides ($2n$), que resultaron de la fusión celular en el hospedero (Hull *et al.*, 2000). Similarmente, al usar sorbosa como única fuente de carbono y seleccionar la pérdida del cromosoma 5 donde se ubica la región MTL , se generaron cepas tipo a y tipo α que se aparearon bajo condiciones *in vitro* (Magee y Magee, 2000).

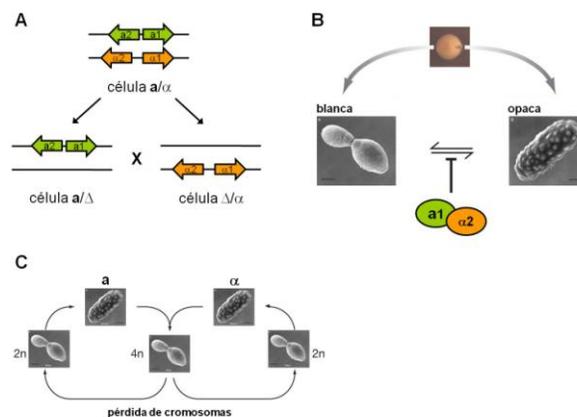


Figura 8. El locus MTL de *C. albicans* controla el cambio morfológico requerido para el apareamiento. (A) Cepas a/Δ y Δ/α de *C. albicans*, derivadas de una cepa a/α incapaz de aparearse, pueden aparearse. (B) El complejo $a1-\alpha2$ reprime genes responsables del cambio en la morfología de colonia blanca a opaca. En el microscopio electrónico las células blancas se ven lisas y redondas, mientras que las células opacas son rugosas y alargadas (modificada de Bennett y Johnson, 2005; Nielsen y Heitman, 2007). (C) El apareamiento en *C. albicans* se produce solo entre una célula homocigota a opaca y una célula homocigota α opaca (modificada de Bennett y Johnson, 2005; Nielsen y Heitman, 2007).

Cerca del 3% de los aislados de *C. albicans* son homocigotos **a/a** o α/α en el locus *MTL* y capaces de aparearse (Figura 7B) al igual que las cepas a/Δ y Δ/α , derivadas de una cepa **a/a** (Figura 8A) (Miller y Johnson, 2002). Esto indica que la homocigosidad, y por lo tanto la ausencia del complejo **a1- α 2** es un requisito para que *C. albicans* se aparee. Las pocas células homocigotas en *MTL* se aparean para generar una tetraploide, que por un proceso de pérdida al azar de cromosomas produce diploides homocigotas y heterocigotas en *MTL* (Figuras 7B) (Forche *et al.*, 2008).

Estudios posteriores mostraron que las células **a/a** no se aparean porque los factores de transcripción **a1** y α 2 forman un heterodímero que reprime la expresión de los **asg** y α sg; además de que inhibe un cambio morfológico crítico (descrito a continuación) que incapacita a las células **a/a** para el apareamiento (Tsong *et al.*, 2003). El que naturalmente haya muy pocas células homocigotas para *MTL* explica por qué durante tanto tiempo se consideró a *C. albicans* como una levadura asexual.

En *C. albicans* existe un proceso de regulación adicional antes de que las homocigotas se aparen. Un cambio en la morfología de la colonia de blanca a opaca es crítico para que *C. albicans* se aparee, pues el apareamiento de las células opacas es un millón de veces más eficiente que el de las células blancas (Figuras 8B y 8C). Células diploides **a/a** no llevan a cabo el cambio de blancas a opacas, mientras que las **a/a** y α/α llevan a cabo esta transición (Miller y Johnson, 2002).

Es interesante que el apareamiento en *C. albicans* involucra un cambio de morfología celular que no ocurre en *S. cerevisiae*. Dado que los nichos ocupados por *C. albicans* y *S. cerevisiae* son muy diferentes, es muy probable que el apareamiento de estas dos levaduras ocurra en condiciones muy diferentes.

El que *C. albicans* tenga un ciclo sexual tan particular y tan controlado, pudiera deberse a la presión selectiva que impone el sistema inmune, pues al evitar el reconocimiento de este, la levadura no es atacada y sobrevive. A

diferencia de las células opacas, las células blancas producen quimioatrayentes para neutrófilos; por lo tanto, la ausencia de este quimioatrayente en las células opacas, competentes para aparearse, tal vez represente un mecanismo para protegerlas del sistema inmune y así facilitar el apareamiento (Geiger *et al.*, 2004).

8.1 Circuito regulador del apareamiento de *C. albicans*

De manera similar a *S. cerevisiae*, los factores de transcripción que se localizan en la región cromosómica *MTL* de *C. albicans*, especifican el tipo de apareamiento **a** y α al activar y reprimir conjuntos de genes. En *C. albicans*, las proteínas **a1**, $\alpha1$ y $\alpha2$ también coordinan la expresión de los **asg** y α s_g; pero además, existe un factor de transcripción adicional denominado **a2** codificado en el locus *MTLa*, ausente en *S. cerevisiae*, que controla su circuito de apareamiento (Figura 9) (revisado por Bennett y Johnson, 2005; Johnson, 2003). Los **asg** están reprimidos en las células α de *C. albicans*, sin embargo, **a2** los activa en las células **a**. El circuito de regulación positiva de los **asg** en *C. albicans* es más antiguo que el circuito de control en *S. cerevisiae*, donde se reorganizó esta red reguladora debido a la ausencia de **a2**, de manera que $\alpha2$ reprime los **asg** en las células α . No obstante la regulación positiva de los **asg** en *C. albicans* o negativa en *S. cerevisiae*, el resultado final es el mismo en ambos organismos: los **asg** se expresan solo en las células **a** (Tsong *et al.*, 2003).

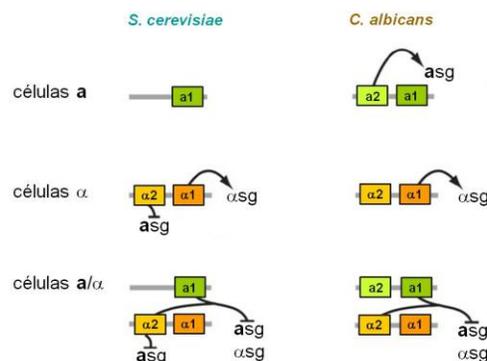


Figura 9. Comparación de los circuitos reguladores del tipo de apareamiento de *S. cerevisiae* y *C. albicans*. En *S. cerevisiae* la formación de una célula **a** no requiere de los genes *MAT*. En células α , $\alpha1$ induce los α s_g y $\alpha2$ reprime los **asg**. En *C. albicans* el

circuito regulador es diferente: **a2** activa los **asg**, y $\alpha 1$ activa los α sg. En ambos organismos **a1** y $\alpha 2$ actúan juntos para reprimir el apareamiento. En *S. cerevisiae* **a1**- $\alpha 2$ reprimen directamente genes para el apareamiento, mientras que en *C. albicans* reprimen directamente genes de apareamiento e indirectamente inhiben la transición de células blancas a opacas (modificada de Tsong *et al.*, 2006).

Aunque existen grandes similitudes entre los circuitos de transcripción que controlan el apareamiento en *S. cerevisiae* y *C. albicans*, también hay diferencias importantes: a) El locus *MTL* de *C. albicans* codifica a **a2**, un activador de **asg**, que está ausente en *S. cerevisiae*. Para compensar esta ausencia, *S. cerevisiae* tiene una rama extra en su circuito que involucra la represión de **asg** por $\alpha 2$ (Figura 9). b) Algunos genes están controlados por los reguladores del tipo de apareamiento en un organismo, pero no en el otro, tal es el caso de *NEJ1*, que participa en la reparación de DNA de extremos no homólogos. *NEJ1* está reprimido por **a1**- $\alpha 2$ en las células diploides, pero no en las haploides de *S. cerevisiae* (Valencia *et al.*, 2001). No obstante, *NEJ1* no está reprimido por **a1**- $\alpha 2$ en *C. albicans* (Tsong *et al.*, 2003). c) En *C. albicans* el cambio de colonias blancas a opacas, ausente en *S. cerevisiae*, involucra la regulación de ~400 genes. Como el cambio de células blancas a opacas está regulado negativamente por **a1**- $\alpha 2$, este heterodímero controla también una gran cantidad de genes indirectamente.

9. Las regiones cromosómicas *MTL* de *C. glabrata*

Dado que en *C. albicans* se identificó un ciclo sexual críptico muy regulado, razón por la cual se consideraba asexual, en *C. glabrata* se buscaron genes similares a los que controlan el tipo de apareamiento en *S. cerevisiae*. Se descubrió que *C. glabrata* posee tres regiones cromosómicas o loci que contienen genes similares a los del tipo de apareamiento, que se denominaron *MTL* (mating-type like) (Figura 10) (Srikantha *et al.*, 2003). Estos tres loci tienen una configuración similar a los tres loci de apareamiento de *S. cerevisiae*.

El locus *MTL1* se ubica en una posición interna del cromosoma B (a ~113 kb del telómero izquierdo) y puede contener información tipo **a** o tipo α en

proporción similar; el locus *MTL2* se localiza a ~29.4 kb del telómero izquierdo del cromosoma E y ~97% de los aislados contienen información tipo *a*; y finalmente, el locus *MTL3* se encuentra en el mismo cromosoma que la región *MTL1*, a ~10.5 kb del telómero izquierdo del cromosoma B y ~97% de los aislados contienen información tipo α (Figura 10) (Lavaniegos-Sobrino *et al.*, 2009; Srikantha *et al.*, 2003).

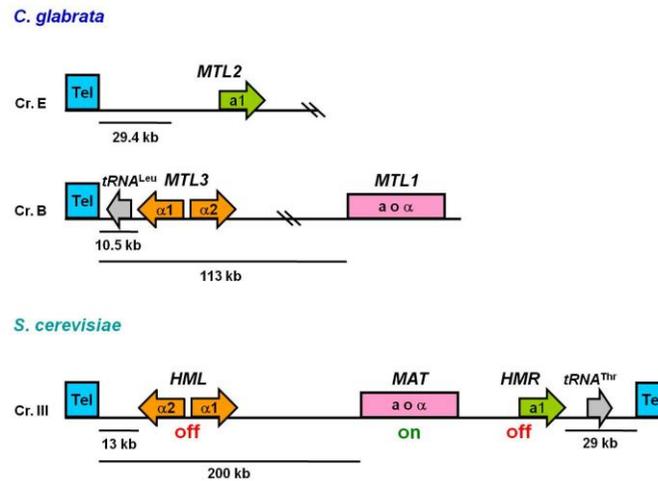


Figura 10. Configuración similar de los loci de apareamiento de *C. glabrata* (*MTL*) y *S. cerevisiae* (*MAT* y *HML*): El locus *MTL1* es el ortólogo del locus *MAT*, el locus *MTL2* es el ortólogo de *HMR*, y finalmente, el locus *MTL3* es el ortólogo de *HML*.

Los loci *MTL2* y *MTL3* de *C. glabrata* son sinténicos de un lado, y por lo tanto, se consideran ortólogos de los loci *HMR* y *HML* de *S. cerevisiae*, respectivamente; además de que se encuentran en una configuración similar al ubicarse cerca de los telómeros. Al igual que *S. cerevisiae* y *C. albicans*, los genes *a* y α de *C. glabrata* son genes cuya transcripción es divergente, adicionalmente, el gen *a1* en los tres organismos contiene dos intrones en la hélice de unión a DNA (Hull y Johnson, 1999).

En *S. cerevisiae*, la endonucleasa Ho permite completar el ciclo sexual en poblaciones clonales, al inducir la formación de células con tipos de apareamiento opuestos (Haber, 1998). Debido a que las infecciones de *C. glabrata* suelen ser monoclonales (Brockert *et al.*, 2003), la reproducción sexual podría depender de la

capacidad de las células para cambiar de tipo de apareamiento. De manera similar a lo que ocurre en *S. cerevisiae*, *C. glabrata* tiene el sitio de corte de Ho en el locus activo *MTL1*, y puede cambiar el tipo de información en *MTL1*, de **a** a α , y viceversa (Butler *et al.*, 2004). Este cambio de información en el locus *MTL1* se ha observado *in vivo* en aislados obtenidos de un mismo paciente (Brockert *et al.*, 2003).

10. El silenciamiento de los loci *HM* de *S. cerevisiae*

El genoma de los eucariontes contiene regiones compactadas por proteínas que se denominan heterocromatina. La heterocromatina se localiza principalmente en regiones pericentroméricas y en regiones cercanas a los telómeros o subteloméricas, sin embargo, también puede presentarse en regiones intracromosómicas no centroméricas. La heterocromatina mantiene la estructura y localización de los cromosomas y regula negativamente la transcripción de genes por un mecanismo global de cromatina represiva (Rusche y Lynch, 2009).

La represión de la transcripción mediante la formación de cromatina compacta o represiva se conoce como silenciamiento. El silenciamiento regional involucra represión transcripcional heredable, de rango amplio y dependiente de posición; en este proceso se dan interacciones entre nucleosomas, proteínas no histonas de unión a la cromatina y enzimas modificadoras de la cromatina.

En el genoma de *S. cerevisiae* se ha caracterizado el silenciamiento de tres regiones: las regiones subteloméricas, el locus de los genes que codifican para DNA ribosomal (rDNA) en el cromosoma XII y los loci de apareamiento *HM* en el cromosoma III (revisado por Rusche *et al.*, 2003).

10.1 Los silenciadores y las proteínas que inician el silenciamiento en *HM*

El silenciamiento de los loci *HMR* y *HML*, que se localizan a 29 kb y 13 kb respectivamente de los telómeros del cromosoma III (Figura 10 y Figura 11 panel inferior), inicia en elementos de DNA de ~150 pb llamados silenciadores. Tanto *HMR* como *HML* están flanqueados por dos silenciadores que contienen combinaciones diferentes de sitios de unión de las proteínas nucleares ORC

(complejo de reconocimiento del origen), Rap1 y Abf1 (revisado por Rusche *et al.*, 2003).

El locus *HMR*, que generalmente contiene información tipo **a**, está flanqueado por el silenciador E, que tiene sitios de unión a ORC, Rap1p y Abf1p, y por el silenciador I, con sitios de unión a Abf1 y ORC. Cabe mencionar que el silenciador *HMR-E* es más fuerte que *HMR-I*. Por su parte, el locus *HML* que contiene principalmente información α , está flanqueado por el silenciador E, que solo une Rap1p y ORC, y por el silenciador I, con sitios de unión a Abf1p y ORC (Figura 11 panel inferior). En contraste a los silenciadores de *HMR*, cualquiera de los dos silenciadores de *HML* puede silenciar esta región en ausencia del otro (revisado por Rusche *et al.*, 2003).

10.2 Las proteínas Sir propagan el silenciamiento en *HM*

Las proteínas ORC, Rap1 y Abf1 reclutan con cierta jerarquía a cuatro proteínas Sir (Silent information regulator), Sir1 a 4p, que establecen y propagan la cromatina represiva en los cromosomas (Figura 11 panel inferior). La proteína Sir1 se une directamente a ORC, incrementando la probabilidad de unión a los silenciadores *HM* de las demás proteínas Sir, sin embargo, Sir1p no se propaga a lo largo del cromosoma (Gardner *et al.*, 1999; Rusche *et al.*, 2002; Triolo y Sternglanz, 1996; Zhang *et al.*, 2002). Sir4p se recluta al silenciador al interactuar con Sir1p (Triolo y Sternglanz, 1996) y Rap1p (Moretti *et al.*, 1994; Moretti y Shore, 2001). Sir4p a su vez recluta a la desacetilasa de histonas dependiente de NAD⁺, Sir2p, al silenciador, formando el complejo Sir2-Sir4p (Ghidelli *et al.*, 2001; Hoppe *et al.*, 2002). Sir3p se une a Rap1p (Moretti *et al.*, 1994; Moretti y Shore, 2001) y a Sir4p (Moazed *et al.*, 1997) y probablemente también a Abf1. Adicionalmente, se ha reportado que las proteínas Sir2, Sir3 y Sir4 forman un complejo soluble que se requiere para el ensamblaje de la cromatina silenciosa en los loci *HM* (Rudner *et al.*, 2005).

Luego de que las proteínas Sir se ensamblan en el silenciador, Sir2p queda cerca de sus sustratos, las lisinas acetiladas en el extremo amino-terminal de las histonas H3 y H4. Sir2p al desacetilar estas lisinas del amino-terminal, compacta

la cromatina y crea un sitio de alta afinidad para la unión de Sir3p y Sir4p (y por lo tanto de Sir2p), para el reclutamiento de proteínas Sir2 a 4p adicionales. Este proceso coloca a nuevas proteínas Sir2 cerca de los extremos acetilados de H3 y H4 del siguiente nucleosoma (Figura 11 panel inferior). El proceso secuencial de desacetilar nucleosomas cercanos y reclutar proteínas Sir adicionales permite que el complejo Sir2 a 4p se propague a varias kilo bases de DNA (Hoppe *et al.*, 2002; Rusche *et al.*, 2002) para generar la cromatina represiva.

10.3 Las proteínas Ku participan modestamente en el silenciamiento de los loci *HM*

El complejo Ku de *S. cerevisiae* es un heterodímero compuesto por yKu70p, codificada por el gen *HDF1*, y yKu80p, codificada por *HDF2*, que funciona como helicasa dependiente de ATP que se une al DNA para reparar cortes de DNA de doble cadena por la unión de extremos no homólogos (NHEJ). La unión de yKu70p al DNA no depende de secuencia, sin embargo, tiene una alta afinidad por los cortes en el DNA de doble cadena (Milne *et al.*, 1996). Adicionalmente, Ku se une a los extremos de los cromosomas para protegerlos de rearrreglos subteloméricos y actividades nucléolíticas, y participa en el reclutamiento de la telomerasa, al unirse a su tallo-asa de RNA TLC1 y a Cdc13p para el alargamiento del telómero (revisado por Fisher y Zakian, 2005). Finalmente, el complejo Ku facilita la localización de los telómeros en conglomerados en la periferia nuclear (Laroche *et al.*, 1998).

Durante mucho tiempo se pensó que el silenciamiento de los loci *HM* era independiente de las proteínas Ku, sin embargo, recientemente se determinó que Sir1p enmascara el papel de yKu80p en el silenciamiento de los *HM*, pues en ausencia de *SIR1*, se puede observar el efecto modesto de silenciamiento ejercido por yKu70p y yKu80p al asociarse a los silenciadores de *HMR* y *HML* por medio de Sir4p (Figura 11 panel inferior) (Patterson y Fox, 2008; Vandre *et al.*, 2008).

11. El silenciamiento subtelomérico de *S. cerevisiae*

Además del silenciamiento de los loci *HM*, los genes reporteros que se insertan cerca de los telómeros de *S. cerevisiae* se silencian por un proceso

denominado efecto de posición cercana al telómero (TPE, por sus siglas en inglés) (Gottschling *et al.*, 1990). El TPE requiere de la mayoría de las proteínas que silencian los loci *HM*, con excepción de Sir1p y ORC (Figura 11) (Aparicio *et al.*, 1991). Sin embargo, la mayoría de los estudios del TPE se han hecho en telómeros artificiales que carecen de secuencias repetidas subteloméricas, por lo que en algunos telómeros naturales Sir1p es importante para establecer cromatina silenciosa (Pryde y Louis, 1999).

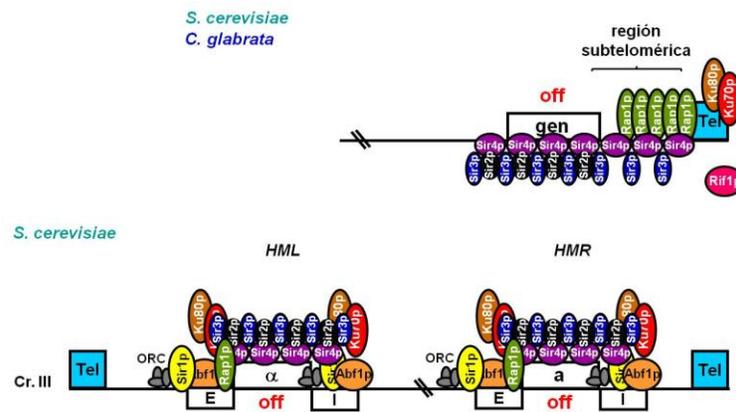


Figura 11. Maquinaria de silenciamiento de genes subteloméricos de *S. cerevisiae* y *C. glabrata* y de los loci de apareamiento *HM* de *S. cerevisiae*.

El ensamblaje de la heterocromatina en *S. cerevisiae* puede propagarse de 1 a 4 kb del extremo del telómero; este silenciamiento disminuye conforme incrementa la distancia al telómero (Gottschling *et al.*, 1990; Renauld *et al.*, 1993). En *S. cerevisiae*, los telómeros miden ~350 pb y están constituidos por repeticiones cortas heterogéneas en serie de la secuencia consenso $C_{1-3}A/TG_{1-3}$ (Conrad *et al.*, 1990; Wright y Zakian, 1995). El silenciamiento subtelomérico en *S. cerevisiae* inicia con la unión de Rap1p a las secuencias repetidas de los telómeros, libres de histonas, que contienen sitios de unión a Rap1 aproximadamente cada 40 pb (existen ~10 a 20 moléculas de Rap1 por telómero).

El silenciamiento subtelomérico presenta un orden de reclutamiento de proteínas Sir similar al reclutamiento en los silenciadores de los loci *HM*, con la diferencia de que Sir1p no se requiere para este silenciamiento, y Sir4p se recluta

a los telómeros por medio de Rap1p y yKu70p (Figura 11 panel superior) (Martin *et al.*, 1999; Mishra y Shore, 1999; Tsukamoto *et al.*, 1997). Al igual que en *HM*, la propagación de Sir2 a 4p a dominios subteloméricos adyacentes, por la acción de Sir2p, genera la cromatina represiva (revisado por Rusche *et al.*, 2003).

11.1 Las proteínas Ku y Rif1

Además de que el complejo Ku mantiene la estructura de los telómeros, se une a estos para mantener su longitud y para establecer silenciamiento subtelomérico (Laroche *et al.*, 1998). Ku estabiliza la asociación de Sir2p y 4p con los telómeros, pues mutantes en *HDF1* y *HDF2* abolen el TPE (Boulton y Jackson, 1998; Laroche *et al.*, 1998; Nugent *et al.*, 1998); pero además, yKu70p puede iniciar el silenciamiento subtelomérico (Martin *et al.*, 1999; Mishra y Shore, 1999). En todos los telómeros de *S. cerevisiae* evaluados a la fecha, las proteínas Ku son esenciales para el TPE, pues facilitan el reclutamiento de Sir3 y 4p a regiones subteloméricas (Figura 11 panel superior) (Boulton y Jackson, 1998; Laroche *et al.*, 1998; Martin *et al.*, 1999; Mishra y Shore, 1999).

En *S. cerevisiae*, Rap1p también interactúa con las proteínas Rif1p y Rif2p (Rap1 interacting factors 1 and 2) (Hardy *et al.*, 1992; Wotton y Shore, 1997) para controlar la longitud de los telómeros. En ausencia de Rif1p, y en menor grado de Rif2p, la longitud de los telómeros incrementa su longitud de 350 pb a 500 pb.

A diferencia de las proteínas Sir y Ku que participan en el establecimiento y mantenimiento de la cromatina represiva en regiones subteloméricas, las proteínas Rif1 y Rif2 de *S. cerevisiae* compiten con Sir3p y Sir4p por su unión con Rap1p. Mutantes *rif1*Δ de *S. cerevisiae* incrementan el silenciamiento en regiones subteloméricas pero muestran una disminución ligera en el silenciamiento de los loci *HM*, sugiriendo una titulación de las proteínas Sir2 a 4p, que son reclutadas por Rap1p, a los telómeros más largos que presentan las mutantes *rif1*Δ. Esta titulación quizás se debe a la mayor disponibilidad de Rap1 en los telómeros alargados (Hardy *et al.*, 1992; Wotton y Shore, 1997).

12. El silenciamiento subtelomérico de *C. glabrata*

Datos generados en nuestro laboratorio muestran que al menos cuatro regiones subteloméricas, en las que se ubican los genes *EPA1* a *7* que codifican adhesinas, están sujetas a silenciamiento (Figura 11 panel superior). Esto se determinó al analizar la expresión o represión del gen reportero *URA3* insertado en regiones intergénicas de los genes *EPA* y entre los genes *EPA* y sus telómeros. Para ello se utilizaron cepas de *C. glabrata* cuyo gen endógeno *URA3* se eliminó completamente (genotipo *ura3Δ*) y en un paso posterior, se les insertó el gen *URA3* como reportero de la estructura de la cromatina, utilizando el transposón Tn7-*URA3* modificado (Castano *et al.*, 2003).

C. glabrata no contiene el gen *SIR1*, sin embargo, se puede establecer silenciamiento subtelomérico de manera eficiente hasta una distancia de ~24 kb del telómero (Rosas-Hernandez *et al.*, 2008). Estudios sistemáticos en *C. glabrata* con mutantes nulas de genes homólogos de la maquinaria de silenciamiento subtelomérico, muestran que Rap1p y Sir2 a 4p silencian las regiones subteloméricas de los cromosomas E_{-R}, I_{-R}, C_{-L} y C_{-R}, sin embargo, el requerimiento de las proteínas yKu70, yKu80 y Rif1 varía en estas regiones (Figura 11) (Castano *et al.*, 2005; De Las Penas *et al.*, 2003; Rosas-Hernandez *et al.*, 2008).

Como se mencionó anteriormente, en *C. glabrata* se sabe de la participación de las proteínas Sir y Ku en el silenciamiento de algunas regiones subteloméricas, sin embargo, se desconoce cómo interactúan estas proteínas así como la jerarquía para su reclutamiento. En nuestro laboratorio se están construyendo herramientas moleculares para caracterizar la interacción entre las proteínas Sir y Ku así como su interacción con las regiones subteloméricas.

ANTECEDENTES DIRECTOS

Debido a que no se ha observado un ciclo de apareamiento naturalmente o en el laboratorio se considera que *C. glabrata* es asexual (Fidel *et al.*, 1999). No obstante, *C. glabrata* posee tres loci *MTL* similares a los de apareamiento de *S. cerevisiae*, denominados *MTL1*, *MTL2* y *MTL3*, que se encuentran en una configuración muy similar (Figura 10). Dada su sintenia con *S. cerevisiae*, se propuso que el locus *MTL1* con información **a** o α (ortólogo de *MAT*) se expresa, mientras que los loci *MTL2a* (ortólogo de *HMR*) y *MTL3 α* (ortólogo de *HML*), que se encuentran cerca de los telómeros, permanecen silenciosos (Figura 10) (Brockert *et al.*, 2003; Srikantha *et al.*, 2003). El silenciamiento de los loci *HM* en *S. cerevisiae* es esencial para que se lleve a cabo la reproducción sexual, ya que si estos loci se expresaran, una célula haploide expresaría ambos tipos de información de apareamiento (**a** y α) y se comportaría como una diploide incapaz de aparearse.

Muller *et al.*, 2008 mostraron, mediante RT-PCR, que el gen $\alpha 1$ se expresa en cepas *MTL1 α* , *MTL2a* y *MTL3 α* , pero no en cepas *MTL1a*, *MTL2a* y *MTL3 α* ; además, determinaron que el gen **a1** se expresa en estas dos cepas, indicando que *MTL3* es la única región *MTL* inactiva para la transcripción.

De acuerdo con la información presente en el locus *MTL1* las células expresan y se clasifican como tipo **a** o tipo α , y se demostró que ocurre cambio de tipo de apareamiento *in vivo*, en distintos sitios de colonización durante el curso de una infección en el hospedero humano (Brockert *et al.*, 2003).

Por otra parte, en un estudio previo de comparación del genoma, se utilizó una serie de secuencias del genoma de *C. glabrata*, que se tenían en ese momento, las cuales representan aproximadamente una quinta parte del genoma completo, y se encontró que *C. glabrata* posee genes ortólogos de al menos 31 genes de *S. cerevisiae* cuyas funciones conocidas son el apareamiento, la meiosis y la esporulación (Wong *et al.*, 2003).

En el laboratorio, utilizamos la secuencia del genoma de *C. glabrata* (cepa de referencia CBS138) que se terminó recientemente y que está accesible públicamente en el sitio web: <http://cbi.labri.fr/Genolevures/elt/CAGL/>, para compararla con 245 genes que se ha reportado que están implicados en el apareamiento, meiosis y esporulación de *S. cerevisiae*. La comparación anterior tuvo como propósito determinar si *C. glabrata* posee los genes ortólogos correspondientes. Encontramos que 235 genes (de los 245 comparados) están presentes en *C. glabrata* y únicamente cuatro genes no se encuentran en el genoma de *C. glabrata* ni tienen parálogos en ninguna de las dos especies (Tabla 1, datos no publicados).

Tabla 1. Genes involucrados en el apareamiento de *S. cerevisiae* que no se encuentran en el genoma de *C. glabrata*

Gen	ORF de <i>S. cerevisiae</i>	Descripción	Parólogo en <i>S. cerevisiae</i>	Parólogo en <i>C. glabrata</i>
<i>AFR1</i>	YDR085C	Regulador de Ste2p. Se requiere para formación de la proyección durante el apareamiento (shmoo).	YER158c	CAGL0I8591
<i>DIG2</i>	YDR480w	Proteína de función desconocida que se induce por feromonas.	YPL049c (<i>DIG1</i>)	CAGL0L12782
<i>FIG2</i>	YCR089w	Adhesina de pared celular que se expresa específicamente durante el apareamiento para mantener la integridad de la pared celular.	YNR044w (<i>AGA1</i>)	CAGL0C03575
<i>MCK1</i>	YNL307c	Cinasa de serina, treonina y tirosina involucrada en el control de la segregación de cromosomas y la entrada a meiosis	YOL128C (<i>YGK3</i>)	CAGL0E01683
<i>MER1</i>	YNL2120w	Proteína con motivos de unión a RNA que se requiere para el splicing de mRNAs específicos de meiosis.	ninguno	ninguno
<i>SIR1</i>	YKR101w	Proteína implicada en la represión de los <i>loci</i> de apareamiento <i>HM</i> silenciosos. Interactúa con Orc1p para reclutar a Sir4p.	ninguno	ninguno
<i>SPO20</i>	YMR017w	Subunidad del complejo tSNARE, específica de meiosis. Se requiere para la formación de la membrana de la pro-espora durante la esporulación.	ninguno	ninguno
<i>SPO71</i>	YDR104c	Proteína específica de meiosis de función desconocida. Se requiere para la formación de pared de la espora.	ninguno	ninguno
<i>SPS18</i>	YNL204c	Proteína de función desconocida, con un dedo de zinc. Se expresa durante la	YDL226c (<i>GCS1</i>)	CAGL0G05445

		esporulación.		
<i>SSF2</i>	YDR312w	Proteína requerida para la maduración de la subunidad grande del ribosoma.	YHR066w (<i>SSF1</i>)	CAGL0J10890

De los diez genes de *S. cerevisiae* ausentes en *C. glabrata*, seis tienen un gen parálogo en *S. cerevisiae* (*AFR1*, *DIG2*, *FIG2*, *MCK1*, *SPS18* y *SSF2*) cuya función está conservada, pero además, *C. glabrata* posee los seis ortólogos de estos genes parálogos de *S. cerevisiae* (<http://cbi.labri.fr/Genolevures/elt/CAGL/>). Un gen parálogo es aquel que se originó por la duplicación de un gen original del cual ha divergido. De los cuatro genes restantes, tres se expresan y requieren específicamente durante la meiosis y esporulación en *S. cerevisiae* (<http://cbi.labri.fr/Genolevures/elt/CAGL/>). El séptimo gen, *SIR1*, se requiere parcialmente para el establecimiento de la cromatina silenciosa en los loci *HML* y *HMR* de *S. cerevisiae* (revisado por Rusche *et al.*, 2003), pero no para el silenciamiento de las regiones subteloméricas. Trabajo previo de nuestro laboratorio sugiere que en *C. glabrata*, al igual que en *S. cerevisiae* no se requiere *SIR1* para establecer zonas de cromatina silenciosa en regiones subteloméricas, como en el caso de los genes *EPA* (Epithelial Adhesin), que codifican adhesinas en regiones subteloméricas (Castano *et al.*, 2005; De Las Penas *et al.*, 2003).

Adicionalmente, *C. glabrata* posee genes ortólogos a los del apareamiento de la levadura con estado sexual *Kluyveromyces delphensis* (Wong *et al.*, 2003). Estos datos sugieren que *C. glabrata* tiene los genes necesarios para aparearse, sin embargo, aún no se ha encontrado un ciclo de reproducción sexual.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Los datos anteriores indican que *C. glabrata* tiene la mayoría de los genes necesarios para llevar a cabo el apareamiento, aunque esto no se haya observado experimentalmente ni tampoco en la naturaleza, por lo que es posible que posea un ciclo sexual no descubierto. Sin embargo, el hecho de poseer los genes no implica necesariamente que su expresión se regule de la misma forma que en *S. cerevisiae*, ni tampoco que posean exactamente la misma función. El hecho de

que *C. glabrata* no posea el gen *SIR1* podría tener implicaciones en la regulación de la expresión de los loci *MTL2* y *MTL3*. Además, como se mencionó anteriormente, es esencial mantener estos loci silenciados para establecer la identidad sexual de *S. cerevisiae*. Por otro lado, varios hongos patógenos de humanos conservan la mayoría de los genes necesarios para la reproducción sexual, sin embargo en algunos de ellos (como *C. glabrata*, *C. tropicalis* y *C. parapsilosis*) aún no se ha descubierto un ciclo sexual. Esto podría sugerir, por un lado, que es posible que *C. glabrata* posea un ciclo sexual aún no descubierto, o bien, que los factores transcripcionales codificados en los loci *MTL* se hayan conservado para realizar otras funciones importantes para su supervivencia como comensal o patógeno oportunista.

HIPÓTESIS

Debido a que en *C. glabrata* no se ha descubierto un ciclo de reproducción sexual, la hipótesis de este trabajo es que la regulación de la expresión de los genes codificados en los loci *MTL* y/o de los genes de respuesta a feromonas de *C. glabrata* es distinta a la que se presenta en *S. cerevisiae*.

ESTRATEGIA

Para estudiar la regulación transcripcional de los loci *MTL*, generamos una serie de inserciones del gen reportero *URA3* a lo largo de los loci *MTL2* y *MTL3*. Así mismo, determinamos por medio de RT-PCR la expresión de los genes $\alpha 1$, $\alpha 1$ y $\alpha 2$ codificados en los tres loci *MTL*, para lo cual construimos una batería de cepas mutantes sencillas, dobles y triple en estos loci para identificar sin ambigüedad el locus del que proviene el transcrito detectado de cada gen.

OBJETIVO GENERAL

El objetivo a largo plazo de este proyecto es entender los programas de desarrollo que *C. glabrata* utiliza para sobrevivir en su hospedero, por lo cual estamos interesados en determinar si *C. glabrata* puede tener un ciclo de reproducción sexual bajo condiciones determinadas. Para ello, nos hemos propuesto determinar los mecanismos de regulación de la expresión de los tres loci de apareamiento *MTL1*, *MTL2* y *MTL3* de *C. glabrata*, ya que la expresión finamente controlada de los genes que se encuentran en estos loci es esencial para el establecimiento de la identidad celular y la reproducción sexual.

OBJETIVOS PARTICULARES

1. Clonar y secuenciar los loci *MTL1*, *MTL2* y *MTL3* de la cepa BG14 (Cormack y Falkow, 1999) de *C. glabrata* para generar varias inserciones del gen reportero *URA3* en diferentes posiciones a lo largo de *MTL1*, *MTL2* y *MTL3*.
2. Determinar el estado transcripcional de la cromatina de los loci *MTL1*, *MTL2* y *MTL3* a través de la expresión del reportero *URA3*.
3. Construir cepas con mutaciones nulas sencillas, dobles y triple de los loci *MTL*.
4. Determinar por RT-PCR el patrón de expresión *in vitro* de los genes endógenos que se ubican en las regiones *MTL*, en las cepas con mutaciones nulas sencillas, dobles y triple de los loci *MTL*.
5. Determinar mediante RT-PCR el patrón de expresión *in vitro* de genes específicos del tipo celular α o α , genes del estado haploide, así como de genes relacionados con la virulencia de *C. glabrata*, en las cepas con mutaciones nulas sencillas, dobles y triple de los loci *MTL*.

6. En el caso de que uno o más loci se encuentren silenciados, analizaremos si los genes que participan en el silenciamiento subtelomérico también son necesarios para ejercer esta represión.

Subtelomeric Silencing of the *MTL3* Locus of *Candida glabrata* Requires γ Ku70, γ Ku80, and Rif1 Proteins^{∇†}

Candy Y. Ramírez-Zavaleta, Griselda E. Salas-Delgado,[‡]
 Alejandro De Las Peñas, and Irene Castaño*

Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica (IPICYT), Camino a la Presa San José 2055,
 Lomas 4a sección, San Luis Potosí SLP, Mexico

Received 25 May 2010/Accepted 21 July 2010

Candida glabrata is a haploid opportunistic fungal pathogen that is phylogenetically related to *Saccharomyces cerevisiae*. Even though *C. glabrata* has no known sexual cycle, it contains, like *S. cerevisiae*, three mating type-like loci (*MTL*) called *MTL1*, *MTL2*, and *MTL3*, as well as most of the genes required for mating, meiosis, and sporulation. *MTL1* is localized at an internal position on chromosome B and is thought to be the locus corresponding to the *MAT* locus in *S. cerevisiae*. *MTL2* and *MTL3* are localized close to two telomeres on different chromosomes (29.4 kb from Chr E-L and 10.5 kb from Chr B-L, respectively). By using *URA3* reporter gene insertions at the three *MTL* loci, we found that in contrast to the case for *S. cerevisiae*, only *MTL3* is subject to transcriptional silencing while *MTL2* is transcriptionally active, and this is in agreement with previously reported data. We found that the silencing of *MTL3* is nucleated primarily at the left telomere of chromosome B and spreads over 12 kb to *MTL3*, rather than nucleating at flanking, closely positioned *cis*-acting silencers, like those flanking *HMR* and *HML* of *S. cerevisiae*. Interestingly, the silencing of *MTL3* absolutely requires the γ Ku70, γ Ku80, and Rif1 proteins, in sharp contrast to the silencing of the *HM* loci of *S. cerevisiae*. In addition, we found that several cell type-specific genes are expressed in *C. glabrata* regardless of the presence, or even absence, of mating type information at any of the *MTL* loci.

Candida glabrata is a haploid yeast found as a normal part of the mammalian microflora, but in recent years it also has emerged as a common opportunistic pathogen of humans, and now it accounts for about 12% of all *Candida* infections worldwide, second only to *Candida albicans* (29, 36, 37, 39, 50). *C. glabrata* and *Saccharomyces cerevisiae* are closely related phylogenetically, and both genomes conserve a high degree of synteny, whereas *C. albicans* is more distantly related (6, 14).

Sexual reproduction has been documented in many fungal species; however, several human fungal pathogens either do not reproduce sexually or very rarely do so (33). As the genomes of more fungal species are sequenced it has become clear, however, that the vast majority of the species have highly conserved genes involved in sexual reproduction, and yet some species have not been observed to mate (5, 6, 16). In some cases, a cryptic sexual cycle and even same-sex mating have been discovered recently, as is the case for *C. albicans* and *Aspergillus fumigatus* (1, 34). *C. glabrata* has no known sexual cycle even though it contains the vast majority of the genes required for mating (6, 14), and some mating type identity is maintained (32).

In many fungal species, mating and cell type identity are

determined by the information encoded by a locus called *MAT* (mating type) in the budding yeast *S. cerevisiae* or *MTL* (mating type like) in other fungi. The information contained in the *MAT* locus of *S. cerevisiae* can be either type *a* or type α and consists of three transcriptional regulators that control the sexual cycle. Mating type *a* cells (*MATa* cells) contain the gene *a1*, and *MAT α* cells contain the genes $\alpha1$ and $\alpha2$. Haploid *MATa* cells can mate only with cells carrying the *MAT α* information (and *vice versa*) to form diploid *a/ α* cells that are unable to mate (21, 26). In addition to the *MAT* locus, the *S. cerevisiae* chromosome III contains two silent loci, *HMR* and *HML*, located near each telomere (~22.7 and ~13.0 kb, respectively). The *HMR* and *HML* loci usually contain identical copies of *MATa* and *MAT α* , respectively, that are normally maintained efficiently repressed through a chromatin-based mechanism called silencing (21, 44). The silencing of these loci (*HM*) is essential for maintaining cell type identity and the occurrence of a sexual cycle. The *HM* loci are each flanked by two small regulatory sites (~150 bp) called silencers, and each one contains binding sites for the proteins Rap1, the origin of recognition complex (ORC), and Abf1 in different combinations. These silencer-binding proteins recruit the four Sir proteins (Sir1 to -4) to nucleate silencing. Once the Sir proteins are at the silencer, Sir2, an NAD⁺-dependent histone deacetylase (25, 46), removes acetyl groups from the N-terminal tails of histones H3 and H4 of the adjacent nucleosomes.

The Rif1 and Rif2 proteins of *Saccharomyces cerevisiae* compete with Sir3 and Sir4 for Rap1 binding, and *S. cerevisiae rif1 Δ* mutants display increased silencing at subtelomeric regions and a modest decrease in silencing at the *HM* loci (20, 55). These phenotypes presumably are due to the titration of the

* Corresponding author. Mailing address: Camino a la Presa San José 2055, División de Biología Molecular, Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, San Luis Potosí 78216, Mexico. Phone: (52) 444-834-2000, ext. 2038. Fax: (52) 444-834-2010. E-mail: icastano@ipicyt.edu.mx.

† Supplemental material for this article may be found at <http://ec.asm.org/>.

‡ Present address: Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México, Circuito Exterior s/n, Ciudad Universitaria, Distrito Federal, Mexico.

∇ Published ahead of print on 30 July 2010.

available Sir proteins that are recruited efficiently by Rap1 to the longer telomeres that *rif1Δ* mutants display.

The Sir2-4 complex is absolutely required for the establishment and maintenance of silent chromatin, whereas Sir1 is not essential and contributes only modestly to establish the silent chromatin at the *HM* loci (17, 38, 44). It is thought that the yeast Ku complex (yKu70/80) is not required for silencing at the *HM* loci, although it is essential for silencing at the subtelomeric regions (4, 28, 43, 49). Recently, however, it was found that Sir1 has a small, redundant role with yKu70 and yKu80 for silencing at *HM* loci and that the yKu complex binds these loci in a process dependent on Sir4 (35, 53).

C. glabrata, like *S. cerevisiae*, contains three mating type-like loci called *MTL1*, *MTL2*, and *MTL3*, which correspond to *MAT*, *HMR*, and *HML*, respectively (47). Initially it was thought that only *MTL1* was transcriptionally active while *MTL2* and *MTL3* were maintained in a silent state, like *HMR* and *HML*. Recently, it was reported that unlike the case for *S. cerevisiae*, the *MTL2* locus is transcriptionally active and some cell type identity is maintained through the cell type-specific regulation of the expression of the $\alpha 1$ and $\alpha 2$ genes and the cell type-specific processing of the *aI* transcript, which contains two introns (32). In this regard it should be noted that *C. glabrata* does not have an *SIR1* orthologue (15), which in *S. cerevisiae* contributes to establishing the silent chromatin at the *HM* loci (38).

To better understand how *C. glabrata* achieves the mating type-specific expression of the α genes and to determine unambiguously from which of the *MTL* loci the transcription of the *aI* gene comes in our *C. glabrata* strain, we constructed a collection of single-deletion mutants of each *MTL* locus, as well as all of the combinations of double mutants and the triple-deletion mutant, which contains no mating type information. By using these mutants and *URA3* reporter gene insertions throughout the three *MTL* loci, we found four major differences between *C. glabrata* and *S. cerevisiae* with respect to the regulation of the expression of mating type-specific genes. First, we found, in agreement with Muller et al. (32), that *MTL2*, unlike *HMR* in *S. cerevisiae*, is transcriptionally active. Second, *C. glabrata* does not seem to maintain cell type identity like *S. cerevisiae*. Third, *MTL3* is subject to subtelomeric silencing rather than silencing mediated by discrete, *cis*-acting silencer elements. Finally, we found that unlike silencing at *HML* of *S. cerevisiae*, *MTL3* silencing absolutely requires Rif1, yKu70, and yKu80 proteins. Taken together, our results highlight several critical differences between the regulation of the expression of the genes located at the *MTL* loci, as well as some genes involved in the maintenance of cell type identity and sexual reproduction, compared to that of *S. cerevisiae*.

MATERIALS AND METHODS

Strains, plasmids, and primers. All strains, plasmids, and primers used in the present study are listed in Tables S1, S2, and S3, respectively, in the supplemental material.

Media. Yeast cells were grown in standard yeast media as described previously (45), and 2% agar was added for plates. Synthetic complete (SC) medium contained 1.7 g/liter yeast nitrogen base [without (NH₄)₂SO₄ and amino acids], 5 g/liter (NH₄)₂SO₄, 0.6% Casamino Acids, and 2% glucose. Yeast extract-peptone-dextrose (YPD) medium contained 10 g/liter yeast extract, 20 g/liter peptone, 2% glucose, and 25 mg/liter uracil. When required, YPD plates were supplemented with 420 μg/ml hygromycin (Invitrogen, Carlsbad, CA). To score

5-fluoroorotic acid resistance (5-FOA; Toronto Research Chemicals, North York, Canada), 0.9 g/liter 5-FOA and 25 mg/liter uracil were added to the SC plates (5-FOA plates).

Bacteria were grown in Luria-Bertani (LB) medium as described previously (2) with 1.5% agar added for plates. LB medium contained 5 g/liter yeast extract, 10 g/liter tryptone, and 5 g/liter NaCl, and when needed, it was supplemented with either 50 μg/ml carbenicillin or 50 μg/ml carbenicillin plus 30 μg/ml kanamycin. All plasmid constructs were introduced into strain DH10B by electroporation.

Cloning and sequencing of the three *MTL* loci of *C. glabrata*. To clone the three mating type loci of our wild-type strain, BG14 (*ura3Δ::Tn903* G418^r) (11), we amplified by PCR three different fragments encompassing the three regions where the *MTL* loci are located, using primers specific for each *MTL* locus containing added BamHI sites. These fragments were cloned into the cloning vector pAP502 (12) or pCR2.1 TOPO (Invitrogen, Carlsbad, CA) and sequenced.

Sequence analysis revealed that our wild-type strain (BG14) contains information at *MTL1* and *MTL2* and α information at *MTL3*. The 2.997-kb PCR fragment containing the *MTL1* locus was amplified with primers 160 and 161 (see Table S3 in the supplemental material) and was cloned into pCR2.1-TOPO (Invitrogen, Carlsbad, CA) to generate pIC122. pIC122 then was digested with NcoI, blunted with Klenow fragment of DNA polymerase I, and then digested with MscI to delete most of the kanamycin resistance gene to generate pSD10. A 2.734-kb PCR fragment containing the *MTL2* locus was amplified with primers 2434 and 2435 (see Table S3) and was cloned into pAP502 (12) to generate pAP699. A 3.319-kb PCR fragment containing the *MTL3* locus was amplified with primers 2438 and 2439 (see Table S3) and was cloned into pAP502 to generate pAP695.

Construction of *URA3* insertions throughout the three *MTL* loci. To assess whether the *MTL* loci are transcriptionally silenced, we inserted a *URA3* reporter gene at different positions throughout the *MTL1*, *MTL2*, and *MTL3* loci using a modified Tn7 transposon carrying the *URA3* gene (9). For this, we mutagenized *in vitro* each of the plasmids containing each *MTL* locus (pSD10, pAP699, and pAP695) with Tn7 UKR as described previously (9). We obtained hundreds of independent insertions for each plasmid transformed in *Escherichia coli*. Insertions first were mapped by colony PCR to identify insertions within each *MTL* locus using primers that anneal with the ends of the Tn7 (oriented outwards) transposon and primers annealing at different positions within the cloned *MTL* fragment. In this way, we picked for further study a total of 5 independent *URA3* insertions throughout *MTL1* (pSD plasmids), 7 along *MTL2*, and 10 in the *MTL3* locus (pRZ plasmids). All of these insertions (a total of 22) were sequenced, and the results are described in Table S4 in the supplemental material.

All of the 22 insertions were introduced into the *C. glabrata* genome by homologous recombination at their respective loci by the one-step gene replacement method as described previously (10, 12). The homologous recombination of each insertion was verified by PCR using locus-specific genomic primers that hybridized outside the region cloned in the plasmids carrying the insertion and primers annealing to the ends of Tn7. Because the transposition of Tn7 occurs *in vitro* and subsequently selects transposition reactions in *E. coli*, only one Tn7 (*URA3*) insertion is obtained in *C. glabrata* after homologous recombination has occurred following transformation with linearized plasmids. Once it has recombined in *C. glabrata*, Tn7 is stable and does not transpose, since it does not contain the transposase genes. To show that *C. glabrata mtl::URA3* strains contain only one copy of the *URA3* gene at the indicated locus, we used three different insertions at each *MTL* locus and replaced the relevant *mtl::URA3* insertion with the hygromycin cassette we used to generate *mtlΔ* mutants. We used the knockout plasmids described in supplemental Table S2 (pSD7, pRZ15, and pRZ17) to transform the different *URA3* insertions and selected resistance to hygromycin. Correct transformants (where the hygromycin cassette was integrated by homologous recombination at each *MTL*) were screened for the Ura⁻ phenotype. All of the correct Hyg^r transformants were uracil auxotrophs and resistant to 5-FOA, indicating that *mtl1,2,3::URA3* insertions contain only one insertion at the indicated *MTL* locus (data not shown). We also performed Southern blotting with three *URA3* insertions at each *MTL* locus using an internal *URA3* fragment as the probe. Genomic DNA from each strain was digested with SspI, and 80 μg of DNA was run in a 0.8% agarose gel and transferred to a Hybond membrane. The membrane was hybridized overnight with peroxidase-labeled probe for 12 h and washed under stringent conditions. The Southern blot for the nine insertions showed that there is only one band of the expected size corresponding to only one *URA3* insertion in each strain (data not shown).

Reporter *URA3* gene expression assays (5-FOA sensitivity assays). To assess the degree of silencing of the *URA3* gene inserted at different positions through-

out the *MTL* loci, we carried out 5-FOA growth assays as described previously (42). Briefly, strains containing the different *URA3* insertions along the *MTL* loci were grown in YPD to stationary phase for around 36 h. The cultures were adjusted to an optical density at 600 nm (OD_{600}) of 1 with sterile water, and 10-fold serial dilutions were made in 96-well plates. Five μ l of each dilution was spotted onto three different plates, YPD, SC without uracil (SC-ura), and SC plus 5-FOA, after which the plates were incubated at 30°C for 48 h and photographed.

Generation of strains with deletion of silencing genes. To generate derivatives with the deletion of silencing genes in strains with three representative *URA3* insertions along the *MTL3* silent locus, we followed the one-step gene replacement procedure using disruption plasmids for each gene to be deleted (*SIR2*, *SIR3*, *SIR4*, *HDF1*, *HDF2*, and *RIF1*) (42) (see Table S1 in the supplemental material). Disruption plasmids contain a hygromycin resistance cassette flanked by 5' and 3' flanking regions of each gene (all of the plasmids used for allele replacements are listed in Table S2 in the supplemental material). Each disruption plasmid was digested with enzymes that cut at both ends, within the 5' and 3' cloned flanking regions, generating ends homologous to each specific gene to be deleted in the *C. glabrata* genome (of each insertion strain to be deleted). The released fragment was used to transform *C. glabrata* selected on plates supplemented with 420 μ g/ml hygromycin. Homologous recombination at each locus was verified by PCR with a primer that anneals in the sequences external to the cloned 5' and 3' fragments and a primer annealing within the hygromycin cassette. We also verified the absence of each gene deleted by the inability to PCR amplify a small internal fragment from each deleted gene (<300 bp). Each of these derivatives was used for 5-FOA plate growth assays as described above.

Construction of strains with deletions of two *MTL* loci. To construct strains that carry only one type of mating information, we set out to construct strains containing deletions of two *MTL* loci (leaving only one *MTL* locus). The first deletion was generated by allele replacement as described above. To construct double or triple mutants, the hygromycin cassette used to generate the first deletion was excised by expressing *ScFLP1* product from plasmid pMZ18 (see Table S2 in the supplemental material). *ScFLP1* encodes a site-specific recombinase that recognizes two direct repeats, the F1p1 recognition target (FRT) sites that flank the hygromycin cassette of the disruption plasmids. The F1p1 recombinase then induces recombination between FRT sites and the hygromycin marker is excised from the chromosome, resulting in an unmarked deletion of the corresponding *MTL* locus and leaving one copy of the FRT site. Unmarked deletion strains are identified as Hyg^r colonies on YPD hygromycin plates, and the deletion is confirmed by PCR using primers annealing in the chromosome outside the 5' and 3' regions used for the disruption.

The resulting Hyg^r strains then are used as recipients for double or triple deletions using the same hygromycin resistance cassette and selecting for Hyg^r colonies.

RT-PCR. RNA was extracted from stationary-phase cells (36 h in YPD) using TRIzol reagent (Invitrogen, Carlsbad, CA) according to the manufacturer's instructions and treated with DNase I (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO). The synthesis of cDNA and PCR was carried out using the AccessQuick reverse transcription-PCR (RT-PCR) system (Promega, Madison, WI). The RT primers used for each gene are listed in Table S3 in the supplemental material. The cDNA synthesis reaction was carried out at 45°C for 45 min for all of the genes. The PCR was carried out at 57°C for *a1*, *STE3* (CAGL0M08184g), *STE12* (CAGL0H02154g), *STE20* (CAGL0K02673g), and *ACT1* (CAGL0K12694g); 53°C for *MF(ALPHA)* (CAGL0H03135g) and *HOG1* (CAGL0M11748g); 55°C for *MFA1* (CAGL0C01919g); 50°C for $\alpha 1$ (CAGL0B1243g), $\alpha 2$ (CAGL0B1265g), and *STE2* (CAGL0K12430g); and 58°C for *BARI* (CAGL0J02288g) and *HO* (CAGL0G05423g). A reaction mixture without reverse transcriptase was included as a negative control in all of the RNA samples and with every pair of primers. No bands were obtained, indicating that the RNA preparations had no DNA contamination.

RESULTS

The *MTL3* locus is the only silent mating type-like locus in *C. glabrata*. *C. glabrata* possesses three *MTL* loci arranged in a configuration similar to that of the mating type loci of *Saccharomyces cerevisiae* (47). *MTL1* is the only one localized at an internal position within chromosome B (approximately 113 kb from the left telomere of this chromosome), while *MTL2* and *MTL3* loci are located close to two telomeres, at approximately 29.4 and 10.5 kb from the left telomeres of chromosomes E

(Chr E-L) and B (Chr B-L), respectively (Fig. 1A). We have shown previously that genes in subtelomeric regions of several chromosomes in *C. glabrata* are subject to chromatin-based transcriptional silencing in a process that depends on Sir2, Sir3, Sir4, Rap1, the Ku70/80 complex, and Rif1 (10, 12). To assess whether *MTL2* and *MTL3* are subject to silencing, we constructed strains containing *URA3* reporter gene insertions at different positions throughout the three *MTL* loci; the precise insertion site for each one is described in Table S4 in the supplemental material. Strains containing *URA3* insertions were plated on medium containing the drug 5-fluoroorotic acid (5-FOA) and on plates lacking uracil (SC-ura plates) to assay for cells expressing *URA3*. The amount of growth on medium containing 5-FOA reflects the extent of the transcriptional silencing of *URA3*.

As shown in Fig. 1B, we isolated five *URA3* reporter insertions throughout the *MTL1* locus. As expected, all of the insertions at *MTL1* are transcriptionally active as measured by the lack of growth on 5-FOA plates and robust growth on SC-ura plates. The parental strain (BG14 *ura3* Δ ::Tn903), used as a control, is not able to grow in the absence of uracil, but it grows well on plates containing 5-FOA. Unlike what has been reported for *S. cerevisiae* (19, 40, 48), seven different *URA3* reporter insertions along the *MTL2* locus (homologous to *HMR*) show that the chromatin in this locus is transcriptionally active, as evidenced by their ability to grow on SC-ura plates and the failure to do so on 5-FOA plates (Fig. 1C). *MTL2* has been reported to be transcriptionally active in *C. glabrata* as assayed by the quantitative PCR of the *a1* gene in several strains (32).

At the *MTL3* locus, however, the first eight *URA3* reporter gene insertions throughout the locus are subject to transcriptional silencing, as shown by the robust growth on 5-FOA plates (Fig. 1D). A significant proportion of the cells from cultures containing these reporter insertions at *MTL3* also are able to grow on media lacking uracil, indicating the expression of *URA3* in these cells. The leakiness of the silencing at *MTL3* contrasts sharply with the silencing observed at the homologous *HML* locus of *S. cerevisiae*, where no expression of reporter genes introduced at this site is detected (3, 40). The last two insertions in *MTL3*, located at the C-terminal end or downstream from the $\alpha 2$ gene, show a decreased level of silencing (Fig. 1D).

Native genes contained at *MTL3* are not expressed, while genes at *MTL1* and *MTL2* are expressed. The complete processing of the *a1* gene is achieved only when transcribed from *MTL1*. To determine whether the native *a1*, $\alpha 1$, and $\alpha 2$ genes from the three *MTL* loci are expressed, we constructed a series of null mutants in each *MTL* locus, all of the combinations of double mutants and the triple knockout (Fig. 2A), and performed RT-PCR experiments on all of them. As shown in Fig. 2B, $\alpha 1$ and $\alpha 2$ genes are not expressed under the conditions tested in any of the strains derived from the BG14 background (*MTL1a*, *MTL2a*, and *MTL3a*), where α information comes from *MTL3* only (but see below). However, a transcript is clearly detectable from the reference, sequenced strain ATCC2001 (CBS138), where the α genes are located at both *MTL1* and *MTL3* (<http://www.genolevures.org/cagl.html>). In our strain background, the *a1* gene, which contains two introns, is expressed from both loci, *MTL1a* and *MTL2a*, but it is

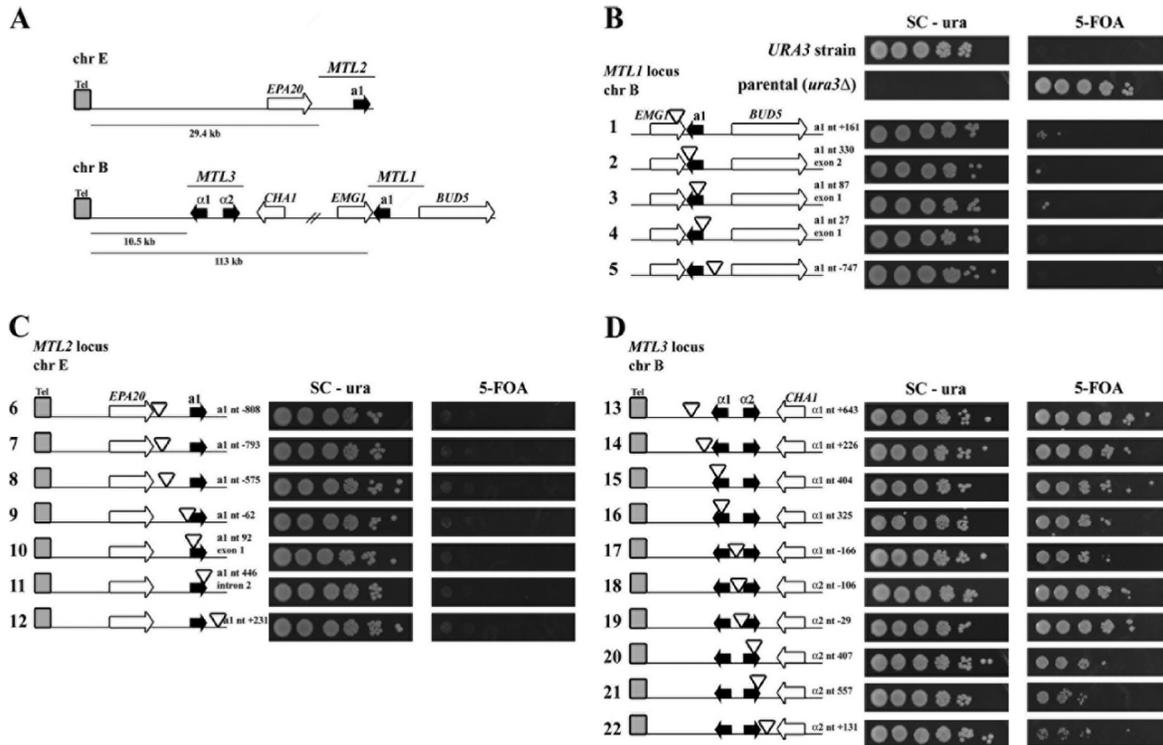


FIG. 1. *MTL3* is the only *MTL* locus subject to silencing in *Candida glabrata*. (A) Schematic representation of the *MTL1*, *MTL2*, and *MTL3* loci of *C. glabrata*. *MTL1* and *MTL3* are located on chromosome B. *MTL3* is placed 10.5 kb away from the left telomere of chromosome B (ChrB-L), and *MTL1* is at an internal position on this chromosome (113 kb away from ChrB-L). *MTL2* is located 29.4 kb from the left telomere of chromosome E (ChrE-L). (B, C, and D) Plate growth assay to determine the expression of the *URA3* reporter gene (shown as empty triangles) inserted across the three *MTL* loci in *C. glabrata*. To the left of each panel is shown a schematic representation of each *MTL* locus and the relative positions of the reporter gene insertions with respect to the *a1*, $\alpha 1$, or $\alpha 2$ gene (represented by black arrows that indicate the direction of transcription). The exact position within the *a1*, $\alpha 1$, or $\alpha 2$ gene of each insertion is indicated. Strains of *C. glabrata* containing 5 *URA3* insertions throughout the *MTL1* locus (B), 7 in the *MTL2* locus (C), or 10 in the *MTL3* locus (D) were grown to stationary phase in YPD, and 10-fold serial dilutions in sterile water were made. Equal numbers of cells of each dilution were spotted onto SC-ura and SC plates containing 5-FOA. Plates were incubated at 30°C for 48 h and photographed.

processed (both partially and completely) only when the transcript is expressed from *MTL1*. Figure 2B, lanes 2 and 6, shows that for strains *mtl1Δ* and (*mtl1,mtl3*) Δ , where *a1* is transcribed only from *MTL2a*, only the unprocessed form of the *a1* transcript is detected, while in strains *mtl2Δ* and (*mtl2,mtl3*) Δ , where *a1* is transcribed only from *MTL1*, the partially and totally processed forms can be seen (Fig. 2B, lanes 3 and 7). In the CBS138 strain, only the unprocessed form of the *a1* transcript is detected, since in this strain type α information is present only at the *MTL2* locus (Fig. 2B, lane 9). These results are in agreement with previously reported data for *C. glabrata* (32) and indicate that in contrast to *S. cerevisiae*, *C. glabrata* does not maintain repression at *MTL2*, which is the orthologue of *HMR*.

C. glabrata cells containing different mating type information at the *MTL* loci express both α -specific and α -specific genes. Because of the imperfect silencing at *MTL3*, it is possible that some cells containing α information at *MTL1* and α at *MTL3* express both types of mating information (RT-PCR using increased number of cycles shows detectable $\alpha 1$ and $\alpha 2$

transcripts from *MTL3*; data not shown). It also is possible that a very small fraction of the *a1* transcript expressed from *MTL2* is processed correctly, such that in cells containing α information at *MTL1* there would be the expression of both types of mating information in a given cell. To maintain cell type identity in *S. cerevisiae*, *MATa* or *MAT α* cells use a regulatory circuit controlled by the mating type genes *a1*, $\alpha 1$, and $\alpha 2$ in which α cells express specific genes present only in *MATa* cells (α -specific genes, or *asg*) and *MAT α* cells express a set of genes present only in these cells (α -specific genes, or *asg*). In diploid cells (after mating; *MATa*/ α cells), a heterodimer repressor is made consisting of the *a1*/ $\alpha 2$ proteins that represses the transcription of several genes expressed only in haploid cells (haploid-specific genes, or *hsg*). We asked whether some of the known *asg*, *asg*, or *hsg* in *S. cerevisiae* are regulated in the same way in *C. glabrata*. For this, we used the strains containing all of the deletion combinations of the *MTL* loci, so that there are strains that contain only one type of information. We performed RT-PCR for three orthologues of the *S. cerevisiae* *asg* (*STE2*, *MF1*, and *BARI*), two of the α *asg* [*STE3*, *MF(ALPHA)*], and four

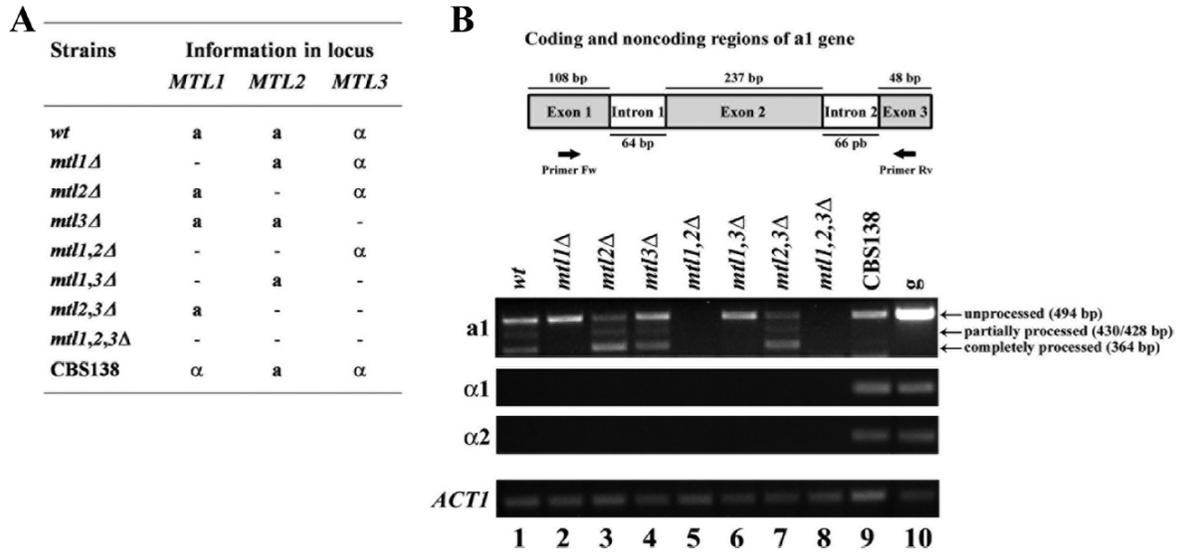


FIG. 2. *a1* transcript, which contains two introns, is processed only when transcription comes from *MTL1* but not when it is initiated at *MTL2*. (A) Description of the mating type information present at each *MTL* locus in the collection of strains containing single, double, and triple deletion mutations in the *MTL* loci. (B) Locus-specific processing of the *a1* transcript. Top panel, schematic representation of the *a1* gene showing the two introns and the positions of the primers used for the PCR (black arrows). Bottom panel, the indicated strains containing deletions in the *MTL* loci were grown to stationary phase and RNA was extracted and used for RT-PCR (see Materials and Methods). *a1* transcript was detected using primers indicated for RT-PCR in the top panel. The unprocessed transcript is 494 bp long, the partially processed transcripts are 430 and 428 bp long, and the completely processed transcript is 364 bp long. Note that the complete processing of the *a1* gene can be detected only when transcription comes from the *MTL1* locus [lanes 3 and 7; *mtl2Δ* and (*mtl2, mtl3Δ*)] but not when transcription is initiated at *MTL2* [lanes 2 and 6; *mtl1Δ* and (*mtl1, mtl3Δ*)]. Strains containing deletions of both *MTL1* and *MTL2* [lanes 5 and 8; (*mtl1, mtl2Δ*) and (*mtl1, mtl2, mtl3Δ*)] were used as negative controls, since there is no *a1* gene. Lane 9, RNA from strain CBS138 (reference strain ATCC2001 containing α information in *MTL1*) was used as a positive control for the transcription of the *a1* or *α2* gene. Lane 10, genomic DNA from the wild-type strain (g) was used as a positive control for PCR. *ACT1* RT-PCR was used as an internal control. Negative control experiments where no reverse transcriptase was added did not amplify any bands (data not shown).

of the *hsg* (*STE12*, *STE20*, *HOG1*, and *HO*). Figure 3 shows that all of the genes we tested are expressed at relatively moderate levels in all of the *MTL* mutant strains, including the strain that contains no mating type information [*mtl(1,2,3)Δ*] (Fig. 3, lane 8) and also the parental strain and CBS138 that contain a and α information, respectively, at *MTL1*. This suggests that *C. glabrata* does not keep a cell type identity, as has been described for *S. cerevisiae*.

Silencing at the *MTL3* locus requires Sir2, Sir3, Sir4, yKu70, yKu80, and Rif1. The yKu70 and yKu80 proteins are absolutely required for silencing at the subtelomeric regions in *S. cerevisiae* (telomere position effect, or TPE) (44), while at the silent *HM* loci these proteins play only a minor role, performing an overlapping function with Sir1 at establishing the silent chromatin (35, 53).

Silencing at the subtelomeric regions of *C. glabrata* requires the Sir proteins (Sir2-4), Rap1, yKu70, and yKu80 and Rif1 (10, 12). To determine whether the silencing proteins also are required for silencing at *MTL3*, we made deletion/insertion mutations in each of the *SIR2*, *SIR3*, *SIR4*, *HDF1*, *HDF2*, and *RIF1* genes in three different *C. glabrata* strains containing the *URA3* reporter insertions at representative locations within *MTL3* (Fig. 4). As expected, the silencing of the reporter *URA3* at the three positions tested in *MTL3* absolutely requires the Sir2 to -4 proteins, as measured by the lack of growth on

5-FOA plates (Fig. 4A to C). Surprisingly, silencing at this locus also requires yKu70, yKu80, and Rif1 proteins (Fig. 4A to C). We determined by RT-PCR that the expression of the native genes *α1* and *α2* in each of the mutants in silencing proteins is strongly derepressed (Fig. 4D).

In *S. cerevisiae* the silencers flanking the silent mating loci contain binding sites for Rap1, ORC, and Abf1. These silencers are not conserved in *MTL2* and *MTL3* of *C. glabrata* (although there are two conserved putative Abf1 binding sites flanking *MTL3* as well as one ORC putative binding site). The absence of conserved silencers at *MTL3* in *C. glabrata* could explain the leaky silencing observed that depends on the nucleation and spreading of the silent chromatin from the telomere.

Silencing at *MTL3* is nucleated predominantly at the telomere and spreads through the *MTL3* locus. The dependence of silencing at the *MTL3* locus on yKu70, yKu80, and Rif1 is reminiscent of the subtelomeric silencing we have observed at other telomeres in *C. glabrata* (10, 12, 42). To determine whether silencing at *MTL3* is nucleated at the left telomere of chromosome B (which is only 10.5 kb away) and then propagates into the *MTL3* locus, we introduced this locus carrying each of the three representative *URA3* insertions into a region away from any telomere. We chose a large, internal, intergenic region 224 kb away from the left telomere of chromosome L

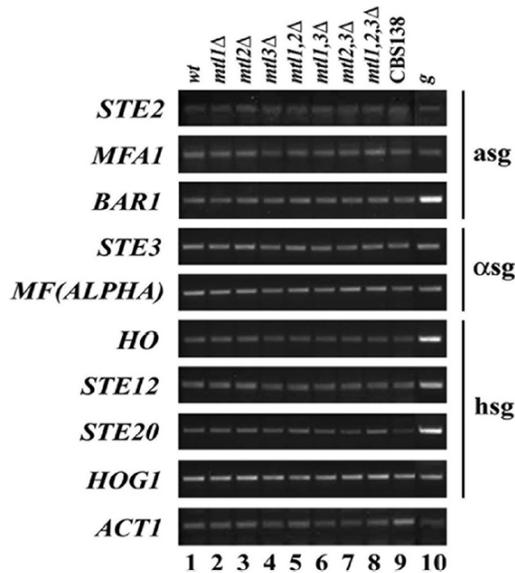


FIG. 3. Analysis of the expression of several cell type-specific genes by RT-PCR. Genes analyzed are *STE2*, *MFA1*, and *BARI* as examples of α -specific genes (asg); *STE3* and *MF(ALPHA)* are α -specific genes (α sg), and *HO*, *STE12*, *STE20*, and *HOG1* are haploid-specific genes (hsg). RNA was extracted from stationary-phase cultures of the collection of single, double, and triple mutants in the *MTL* loci as indicated. *C. glabrata* strain CBS138 (ATCC2001) was used as a positive control for the expression of α -specific genes. *ACT1* RT-PCR was used as an internal control and genomic DNA from the wild-type strain (g) as a positive control for the PCR. Negative-control experiments where no reverse transcriptase was added did not amplify any bands (data not shown).

that is not subject to silencing to integrate the entire *MTL3* locus with the reporter insertions. These constructs consist of a 3.313-kb fragment (1.262 kb downstream from $\alpha 1$ and 0.531 kb downstream from $\alpha 2$) containing the *MTL3* locus as well as the flanking sequences containing the conserved putative Abf1 and ORC binding sites and each of the three *URA3* reporter insertions. As shown in Fig. 5A to C, moving *MTL3* away from the left telomere of chromosome B, where it normally resides, into an internal location of chromosome L results in an almost-complete loss of silencing as measured by the lack of growth on 5-FOA plates (compare growth on 5-FOA of strains with *URA3* insertions at chromosome L with that of their counterpart strains with *URA3* insertions integrated at the subtelomeric region of chromosome B). The fact that there is no silencing of the *MTL3::URA3* reporter system when moved to a nonsubtelomeric region suggests that the flanking regions of *MTL3* do not contain a *cis*-acting silencer and that the silencing observed at this locus is nucleated mainly at the telomere and propagates into *MTL3* from there. In agreement with the expression of the reporter *URA3* at this location, we could detect the expression of the $\alpha 1$ and $\alpha 2$ genes at this internal position (Fig. 5D).

DISCUSSION

The occurrence of a sexual cycle in human pathogenic fungi is uncommon, and it has been suggested that mating sorts out

specific combinations of genes required for virulence or survival in the host (33). However, in several cases of human fungal pathogens, a cryptic sexual cycle has been found. One example is the obligate diploid *Candida albicans*, where the vast majority of strains are heterozygous at the mating type-like locus (*MTL*) containing both types of information (α/α). In this human pathogen, mating was shown to occur if two requirements are fulfilled: first, the information present at the *MTL* locus needs to be homozygous (cell expressing either α/α or α/α information), and second, cells must switch to the mating-competent type or opaque cell type. Under these conditions, a parasexual cycle can be detected where opaque cells expressing only one type of information can mate with another opaque cell expressing only the opposite type of information (23, 24, 30, 31). Furthermore, it was shown recently that *C. albicans* also can undergo same-sex mating between homozygous strains in a way similar to what has been reported for some other medically relevant fungi (1).

Candida glabrata has never been shown to mate, and all isolates analyzed to date are haploids. Using a population genetics-based analysis it was determined that the population structure is predominantly clonal, with some evidence for recombination (13).

The genes that control mating and cell type identity in fungi are in the *MAT* locus in *S. cerevisiae* and *MTL* in other fungi. *C. glabrata*, like *S. cerevisiae*, contains three mating type loci, *MTL1*, *MTL2*, and *MTL3*, and only *MTL1* was thought to be transcriptionally active, corresponding to the functional homologue of the *MAT* locus, so that the information present at *MTL1* is thought to determine the mating type of the cell (32, 47). In a recent report, Muller et al. (32) found that $\alpha 1$ and $\alpha 2$ are expressed in a mating type-specific way while $\alpha 1$ is transcribed in both mating types, and mating type identity was proposed to be maintained in *C. glabrata* through the mating type-specific processing of the *a1* gene (32). In this work, we looked at the transcriptional activity of the three *MTL* loci and determined that *MTL1* and *MTL2* are expressed and only *MTL3* is silenced; in fact, *MTL3 α* (an orthologue of *HMR α*) is imperfectly silenced in *C. glabrata*, most likely through silencing nucleated at the telomere that propagates more than 11 kb to *MTL3*. Surprisingly, the silencing of *MTL3 α* absolutely depends on the silencing proteins yKu70, yKu80, and Rif1p. In *S. cerevisiae*, these proteins do not have a predominant role in the silencing of the mating type silent cassettes, and only in the absence of Sir1 could a small effect of the Ku proteins in silencing the *HM* loci be detected (35, 53).

***C. glabrata* *MTL1a* and *MTL2a* loci are transcriptionally active.** By introducing multiple insertions of the reporter *URA3* gene at various positions along *MTL1* and *MTL2* loci, we found, in agreement with Muller et al. (32), that both *MTL1a* and *MTL2a* (the functional homologue of *HMRa*) are transcriptionally active (Fig. 1B and C). This is in sharp contrast to *S. cerevisiae*, where both *HMRa* and *HML α* are very efficiently silenced (3, 22, 27).

Locus-specific processing of the *a1* transcript. By using a collection of single, double, and triple *MTL* deletion strains to unambiguously determine whether the transcription of the native *a1* gene comes from *MTL1* or *MTL2* (since both contain this gene), we determined that this gene is transcribed from both loci, but there is a locus-specific processing of the *a1*

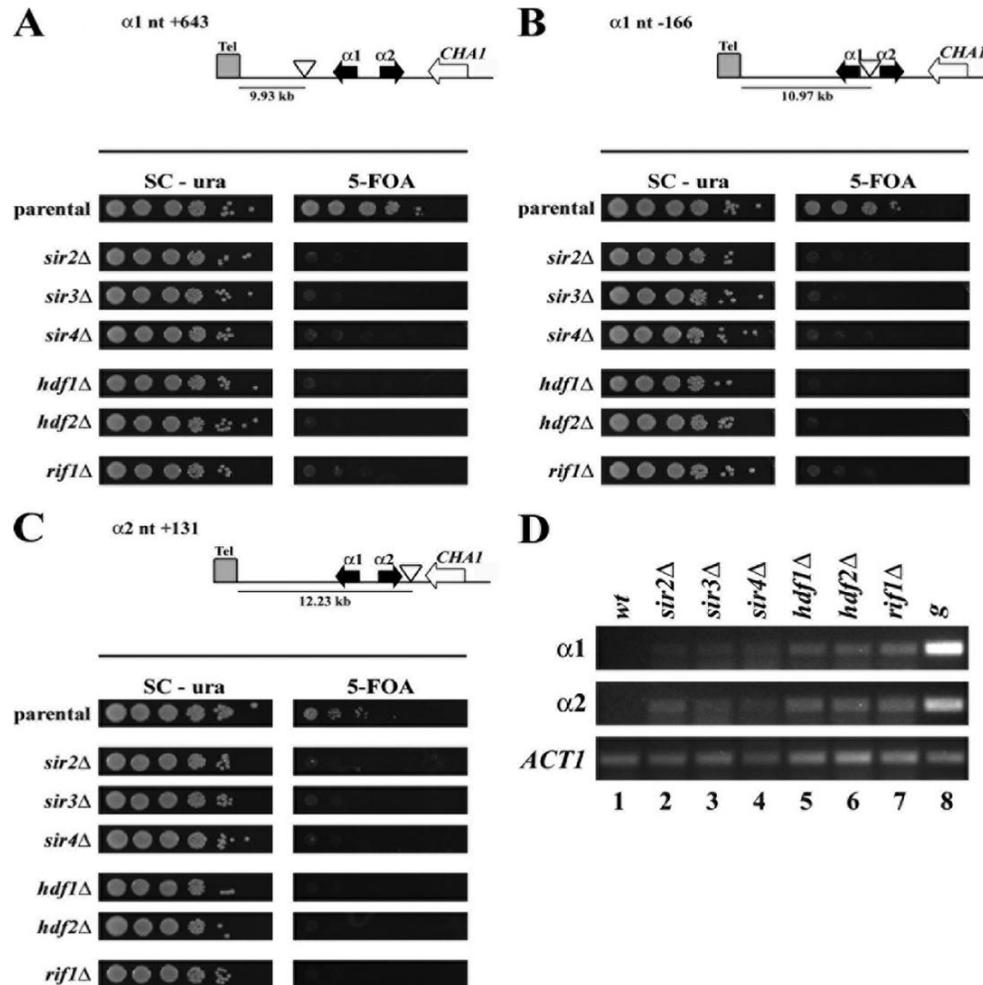


FIG. 4. Silencing at *MTL3* depends on the silencing proteins Sir2, Sir3, Sir4, yKu70, yKu80, and Rif1. The top parts of A, B, and C show three representative *URA3* insertions across the *MTL3* locus (indicated by empty triangles) that were selected to be introduced independently in each one of the deletion/insertion mutations in *SIR2*, *SIR3*, *SIR4*, *HDF1* (yKu70), *HDF2* (yKu80), and *RIF1*. Stationary-phase cultures of strains of *C. glabrata* containing the shown *URA3* insertions and the indicated deletion alleles, *sir2* Δ , *sir3* Δ , *sir4* Δ , *hdf1* Δ , *hdf2* Δ , and *rif1* Δ , were diluted in sterile water. Equal numbers of cells of each dilution were spotted onto SC-ura and SC plates containing 5-FOA. Plates were incubated at 30°C for 48 h and photographed. (A) Strains of *C. glabrata* containing the indicated silencing mutations and the *URA3* insertion closest to the ChrB-L telomere (9.93 kb from the telomere repeats). (B) Strains containing the indicated silencing mutations and the *URA3* insertion between $\alpha 1$ and $\alpha 2$ of *MTL3* (10.97 kb from the telomere). (C) Strains containing the indicated silencing mutations and the *URA3* insertion farthest away from the *MTL3* telomere (12.23 kb). (D) Analysis of the expression of $\alpha 1$ and $\alpha 2$ genes from *MTL3* by RT-PCR. Strains containing deletion alleles in *SIR2*, *SIR3*, *SIR4*, *HDF1* (yKu70), *HDF2* (yKu80), and *RIF1* were grown to stationary phase, and RNA was extracted to perform RT-PCR. *ACT1* RT-PCR was used as an internal control. Control experiments where no reverse transcriptase was added did not amplify any bands (not shown). Genomic DNA from the wild-type strain (g) was used as a positive control for the PCR (lane 8).

transcript. When the transcription of *a1* comes from *MTL2*, as in strains *mtl1* Δ and (*mtl1*, *mtl3*) Δ (Fig. 2B, lanes 2 and 6), we cannot detect the processing of the transcript, whereas when transcription comes from *MTL1*, as in strains *mtl2* Δ and (*mtl2*, *mtl3*) Δ (Fig. 2B, lanes 3 and 7), we can detect both the fully processed transcripts and the intermediates of the partially processed transcript. These results are consistent with previously reported data and are thought to demonstrate the mechanism by which *C. glabrata* maintains some cell type identity

(32). The sequences of both *a1* genes at *MTL1* and *MTL2* loci in our background are identical for up to 500 bp on the 5'-flanking sequence, except for two mismatches at positions -375 and -360 from the start codon. At the 3' region, the identity extends for 370 bp downstream from the stop codon; further upstream or downstream the sequences are completely different. It is possible that the two differences in the 5' region or the sequences upstream from -500 bp or downstream from +370 lead to differential splicing. Another possibility is that

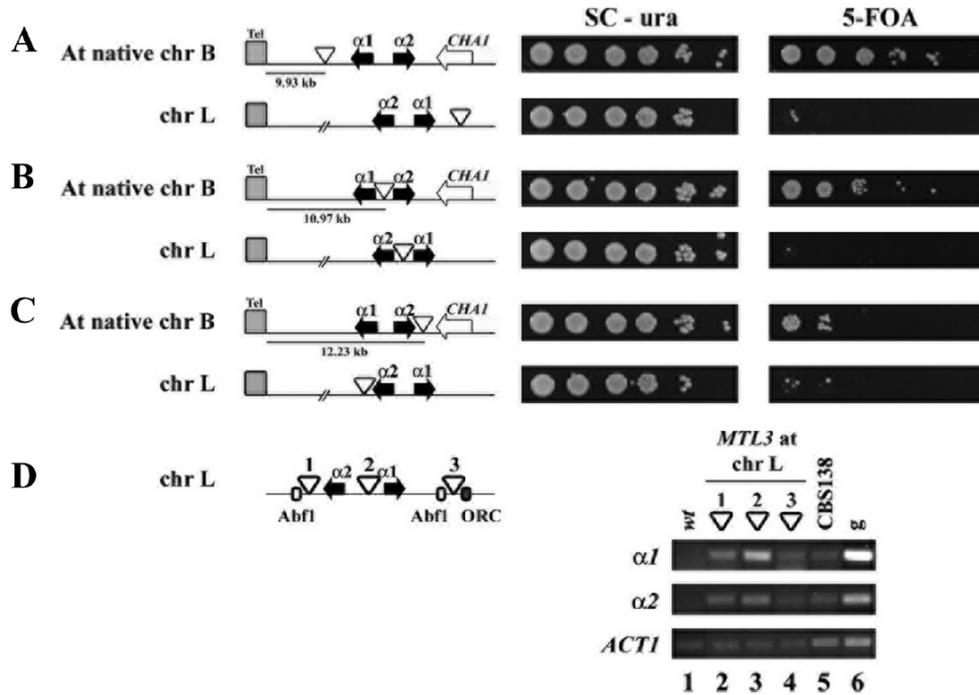


FIG. 5. Silencing at *MTL3* requires the telomere context. The entire *MTL3* region containing the three representative *URA3* insertions at *MTL3* and the flanking sequences that contain Abf1 and ORC putative binding sites (indicated by white and black small rectangles, respectively) were integrated at an internal, large intergenic region in chromosome L, and silencing at these positions was assayed by the plate growth assay as described for Fig. 1. (A) Silencing of the *URA3* insertion closest to the telomere, at its native location 9.93 kb from the left telomere of chromosome B (top row) and when integrated at an internal position on chromosome L (bottom row). (B) Silencing of the *URA3* insertion between $\alpha 1$ and $\alpha 2$ genes, at its native location 10.97 kb from the left telomere of chromosome B (top row) and when integrated at an internal position on chromosome L (bottom row). (C) Silencing of the *URA3* insertion farthest from the telomere at its native site 12.23 kb from the left telomere of chromosome B (top row) and when integrated at an internal position on chromosome L (bottom row). (D) Expression measured by RT-PCR of $\alpha 1$ and $\alpha 2$ genes from *MTL3* when inserted at an internal location on chromosome L.

there are as-yet-unidentified mechanisms, possibly chromatin based or others, that detect where the $\alpha 1$ transcript originates and only process it when it comes from *MTL1*, but the identification of this regulation needs further studies.

C. glabrata cells express a-specific, α -specific, and haploid-specific genes regardless of the mating type information present at *MTL* loci. Surprisingly, we found that unlike *S. cerevisiae*, *C. glabrata* expresses at least some of the genes that are cell type specific in *S. cerevisiae*. For example, three *S. cerevisiae* a-specific genes (*STE2*, *MFA1*, and *BARI1*) as well as two of the α -specific genes [*STE3* and *MF(ALPHA)*] are expressed at moderate levels in *C. glabrata* independently of the presence or absence of mating type information at any of the *MTL* loci (Fig. 3). The transcription of four of the *S. cerevisiae* haploid-specific genes (*STE12*, *STE20*, *HOG1*, and *HO*) (18, 26) also was detected in all of the strains tested, including the triple mutant strain (*mtl1*, *mtl2*, *mtl3*) Δ (Fig. 3, lane 8). This suggests that *C. glabrata* does not regulate the expression of cell type-specific genes in the same way that *S. cerevisiae* regulates these genes, and this probably leads to a lack of cell type identity of *C. glabrata*. This is also different from *C. albicans*, where the expression of a-specific genes is detected only when a cells are induced with alpha pheromone (51), while in *C.*

glabrata expression is detected in the absence of pheromone and in all *mtl* mutant strains. In this regard, both *MFA1* and *BARI1* promoter regions contain relatively conserved putative Mcm1 and $\alpha 2$ recognition sequences while *STE2* is less conserved, and the spacing differs from that of *S. cerevisiae* (52). For the α sg, the promoter region of *STE3*, but not *MF(ALPHA)*, contains putative Mcm1 and $\alpha 1$ recognition sequences.

Genes negatively regulated by the $\alpha 1/\alpha 2$ heterodimer are a subset of the haploid-specific genes in *S. cerevisiae*, and of the four hsg we assayed, only the *HO* promoter region contains an $\alpha 1/\alpha 2$ heterodimer recognition sequence. The result, however, is the same for all of the genes we tested, since all were expressed at moderate levels in all of the strains, regardless of the information at the *MTL* loci and of the presence or absence of conserved binding sites for the different transcription factors. It is not known if the $\alpha 1$, $\alpha 1$, and $\alpha 2$ proteins are functional in *C. glabrata*, or whether they control a different set of genes. It is possible that *C. glabrata* has undergone a rewiring of the transcriptional regulators of the mating pathway, and that they do not regulate sexual reproduction or cell type identity genes. It also should be noted that both $\alpha 1$ and $\alpha 2$ are

not closely conserved, sharing only 27 and 38% identity, respectively, across the entire lengths of the proteins.

***MTL3* locus is subject to subtelomeric silencing that depends on yKu70, yKu80, and Rif1.** Unlike *MTL2*, *MTL3* is subject to transcriptional silencing as shown by growth on 5-FOA plates of all the strains with the insertions we isolated across the entire locus (Fig. 1D). The degree of silencing decreases as the distance between the *URA3* insertions and the telomere increases (the farthest insertion is located 12.233 kb from the telomere [insertion no. 22; Fig. 1D, last row]). Relieving subtelomeric silencing by making deletions of each of the genes coding for silencing proteins results in the expression not only of the reporter *URA3* gene but also of the native $\alpha 1$ and $\alpha 2$ genes at *MTL3* (Fig. 4D).

It should be noted that in *S. cerevisiae*, the functional orthologous locus *HML α* is very efficiently silenced in a process depending on Sir1 to -4, Rap1, ORC, and Abf1, but not on the yKu proteins (4, 28, 43, 49). However, a small effect of yKu70 and yKu80 on both of the *HM* silent loci that is redundant with Sir1 recently was discovered in *S. cerevisiae* (35, 53). Rif1 also was shown to contribute to silencing but only at a weakened *hmr Δ 4* silencer (20, 55).

In contrast, in *C. glabrata* the silencing of *MTL3* absolutely requires Sir2 to -4, Rif1, yKu70, and yKu80 (Fig. 4). In this regard, silencing at *MTL3* is reminiscent of the silencing we have found at telomeres Chr C-L and Chr I-R, in which silencing appears to be nucleated at the telomere and propagates over long distances to some *EPA* genes (like *EPA7*, *EPA4*, and *EPA5*). A consequence of this type of silencing is that *MTL3* is not as efficiently silenced as the *HM* loci of *S. cerevisiae*, resulting in a sizable proportion of the population in each culture expressing, at least transiently, the reporter gene (Fig. 1). Sir1 is required for the establishment of silencing at the *HM* loci in *S. cerevisiae*, and *C. glabrata* does not contain the *SIR1* gene (15). This could explain in part the lack of silencing at *MTL2* and the imperfect silencing at *MTL3*. In contrast, silencing at the *HM* loci in *S. cerevisiae* is nucleated at discrete silencers flanking each locus that depend on Rap1, ORC, and Abf1 but not on the yKu proteins. At *MTL3* in *C. glabrata*, however, the sequences of the silencers are not conserved, although there are two putative Abf1 binding sites flanking $\alpha 1$ and $\alpha 2$ genes and an ORC consensus site downstream from $\alpha 1$. These conserved, putative binding sites, however, are not sufficient to mediate the silencing of the $\alpha 1$ and $\alpha 2$ genes independently of the telomere, since when moving three representative *URA3* reporter insertions in the *MTL3* locus (along with its flanking regions and putative binding sites for Abf1 and ORC) to an internal, intergenic region in chromosome L (200 kb away from the telomere), both the *URA3* reporter and $\alpha 1$ and $\alpha 2$ genes are expressed (Fig. 5A, B, C and D).

The leaky silencing of *MTL3* could have implications in *C. glabrata*, since strains containing $\alpha 1$ at *MTL1* could form the $\alpha 1/\alpha 2$ heterodimer in at least some cells in any given population. This could lead to the repression of several genes if, in *C. glabrata*, this heterodimer functions in the same way as it does in *S. cerevisiae*, where it is a repressor of many haploid-specific genes. We are investigating this possibility.

Taken together, our results highlight some important differences between *C. glabrata* and *S. cerevisiae* in recruiting silencing machinery to their respective mating loci. There are dif-

ferences in the expression of cell type-specific genes as well that could explain in part the apparent absence of cell type identity and sexual reproduction in *C. glabrata*.

It has been proposed that many human fungal pathogens rarely undergo sexual reproduction, which possibly gives them an advantage to proliferate in the host, but under stressful conditions, a sexual or parasexual cycle can be achieved, allowing for adaptation to hostile environments (33). Genomic data from many fungal species shows that the vast majority of them have conserved almost all the genes needed to reproduce sexually (5, 6), even in those species where no sexual cycle has been found. Although it is not known why they have kept all of these genes, it is possible that some of them have been rewired in the asexual pathogenic species and now play an additional role important to their survival as commensals or pathogens in their hosts. For example, it has been reported that in *C. albicans*, *C. glabrata*, and *C. neoformans* some components of the pheromone response pathway play a role in the virulence of these pathogens, and this implies that the components of the pheromone response pathway, rather than the actual mating, are important for pathogenesis (5, 7, 8, 41, 54). Further studies on the regulation of cell type-specific genes and pheromone response pathway genes will help define whether *C. glabrata* can undergo sexual reproduction and whether some of these genes have been rewired to control other processes important for its survival in the mammalian host.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank B. Cormack for providing strains and helpful discussions and A. D. Johnson for kindly providing space and reagents. We are indebted to O.E. Arroyo-Helguera and E. E. Uresti-Rivera for excellent technical assistance.

This work was supported by CONACyT fellowships to C.Y.R.-Z. (164574) and to G.E.S.-D. (209281), as well as CONACyT grant no. CB-2005-48304 to I.C.N. and UC-MEXUS CONACyT grant no. CN-06-53 to I.C.N. and A.D.J.

REFERENCES

- Alby, K., D. Schaefer, and R. J. Bennett. 2009. Homothallic and heterothallic mating in the opportunistic pathogen *Candida albicans*. *Nature* 460:890–893.
- Ausubel, F., R. Brent, R. E. Kingston, D. D. Moore, J. G. Seidman, J. A. Smith, and K. Struhl (ed.). 2001. *Current protocols in molecular biology*. Wiley & Sons, Inc., New York, NY.
- Bi, X., M. Braunstein, G. J. Shei, and J. R. Broach. 1999. The yeast HML I silencer defines a heterochromatin domain boundary by directional establishment of silencing. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 96:11934–11939.
- Boulton, S. J., and S. P. Jackson. 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.
- Butler, G. 2010. Fungal sex and pathogenesis. *Clin. Microbiol. Rev.* 23:140–159.
- Butler, G., M. D. Rasmussen, M. F. Lin, M. A. S. Santos, S. Sakthikumar, C. A. Munro, E. Rheinbay, M. Grabherr, A. Forche, J. L. Reedy, I. Agrafioti, M. B. Arnaud, S. Bates, A. J. P. Brown, S. Brunke, M. C. Costanzo, D. A. Fitzpatrick, P. W. J. de Groot, D. Harris, L. L. Hoyer, B. Hube, F. M. Klis, C. Kodira, N. Lennard, M. E. Logue, R. Martin, A. M. Neiman, E. Nikolau, M. A. Quail, J. Quinn, M. C. Santos, F. F. Schmitzberger, G. Sherlock, P. Shah, K. A. T. Silverstein, M. S. Skrzypek, D. Soll, R. Staggs, I. Stansfield, M. P. H. Stumpf, P. E. Sudbery, T. Srikantha, Q. D. Zeng, J. Berman, M. Berriman, J. Heitman, N. A. R. Gow, M. C. Lorenz, B. W. Birren, M. Kellis, and C. A. Cuomo. 2009. Evolution of pathogenicity and sexual reproduction in eight *Candida* genomes. *Nature* 459:657–662.
- Calcagno, A. M., E. Bignell, T. R. Rogers, M. Canedo, F. A. Muhlschlegel, and K. Haynes. 2004. *Candida glabrata* Ste20 is involved in maintaining cell wall integrity and adaptation to hypertonic stress, and is required for wild-type levels of virulence. *Yeast* 21:557–568.
- Calcagno, A. M., E. Bignell, P. Warn, M. D. Jones, D. W. Denning, F. A. Muhlschlegel, T. R. Rogers, and K. Haynes. 2003. *Candida glabrata* STE12 is required for wild-type levels of virulence and nitrogen starvation induced filamentation. *Mol. Microbiol.* 50:1309–1318.

9. Castano, I., R. Kaur, S. Pan, R. Cregg, A. De Las Penas, N. Guo, M. C. Biery, N. L. Craig, and B. P. Cormack. 2003. Tn7-based genome-wide random insertional mutagenesis of *Candida glabrata*. *Genome Res.* 13:905–915.
10. Castaño, I., S. J. Pan, M. Zupancic, C. Hennequin, B. Dujon, and B. P. Cormack. 2005. Telomere length control and transcriptional regulation of subtelomeric adhesins in *Candida glabrata*. *Mol. Microbiol.* 55:1246–1258.
11. Cormack, B. P., and S. Falkow. 1999. Efficient homologous and illegitimate recombination in the opportunistic yeast pathogen *Candida glabrata*. *Genetics* 151:979–987.
12. De Las Peñas, A., S. J. Pan, I. Castano, J. Alder, R. Cregg, and B. P. Cormack. 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.
13. Dodgson, A. R., C. Pujol, M. A. Pfaller, D. W. Denning, and D. R. Soll. 2005. Evidence for recombination in *Candida glabrata*. *Fungal Genet. Biol.* 42: 233–243.
14. Dujon, B., D. Sherman, G. Fischer, P. Durrens, S. Casaregola, I. Lafontaine, J. De Montigny, C. Marek, C. Neuvéglise, E. Talla, N. Goffard, L. Frangeul, M. Aigle, V. Anthouard, A. Babour, V. Barbe, S. Barnay, S. Blanchin, J. M. Beckerich, E. Beyne, C. Bleykasten, A. Boisrame, J. Boyer, L. Cattolico, F. Confanioleri, A. De Daruvar, L. Despons, E. Fabre, C. Fairhead, H. Ferry-Dumazet, A. Groppi, F. Hantraye, C. Hennequin, N. Jauniaux, P. Joyet, R. Kachouri, A. Kerrest, R. Koszul, M. Lemaire, I. Lesur, L. Ma, H. Muller, J. M. Nicaud, M. Nikolski, S. Oztas, O. Ozier-Kalogeropoulos, S. Pellenz, S. Potier, G. F. Richard, M. L. Straub, A. Suleau, D. Swennen, F. Tekcia, M. Wesolowski-Louvel, E. Westhof, B. Wirth, M. Zeniou-Meyer, I. Zivanovic, M. Bolotin-Fukuhara, A. Thierry, C. Bouchier, B. Caudron, C. Scarpelli, C. Gaillardin, J. Weissenbach, P. Wincker, and J. L. Souciet. 2004. Genome evolution in yeasts. *Nature* 430:35–44.
15. Fabre, E., H. Muller, P. Therizols, I. Lafontaine, B. Dujon, and C. Fairhead. 2005. Comparative genomics in hemiascomycete yeasts: evolution of sex, silencing, and subtelomeres. *Mol. Biol. Evol.* 22:856–873.
16. Fitzpatrick, D. A., M. E. Logue, J. E. Stajich, and G. Butler. 2006. A fungal phylogeny based on 42 complete genomes derived from supertree and combined gene analysis. *BMC Evol. Biol.* 6:99.
17. Fox, C. A., and K. H. McConnell. 2005. Toward biochemical understanding of a transcriptionally silenced chromosomal domain in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* 280:8629–8632.
18. Galgoczy, D. J., A. Cassidy-Stone, M. Llinas, S. M. O'Rourke, I. Herskowitz, J. L. DeRisi, and A. D. Johnson. 2004. Genomic dissection of the cell type-specification circuit in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 101:18069–18074.
19. Gottschling, D. E., O. M. Aparicio, B. L. Billington, and V. A. Zakian. 1990. Position effect at *S. cerevisiae* telomeres: reversible repression of Pol II transcription. *Cell* 63:751–762.
20. Hardy, C. F., L. Sussel, and D. Shore. 1992. A RAP1-interacting protein involved in transcriptional silencing and telomere length regulation. *Genes Dev.* 6:801–814.
21. Herskowitz, J., J. Rine, and J. Strathern. 1992. Mating-type determination and mating-type interconversion in *Saccharomyces cerevisiae*, vol. 2. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.
22. Huang, Y. 2002. Transcriptional silencing in *Saccharomyces cerevisiae* and *Schizosaccharomyces pombe*. *Nucleic Acids Res.* 30:1465–1482.
23. Hull, C. M., and A. D. Johnson. 1999. Identification of a mating type-like locus in the asexual pathogenic yeast *Candida albicans*. *Science* 285:1271–1275.
24. Hull, C. M., R. M. Raisner, and A. D. Johnson. 2000. Evidence for mating of the "asexual" yeast *Candida albicans* in a mammalian host. *Science* 289:307–310.
25. Imai, S., C. M. Armstrong, M. Kaerberlein, and L. Guarente. 2000. Transcriptional silencing and longevity protein Sir2 is an NAD-dependent histone deacetylase. *Nature* 403:795–800.
26. Johnson, A. D. 1995. Molecular mechanisms of cell-type determination in budding yeast. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 5:552–558.
27. Kimmerly, W., A. Buchman, R. Kornberg, and J. Rine. 1988. Roles of two DNA-binding factors in replication, segregation and transcriptional repression mediated by a yeast silencer. *EMBO J.* 7:2241–2253.
28. Laroche, T., S. G. Martin, M. Gotta, H. C. Gorham, F. E. Pryde, E. J. Louis, and S. M. Gasser. 1998. Mutation of yeast Ku genes disrupts the subnuclear organization of telomeres. *Curr. Biol.* 8:653–656.
29. Leroy, O., J. P. Gangneux, P. Montravers, J. P. Mira, F. Gouin, J. P. Sollet, J. Carlet, J. Reynes, M. Rosenheim, B. Regnier, and O. Lortholary. 2009. Epidemiology, management, and risk factors for death of invasive *Candida* infections in critical care: a multicenter, prospective, observational study in France (2005–2006). *Crit. Care Med.* 37:1612–1618.
30. Magee, B. B., and P. T. Magee. 2000. Induction of mating in *Candida albicans* by construction of MTL α and MTL α strains. *Science* 289:310–313.
31. Miller, M. G., and A. D. Johnson. 2002. White-opaque switching in *Candida albicans* is controlled by mating-type locus homeodomain proteins and allows efficient mating. *Cell* 110:293–302.
32. Muller, H., C. Hennequin, J. Gallaud, B. Dujon, and C. Fairhead. 2008. The asexual yeast *Candida glabrata* maintains distinct α and α haploid mating types. *Eukaryot. Cell* 7:848–858.
33. Nielsen, K., and J. Heitman. 2007. Sex and virulence of human pathogenic fungi. *Adv. Genet.* 57:143–173.
34. O'Gorman, C. M., H. T. Fuller, and P. S. Dyer. 2009. Discovery of a sexual cycle in the opportunistic fungal pathogen *Aspergillus fumigatus*. *Nature* 457:471–474.
35. Patterson, E. E., and C. A. Fox. 2008. The Ku complex in silencing the cryptic mating-type loci of *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 180:771–783.
36. Pfaller, M. A., and D. J. Diekema. 2007. Epidemiology of invasive candidiasis: a persistent public health problem. *Clin. Microbiol. Rev.* 20:133–163.
37. Pfaller, M. A., S. A. Messer, L. Boyken, S. Tendolkar, R. J. Hollis, and D. J. Diekema. 2004. Geographic variation in the susceptibilities of invasive isolates of *Candida glabrata* to seven systemically active antifungal agents: a global assessment from the ARTEMIS antifungal surveillance program conducted in 2001 and 2002. *J. Clin. Microbiol.* 42:3142–3146.
38. Pillus, L., and J. Rine. 1989. Epigenetic inheritance of transcriptional states in *Saccharomyces cerevisiae*. *Cell* 59:637–647.
39. Richardson, M., and C. Lass-Flörl. 2008. Changing epidemiology of systemic fungal infections. *Clin. Microbiol. Infect.* 14:5–24.
40. Rivier, D. H., J. L. Ekena, and J. Rine. 1999. HMR-I is an origin of replication and a silencer in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 151:521–529.
41. Román, E., D. M. Arana, C. Nombela, R. Alonso-Monge, and J. Pla. 2007. MAP kinase pathways as regulators of fungal virulence. *Trends Microbiol.* 15:181–190.
42. Rosas-Hernández, L. L., A. Juárez-Reyes, O. E. Arroyo-Helguera, A. De Las Penas, S. J. Pan, B. P. Cormack, and I. Castano. 2008. yku70/yku80 and Rif1 regulate silencing differentially at telomeres in *Candida glabrata*. *Eukaryot. Cell* 7:2168–2178.
43. Roy, R., B. Meier, A. D. McAmsh, H. M. Feldmann, and S. P. Jackson. 2004. Separation-of-function mutants of yeast Ku80 reveal a Yku80p-Sir4p interaction involved in telomeric silencing. *J. Biol. Chem.* 279:86–94.
44. Rusche, L. N., A. L. Kirchmaier, and J. Rine. 2003. The establishment, inheritance, and function of silenced chromatin in *Saccharomyces cerevisiae*. *Annu. Rev. Biochem.* 72:481–516.
45. Sherman, F., G. R. Fink, and J. B. Hicks. 1986. *Methods in yeast genetics*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.
46. Smith, J. S., C. B. Brachmann, I. Celic, M. A. Kenna, S. Muhammad, V. J. Starai, J. L. Avalos, J. C. Escalante-Semerena, C. Grubmeyer, C. Wolberger, and J. D. Boeke. 2000. A phylogenetically conserved NAD⁺-dependent protein deacetylase activity in the Sir2 protein family. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 97:6658–6663.
47. Srikantha, T., S. A. Lachke, and D. R. Soll. 2003. Three mating type-like loci in *Candida glabrata*. *Eukaryot. Cell* 2:328–340.
48. Sussel, L., D. Vannier, and D. Shore. 1993. Epigenetic switching of transcriptional states: cis- and trans-acting factors affecting establishment of silencing at the HMR locus in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* 13:3919–3928.
49. Tham, W. H., and V. A. Zakian. 2002. Transcriptional silencing at *Saccharomyces* telomeres: implications for other organisms. *Oncogene* 21:512–521.
50. Trick, W. E., S. K. Fridkin, J. R. Edwards, R. A. Hajjeh, and R. P. Gaynes. 2002. Secular trend of hospital-acquired candidemia among intensive care unit patients in the United States during 1989–1999. *Clin. Infect. Dis.* 35: 627–630.
51. Tsong, A. E., M. G. Miller, R. M. Raisner, and A. D. Johnson. 2003. Evolution of a combinatorial transcriptional circuit: a case study in yeasts. *Cell* 115:389–399.
52. Tsong, A. E., B. B. Tuch, H. Li, and A. D. Johnson. 2006. Evolution of alternative transcriptional circuits with identical logic. *Nature* 443:415–420.
53. Vandre, C. L., R. T. Kamakaka, and D. H. Rivier. 2008. The DNA end-binding protein Ku regulates silencing at the internal HML and HMR loci in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 180:1407–1418.
54. Wang, P., C. B. Nichols, M. B. Lengeler, M. E. Cardenas, G. M. Cox, J. R. Perfect, and J. Heitman. 2002. Mating-type-specific and nonspecific PAK kinases play shared and divergent roles in *Cryptococcus neoformans*. *Eukaryot. Cell* 1:257–272.
55. Wotton, D., and D. Shore. 1997. A novel Rap1p-interacting factor, Rif2p, cooperates with Rif1p to regulate telomere length in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genes Dev.* 11:748–760.

TABLAS SUPLEMENTARIAS DEL ARTÍCULO

Supplementary Table 1. *E. coli* and *C. glabrata* strains used in this work

<i>E. coli</i> strains		Genotype	Reference
DH10B		<i>F</i> <i>mcrA</i> Δ (<i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i>) ϕ 80 <i>dlacZ</i> Δ <i>M15</i> <i>\Delta lacX74 deoR recA1 endA1 araD139</i> <i>\Delta</i> (<i>ara,leu</i>)7697 <i>galU galK</i> λ <i>rpsL nupG</i>	
BW23473		<i>\Delta lac-169 robA1 creC510 hsdR514 endA recA</i> <i>\Delta vidA::pir</i> ⁺	
GM2163		<i>F</i> <i>ara-14 leuB6 fhuA31 lacY1 tsx78 glnV44 galK2</i> <i>galT22 mcrA dcm-6 hisG4 rfbD1 rpsL136</i> <i>dam13::Tn9(CamR)xylA5 mtl-1 thi-1 mcrB1</i> <i>hsdR2</i>	(8)
Transposon			
Tn7		Tn7 R6K γ ori <i>URA3 npt</i> (Km ^R)	
<i>C. glabrata</i> strains			
Strain	Parent	Genotype	
BG2		Clinical isolate	
BG14	BG2	<i>ura3</i> Δ ::Tn903 G418 ^R	
CBS138		Clinical isolate. Reference strain	Strain ATCC2001
Tn7 insertions at <i>MTL1</i> locus			
CGM533	BG14	<i>ura3</i> Δ ::Tn903 G418 ^R Tn7 at 161 bp downstream from a1 stop codon in <i>EMG1</i> (pSD11/ <i>Mfe</i> I). Insertion 1	This work
CGM469	BG14	<i>ura3</i> Δ ::Tn903 G418 ^R Tn7 at 330 bp of a1 (pSD13/ <i>Bcg</i> I). Insertion 2	This work
CGM470	BG14	<i>ura3</i> Δ ::Tn903 G418 ^R Tn7 at 87 bp of a1 (pSD17/ <i>Bcg</i> I). Insertion 3	This work
CGM524	BG14	<i>ura3</i> Δ ::Tn903 G418 ^R Tn7 at 27 bp of a1 (pSD15/ <i>Mfe</i> I). Insertion 4	This work
CGM535	BG14	<i>ura3</i> Δ ::Tn903 G418 ^R Tn7 at 747 bp upstream from a1 start codon, between a1 and <i>BUD5</i> (pSD21/ <i>Mfe</i> I). Insertion 5	This work
Tn7 insertions at <i>MTL2</i> locus			
CGM428	BG14	<i>ura3</i> Δ ::Tn903 G418 ^R Tn7 at 808 bp upstream from a1 start codon, between <i>EPA20</i> and a1 (pRZ23/ <i>Bcg</i> I). Insertion 6	This work
CGM424	BG14	<i>ura3</i> Δ ::Tn903 G418 ^R	This work

		Tn7 at 793 bp upstream from a1 start codon, between <i>EPA20</i> and a1 (pRZ30/ <i>Bcg</i> I). Insertion 7	
CGM422	BG14	<i>ura3Δ::Tn903</i> G418 ^R Tn7 at 575 bp upstream from a1 start codon, between <i>EPA20</i> and a1 (pRZ27/ <i>Bcg</i> I). Insertion 8	This work
CGM426	BG14	<i>ura3Δ::Tn903</i> G418 ^R Tn7 at 62 bp upstream from a1 start codon, between <i>EPA20</i> and a1 (pRZ31/ <i>Mfe</i> I and <i>Msc</i> I). Insertion 9	This work
CGM432	BG14	<i>ura3Δ::Tn903</i> G418 ^R Tn7 at 92 bp of a1 (exon1) (pRZ29/ <i>Bcg</i> I). Insertion 10	This work
CGM417	BG14	<i>ura3Δ::Tn903</i> G418 ^R Tn7 at 446 bp of a1 (intron 2) (pRZ21/ <i>Bcg</i> I). Insertion 11	This work
CGM421	BG14	<i>ura3Δ::Tn903</i> G418 ^R Tn7 at 231 bp downstream from a1 stop codon (pRZ22/ <i>Mfe</i> I and <i>Msc</i> I). Insertion 12	This work
Tn7 insertions at <i>MTL3</i> locus			
CGM454	BG14	<i>ura3Δ::Tn903</i> G418 ^R Tn7 at 643 bp downstream from $\alpha 1$ stop codon (pRZ36/ <i>Spe</i> I). Insertion 13	This work
CGM565	BG14	<i>ura3Δ::Tn903</i> G418 ^R Tn7 at 226 bp downstream from $\alpha 1$ stop codon (pRZ34/ <i>Spe</i> I). Insertion 14	This work
CGM653	BG14	<i>ura3Δ::Tn903</i> G418 ^R Tn7 at 404 bp of $\alpha 1$ (pRZ39/ <i>Mfe</i> I). Insertion 15	This work
CGM455	BG14	<i>ura3Δ::Tn903</i> G418 ^R Tn7 at 325 bp of $\alpha 1$ (pRZ37/ <i>Mfe</i> I). Insertion 16	This work
CGM458	BG14	<i>ura3Δ::Tn903</i> G418 ^R Tn7 at 166 bp upstream from $\alpha 1$ start codon, between $\alpha 1$ and $\alpha 2$ (pRZ32/ <i>Bcg</i> I). Insertion 17	This work
CGM430	BG14	<i>ura3Δ::Tn903</i> G418 ^R Tn7 at 106 bp upstream from $\alpha 2$ start codon, between $\alpha 1$ and $\alpha 2$ (pRZ33/ <i>Bcg</i> I). Insertion 18	This work
CGM457	BG14	<i>ura3Δ::Tn903</i> G418 ^R Tn7 at 29 bp upstream from $\alpha 2$ start codon, between $\alpha 1$ and $\alpha 2$ (pRZ38/ <i>Mfe</i> I). Insertion 19	This work
CGM648	BG14	<i>ura3Δ::Tn903</i> G418 ^R Tn7 at 407 bp of $\alpha 2$ (pRZ35/ <i>Mfe</i> I). Insertion 20	This work
CGM644	BG14	<i>ura3Δ::Tn903</i> G418 ^R Tn7 at 557 bp of $\alpha 2$ (pRZ20/ <i>Mfe</i> I). Insertion 21	This work
CGM697	BG14	<i>ura3Δ::Tn903</i> G418 ^R	This work

		Tn7 at 131 bp downstream from $\alpha 2$ stop codon, between $\alpha 2$ and <i>CHAI</i> (pRZ40/ <i>Bcg</i> I). Insertion 22	
<i>sir2Δ::hph</i>			
BG1048	BG14	<i>ura3Δ::Tn903 G418^R, sir2Δ::hph Hyg^R</i> (pAP596/ <i>Sac</i> I- <i>Kpn</i> I)	
CGM602	CGM454	<i>ura3Δ::Tn903 G418^R, sir2Δ::hph Hyg^R</i> (pAP596/ <i>Sac</i> I- <i>Kpn</i> I) Tn7 at 643 bp downstream from $\alpha 1$ stop codon (insertion 13)	This work
CGM594	CGM458	<i>ura3Δ::Tn903 G418^R, sir2Δ::hph Hyg^R</i> (pAP596/ <i>Sac</i> I- <i>Kpn</i> I) Tn7 at 166 bp upstream from $\alpha 1$ start codon, between $\alpha 1$ and $\alpha 2$ (insertion 17)	This work
CGM800	CGM697	<i>ura3Δ::Tn903 G418^R, sir2Δ::hph Hyg^R</i> (pAP596/ <i>Sac</i> I- <i>Kpn</i> I) Tn7 at 131 bp downstream from $\alpha 2$ stop codon, between $\alpha 2$ and <i>CHAI</i> (insertion 22)	This work
<i>sir3Δ::hph</i>			
CGM312	BG14	<i>ura3Δ::Tn903 G418^R, sir3Δ::hph Hyg^R</i> (pIC120/ <i>Kpn</i> I- <i>Hpa</i> I+T4 DNA polymerase)	
CGM626	CGM454	<i>ura3Δ::Tn903 G418^R, sir3Δ::hph Hyg^R</i> (pIC120/ <i>Kpn</i> I- <i>Hpa</i> I+T4 DNA polymerase) Tn7 at 643 bp downstream from $\alpha 1$ stop codon (insertion 13)	This work
CGM596	CGM458	<i>ura3Δ::Tn903 G418^R, sir3Δ::hph Hyg^R</i> (pIC120/ <i>Kpn</i> I- <i>Hpa</i> I+T4 DNA polymerase) Tn7 at 166 bp upstream from $\alpha 1$ start codon, between $\alpha 1$ and $\alpha 2$ (insertion 17)	This work
CGM802	CGM697	<i>ura3Δ::Tn903 G418^R, sir3Δ::hph Hyg^R</i> (pIC120/ <i>Kpn</i> I- <i>Hpa</i> I+T4 DNA polymerase) Tn7 at 131 bp downstream from $\alpha 2$ stop codon, between $\alpha 2$ and <i>CHAI</i> (insertion 22)	This work
<i>sir4Δ::hph</i>			
BG1050	BG14	<i>ura3Δ::Tn903 G418^R, sir4Δ::hph Hyg^R</i> (pAP598/ <i>Bsg</i> I)	
CGM604	CGM454	<i>ura3Δ::Tn903 G418^R, sir4Δ::hph Hyg^R</i> (pAP598/ <i>Bsg</i> I) Tn7 at 643 bp downstream from $\alpha 1$ stop codon (insertion 13)	This work
CGM624	CGM458	<i>ura3Δ::Tn903 G418^R, sir4Δ::hph Hyg^R</i>	This work

		(pAP598/ <i>Bsg</i> I) Tn7 at 166 bp upstream from α 1 start codon, between α 1 and α 2 (insertion 17)	
CGM804	CGM697	<i>ura3</i> Δ ::Tn903 G418 ^R , <i>sir4</i> Δ :: <i>hph</i> Hyg ^R (pAP598/ <i>Bsg</i> I) Tn7 at 131 bp downstream from α 2 stop codon, between α 2 and <i>CHA1</i> (insertion 22)	This work
<i>hdf1</i>Δ::<i>hph</i> (Ku70p)			
BG1080	BG14	<i>ura3</i> Δ ::Tn903 G418 ^R , <i>hdf1</i> Δ :: <i>hph</i> Hyg ^R (pAP611/ <i>Bcg</i> I)	
CGM606	CGM454	<i>ura3</i> Δ ::Tn903 G418 ^R , <i>hdf1</i> Δ :: <i>hph</i> Hyg ^R (pAP611/ <i>Bcg</i> I) Tn7 at 643 bp downstream from α 1 stop codon (insertion 13)	This work
CGM598	CGM458	<i>ura3</i> Δ ::Tn903 G418 ^R , <i>hdf1</i> Δ :: <i>hph</i> Hyg ^R (pAP611/ <i>Bcg</i> I) Tn7 at 166 bp upstream from α 1 start codon, between α 1 and α 2 (insertion 17)	This work
CGM805	CGM697	<i>ura3</i> Δ ::Tn903 G418 ^R , <i>hdf1</i> Δ :: <i>hph</i> Hyg ^R (pAP611/ <i>Bcg</i> I) Tn7 at 131 bp downstream from α 2 stop codon, between α 2 and <i>CHA1</i> (insertion 22)	This work
<i>hdf2</i>Δ::<i>hph</i> (Ku80p)			
BG1081	BG14	<i>ura3</i> Δ ::Tn903 G418 ^R , <i>hdf2</i> Δ :: <i>hph</i> Hyg ^R (pAP612/ <i>Bcg</i> I)	
CGM608	CGM454	<i>ura3</i> Δ ::Tn903 G418 ^R , <i>hdf2</i> Δ :: <i>hph</i> Hyg ^R (pAP612/ <i>Bcg</i> I) Tn7 at 643 bp downstream from α 1 stop codon (insertion 13)	This work
CGM600	CGM458	<i>ura3</i> Δ ::Tn903 G418 ^R , <i>hdf2</i> Δ :: <i>hph</i> Hyg ^R (pAP612/ <i>Bcg</i> I) Tn7 at 166 bp upstream from α 1 start codon, between α 1 and α 2 (insertion 17)	This work
CGM807	CGM697	<i>ura3</i> Δ ::Tn903 G418 ^R , <i>hdf2</i> Δ :: <i>hph</i> Hyg ^R (pAP612/ <i>Bcg</i> I) Tn7 at 131 bp downstream from α 2 stop codon, between α 2 and <i>CHA1</i> (insertion 22)	This work
<i>rif1</i>Δ::<i>hph</i>			
CGM314	BG14	<i>ura3</i> Δ ::Tn903 G418 ^R , <i>rif1</i> Δ :: <i>hph</i> Hyg ^R (pSP166/ <i>Bsg</i> I)	
CGM610	CGM454	<i>ura3</i> Δ ::Tn903 G418 ^R , <i>rif1</i> Δ :: <i>hph</i> Hyg ^R	This work

		(pSP166/ <i>Bsg</i> I) Tn7 at 643 bp downstream from α 1 stop codon (insertion 13)	
CGM563	CGM458	<i>ura3</i> Δ ::Tn903 G418 ^R , <i>rif1</i> Δ :: <i>hph</i> Hyg ^R Tn7 at 166 bp upstream from α 1 start codon, between α 1 and α 2 (pRZ32/ <i>Bcg</i> I) (insertion 17 in a <i>rif1</i> Δ strain)	This work
CGM843	CGM697	<i>ura3</i> Δ ::Tn903 G418 ^R , <i>rif1</i> Δ :: <i>hph</i> Hyg ^R (pSP166/ <i>Bsg</i> I) Tn7 at 131 bp downstream from α 2 stop codon, between α 2 and <i>CHA1</i> (insertion 22)	This work
Strains with deletions of the <i>MTL</i> loci			
CGM383	BG14	<i>ura3</i> Δ ::Tn903 G418 ^R , <i>mtl1</i> Δ :: <i>hph</i> Hyg ^R (pSD7/ <i>Bsg</i> I)	This work
CGM390	CGM383	<i>ura3</i> Δ ::Tn903 G418 ^R , <i>mtl1</i> Δ Hyg ^S (made with pMZ18)	This work
CGM394	BG14	<i>ura3</i> Δ ::Tn903 G418 ^R , <i>mtl2</i> Δ :: <i>hph</i> Hyg ^R (pRZ15/ <i>Bsg</i> I)	This work
CGM413	CGM394	<i>ura3</i> Δ ::Tn903 G418 ^R , <i>mtl2</i> Δ Hyg ^S (made with pMZ18)	This work
CGM415	BG14	<i>ura3</i> Δ ::Tn903 G418 ^R , <i>mtl3</i> Δ :: <i>hph</i> Hyg ^R (pRZ17/ <i>Bsg</i> I)	This work
CGM460	CGM415	<i>ura3</i> Δ ::Tn903 G418 ^R , <i>mtl3</i> Δ Hyg ^S (made with pMZ18)	This work
CGM499	CGM390	<i>ura3</i> Δ ::Tn903 G418 ^R , <i>mtl1</i> Δ , <i>mtl2</i> Δ :: <i>hph</i> Hyg ^R (pRZ15/ <i>Bsg</i> I)	This work
CGM529	CGM499	<i>ura3</i> Δ ::Tn903 G418 ^R , (<i>mtl1</i> , <i>mtl2</i>) Δ Hyg ^S (made with pMZ18)	This work
CGM472	CGM390	<i>ura3</i> Δ ::Tn903 G418 ^R , <i>mtl1</i> Δ <i>mtl3</i> Δ :: <i>hph</i> Hyg ^R (pRZ17/ <i>Bsg</i> I)	This work
CGM498	CGM472	<i>ura3</i> Δ ::Tn903 G418 ^R , (<i>mtl1</i> , <i>mtl3</i>) Δ Hyg ^S (made with pMZ18)	This work
CGM434	CGM413	<i>ura3</i> Δ ::Tn903 G418 ^R , <i>mtl2</i> Δ <i>mtl3</i> Δ :: <i>hph</i> Hyg ^R (pRZ17/ <i>Bsg</i> I)	This work
CGM557	CGM434	<i>ura3</i> Δ ::Tn903 G418 ^R , (<i>mtl2</i> , <i>mtl3</i>) Δ Hyg ^S (made with pMZ18)	This work
CGM526	CGM498	<i>ura3</i> Δ ::Tn903 G418 ^R , (<i>mtl1</i> , <i>mtl3</i>) Δ , <i>mtl2</i> Δ :: <i>hph</i> Hyg ^R (pRZ15/ <i>Bsg</i> I)	This work
CGM531	CGM526	<i>ura3</i> Δ ::Tn903 G418 ^R , (<i>mtl1</i> , <i>mtl2</i> , <i>mtl3</i>) Δ Hyg ^S (made with pMZ18)	This work
Tn7 insertions at <i>MTL3</i> locus integrated in the chr L			

CGM1033	BG14	<i>ura3Δ::Tn903 G418^R pRZ69/Msc I</i> . Tn7 at 643 bp downstream from $\alpha 1$ stop codon, integrated at an internal site in chr L at 224 kb from the telomere.	This work
CGM1030	BG14	<i>ura3Δ::Tn903 G418^R pRZ78/Msc I</i> . Tn7 at 166 bp upstream from $\alpha 1$ start codon between $\alpha 1$ and $\alpha 2$, integrated at an internal site in chr L at 224 kb from the telomere	This work
CGM1031	BG14	<i>ura3Δ::Tn903 G418^R pRZ71/Msc I</i> . Tn7 at 131 bp downstream from $\alpha 2$ stop codon, between $\alpha 2$ and <i>CHAI</i> integrated at an internal site in chr L at 224 kb from the telomere.	This work

1. **Calvin, N. M., and P. C. Hanawalt.** 1988. High-efficiency transformation of bacterial cells by electroporation. *J Bacteriol* **170**:2796-801.
2. **Castano, I., R. Kaur, S. Pan, R. Cregg, A. De Las Penas, N. Guo, M. C. Biery, N. L. Craig, and B. P. Cormack.** 2003. Tn7-based genome-wide random insertional mutagenesis of *Candida glabrata*. *Genome Res* **13**:905-15.
3. **Cormack, B. P., and S. Falkow.** 1999. Efficient homologous and illegitimate recombination in the opportunistic yeast pathogen *Candida glabrata*. *Genetics* **151**:979-87.
4. **Domergue, R., I. Castano, A. De Las Penas, M. Zupancic, V. Locketell, J. R. Hebel, D. Johnson, and B. P. Cormack.** 2005. Nicotinic acid limitation regulates silencing of *Candida* adhesins during UTI. *Science* **308**:866-70.
5. **Fidel, P. L., Jr., J. L. Cutright, L. Tait, and J. D. Sobel.** 1996. A murine model of *Candida glabrata* vaginitis. *J Infect Dis* **173**:425-31.
6. **Haldimann, A., M. K. Prahalad, S. L. Fisher, S. K. Kim, C. T. Walsh, and B. L. Wanner.** 1996. Altered recognition mutants of the response regulator PhoB: a new genetic strategy for studying protein-protein interactions. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**:14361-6.
7. **Rosas-Hernandez, L. L., A. Juarez-Reyes, O. E. Arroyo-Helguera, A. De Las Penas, S. J. Pan, B. P. Cormack, and I. Castano.** 2008. yKu70/yKu80 and Rif1 Regulate Silencing Differentially at Telomeres in *Candida glabrata*. *Eukaryotic Cell* **7**:2168-2178
8. **Woodcock, D. M., P. J. Crowther, J. Doherty, S. Jefferson, E. DeCruz, M. Noyer-Weidner, S. S. Smith, M. Z. Michael, and M. W. Graham.** 1989. Quantitative evaluation of *Escherichia coli* host strains for tolerance to cytosine methylation in plasmid and phage recombinants. *Nucleic Acids Res* **17**:3469-3478.

Supplementary Table 2. Plasmids used in this work

Plasmid	Relevant genotype	Reference
Cloning or marker removal vectors		
pCR2.1 TOPO	Cloning vector, Amp ^R , Km ^R	Invitrogen
pGEM-T Easy	Cloning vector, Amp ^R	Promega
pRS306	Cloning, integrative vector <i>URA3</i> , Amp ^R	
pYIplac211	Cloning, integrative vector <i>URA3</i> , Amp ^R	
pAP502	Cloning vector, Amp ^R pACYC177 cut with <i>Drd I/Dra III</i> and ligated to a <i>Drd I/Dra III</i> linker carrying a <i>Bam HI</i> site flanked by 2 <i>Bcg I</i> sites	
pAP599	Cloning, integrative vector with 2 FRT direct repeats flanking a hygromycin resistance cassette [FRT- <i>P_{PGK}::hph::3'UTR_{HIS3}</i> -FRT] for construction of multiple rounds of knock-out mutants, Amp ^R , Hyg ^R , <i>URA3</i>	
pMZ18	Replicative vector expressing <i>ScFLP1</i> (recombinase gene) for removing the hygromycin marker, <i>P_{EPAL}::FLP1::(3' UTR of HIS3)</i> Cg <i>CEN ARS</i> , Amp ^R	Cormack lab collection
Plasmids carrying the <i>MTL</i> loci		
pIC122	A 3.177 kb <i>Bam HI</i> PCR fragment carrying the <i>MTL1</i> locus (primers #160 and #161) cloned into pCR2.1 TOPO, Amp ^R , Km ^R	This work
pSD10	pIC124 cut with <i>Nco I</i> (filled with Klenow fragment)/ <i>Msc I</i> and ligated, Amp ^R , Km ^S	This work
pAP695	A 3.319 kb <i>Bam HI</i> PCR fragment carrying the <i>MTL3</i> locus (primers #2438 and #2439) cloned into pAP502, Amp ^R	This work
pAP699	A 2.734 kb <i>Bam HI</i> PCR fragment carrying the <i>MTL2</i> locus (primers #2434 and #2435) cloned into pAP502, Amp ^R	This work
Plasmid carrying Transposon		
pIC6	Modified Tn7 R6Kγ ori <i>URA3 npt</i> (Km ^R)	
Plasmids for Tn7 (<i>URA3</i>) insertions at <i>MTL1</i> loci		

pSD11 Insertion 1	A Tn7 insertion 161 bp downstream from a1 stop codon from <i>MTL1</i> (in pSD10), Amp ^R , Km ^R	This work
pSD13 Insertion 2	A Tn7 insertion at nt. 330 of a1 (in exon 2) from <i>MTL1</i> (in pSD10), Amp ^R , Km ^R	This work
pSD17 Insertion 3	A Tn7 insertion at nt. 87 of a1 (in exon 1) from <i>MTL1</i> (in pSD10), Amp ^R , Km ^R	This work
pSD15 Insertion 4	A Tn7 insertion at nt 27 of a1 (in exon 1) from <i>MTL1</i> (in pSD10), Amp ^R , Km ^R	This work
pSD21 Insertion 5	A Tn7 insertion 747 bp upstream from a1 start codon (between a1 and <i>BUD5</i>) from <i>MTL1</i> (in pSD10), Amp ^R , Km ^R	This work
Plasmids for Tn7 (URA3) insertions at MTL2 loci		
pRZ23 Insertion 6	A Tn7 insertion 808 bp upstream from a1 start codon (between <i>EPA20</i> and a1) from <i>MTL2</i> (in pAP699), Amp ^R , Km ^R	This work
pRZ30 Insertion 7	A Tn7 insertion 793 bp upstream from a1 start codon, (between <i>EPA20</i> and a1) from <i>MTL2</i> (in pAP699), Amp ^R , Km ^R	This work
pRZ27 Insertion 8	A Tn7 insertion 575 bp upstream from a1 start codon (between <i>EPA20</i> and a1) from <i>MTL2</i> (in pAP699), Amp ^R , Km ^R	This work
pRZ31 Insertion 9	A Tn7 insertion 62 bp upstream from a1 start codon (between <i>EPA20</i> and a1) from <i>MTL2</i> (in pAP699), Amp ^R , Km ^R	This work
pRZ29 Insertion 10	A Tn7 insertion at nt 92 bp of a1 (exon1) from <i>MTL2</i> (in pAP699), Amp ^R Km ^R	This work
pRZ21 Insertion 11	A Tn7 insertion at nt 446 bp of a1 (intron 2) from <i>MTL2</i> (in pAP699), Amp ^R , Km ^R	This work
pRZ22 Insertion 12	A Tn7 insertion 231 bp downstream from a1 stop codon from <i>MTL2</i> (in pAP699), Amp ^R , Km ^R	This work
Plasmids for Tn7 (URA3) insertions at MTL3 loci		
pRZ36 Insertion 13	A Tn7 insertion 643 bp downstream from $\alpha 1$ stop codon from <i>MTL3</i> (in pAP695), Amp ^R , Km ^R	This work

pRZ34 Insertion 14	A Tn7 insertion 226 bp downstream from α 1 stop codon from <i>MTL3</i> (in pAP695), Amp ^R , Km ^R	This work
pRZ39 Insertion 15	A Tn7 insertion at nt 404 of α 1 from <i>MTL3</i> (in pAP695), Amp ^R , Km ^R	This work
pRZ37 Insertion 16	A Tn7 insertion at nt. 325 of α 1 from <i>MTL3</i> (in pAP695), Amp ^R , Km ^R	This work
pRZ32 Insertion 17	A Tn7 insertion 166 bp upstream from α 1 start codon (between α 1 and α 2) from <i>MTL3</i> (in pAP695), Amp ^R , Km ^R	This work
pRZ33 Insertion 18	A Tn7 insertion 106 bp upstream from α 2 start codon (between α 1 and α 2) from <i>MTL3</i> (in pAP695), Amp ^R , Km ^R	This work
pRZ38 Insertion 19	A Tn7 insertion 29 bp upstream from α 2 start codon (between α 1 and α 2) from <i>MTL3</i> (in pAP695), Amp ^R , Km ^R	This work
pRZ35 Insertion 20	A Tn7 insertion at nt 407 of α 2 from <i>MTL3</i> (in pAP695), Amp ^R Km ^R	This work
pRZ20 Insertion 21	A Tn7 insertion at nt 557 of α 2 from <i>MTL3</i> (in pAP695), Amp ^R , Km ^R	This work
pRZ40 Insertion 22	A Tn7 insertion 131 bp downstream from α 2 stop codon (between α 2 and <i>CHAI</i>) from <i>MTL3</i> (in pAP695), Amp ^R , Km ^R	This work
Plasmids for deletions of silencing proteins		
pAP596 (<i>sir2</i> Δ :: <i>hph</i> Hyg ^R)	<i>SIR2</i> deletion vector. A 0.904 kb PCR fragment containing <i>SIR2</i> 5' and a 0.816 kb PCR fragment carrying <i>SIR2</i> 3' non coding regions cloned into pAP573	
pIC39 (<i>sir3</i> Δ)	A 0.551 kb PCR fragment carrying <i>SIR3</i> 5' and a 0.978 kb PCR fragment carrying <i>SIR3</i> 3' non coding regions cloned into pRS306	
pIC120 (FRT- <i>sir3</i> Δ :: <i>hph</i> -FRT Hyg ^R)	<i>SIR3</i> deletion vector. A 2.1 kb <i>Hind</i> III/ <i>Bam</i> HI fragment from pAP599 containing [FRT- <i>P_{PGK}</i> :: <i>hph</i> ::3'UTR _{<i>HIS3</i>} -FRT] cloned into pIC39 between <i>SIR3</i> 5' and 3' non-coding regions	
pAP598 (<i>sir4</i> Δ :: <i>hph</i> Hyg ^R)	<i>SIR4</i> deletion vector. A 0.904 kb <i>Hind</i> III/ <i>Kpn</i> I PCR fragment containing <i>SIR4</i> 5' (primers	

	#2280-#2281), and a 0.894 kb <i>Sac I/Bam HI</i> PCR fragment carrying <i>SIR2</i> 3' (primers #2283-#2284), non coding regions cloned into pAP573	
pAP611 (<i>hdf1Δ::hph Hyg^R</i>)	<i>HDF1</i> deletion vector. A 0.804 kb <i>Hind III/Kpn I</i> PCR fragment containing <i>HDF1</i> 5' (primers #2238-#2239), and a 0.836 kb <i>Bgl II/Sac I</i> PCR fragment containing <i>HDF1</i> 3' (primers #2240-#2241), non coding regions cloned into pAP573	
pAP612 (<i>hdf2Δ::hph Hyg^R</i>)	<i>HDF2</i> deletion vector. A 0.905 kb <i>Hind III/Kpn I</i> PCR fragment containing <i>HDF2</i> 5' (primers #2244-#2245), and a 0.813 kb <i>Bgl II/Sac I</i> PCR fragment containing <i>HDF1</i> 3' (primers #2246-#2247), non coding regions cloned into pAP573	
pSP165 (<i>rif1Δ</i>)	For <i>RIF1</i> deletion construct. A 0.934 kb <i>Hind III/Xho I</i> PCR fragment containing <i>RIF1</i> 5' (primers #2051-#2059), and a 0.884 kb <i>Xho I/Xma I</i> PCR fragment containing <i>RIF1</i> 3' (primers #1952-#2050), non coding regions cloned into pYIplac211	
pSP166 (<i>rif1Δ::hph Hyg^R</i>)	<i>RIF1</i> deletion vector. A 2.012 kb <i>Sac I/Kpn I</i> (blunt ended) fragment from pAP358 containing [<i>P_{PGK}::hph::3'UTR_{HIS3}</i>] cloned into pSP165 between <i>RIF1</i> 5' and 3' non coding regions	
Plasmids to construct strains with deletions of <i>MTL</i> loci		
pSD1	A 510 bp <i>Sac I/Bam HI</i> PCR fragment (primers #148 and #149) carrying the <i>MTL1</i> 3' non coding region cloned into pGEM-T, Amp ^R	This work
pSD3	A 574 bp <i>Kpn I/Bsg I/Hind III</i> PCR fragment (primers #146 and #147) carrying the <i>MTL1</i> 5' non coding region cloned into pGEM-T, Amp ^R	This work
pSD5	A 510 bp <i>Sac I/Bam HI</i> fragment carrying the <i>MTL1</i> 3' non coding region from pSD1 cloned into pAP599, Amp ^R	This work
pSD7	A 574 bp <i>Kpn I/Hind III</i> fragment carrying the <i>MTL1</i> 5' non coding region from pSD3 cloned into pSD5, Amp ^R	This work

pRZ1	A 472 bp <i>Kpn I/Hind III</i> PCR fragment (primers #150 and #151) carrying the <i>MTL2</i> 5' non coding region cloned into pGEM-T, Amp ^R	This work
pRZ3	A 629 bp <i>Kpn I Bsg I/Xho I</i> PCR fragment (primers #144 and #145) carrying the <i>MTL3</i> 5' non coding region cloned into pGEM-T, Amp ^R	This work
pRZ5	A 473 bp <i>Sac I/Bam HI</i> PCR fragment (primers #152 and #153) carrying the <i>MTL2</i> 3' non coding region cloned into pGEM-T, Amp ^R	This work
pRZ7	A 629 bp <i>Sac I Bsg I/Bam HI</i> PCR fragment (primers #143 and #142) carrying the <i>MTL3</i> 3' non coding region cloned into pGEM-T, Amp ^R	This work
pRZ11	A 629 bp <i>Sac I/Bam HI</i> fragment carrying the <i>MTL3</i> 3' non coding region from pRZ7 cloned into pAP599, Amp ^R	This work
pRZ13	A 472 bp <i>Kpn I/Hind III</i> fragment carrying the <i>MTL2</i> 5' non coding region from pRZ1 cloned into pAP599, Amp ^R	This work
pRZ15	A 473 bp <i>Sac I/Bam HI</i> fragment carrying the <i>MTL2</i> 3' non coding region from pRZ5 cloned into pRZ13, Amp ^R	This work
pRZ17	A 629 bp <i>Kpn I/Xho I</i> fragment carrying the <i>MTL3</i> 5' non coding region from pRZ3 cloned into pRZ11, Amp ^R	This work
Plasmids for Tn7::<i>MTL3</i> locus integration at the chr L		
pRZ63	A 640 bp <i>Pst I</i> PCR fragment carrying a non coding region of Chr L (primers #254 and #663) cloned into pGEM-T Easy, Amp ^R	This work
pRZ69	Vector to integrate the <i>MTL3</i> locus carrying Tn7 insertion 643 bp downstream from $\alpha 1$ stop codon into a Chr L intergenic region. A 640 bp <i>Pst I</i> fragment carrying a non coding region of chr L from pRZ63 cloned into pRZ36, Amp ^R , Km ^R	This work
pRZ78	Vector to integrate the <i>MTL3</i> locus carrying a Tn7 insertion 166 bp upstream from $\alpha 1$ start codon (between $\alpha 1$ and $\alpha 2$) into a Chr L intergenic region. A 640 bp <i>Pst I</i> fragment	This work

	carrying a non coding region of Chr L from pRZ63 cloned into pRZ32, Amp ^R , Km ^R	
pRZ71	Vector to integrate the <i>MTL3</i> locus carrying Tn7 insertion 131 bp downstream from $\alpha 2$ stop codon (between $\alpha 2$ and <i>CHAI</i>) into a Chr L intergenic region. A 640 bp <i>Pst</i> I fragment carrying a non coding region of Chr L from pRZ63 cloned into pRZ40, Amp ^R , Km ^R	This work

1. **Castano, I., R. Kaur, S. Pan, R. Cregg, A. De Las Penas, N. Guo, M. C. Biery, N. L. Craig, and B. P. Cormack.** 2003. Tn7-based genome-wide random insertional mutagenesis of *Candida glabrata*. *Genome Res* **13**:905-15.
2. **De Las Penas, A., S. J. Pan, I. Castano, J. Alder, R. Cregg, and B. P. Cormack.** 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**:2245-58.
3. **Domergue, R., I. Castano, A. De Las Penas, M. Zupancic, V. Locketell, J. R. Hebel, D. Johnson, and B. P. Cormack.** 2005. Nicotinic acid limitation regulates silencing of *Candida* adhesins during UTI. *Science* **308**:866-70.
4. **Gietz, R. D., and A. Sugino.** 1988. New yeast-*Escherichia coli* shuttle vectors constructed with in vitro mutagenized yeast genes lacking six-base pair restriction sites. *Gene* **74**:527-34.
5. **Rosas-Hernandez, L. L., A. Juarez-Reyes, O. E. Arroyo-Helguera, A. De Las Penas, S. J. Pan, B. P. Cormack, and I. Castano.** 2008. yKu70/yKu80 and Rif1 Regulate Silencing Differentially at Telomeres in *Candida glabrata*. *Eukaryotic Cell* **7**:2168-2178.
6. **Sikorski, R. S., and P. Hieter.** 1989. A system of shuttle vectors and yeast host strains designed for efficient manipulation of DNA in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* **122**:19-27.

Supplementary Table 3. Oligonucleotides used in this work

Primer	Sequence (5'-3')	Site(s) added
MTL cloning		
160	GCGGATCCGTGCTTCAATTATGTTTCGATAGC	<i>Bam</i> HI
161	GCGGATCCGCGCGTCCAATTGCTGCGATGG	<i>Bam</i> HI
2434	GGGGATCCTAACGTCGTAAGGTTAGTGTGGCACC	<i>Bam</i> HI
2435	CCGGATCCTAAGTGGTCAATAATACGCAAC	<i>Bam</i> HI
2438	CCGGATCCCACGCATTGCTTTTACCAATGCGAGAC	<i>Bam</i> HI
2439	CCGGATCCGTACTCACAGACTAAAATGAGTAAGGC	<i>Bam</i> HI
Construction of MTL knock-out vectors		
142	CCGGATCCATATGAGAACGATTTTTCTCGC	<i>Bam</i> HI
143	CCGAGCTCTTGTGCAGCATAAAAACCATTTTCGTTATGG	<i>Sac</i> I/ <i>Bsg</i> I
144	CCGGTACCTTGTGCAGCATATTATAGTGCTTTGCCTG	<i>Kpn</i> I/ <i>Bsg</i> I
145	CCCTCGAGTTATATAATGGCCCATGCGTCC	<i>Xho</i> I
146	CCGGTACCTTGTGCAGCTGCTGAACTGTGACGACCATC	<i>Kpn</i> I/ <i>Bsg</i> I
147	CACAAGCTTTTATATAATGGCCCATGCGTC	<i>Hind</i> III
148	CCGGATCCTCTTTGTCTTCTGCCACTAC	<i>Bam</i> HI
149	CCGAGCTCTTGTGCAGGCGTCTTTCCTGTGATTATGATG	<i>Sac</i> I/ <i>Bsg</i> I
150	CCGGTACCTTGTGCAGGTTAGTGTGGCACCTAAATG	<i>Kpn</i> I/ <i>Bsg</i> I
151	CCAAGCTTCCGGGACAATCAAACCTTAC	<i>Hind</i> III
152	CCGGATCCTCCCCGTACAATTCAATAC	<i>Bam</i> HI
153	CCGAGCTCTTGTGCAGCTGATATGATTTGGATATTGAA G	<i>Sac</i> I/ <i>Bsg</i> I
Construction of Chr L integrative vectors		
254	CGCCTGCAGACATGTCTCCCTGCTAAGGTATCC	<i>Pst</i> I
663	CGCCTGCAGAGTGGAGGATCAAGAGTAGATTGG	<i>Pst</i> I
RT-PCR		
189 <i>MFAI</i> Fw	GCAACCAACTATTGAAGCCAC	

190 <i>MFA1</i> Rv	GCGATTACACAATCTGGACTCC
191 <i>MF(ALPHA)</i> Fw	CGGTTGCATTATTGATTACTGG
192 <i>MF(ALPHA)</i> Rv	GTGGCTTGATTATACAGGGTAG
195 <i>STE3</i> Fw	CCACCGCTTGCATGGCATAACC
196 <i>STE3</i> Rv	GATATCCCAACATTGGCACCGAC
205 <i>STE20</i> Fw	GGTCGATGGATCCCAAGAGCCC
206 <i>STE20</i> Rv	GGGGAATGCGATAAACTCAAGC
209 <i>HOG1</i> Fw	CATAAGAACCCAGATATTCGGC
210 <i>HOG1</i> Rv	CCAGCACCGCTGTGGCGAAAGG
219 <i>ACT1</i> Fw	CGCCGGTGACGATGCTCC
220 <i>ACT1</i> Rv	CTTGGATTGAGCTTCGTC
286 <i>STE2</i> Fw	TTGCCATTATCCTCTATCTG
287 <i>STE2</i> Rv	ACCCATTGCTCTTATTCCG
288 $\alpha 1$ Fw	ATTAGAGAAGAAAGGATGAAAC
289 $\alpha 1$ Rv	GATGGAAGTATTGAAGTGATG
290 $\alpha 2$ Fw	TCAAGAATTAGTATTACGCATC
291 $\alpha 2$ Rv	AACTGGAACACAATGATATAAG
468 a1 Fw	GACCCAATACAAGATCTACGC
469 a1 Rv	AGATCTTTCGATCTCTTGCGC
614 <i>STE12</i> Rv	GGGTTTCCAGTAACACGTTG
615 <i>STE12</i> Fw	CTAGGGCAGTTCGCGAGCC

Mapping *URA3* insertions at *MTL* loci

20	ATAATCCTTAAAACTCCATTTCCACCCCT	Tn7 Left
21	ACTTTATTGTCATAGTTTAGATCTATTTTG	Tn7 Right
72	GAAGTTTAAAATTTCTTTAGG	
163	CGGTTGATGAGAGCTTTGTTGTAGG	
164	ATAGGCGTATGCACGAGGCC	
180	CACCGACCGTTATATAATAATAG	
181	CCTTAGTGATTCATTTGTATCC	
186	GTCTATCATATTTACCTAATATGG	

199	GACAGTCGCTCCCGGGGCCGTCG	
Diagnosis of integration of <i>URA3</i> insertions into the <i>MTL</i> loci		
173	CAGTTGGCTCTGTTTTTGG	
174	GGTAAAGCCTCAGTTGCTC	
175	CTCTAGGATTGTATCTTGAGAACTC	
178	CTGTGGAGGTTTCATCGAACAC	
222	CAGATGATTGAAACGCTGACAC	
223	CAAGATCCAAACTATTTGGG	
Diagnosis of <i>MTL</i> deletion mutants		
15	CGATAAGAGGCCACGTGCTTTATG	
16	AGAAATACGCACGAACACGATATAGAGG	
176	CCGTTTCTAGGTAAATATACGTG	
177	GGTATGCGCACGCATAGAGC	
Diagnosis of deletion/insertion mutants of silencing genes		
54	GCAGCCACTGCACAAGAATC	
55	AGGCAGCTCGCCAGAATCCCATTC	
56	GGGTCTGACAGCCATCAAGTTAC	
2055	GAGTACGAAGATTGAACATAATTA	
2242	AGCGAGGTACGAAGATATAGAACGC	
2243	CCCGTACTACAATAACAATGCAGCT	
2248	AGCCGCTGTATCGGGATCAAC	
2249	CCGACAACAAGAACAGCACCCCTTGG	
2254	CAACCGCTGAAATTATTAGAGCCACG	
2255	TTGGGCAGAGGTGTTCAACTCTAGACC	
2282	GCAGCTTACACTAAAGTCACGT	
2285	ACAACCAACTCAAACAAGTACCTACCG	
Diagnosis of absence of internal fragments of silencing genes in <i>C. glabrata</i>		
80	CGGAACATATGTTTCGAGGTAC	

81	GGAATGTTTAGTTTCTTATTCTGATC	
82	CCTCGTGAACACACCGAGACGC	
83	CGCGAGTCCAGCTCCTCG	
84	GAATGTCAAGGACGGGAAG	
85	CAATAGACGAATGGTGAAC	
86	TAGTGAAGTAGTTAGTCCAATG	
87	CGTAGTATCCTGTTCAAGC	
108	GACCTGGAAGGATGGCAGATAATC	
109	GGGCTTGAAGTCCCTTGTAGTAGTC	
110	GGGAGTTATCGCACCCAGATATGC	
111	GACAAATTTACATTAGCCGCTATTGG	
Diagnosis of integration of <i>MTL3</i>. <i>URA3</i> in Chr L		
197	GGCTGTAGTTCCACAAAGAG	
260	CAACGGGAGGAATATTTGCTCAGGTGC	
261	TTAAGGACATGCGCGTAAACATGGG	

Supplementary Table 4. Nucleotide positions of the insertions of Tn7 throughout the mating loci *MTL1*, *MTL2* and *MTL3*

Insertion No.	Plasmid	Locus	Gene	Nucleotide position
1	pSD11	<i>MTL1</i>	downstream of a1	a1 nt +161 bp
2	pSD13	<i>MTL1</i>	a1 exon 2	a1 nt 330
3	pSD17	<i>MTL1</i>	a1 exon 1	a1 nt 87
4	pSD15	<i>MTL1</i>	a1 exon 1	a1 nt 27
5	pSD21	<i>MTL1</i>	upstream of a1	a1 nt -747
6	pRZ23	<i>MTL2</i>	upstream of a1	a1 nt -808
7	pRZ30	<i>MTL2</i>	upstream of a1	a1 nt -793
8	pRZ27	<i>MTL2</i>	upstream of a1	a1 nt -575
9	pRZ31	<i>MTL2</i>	upstream of a1	a1 nt -62
10	pRZ29	<i>MTL2</i>	a1 exon 1	a1 nt 92
11	pRZ21	<i>MTL2</i>	a1 intron 2	a1 nt 446
12	pRZ22	<i>MTL2</i>	downstream of a1	a1 nt +231
13	pRZ36	<i>MTL3</i>	downstream of $\alpha 1$	$\alpha 1$ nt +643
14	pRZ34	<i>MTL3</i>	downstream of $\alpha 1$	$\alpha 1$ nt +226
15	pRZ39	<i>MTL3</i>	$\alpha 1$	$\alpha 1$ nt 404
16	pRZ37	<i>MTL3</i>	$\alpha 1$	$\alpha 1$ nt 325
17	pRZ32	<i>MTL3</i>	upstream of $\alpha 1$	$\alpha 1$ nt -166
18	pRZ33	<i>MTL3</i>	upstream of $\alpha 2$	$\alpha 2$ nt -106
19	pRZ38	<i>MTL3</i>	upstream of $\alpha 2$	$\alpha 2$ nt -29
20	pRZ35	<i>MTL3</i>	$\alpha 2$	$\alpha 2$ nt 407
21	pRZ20	<i>MTL3</i>	$\alpha 2$	$\alpha 2$ nt 557
22	pRZ40	<i>MTL3</i>	downstream of $\alpha 2$	$\alpha 2$ nt +131

FIGURAS DE LOS DATOS ADICIONALES

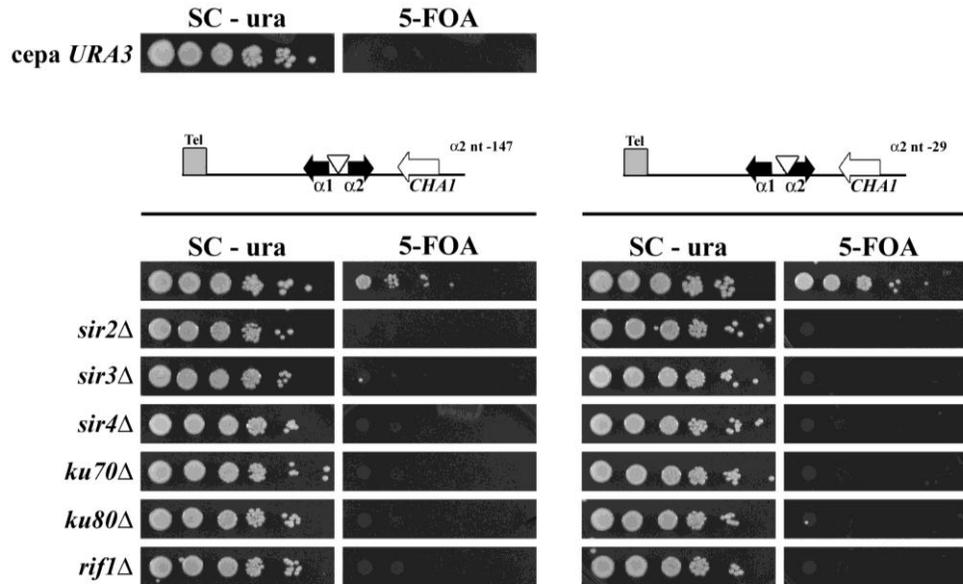


Figura 12. El silenciamiento fuerte de la región entre los genes $\alpha 1$ y $\alpha 2$, ubicada a 29 nucleótidos del codón de inicio de $\alpha 2$, también depende las proteínas Sir2, Sir3, Sir4, yKu70, yKu80 y Rif1. El panel superior muestra dos inserciones del gen *URA3* ubicadas en la región intergénica de los genes $\alpha 1$ y $\alpha 2$ (indicadas con triángulos blancos invertidos) que se seleccionaron para introducir independientemente mutaciones por eliminación/inserción de los genes *SIR2*, *SIR3*, *SIR4*, *HDF1* (yKu70p), *HDF2* (yKu80p) y *RIF1*. Cultivos de fase estacionaria de cepas de *C. glabrata* que contienen las inserciones de *URA3* mostradas y los alelos de eliminación *sir2* Δ , *sir3* Δ , *sir4* Δ , *hdf1* Δ , *hdf2* Δ y *rif1* Δ se diluyeron en agua estéril. El mismo número de células de cada dilución se goteó en cajas de medio YPD (no mostrado), medio sin uracilo (SC-ura) y medio SC con 5-FOA. Las cajas se incubaron a 30°C durante 48 h y se fotografiaron. El panel izquierdo muestra el crecimiento de las cepas con las mutaciones nulas de los genes del silenciamiento y la inserción de *URA3* entre $\alpha 1$ y $\alpha 2$ de *MTL3*, a 147 nucleótidos del codón de inicio de $\alpha 2$ (o a 166 nucleótidos del codón de inicio de $\alpha 1$, como en la Figura 1D, Ramirez-Zavaleta *et al.*, 2010). El panel derecho muestra el crecimiento de las cepas con las mutaciones nulas de los genes del silenciamiento y la inserción de *URA3* entre $\alpha 1$ y $\alpha 2$ de *MTL3*, a 29 nucleótidos del codón de inicio de $\alpha 2$, la cual está más silenciada que la inserción entre $\alpha 1$ y $\alpha 2$ a 147 nucleótidos del codón de inicio de $\alpha 2$.

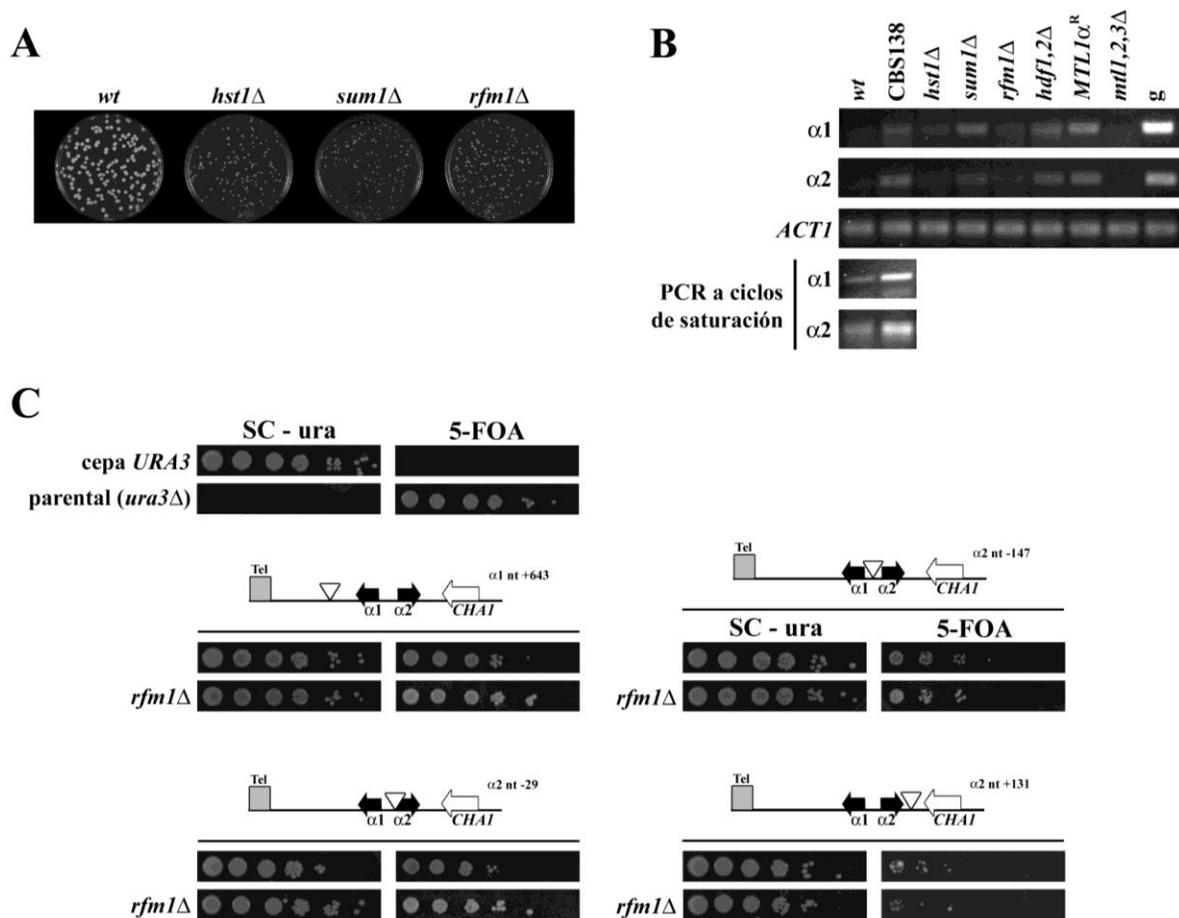


Figura 13. El silenciamiento subtelomérico de la cromatina de *MTL3* es el mecanismo principal de represión de los genes $\alpha 1$ y $\alpha 2$. (A) El tamaño de las colonias de las mutantes nulas *hst1Δ*, *sum1Δ* y *rfm1Δ* que crecen en cajas de medio YPD es menor que el de la cepa silvestre (B) Análisis de la expresión de los genes $\alpha 1$ y $\alpha 2$ de *MTL3* por RT-PCR. Cepas que contienen los alelos de eliminación de los genes *HST1*, *SUM1*, *RFM1* y *HDF1* (yKu70p) y *HDF2* (yKu80p) simultáneamente, crecieron hasta fase estacionaria durante 48 h y se extrajo el RNA para llevar a cabo RT-PCR. Las cepas CBS138 y *mtl1,2,3Δ* se usaron como controles positivo y negativo de la expresión de los genes α , respectivamente. Adicionalmente se evaluó la expresión de los genes $\alpha 1$ y $\alpha 2$ de una cepa *mtl1,2,3Δ* a la que se reconstituyó la información α en *MTL1* (*MTL1 α^R*). El gen *ACT1* se usó como un control interno de expresión. Las reacciones a las que no se les agregó transcriptasa reversa (-RT) no amplificaron ninguna banda (no mostrado). El DNA genómico de la cepa silvestre (g) se usó como control positivo de la reacción de PCR. (C)

Se muestra la ubicación de cuatro inserciones representativas de *URA3* en *MTL3* (triángulos invertidos) que se seleccionaron para introducir una mutación por eliminación/inserción del gen *RFM1*. Cultivos de fase estacionaria de cepas de *C. glabrata* que contienen las inserciones de *URA3* mostradas y el alelo de eliminación *rfm1* Δ se diluyeron en agua estéril. El mismo número de células de cada dilución se goteó en cajas de medio YPD (no mostrado), medio sin uracilo (SC-ura) y medio SC con 5-FOA. Las cajas se incubaron a 30°C durante 48 h y se fotografiaron.

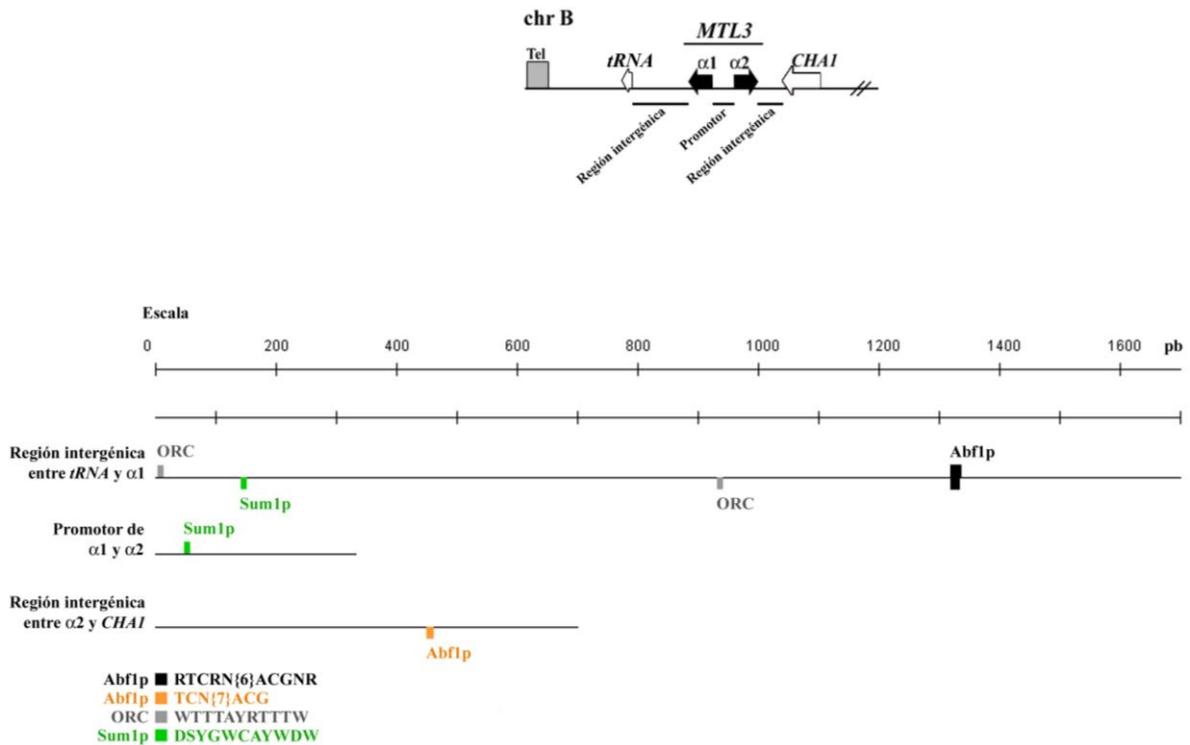


Figura 14. Las regiones intergénicas de los genes *tRNA* y $\alpha 1$, entre $\alpha 1$ y $\alpha 2$, y entre $\alpha 2$ y *CHA1* contienen posibles sitios de unión a proteínas que nuclea el silenciamiento. Se obtuvieron las secuencias de las regiones intergénicas mencionadas anteriormente de la base de datos de la página del National Center for Biotechnology Information (NCBI) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Posteriormente, con el programa TOUCAN (Aerts *et al.*, 2003), que simultáneamente analiza las cadenas Watson y Crick, se buscaron los sitios consenso de unión a Abf1p, ORC y Sum1p de *S. cerevisiae*. La región entre los genes *tRNA* y $\alpha 1$ contiene dos sitios de unión a ORC, un sitio de unión a Abf1p y un sitio de unión a Sum1p. La región entre los genes $\alpha 1$ y $\alpha 2$ contiene un sitio de unión a Sum1p. Finalmente, la región entre los genes $\alpha 2$ y *CHA1* contiene un sitio de unión a Abf1p un poco más degenerado.

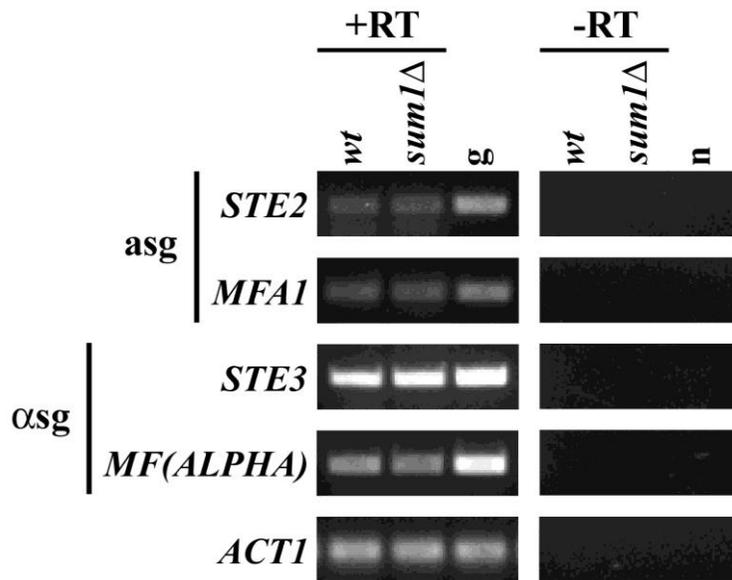


Figura 15. En *C. glabrata* Sum1p no regula genes específicos del tipo sexual α (α sg) como sucede en *S. cerevisiae*, ni tampoco genes específicos del tipo sexual a (asg). En la cepa silvestre y en la mutante nula *sum1*Δ se analizó la expresión de los genes *STE2* y *MFA1*, dos asg de *S. cerevisiae*, y de los genes *STE3* y *MF(ALPHA)*, dos α sg de *S. cerevisiae*, por RT-PCR. La cepa silvestre y la mutante nula *sum1*Δ crecieron hasta fase estacionaria durante 48 h y se extrajo el RNA para llevar a cabo RT-PCR. El gen *ACT1* se usó como un control interno de expresión. Las reacciones a las que no se les agregó transcriptasa reversa (-RT) no amplificaron ninguna banda. El DNA genómico de la cepa silvestre (g) se usó como control positivo de la reacción de PCR.

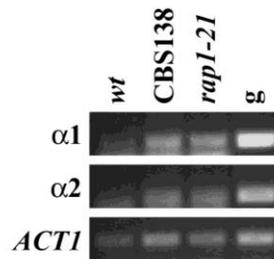
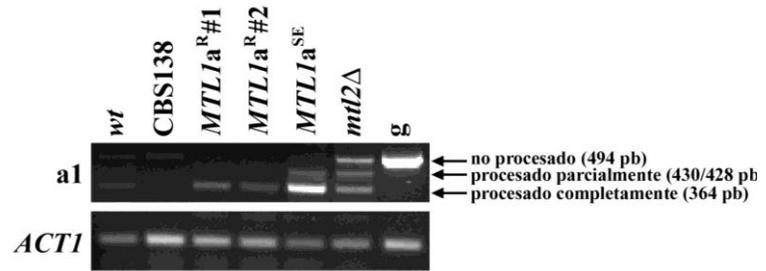
A**B**

Figura 16. (A) El silenciamiento de los genes $\alpha 1$ y $\alpha 2$ de *MTL3* también depende de la proteína Rap1. Se analizó de la expresión de los genes $\alpha 1$ y $\alpha 2$ de *MTL3* por RT-PCR. La cepas silvestre, CBS138 (usada como control positivo de la expresión de los genes α) y mutante *rap1-21* crecieron hasta fase estacionaria durante 48 h y se extrajo el RNA para llevar a cabo RT-PCR. El gen *ACT1* se usó como control interno de expresión. Las reacciones a las que no se les agregó transcriptasa reversa (-RT) no amplificaron ninguna banda (no mostrado). El DNA genómico de la cepa silvestre (g) se usó como control positivo de la reacción de PCR. (B) Las cepas con un solo locus *MTL1a* y una cepa sobre expresante de **a** transcriben correctamente la información del tipo de apareamiento. Se analizó de la expresión del gen **a1** por RT-PCR. Las cepas silvestre, CBS138, *mtl1,2,3Δ* a la que se reconstituyó la información **a** en *MTL1* (*MTL1a^R*), sobre expresante de la información **a** (*MTL1a^{SE}*) y *mtl2Δ* crecieron hasta fase estacionaria durante 48 h y se extrajo el RNA para llevar a cabo RT-PCR. El gen *ACT1* se usó como control interno de expresión. Las reacciones a las que no se les agregó transcriptasa reversa (-RT) no amplificaron ninguna banda (no mostrado). El DNA genómico de la cepa silvestre (g) se usó como control positivo de la reacción de PCR.

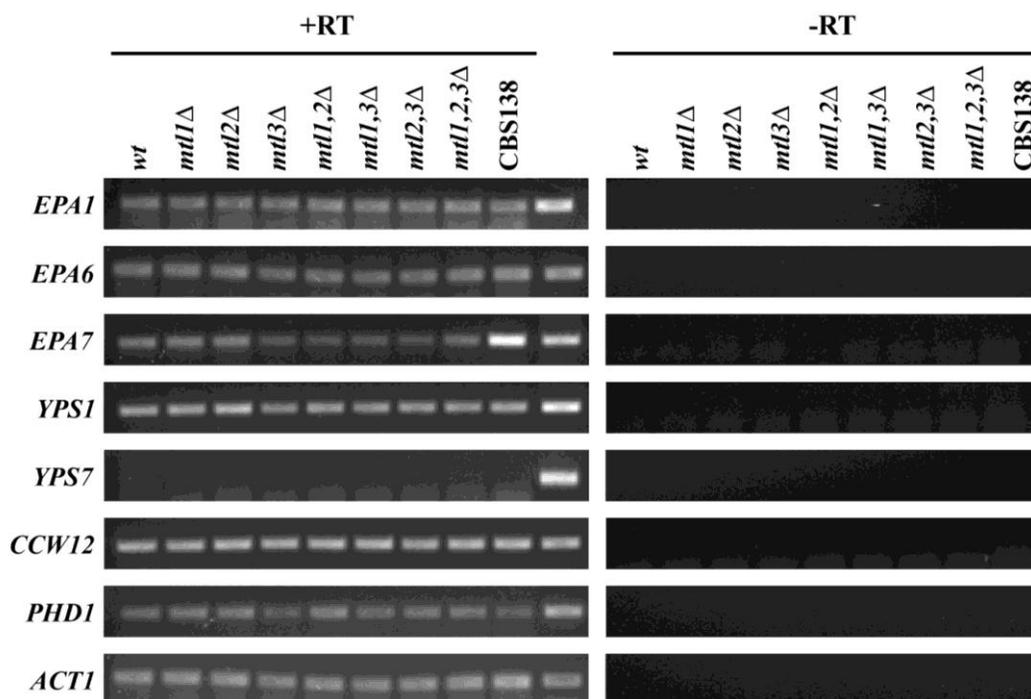


Figura 17. La información contenida en los loci *MTL* no afecta la expresión de genes relacionados con la virulencia de *C. glabrata*. Se analizó la expresión de los genes *EPA1*, *EPA6*, *EPA7*, *YPS1*, *YPS7*, *CCW12*, un hsg de *S. cerevisiae*, y *PHD1* por RT-PCR. Las cepas que conforman la batería de mutantes nulas sencillas, dobles y triple de los loci *MTL* crecieron hasta fase estacionaria durante 48 h y se extrajo el RNA para realizar RT-PCR. La cepa CBS138, tipo α , se usó para comparar la expresión de los genes anteriores con respecto a nuestra cepa silvestre BG14 (Cormack y Falkow, 1999), tipo **a**. El gen *ACT1* se usó como control interno de expresión. Las reacciones a las que no se les agregó transcriptasa reversa (-RT) no mostraron productos de amplificación. El DNA genómico de la cepa silvestre (g) se usó como control positivo de la reacción de PCR.

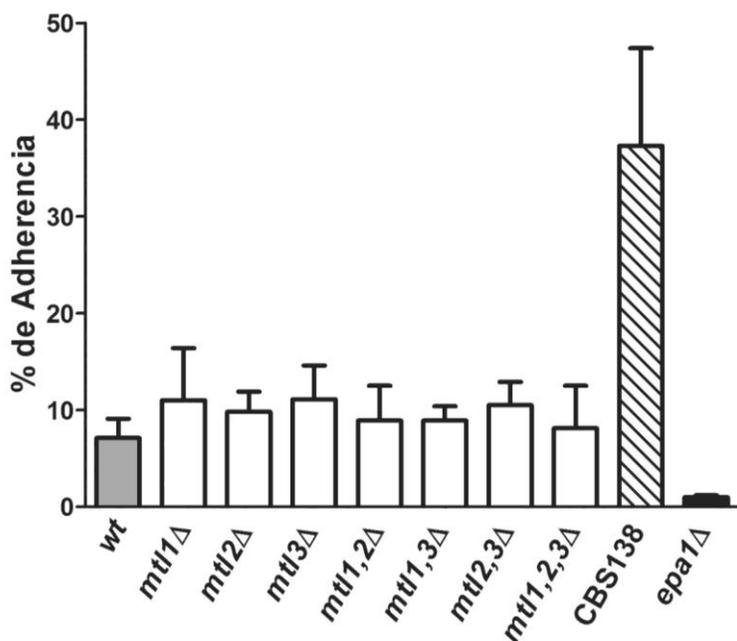


Figura 18. La información *MTL* no determina la capacidad de adherencia de *C. glabrata*, en fase estacionaria, a células HeLa *in vitro*. Células de las distintas cepas con mutaciones sencillas, dobles y triple de los loci *MTL* crecieron a fase estacionaria en YPD a 30°C durante 48 h. La densidad óptica (O.D.₆₀₀) se ajustó a 1.0 con HBSS (Hanks Balanced Salt Solution) suplementada con 5 mM de CaCl₂. Se tomó 1 ml de la suspensión celular a O.D. de 1.0 y se diluyó hasta 1 x 10⁻⁴ en agua estéril. Se platearon 200 µl de la dilución 1 x 10⁻⁴ (input de células) en cajas de YPD con penicilina (100 U/ml) y estreptomicina (100 µg/ml). Por triplicado, se tomó 1 ml de la suspensión celular a O.D. de 1.0 y se agregó a un pozo de 15 mm de diámetro que contenía células HeLa, fijadas con paraformaldehído al 3.7%, y 0.5 ml de HBSS suplementada con 5 mM de CaCl₂. Se incubó durante 1 h y media a temperatura ambiente. Se decantó el contenido de los pozos y se hicieron cuatro lavados con 1 ml de HBSS suplementada con 5 mM de CaCl₂. Se agregó a cada pozo 0.5 ml de PBS suplementado con Tritón al 0.5% y 10mM de EDTA y recuperaron las células de *C. glabrata* que permanecieron adheridas. Se diluyó hasta 1 x 10⁻⁴ en agua estéril y se platearon 200 µl de esta dilución en cajas de YPD con penicilina y estreptomicina. Las cajas se incubaron a 30°C durante 48 h. Finalmente se contó el número de colonias. La cepa *epa1Δ* se utilizó como control negativo de adherencia a células HeLa.

Las cepas reporteras de los loci *MTL* contienen una sola copia del gen *URA3* integrada en su genoma

Los ensayos de silenciamiento se basan en la expresión del gen reportero *URA3* y primero probamos que solo hubiera una inserción de *URA3* por cepa. Mostramos, por medio de Southern blot, que cepas reporteras del estado de la cromatina de los tres loci *MTL* contenían una sola inserción de *URA3* (Figura 19, datos adicionales). Adicionalmente, realizamos un experimento para reemplazar por doble recombinación homóloga el locus *MTL* (que contenía el gen *URA3*), por un cassette *hph* de resistencia a higromicina (Hyg^R). Encontramos que todas las colonias Ura^- fueron Hyg^R , y por PCR determinamos que habían perdido el gen *URA3*, pero que habían integrado correctamente el marcador de selección *hph* (Tabla 2, datos adicionales). Estos datos apoyan que las cepas reporteras de los loci *MTL* contienen una sola copia de *URA3* en el genoma, lo que indica que su fenotipo en 5-FOA se debe a la expresión de una copia de *URA3* integrado en *MTL*, pero no a su integración en un lugar distinto del genoma.

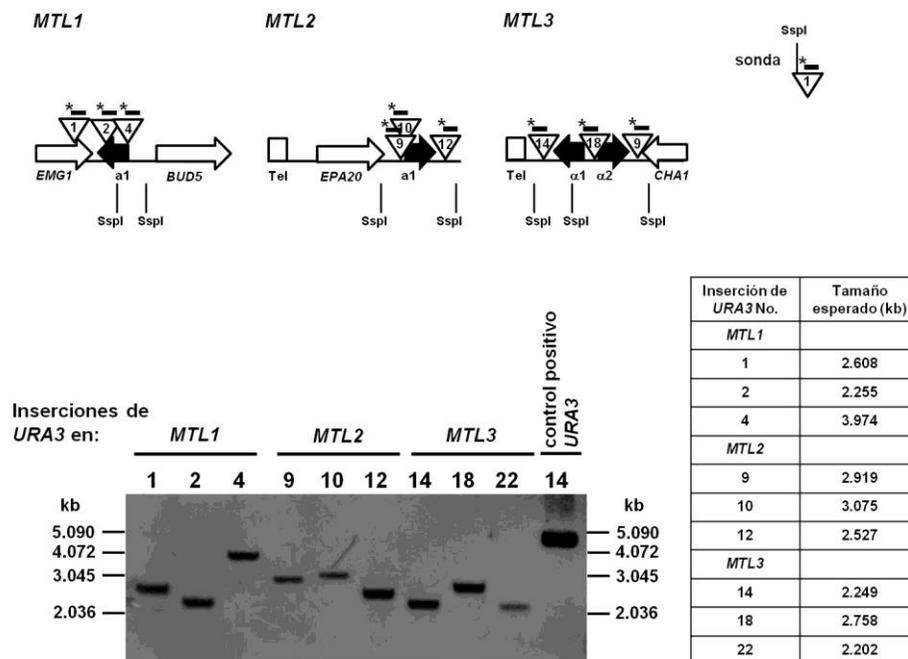


Figura 19. Cepas reporteras de *C. glabrata* contienen solo un gen *URA3* integrado en el genoma. Panel superior: representación esquemática de los loci *MTL* indicando la

inserción (triángulo blanco invertido) usada para el Southern blot y el fragmento interno de *URA3* usado como sonda (rectángulo negro con asterisco). Se indica el número de la inserción correspondiente a las inserciones de la Figura 1 del artículo: Subtelomeric silencing of the *MTL3* locus of *Candida glabrata* requires yKu70, yKu80 and Rif1 proteins. Panel inferior: DNA genómico (160 µg) de tres diferentes inserciones en cada locus *MTL* se digirió con *SspI*, se separó en un gel de agarosa al 0.8% y se transfirió a una membrana Hybond. La membrana se hibridó con un fragmento interno de *URA3* de 229 pb acoplado a peroxidasa (sonda) (ECL G&E kit). Un plásmido super enrollado (pRZ34, que generó la inserción 14) que contiene el gen *URA3* se usó como control positivo de la señal de la sonda. La tabla de la derecha indica el tamaño de la banda esperado para cada inserción.

Cepa con la inserción de <i>URA3</i>	<i>mtl::URA3</i> remplazado por <i>hph</i>	Selección	<i>mtlΔ::hph</i> integrado correctamente			<i>mtlΔ::hph</i> integrado incorrectamente		
			% de colonias		% de colonias con <i>mtl::URA3</i> original	% de colonias		% de colonias con <i>mtl::URA3</i> original
			Ura ⁻	5-FOA ^R		Ura ⁻	5-FOA ^R	
1 (pSD11)	<i>MTL1</i>	Hyg ^R	100	100	0	0	0	100
2 (pSD13)	<i>MTL1</i>	Hyg ^R	100	100	0	0	0	100
4 (pSD15)	<i>MTL1</i>	Hyg ^R	100	100	0	0	0	100
9 (pRZ31)	<i>MTL2</i>	Hyg ^R	100	100	0	0	0	100
10 (pRZ29)	<i>MTL2</i>	Hyg ^R	100	100	0	0	0	100
12 (pRZ22)	<i>MTL2</i>	Hyg ^R	100	100	0	0	0	100
18 (pRZ33)	<i>MTL3</i>	Hyg ^R	100	100	0	0	0	100

Tabla 2. El remplazo de varias inserciones *mtl::URA3* por *mtlΔ::hph* causa la pérdida del gen *URA3* generando células Ura⁻. Cepas de *C. glabrata* que contienen la inserción indicada de *URA3* en cada locus *MTL* se transformaron con los plásmidos *mtlΔ::hph* (pSD7 -knock out de *MTL1*-, pRZ15 -knock out de *MTL2*- y pRZ17 -knock out de *MTL3*) digeridos con *BsgI* para inducir doble recombinación homóloga en el locus *MTL* correspondiente y se seleccionaron colonias Hyg^R. Se hicieron parches en cajas de medio YPD Hyg, SC -ura y 5-FOA de las colonias transformantes para identificar las colonias Ura⁻. Las cepas Ura⁻ que integraron correctamente los plásmidos *mtlΔ::hph* y reemplazaron la inserción *mtl::URA3* relevante, se identificaron por PCR para determinar la presencia del cassette *hph* en el locus correcto, así como la presencia (o ausencia) del gen *URA3* original en cada locus.

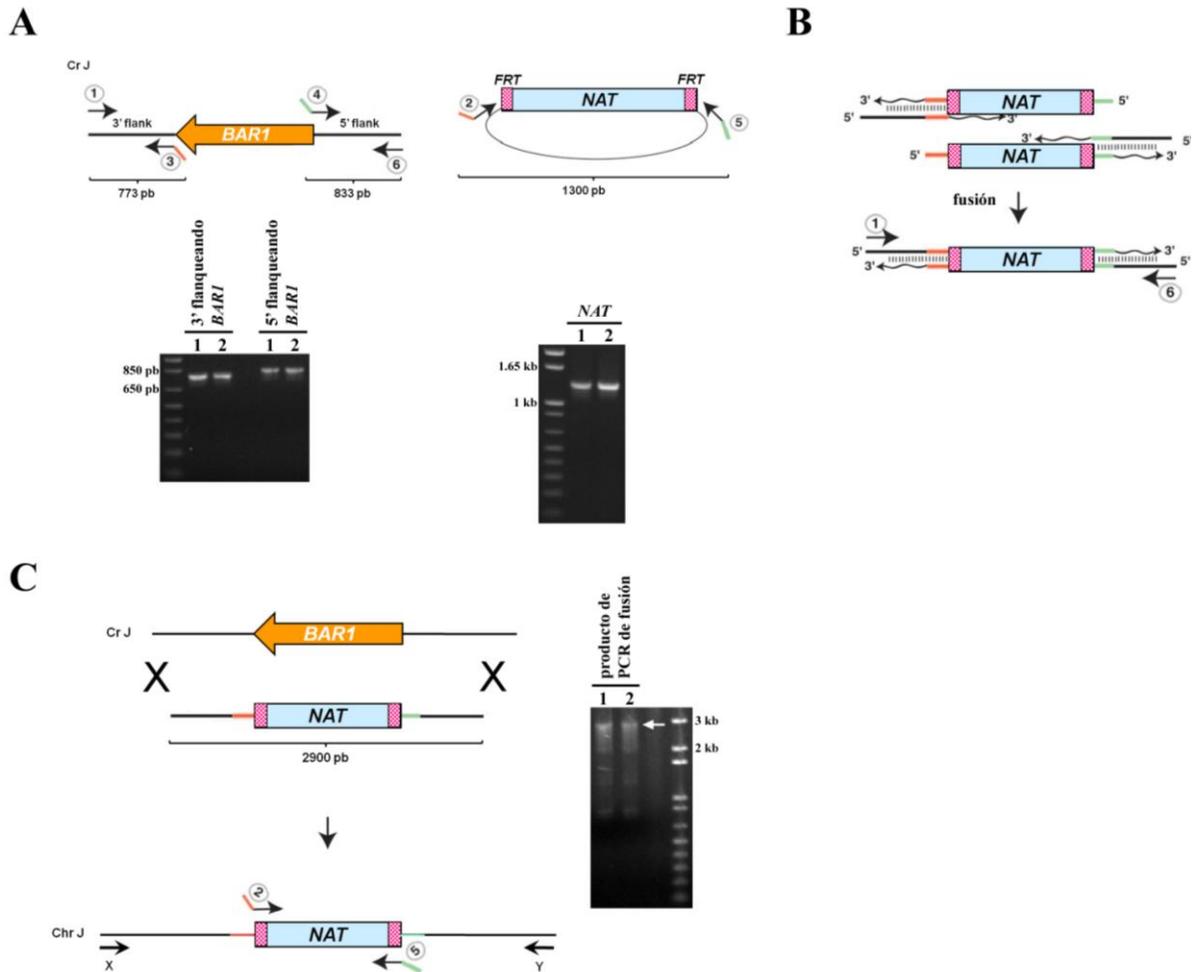


Figura 20. Generación de un producto de PCR de fusión para el remplazo, por eliminación/inserción, del gen *BAR1*. (A) Se amplificaron por PCR las secuencias 5' (producto de 833 pb con la pareja de oligonucleótidos 4 (#679) y 6 (#680), $T_a = 62^\circ\text{C}$) y 3' (producto de 773 pb con la pareja de oligonucleótidos 1 (#677) y 3 (#678), $T_a = 62^\circ\text{C}$) que flanquean el gen *BAR1*. Adicionalmente, se amplificó por PCR el marcador de selección *NAT* que confiere resistencia a noursetricina (producto de 1300 pb con la pareja de oligonucleótidos 2 (#225) y 5 (#227), cuyos extremos son complementarios a los de los oligonucleótidos 3 (#678) y 4 (#679) respectivamente, $T_a = 62^\circ\text{C}$). (B) Posteriormente, se realizó la reacción de PCR de fusión usando como molde las secuencias 5' y 3' que flanquean a *BAR1*, así como el gen *NAT* flanqueado por secuencias *FRT* (EIp1p Recognition Target), para su eliminación posterior (producto de 2900 pb con la pareja de oligonucleótidos 1 (#677) y 6 (#680), $T_a = 62^\circ\text{C}$). (C) El producto de PCR knock out de

BAR1 se transformó en *C. glabrata*, que por doble recombinación homóloga reemplazó *BAR1* endógeno por *NAT*. La integración correcta en el genoma del producto de PCR de fusión se diagnosticó por PCR para determinar: a) la ausencia de *BAR1* (producto de 174 pb con la pareja de oligonucleótidos internos de *BAR1* #683 y #684, $T_a=59^\circ\text{C}$); b) la integración al 5' (producto de 2245 pb con la pareja de oligonucleótidos 2 (#225) y Y (#682), que hibrida río abajo del 5' de *NAT*, fuera del producto de PCR de fusión, $T_a=61^\circ\text{C}$); c) la integración al 3' (producto de 2193 pb con la pareja de oligonucleótidos X (#681) y 5 (#227), que hibrida río arriba del 3' de *NAT*, fuera del producto de PCR de fusión, $T_a=62^\circ\text{C}$); y finalmente, d) se realizó una PCR con la pareja de oligonucleótidos que hibridan en las regiones cromosómicas que flanquean el sitio de integración de *NAT* (producto de 3115 pb con la pareja de oligonucleótidos X (#681) y Y (#682), $T_a=62^\circ\text{C}$).

TABLAS DE LOS DATOS ADICIONALES

Tabla 3. Cepas de *C. glabrata* utilizadas en este trabajo

Cepa	Parental	Genotipo	Referencia
<i>sir2Δ::hph</i>			
CGM612	CGM457	<i>ura3Δ::Tn903 G418^R, sir2Δ::hph Hyg^R</i> (pAP596/ <i>Sac I-Kpn I</i>) Tn7 a 29 pb río arriba del codón de inicio de $\alpha 2$, entre $\alpha 1$ y $\alpha 2$ (inserción 19)	Este trabajo
<i>sir3Δ::hph</i>			
CGM614	CGM457	<i>ura3Δ::Tn903 G418^R, sir3Δ::hph Hyg^R</i> (pIC120/ <i>Kpn I-Hpa I+T4 DNA polimerasa</i>) Tn7 a 29 pb río arriba del codón de inicio de $\alpha 2$, entre $\alpha 1$ y $\alpha 2$ (inserción 19)	Este trabajo
<i>sir4Δ::hph</i>			
CGM616	CGM457	<i>ura3Δ::Tn903 G418^R, sir4Δ::hph Hyg^R</i> (pAP598/ <i>Bsg I</i>) Tn7 a 29 pb río arriba del codón de inicio de $\alpha 2$, entre $\alpha 1$ y $\alpha 2$ (inserción 19)	Este trabajo
<i>hdf1Δ::hph (Ku70p)</i>			
CGM618	CGM457	<i>ura3Δ::Tn903 G418^R, hdf1Δ::hph Hyg^R</i> (pAP611/ <i>Bcg I</i>) Tn7 a 29 pb río arriba del codón de inicio de $\alpha 2$, entre $\alpha 1$ y $\alpha 2$ (inserción 19)	Este trabajo
<i>hdf2Δ::hph (Ku80p)</i>			
CGM620	CGM457	<i>ura3Δ::Tn903 G418^R, hdf2Δ::hph Hyg^R</i> (pAP612/ <i>Bcg I</i>) Tn7 a 29 pb río arriba del codón de inicio de $\alpha 2$, entre $\alpha 1$ y $\alpha 2$ (inserción 19)	Este trabajo
<i>rif1Δ::hph</i>			
CGM622	CGM457	<i>ura3Δ::Tn903 G418^R, rif1Δ::hph Hyg^R</i> (pSP166/ <i>Bsg I</i>) Tn7 a 29 pb río arriba del codón de inicio de $\alpha 2$, entre $\alpha 1$ y $\alpha 2$ (inserción 19)	Este trabajo
<i>rfm1Δ::nat</i>			
CGM1160	CGM454	<i>ura3Δ::Tn903 G418^R, rfm1Δ::nat Nourseothricin^R</i> (hecha con un producto de PCR de fusión <i>5'RFM1::nat::3'RFM1</i>) Tn7 a 643 pb río abajo del codón de paro de $\alpha 1$ (inserción 13)	Este trabajo
CGM1164	CGM458	<i>ura3Δ::Tn903 G418^R, rfm1Δ::nat Nourseothricin^R</i> (hecha con un producto de PCR de fusión <i>5'RFM1::nat::3'RFM1</i>) Tn7 a 147 pb río arriba del codón de inicio de $\alpha 2$ (o 166 pb río arriba del codón de inicio de $\alpha 1$), entre $\alpha 1$ y $\alpha 2$ (inserción 17)	Este trabajo
CGM1162	CGM457	<i>ura3Δ::Tn903 G418^R, rfm1Δ::nat Nourseothricin^R</i> (hecha con un producto de PCR de fusión <i>5'RFM1::nat::3'RFM1</i>)	Este trabajo

		Tn7 a 29 pb río arriba del codón de inicio de $\alpha 2$, entre $\alpha 1$ y $\alpha 2$ (inserción 19)	
CGM1166	CGM697	<i>ura3</i> Δ ::Tn903 G418 ^R , <i>rfm1</i> Δ :: <i>nat</i> Nourseothricin ^R (hecha con un producto de PCR de fusión 5' <i>RFM1</i> :: <i>nat</i> :3' <i>RFM1</i>) Tn7 a 131 pb río abajo del codón de paro de $\alpha 2$, entre $\alpha 2$ y <i>CHA1</i> (inserción 22)	Este trabajo
Cepas con distintas mutaciones			
CGM76	BG14	<i>ura3</i> Δ ::Tn903 G418 ^R , <i>hst1</i> Δ :: <i>hph</i> Hyg ^R (pAP628/ <i>Bse</i> RI- <i>Bgl</i> II- <i>Stu</i> I)	De Las Peñas A., datos no publicados
CGM84	CGM76	<i>ura3</i> Δ ::Tn903 G418 ^R , <i>hst1</i> Δ Hyg ^S (hecha con pMZ18)	De Las Peñas A., datos no publicados
CGM673	BG14	<i>ura3</i> Δ ::Tn903 G418 ^R , <i>sum1</i> Δ :: <i>hph</i> Hyg ^R (hecha con un producto de PCR de fusión 5' <i>SUM1</i> :: <i>hph</i> :3' <i>SUM1</i>)	Gutiérrez-Escobedo M.G., datos no publicados
CGM943	BG14	<i>ura3</i> Δ ::Tn903 G418 ^R , <i>rfm1</i> Δ :: <i>nat</i> Nourseothricin ^R (hecha con un producto de PCR de fusión 5' <i>RFM1</i> :: <i>nat</i> :3' <i>RFM1</i>)	Orta-Zavalza E., datos no publicados
CGM792	CGM710	<i>ura3</i> Δ ::Tn903 G418 ^R , <i>hdf1,2</i> Δ :: <i>hph</i> Hyg ^R (pAJ27/ <i>Bcg</i> I)	Juárez-Reyes A., datos no publicados
CGM1029	CGM792	<i>ura3</i> Δ ::Tn903 G418 ^R , <i>hdf1,2</i> Δ Hyg ^S (hecha con pMZ18)	Juárez-Reyes A., datos no publicados
CGM569	CGM531	<i>ura3</i> Δ ::Tn903 G418 ^R , <i>mtl1</i> Δ :: <i>MTL 1a</i> ^R , <i>mtl2,3</i> Δ Ura ⁺ (pLS5/ <i>Mfe</i> I)	Lavaniegos-Sobrino M.T., datos no publicados
CGM904	CGM569	<i>ura3</i> Δ ::Tn903 G418 ^R , <i>mtl1</i> Δ :: <i>MTL 1a</i> ^R , <i>mtl2,3</i> Δ Ura ⁻ , 5-FOA ^R (resuelta en 5-FOA)	Lavaniegos-Sobrino M.T., datos no publicados
CGM905	CGM569	<i>ura3</i> Δ ::Tn903 G418 ^R , <i>mtl1</i> Δ :: <i>MTL 1a</i> ^R , <i>mtl2,3</i> Δ Ura ⁻ , 5-FOA ^R (resuelta en 5-FOA)	Lavaniegos-Sobrino M.T., datos no publicados
CGM591	CGM531	<i>ura3</i> Δ ::Tn903 G418 ^R , <i>mtl1</i> Δ :: <i>MTL 1a</i> ^R , <i>mtl2,3</i> Δ Ura ⁺ (pLS7/ <i>Mfe</i> I)	Lavaniegos-Sobrino M.T., datos no publicados
CGM707	CGM591	<i>ura3</i> Δ ::Tn903 G418 ^R , <i>mtl1</i> Δ :: <i>MTL 1a</i> ^R , <i>mtl2,3</i> Δ Ura ⁻ (resuelta)	Lavaniegos-Sobrino M.T., datos no publicados
CGM871	CGM531	<i>ura3</i> Δ ::Tn903 G418 ^R , <i>mtl1</i> Δ :: <i>MTL 1a</i> ^{SE} , <i>mtl2,3</i> Δ Ura ⁺ (pTP7/ <i>Mfe</i> I)	Yáñez-Carrillo P., datos no publicados
CGM978	CGM871	<i>ura3</i> Δ ::Tn903 G418 ^R , <i>mtl1</i> Δ :: <i>MTL 1a</i> ^{SE} , <i>mtl2,3</i> Δ Ura ⁻ (resuelta en 5-FOA)	Yáñez-Carrillo P., datos no publicados

CGM22	BG590	<i>ura3Δ::Tn903 G418^R, rap1-21</i>	De Las Peñas A. <i>et al.</i> 2003
CGM19	BG14	<i>ura3Δ::Tn903 G418^R, epa1Δ</i> (del ATG al TAA)	Colección del laboratorio de Brendan P. Cormack
Cepas en las que se remplazaron varias inserciones <i>mtl::URA3</i> por <i>mtlΔ::hph</i>			
CGM1150	CGM533	<i>ura3Δ::Tn903 G418^R, mtl1::URA3</i> por <i>mtl1Δ::hph Ura⁻ Hyg^R</i> (pSD7/Bsg I)	Este trabajo
CGM1151	CGM469	<i>ura3Δ::Tn903 G418^R, mtl1::URA3</i> por <i>mtl1Δ::hph Ura⁻ Hyg^R</i> (pSD7/Bsg I)	Este trabajo
CGM1153	CGM524	<i>ura3Δ::Tn903 G418^R, mtl1::URA3</i> por <i>mtl1Δ::hph Ura⁻ Hyg^R</i> (pSD7/Bsg I)	Este trabajo
CGM1154	CGM426	<i>ura3Δ::Tn903 G418^R, mtl2::URA3</i> por <i>mtl2Δ::hph Ura⁻ Hyg^R</i> (pRZ15/Bsg I)	Este trabajo
CGM1155	CGM432	<i>ura3Δ::Tn903 G418^R, mtl2::URA3</i> por <i>mtl2Δ::hph Ura⁻ Hyg^R</i> (pZR15/Bsg I)	Este trabajo
CGM1157	CGM421	<i>ura3Δ::Tn903 G418^R, mtl2::URA3</i> por <i>mtl2Δ::hph Ura⁻ Hyg^R</i> (pRZ15/Bsg I)	Este trabajo
CGM1159	CGM430	<i>ura3Δ::Tn903 G418^R, mtl3::URA3</i> por <i>mtl3Δ::hph Ura⁻ Hyg^R</i> (pRZ17/Bsg I)	Este trabajo

Tabla 4. Oligonucleótidos utilizados en este trabajo

Oligo	Secuencia (5'-3')	Sitio(s) agregado
Diagnóstico de mutantes por eliminación/inserción de <i>RFM1</i>		
225	CCGCTGCTAGGCGCGCCGTG	
227	GCAGGGATGCGGCCGCTGAC	
488	CAAGACCCACCCAATAAGTG	
491	CAAGACAGCTTCGAAGAACC	
492	AAGACATACACGAACTTTACAGG	
493	GATGCAGATCTTGCTTTCG	
RT-PCR		
36 <i>EPA1</i> Fw	GGGCTCAAAAACAGCTAAAG	
22 <i>EPA1</i> Rv	TAACAGTGTTTTTCGTTTGAT	
40 <i>EPA6</i> Fw	GGGTTCTCAAACAGCTAAGG	
50 <i>EPA6</i> Rv	GACTTAATGCACCATCATTG	
64 <i>EPA7</i> Fw	TACGGAAGAATGGTTCGTAC	
51 <i>EPA7</i> Rv	GCTTGCCGGTAAATGATCT	
215 <i>YPS1</i> Fw	CGTTGCTGATCTCTCCTATGTC	
216 <i>YPS1</i> Rv	CGACTTCCAAAGTGACCGAGTAG	
217 <i>YPS7</i> Fw	CTCCAGCGAGGTTCCGCTGGAGC	
218 <i>YPS7</i> Rv	GGCTGCGCCAGCCCCAGCCCAAG	
211 <i>CCW12</i> Fw	CTCTACTGTCGCTTCCGTCGCTG	
212 <i>CCW12</i> Rv	GGTGACAACGTCGTTGACGGTGAC	
213 <i>PHD1</i> Fw	CCTCCAAACGCGCAACAACATG	

214	<i>PHD1</i> Rv	GACCCCTGTTGATATACAGCGG
Diagnóstico del remplazo de la inserción <i>mtl1::URA3</i> por <i>mtl1Δ::hph</i>		
329	GCTTCTGCAGTATCTACAATAGATAGAAGG	<i>Pst</i> I
Generación por PCR de fusión y diagnóstico de la mutante nula de <i>BAR1</i>		
225	CCGCTGCTAGGCGCGCCGTG	
227	GCAGGGATGCGGCCGCTGAC	
677	GTTTCAAACCTTGAATTAAGTCG	
678	CCACGGCGCGCCTAGCAGCGGGAATTAATTTGATGATTTGTTCC	
679	CGTCAGCGGCCGCATCCCTGCGGTATTCCAACGTCTTTGTAGC	
680	GCTTTGAATTGGCTTGTTTC	
681	GCACCGGAAAGTACGAACTTG	
682	GGTCTGAGTTTGAAGATTCTTG	
683	GCGTAGTGCTGTTGATTTGC	
684	CGGTTTCCCAGAACCTTTG	

DISCUSIÓN

A partir de la década pasada, las enfermedades infecciosas por hongos oportunistas han aumentado por el incremento de la población inmunocomprometida (Butler *et al.*, 2009; Richardson y Lass-Flörl, 2008). Los tres hongos patógenos predominantes en humanos, *Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans* y *Aspergillus fumigatus*, han mantenido la maquinaria para la reproducción sexual, pero limitan su acceso a este proceso (Nielsen y Heitman, 2007). Estudios con cepas de *Saccharomyces cerevisiae*, mostraron que una cepa asexual crece mejor en condiciones constantes, mientras que una sexual predomina en condiciones de estrés (Goddard *et al.*, 2005; Grimberg y Zeyl, 2005).

Los hongos patógenos de humanos limitan su apareamiento en formas únicas. El control estricto del ciclo sexual podría permitir la proliferación de estos patógenos en sus nichos. Sin embargo, en respuesta a condiciones de estrés, como ambientes nuevos, hospederos distintos o cambios en el hospedero, los patógenos podrían intercambiar DNA y generar diversidad genética mediante el apareamiento. Adicionalmente, el intercambio de material genético permitiría la selección de poblaciones mejor adaptadas a nuevas condiciones (Nielsen y Heitman, 2007).

Recientemente se encontró un ciclo sexual críptico en la levadura *C. albicans* (Hull *et al.*, 2000; Magee y Magee, 2000) que requiere primero de homocigosidad en el locus *MTL* y después del cambio morfológico de células blancas a opacas (Miller y Johnson, 2002). Debido a que en *Candida glabrata* no se ha observado apareamiento, se considera que es asexual porque presenta una población principalmente clonal (Brockert *et al.*, 2003), aunque en algunos casos existe evidencia de recombinación (Dodgson *et al.*, 2005).

C. glabrata, como *S. cerevisiae*, contiene tres loci de apareamiento *MTL* (Srikantha *et al.*, 2003): *MTL1a* o α , ortólogo de *MAT*, que se propuso como el único locus *MTL* que se expresa. Por otra parte, se propuso que *MTL2a* y *MTL3a*,

ortólogos a *HMRa* y *HML α* , respectivamente, y ubicados cerca de los telómeros, se mantienen silenciosos. Recientemente se mostró que los genes $\alpha 1$ y $\alpha 2$ de *C. glabrata* se expresan en células *MTL1 α* , pero no en células *MTL1a*, es decir en una forma específica del tipo de apareamiento, lo que contrasta con **a1** que se expresa en ambos tipos de apareamiento (Muller *et al.*, 2008). Adicionalmente, se propuso que la identidad sexual **a** o α de *C. glabrata* podría deberse al procesamiento específico del gen **a1** en las cepas *MTL1a*, pero no en las *MTL1 α* (Muller *et al.*, 2008).

En el laboratorio estamos interesados en estudiar los programas de desarrollo que *C. glabrata* usa para sobrevivir en su hospedero, y en particular, en explorar la posibilidad de la existencia de un ciclo de reproducción sexual en *C. glabrata* bajo condiciones específicas. Como primer paso, el objetivo de este trabajo de tesis fue evaluar la regulación de la actividad transcripcional de las regiones cromosómicas de apareamiento *MTL* de *C. glabrata*. Encontramos que las regiones *MTL1* y *MTL2* son activas para la transcripción, mientras que *MTL3 α* , ortólogo a *HML α* , es el único locus *MTL* silencioso, sin embargo, este silenciamiento no ocurre en todas las células de la población en cultivo. El silenciamiento de la región *MTL3 α* inicia en el telómero, se extiende hasta 11 kb del telómero y depende de las proteínas Sir2 a 4, Ku70, Ku80 y Rif1 (Ramirez-Zavaleta *et al.*, 2010).

MTL3* es el única región *MTL* silenciosa de *C. glabrata

Mediante inserciones del gen reportero *URA3* a lo largo de los loci *MTL*, encontramos que la cromatina del locus *MTL1a*, ortólogo de *MAT*, es transcripcionalmente activa (Figura 1B, Ramirez-Zavaleta *et al.*, 2010). En *S. cerevisiae* las regiones *HMR* y *HML* se mantienen silenciosas debido a que están flanqueadas por los silenciadores *HM-E* y *HM-I* que requieren de las proteínas Abf1, ORC, Rap1 y Sir1 para establecer el silenciamiento. A diferencia del silenciamiento extremadamente eficiente del locus *HMR* de *S. cerevisiae*, encontramos que la cromatina del locus *MTL2a*, es transcripcionalmente activa

(Figura 1C, Ramirez-Zavaleta *et al.*, 2010), lo cual apoya los datos de Muller *et al.*, 2008. Como se mencionó anteriormente, Sir1p participa en el silenciamiento de los loci *HM* de *S. cerevisiae*, por lo que quizás la ausencia de un ortólogo de *SIR1* en *C. glabrata* (Fabre *et al.*, 2005) explique en parte, por qué *MTL2* no se encuentra silencioso.

Para *C. glabrata* está reportado que el silenciamiento subtelomérico de los genes *EPA* puede propagarse a 23.8 kb del telómero (Rosas-Hernandez *et al.*, 2008), y dado que *MTL3* se ubica a 10.5 kb del telómero era probable que este locus estuviera silencioso, como su ortólogo *HML* de *S. cerevisiae*. A diferencia de las regiones *MTL1a* y *MTL2a*, encontramos que la cromatina del locus *MTL3 α* se encuentra en un estado represivo (Figura 1D, Ramirez-Zavaleta *et al.*, 2010), como la de su ortólogo *HML* en *S. cerevisiae*. Bajo las condiciones probadas, no encontramos expresión por RT-PCR de los genes $\alpha1$ y $\alpha2$ ubicados en *MTL3* (Figura 2B, Ramirez-Zavaleta *et al.*, 2010), lo que apoya el silenciamiento de *MTL3*. Adicionalmente, la información presente en cada uno de los otros loci *MTL* no afecta la expresión de $\alpha1$ y $\alpha2$ provenientes de *MTL3* (Figura 2, Ramirez-Zavaleta *et al.*, 2010).

Cabe destacar que el silenciamiento de *MTL3* no es totalmente eficiente, debido a que algunos miembros de la población no muestran silenciamiento de esta región (Figura 1D, Ramirez-Zavaleta *et al.*, 2010 muestra el crecimiento en el medio sin uracilo de un sector de la población), lo que contrasta con *HML* donde toda la población de levaduras mantiene silenciada esta región y no se observa crecimiento en el medio sin uracilo. El hecho de que es posible detectar pequeñas cantidades de transcrito de los genes $\alpha1$ y $\alpha2$ cuando la PCR se realiza a ciclos de saturación (Figura 13B panel inferior, datos adicionales) apoya la conclusión de que el silenciamiento en *MTL3* de *C. glabrata* no es completamente eficiente. Nuevamente, cabe la posibilidad de que el silenciamiento imperfecto de *MTL3* se deba a la ausencia de Sir1p y/o de silenciadores que flanquean el locus *MTL3* como en *S. cerevisiae*.

En nuestro estudio generamos tres inserciones de *URA3* en la región intergénica de $\alpha 1$ y $\alpha 2$: una a 147 nucleótidos del codón de inicio de $\alpha 2$, que presenta un menor grado de silenciamiento y dos a 106 y 29 nucleótidos del codón de inicio de $\alpha 2$, mucho más silenciadas. Debido a que inicialmente evaluamos el efecto de la maquinaria del silenciamiento en la inserción menos silenciada en el promotor, decidimos evaluar la dependencia por estas proteínas en una de las inserciones con mucho mayor grado de silenciamiento en la región promotora. Encontramos que de forma similar al silenciamiento a 147 nucleótidos del codón de inicio de $\alpha 2$, el silenciamiento a 29 nucleótidos del codón de inicio de $\alpha 2$ depende absolutamente de Sir2-4p, Ku70p, Ku80p y Rif1p (Figura 12, datos adicionales).

En *C. glabrata* el transcrito a1 solo se procesa cuando se transcribe a partir de *MTL1* pero no cuando proviene de *MTL2*

Encontramos que la cepa silvestre BG14 expresa tres formas del transcrito de **a1**, presente en *MTL1* y *MTL2*, las cuales son: una forma no procesada, una forma procesada parcialmente y una forma procesada completamente (Figura 2B, Ramirez-Zavaleta *et al.*, 2010). Para determinar sin ambigüedad si la transcripción de **a1** provenía de *MTL1*, de *MTL2* o de ambos loci, evaluamos la transcripción de **a1** en una batería de mutantes nulas sencillas, dobles y triple de los loci *MTL*. Encontramos que el gen **a1** se transcribe de ambos loci, sin embargo, cuando el transcrito proviene de *MTL2* (en las cepas *mtl1* Δ y *mtl1,3* Δ) no se procesa (Figura 2B líneas 2 y 6, Ramirez-Zavaleta *et al.*, 2010). Por el contrario, cuando la expresión de **a1** proviene de *MTL1* (en las cepas *mtl2* Δ y *mtl2,3* Δ), detectamos los transcritos no procesados, procesados parcialmente y en su mayoría el que se procesó completamente (Figura 2B líneas 3 y 7, Ramirez-Zavaleta *et al.*, 2010). Previamente Muller *et al.*, 2008 propusieron que el procesamiento de **a1** en cepas tipo **a**, pero no en las tipo α , era el responsable de mantener identidad sexual **a** o α en *C. glabrata*.

El procesamiento específico de locus de **a1** fue sorprendente debido a que los ORFs de **a1** provenientes de *MTL1* o de *MTL2* son idénticos. Además, las secuencias de 500 pb al 5' que flanquean **a1** en *MTL1* y *MTL2* son idénticas, excepto por dos nucleótidos a -360 y -375 del codón de inicio. De forma similar, las secuencias de 370 pb al 3' que flanquean **a1** en *MTL1* y *MTL2* también son idénticas, aunque río arriba de 500 pb al 5' y río abajo de 370 pb al 3' las secuencias son muy diferentes. Dado lo anterior, cabe la posibilidad de que los dos cambios de nucleótidos al 5', las secuencias diferenciales río arriba de -500 pb y río abajo de +370 pb, separadas o en conjunto; o bien, otros mecanismos aún no identificados permitan detectar el origen del transcrito **a1** para procesarlo solo cuando proviene de *MTL1*. En el laboratorio estamos empezando a evaluar estas posibilidades.

La traducción de transcritos no procesados genera polipéptidos truncos que podrían afectar procesos celulares esenciales. El NMD (Nonsense-Mediated mRNA Decay) es un mecanismo citoplasmático que elimina los transcritos que contienen codones de terminación prematuros (Chanfreau, 2010). Debido a que el primer intrón del gen **a1** contiene dos codones de terminación de la traducción en fase con dos marcos de lectura distintos, la traducción de los transcritos no procesados produciría una proteína no funcional. Sorprendentemente, en los hongos, las secuencias de los intrones reconocidas por el spliceosoma para la edición de los transcritos contienen los codones para la terminación de la traducción (Chanfreau, 2010). Estos datos sugieren que las secuencias para la edición de los transcritos se han seleccionado o han co-evolucionado con la maquinaria de la traducción para incrementar la probabilidad de degradación de los transcritos no procesados por el NMD (Chanfreau, 2010).

C. *glabrata* expresa simultáneamente genes específicos del tipo celular α y α independientemente de la información α o α en los loci *MTL*

A diferencia de *S. cerevisiae* que presenta identidad sexual α o α , *C. glabrata* no parece mostrarla, pues independientemente de la información de los

loci *MTL2* y *MTL3*, del tipo de información **a** o α en *MTL1*, o incluso de la ausencia de cualquier tipo de información, encontramos expresión de tres genes específicos del tipo sexual **a** (**asg**): *STE2*, *MFA1* y *BAR1*, y de dos genes específicos del tipo sexual α (α s_g): *STE3* y *MF(ALPHA)* (Figura 3, Ramirez-Zavaleta *et al.*, 2010). Sorprendentemente, también encontramos expresión de estos **asg** y α s_g en la triple mutante *mtl1,2,3* Δ .

Estos datos debaten la propuesta de que el procesamiento específico de **a1** en las células *MTL1a*, pero no en las *MTL1* α , determina la identidad sexual de *C. glabrata* (Muller *et al.*, 2008), pues tanto nuestra cepa silvestre, que procesa **a1**, como la cepa de referencia secuenciada (CBS138), que no lo procesa, expresan **asg** y α s_g. Los datos anteriores sugieren un comportamiento bisexual de *C. glabrata*, pues no parece regular genes que determinan el tipo sexual **a** o α como lo hace *S. cerevisiae*. *C. albicans* muestra una regulación de genes específicos del tipo **a** diferente a *S. cerevisiae*, pues la expresión de éstos se observa únicamente cuando las células son estimuladas con feromona α (Tsong *et al.*, 2003). Sin embargo, no podemos descartar que diferencias sutiles en la cantidad de transcritos de estos genes específicos de **a** o α , que no se detectan en una RT-PCR semi-cuantitativa, confieran algún tipo de identidad sexual en *C. glabrata*. Adicionalmente, y como se espera en células **a** y α de *S. cerevisiae*, en la cepa silvestre (*MTL1a*), en la batería de mutantes *MTL* y en la cepa CBS138 (*MTL1* α) detectamos la expresión de cuatro genes específicos del estado haploide (hsg): *HO*, *STE12*, *STE20* y *HOG1* (Figura 3, Ramirez-Zavaleta *et al.*, 2010).

En *S. cerevisiae* los promotores de **asg** contienen sitios de unión para los factores de transcripción Mcm1 y α 2. En *C. glabrata*, los promotores de *MFA1* y *BAR1*, dos **asg** en *S. cerevisiae*, contienen posibles secuencias de reconocimiento de Mcm1p y α 2. El promotor de *STE2* contiene esos sitios de unión, aunque menos conservados y su espaciamiento es diferente al mostrado en *S. cerevisiae* (datos no mostrados) (Tsong *et al.*, 2006). Similar a los promotores de α s_g de *S. cerevisiae* con sitios de unión a Mcm1p y α 1, el promotor del gen *STE3* contiene posibles sitios de reconocimiento de estos factores de transcripción, no así el

promotor de *MF(ALPHA)* de *C. glabrata*, un α sg de *S. cerevisiae* (datos no mostrados).

Por otra parte, en *S. cerevisiae* los genes reprimidos por el heterodímero **a1- α 2** son un subgrupo de hsg. De los cuatro hsg que evaluamos su transcripción, únicamente el promotor de *HO* contiene la secuencia de unión del complejo represor **a1- α 2**. Cabe resaltar que se desconoce si las proteínas **a1**, α 1 y α 2 son funcionales en *C. glabrata*, y también es posible que controlen genes diferentes a los **asg**, α sg y hsg. Datos adicionales indican que en comparación con *S. cerevisiae*, *C. glabrata* ha reorganizado claramente el circuito regulador de los genes α sg, debido a que nuestra cepa silvestre BG14 tipo **a**, expresa α sg aún en presencia de Sum1p, que reprime estos genes en *S. cerevisiae* (Figura 3, Ramirez-Zavaleta *et al.*, 2010 y Figura 15, datos adicionales). Igualmente, la cepa CBS138 tipo α transcribe **asg** sin importar la presencia del represor α 2 (Figura 3, Ramirez-Zavaleta *et al.*, 2010).

El silenciamiento de *MTL3 α* depende de Rap1p, Sir2 a 4p, Ku70p, Ku80p y Rif1p

El locus *MTL3 α* es la única región *MTL* silenciosa que *C. glabrata* posee. Al eliminar algunos de los genes cuyos productos silencian genes subteloméricos de *S. cerevisiae* y *C. glabrata*, o bien, que silencian los loci *HM* de *S. cerevisiae*, encontramos que la cromatina represiva a lo largo de *MTL3* también depende de las proteínas Sir2, Sir3 y Sir4 (Figuras 4A, 4B y 4C, Ramirez-Zavaleta *et al.*, 2010).

En *S. cerevisiae*, las proteínas Abf1, ORC, Rap1 y Sir1 a 4, pero no las proteínas Ku ni Rif1, silencian eficientemente los loci *HM* (revisado por Rusche *et al.*, 2003). No obstante, recientemente se reportó un papel menor y redundante con Sir1p de las proteínas Ku70 y Ku80 en el silenciamiento de ambos loci *HM* de *S. cerevisiae* (Patterson y Fox, 2008; Vandre *et al.*, 2008). En contraste con *S. cerevisiae*, el silenciamiento de la región *MTL3* de *C. glabrata* requiere absolutamente de las proteínas Ku70 y Ku80. El papel tan notable de las proteínas

Ku para silenciar *MTL3* quizás se deba también en parte a la falta de Sir1p en *C. glabrata* (Figuras 4A, 4B y 4C, Ramirez-Zavaleta *et al.*, 2010).

En *S. cerevisiae* la proteína Rif1 compite con Sir3p y Sir4p por su unión a Rap1p. Mutantes *rif1* Δ de *S. cerevisiae* incrementan el silenciamiento en regiones subteloómicas pero muestran una disminución ligera en el silenciamiento de los loci *HM* posiblemente por el reclutamiento de Sir2 a 4p a los telómeros más largos que resultan por la ausencia de Rif1p (Hardy *et al.*, 1992; Wotton y Shore, 1997). Adicionalmente, la participación de Rif1p en el silenciamiento del locus *HMR* solamente se ha observado en una variante que contiene un silenciador *hmr* Δ A mutante débil (Hardy *et al.*, 1992; Wotton y Shore, 1997). En cambio, *C. glabrata* requiere absolutamente de Rif1p para silenciar el locus *MTL3* (Figuras 4A, 4B y 4C, Ramirez-Zavaleta *et al.*, 2010), lo que indica que el mecanismo de silenciamiento de los loci silenciosos es diferente en *C. glabrata* y *S. cerevisiae*.

Adicionalmente, la ausencia de las proteínas que participan en el silenciamiento de *MTL3* además de causar la expresión del reportero *URA3*, permite que los genes $\alpha 1$ y $\alpha 2$ se expresen. A pesar de que nuestros análisis de expresión génica no fueron cuantitativos, la ausencia de las proteínas Sir2, Sir3 y Sir4 causa una expresión detectable de los genes α , y la falta de Ku70p, Ku80p o Rif1p ocasiona una mayor expresión relativa de $\alpha 1$ y $\alpha 2$ (Figura 4D, Ramirez-Zavaleta *et al.*, 2010).

El silenciamiento de *MTL3* α inicia en el telómero del cromosoma B

Los loci *HM* de *S. cerevisiae* están flanqueados por dos silenciadores, *HM-E* y *HM-I*, que reclutan a las proteínas Abf1, ORC y Rap1 (revisado por Rusche *et al.*, 2003). *C. glabrata* carece de los silenciadores *E* e *I*, sin embargo, contiene dos sitios de unión de la proteína Abf1 que flanquean los genes $\alpha 1$ y $\alpha 2$ así como dos sitios de reconocimiento de ORC río abajo de $\alpha 1$ (Figura 14, datos adicionales). Dado que el locus *MTL3* de *C. glabrata* se ubica a 10.5 kb del telómero, una distancia a la que se podría propagar el silenciamiento, nos propusimos evaluar si

el silenciamiento de *MTL3* iniciaba en el telómero, como en el caso de los genes *EPA*, o en secuencias en cis contenidas en *MTL3*, como en los loci *HM*.

Al trasladar el locus *MTL3*, que contiene los sitios de unión de Abf1 y ORC y el gen *URA3* al cromosoma L, en un sitio ubicado en una región larga entre dos genes no esenciales y no sujeta a silenciamiento (Juárez-Reyes *et al.*, datos no publicados), encontramos que el silenciamiento de *MTL3* se pierde (en este lugar se expresan tanto el reportero *URA3* como los genes $\alpha 1$ y $\alpha 2$) (Figura 5, Ramirez-Zavaleta *et al.*, 2010). Estos datos indican que el silenciamiento de *MTL3 α* se inicia y propaga a partir del telómero del cromosoma B.

El gen *tRNA^{Thr}* ubicado en el lado proximal al telómero de *HMR* (Figura 10) es un elemento frontera bien estudiado que limita la propagación de la cromatina silenciosa, y se piensa que el ensamblaje del complejo de transcripción de la polimerasa III bloquea esta propagación (Donze y Kamakaka, 2001). Es interesante que a pesar de que *C. glabrata* contiene un gen *tRNA^{Leu}* entre el telómero del cromosoma B y el locus *MTL3* (Figura 10), el silenciamiento aún puede propagarse.

En *S. cerevisiae* y *C. glabrata* Rap1p participa en el silenciamiento de genes subteloméricos (Castano *et al.*, 2005; De Las Penas *et al.*, 2003; Rusche *et al.*, 2003). Además, está demostrado que Rap1p se une a secuencias repetidas en los telómeros de *S. cerevisiae* para iniciar el silenciamiento de genes cercanos a los telómeros (revisado por Rusche *et al.*, 2003). Debido a que el silenciamiento de *MTL3* se origina en el telómero, pensamos que Rap1 tendría algún efecto en este mecanismo de represión. Encontramos que a diferencia de la cepa silvestre, la ausencia de Rap1 permite la expresión de los genes $\alpha 1$ y $\alpha 2$ (Figura 16A, datos adicionales).

Adicionalmente, encontramos que a diferencia de la cepa silvestre, los genes $\alpha 1$ y $\alpha 2$ se expresan en la doble mutante nula *hdf1,2 Δ* (Figura 13B, datos adicionales), como sucede en las mutantes nulas sencillas *hdf1 Δ* y *hdf2 Δ* (Figura 4D, Ramirez-Zavaleta *et al.*, 2010). Estos datos sugieren que similar a *S.*

cerevisiae, las proteínas Ku70 y Ku80 de *C. glabrata* funcionan como un complejo para silenciar los genes α .

Además del silenciamiento subtelomérico *MTL3* se reprime por un mecanismo específico de promotor

Contrario a la falta de expresión de los genes α_1 y α_2 en la cepa silvestre, al eliminar completamente el gen *SIR2*, detectamos una expresión modesta de ambos genes α (Figura 4D, Ramirez-Zavaleta *et al.*, 2010), lo que podría sugerir que otra desacetilasa de histonas, distinta de Sir2p, silencia el locus *MTL3*. En *S. cerevisiae* se conocen bien las funciones de Sir2p y su proteína paróloga Hst1p. Sir2p interactúa con Sir3p y Sir4p para propagarse y silenciar regiones cromosómicas grandes, tales como regiones cercanas a los telómeros y los loci *HM* (revisado por Rusche *et al.*, 2003). A diferencia de Sir2p, Hst1p no se propaga, sino que se asocia con las proteínas Sum1 y Rfm1 para reprimir genes específicos (McCord *et al.*, 2003) como los involucrados en la esporulación, biosíntesis de NAD⁺ y α sg (Bedalov *et al.*, 2003; McCord *et al.*, 2003; Xie *et al.*, 1999; Zill y Rine, 2008).

Datos de nuestro laboratorio muestran que la cepa *hst1* Δ de *C. glabrata* crece más lento que la cepa silvestre en medio rico, un fenotipo que también se observa en el tamaño de las colonias de la mutante nula, que son más pequeñas que las de la cepa silvestre (Figura 13A, datos adicionales). De manera similar a las colonias de la cepa *hst1* Δ , las colonias de las mutantes nulas *sum1* Δ y *rfm1* Δ son más pequeñas que la cepa silvestre, lo que apoya la idea de que Hst1p, Sum1p y Rfm1p forman parte del mismo complejo, cuya ausencia afecta el tamaño de la colonia (Figura 13A, datos adicionales).

Encontramos, mediante RT-PCR, que Hst1p, Sum1p y Rfm1p reprimen la expresión de los genes α_1 y α_2 ubicados en *MTL3* (Figura 13B, datos adicionales). Sin embargo, cuando eliminamos completamente *RFM1* en cuatro cepas reporteras de *URA3*, encontramos que el silenciamiento de *MTL3* se afecta modestamente solo en la cepa que tiene la inserción de *URA3* a 12.23 kb del

telómero (la inserción más alejada del telómero) (Figura 13C, datos adicionales). Cabe destacar que los genes α se expresan más en ausencia de Sum1p, que de Hst1p y de Rfm1, lo que sugiere que Sum1p podría reclutar otros represores de la transcripción. Estos datos indican que aunque las proteínas Hst1, Sum1 y Rfm1 reprimen los genes $\alpha 1$ y $\alpha 2$ de *MTL3*, el silenciamiento que viene del telómero es el principal mecanismo represor de estos genes α . Como perspectiva analizaremos el silenciamiento de *MTL3* en cepas *hst1* Δ y *sum1* Δ que contengan las mismas inserciones de *URA3* que en *rfm1* Δ .

En apoyo a la represión por Sum1p de $\alpha 1$ y $\alpha 2$, encontramos dos posibles sitios de reconocimiento de Sum1p en *MTL3*, uno río abajo de $\alpha 1$ y otro en el promotor de $\alpha 1$ y $\alpha 2$ (Figura 14, datos adicionales). Adicionalmente, a diferencia de las células **a** de *S. cerevisiae* cuyos α sg están co reprimidos por Sum1p y Mcm1, nuestra cepa silvestre tipo **a** expresa *STE3* y *MF(ALPHA)*, dos α sg en *S. cerevisiae*, aún en presencia de Sum1p (Figura 15, datos adicionales). La falta de Sum1p no afectó la expresión de **asg** ni la de α sg. Estos datos sugieren una vez más que el circuito que controla la expresión de genes del tipo de apareamiento se ha reorganizado en *C. glabrata*.

La información de los loci *MTL* no afecta la expresión de los genes relacionados con la virulencia de *C. glabrata*

C. albicans es, en términos de patogenicidad, similar a *C. glabrata* respecto al nicho que colonizan y algunos datos sugieren que la vía de feromonas de apareamiento podría regular genes de virulencia en *C. albicans*. Células homocigotas **a/a** opacas de *C. albicans* responden a la feromona α sobre expresando 62 genes, de los cuales siete codifican para proteínas secretadas y adhesinas de pared celular implicadas en la virulencia de *C. albicans* en un modelo murino de candidosis diseminada (Figura 4) (Bennett *et al.*, 2003).

La adherencia *in vitro* de *C. glabrata* a células epiteliales humanas depende principalmente de la adhesina Epa1, que reconoce gluco-conjugados con N-acetil lactosamina del hospedero (Cormack y Falkow, 1999). Epa1p pertenece al grupo

de proteínas de pared celular que contienen sitio de ancla de glucosilfosfatidilinositol (GPI-CWPs, por sus siglas en inglés), y que se encuentran en varios hongos (Brul *et al.*, 1997; Kapteyn *et al.*, 2000; Klis *et al.*, 2001). No obstante, aunque *EPA1* es responsable de la adherencia *in vitro*, su ausencia no afecta la virulencia de *C. glabrata* en ratones (Cormack *et al.*, 1999). Por otra parte, a diferencia de la cepa silvestre, las cepas *sir3Δ* y *rif1Δ* inducen la expresión de los genes *EPA1*, *EPA6* y *EPA7*, responsables de la hiper adherencia de estas mutantes (Castano *et al.*, 2005). Adicionalmente, una cepa que carece de *EPA1*, 6 y 7, que se inducen en la orina, no coloniza eficientemente el riñón y la vejiga de ratones infectados en vías urinarias (Domergue *et al.*, 2005).

Como sucedió en el caso de los genes $\alpha 1$, $\alpha 2$, *asg*, *αsg* y *hsg*, la información de los loci *MTL* no afecta la expresión de los genes *EPA1*, 6 y 7, relacionados con la virulencia de *C. glabrata* (Figura 17, datos adicionales), no obstante, evaluamos el efecto de la información *MTL* en la transcripción de otros genes relacionados con virulencia.

Las yapsinas de *S. cerevisiae* son una familia de cinco aspartil proteasas unidas a GPI (Yps1-3p, Yps6p y Yps7p). Los genes que codifican yapsinas se inducen durante la remodelación de la pared celular (Krysan *et al.*, 2005). En *C. albicans* la ausencia de las proteasas Sap9 y Sap10, relacionadas a las yapsinas, disminuye su adherencia a células epiteliales (Albrecht *et al.*, 2006). Adicionalmente, recientemente se reportó en *C. glabrata* que Yps1p y Yps7p se requieren para mantener la integridad de la pared celular, la adhesión a células de mamíferos, la supervivencia en los macrófagos y la colonización de riñón, hígado y bazo de ratones (Kaur *et al.*, 2007). No obstante, la información contenida en las regiones *MTL* tampoco afectó la expresión de los genes *YPS1* y *YPS7* (Figura 17, datos adicionales).

El gen *CCW12*, codifica una manoproteína de pared celular involucrada en la aglutinación de *S. cerevisiae*. *CCW12* se expresa únicamente en células haploides de *S. cerevisiae*, debido a que en las diploides está reprimido por el complejo $\alpha 1$ - $\alpha 2$ (Galgoczy *et al.*, 2004). Mutantes *ccw12Δ* de *S. cerevisiae* son

muy sensibles a blanco de Calcoflúor y rojo Congo (dos agentes que alteran la integridad de la pared celular), reducen su eficiencia de apareamiento y la aglutinación (Mrsa *et al.*, 1999). Adicionalmente, células que expresan *FLO1*, similar a *CCW12*, floculan formando agregados similares a bio-películas y son más resistentes a ciclos de congelación y descongelación, choque por calor, estrés oxidativo y anfotericina B (Smukalla *et al.*, 2008).

La familia de genes *FLO*, que codifican adhesinas GPI-CWPs de *S. cerevisiae*, está formada por *FLO1*, 5, 9, 10 y 11. *FLO1*, 5, 9 y 10 son subteloméricas y codifican lectinas que se unen a residuos de manosa en la pared celular de otras levaduras, lo que causa su floculación (Guo *et al.*, 2000; Teunissen y Steensma, 1995). *FLO11* participa la formación de pseudo hifas (Lambrechts *et al.*, 1996; Lo y Dranginis, 1998), y en la floculación dependiente de Ca^{2+} (Guo *et al.*, 2000; Lo y Dranginis, 1996). Además, *FLO10* y 11 promueven la formación de bio películas (Guo *et al.*, 2000; Reynolds y Fink, 2001). Por su parte, *FLO11* está regulado por la proteína Phd1 (Gimeno y Fink, 1994; Pan y Heitman, 2000). En *C. albicans* Efg1p, un ortólogo de Phd1p que se activa por la vía AMPc/PKA, induce la transcripción de la adhesina GPI-CWPs *ALS1* (Braun y Johnson, 2000; Fu *et al.*, 2002) y posiblemente de *ALS3* (Leng *et al.*, 2001).

Encontramos de nuevo que la información contenida en *MTL* no afecta la expresión de los genes *CCW12* y *PHD1*, relacionados con floculación en *S. cerevisiae* y virulencia de *C. albicans* (Figura 17, datos adicionales). Sin embargo, estos datos no descartan que en *C. glabrata*, la expresión de éstos y otros genes relacionados con virulencia esté afectada por genes de la vía de respuesta a feromonas como en *C. albicans*. De forma similar, encontramos que la información de los loci *MTL* no determina la adherencia de *C. glabrata* a células HeLa (Figura 17, datos adicionales). Estudios a futuro de la regulación de los genes específicos del tipo sexual, como los de la vía de feromonas, podrían revelar un circuito regulador diferente en *C. glabrata*, y/o bien revelar si la limitación del acceso al apareamiento le ayuda para sobrevivir como comensal o como patógeno en su hospedero mamífero.

Cepas con un solo locus *MTL1a* o *MTL1 α* y una cepa sobre expresante de *a* transcriben correctamente la información del tipo de apareamiento

Con el objeto de construir cepas que se utilizarán para buscar condiciones de apareamiento en *C. glabrata*, en el laboratorio se generaron a partir de la triple mutante *mtl1,2,3 Δ* , dos cepas a las que se les reconstituyó la información **a** o α en el locus *MTL1* (Lavaniegos-Sobrino M.T., datos no publicados), de manera que expresen un solo tipo de información. Adicionalmente, se construyó una cepa en la que la transcripción del gen **a1** está controlada por un promotor fuerte (Yáñez-Carrillo P., datos no publicados). Por medio de RT-PCR, determinamos que la cepa a la que se le reconstituyó la información **a** en *MTL1* expresa las tres formas del transcrito de **a1** (Figura 16B, datos adicionales). Por su parte, la cepa a la que se le reconstituyó la información α en *MTL1*, que no es sujeto a silenciamiento, expresa los genes $\alpha1$ y $\alpha2$ (Figura 13B, datos adicionales). Finalmente, comparada con la cepa silvestre, la cepa diseñada para expresar una mayor cantidad del transcrito de **a1** transcribe en mayor cantidad este gen (Figura 16B, datos adicionales).

Generación de la cepa *bar1 Δ*

Células **a** de *S. cerevisiae* y *C. albicans* producen Bar1p, que degrada extracelularmente la pequeña cantidad de feromona α que producen las células **a**. Recientemente en *C. albicans* se reportó reproducción sexual entre células con el mismo tipo de apareamiento (homosexual) (Alby *et al.*, 2009). Poblaciones unisexuales de células **a** que carecen de Bar1p se auto estimulan por feromona α y se aparean, lo que hace pensar en la posibilidad de que ciertas señales en el hospedero repriman la actividad de Bar1p para favorecer la reproducción homosexual solo en condiciones muy particulares. Adicionalmente, se ha mostrado que el apareamiento entre células **a** se produce en poblaciones mixtas de células **a** y α , en las que un número limitado de células α secretan feromona α (Alby *et al.*, 2009).

Además de *C. albicans*, otros hongos patógenos de humano presentan reproducción homosexual. Tanto en la naturaleza como en el laboratorio, se ha observado apareamiento entre células tipo α de *C. neoformans* y se piensa que es el modo principal de apareamiento en este hongo (Bui *et al.*, 2008; Fraser *et al.*, 2005; Lin *et al.*, 2005). *Pneumocystis carinii* es otro hongo patógeno en el que se ha propuesto la reproducción homosexual (Smulian *et al.*, 2001). Estos datos indican que la reproducción homosexual es una característica que comparten varios hongos patógenos, que podrían haber evolucionado sus programas de apareamiento para apoyar su supervivencia y propagación.

Nos preguntamos si en *C. glabrata* la eliminación del gen *BAR1* puede resultar en reproducción homosexual. Por esta razón decidimos eliminar por doble recombinación homóloga el gen *BAR1* (Figura 20, datos adicionales), con un producto de PCR de fusión. Trabajo a futuro en el laboratorio estudiará el papel de Bar1p en la respuesta a feromona α o a otro tipo de señales en *C. glabrata*, o bien, en un posible ciclo de reproducción sexual.

CONCLUSIONES Y APORTACIONES DEL TRABAJO

No obstante su cercanía filogenética, *C. glabrata* presenta una regulación de la transcripción de los loci de apareamiento *MTL2* y *MTL3* distinta a la de sus ortólogos *HMR* y *HML* de *S. cerevisiae*. A diferencia del locus *HMR* que se mantiene silencioso, la cromatina del locus *MTL2* no se encuentra silenciosa. Contrario a *MTL2*, y a diferencia del silenciamiento eficiente de *HML*, la cromatina del locus *MTL3* presenta un silenciamiento imperfecto. Encontramos que el locus *MTL3* se reprime principalmente por silenciamiento subtelomérico que depende notablemente de las proteínas Ku70, Ku80 y Rif1, aunque también se reprime por un mecanismo específico de promotor. Estos resultados muestran diferencias importantes entre *C. glabrata* y *S. cerevisiae* para reclutar maquinaria de silenciamiento a sus respectivos loci de apareamiento.

Otra diferencia importante con respecto a *S. cerevisiae* y *C. albicans* es que *C. glabrata* parece no mostrar identidad celular \mathbf{a} o α , pues independientemente de la información \mathbf{a} o α presente en *MTL1*, *C. glabrata* expresa \mathbf{asg} y $\alpha\mathbf{sg}$. Estos datos sugieren que *C. glabrata* ha reorganizado el circuito que controla la expresión de genes que determinan el tipo sexual, lo que podría explicar en parte por qué *C. glabrata* no se aparea. Adicionalmente, encontramos que la información contenida en los loci *MTL* no determina la adherencia *in vitro* de *C. glabrata* a células HeLa ni la expresión de genes relacionados con la virulencia.

Nuestros resultados destacan diferencias importantes entre *C. glabrata* y *S. cerevisiae*, dos levaduras relacionadas filogenéticamente, para regular genes de apareamiento, pero también muestran diferencias entre *C. glabrata* y *C. albicans*, dos levaduras oportunistas, para regular genes que confieren identidad sexual. Nuestros datos aportan nuevos mecanismos de control de genes de apareamiento en un hongo patógeno asexual, que si bien no participan en un ciclo sexual de *C. glabrata*, podrían apoyar su supervivencia como comensal o como patógeno.

PARTICIPACIÓN EN OTROS TRABAJOS

Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Vol. 104(5): 775-782, August 2009 775

Genotyping of the *MTL* loci and susceptibility to two antifungal agents of *Candida glabrata* clinical isolates

María Teresa Lavaniegos-Sobrino¹, Candy Y Ramírez-Zavaleta¹, Alfredo Ponce de León², José Sifuentes-Osornio², Miriam Bobadilla-Del Valle², Andrea Rangel-Cordero², Alejandro De Las Peñas¹, Irene Castaño¹†

¹División de Biología Molecular, Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, Camino a la Presa San José 2055, Lomas 4^a sección, 78216 San Luis Potosí, México ²Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán, México DF, México

The opportunistic fungal pathogen Candida glabrata is the second most common isolate from bloodstream infections worldwide and is naturally less susceptible to the antifungal drug fluconazole than other Candida species. C. glabrata is a haploid yeast that contains three mating-type like loci (MTL), although no sexual cycle has been described. Strains containing both types of mating information at the MTL1 locus are found in clinical isolates, but it is thought that strains containing type a information are more common. Here we investigated if a particular combination of mating type information at each MTL locus is more prevalent in clinical isolates from hospitalized patients in Mexico and if there is a correlation between mating information and resistance to fluconazole and 5-fluorocytosine. We found that while both types of information at MTL1 are equally represented in a collection of 64 clinical isolates, the vast majority of isolates contain a-type information at MTL2 and α -type at MTL3. We also found no correlation of the particular combination of mating type information at the three MTL loci and resistance to fluconazole.

Key words: *Candida glabrata* - mating type loci - *MTL* - clinical isolate - fluconazole - 5-fluorocytosine

Candida species are successful as both commensal and opportunistic fungal pathogens, accounting for 12% of all bloodstream infections worldwide (Trick et al. 2002, Richardson 2005, Pfaller & Diekema 2007). *Candida glabrata* is a haploid budding yeast that has only one known niche, the mammalian host and has recently emerged as a common opportunistic pathogen. In fact, *C. glabrata* is now the second most common *Candida* species isolated from bloodstream infections (Jarvis 1995, Nguyen et al. 1996) and most clinical isolates are innately less susceptible to antifungal treatment with azole compounds than other *Candida* species (Pfaller & Diekema 2004, Richter et al. 2005, Messer et al. 2006, Gonzalez et al. 2008, Manzano-Gayosso et al. 2008). Phylogenetically, *C. glabrata* is closely related to *Saccharomyces cerevisiae* and close homologues of approximately 90% of *S. cerevisiae* genes can be found in the *C. glabrata* genome (Byrne & Wolfe 2005).

Until recently, both *Candida albicans* and *C. glabrata* had been considered "asexual" since no mating or sexual forms had been documented. In the budding yeast *S. cerevisiae*, sexual reproduction is controlled by genes at the mating-type locus (*MAT*), which encodes transcription factor proteins that control the sexual cycle and possibly other

processes (Herskowitz et al. 1992, Bahn et al. 2007). The discovery in *C. albicans* of various homologues of genes known to be important for mating in the related yeast *S. cerevisiae*, including a mating type-like locus (*MTL*), led to the discovery of a cryptic sexual phase in *C. albicans* (Hull & Johnson 1999, Hull et al. 2000, Magee & Magee 2000). This and subsequent work suggested that mating in *C. albicans* is regulated by unusual mechanisms that might be important for its survival in the host (Johnson 2003).

C. glabrata has also been considered an asexual organism because it has no known sexual cycle and it has a predominantly clonal population (Dodgson et al. 2005). It was recently discovered however, that *C. glabrata*, like *S. cerevisiae*, contains three *MTL* loci (*MTL1*, *MTL2* and *MTL3*) (Srikantha et al. 2003), as well as the vast majority of genes involved in mating, sporulation and meiosis (Wong et al. 2003). It was reported that *MTL2* and *MTL3* appear to contain silent information (most frequently a and α information respectively) and *MTL1* is thought to be the expression locus and can contain either type of information (Srikantha et al. 2003). More recently it was discovered that the information present at *MTL2* is not completely silenced. *C. glabrata* cells however, are able to maintain cell type identity through differential regulation of expression of the α genes and differential splicing of the $\alpha 1$ gene transcript (Muller et al. 2008). The clinical isolates characterized in the previous studies identified five different classes according to the information in each *MTL* locus with more strains containing a-type information at *MTL1* although both types were found (Srikantha et al. 2003). More recently, in a worldwide collection of 198 clinical isolates, it was found that the majority of strains contained type a information at *MTL1* (Brisse et al. 2009).

Financial support: CONACyT [MTLS (211756), CYR-Z (164574)], Fondos Sectoriales-Salud-CONACyT [APN (13927), ICN (CB-2005-48304)]

† Corresponding author: icastano@ipicyt.edu.mx

Received 10 August 2008

Accepted 24 April 2009

REFERENCIAS

- Aerts, S., Thijs, G., Coessens, B., Staes, M., Moreau, Y., and De Moor, B. (2003). Toucan: deciphering the cis-regulatory logic of coregulated genes. *Nucleic Acids Res* 31, 1753-1764.
- Albrecht, A., Felk, A., Pichova, I., Naglik, J. R., Schaller, M., de Groot, P., Maccallum, D., Odds, F. C., Schafer, W., Klis, F., *et al.* (2006). Glycosylphosphatidylinositol-anchored proteases of *Candida albicans* target proteins necessary for both cellular processes and host-pathogen interactions. *J Biol Chem* 281, 688-694.
- Alby, K., Schaefer, D., and Bennett, R. J. (2009). Homothallic and heterothallic mating in the opportunistic pathogen *Candida albicans*. *Nature* 460, 890-893.
- Aparicio, O. M., Billington, B. L., and Gottschling, D. E. (1991). Modifiers of position effect are shared between telomeric and silent mating-type loci in *S. cerevisiae*. *Cell* 66, 1279-1287.
- Bedalov, A., Hirao, M., Posakony, J., Nelson, M., and Simon, J. A. (2003). NAD⁺-dependent deacetylase Hst1p controls biosynthesis and cellular NAD⁺ levels in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* 23, 7044-7054.
- Bennett, R. J., and Johnson, A. D. (2005). Mating in *Candida albicans* and the search for a sexual cycle. *Annu Rev Microbiol* 59, 233-255.
- Bennett, R. J., Uhl, M. A., Miller, M. G., and Johnson, A. D. (2003). Identification and characterization of a *Candida albicans* mating pheromone. *Mol Cell Biol* 23, 8189-8201.
- 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.
- Braun, B. R., and Johnson, A. D. (2000). TUP1, CPH1 and EFG1 make independent contributions to filamentation in *Candida albicans*. *Genetics* 155, 57-67.
- Brockert, P. J., Lachke, S. A., Srikantha, T., Pujol, C., Galask, R., and Soll, D. R. (2003). Phenotypic switching and mating type switching of *Candida glabrata* at sites of colonization. *Infect Immun* 71, 7109-7118.
- Bruhn, L., and Sprague, G. F., Jr. (1994). MCM1 point mutants deficient in expression of alpha-specific genes: residues important for interaction with alpha 1. *Mol Cell Biol* 14, 2534-2544.
- Brul, S., King, A., van der Vaart, J. M., Chapman, J., Klis, F., and Verrrips, C. T. (1997). The incorporation of mannoproteins in the cell wall of *S. cerevisiae* and filamentous Ascomycetes. *Antonie Van Leeuwenhoek* 72, 229-237.
- Bui, T., Lin, X., Malik, R., Heitman, J., and Carter, D. (2008). Isolates of *Cryptococcus neoformans* from infected animals reveal genetic exchange in unisexual, alpha mating type populations. *Eukaryot Cell* 7, 1771-1780.
- Butler, G. Fungal sex and pathogenesis. *Clin Microbiol Rev* 23, 140-159.
- Butler, G., Kenny, C., Fagan, A., Kurischko, C., Gaillardin, C., and Wolfe, K. H. (2004). Evolution of the MAT locus and its Ho endonuclease in yeast species. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 1632-1637.
- Butler, G., Rasmussen, M. D., Lin, M. F., Santos, M. A., Sakthikumar, S., Munro, C. A., Rheinbay, E., Grabherr, M., Forche, A., Reedy, J. L., *et al.* (2009). Evolution of pathogenicity and sexual reproduction in eight *Candida* genomes. *Nature* 459, 657-662.

- Calcagno, A. M., Bignell, E., Warn, P., Jones, M. D., Denning, D. W., Muhlschlegel, F. A., Rogers, T. R., and Haynes, K. (2003). *Candida glabrata* STE12 is required for wild-type levels of virulence and nitrogen starvation induced filamentation. *Mol Microbiol* 50, 1309-1318.
- Castano, I., Cormack, B., and De Las Penas, A. (2006). [Virulence of the opportunistic pathogen mushroom *Candida glabrata*]. *Rev Latinoam Microbiol* 48, 66-69.
- Castano, I., Kaur, R., Pan, S., Cregg, R., Penas Ade, L., 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.
- Chanfreau, G. F. A dual role for RNA splicing signals. *EMBO Rep* 11, 720-721.
- Chen, J., Lane, S., and Liu, H. (2002). A conserved mitogen-activated protein kinase pathway is required for mating in *Candida albicans*. *Mol Microbiol* 46, 1335-1344.
- Conrad, M. N., Wright, J. H., Wolf, A. J., and Zakian, V. A. (1990). RAP1 protein interacts with yeast telomeres in vivo: overproduction alters telomere structure and decreases chromosome stability. *Cell* 63, 739-750.
- 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.
- Csank, C., and Haynes, K. (2000) *Candida glabrata* displays pseudohyphal growth.
- 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.
- 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.
- Delneri, D., Colson, I., Grammenoudi, S., Roberts, I. N., Louis, E. J., and Oliver, S. G. (2003). Engineering evolution to study speciation in yeasts. *Nature* 422, 68-72.
- Dodgson, A. R., Pujol, C., Pfaller, M. A., Denning, D. W., and Soll, D. R. (2005). Evidence for recombination in *Candida glabrata*. *Fungal Genet Biol* 42, 233-243.
- Domergue, R., Castano, I., De Las Penas, A., Zupancic, M., Lockatell, 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.
- Donze, D., and Kamakaka, R. T. (2001). RNA polymerase III and RNA polymerase II promoter complexes are heterochromatin barriers in *Saccharomyces cerevisiae*. *Embo J* 20, 520-531.
- Elion, E. A. (2000). Pheromone response, mating and cell biology. *Curr Opin Microbiol* 3, 573-581.
- Fabre, E., Muller, H., Therizols, P., Lafontaine, I., Dujon, B., and Fairhead, C. (2005). Comparative genomics in hemiascomycete yeasts: evolution of sex, silencing, and subtelomeres. *Mol Biol Evol* 22, 856-873.

- 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.
- Fields, S., and Herskowitz, I. (1985). The yeast STE12 product is required for expression of two sets of cell-type specific genes. *Cell* 42, 923-930.
- Fisher, T. S., and Zakian, V. A. (2005). Ku: a multifunctional protein involved in telomere maintenance. *DNA Repair (Amst)* 4, 1215-1226.
- Forche, A., Alby, K., Schaefer, D., Johnson, A. D., Berman, J., and Bennett, R. J. (2008). The parasexual cycle in *Candida albicans* provides an alternative pathway to meiosis for the formation of recombinant strains. *PLoS Biol* 6, e110.
- Fraser, J. A., Giles, S. S., Wenink, E. C., Geunes-Boyer, S. G., Wright, J. R., Diezmann, S., Allen, A., Stajich, J. E., Dietrich, F. S., Perfect, J. R., and Heitman, J. (2005). Same-sex mating and the origin of the Vancouver Island *Cryptococcus gattii* outbreak. *Nature* 437, 1360-1364.
- Fu, Y., Ibrahim, A. S., Sheppard, D. C., Chen, Y. C., French, S. W., Cutler, J. E., Filler, S. G., and Edwards, J. E., Jr. (2002). *Candida albicans* Als1p: an adhesin that is a downstream effector of the EFG1 filamentation pathway. *Mol Microbiol* 44, 61-72.
- Galgoczy, D. J., Cassidy-Stone, A., Llinas, M., O'Rourke, S. M., Herskowitz, I., DeRisi, J. L., and Johnson, A. D. (2004). Genomic dissection of the cell-type-specification circuit in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 18069-18074.
- Gardner, K. A., Rine, J., and Fox, C. A. (1999). A region of the Sir1 protein dedicated to recognition of a silencer and required for interaction with the Orc1 protein in *saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 151, 31-44.
- Geiger, J., Wessels, D., Lockhart, S. R., and Soll, D. R. (2004). Release of a potent polymorphonuclear leukocyte chemoattractant is regulated by white-opaque switching in *Candida albicans*. *Infect Immun* 72, 667-677.
- Ghidelli, S., Donze, D., Dhillon, N., and Kamakaka, R. T. (2001). Sir2p exists in two nucleosome-binding complexes with distinct deacetylase activities. *Embo J* 20, 4522-4535.
- Gimeno, C. J., and Fink, G. R. (1994). Induction of pseudohyphal growth by overexpression of PHD1, a *Saccharomyces cerevisiae* gene related to transcriptional regulators of fungal development. *Mol Cell Biol* 14, 2100-2112.
- Goddard, M. R., Godfray, H. C., and Burt, A. (2005). Sex increases the efficacy of natural selection in experimental yeast populations. *Nature* 434, 636-640.
- Gottschling, D. E., Aparicio, O. M., Billington, B. L., and Zakian, V. A. (1990). Position effect at *S. cerevisiae* telomeres: reversible repression of Pol II transcription. *Cell* 63, 751-762.
- Grimberg, B., and Zeyl, C. (2005). The effects of sex and mutation rate on adaptation in test tubes and to mouse hosts by *Saccharomyces cerevisiae*. *Evolution* 59, 431-438.
- Guo, B., Styles, C. A., Feng, Q., and Fink, G. R. (2000). A *Saccharomyces* gene family involved in invasive growth, cell-cell adhesion, and mating. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 12158-12163.
- Haber, J. E. (1998). Mating-type gene switching in *Saccharomyces cerevisiae*. *Annu Rev Genet* 32, 561-599.
- Hardy, C. F., Sussel, L., and Shore, D. (1992). A RAP1-interacting protein involved in transcriptional silencing and telomere length regulation. *Genes Dev* 6, 801-814.
- Hoppe, G. J., Tanny, J. C., Rudner, A. D., Gerber, S. A., Danaie, S., Gygi, S. P., and Moazed, D. (2002). Steps in assembly of silent chromatin in yeast: Sir3-

- independent binding of a Sir2/Sir4 complex to silencers and role for Sir2-dependent deacetylation. *Mol Cell Biol* 22, 4167-4180.
- Hull, C. M., and Johnson, A. D. (1999). Identification of a mating type-like locus in the asexual pathogenic yeast *Candida albicans*. *Science* 285, 1271-1275.
- Hull, C. M., Raisner, R. M., and Johnson, A. D. (2000). Evidence for mating of the "asexual" yeast *Candida albicans* in a mammalian host. *Science* 289, 307-310.
- 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.
- Johnson, A. (2003). The biology of mating in *Candida albicans*. *Nat Rev Microbiol* 1, 106-116.
- Kantarcioglu, A. S., and Yucel, A. (2002). Phospholipase and protease activities in clinical *Candida* isolates with reference to the sources of strains. *Mycoses* 45, 160-165.
- Kapteyn, J. C., Hoyer, L. L., Hecht, J. E., Muller, W. H., Andel, A., Verkleij, A. J., Makarow, M., Van Den Ende, H., and Klis, F. M. (2000). The cell wall architecture of *Candida albicans* wild-type cells and cell wall-defective mutants. *Mol Microbiol* 35, 601-611.
- 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. In *Curr Opin Microbiol*, pp. 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.
- Kirkman-Correia, C., Stroke, I. L., and Fields, S. (1993). Functional domains of the yeast STE12 protein, a pheromone-responsive transcriptional activator. *Mol Cell Biol* 13, 3765-3772.
- Klis, F. M., de Groot, P., and Hellingwerf, K. (2001). Molecular organization of the cell wall of *Candida albicans*. *Med Mycol* 39 Suppl 1, 1-8.
- Krysan, D. J., Ting, E. L., Abeijon, C., Kroos, L., and Fuller, R. S. (2005). Yapsins are a family of aspartyl proteases required for cell wall integrity in *Saccharomyces cerevisiae*. *Eukaryot Cell* 4, 1364-1374.
- Lachke, S. A., Joly, S., Daniels, K., and Soll, D. R. (2002). Phenotypic switching and filamentation in *Candida glabrata*. *Microbiology* 148, 2661-2674.
- Lambrechts, M. G., Bauer, F. F., Marmur, J., and Pretorius, I. S. (1996). Muc1, a mucin-like protein that is regulated by Mss10, is critical for pseudohyphal differentiation in yeast. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 8419-8424.
- Laroche, T., Martin, S. G., Gotta, M., Gorham, H. C., Pryde, F. E., Louis, E. J., and Gasser, S. M. (1998). Mutation of yeast Ku genes disrupts the subnuclear organization of telomeres. *Curr Biol* 8, 653-656.
- Lavaniegos-Sobrinho, M. T., Ramirez-Zavaleta, C. Y., Ponce de Leon, A., Sifuentes-Osornio, J., Bobadilla-Del Valle, M., Rangel-Cordero, A., De Las Penas, A., and Castano, I. (2009). Genotyping of the MTL loci and susceptibility to two antifungal agents of *Candida glabrata* clinical isolates. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 104, 775-782.
- Lee, S. C., Ni, M., Li, W., Shertz, C., and Heitman, J. The evolution of sex: a perspective from the fungal kingdom. *Microbiol Mol Biol Rev* 74, 298-340.
- Leng, P., Lee, P. R., Wu, H., and Brown, A. J. (2001). Efg1, a morphogenetic regulator in *Candida albicans*, is a sequence-specific DNA binding protein. *J Bacteriol* 183, 4090-4093.

- Lengeler, K. B., Davidson, R. C., D'Souza, C., Harashima, T., Shen, W. C., Wang, P., Pan, X., Waugh, M., and Heitman, J. (2000). Signal transduction cascades regulating fungal development and virulence. *Microbiol Mol Biol Rev* 64, 746-785.
- Lin, X., Hull, C. M., and Heitman, J. (2005). Sexual reproduction between partners of the same mating type in *Cryptococcus neoformans*. *Nature* 434, 1017-1021.
- Lo, W. S., and Dranginis, A. M. (1996). FLO11, a yeast gene related to the STA genes, encodes a novel cell surface flocculin. *J Bacteriol* 178, 7144-7151.
- Lo, W. S., and Dranginis, A. M. (1998). The cell surface flocculin Flo11 is required for pseudohyphae formation and invasion by *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Biol Cell* 9, 161-171.
- Lockhart, S. R., Zhao, R., Daniels, K. J., and Soll, D. R. (2003). Alpha-pheromone-induced "shmooing" and gene regulation require white-opaque switching during *Candida albicans* mating. *Eukaryot Cell* 2, 847-855.
- Magee, B. B., Legrand, M., Alarco, A. M., Raymond, M., and Magee, P. T. (2002). Many of the genes required for mating in *Saccharomyces cerevisiae* are also required for mating in *Candida albicans*. *Mol Microbiol* 46, 1345-1351.
- Magee, B. B., and Magee, P. T. (2000). Induction of mating in *Candida albicans* by construction of MTL α and MTL α strains. *Science* 289, 310-313.
- Manzano-Gayosso, P., Hernandez-Hernandez, F., Bazan-Mora, E., Mendez-Tovar, L. J., Gonzalez-Monroy, J., and Lopez-Martinez, R. (2000). [Identification and typing of yeast isolates from hospital patients in Mexico City]. *Rev Argent Microbiol* 32, 1-6.
- 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.
- McCord, R., Pierce, M., Xie, J., Wonkatal, S., Mickel, C., and Vershon, A. K. (2003). Rfm1, a novel tethering factor required to recruit the Hst1 histone deacetylase for repression of middle sporulation genes. *Mol Cell Biol* 23, 2009-2016.
- Miller, M. G., and Johnson, A. D. (2002). White-opaque switching in *Candida albicans* is controlled by mating-type locus homeodomain proteins and allows efficient mating. *Cell* 110, 293-302.
- Milne, G. T., Jin, S., Shannon, K. B., and Weaver, D. T. (1996). Mutations in two Ku homologs define a DNA end-joining repair pathway in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* 16, 4189-4198.
- Mishra, K., and Shore, D. (1999). Yeast Ku protein plays a direct role in telomeric silencing and counteracts inhibition by rif proteins. *Curr Biol* 9, 1123-1126.
- Moazed, D., Kistler, A., Axelrod, A., Rine, J., and Johnson, A. D. (1997). Silent information regulator protein complexes in *Saccharomyces cerevisiae*: a SIR2/SIR4 complex and evidence for a regulatory domain in SIR4 that inhibits its interaction with SIR3. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 2186-2191.
- 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.
- Moretti, P., and Shore, D. (2001). Multiple interactions in Sir protein recruitment by Rap1p at silencers and telomeres in yeast. *Mol Cell Biol* 21, 8082-8094.
- Morschhauser, J. Regulation of multidrug resistance in pathogenic fungi. *Fungal Genet Biol* 47, 94-106.
- Mrsa, V., Ecker, M., Strahl-Bolsinger, S., Nimtz, M., Lehle, L., and Tanner, W. (1999). Deletion of new covalently linked cell wall glycoproteins alters the electrophoretic mobility of phosphorylated wall components of *Saccharomyces cerevisiae*. *J Bacteriol* 181, 3076-3086.

- Muller, H., Hennequin, C., Gallaud, J., Dujon, B., and Fairhead, C. (2008). The asexual yeast *Candida glabrata* maintains distinct a and alpha haploid mating types. *Eukaryot Cell* 7, 848-858.
- Naglik, J., Albrecht, A., Bader, O., and Hube, B. (2004). *Candida albicans* proteinases and host/pathogen interactions. *Cell Microbiol* 6, 915-926.
- Nielsen, K., and Heitman, J. (2007). Sex and virulence of human pathogenic fungi. *Adv Genet* 57, 143-173.
- Nugent, C. I., Bosco, G., Ross, L. O., Evans, S. K., Salinger, A. P., Moore, J. K., Haber, J. E., and Lundblad, V. (1998). Telomere maintenance is dependent on activities required for end repair of double-strand breaks. *Curr Biol* 8, 657-660.
- O'Gorman, C. M., Fuller, H. T., and Dyer, P. S. (2009). Discovery of a sexual cycle in the opportunistic fungal pathogen *Aspergillus fumigatus*. *Nature* 457, 471-474.
- Pan, X., and Heitman, J. (2000). Sok2 regulates yeast pseudohyphal differentiation via a transcription factor cascade that regulates cell-cell adhesion. *Mol Cell Biol* 20, 8364-8372.
- Patterson, E. E., and Fox, C. A. (2008). The Ku complex in silencing the cryptic mating-type loci of *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 180, 771-783.
- Pfaller, M. A., and Diekema, D. J. Epidemiology of invasive mycoses in North America. *Crit Rev Microbiol* 36, 1-53.
- Polakova, S., Blume, C., Zarate, J. A., Mentel, M., Jorck-Ramberg, D., Stenderup, J., and Piskur, J. (2009). Formation of new chromosomes as a virulence mechanism in yeast *Candida glabrata*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106, 2688-2693.
- Pryde, F. E., and Louis, E. J. (1999). Limitations of silencing at native yeast telomeres. *Embo J* 18, 2538-2550.
- Ramirez-Zavaleta, C. Y., Salas-Delgado, G. E., De Las Penas, A., and Castano, I. Subtelomeric silencing of the MTL3 locus of *Candida glabrata* requires yKu70, yKu80, and Rif1 proteins. *Eukaryot Cell* 9, 1602-1611.
- Renauld, H., Aparicio, O. M., Zierath, P. D., Billington, B. L., Chhablani, S. K., and Gottschling, D. E. (1993). Silent domains are assembled continuously from the telomere and are defined by promoter distance and strength, and by SIR3 dosage. *Genes Dev* 7, 1133-1145.
- Reynolds, T. B., and Fink, G. R. (2001). Bakers' yeast, a model for fungal biofilm formation. *Science* 291, 878-881.
- Richardson, M., and Lass-Flörl, C. (2008). Changing epidemiology of systemic fungal infections. *Clin Microbiol Infect* 14 Suppl 4, 5-24.
- Richardson, M. D. (2005). Changing patterns and trends in systemic fungal infections. *J Antimicrob Chemother* 56 Suppl 1, i5-i11.
- 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.
- Rudner, A. D., Hall, B. E., Ellenberger, T., and Moazed, D. (2005). A nonhistone protein-protein interaction required for assembly of the SIR complex and silent chromatin. *Mol Cell Biol* 25, 4514-4528.
- Rusche, L. N., Kirchmaier, A. L., and Rine, J. (2002). Ordered nucleation and spreading of silenced chromatin in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Biol Cell* 13, 2207-2222.
- 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.

- Rusche, L. N., and Lynch, P. J. (2009). Assembling heterochromatin in the appropriate places: A boost is needed. *J Cell Physiol* 219, 525-528.
- Sahni, N., Yi, S., Daniels, K. J., Srikantha, T., Pujol, C., and Soll, D. R. (2009). Genes selectively up-regulated by pheromone in white cells are involved in biofilm formation in *Candida albicans*. *PLoS Pathog* 5, e1000601.
- Sauve, A. A., Wolberger, C., Schramm, V. L., and Boeke, J. D. (2006). The biochemistry of sirtuins. *Annu Rev Biochem* 75, 435-465.
- Schwartz, M. A., and Madhani, H. D. (2004). Principles of MAP kinase signaling specificity in *Saccharomyces cerevisiae*. *Annu Rev Genet* 38, 725-748.
- Sengupta, P., and Cochran, B. H. (1990). The PRE and PQ box are functionally distinct yeast pheromone response elements. *Mol Cell Biol* 10, 6809-6812.
- Smith, D. L., and Johnson, A. D. (1992). A molecular mechanism for combinatorial control in yeast: MCM1 protein sets the spacing and orientation of the homeodomains of an alpha 2 dimer. *Cell* 68, 133-142.
- Smukalla, S., Caldara, M., Pochet, N., Beauvais, A., Guadagnini, S., Yan, C., Vinces, M. D., Jansen, A., Prevost, M. C., Latge, J. P., *et al.* (2008). FLO1 is a variable green beard gene that drives biofilm-like cooperation in budding yeast. *Cell* 135, 726-737.
- Smulian, A. G., Sesterhenn, T., Tanaka, R., and Cushion, M. T. (2001). The ste3 pheromone receptor gene of *Pneumocystis carinii* is surrounded by a cluster of signal transduction genes. *Genetics* 157, 991-1002.
- Soll, D. R. (2004). Mating-type locus homozygosity, phenotypic switching and mating: a unique sequence of dependencies in *Candida albicans*. *Bioessays* 26, 10-20.
- Srikantha, T., Lachke, S. A., and Soll, D. R. (2003). Three mating type-like loci in *Candida glabrata*. *Eukaryot Cell* 2, 328-340.
- Strathern, J., Hicks, J., and Herskowitz, I. (1981). Control of cell type in yeast by the mating type locus. The alpha 1-alpha 2 hypothesis. *J Mol Biol* 147, 357-372.
- Teunissen, A. W., and Steensma, H. Y. (1995). Review: the dominant flocculation genes of *Saccharomyces cerevisiae* constitute a new subtelomeric gene family. *Yeast* 11, 1001-1013.
- Triolo, T., and Sternglanz, R. (1996). Role of interactions between the origin recognition complex and SIR1 in transcriptional silencing. *Nature* 381, 251-253.
- Tsong, A. E., Miller, M. G., Raisner, R. M., and Johnson, A. D. (2003). Evolution of a combinatorial transcriptional circuit: a case study in yeasts. *Cell* 115, 389-399.
- Tsong, A. E., Tuch, B. B., Li, H., and Johnson, A. D. (2006). Evolution of alternative transcriptional circuits with identical logic. *Nature* 443, 415-420.
- Tsukamoto, Y., Kato, J., and Ikeda, H. (1997). Silencing factors participate in DNA repair and recombination in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nature* 388, 900-903.
- Valencia, M., Bentele, M., Vaze, M. B., Herrmann, G., Kraus, E., Lee, S. E., Schar, P., and Haber, J. E. (2001). NEJ1 controls non-homologous end joining in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nature* 414, 666-669.
- Vandre, C. L., Kamakaka, R. T., and Rivier, D. H. (2008). The DNA end-binding protein Ku regulates silencing at the internal HML and HMR loci in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 180, 1407-1418.
- 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.

- Wright, J. H., and Zakian, V. A. (1995). Protein-DNA interactions in soluble telosomes from *Saccharomyces cerevisiae*. *Nucleic Acids Res* 23, 1454-1460.
- Xie, J., Pierce, M., Gailus-Durner, V., Wagner, M., Winter, E., and Vershon, A. K. (1999). Sum1 and Hst1 repress middle sporulation-specific gene expression during mitosis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Embo J* 18, 6448-6454.
- Yuan, Y. O., Stroke, I. L., and Fields, S. (1993). Coupling of cell identity to signal response in yeast: interaction between the alpha 1 and STE12 proteins. *Genes Dev* 7, 1584-1597.
- Zhang, Z., Hayashi, M. K., Merkel, O., Stillman, B., and Xu, R. M. (2002). Structure and function of the BAH-containing domain of Orc1p in epigenetic silencing. *Embo J* 21, 4600-4611.
- Zill, O. A., and Rine, J. (2008). Interspecies variation reveals a conserved repressor of alpha-specific genes in *Saccharomyces* yeasts. *Genes Dev* 22, 1704-1716.