

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

POSGRADO EN CIENCIAS EN BIOLOGÍA MOLECULAR

**Identificación de elementos en *cis* que  
regulan la expresión de genes de adhesinas  
en *Candida glabrata***

Tesis que presenta  
**Alejandro Juárez Reyes**

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

Directora de Tesis:  
**Dra. Irene Castaño Navarro**

*San Luis Potosí, S.L.P., 8 de Julio de 2011*



## Constancia de aprobación de la tesis

La tesis “Identificación de elementos en *cis* que regulan la expresión de genes de adhesinas en *Candida glabrata*” presentada para obtener el grado de Doctor en Ciencias en Biología Molecular fue elaborada por **Alejandro Juárez Reyes** y aprobada el **27 de Junio de de 2011** por los suscritos, designados por el Colegio de Profesores de la División de Biología Molecular del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C

Dra. Irene Castaño Navarro  
(Director de la tesis)

Dr. Gerardo Arguuello Astorga  
(Asesor de la tesis)

Dra. Lina Raquel Riebo Ruíz  
(Asesor de la tesis)

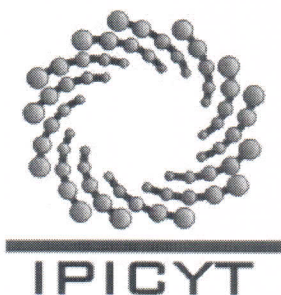
Dr. Félix Recillas Targa  
(Asesor de la tesis)



## **Créditos Institucionales**

Esta tesis fue elaborada en el Laboratorio de Microbiología Molecular de la División de Biología Molecular del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C., bajo la dirección de la Dra. Irene Beatriz Castaño Navarro, apoyada por el proyecto No. CB-2005-48304.

Durante la realización del trabajo el autor recibió una beca académica del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología con No. de registro 167877 y del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A. C.



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

## Acta de Examen de Grado

El Secretario Académico del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C., certifica que en el Acta 035 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 8 días del mes de julio del año 2011, se reunió a las 11:30 horas en las instalaciones del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C., el Jurado integrado por:

<b>Dr. Gerardo Rafael Argüello Astorga</b>	<b>Presidente</b>	<b>IPICYT</b>
<b>Dr. Félix Recillas Targa</b>	<b>Secretario</b>	<b>UNAM</b>
<b>Dra. Irene Beatriz Castaño Navarro</b>	<b>Sinodal</b>	<b>IPICYT</b>
<b>Dra. Lina Raquel Riego Ruiz</b>	<b>Sinodal</b>	<b>IPICYT</b>

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

**DOCTOR EN CIENCIAS EN BIOLOGÍA MOLECULAR**

sustentó el C.

**Alejandro Juárez Reyes**

sobre la Tesis intitulada:

*Identificación de elementos en cis que regulan la expresión de genes de adhesinas en Candida glabrata*

que se desarrolló bajo la dirección de

**Dra. Irene Beatriz Castaño Navarro**

El Jurado, después de deliberar, determinó

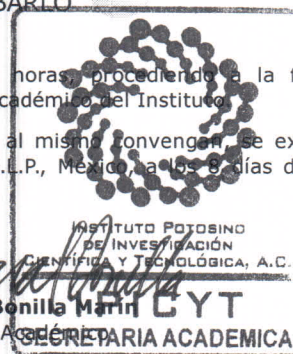
**APROBARLO**

Dándose por terminado el acto a las 13:30 horas, procediendo a la firma del Acta los integrantes del Jurado. Dando fe el Secretario Académico del Instituto

A petición del interesado y para los fines que al mismo convenga, se extiende el presente documento en la ciudad de San Luis Potosí, S.L.P., México, a los 8 días del mes de julio de 2011.

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

**Dr. Marcial Bonilla Martín**  
Secretario Académico



*“Sólo entonces Lo verás, cuando no hables de Ello; pues su conocimiento es silencio profundo y supresión de los sentidos”.*

**Hermes, Lib. X.5**

## DEDICATORIAS

A mis padres Marilú y Gonzalo, por su apoyo, por su cariño, por lo que han dejado en mí y por sus valiosas enseñanzas y reflexiones únicas, que me permiten dar lo mejor del ser humano que habita en mí.

A mis hermanas Lucy y Amida, por su apoyo, por su amistad, por su risa, por compartir su alegría y sus ilusiones en la vida.

A todos mis amigos del IPICYT maestros y estudiantes, por todos los momentos de alegrías, risas, de esfuerzo en conjunto, de trabajo constante y de aprendizaje. Por compartir tantas horas del día durante esta época de mi vida.

A las personas que me ha tocado conocer en este viaje, pues aún no encuentro uno sola de la que no pueda aprender nada.

Al esfuerzo humano colectivo por conocer la naturaleza y el ser mismo.

## AGRADECIMIENTOS

Primeramente a DIOS que mantiene su voluntad en la mía. Por develar lenta y sutilmente la conciencia de su maravillosa creación a sus mismas criaturas.

A mis padres, cuyo cariño y apoyo me son indispensables para seguir y no desistir, por su amor y sabiduría. Gracias por apoyarme siempre y más en los momentos difíciles.

A Irene Castaño, por aceptarme como estudiante y por inyectarle mucho ánimo al proyecto y transmitir esa emoción cuando obtenemos resultados inesperados. Por todos los elementos que aportó en mi formación académica y personal. Por su gran amistad y empatía. Por su increíble ejemplo de optimismo

A Gerardo Arguello por haber sido mi director y asesor de tesis en mi época de estudiante en el *IPICYT*, por sus consejos, enseñanzas, humildad, su buen sentido del humor y su gran amistad. Por compartir su emoción por la naturaleza y su gran valor humano.

A Lina Riego por sus aportes a mi desarrollo como estudiante, por sus observaciones, correcciones, asesorías y auxilio. Por su amistad.

A Alejandro de las Peñas, por ser también mi asesor no oficial, por todas las discusiones, ideas, y sugerencias al proyecto. Por su ejemplo de trabajo constante e interés por conocer detalles.

A Félix Recillas por las sugerencias, observaciones precisas y sus valiosas preguntas en los seminarios. Por motivarme en que mis resultados no son poca cosa.

Al Dr. Omar Arroyo y la Dra. Candy Ramírez por su trabajo y apoyo técnico para el funcionamiento del laboratorio y a Gloria López por la ayuda que nos brinda con el material de trabajo.

A mis maestros de Biología Molecular, por las clases y preguntas. A *IPICYT* y *CONACYT* por los medios necesarios.

Y muy especialmente,

A TODOS mis amigos del *IPICYT*, de todos los laboratorios y lugares, que sinceramente les estoy profundamente agradecido, por su valiosa amistad, por todos los momentos inolvidables, pues cada uno enriquece mi vida aún con solo una plática, una risa, un saludo y un *adiós*.

# CONTENIDO

<b>Constancia de aprobación de la tesis</b>	<b><i>ii</i></b>
<b>Créditos institucionales</b>	<b><i>iii</i></b>
<b>Acta de examen</b>	<b><i>iv</i></b>
<b>Dedicatorias</b>	<b><i>v</i></b>
<b>Agradecimientos</b>	<b><i>vi</i></b>
<b>Lista de figuras</b>	<b><i>x</i></b>
<b>Lista de tablas</b>	<b><i>xii</i></b>
<b>Lista de figuras suplementarias</b>	<b><i>xiii</i></b>
<b>Lista de anexos</b>	<b><i>xiv</i></b>
<b>Abreviaturas</b>	<b><i>xv</i></b>
<b>Glosario</b>	<b><i>xvi</i></b>
<b>RESUMEN</b>	<b><i>xvii</i></b>
<b>ABSTRACT</b>	<b><i>xviii</i></b>
<b>1. INTRODUCCIÓN</b>	
1.1 Características generales de <i>Candida glabrata</i> y clasificación	1
1.2 Genoma y relación filogenética	1
1.3 Virulencia. Las proteínas de pared	2
1.4 Dominios del genoma y silenciamiento transcripcional	4
1.5 Silenciamiento subtelomérico	6
1.6 El silenciamiento subtelomérico en <i>S. cerevisiae</i>	7
1.7 Las proteínas de silenciamiento subtelomérico	9
1.8 Silenciamiento de los loci de apareamiento <i>HML</i> y <i>HMR</i> en <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	12



1.9	Modelos de silenciamiento transcripcional en levaduras	13
1.10	Silenciamiento y orientación de los elementos silenciadores	14
1.11	Dominios estructurales y funcionales de la cromatina	14
1.12	Elementos de frontera o elementos aislantes	15
1.13	Mecanismos de la actividad de frontera	15
1.14	Importancia del contexto genómico en la expresión génica.	16
1.15	Los telómeros	17
<b>2.</b>	<b>ANTECEDENTES DIRECTOS</b>	19
<b>3.</b>	<b>PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA E HIPÓTESIS</b>	21
<b>4.</b>	<b>ESTRATEGIA</b>	22
<b>5.</b>	<b>OBJETIVO GENERAL Y PARTICULAR</b>	23
<b>6.</b>	<b>MATERIALES Y MÉTODOS</b>	
6.1	Cepas, plásmidos y oligonucleótidos	24
6.2	Construcción de vectores para analizar el silenciamiento	24
6.3	Delimitación de la región silenciadora Sil2126	25
6.4	Comprobación de las construcciones en plásmidos	26
6.5	PCR	27
6.6	RT-PCR	27
6.7	Ensayos de crecimiento en medio 5-FOA para analizar el silenciamiento	27
6.8	Transformación de <i>Candida glabrata</i>	27
6.9	<b>Analysis of Subtelomeric Silencing in <i>Candida glabrata</i></b>	28
<b>7.</b>	<b>RESULTADOS</b>	
7.1	<b>yKu70/yKu80 and Rif1 regulate silencing differentially at telomeres in <i>Candida glabrata</i>.</b>	52
7.2	<b>A protosilencer is responsible for yKu70/yKu80-independent subtelomeric silencing on chromosome E-R in <i>Candida glabrata</i>.</b>	63

<b>8. RESULTADOS ADICIONALES</b>	
8.1 La expresión de los genes <i>EPA</i> en el telómero E <sub>R</sub> se encuentra favorecida en las mutantes que más afectan el silenciamiento de este telómero	88
8.2 El promotor de <i>URA3</i> no es lo suficiente fuerte para contrarrestar el silenciamiento en la cercanía inmediata al telómero	89
8.3 El Silenciamiento mediado por Sil2126 es independiente de Hst2, y es dependiente de Rap1 y Sir2	90
8.4 Búsqueda de una clasificación de los telómeros de <i>C. glabrata</i>	91
<b>9. DISCUSIÓN</b>	
9.1 La región subtelomérica E <sub>R</sub> , un contexto adecuado para el silenciamiento	92
9.2 Discontinuidad en la represión transcripcional	94
9.3 El promotor <i>PGK1</i> como un elemento de barrera	94
9.4 Plegamientos estructurales entre loci silenciosos	99
9.5 Ku70/Ku80 y Sil2126 en el silenciamiento subtelomérico E <sub>R</sub>	100
9.6 Elementos compuestos con aislantes, plegamientos estructurales y polaridad de silenciadores: fenómenos no excluyentes para explicar el silenciamiento direccional	101
<b>10. CONCLUSIONES PARTICULARES</b>	104
<b>11. CONCLUSIÓN GENERAL</b>	105
<b>12. PERSPECTIVAS</b>	106
<b>13. FIGURAS SUPLEMENTARIAS</b>	108
<b>14. RECURSOS EMPLEADOS DE INTERNET</b>	116
<b>15. REFERENCIAS</b>	118
<b>16. ANEXOS</b>	125

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Filogenia de especies secuenciadas del clado de <i>Candida</i> y <i>Saccharomyces</i> .	2
<b>Figura 2.</b> Dendograma de relaciones filogenéticas entre secuencias de genes parálogos del gen <i>EPA1</i> en el genoma de <i>C. glabrata</i> de la cepa BG2.	4
<b>Figura 3.</b> Modelo de dominios de heterocromatina formados con el complejo Sir en <i>S. cerevisiae</i> .	6
<b>Figura 4.</b> Interacciones entre 172 genes cuya delección confiere un fenotipo de acortamiento o alargamiento de los telómeros.	9
<b>Figura 5.</b> Dominios silenciados en los loci de apareamiento <i>HML</i> , <i>HMR</i> y los telómeros.	13
<b>Figura 6.</b> Los telómeros de <i>S. cerevisiae</i> se clasifican en dos categorías principales.	18
<b>Figura 7.</b> Niveles de transcrito de los genes <i>EPA1</i> a <i>EPA7</i> en cepas de <i>C. glabrata</i> en fase estacionaria.	19
<b>Figura 8.</b> Una secuencia subtelomérica del cromosoma E-R produce silenciamiento de un reportero <i>URA3</i> ubicado a 32 kb del telómero.	20
<b>Figura 9.</b> Vector integrativo base para estudiar las propiedades del elemento Sil2126.	25
<b>Figura 10.</b> Análisis de expresión por RT-PCR de los genes <i>EPA1</i> , <i>EPA2</i> y <i>EPA3</i> localizados en el telómero E-R en distintas mutantes de <i>C. glabrata</i> .	88
<b>Figura 11.</b> Plásmidos diseñados para reemplazar por doble recombinación homóloga, la secuencia de Sil2126 por los genes reporteros <i>hph</i> y <i>NAT</i> bajo el control de los promotores de <i>PGK1</i> y <i>URA3</i> respectivamente.	89
<b>Figura 12.</b> Efecto de diferentes mutantes sobre el silenciamiento mediado por Sil2126.	90
<b>Figura 13.</b> Modelo de coalescencia para generar las interacciones funcionales entre elementos silenciadores.	93
<b>Figura 14.</b> Diferentes estados de la cromatina en un sistema reportero ubicado en el locus silencioso <i>HML</i> de <i>S. cerevisiae</i> .	96

<b>Figura 15.</b> La distinción experimental entre actividades de barrera (BA) y actividades desilenciadoras (DA) en una proteína o complejo está basada en sus diferentes modos de acción.	98
<b>Figura 16.</b> Modelo propuesto de la arquitectura nuclear en los telómeros de <i>S. cerevisiae</i> .	101
<b>Figura 17.</b> Modelos propuestos para explicar la polaridad del elemento Sil2126 en el silenciamiento de <i>URA3</i> en integraciones subtelméricas en E- <sub>R</sub> a más de 30 kb del telómero.	103

## LISTA DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Vectores integrativos y su tamaño remanente de la región Sil2126 utilizados para localizar los principales elementos funcionales de Sil2126.	26
<b>Tabla 2.</b> Identidad y similitud entre las principales proteínas de silenciamiento subtelómero estudiadas en este trabajo en <i>C. glabrata</i> , <i>C. albicans</i> , y <i>S. cerevisiae</i> .	114
<b>Tabla 3.</b> Resumen del orden cronológico de construcción de las cepas dobles mutantes <i>hdf1Δ/silΔ</i> , <i>hdf2Δ/silΔ</i> .	115

## LISTA DE FIGURAS SUPLEMENTARIAS

<b>Figura S1.</b> Alineamiento que muestra la identidad de Sil2126 del cromosoma E con regiones similares en los cromosomas A e I.	108
<b>Figura S2.</b> Integraciones del sistema Sil2126- <i>URA3</i> en distintos lugares del genoma de <i>Candida glabrata</i> .	109
<b>Figura S3.</b> Esquema de las integraciones Sil2126- <i>URA3</i> en la región subtelomérica del brazo derecho del cromosoma E (E-R).	110
<b>Figura S4.</b> Esquema de la región subtelomérica del brazo izquierdo del cromosoma E (E-L).	111
<b>Figura S5.</b> Sil2126 es un elemento que depende de la localización subtelomérica particular, orientación relativa respecto al gen reportero, y orientación respecto al telómero.	112
<b>Figura S6.</b> Ensayos de termosensibilidad en cepas de <i>C. glabrata</i> .	113
<b>Figura S7.</b> El genoma de <i>C. glabrata</i> contiene una copia adicional de Sil2126 cercana al telómero A-L.	113

## LISTA DE ANEXOS

<b>Tabla A1.</b> Cepas de <i>E. coli</i> y <i>C. glabrata</i> utilizadas en la sección 7.1	125
<b>Tabla A2.</b> Plásmidos utilizados en la sección 7.1	133
<b>Tabla A3.</b> Cepas de <i>E. coli</i> y <i>C. glabrata</i> utilizadas en la sección 7.2	137
<b>Tabla A4.</b> Plásmidos utilizados en la sección 7.2	142
<b>Tabla A5.</b> Oligonucleótidos utilizados en la sección 7.2	145

## ABREVIATURAS

<b>5-FOA</b>	<b>5-Fluoroorotic Acid</b>
<b>3C</b>	<b>Chromosome Conformation Capture</b>
<b>CAA</b>	<b>Casaamino Acids</b>
<b>ChIP</b>	<b>Chromatin Immunoprecipitation</b>
<b>FRT</b>	<b>Flippase1 Recognition Target</b>
<b>GPI</b>	<b>Glicosyl-Phosphatidylinositol</b>
<b>PEV</b>	<b>Position Effect Variegation</b>
<b>STARs</b>	<b>Subtelomeric Antisilencing Regions</b>
<b>TPE</b>	<b>Telomere Position Effect</b>
<b>UTR</b>	<b>Untranslated Region</b>
<b>YPD</b>	<b>Yeast extract-Peptide-Dextrose</b>

## NOMBRES DE GENES

<b><i>ABF1</i></b>	<b>ARS-Binding Factor</b>
<b><i>EPA</i></b>	<b>Epithelial Adhesin</b>
<b><i>FLP1</i></b>	<b>Flippase 1; a site-specific recombinase</b>
<b><i>hph</i></b>	<b>hygromycin phosphotransferase</b>
<b><i>NAT</i></b>	<b>Nourseothricin Acetyltransferase</b>
<b><i>PGK1</i></b>	<b>3-PhosphoGlycerate Kinase</b>
<b><i>RAP1</i></b>	<b>Represor Activator Protein</b>
<b><i>REB1</i></b>	<b>RNA polymerase I Enhancer Binding protein</b>
<b><i>RIF1</i></b>	<b>Rap1 Interacting Factor</b>
<b><i>SIR</i></b>	<b>Silent Information Regulator</b>
<b><i>TBF1</i></b>	<b>TTAGGG repeat-Binding Factor</b>
<b><i>URA3</i></b>	<b>URAcil requiring; Orotidine-5'-phosphate decarboxylase</b>



## GLOSARIO

**Abf1:** Proteína de unión al DNA con posible actividad remodeladora de la cromatina. Involucrada en silenciamiento génico, activación de la transcripción, y replicación y reparación del DNA.

**Elemento:** Secuencia en el DNA con un efecto funcional particular, cuya extensión exacta solo está determinada por las técnicas, análisis y diseño del experimento con el que se estudia.

**Elemento de frontera o de límite (Boundary element):** Son secuencias especializadas en el DNA que dividen el genoma en distintos dominios funcionales. Cuando los genes se flanquean por estos elementos, éstos son protegidos de los efectos represivos o de activación de la cromatina circundante.

**Enhancer:** Elemento en el DNA que incrementa el nivel de transcripción en una forma independiente de su orientación y distancia relativa al sitio de inicio de la transcripción.

**Epigenética:** Se refiere a cambios heredables en el corto plazo, presentes en el DNA o en el complejo de la cromatina y que producen un fenotipo, pero que no involucran mutaciones en el DNA.

**Homólogos:** Genes que comparten un ancestro común.

**ORF (Open Reading Frame):** Parte de la secuencia de un gen que abarca del codón de inicio de la traducción al codón de terminación.

**Ortólogos:** Tipo de genes homólogos que se originaron a partir de un único gen ancestral en el último ancestro común, en los genomas comparados de dichos organismos (Relación vertical). Usualmente realizan la misma función.

**Parálogos:** Tipo de genes homólogos que se originaron a partir de una duplicación en un mismo genoma (Relación horizontal). Usualmente sus funciones tienden a divergir y especializarse.

**RNAnc (RNA no codificante):** Su secuencia no es traducida a una proteína.

**Sintenia:** Es la conservación del orden y dirección relativa de transcripción de un conjunto de genes contiguos, que se presenta al comparar genomas de diferentes organismos.

**UAS (Upstream Activating Sequence):** Es una secuencia reguladora en *cis*, que no forma parte del núcleo del promotor, y que incrementa la expresión de un gen adyacente ubicado corriente abajo.

## RESUMEN

### Identificación de elementos en *cis* que regulan la expresión de genes de adhesinas en *Candida glabrata*

**PALABRAS CLAVE:** *Candida glabrata*, silenciamiento subtelomérico, protosilenciador, Ku70 y Ku80.

*Candida glabrata* es una levadura comensal de mamíferos que bajo ciertas condiciones que debilitan el sistema inmune del huésped se comporta como patógena. Entre sus factores de virulencia se encuentran proteínas de pared que median la adherencia a distintas superficies biológicas. Los genes *EPA* que codifican estas proteínas se encuentran localizados en regiones subteloméricas. Dichos genes, o genes reporteros insertados en éstas regiones se encuentran reprimidos, fenómeno llamado silenciamiento subtelomérico o TPE. La formación de la cromatina silenciosa depende de las proteínas Sir2, Sir3, Sir4, y en diferente medida de Rap1, Rif1, Ku70 y Ku80 en los diferentes telómeros. En *C. glabrata* así como en *S. cerevisiae* las regiones subteloméricas contienen además elementos en *cis* importantes en la formación y propagación de la cromatina represiva. Estos elementos funcionan como protosilenciadores porque incrementan la acción de silenciadores localizados en su cercanía, mientras que no pueden mediar el silenciamiento por sí solos.

En este trabajo se identificó una región protosilenciadora (Sil2126), localizada entre *EPA3* y el telómero E<sub>R</sub>. Las propiedades de Sil2126 se estudiaron mediante un reportero *URA3* en distintas ubicaciones cromosómicas. Se encontró que el efecto de Sil2126 es dependiente de las proteínas Sir2, Sir3, Sir4, Rap1, Rif1 y es independiente de las proteínas Ku70 y Ku80. Sil2126 presenta una composición modular con distintos elementos internos no funcionales de forma individual. El funcionamiento de Sil2126 es dependiente tanto de su distancia al telómero como del contexto subtelomérico particular, ya que este elemento puede mediar el silenciamiento de *URA3* a 32 kb de su telómero nativo E<sub>R</sub>, mas no a una distancia similar de 34 kb en el telómero E<sub>L</sub>. Sil2126 pierde su funcionalidad si se coloca a una distancia de 50 kb de su propio telómero o cuando se integra en regiones internas de los cromosomas F, L y M a más de 200 kb del telómero. Las propiedades de Sil2126 son dependientes de su orientación relativa respecto al gen reportero y respecto al telómero. A la fecha, todos los telómeros estudiados de *S. cerevisiae* y *C. glabrata* dependen de Ku70 y Ku80 para el silenciamiento; sin embargo, el elemento Sil2126 así como el telómero E<sub>R</sub> en el que se encuentra ubicado, aparentemente no dependen de Ku70 y Ku80 para su funcionamiento. En este trabajo se encontró que la participación de Ku70 y Ku80 en el silenciamiento subtelomérico E<sub>R</sub> se encuentra enmascarada por el efecto redundante que presenta junto con Sil2126. Dicho efecto solo se manifiesta en mutantes dobles *hdf1Δ/silΔ* y *hdf2Δ/silΔ*.

Se propone que interacciones funcionales entre el telómero y elementos internos al cromosoma como el protosilenciador Sil2126, están involucradas en las características y grado de propagación del silenciamiento en cada telómero. El establecimiento del silenciamiento puede ser anulado por la presencia de un promotor fuerte que establezca una barrera en la formación o propagación del silenciamiento, como es el caso del promotor del gen *PGK1*.

## ABSTRACT

### Identification of *cis*-elements regulating the expression of adhesin genes in *Candida glabrata*

**KEYWORDS:** *Candida glabrata*, subtelomeric silencing, protosilencer, Ku70 and Ku80.

*Candida glabrata* is a commensal yeast in mammals that can become a pathogen when the host defenses are compromised. One of the most important virulence factors of *C. glabrata* are the adhesin proteins that mediate adherence to different surfaces. These proteins are encoded by the *EPA* genes which are localized in regions close to the telomeres. These subtelomeric regions are assembled as a transcriptionally repressed chromatin so that native or reporter genes inserted at these sites are not expressed, a process called subtelomeric silencing or TPE. Silenced chromatin depends on proteins Sir2, Sir3, Sir4, and to different degrees on Rap1, Rif1, Ku70 and Ku80 depending on the particular telomere. *C. glabrata* and *S. cerevisiae* subtelomeric regions contain important *cis* elements for the establishment and spreading of heterochromatin. These elements work as protosilencers because they increase the action of closely localized silencers but they do not establish silencing on their own.

In this work, we identified a region with protosilencer properties (Sil2126) between *EPA3* and the right telomere of chromosome E ( $E_{-R}$ ). Sil2126 properties are analyzed by using a *URA3* reporter inserted at different genomic locations. It was found that Sil2126 activity is dependent on the main subtelomeric silencing proteins Sir2, Sir3, Sir4, Rap1, Rif1, and is independent of Ku70/Ku80. Sil2126 shows a modular composition with several internal elements that are not functional on their own. The Sil2126 activity is dependent on its relative proximity to the telomere and on the particular subtelomeric context, since Sil2126 mediates silencing 32 kb from its native telomere  $E_{-R}$  but not at a similar distance (34 kb) from the opposite telomere on chromosome E ( $E_{-L}$ ). Sil2126 loses activity when placed at 50 kb of telomere  $E_{-R}$  or when it is integrated at internal regions on chromosomes F, L and M that are over 200 kb from the telomere. Sil2126 properties are dependent on its relative orientation with respect to the reporter and the telomere. To date, all the telomeres studied in *S. cerevisiae* and *C. glabrata* depend on Ku70 and Ku80 for silencing, however Sil2126 and the  $E_{-R}$  telomere apparently do not depend on Ku70/Ku80 for silencing. In this work, it was found that the role of Ku70 and Ku80 on subtelomeric silencing at  $E_{-R}$  is masked by the redundant function of Sil2126 on silencing. This effect is visible only in double mutants *hdf1Δ/silΔ* and *hdf2Δ/silΔ*.

It is proposed that functional interactions between the telomere and internal elements such as this protosilencer could be involved in the properties and the silencing level of each particular telomere. The establishment of silencing at subtelomeric regions is abolished by the presence of elements such as the strong promoter *PGK1*, which could form an active boundary for the spreading of silencing.

## 1. INTRODUCCIÓN

*Candida glabrata* es una levadura considerada como parte de la biota habitual en individuos sanos. En condiciones de inmunosupresión en el hospedero puede colonizar y causar infección en la mucosa oral o vaginal así como infecciones sistémicas. En la población humana adulta, *C. glabrata* es la segunda causa de candidiasis en mucosas o infección sistémica por hongos después de *Candida albicans* [1]. En el medio ambiente ambas especies solo se han encontrado en asociación con mamíferos. Las infecciones por *C. glabrata* son difíciles de tratar y son frecuentemente resistentes a los azoles, especialmente al fluconazol [2].

### 1.1 Características generales de *C. glabrata*

*C. glabrata* forma colonias circulares de aspecto liso y brillante y de coloración crema. El tamaño de *C. glabrata* de 1 a 4  $\mu\text{M}$ , es relativamente menor al de *C. albicans* (4 a 6  $\mu\text{M}$ ) y al de *S. cerevisiae* (5 a 10  $\mu\text{M}$ ) [3]. *C. glabrata* es una levadura haploide no dimórfica, consecuentemente se encuentra en forma de blastoconidia tanto como comensal como en su forma patógena. Sin embargo, existe un reporte en el que *C. glabrata* presenta formación de pseudohifas *in vitro* bajo condiciones de limitación de nitrógeno [4].

### Clasificación

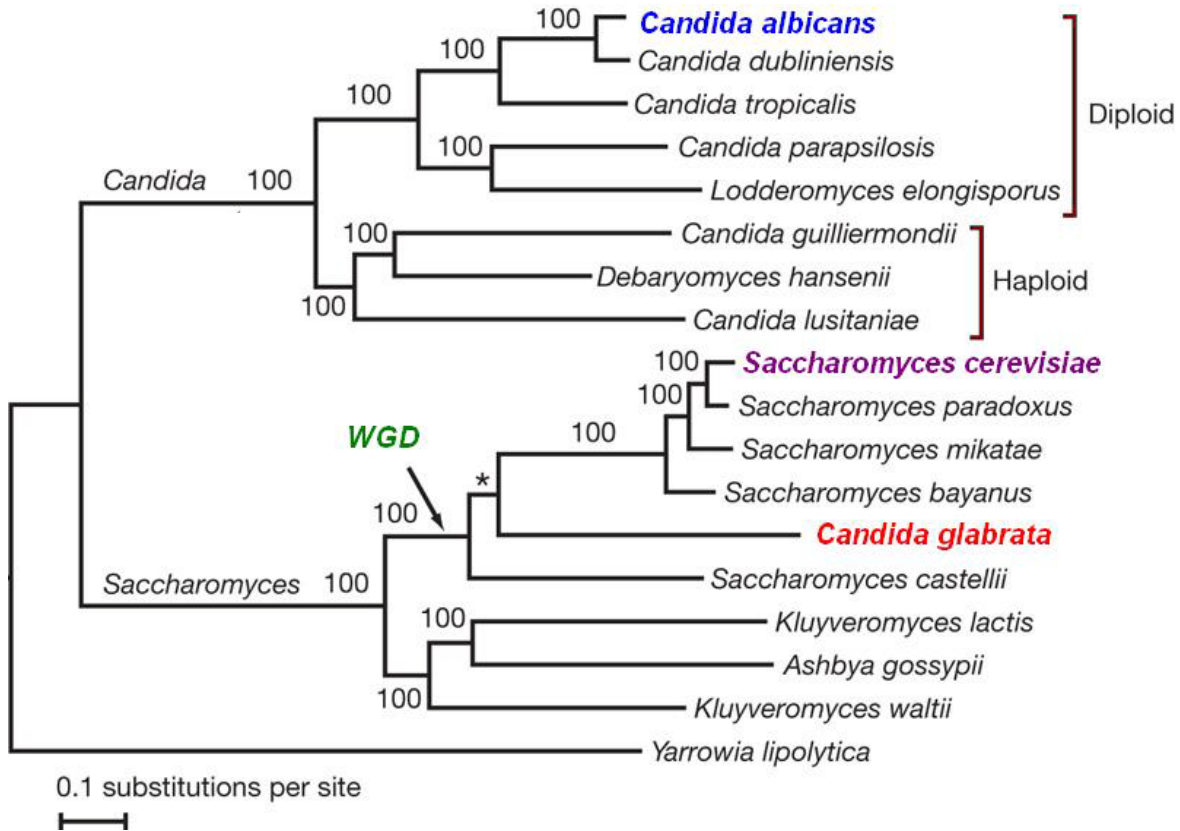
<i>Reino</i>	Fungi
<i>Phylum</i>	Ascomycota
<i>Subphylum</i>	Saccharomycotina
<i>Clase</i>	Saccharomycetes
<i>Orden</i>	Saccharomycetales
<i>Familia</i>	Saccharomycetaceae
<i>Genero</i>	<i>Candida</i>
<i>Especie</i>	<i>glabrata</i>

### 1.2 Genoma y Relación Filogenética

El genoma de la cepa CBS138 de *C. glabrata* fue secuenciado como parte del programa Genolevures [5] y se encuentra depositado en la base de datos NCBI [6] y EMBL-EBI [7]. Consta de 12.3 Mb distribuidas en 13 cromosomas que se designan con las letras de la A a la M. Contiene aproximadamente 5283 regiones codificantes y 207 genes de tRNA.

Con base en la similitud que presentan las secuencias 18S de rRNA, *C. glabrata* presenta una relación filogenética más estrecha con *Saccharomyces cerevisiae* que con cualquier otra especie de *Candida* (Figura 1). Además estas dos levaduras presentan un alto grado de sintenia y muestran en promedio un 65% de identidad de aminoácidos entre proteínas ortólogas [8]; estas

características permiten utilizar herramientas moleculares desarrolladas en *S. cerevisiae* y hacer estudios comparativos entre ambas levaduras.



**Figura 1.** Filogenia de especies secuenciadas del clado de *Candida* y *Saccharomyces*. WGD indica el punto de la duplicación genómica y las especies que divergieron después de esta. El asterisco (\*) marca un brazo constreñido con base en la conservación sinténica. Tomada y modificada de [9].

### 1.3 Virulencia

#### Las proteínas de pared

En levaduras, las proteínas que median la adherencia a células (adhesinas), son críticas en las interacciones célula-célula y en la patogénesis. Estas proteínas contienen varios dominios con funciones distintas. La mayoría de estas proteínas presenta una estructura general que consiste de las siguientes partes: i) una región N-terminal que contiene secuencias señal para su secreción al exterior de la membrana, y el dominio de unión al ligando; ii) La región central, que puede o

no ser rica en dominios glicosilados ricos en serina y treonina, facilita la interacción célula-célula, y exhibe N- y O- glicosilaciones que proyectan los dominios de unión al exterior de la pared celular; iii) la región C-terminal, en la que se encuentra una secuencia señal para la adición de un grupo químico glicosil-fosfatidil-inositol (GPI) en el retículo endoplásmico, lo que permite un entrecruzamiento covalente con la matriz extracelular. Por esta razón estas proteínas de pared son llamadas GPI-CWPs.

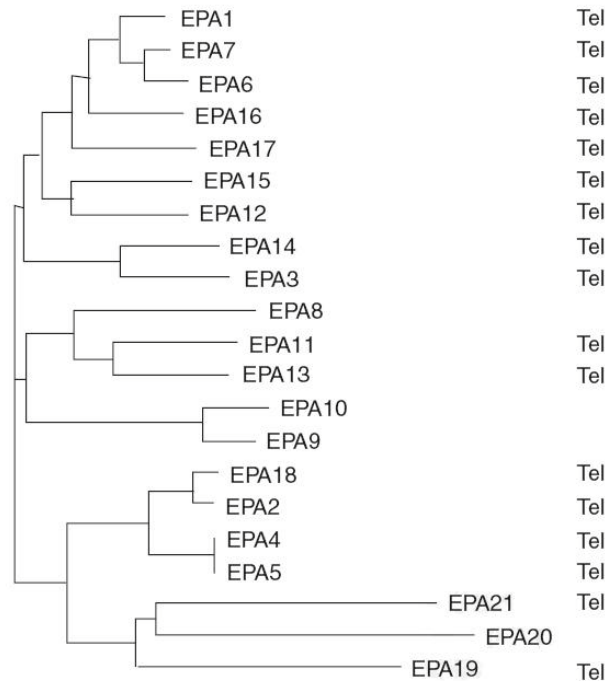
En *Candida albicans* una familia de GPI-CWPs media la adherencia a células epiteliales, la agregación celular y la formación de biofilms. Esta familia codificada por los genes *ALS*, se constituye de ocho genes que se expresan en diferentes fases de crecimiento y de infección [10-11]. Para las proteínas Als, el dominio N-terminal es necesario y suficiente para unirse a la superficie de las células. La actividad de Als está correlacionada con la patogénesis. Las células de *C. albicans* que expresan genes *ALS* pueden agregarse y esta agregación no requiere  $Ca^{2+}$ . La expresión de la adhesina *ALS1* en *C. albicans* así como la expresión de *EPA1* en *C. glabrata* se induce cuando las levaduras se inoculan en medio de crecimiento fresco [10, 12].

Entre los factores de virulencia que presenta *C. glabrata* está la capacidad de adherirse a células epiteliales de mamífero. Dicha adherencia esta mediada por proteínas de pared celular llamadas adhesinas y es dependiente de  $Ca^{2+}$ . Estas adhesinas forman parte de una amplia familia de genes llamados *EPA*, los cuales se encuentran localizados en regiones subteloméricas y sujetos a silenciamiento transcripcional (Figura 2). La cepa secuenciada CBS138 posee 17 genes *EPA* y la cepa BG2 (este estudio) posee por lo menos 23.

La adherencia *in vitro* a células epiteliales se debe principalmente a la adhesina *Epa1*, que es una lectina que reconoce glicoconjugados que contienen N-acetilactosamina [13]. La estructura general de la proteína *Epa1* y sus parálogas se caracteriza por la presencia de una secuencia señal hidrofóbica, un dominio N-terminal que media la interacción específica proteína-proteína o proteína-ligando, la adición de un grupo GPI en el carboxilo terminal y en algunos casos una región C-terminal rica en serina/treonina. A pesar de que *Epa1* media el 95% de la adherencia a células epiteliales observada *in vitro*, la ausencia de *EPA1* no produce un fenotipo de menor virulencia en modelos murinos de infección sistémica o vaginal. Esto sugiere que otras adhesinas de la familia pueden compensar su ausencia *in vivo*. Posteriormente se encontró que en ausencia de *EPA1* las adhesinas *Epa6* y *Epa7* son importantes para la colonización en riñón en modelos murinos [14].

Una característica en común entre *C. glabrata* y otros microbios patógenos, es que en las regiones subteloméricas se encuentran los genes que codifican para proteínas de pared involucradas en virulencia. En *Trypanosoma brucei*, un protozooario parásito que causa la enfermedad del sueño, los genes *vsg* presentes en regiones subteloméricas codifican para variantes de la proteína de cubierta que cubre casi la totalidad del protozooario. El *trypanosoma* expresa casi exclusivamente un único gen *vsg* y periódicamente cambia la expresión hacia otro gen *vsg* de su reservorio de cerca de 1000 genes *vsg*, lo que le permite evadir el sistema inmune constantemente [15]. En *Plasmodium falciparum*, el agente causal de la malaria, los genes subteloméricos *var* codifican para variantes de proteínas

de superficie involucradas en citoadherencia [16]. *Pneumocystis carinii*, otro patógeno, cuenta con cerca de 100 genes subteloméricos que codifican para glicoproteínas mayores de superficie (MSGs) involucradas en virulencia.



**Figura 2.** Dendrograma de relaciones filogenéticas entre secuencias de genes parálogos del gen *EPA1* en el genoma de *C. glabrata* de la cepa BG2. Construido con base en las secuencias del dominio N-terminal usando el método de neighbor-joining. La mayoría de estos genes se encuentran localizados en regiones subteloméricas.

#### 1.4 Dominios del genoma y silenciamiento transcripcional

El DNA en los genomas de eucariotes se empaqueta por la acción de proteínas en dos distintos tipos generales de cromatina que permiten cambios en la expresión génica. La eucromatina se asocia a secuencias transcripcionalmente activas y se observa como bandas pobremente teñidas en cromosomas durante la interfase. Por otro lado la heterocromatina es usualmente rica en secuencias repetidas, baja en densidad génica y presenta poca accesibilidad a factores transcripcionales. Todas estas características se correlacionan con una baja expresión génica, y comúnmente se considera a la heterocromatina como un sinónimo de cromatina silenciada. Aunque se describen como dos distintos tipos de cromatina, la formación de cada uno de ellas puede producirse por diferentes mecanismos y con diferentes características.

Usualmente entre las características moleculares de la heterocromatina destaca: (a) desacetilación de residuos de lisina en histonas, (b) metilación de citosinas en los residuos CpG, y (c) metilación de la histona H3 en la lisina 9.

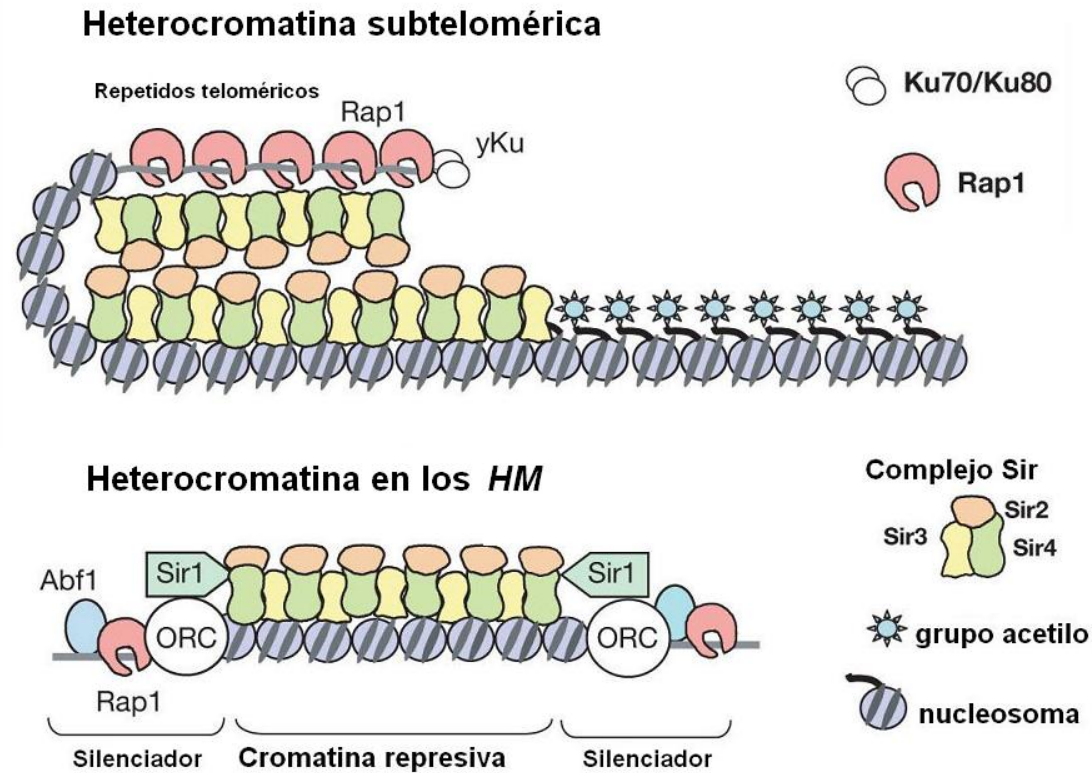
El silenciamiento es una forma de represión transcripcional que se presenta en regiones amplias de DNA que abarcan a más de un gen y en general no depende del promotor de dichos genes. En contraste, en la represión gen-específica, un solo promotor es blanco de la represión por medio de un represor o un complejo que reconoce una secuencia específica en este. El silenciamiento se presenta sólo en ciertas regiones cromosomales y depende en gran medida de la posición de un gen en el genoma y de la ausencia de elementos de barrera que impidan la propagación de los complejos de silenciamiento o de modificaciones de las histonas en la región.

El silenciamiento transcripcional requiere de la presencia de elementos en *cis* llamados silenciadores así como sus correspondientes factores de acción en *trans*. Las regiones del DNA que se encuentran silenciadas forman una estructura de la cromatina especializada que inhibe la transcripción. Las proteínas que participan en el silenciamiento varían según el organismo e incluso entre distintas regiones cromosómicas de un mismo organismo.

En *S. cerevisiae* se han identificado por lo menos tres regiones que están sujetas a silenciamiento. Estas regiones son los loci de apareamiento *HML* y *HMR*, las regiones subteloméricas, y los repetidos de DNA codificante para RNAr. En varios de estos loci, el silenciamiento juega un papel estructural que es independiente de la represión transcripcional [17].

Las principales proteínas estructurales presentes en la cromatina silenciosa son las llamadas Sir (**S**ilent **I**nformation **R**egulators): Sir2, Sir3 y Sir4. De estas tres proteínas del complejo Sir, solo la proteína Sir2 es común a las tres regiones silenciosas arriba mencionadas. El complejo Sir2/Sir3/Sir4 y Rap1 (**R**epressor **A**ctivator **P**rotein) son comunes en el silenciamiento subtelomérico y en el silenciamiento de los loci *HM* (Figura 3). El silenciamiento en los loci de apareamiento requiere de Sir1 para reclutar eficientemente las otras proteínas del complejo Sir; mientras que en los repetidos de DNAr, el complejo RENT a través de Net1 es el responsable de reclutar a Sir2 para el silenciamiento.





**Figura 3.** Modelo de dominios de heterocromatina formados con el complejo Sir en *S. cerevisiae*. Tanto las regiones subtelo méricas como los loci *HM* requieren de Rap1 y del complejo Sir2/3/4, pero presentan diferencias en la participación de otras proteínas esenciales para el silenciamiento. El silenciamiento telomérico requiere de Ku70/Ku80 y el silenciamiento en los loci *HM* se apoya en Abf1, ORC y Sir1. En ambos casos la heterocromatina tiene un papel estructural. Se propone que la heterocromatina telomérica se pliega sobre sí misma hacia el interior, lo que forma una estructura que favorece el silenciamiento y protege al telómero de la degradación. Imagen tomada y modificada de Epigenetics© 2006 Cold Spring Harbor Laboratory Press [18].

## 1.5 Silenciamiento subtelo mérico

Los telómeros son los extremos naturales de los cromosomas eucariotes. Estos consisten de secuencias repetidas directas que son específicas de cada organismo. Los telómeros están desprovistos de nucleosomas, pero en su lugar contienen un complejo de proteínas que participan en diversos procesos y que protegen los extremos de los cromosomas (ver sección 1.15, telómeros).

Además del mantenimiento de la integridad del genoma, los telómeros actúan como elementos silenciadores al reprimir la expresión de genes que naturalmente se localizan en su cercanía (genes nativos) o de genes insertados en las mismas regiones. En *S. cerevisiae* estudios genéticos y bioquímicos indican que genes posicionados en la cercanía de los telómeros presentan represión transcripcional, un fenómeno llamado efecto mediado por la posición del telómero (TPE, por sus

siglas en inglés)[19]. Esta cromatina silenciosa puede ser heredada a las células hijas después de la división celular y mantenerse por algunas generaciones. Dicha cromatina represiva no involucra cambios en el DNA por lo que se considera un cambio epigenético. El estado de esta cromatina puede revertirse en algunas células de la población lo que resulta en un fenotipo mosaico en el que algunas células presentan silenciamiento mientras que otras no, fenómeno conocido como *position effect variegation* (PEV) [20].

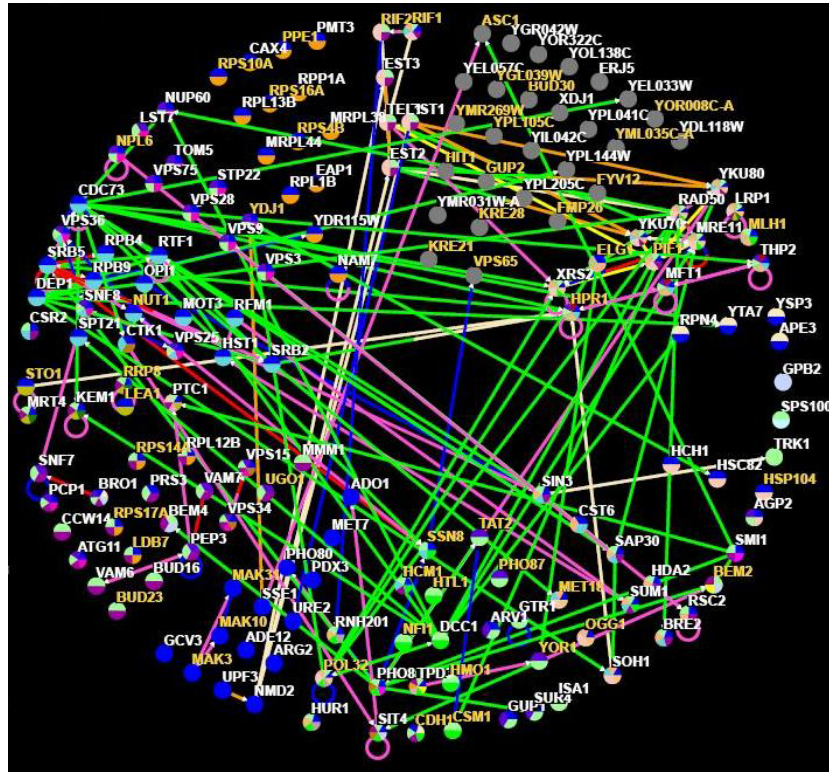
Se ha propuesto que el silenciamiento empieza en el telómero y se propaga hacia el centrómero. La evidencia que apoya esto se ha inferido de experimentos en los que el silenciamiento de un gen reportero disminuye conforme aumenta su distancia del telómero [21]. Sin embargo, el mecanismo por el cual el silenciamiento se transmite del telómero hacia regiones internas subteloméricas se encuentra en estudio. Modelos más completos de silenciamiento subtelomérico proponen que el silenciamiento originado en el telómero es multidireccional [22]. Dicho efecto es posible que se logre mediante la formación de un doblez (loop), un mecanismo que también va de acuerdo con la evidencia de la formación de dominios de silenciamiento de forma discontinua.

## 1.6 El silenciamiento subtelomérico en *S. cerevisiae*

En el modelo propuesto de silenciamiento subtelomérico, Rap1 se une específicamente a los repetidos de los telómeros e inicia la formación de un complejo multiprotéico que permite el establecimiento y mantenimiento del silenciamiento. Rap1 interacciona con Sir3 y Sir4, y en complejo soluble se ha encontrado junto con Sir2, Sir3 y Sir4. Sir4 interacciona con Sir2 la cual posee la actividad clave del complejo Sir. Sir2 es una desacetilasa de histonas dependiente de NAD<sup>+</sup>. Sir2 desacetila las histonas H3 y H4 de los nucleosomas. Las histonas desacetiladas crean sitios de alta afinidad para la unión de Sir3 y Sir4. Existe un mayor nivel de acetilación de la lisina 16, que de cualquiera de las otras tres lisinas en H4, la desacetilación de la lisina 16 parece ser suficiente para que se presente la propagación de la cromatina silenciosa [23-24]. Sin embargo, otros autores indican que todas las lisinas acetilables de las histonas H3 y H4 están completamente desacetiladas en los loci silenciosos [25]. La habilidad del complejo Sir3-Sir4-Sir2 de unirse a histonas hipoacetiladas permite la propagación del complejo Sir. Las proteínas Ku70 y Ku80, que funcionan como un heterodímero, se unen a los extremos del telómero y tienen un papel positivo en el silenciamiento, posiblemente al estabilizar o favorecer el complejo de silenciamiento a través de una interacción con la proteína Sir4. La proteína Rif1 (Rap1 Interacting Factor) en *S. cerevisiae* tiene un papel negativo en el silenciamiento subtelomérico y se propone que al interactuar con Rap1 compite en cierta medida con el complejo Sir por la interacción con Rap1. Las propiedades del TPE en los distintos telómeros no son necesariamente las mismas y varían de un telómero a otro.

Además de Rap1, Rif1, Ku70-Ku80 y el complejo Sir, existen más de 50 genes que afectan el TPE [26]. Muchos de estos genes solo tienen efectos modestos en el nivel de silenciamiento y posiblemente no actúen directamente en la formación de la cromatina silenciosa. Algunos genes involucrados en el equilibrio de la longitud de los telómeros también están involucrados en los distintos niveles de silenciamiento observados para el TPE. En *S. cerevisiae* y *C. glabrata*, mutantes que generan variaciones en la longitud normal de los telómeros, como *HDF1* y *HDF2* (que codifican para las proteínas Ku70 y Ku80, respectivamente) que generan telómeros más cortos [27-29] están asociadas con diferencias en los niveles del silenciamiento subtelomérico [21]. Mutantes en Rif1 que producen un alargamiento de los telómeros [14, 30] muestran fenotipos de aumento o disminución en los niveles de silenciamiento subtelomérico en *S. cerevisiae* y *C. glabrata*, respectivamente [14, 21]. Además de Ku70, Ku80 y Rif1, existen 170 genes cuyo fenotipo presenta cambios en la longitud de los telómeros (122 genes con alargamiento de telómeros, 50 genes con acortamiento de telómeros) (Figura 4) [31]. La gran cantidad de proteínas y complejos presentes en los telómeros, sus diferencias en localización nuclear y la extensión de los telómeros, no permiten definir este fenómeno en términos de una cuantas proteínas, ya que todos estos procesos afectan directamente el silenciamiento subtelomérico. Por esta razón, el TPE puede ser considerado como un proceso que puede variar en gran medida sin que se elimine completamente, dependiendo de cambios en las condiciones ambientales, cambios en el ciclo celular o alteraciones en cualquiera de los componentes que están directa o indirectamente involucrados. Estas características además de la alta frecuencia de recombinación de las regiones subteloméricas posiblemente explican el por qué genes esenciales no se encuentran codificados en regiones cercanas a los telómeros.

En *S. cerevisiae* la mayoría de los estudios de silenciamiento se han realizado con telómeros truncados y la región silenciada se extiende alrededor de 4-8 kb respecto al telómero [32]. En *C. glabrata* el silenciamiento se extiende por lo menos a 20 kb del telómero en los cromosomas I<sub>-R</sub> y E<sub>-R</sub> estudiados [21], y en *Aspergillus nidulans* el TPE se extiende por lo menos 30 kb en el cromosoma E [33].



**Figura 4.** Interacciones entre 172 genes identificados por Askree *et al.* [34] cuya delección, confiere un fenotipo de acortamiento o alargamiento de los telómeros. (Telómeros largos, nombres en anaranjado, telómeros cortos, nombres en blanco). Tomada de [31].

## 1.7 Las proteínas de silenciamiento subtelo­mérico

### Sir2

Sir2 forma parte de la familia de las sirtuinas, proteínas que se encuentran conservadas desde bacterias hasta humanos. Esta familia se caracteriza por contener desacetilasas de histonas dependientes de  $\text{NAD}^+$ . La función enzimática de Sir2 acopla la reacción de desacetilación con la hidrólisis de  $\text{NAD}^+$ . Una molécula de  $\text{NAD}^+$  es convertida en ADP-ribosa + nicotinamida por cada grupo acetilo removido de la lisina. El grupo acetilo removido se transfiere a la ADP-ribosa, formando 2'-O-acetyl-ADP ribosa.

### Sir3

Sir3 no posee actividad enzimática conocida, pero juega un papel estructural en el ensamblaje de la cromatina silenciosa. Sir3 es reclutado al silenciador de forma independiente del complejo previamente formado Sir2-Sir4. Los primeros 214 aminoácidos de Sir3 muestran un 50% de identidad con el amino terminal de Orc1.

El dominio N-terminal de Orc1 no se requiere para la replicación pero sí para el silenciamiento mediante la unión de Sir1 [35]. El dominio de unión de Sir1 en Orc1 no se encuentra conservado en Sir3, razón por la cual Sir3 no interacciona con Sir1.

Sir3 es fosforilado, sin embargo, no se conoce si esta fosforilación regula su actividad. Sir3 es hiperfosforilado en respuesta a choque térmico, limitación de nutrientes, feromona de apareamiento, y estos cambios en fosforilación correlacionan con cambios en el silenciamiento [36-37].

Estas observaciones apuntan a que el silenciamiento es sensible a las condiciones ambientales, quizá como resultado de la acción de vías de señalización con cinasas que tienen como blanco a las proteínas Sir.

## Sir4

Al igual que Sir3, Sir4 no posee actividad enzimática conocida pero desempeña un papel estructural en la formación de la cromatina silenciosa. Sir4 interacciona con proteínas de unión a los silenciadores como Rap1 y a su vez se requiere para la asociación con Sir2 y Sir3. Sir4 también interacciona con Dis1/Ris1, un miembro de la familia Swi/Snf que hace permisible la cromatina silenciosa para la recombinación durante el cambio fenotípico de la información de tipo de apareamiento [38].

Sir4 interacciona con dos hidrolasas de ubiquitina, Dot4 y Ubp3. La pérdida de la actividad de Dot4 resulta en una disminución del silenciamiento subtelomérico [39].

## Ku70 y Ku80

En eucariotes, Ku es un heterodímero constituido por dos subunidades. Para *S. cerevisiae* estas subunidades son de aproximadamente 70 y 80 kDa, conocidas como Ku70 y Ku80 y codificadas por los genes *HDF1* y *HDF2*, respectivamente. Las proteínas Ku se han mantenido a lo largo de la evolución de los eucariotes resaltando su vital importancia en procesos celulares, e incluso homólogos de Ku han sido identificados en organismos de los dominios Archea y Bacteria. La mayor parte de la proteína Ku se encuentra principalmente en el núcleo y de forma estable al formar el complejo Ku70-Ku80. Este complejo tiene funciones celulares en la protección de los telómeros, en la reparación de cortes de doble cadena en el DNA, en rearrreglos génicos, movimiento de elementos genéticos móviles y transcripción. Cuando el complejo Ku se localiza en los telómeros, este regula su extensión, los protege de la recombinación y degradación nucleolítica, determina en parte su localización nuclear y promueve el silenciamiento transcripcional de los genes próximos al telómero (TPE).

En *S. cerevisiae*, se ha mostrado que Ku participa en la localización de los telómeros en la periferia nuclear [40], y se requiere para el establecimiento del silenciamiento transcripcional de genes localizados en regiones subteloméricas [27-28]. Uno de los papeles clave de Ku en la protección del extremo del telómero,

es limitar la actividad de nucleasa responsable de la degradación de las citosinas que generan la cola de guanina de cadena sencilla al final de los telómeros.

La re-síntesis de la cadena de citosinas al final del telómero al final de la fase S puede ser defectuosa en células deficientes de Ku [41]. Como consecuencia de esta estructura anormal, las células que carecen de Ku son termosensibles. Esta termosensibilidad es más probable que se deba a defectos en el mantenimiento del telómero, que a un defecto generalizado en la reparación del DNA, puesto que la sobreexpresión de componentes del complejo de la telomerasa como *TLC1*, *EST1* y *EST2*, suprime parcialmente la termosensibilidad en cepas deficientes de Ku [27, 42-43]. Mutantes de Ku en *S. cerevisiae* son termosensibles a 37 °C [44], y sus telómeros son más cortos en longitud respecto a cepas silvestres [27-29]. Estos mismos fenotipos también han sido observados en *C. glabrata*, en los que mutantes nulas de *HDF1* y *HDF2* presentan acortamiento de los telómeros [21], y termosensibilidad a 45 °C (este trabajo, Figura S6).

Ku también puede mediar el control de la longitud de los telómeros al secuestrar componentes del núcleo catalítico durante la fase G<sub>1</sub> del ciclo celular [45]. Ku interacciona genéticamente con componentes del complejo de la telomerasa que incluyen Cdc13, Tlc1, Est1, Est2 [45-49].

## Rif1

En *S. cerevisiae* Rif1 interacciona con Rap1[30] y con Rif2 [50]. Estas tres proteínas regulan negativamente la longitud de los telómeros y aunque se requiere de Rap1 para la unión de Rif1 y Rif2, son estas últimas dos proteínas las que están involucradas en el mantenimiento de la longitud de los telómeros. En cepas en las que se dirige artificialmente Rif1 o Rif2 a los telómeros en mutantes en el C-terminal de Rap1 (dominio de interacción con Rif1/2) el acortamiento de los telómeros es proporcional al número de moléculas reclutadas [51].

En *Schizosaccharomyces pombe* Rif1 se localiza de forma heterogénea en el núcleo en células silvestres, pero colocaliza con los telómeros en cepas *rap1*. Esto sugiere que solo una fracción de las moléculas de Rif1 están unidas a los telómeros en una cepa silvestre [52].

En *C. glabrata* no existe un ortólogo para Rif2 pero sí para Rif1. Mutantes en Rif1 en esta levadura, tienen una reducción casi completa del silenciamiento subtelomérico.

Es posible que los defectos de silenciamiento observados en mutantes Rif1 sean provocados indirectamente por el cambio en la longitud de los telómeros producido.

## 1.8 Silenciamiento de los loci de apareamiento *HML* y *HMR* en *Saccharomyces cerevisiae*

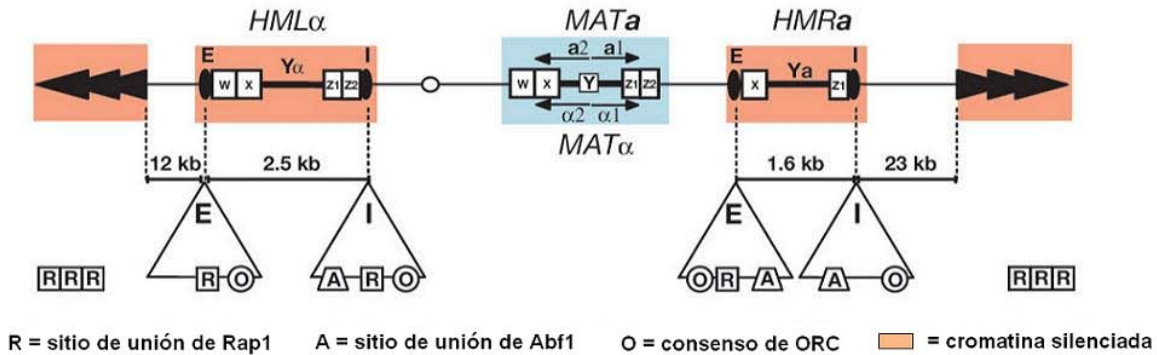
En *S. cerevisiae*, los loci *HML*, *MAT*, y *HMR* que contienen la información que determinan el tipo de identidad celular para el apareamiento (factores transcripcionales  $\alpha$  ó  $\alpha$ ) se encuentran en el cromosoma III. De estos 3 loci, *HML* y *HMR* se encuentran silenciados y *MAT* es el locus activo (Figura 5).

En los loci *HML* y *HMR* el reclutamiento del complejo Sir se logra a partir de la interacción de proteínas que reconocen secuencias específicas en los elementos llamados silenciadores E e I que se encuentran a ambos extremos de dichos loci. Estos silenciadores contienen secuencias de unión para los factores esenciales Rap1, Abf1, y el complejo ORC. Los sitios de unión en el DNA para estas proteínas se conocen como proto-silenciadores. Un solo sitio de unión de Rap1, Abf1 o el complejo ORC en muchos contextos puede potenciar la acción de un silenciador cercano sin poseer actividad de silenciador por sí solo [53]. En el contexto natural de estos silenciadores dos de los tres sitios de unión de estos factores son suficientes para producir el silenciamiento lo que indica que estos factores de alguna forma tienen un efecto redundante para el reclutamiento del complejo necesario para el silenciamiento en este locus [54]. Una explicación posible de esta redundancia se debe a que las distintas proteínas reclutadas por estos sitios de unión convergen en facilitar la unión de Sir4-Sir2 que es la parte activa del complejo de silenciamiento. Rap1 recluta a Sir4, Abf1 interacciona con Sir3, Sir3 interacciona con Sir4, el complejo ORC tiene afinidad por Sir1, mientras que Sir1 interacciona con el amino terminal de Sir4. Mutaciones en los genes que codifican para Abf1, Rap1 y subunidades del complejo ORC irrumpen el silenciamiento en estos loci [55-58].

A diferencia del silenciamiento subtelomérico, en el silenciamiento de los loci de *HML* y *HMR* participa la proteína Sir1. Esta proteína juega un papel en el establecimiento del silenciamiento al facilitar el ensamble de las otras proteínas Sir en estos silenciadores. Sin embargo Sir1 no es esencial para mantener el silenciamiento una vez establecido, y no se propaga junto con el complejo Sir2,3,4 a sitios más allá de los silenciadores [59]. En *C. glabrata* no se encuentra presente un ortólogo de Sir1.

En su contexto cromosómico, la delección de *HMR-E* lleva a una completa desrepresión de *HMR*, mientras que una delección de *HMR-I* no tiene efecto en un contexto silvestre, pero sí en presencia de otras mutaciones que debiliten el silenciamiento [60]. Por otra parte cualquiera de los silenciadores E e I de *HML* puede mediar el silenciamiento en ausencia del otro [61].

A pesar de que Rap1, Abf1 y ORC muestran muy poca similitud estructural, existe una redundancia de funciones para la formación del silenciamiento en estos loci.



**Figura 5.** Dominios silenciados en los loci de apareamiento *HML*, *HMR* y los telómeros (flechas negras). El locus *MAT* es el único locus transcripcionalmente activo entre los loci de apareamiento. Los loci *HML* y *HMR* contienen los silenciadores E (por Esencial) e I (por Importante), que mantienen la represión de los genes de factores transcripcionales codificados en el interior del locus. Estos silenciadores contienen sitios de unión para Rap1, Abf1 y ORC. Imagen tomada de Epigenetics© 2006 Cold Spring Harbor Laboratory Press [18].

### 1.9 Modelos de silenciamiento transcripcional en levaduras

En el silenciamiento transcripcional, en el que se asume que la represión transcripcional de los genes se debe a su localización en los cromosomas y no a su secuencia, se han propuesto dos modelos para explicar cómo se inhibe la transcripción. El modelo de impedimento estérico apunta a que el silenciamiento inhibe la unión de proteínas activadoras [19, 62], o del complejo de la RNA polimerasa II [63], con sus sitios de unión al DNA. El otro modelo propone que los activadores y la RNA polimerasa II sí tienen acceso a sus sitios blanco, pero existe un impedimento en otro punto posterior del proceso de transcripción (downstream inhibition model) [64].

Existen evidencias que apoyan parcialmente cada uno de estos modelos. El modelo de impedimento estérico lo apoyan ensayos que evalúan la accesibilidad al DNA de distintas proteínas o enzimas. Las regiones de la cromatina que se encuentran silenciadas son menos accesibles a la metiltransferasa de DNA Dam [19], enzimas de restricción [62], proteínas requeridas para la reparación del DNA [65] y a la endonucleasa HO [66]. Evidencia que pareciera ir en contra de este modelo proviene de estudios en los que la sensibilidad a la nucleasa micrococcal es mayor en la región silenciada del promotor *HMLα* y en el DNA entre ambas cajas TATA, que en las regiones equivalentes del locus *MATα* que se encuentra transcripcionalmente activo [67].

Por otro lado existe evidencia que apunta hacia el modelo de inhibición posterior a la unión de las proteínas activadoras. La proteína de unión a la caja TATA (TBP), y la RNA Polimerasa II se encuentran presentes en el promotor de *HMRa1* aún cuando el gen esta silenciado. De igual forma el factor de transcripción de choque térmico (HSF), la TBP y la polimerasa II ocupan el promotor de un transgen HSP82 silenciado al insertarse en el locus de *HMR-E* [64].



Otros autores encuentran resultados que tienen puntos que refutan las interpretaciones del modelo de impedimento estérico y las del modelo de inhibición corriente abajo, dado que en términos cualitativos ambos se presentan en distinta proporción y sus efectos pueden ser independientes. Ante esto se plantea una solución intermedia en la que el silenciamiento puede ser considerado en términos de una reducción de la probabilidad de que la RNA polimerasa II ocupe los promotores de los genes silenciados [68].

### 1.10 Silenciamiento y orientación de los elementos silenciadores

En algunos casos se ha observado que la orientación de los elementos silenciadores tiene un efecto sobre la dirección hacia la cual se favorece el silenciamiento. En el locus *HML* la inversión del silenciador I incrementa el silenciamiento fuera del locus mientras que debilita el silenciamiento hacia la parte interna del locus [69]. Sin embargo, los alrededores de *HML* no presentan actividad detectable de elementos de barrera. Esto sugiere que algunos de los silenciadores delimitan un dominio represivo mediante el establecimiento unidireccional del silenciamiento [69-70]. Para *HMR-E* y *HML-I*, la direccionalidad de estos silenciadores tiene correlación con un posicionamiento asimétrico de los nucleosomas. El arreglo y composición de los sitios de unión de Abf1, ORC1 y Rap1 en estos silenciadores genera una asimetría funcional en la propagación del silenciamiento. La propagación del complejo Sir a lo largo de la cromatina depende de su asociación con los nucleosomas y posiblemente requiera de un arreglo continuo de nucleosomas cercanamente posicionados. Específicamente los nucleosomas están establemente posicionados cerca del sitio de unión de Abf1, y el silenciamiento se presenta de forma preferente en el lado Abf1 de estos silenciadores [71].

### 1.11 Dominios estructurales y funcionales de la cromatina

La cromatina en los organismos eucariotas se encuentra finamente regulada para permitir la expresión de un conjunto particular de genes cuando son requeridos. El genoma eucariota se encuentra organizado principalmente en dos dominios estructurales activos e inactivos. Distintos elementos reguladores y las proteínas de acción en *trans* que actúan en los elementos reguladores como potenciadores (enhancers), promotores, silenciadores y regiones de control del locus mantienen la expresión de los distintos genes en el genoma. Los dominios inactivos en un momento particular se conocen como heterocromatina y los dominios en los que principalmente se encuentran los genes transcripcionalmente activos se conocen como eucromatina. Estos dos dominios se encuentran dispersos en todo el genoma.

## 1.12 Elementos de frontera o elementos aislantes

Los distintos dominios de expresión de la cromatina se mantienen separados por elementos de frontera o elementos aislantes (“boundary elements o insulators”). Estos elementos evitan que los efectos de activación o represión de una región del genoma afecten los niveles de expresión de genes adyacentes.

Los insulators han sido identificados en muchos genomas eucariotes, lo que sugiere que estos elementos tienen un papel conservado para definir los dominios de expresión génica [72-73]. La mayoría de los insulators tienen dos propiedades principales: una actividad anti-enhancer que bloquea la comunicación entre un enhancer y el promotor (enhancer-blocker insulator) y una actividad anti-silenciadora (barrier insulator), que previene la propagación de la cromatina silenciosa. Sin embargo, no todos los insulators poseen las dos propiedades anteriormente descritas y en otros casos ambas pueden ser separadas en dos regiones diferentes; tal es el caso del insulator H4 del gen de la  $\beta$ -globina de pollo [74].

## 1.13 Mecanismos de la actividad de frontera

Los mecanismos por los cuales los insulators ejercen su función son variados por lo que un solo mecanismo general no puede proponerse. Las ideas actuales de los mecanismos de acción conjuntan el reclutamiento de factores transcripcionales, complejos remodeladores de la cromatina, desplazamiento o eliminación de nucleosomas de una región, localización de las regiones en ciertos dominios nucleares y la formación de dominios de la cromatina topológicamente incompatibles para la propagación del silenciamiento o para la activación génica.

Algunos promotores fuertes pueden funcionar como barreras del silenciamiento. Los genes *TEF1* y *TEF2* de *S. cerevisiae* y *TEF* de *Ashbya gossypii* son resistentes al silenciamiento transcripcional en el locus *HML*, es decir funcionan como barreras que impiden el silenciamiento originado por elementos silenciadores que flanquean dicho locus. Las secuencias ubicadas en el UAS de *TEF2* son necesarias y suficientes para la actividad de barrera. Paradójicamente, en esta región del UAS, las secuencias que funcionan como barrera se localizaron en tres repeticiones con variantes de la secuencia consenso de unión de Rap1. Mutaciones en estas secuencias consenso eliminan el efecto de barrera. [75]

La doble funcionalidad de las proteínas que interactúan con muchos de los insulators añade un grado más de complejidad en la resolución del mecanismo por el cual estos elementos de frontera separan dos dominios. Rap1 es una proteína “biológicamente compleja”, la cual dependiendo del contexto puede mediar silenciamiento, activación de la transcripción, y posiblemente una función de barrera. Estas funciones opuestas se localizan en diferentes dominios de la proteína [76]. La proteína Rap1 se une a muchos sitios a lo largo del genoma y actúa como un regulador transcripcional global tanto para la activación como para la represión [77], para la regulación de la longitud de los telómeros y en el silenciamiento subtelomérico. En este sentido Rap1 se comporta como la proteína

con dedos de zinc Su(Hw) en *Drosophila*, la cual se une al elemento transponible *gypsy* que funciona como un insulador. En otros loci, Su(Hw) funciona como activador o represor [78]. El mecanismo de insulador mediado por Su(Hw) en *gypsy* sólo es mediado en presencia de la proteína mdg4, ya que en ausencia de mdg4, Su(Hw) actúa como un silenciador que promueve la formación de heterocromatina en forma bidireccional. Finalmente, la proteína altamente conservada en vertebrados CTCF, que se une al insulador H4 del locus de la  $\beta$ -globina de pollo, también está implicada en funciones de activación y de represión.

### 1.14 Importancia del contexto genómico en la expresión génica.

Es importante notar que el efecto a favor de la activación o de la represión que median estas proteínas en común es mediado por el contexto genómico en particular. El balance global de todos los elementos reguladores que puedan ejercer función sobre un locus y sus interacciones específicas con las proteínas o complejos reclutados por dichos elementos, determina los niveles de expresión en el locus. La fuerza o potencial de un elemento barrera está determinada por la fuerza de los elementos silenciadores en una región. La secuencia *ETC4* (extra TFIIC sitio 4), que es un sitio de unión del complejo TFIIC de la RNA polimerasa III en *S. cerevisiae* funciona como una barrera para la propagación del silenciamiento al exterior del locus *HMR* [79], pero si se coloca en el interior de dicho locus solo funciona como una barrera débil. De igual forma la efectividad de un insulador está influida por la fuerza de un promotor o un enhancer, lo que indica que existe una competencia entre el insulador con el promotor o con un enhancer [80-81].

En otros casos, la frontera entre los dominios de eucromatina y heterocromatina no está ubicada en un punto muy definido del genoma, sino más bien puede manifestarse como una zona de competencia entre dos actividades enzimáticas, o como una zona en la que la remoción del sustrato del complejo Sir evita su propagación. En *S. cerevisiae* la mutante de la desacetilasa de histonas *rpd3 $\Delta$*  conlleva a una mayor propagación del complejo Sir en regiones subteloméricas y a la represión de genes subteloméricos [82]. Un mecanismo propuesto de cómo Rpd3 funciona en la formación de fronteras en la cromatina es por la remoción del sustrato de Sir2. Se propone que Rpd3 desacetila residuos de lisina equivalentes a los que desacetila Sir2 en las histonas H3 y H4. Esta remoción del sustrato conlleva a que Sir2 no pueda producir O-acetil-ADP ribosa (OAADPR) por el consumo de NAD<sup>+</sup>. La ausencia de OAADPR no permite a su vez la unión de Sir3, que requiere de dicha molécula para su unión a la histona, lo que previene la propagación del silenciamiento [83].

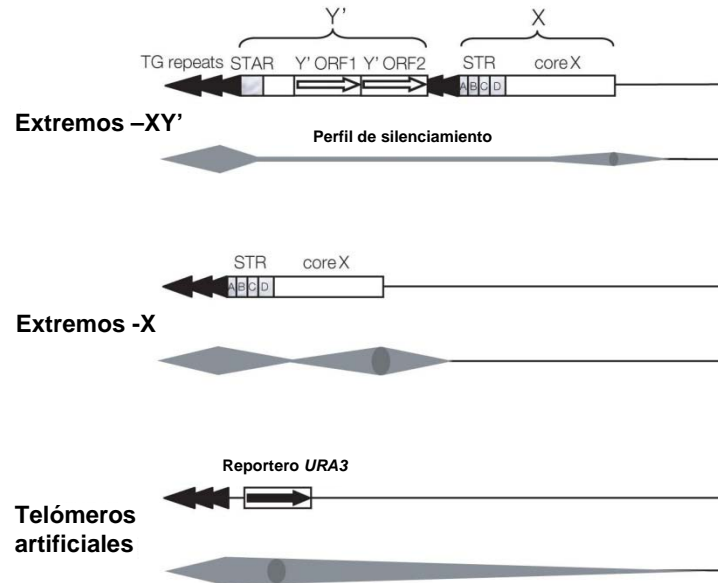
## 1.15 Los Telómeros

Los telómeros son los extremos de los cromosomas lineales eucariotas y contienen una serie de secuencias cortas y repetitivas distintivas de cada especie. Estas estructuras se encuentran libres de nucleosomas pero se encuentran cubiertas por complejos de proteínas que participan en diversas funciones. Algunos de los complejos son esenciales para mantener la integridad del genoma al proteger los extremos de los cromosomas de la degradación y fusión durante la proliferación celular. Las regiones cercanas a los telómeros son propensas a rearrreglos cromosomales y a duplicaciones.

En *S. cerevisiae* la secuencia de los repetidos teloméricos es frecuentemente denotada como  $G_{1-3}T$ ; sin embargo, un consenso más preciso es  $T(G)_{2-3}(TG)_{1-6}$  [84]. La mayoría de las cepas poseen aproximadamente entre 350-500 pb de estos repetidos. En *C. glabrata* la secuencia de los repetidos teloméricos es GGGTGCTGTGGGGTCT [85], esta secuencia corresponde con una secuencia dentro del gen *TLC1* (GGGTACTGTGGGGTCTGGGGTGCTG), el cual codifica para un RNanc que es parte del complejo de la telomerasa [86]. A partir de este molde, la telomerasa copia la secuencia para los repetidos del telómero. En la cepa silvestre de laboratorio BG2 [87], los repetidos teloméricos pueden tener un consenso más general GGGTDCTGT( $G_{3-5}$ )TCT, (D, A/G/T). Este ligero grado de diversidad de la secuencia puede ser debido a síntesis abortiva en diferentes puntos a lo largo del molde, degradación nucleolítica y/o replicación semiconservativa incompleta en los trectos dúplex de los repetidos. Los extremos del telómero son altamente dinámicos, debido a un balance entre procesos de acortamiento y extensión mediado por la telomerasa. La telomerasa actúa preferentemente solo en un grupo de telómeros en cada ciclo celular [88]; estas características reflejan la particularidad de los telómeros de ser heterogéneos en extensión, incluso en un mismo telómero entre dos células.

Otra característica de los telómeros es la presencia de una extensión de cadena sencilla de guanina (G) en el extremo 3' del telómero. Esta secuencia que sobresale del extremo es protegida por la proteína Cdc13 y es blanco de un gran número de complejos. Dicha secuencia también es sustrato de la telomerasa y a la par de un gran número de proteínas que regulan su actividad.

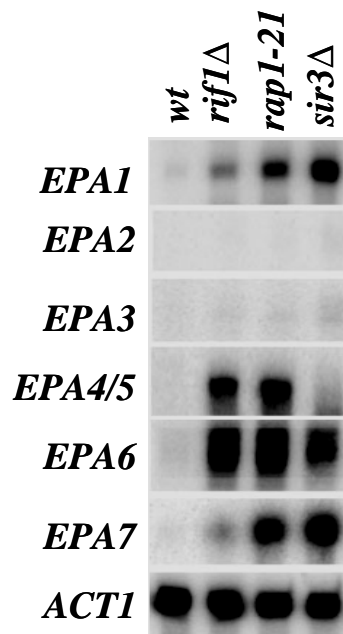
En *S. cerevisiae*, en el DNA adyacente a los telómeros se encuentran dos tipos de elementos con secuencias repetitivas llamados X y Y'. El elemento X se encuentra presente en todos los telómeros. Dentro de X y Y' se encuentran elementos que bloquean la propagación del silenciamiento llamados STARs (del inglés subtelomeric antisilencing regions) [32, 89] (Figura 6). Estos elementos generan dominios discontinuos en la propagación del silenciamiento telomérico, al funcionar como insulators. Cuando dos STARs flanquean un gen reportero, su expresión no está influida por elementos silenciadores circundantes, a pesar de que estos siguen siendo activos en un segundo gen reportero no flanqueado por STARs [89]. El análisis de los elementos de barrera en los STARs indica que estos contienen sitios de unión para los factores transcripcionales Reb1 y Tbf1 [32, 89-90]. Es posible que los efectos de barrera de los STARs permitan delimitar un compartimiento particular de la región subtelomérica respecto a otros efectos del genoma.



**Figura 6.** Los telómeros de *S. cerevisiae* se clasifican en dos categorías principales: los que contienen el core X y los que contienen el core X+Y'. Las secuencias STARs y STRs en los elementos X y Y' contienen elementos que bloquean la propagación de la heterocromatina y dejan una región de represión reducida. El plegamiento a través de proteínas entre elementos del core X y el telómero puede dejar áreas no reprimidas entre los puntos de contacto. Obsérvese que la zona y nivel de silenciamiento representado en gris en la parte inferior de cada telómero es discontinuo en los telómeros con extremos X y X+Y', y continuo en los telómeros artificiales truncados en los que la inserción del reportero reemplaza importantes elementos subtelo méricos. Imagen tomada de Epigenetics© 2006 Cold Spring Harbor Laboratory Press [18].

## 2. ANTECEDENTES DIRECTOS

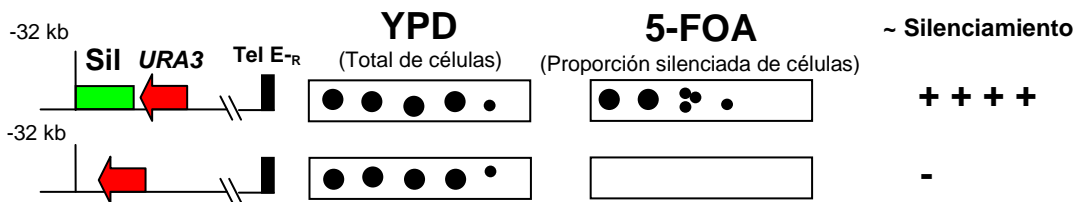
Previamente se ha demostrado que diversas regiones subtelo méricas de *C. glabrata* se encuentran silenciadas, tanto los genes *EPA* nativos en ellas, así como reporteros insertados en estas regiones. La maquinaria de silenciamiento en *C. glabrata* es análoga a la de *S. cerevisiae*, que ha sido mejor estudiada. Este silenciamiento depende de las principales proteínas de silenciamiento subtelo mérico. Se ha mostrado que en *C. glabrata* el silenciamiento subtelo mérico depende de las proteínas Rap1, Sir2, Sir3, Sir4, Rif1 y Ku70/Ku80 [14, 21, 91]. Sin embargo, estas proteínas de silenciamiento participan en diferente grado en distintas regiones subtelo méricas [21]. Además de esto, la expresión de distintos genes *EPA* estudiados (*EPA1* a *EPA7*) se regula de forma diferente por las mismas proteínas de silenciamiento subtelo mérico (Figura 7). Por ejemplo, Rif1 tiene un efecto fuerte de regulación negativa sobre la expresión de *EPA6*, mientras que solo tiene un ligero efecto en la expresión de *EPA7*, a pesar de que ambos genes están localizados a una distancia similar del telómero en el cromosoma C (telómeros C<sub>L</sub> y C<sub>R</sub> respectivamente) [14, 21]. Por distintas inserciones de *URA3* así como por los ensayos de expresión de los genes *EPA* en el locus subtelo mérico E<sub>R</sub> sabemos que a pesar de que una región de la cromatina subtelo mérica no esté silenciada, los genes *EPA* en dicha región pueden no expresarse si no se presentan las condiciones adecuadas para su activación. En el locus subtelo mérico E<sub>R</sub>, inserciones independientes de *URA3* al 5' y al 3' de *EPA3* se encuentran silenciadas en una cepa wt y se expresan en mutantes *sir3Δ*; sin embargo, en cepas *sir3Δ* no hay expresión de *EPA3* a pesar de que aparentemente su dominio no está silenciado (Figura 7).



**Figura 7.** Niveles de transcrito de los genes *EPA1* a *EPA7* en cepas de *C. glabrata* en fase estacionaria. Los niveles de expresión se obtuvieron mediante un ensayo de protección a la nucleasa S1 [14].

Por tal razón las mediciones de expresión del reportero *URA3* para inferir el estado general de la cromatina en una región, no se pueden correlacionar directamente con la expresión de los genes propios de un locus. Estos datos sugieren la existencia de una capa de regulación adicional y específica que controla de forma diferencial cada región subtelo mérica y cada gen. La regulación diferencial de cada región subtelo mérica es determinada por su composición y distribución de elementos en *cis*.

En estudios previos se encontró que existe una región de regulación negativa presente entre *EPA3* y el telómero  $E_{-R}$ . Esta secuencia puede mediar el silenciamiento del gen reportero *URA3* cuando se coloca adyacente a éste a una distancia de 32 kb de su telómero nativo  $E_{-R}$ . Cuando se elimina *Sil2126* del sistema reportero *Sil2126-URA3* a 32 kb del telómero, se pierde el silenciamiento. (Figura 8).



**Figura 8.** Una secuencia subtelo mérica del cromosoma  $E_{-R}$  produce silenciamiento de un reportero *URA3* ubicado a 32 kb del telómero.

La presencia de este tipo de secuencias en las regiones subtelo méricas de *C. glabrata* proporciona evidencia a favor de la noción de que existen diferencias en el nivel de silenciamiento y participación diferencial de las proteínas en el silenciamiento de distintas regiones subtelo méricas.

Otra característica adicional del telómero  $E_{-R}$ , es que a diferencia de los otros telómeros estudiados en esta levadura así como en *S. cerevisiae*, el silenciamiento subtelo mérico es aparentemente independiente de *Ku70* y *Ku80* en inserciones de *URA3* y para la expresión de los genes *EPA* de este locus.

El estudio de estas regiones cromosómicas en cuanto a la composición de elementos en *cis* así como las proteínas y complejos que se asocian a ellas, es importante para comprender a mayor detalle cómo es la regulación de algunos de los principales genes de virulencia en este patógeno. Este conocimiento también aporta información para entender procesos básicos de la naturaleza funcional de la cromatina subtelo mérica.

### 3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Inicialmente se consideraba que el silenciamiento subtelo mérico en *C. glabrata* era una forma de represión homogénea a lo largo de las regiones cercanas a los telómeros; sin embargo, como sugieren los datos presentados en la sección de antecedentes, el hecho de que la regulación tanto de la expresión de un gen reportero insertado en estas regiones (TPE), como la expresión diferencial de los genes *EPA* localizados en regiones subtelo méricas, indica que cada telómero tiene una regulación particular. La expresión que finalmente se observa de los genes presentes en estas regiones depende del contexto de cada telómero particular incluyendo las secuencias en *cis* presentes en las regiones subtelo méricas y de la accesibilidad de las proteínas que actúan en *trans* para regular este proceso.

En *S. cerevisiae* y en *C. glabrata*, el silenciamiento subtelo mérico en los telómeros estudiados depende entre otras proteínas del heterodímero Ku70/Ku80. Sin embargo, en el brazo derecho del cromosoma E ( $E_R$ ), se encontró que el silenciamiento no depende de estas proteínas [21]. Este caso es el único telómero estudiado en el cual el silenciamiento subtelo mérico no depende de Ku70 y Ku80. Además, la región subtelo mérica en  $E_R$  posee en la cercanía inmediata al telómero, un elemento silenciador (Sil2126) cuya función también es independiente de Ku70 y Ku80. Es posible, por tanto, que Sil2126 posiblemente tenga una función en el silenciamiento de este telómero.

### HIPÓTESIS

El elemento silenciador Sil2126 presente en el brazo derecho del cromosoma E ( $E_R$ ), mediante la unión de factores en *trans*, realiza una función redundante con la que llevan a cabo Ku70 y Ku80 en el silenciamiento, lo que resulta en que el silenciamiento en este telómero sea aparentemente independiente de las proteínas Ku.



#### 4. ESTRATEGIA

Para estudiar el silenciamiento subtelomérico y el elemento Sil2126, se siguió un enfoque genético con inserciones del reportero *URA3* o del sistema Sil-*URA3* en diferentes regiones cromosómicas. Estas inserciones del sistema Sil-*URA3* permiten estudiar distintas configuraciones del elemento Sil2126 en cuanto a extensión, localización, orientación, y a su dependencia de proteínas de silenciamiento.

El silenciamiento de los genes nativos *EPA1*, *EPA2* y *EPA3* del locus en el telómero E<sub>R</sub> se estudió por RT-PCR.

Los análisis de expresión de los reporteros *URA3* permiten hacer una correlación entre el estado transcripcional general de la cromatina en una región, con los niveles basales de expresión de los genes *EPA* en dicho locus.

## 5. OBJETIVO GENERAL

Estudiar con mayor detalle el silenciamiento subtelomérico en *Candida glabrata*, con especial énfasis en la determinación de las propiedades funcionales del elemento de regulación negativa Sil2126 presente en el brazo derecho del cromosoma E (E-R) donde se encuentran codificadas las adhesinas *EPA1*, *EPA2* y *EPA3*.

## OBJETIVOS PARTICULARES

- Determinar la participación de distintas proteínas de silenciamiento subtelomérico en la represión mediada por Sil2126.
- Delimitar o acotar los principales elementos funcionales dentro de la región de Sil2126.
- Determinar si la función de represión de Sil2126 depende del contexto del telómero.
- Establecer si la función del elemento Sil2126 depende de su posición y orientación.
- Determinar si la presencia de Sil2126 influye en la expresión de los genes *EPA* en el brazo derecho del cromosoma E.
- Proponer algún mecanismo funcional que explique cómo elementos subteloméricos (tales como Sil2126) determinan el silenciamiento particular de cada telómero y cómo se generan dominios discontinuos en el silenciamiento.

## 6. MATERIALES Y MÉTODOS

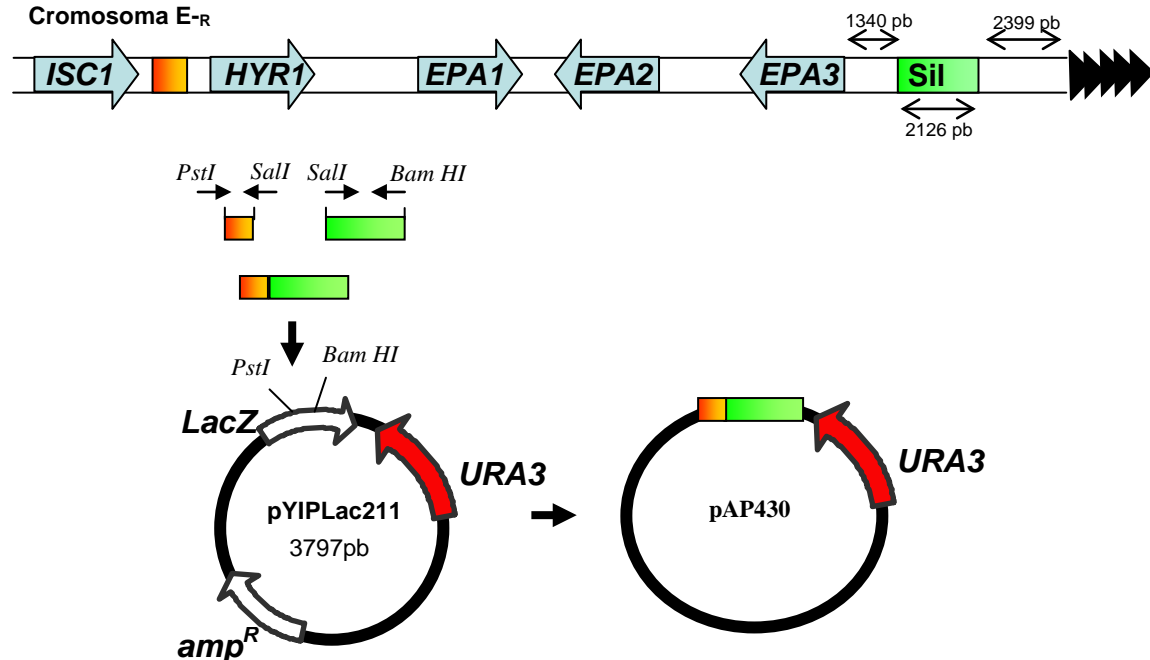
### 6.1 Cepas, plásmidos y oligonucleótidos.

Las cepas de *E. coli* y de *C. glabrata*, los oligonucleótidos y los plásmidos utilizados en este trabajo se presentan en las tablas respectivas en la sección de anexos.

### 6.2 Construcción de vectores para analizar el silenciamiento

Para la construcción de los distintos vectores empleados en este estudio se utilizaron técnicas básicas de Biología Molecular. Las enzimas de restricción empleadas fueron en su mayoría de New England BioLabs® Inc. y en menor medida de Invitrogen Life Technology® y Roche Applied Science®. Para las reacciones de ligación se utilizó la T4 DNA Ligasa® (Promega) y T4 DNA Ligasa (NEB).

Para poder estudiar las propiedades de la región de regulación negativa Sil2126 ubicada entre *EPA3* y el telómero  $E_{-R}$ , se construyó un vector base sobre el vector integrativo pYIP/*lac211*. En pYIP/*lac211* la secuencia Sil2126 fue clonada adyacente a una secuencia para su integración en el genoma de *C. glabrata* a 32 kb de los repetidos teloméricos del mismo telómero donde se encuentra en forma nativa [21]. En este vector, hacia el extremo 3' de Sil2126 se encuentra el reportero *URA3* de *S. cerevisiae* bajo el control de su mismo promotor (Figura 9). La orientación del promotor de *URA3* es distal a Sil2126. El vector resultante llamado pAP430 fue la base para la construcción de muchos otros de los vectores construidos para la integración del sistema Sil2126-*URA3* en otros cromosomas y para los vectores con la serie de deleciones en la secuencia de Sil2126.



**Figura 9.** Vector integrativo base para estudiar las propiedades del elemento Sil2126, en cuanto a extensión posición y orientación. Los triángulos negros representan las repeticiones teloméricas.

### 6.3 Delimitación de la región silenciadora Sil2126

La región de regulación negativa inicialmente clonada consta de 2126 pb. Es posible que los elementos funcionalmente importantes estén contenidos en una región mucho más pequeña. Para estudiar con mayor detalle este punto se construyeron versiones progresivamente más cortas de dicha región. Para las construcciones más cortas al 3' de esta región, se utilizaron los sitios de restricción presentes en forma nativa y se realizaron digestiones dobles usando un sitio interno en Sil2126 y un sitio externo al extremo 3'. Tras la digestión doble los plásmidos fueron religados. Para las construcciones más cortas al 5' se diseñaron primers Fw a diferentes distancias del extremo 5' que incorporan el sitio *SalI* y que hacen pareja con un único primer Rv que hibrida en el extremo 3' de Sil2126 y que incluye el sitio *BamHI*. Los productos de PCR fueron sustituidos por el fragmento *BamHI-SalI* en pAP430. Los distintos vectores construidos se muestran en la Tabla 1.

**Tabla 1.** Vectores integrativos y su tamaño remanente de la región Sil2126 utilizados para localizar los principales elementos funcionales de Sil2126.

Plásmido	Tamaño (pb)	Remanente de Sil2126 en (pb)
pAP430	6583pb	2126pb
<b>Delecciones al 3' de Sil2126 sobre pAP430</b>		
pAP566 ( <i>SmaI-EcoNI</i> ) $\Delta$	6254	1810
pAP567 ( <i>Acc65-BsrGI</i> ) $\Delta$	5686	1241
pAP568 ( <i>SmaI-PacI</i> ) $\Delta$	5307	866
pAP569 ( <i>SmaI-BsNI</i> ) $\Delta$	5134	694
pAP570 ( <i>SmaI-HpaI</i> ) $\Delta$	4859	416
pAP571 ( <i>SmaI-BseRI</i> ) $\Delta$	4777	334
pAP572 ( <i>SmaI-NheI</i> ) $\Delta$	4553	106
pAP509 ( <i>BamHI-SalI</i> ) $\Delta$	4454	0
<b>Delecciones al 5' de Sil2126 sobre pAP430</b>		
pAJ7	6321	1864
pAJ6	6121	1664
pAJ5	5845	1388
pAJ4	5355	899
pAJ3	4961	506
pAJ29	6544	2087
pAJ30	6515	2058
pAJ31	6468	2011
pAJ32	6423	1996
pAJ33	6379	1922
<b>Delección doble, al 5' y al 3' de Sil2126 sobre pAP430</b>		
pAJ1 (5'-334pb, 3'-885pb)	5365	907
<b>Delección en el interior de Sil2126 sobre pAP430</b>		
pAJ2 (334 - 885) $\Delta$	5674	1219

#### 6.4 Comprobación de las construcciones en plásmidos

Para la comprobación de los plásmidos se realizaron reacciones de PCR con oligonucleótidos específicos (ver tabla en anexos), así como digestiones con enzimas de restricción para determinar la presencia u orientación correcta de las secuencias de interés. Las enzimas de restricción empleadas fueron en su mayoría de New England BioLabs<sup>®</sup> Inc. y en menor medida de Invitrogen Life Technology<sup>®</sup> y Roche Applied Science<sup>®</sup>.

## 6.5 PCR

Las reacciones de PCR para obtener los amplicones utilizados en la construcción de los distintos vectores para integrar Sil2126-*URA3* en los cromosomas E, F, L y M fueron realizadas con la DNA polimerasa de alta fidelidad Phusion™ (Finnzymes). Los fragmentos para construir los plásmidos con la serie de deleciones al 5' de la secuencia Sil2126 se amplificaron utilizando la polimerasa de alta fidelidad Platinum® (Invitrogen).

Los PCRs diagnósticos de los plásmidos o de sus respectivas integraciones en *C. glabrata* se realizaron utilizando la polimerasa Amplificasa® (Taq DNA polimerasa, BIOGENICA) u otra Taq DNA polimerasa preparada en el laboratorio.

## 6.6 RT-PCR

Los ensayos de RT-PCR para *EPA1* se realizaron como se indica en el artículo incorporado en esta tesis. Los RT-PCRs para *EPA2* y *EPA3* en la sección de datos adicionales fueron realizados de una forma similar utilizando una temperatura de alineamiento de 52 °C para *EPA2* y de 57 °C para *EPA3*; los primers empleados se indican en la sección de anexos.

## 6.7 Ensayos de crecimiento en medio 5-FOA para analizar el silenciamiento

Para medir el silenciamiento (expresión de *URA3*) se realizaron ensayos de crecimiento de las distintas cepas en medio 5-FOA. Cuando existe una alta expresión de *URA3* en presencia del compuesto 5-FOA, se produce un compuesto tóxico para la célula, de modo que el crecimiento en este medio correlaciona directamente con el nivel de silenciamiento. Los detalles de la preparación del medio 5-FOA y del ensayo aparecen en la sección 6.9-2.5 y 6.9-3.5.

## 6.8 Transformación de *Candida glabrata*

La transformación de *C. glabrata* se detalla en extenso en el apartado 6.9-2.4 y 6.9-3.4.

## 6.9 Analysis of Subtelomeric Silencing in *Candida glabrata*

Alejandro Juárez-Reyes, Alejandro De las Peñas, Irene Castaño  
Yeast Genetic Networks: Methods and Protocols. Series: Methods in Molecular Biology, Volume: (734), 279-301.

# Chapter 14

## Analysis of Subtelomeric Silencing in *Candida glabrata*

Alejandro Juárez-Reyes, Alejandro De Las Peñas, and Irene Castaño

### Abstract

Analysis of gene function often involves detailed studies of when a given gene is expressed or silenced. Transposon mutagenesis is a powerful tool to generate insertional mutations that provide with a selectable marker and a reporter gene that can be used to analyze the transcriptional activity of a specific locus in a variety of microorganisms to study gene regulation. Then the reporter gene expression can be easily measured under different conditions to gain insight into the regulation of the particular locus of interest. We have used transposon mutagenesis as a tool to generate insertional mutations with a modified Tn7-*URA3* transposon containing the reporter gene *URA3* (Tn7-*URA3*) to study subtelomeric silencing in the opportunistic fungal pathogen *Candida glabrata*. This method consists of two major steps: an in vitro Tn7-*URA3* mutagenesis of a plasmid containing the desired subtelomeric region to be analyzed, followed by homologous recombination into the target region of the *C. glabrata* genome. As an alternative, a fusion PCR protocol can also be used in which the *URA3* reporter gene can be “fused” together with the 5' and 3' regions of the desired insertion point by a two step PCR protocol. This fusion product can be introduced into the *C. glabrata* genome by homologous recombination after transformation in the same way as the Tn7-*URA3* mutagenesis products. Once the *URA3* reporter gene has been introduced in the desired locus in the *C. glabrata* genome, a simple plate growth assay is performed to assess the expression of the reporter gene.

**Key words:** Insertional mutagenesis, Modified Tn7-*URA3* transposon, Fusion PCR, Subtelomeric silencing, *Candida glabrata*, *URA3* reporter gene

---

## 1. Introduction

The genomes of eukaryotes are organized into two distinct domains, the transcriptionally active regions known as euchromatin and the transcriptionally inactive domains or heterochromatin. In heterochromatic regions, a specialized chromatin structure is assembled which maintains the silencing of the majority of genes present at this location. In *Saccharomyces cerevisiae* and many other microorganisms, there are several silenced regions throughout the genome. One example is the region adjacent to the telomeres (subtelomeric region) where the chromatin is assembled into a

## 7. RESULTADOS

**7.1 yKu70/yKu80 and Rif1 regulate silencing differentially at telomeres in *Candida glabrata*.** Rosas-Hernandez LL, Juárez-Reyes A, Arroyo-Helguera OE, De Las Penas A, Pan SJ, Cormack BP, Castano I: *Eukaryot Cell* 2008, **7**(12):2168-2178.

**7.2 A protosilencer is responsible for yKu70/yKu80-independent subtelomeric silencing on chromosome E-R in *Candida glabrata*.** Alejandro Juárez-Reyes, Alejandro De Las Peñas and Irene Castaño.



## yKu70/yKu80 and Rif1 Regulate Silencing Differentially at Telomeres in *Candida glabrata*<sup>∇‡</sup>

Lluvia L. Rosas-Hernández,<sup>1†</sup> Alejandro Juárez-Reyes,<sup>1†</sup> Omar E. Arroyo-Helguera,<sup>1</sup>  
Alejandro De Las Peñas,<sup>1</sup> Shih-Jung Pan,<sup>2</sup> Brendan P. Cormack,<sup>2</sup> and Irene Castaño<sup>1\*</sup>

Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, Camino a la Presa San José #2055, Lomas 4a Sección, San Luis Potosí SLP, México,<sup>1</sup> and Johns Hopkins University, 725 North Wolfe St., Baltimore, Maryland 21205<sup>2</sup>

Received 12 July 2008/Accepted 25 September 2008

*Candida glabrata*, a common opportunistic fungal pathogen, adheres efficiently to mammalian epithelial cells in culture. This interaction in vitro depends mainly on the adhesin Epa1, one of a large family of cell wall proteins. Most of the EPA genes are located in subtelomeric regions, where they are transcriptionally repressed by silencing. In order to better characterize the transcriptional regulation of the EPA family, we have assessed the importance of *C. glabrata* orthologues of known regulators of subtelomeric silencing in *Saccharomyces cerevisiae*. To this end, we used a series of strains containing insertions of the reporter *URA3* gene within different intergenic regions throughout four telomeres of *C. glabrata*. Using these reporter strains, we have assessed the roles of *SIR2*, *SIR3*, *SIR4*, *HDF1* (yKu70), *HDF2* (yKu80), and *RIF1* in mediating silencing at four *C. glabrata* telomeres. We found that, whereas the *SIR* proteins are absolutely required for silencing of the reporter genes and the native subtelomeric EPA genes, the Rif1 and the Ku proteins regulate silencing at only a subset of the analyzed telomeres. We also mapped a cis element adjacent to the EPA3 locus that can silence a reporter gene when placed at a distance of 31 kb from the telomere. Our data show that silencing of the *C. glabrata* telomeres varies from telomere to telomere. In addition, recruitment of silencing proteins to the subtelomeres is likely, for certain telomeres, to depend both on the telomeric repeats and on particular discrete silencing elements.

*Candida glabrata* is a common opportunistic fungal pathogen of humans, accounting for ca. 12% of *Candida* bloodstream infections worldwide (30, 33, 38). Phylogenetically, *C. glabrata* is closely related to *Saccharomyces cerevisiae*, and close homologues of ca. 90% of *S. cerevisiae* genes can be found in the *C. glabrata* genome.

*C. glabrata* is able to adhere tightly to mammalian epithelial cells both in vivo and in vitro. This attribute is thought to be important for *Candida* species to establish infection. Adherence of *C. glabrata* to mammalian epithelial cells in culture is mediated primarily by the adhesin Epa1, a glycosylphosphatidylinositol-anchored cell wall protein. *EPA1* is a member of a large gene family: in strain BG2 of *C. glabrata* we have characterized at least 23 paralogues of *EPA1*, all encoding proteins highly related to Epa1 in the N-terminal ligand-binding domain. Interestingly, most of these EPA genes are encoded at regions immediately adjacent to the telomeres, where they are transcriptionally silenced (9, 11). Transcription of at least some of subtelomeric EPA genes can be derepressed by certain environmental signals, including limitation for vitamin precursors of NAD<sup>+</sup> (12).

In eukaryotes, the telomeric region is condensed into a heterochromatic structure through the interaction between the

telomere sequences and several protein factors that form non-nucleosomal protein-DNA complexes called telosomes (41). In *S. cerevisiae* the telomeres are around 350 bp in length and consist of short heterogeneous tandem repeats with the consensus sequence C<sub>1-3</sub>A/TG<sub>1-3</sub> (10, 42). Rap1 and the Ku heterodimer, yKu70/yKu80 (encoded by *HDF1* and *HDF2*, respectively) bind to telomeric DNA. Rap1 binds in a sequence-specific fashion to the telomeric repeats, whereas the yKu70/yKu80 complex binds to the telomere ends in a sequence-nonspecific fashion (17, 25). Additional proteins localize to the telomere through their interaction with Rap1; these include the silencing proteins Sir2, Sir3, and Sir4 and the telomere-length regulatory proteins Rif1 and Rif2 (6, 35).

Adjacent to the telomere repeats, the DNA is organized into nucleosomes in a heterochromatin-like conformation. The formation of subtelomeric heterochromatin in *S. cerevisiae* is modeled to initiate when Rap1 binds to the telomere tracts (about 10 to 20 Rap1 molecules per telomere) (10), which recruits Sir3, Sir4, and Sir2 (a NAD<sup>+</sup>-dependent histone deacetylase). Sir2 catalyzes the deacetylation reaction of the amino-terminal tails of histones H3 and H4. Sir3 and Sir4 then spread to the adjacent chromatin through interactions with the deacetylated histones (20, 37). In *S. cerevisiae*, it has also been demonstrated that binding of yKu70/yKu80 to the telomere facilitates the recruitment of Sir3 and Sir4 (17, 23, 25, 34, 39), and in fact the yKu70/yKu80 complex is required for silencing at all telomeres tested to date (4, 23, 25, 26, 31). The concerted assembly of heterochromatin can propagate from 1 to 4 kb from the end of the telomere, and genes located in this region are consequently transcriptionally silenced. This silencing, also known as telomere position effect (TPE), decreases precipitously with distance from the telomere repeats (1, 16, 32). All

\* Corresponding author. Mailing address: División de Biología Molecular, Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, Camino a la Presa San José #2055, San Luis Potosí, San Luis Potosí 78216, México. Phone: (52) 444-834-2000, x2039. Fax: (52) 444-834-2010. E-mail: icastano@ipicyt.edu.mx.

† L.L.R.-H. and A.J.-R. contributed equally to this study.

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

<sup>∇</sup> Published ahead of print on 3 October 2008.

of the proteins mentioned above play important roles in TPE. In particular, *S. cerevisiae* mutants in *RAP1*, *SIR2*, *SIR3*, *SIR4*, *HDF1*, or *HDF2* exhibit decreased levels of subtelomeric silencing (1, 4, 16, 26).

In *S. cerevisiae* the Rif proteins compete with Sir3 and Sir4 for Rap1 binding and therefore have a negative effect on TPE (19, 40). It is thought that deletion of either *RIF1* and/or *RIF2* results in increased TPE because, first, more Rap1 is available to interact with Sir proteins in the absence of competition from Rap1-Rif1 or Rap1-Rif2 interactions and, second, because loss of Rif proteins leads to telomere elongation and the consequent ability to recruit additional Rap1-Sir complexes to the telomeres (14, 22, 40). Genetically, Rif1 and Rif2 are antagonized by yKu70/yKu80 in TPE, since mutations in *RIF1* and *RIF2* restore wild-type levels of TPE to *hdf1* and *hdf2* mutants (26, 27).

Previously, we and others showed that in *C. glabrata* the subtelomeric silencing of several *EPA* genes depends on the functions of the homologues of Rap1, Sir3, Sir4, and Rif1, since null mutations in *SIR3*, *SIR4*, and *RIF1* and deletion of the C-terminal 28 amino acids of Rap1 leads to expression of many *EPA* genes, resulting in a hyperadherent phenotype when cells are grown under standard laboratory conditions (9, 11, 21). Interestingly, Rif1 may have a different role in *C. glabrata* subtelomeric silencing than has been characterized in *S. cerevisiae*. *C. glabrata rif1Δ* mutants display loss of silencing and increased expression of multiple *EPA* genes. This stands in contrast to *S. cerevisiae rif1Δ* strains which show an increase in subtelomeric silencing as assayed by expression of the reporter gene *URA3* placed at a truncated telomere (7, 9, 11, 19, 21, 22).

We describe here a systematic analysis of the role of Sir2, Sir3, Sir4, Rif1, yKu70, and yKu80 on subtelomeric silencing in four individual telomeres in *C. glabrata*. Our data show that the function of Sir2, Sir3, and Sir4 are absolutely required for TPE at all of the telomeric regions tested. However, the requirement for Rif1, yKu70, and yKu80 varies between subtelomeric regions. In addition, we mapped a *cis*-acting DNA sequence located 1.329 kb upstream from the start of *EPA3*, which functions as a discrete silencing element and which could contribute to subtelomeric silencing at chromosome E. Together, these data suggest that the silencing landscape of *C. glabrata* telomeres is not homogenous and that unique sequence-specific characteristics of individual telomeres influence subtelomeric gene silencing and potentially the normal regulation of different *EPA* genes.

#### MATERIALS AND METHODS

**Strains.** All strains used in the present study are listed in Table S1 in the supplemental material.

**Plasmids.** All of the plasmids used in the present study are summarized in Table S2 in the supplemental material.

**Oligonucleotides.** All of the primers used in the present study are listed in Table 1.

**Media.** Yeast were grown on standard yeast media as described previously (36) with 2% agar added for plates. Synthetic complete (SC) contains yeast nutrient broth without  $\text{NH}_2\text{SO}_4$  at 1.7 g/liter and  $\text{NH}_2\text{SO}_4$  at 5 g/liter and supplemented with 0.6% of Casamino Acids and 2% glucose. When needed, SC was supplemented with 25 mg of uracil/liter. To score for resistance to 5-fluoroorotic acid (5-FOA; Toronto Research Chemicals, North York, Canada), 0.9 g of 5-FOA and 25 mg of uracil/liter were added to the SC. Yeast extract-peptone-dextrose (YPD) medium contains yeast extract at 10 g/liter and peptone at 20 g/liter and

TABLE 1. Oligonucleotides used in this study

Primer	Sequence (5'–3') <sup>a</sup>	Site(s) added
962	AATCCTGCAGCTATACAAGCCTTAC AACAG	PstI
963	AGGCTGTCGACGATCTTGCATCAA CATAGCCC	SaII
1952	CCATAACCGACTCGAGATAGCCAC TTACTGTTAAGATTTG	Xho
2050	TAATGTTCTCCCGGGCACCAGCA AAGATCGATGTCACC	XmaI
2051	CCAAAGCTTGAATGGCATCTGCTGT GCAGAGAAATAC	HindIII
2059	ATCTTGCTCGAGTGGTCTTG	XhoI
2238	CGGGGTACCTTCGACTTGGTTGCAT ACGAGCATGTTTTGCTCGGG	KpnI, BcgI
2239	CCCAAGCTTATTCGCTATTTTCTAT TCACAGAG	HindIII
2240	GGAAGATCTCCCACTTTCTTTTTT GATAATTC	BglII
2241	CAAGGAGCTCCTTCGATTTGGTTGC TATGAAAGAACCAGACAGTG	SacI, BcgI
2244	CGGGGTACCTTCGACTACGATGCCA TGCTCTCGCTACTACCCC	KpnI, BcgI
2245	CCCAAGCTTAGCCTTTTTTCTATGTA GACGC	HindIII
2246	CTAGAGATCTCAGGTCGTATATATA TCATTCTATATAACTC	BglII
2247	CAAGGAGCTCCTTCGAGTTGGTTGC GATTCTATTTGGGACATTAGA TGAG	SacI, BcgI
2280	CGGGGTACCTTGTGCAGATGTGCCG TAGTACCTAAACTTGCCC	KpnI, BsgI
2281	CCCAAGCTTTTTTTATTATGAGTAC AACAGTAGGTT	HindIII
2283	CGCGGATCCTATTCTAACTTAATAT ATATGCCCTATAATC	BamHI
2284	CAAGGAGCTCTTGTGCAGTACAGCA AATATCGACATATTAATTCACC	SacI, BsgI

<sup>a</sup> Restriction sites are indicated in boldface.

is supplemented with 2% glucose. When required, YPD plates were supplemented with hygromycin (Invitrogen) at 400 μg/ml.

Bacteria were grown in LB medium as described previously (2). All plasmid constructs were introduced into strain DH10 by electroporation, and carbenicillin (Invitrogen) at a final concentration of 100 μg/ml was added for selection of plasmids. For LB plates, 1.5% agar was used.

**Yeast transformation.** Yeast transformation with digested or supercoiled plasmids was performed as previously described (8).

**Construction of deletion strains.** To generate all deletion derivatives in the present study, we first constructed disruption plasmids for each gene to be deleted (*SIR2*, *SIR3*, *SIR4*, *HDF1*, *HDF2*, and *RIF1*). Briefly, the 5' and 3' untranslated regions of each gene to be deleted were PCR amplified and cloned into pGEM-T (Promega). Each pair of fragments were subcloned into pAP599 (conserving the relative orientation of the chromosomal locus to be deleted) flanking the hygromycin expression cassette. The plasmids generated in this way were used to generate allele replacements of each gene to be deleted by homologous recombination in a one-step gene replacement procedure. Briefly, each plasmid was digested with enzymes that cut at both ends of the cloned 5' and 3' flanking fragments, generating ends homologous to each specific gene to be deleted in the *C. glabrata* genome. The released fragment was used to transform *C. glabrata* selecting on plates supplemented with 400 μg of hygromycin/ml. Homologous recombination and allele replacement of each locus was verified by PCR analysis using a primer that anneals in the sequences external to the cloned fragments and a primer annealing within the hygromycin cassette. We also verified the absence of each gene deleted by the inability to PCR amplify an internal fragment from each deleted gene.

**5-FOA sensitivity assays.** To assess the level of silencing of the *URA3* gene inserted at different positions throughout the four telomeres, we carried out a

plate growth assay as described previously (9, 11). Briefly strains containing the different *URA3* insertions were grown in YPD for 36 h to stationary phase. The cultures were adjusted to an optical density at 600 nm of 1 with sterile water, and 10-fold serial dilutions were made in 96-well plates. Then, 5  $\mu$ l of each dilution was spotted onto YPD, SC lacking uracil (SC-Ura), and SC+5-FOA plates, followed by incubation 48 h at 30°C, and photographed.

**Telomere length determination by Southern blotting.** Genomic DNA from wild-type (BG2), *rif1 $\Delta$*  (BG509), *hdf1 $\Delta$*  (BG1080), *hdf2 $\Delta$*  (BG1081), *sir2 $\Delta$*  (BG1048) and *sir4 $\Delta$*  (BG1050) strains (see Table S1 in the supplemental material) was digested with either ApaI or Sau3AI, run on a 0.8% agarose gel, and transferred to a Amersham Hybond-N membrane (General Electric). The blot was hybridized to a 32-mer probe (CACCCAGACCCACAGACCCAGACC CCACAG) end labeled with T4 polynucleotide kinase (New England Biolabs) and [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P]ATP.

**In vivo nonhomologous end-joining assay.** Plasmid pGRB2.0 (*C. glabrata* *CEN* ARS *URA3*; see Table S2 in the supplemental material) was linearized with either BamHI or SmaI to generate cohesive or blunt-ended plasmid molecules, respectively. Supercoiled and linearized plasmids were gel purified by using a Qiaquick gel extraction kit (Qiagen). Then, 500 ng of each gel-purified DNA was used to transform the wild-type (BG14), *hdf1 $\Delta$*  (BG1080), and *hdf2 $\Delta$*  (BG1081) strains. Serial dilutions of transformed cells were plated on SC-Ura plates, followed by incubation at 30°C for 2 days. Colonies were counted on each plate, and the relative efficiency of end joining was calculated as follows. First, the efficiency of end joining (transformant recovery) was calculated for each strain as the number of transformants obtained with linearized plasmid divided by the number obtained with supercoiled plasmid. The wild-type efficiency for BamHI-digested plasmid was then normalized to 1, and the relative efficiencies were calculated dividing the transformant recovery in each case by the wild-type efficiency obtained with each type of digested DNA.

**Reverse transcription-PCR (RT-PCR).** RNA was extracted from stationary grown cells (36 h in YPD) using TRIzol reagent (Invitrogen) according to the manufacturer's instructions and treated with DNase I (Invitrogen). Synthesis of cDNA and PCR were carried out as previously described using the ThermoScript RT-PCR system (Invitrogen) (11). The RT primers used for each gene were as follows: *EPA1*, TAACAGTGTTCGTTTGAT; *EPA2*, GAATGATTCCTT ATTTAAAT; *EPA3*, TAATTTGATCAGTAGCACCG; *EPA4/5*, GTCAAAATT CTGTAGTGAAAG; *EPA6*, GACTTAATGCACCATCATTG; *EPA7*, GCTTG CCGGTAATGATCT; and *ACT1*, CTGGATTGAGCTTCGTC. The cDNA synthesis reaction was carried out at 55°C for *EPA1*, *EPA2*, *EPA3*, *EPA4/5*, and *EPA6*; at 59°C for *EPA7*; and at 50°C for *ACT1*. We used the same reverse primers for each gene of the PCRs and the following forward primers: *EPA1*, GGGCTCAAAAACAGCTAAAAG; *EPA2*, GGGATCAGATTATGCAAAAAG; *EPA3*, GCATGTTGATAGTTCCAAA; *EPA4/5*, GCTAACATTACTGTATT TCT; *EPA6*, GACTTAATGCACCATCATTG; *EPA7*, TACGGAAGAATGGT TCGTAC; and *ACT1*, CGCCGGTGACGATGCTCC. The PCR was carried out at 52°C for *EPA1*, *EPA2*, and *EPA4/5*; at 57°C for *EPA3* and *EPA7*; at 55°C for *EPA6*; and at 50°C for *ACT1*.

In all of the RNA samples and with every pair of primers, a no-reverse-transcriptase reaction was included as a negative control. No bands were obtained, indicating that the RNA preparations had no DNA contamination.

## RESULTS

**Subtelomeric regions at four different telomeres are silenced in *C. glabrata*.** In order to analyze silencing at different subtelomeric regions in *C. glabrata*, we chose to use a *URA3* reporter assay. Briefly, *URA3* expression can be scored both positively by growth on medium lacking uracil (SC-Ura plates) and negatively by growth on medium containing uracil and 5-FOA (5-FOA plates). 5-FOA is converted into a toxic product by orotidine-5'-phosphate decarboxylase, encoded by the *URA3* gene; consequently, cells expressing *URA3* are unable to grow on plates containing 5-FOA, and growth on 5-FOA plates is a measure of the extent of transcriptional silencing. The *URA3* gene was integrated at nine positions across four telomeres. The telomeres chosen are the right end of chromosome E (Chr E-R), where the *EPA1*, *EPA2*, and *EPA3* are localized; the right end of chromosome I (Chr I-R), where the *EPA4* and *EPA5* are located; and both ends of

chromosome C (Chr C-L and Chr C-R), where *EPA6* and *EPA7*, respectively, are found (Fig. 1A).

As shown in Fig. 1B, on Chr E-R, *URA3* inserted at a position 31.5 kb from the telomeric repeats (insertion 1) is transcriptionally active and not silenced, as measured by the failure to grow on 5-FOA plates. As the distance between the *URA3* reporter and the telomere repeats decreases, the level of gene silencing increases. Low levels of silencing are seen for insertion 2 (20.8 kb from the telomere repeats), whereas insertions 3 and 4 (13.39 and 1.32 kb, respectively, from the telomere) are strongly silenced. The three insertions throughout the *EPA4* and *EPA5* loci (Chr I-R) are all transcriptionally silent. Insertion 5, located 23.69 kb from the telomeric repeats, is completely silenced, as are insertions 6 and 7 (11.5 and 0.9 kb, respectively, from the telomeric repeats). It is interesting that insertion 5 is farther away from its telomere than insertion 2 (23.69 kb versus 20.86 kb), and yet the region downstream from *EPA5* is silenced, whereas the *URA3* insertion in the region downstream from *EPA1* is largely expressed (insertion 2). This suggests already that silencing in *C. glabrata* is not purely a product of distance from the telomeric repeats.

*EPA6* and *EPA7* are located close to their respective telomeres on chromosome C. These two loci in strain BG2 are nearly identical to each other, including 2.3 kb of the 3' untranslated region (representing the entire region between the open reading frames and the telomeric repeats) (9). Insertions 8 and 9 are positioned 2.53 and 2.29 kb from their respective telomeres on chromosome C, and both of these are silenced.

Expression of the native *EPA1*, *EPA2*, *EPA3*, *EPA4*, *EPA5*, *EPA6*, and *EPA7* genes as measured by semiquantitative RT-PCR of the wild-type strain is in good agreement with what is seen with the reporter (see Fig. 5). *EPA1* expression is detectable in stationary-phase cultures, whereas *EPA2*, *EPA3*, *EPA4/5*, and *EPA7* are not expressed. In wild-type cells, there was detectable expression of *EPA6*, even though a *URA3* gene integrated at the *EPA6* locus is strongly silenced (see Fig. 4B).

**yKu70 and yKu80 are required for maintaining telomere length and for nonhomologous end joining (NHEJ).** To investigate the function of *C. glabrata* Sir2, Sir3, Sir4, Rif1, Ku70, and Ku80 in subtelomeric silencing, we generated null alleles in each of the corresponding genes in each of the eight strains carrying the *URA3* insertions in the intergenic regions of the genes *EPA1* to *EPA7*, generating a total of 48 strains in addition to the parental strains containing the reporter insertions that are wild-type for silencing function (see Materials and Methods and Table S1 in the supplemental material). Many of the *C. glabrata* silencing proteins have been shown to be functional equivalents to the corresponding orthologues in *S. cerevisiae*. In *C. glabrata*, as in *S. cerevisiae*, mutations in *RIF1* have been previously shown to be altered in subtelomeric silencing and to have an increased telomere length (9, 19). In an analogous way, *sir2 $\Delta$* , *sir3 $\Delta$* , and *sir4 $\Delta$*  mutants in *C. glabrata* show the same defective silencing phenotypes as the corresponding *S. cerevisiae* *sir* mutants (9, 11, 21). Mutants in *HDF1* and *HDF2*, however, have not been described in *C. glabrata*. We generated deletion/insertion alleles of the *C. glabrata* orthologues of *HDF1* and *HDF2* (CAGL0I02662g and CAGL0K03443g), which show 46 and 40% amino acid identity (and 64 and 59% similarity), respectively, to *S. cerevisiae* yKu70 and yKu80. In addition, the genes are syntenic with their *S. cerevisiae* orthologues. To further verify that CAGL0I02662g and

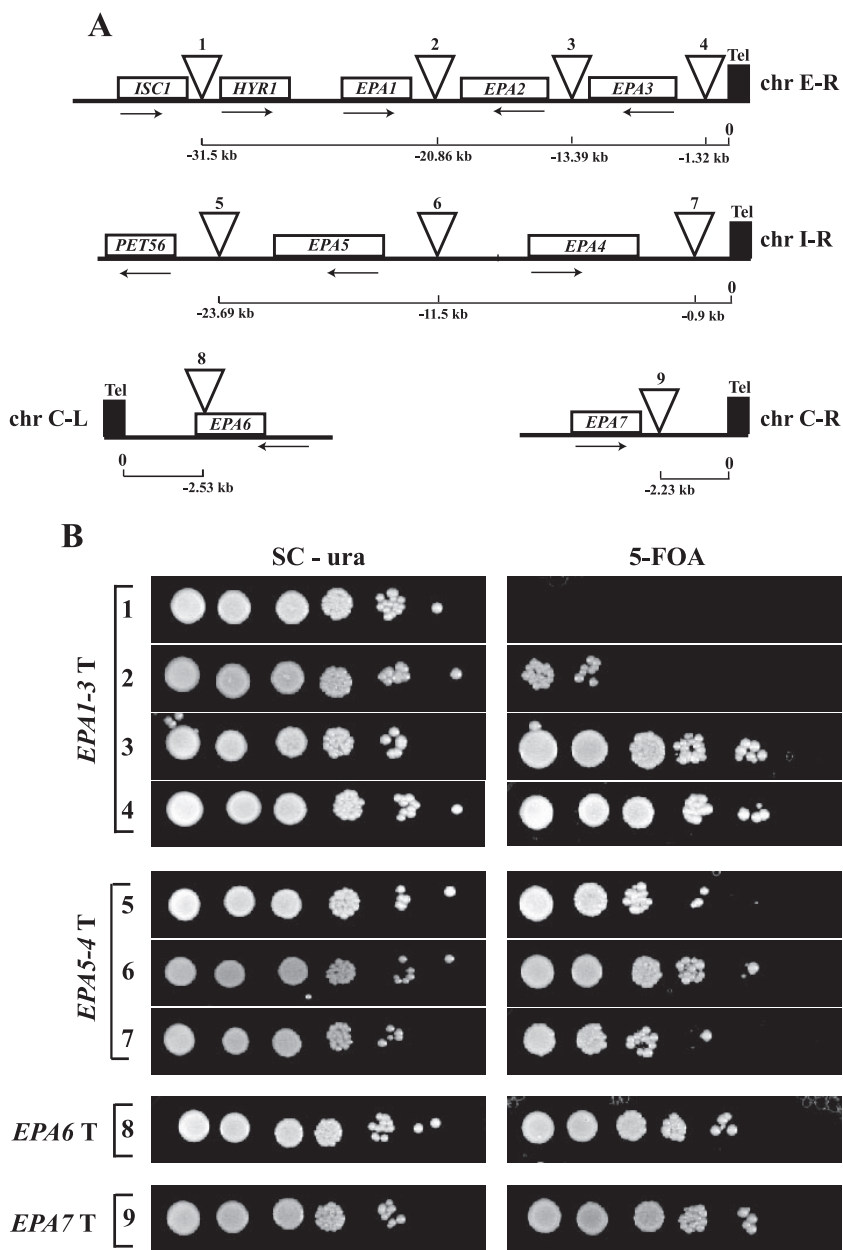


FIG. 1. The subtelomeric regions of four telomeres in *C. glabrata* containing the genes *EPA1* to *EPA7* are subject to subtelomeric silencing. (A) Schematic representation of the positions of nine different insertions of Tn7 (containing the *URA3* reporter gene) throughout four separate telomeres of *C. glabrata*. The *EPA1* cluster is located at the right telomere of chromosome E, the *EPA4/5* cluster is located at the right telomere on chromosome I, and *EPA6* and *EPA7* are located at either telomere of chromosome C. (B) Transcription of the *URA3* reporter gene is subject to TPE when placed in the intergenic regions between *EPA* genes and the *EPA* genes and their respective telomeres. Strains containing *URA3* insertions 1 to 9 (Fig. 1A) were grown to stationary phase in YPD, and 10-fold serial dilutions were made. Equal numbers of cells of each dilution were spotted onto SC-Ura and SC plates containing 5-FOA, and the plates were incubated for 48 h at 30°C and photographed (see Materials and Methods).

CAGL0K03443g correspond to *HDF1* and *HDF2* orthologues, we also characterized phenotypically yKu mutants in *C. glabrata*. In *S. cerevisiae*, yKu70 and yKu80 are required for maintenance of telomere structure and length and for double-strand break repair by NHEJ (3, 5, 17, 26). To determine whether the *hdf1* and *hdf2* mutants in *C. glabrata* shared these phenotypes, we first performed Southern blot experiments to analyze the telomere length in *C. glabrata hdf1Δ* and *hdf2Δ* mutants. In Fig. 2A, we used genomic DNA from the wild-type strain and the *hdf1Δ* and *hdf2Δ*

mutants digested with either of two enzymes and hybridized to a probe containing two copies of the telomere repeats (see Materials and Methods). As can be seen, the smear that corresponds to the smaller telomere fragments form an inhomogeneous population of telomere bands that hybridize to the probe. The average molecular weight of the smaller fragments is 250 to 300 bp smaller for both yKu mutants than it is for the wild-type strain or *sir2Δ* and *sir4Δ* strains, which were included for comparison and are known not to be defective for maintenance of telomere length in

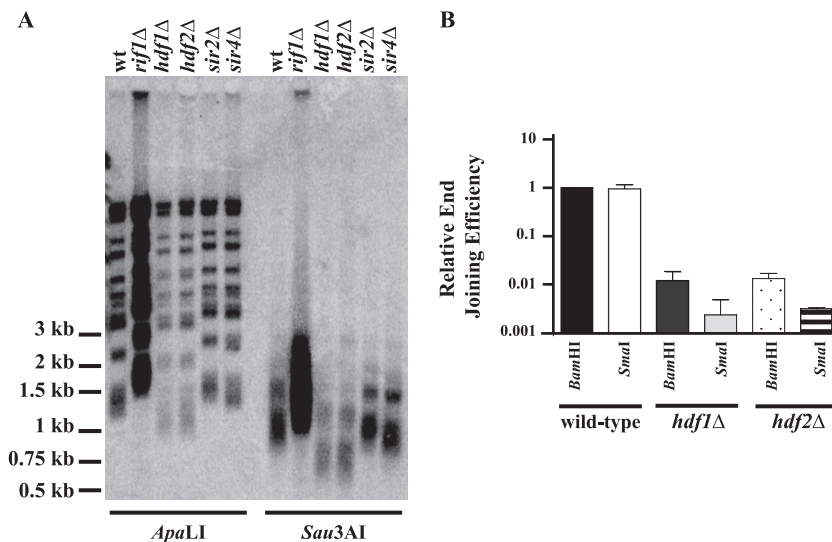


FIG. 2. *hdf1Δ* (yKu70) and *hdf2Δ* (yKu80) *C. glabrata* mutants display shorter average telomere lengths and are defective at NHEJ. (A) Southern blot with genomic DNAs from the wild-type, *hdf1Δ*, *hdf2Δ*, *sir2Δ*, and *sir4Δ* strains digested with either ApaLI or Sau3AI. After transfer to nylon membrane, the blot was hybridized to a 32-mer containing two repeats of the 16-bp telomere repeat. (B) In vivo end-joining assay using a *CEN.URA3* plasmid (pGRB2.0) linearized with either SmaI (blunt-ended plasmid molecules) or BamHI (cohesive-ended molecules). Relative end joining is calculated as the number of transformants obtained in each strain with linearized plasmid divided by the number of colonies obtained with uncut plasmid, and the wild-type value was normalized to 1.

*S. cerevisiae*. As a reference, we also included a *rif1Δ* mutant in which the average telomere length is increased by 300 to 400 bp (9). Thus, similar to *S. cerevisiae* *hdf1* and *hdf2* mutants, the *C. glabrata* *hdf1* and *hdf2* mutants have a substantially shorter average telomere length. Next, we measured the ability of *hdf1Δ* and *hdf2Δ* mutants to repair in vivo double-strand breaks, as determined by the repair of a linearized plasmid transformed into *C. glabrata*. In order for the plasmid to replicate in *C. glabrata* and to obtain stable transformants, the plasmid must be recircularized. Therefore, the number of transformants obtained in each strain with linearized plasmid normalized to the number of colonies obtained with uncut plasmid is a measure of the efficiency of nonhomologous end-joining. As shown in Fig. 2B, both *hdf1Δ*, and *hdf2Δ* are profoundly deficient (and to the same extent) in repairing linearized plasmids compared to the wild-type strain. The defect in NHEJ of yKu-deficient mutants is more pronounced when the double-strand break generates blunt ends than when it leaves cohesive DNA ends (~300-fold versus 75-fold lower than the wild-type levels, respectively). Therefore, *C. glabrata* Ku70/Ku80 orthologues are also required for NHEJ, a finding consistent with the phenotype described for *S. cerevisiae* *hdf1Δ* and *hdf2Δ* mutants (17, 26). We are confident, therefore, that these two genes represent the *C. glabrata* functional equivalents of *S. cerevisiae* *HDF1* and *HDF2*.

**Subtelomeric silencing at the *EPA1*, *EPA2*, *EPA3*, *EPA4*, *EPA5*, *EPA6*, and *EPA7* loci requires Sir2, Sir3, and Sir4.** With all of the mutations in the silencing proteins introduced into the reporter strains, we could assess systematically gene silencing by using the *URA3*-based assay. As can be seen in Fig. 3B, 4B, and 5B, it is clear that silencing of all of the *URA3* insertions at all four telomeres absolutely requires the three Sir proteins present in *C. glabrata*: Sir2, Sir3, and Sir4. In the absence of any one of these proteins, all eight insertions throughout four different telomeres are completely dere-

pressed, as judged by the absence of growth on plates containing 5-FOA.

In backgrounds mutated for any of the *SIR* genes, the native genes *EPA1* to *EPA7* are derepressed in stationary phase, which is in good correlation with the data for the *URA3* reporter strains (see Fig. 6).

**Subtelomeric silencing at the right telomere of chromosome E (*EPA1* telomere) does not require yKu70/yKu80 proteins, but three other telomeres do.** In order to assess whether the *C. glabrata* yKu proteins are required for subtelomeric silencing, we assayed the expression of the *URA3* reporter genes placed at all of the positions across the four telomeres shown in Fig. 1A. Although silencing of the *URA3* insertions at telomeres Chr I-R, Chr C-L, and Chr C-R depends strongly on functional yKu70 and yKu80 (Fig. 4B and 5B), we found that, surprisingly, subtelomeric silencing over the entire *EPA1* telomere region (Chr E-R) does not depend on the yKu70 and yKu80 proteins. The degree of silencing of each insertion is almost the same in the presence or absence of *HDF1* or *HDF2* (insertions 2, 3, and 4, Fig. 3B).

Transcription levels of the native *EPA* genes in the absence of yKu70 and yKu80 is in good agreement with the expression of corresponding reporter; notably, *EPA1*, *EPA2*, and *EPA3* are essentially not induced in the *hdf1Δ* or *hdf2Δ* mutants, whereas the expression of *EPA4*, *EPA5*, *EPA6*, and *EPA7* is markedly induced in the absence of the Ku proteins (Fig. 6).

We conclude that different telomeres vary significantly in their dependence on the yKu70/yKu80 complex for silencing, as measured both by silencing of the native *EPA* genes and by silencing of the *URA3* reporter. Specifically, silencing of the Chr-E R subtelomeric region is not dependent at all on yKu70 and yKu80.

**Rif1 is required differentially at several telomeres in *C. glabrata*.** We next determined the degree of silencing at all four telomeres in the absence of *RIF1*. The *URA3* reporter gene,

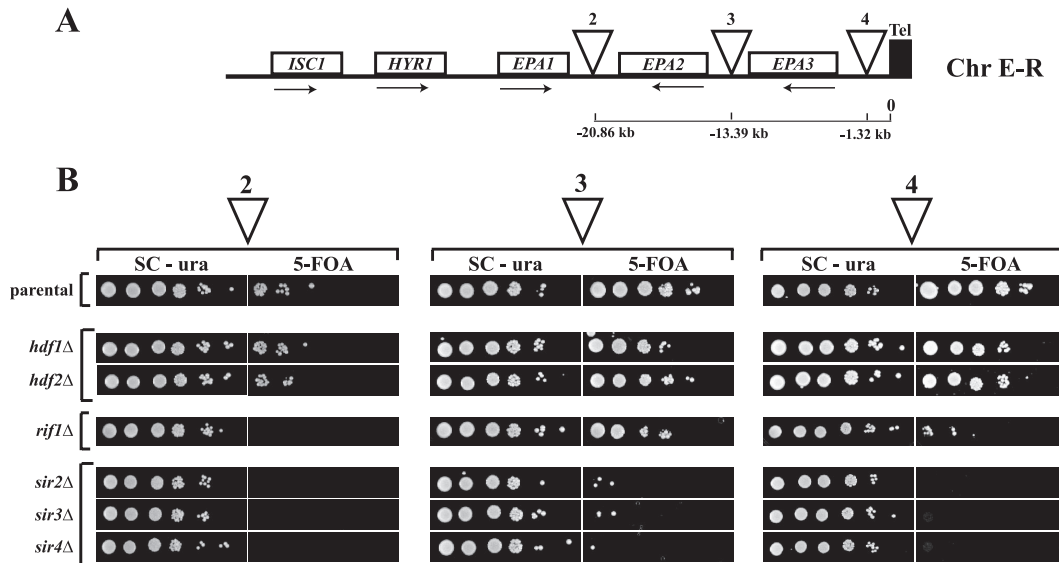


FIG. 3. Subtelomeric silencing at the telomere where *EPA1* is localized does not depend on yKu70/yKu80 heterodimer. (A) Schematic representation of the right telomere of chromosome E showing the positions of the *URA3* insertions (insertions 2, 3, and 4) at the telomere. (B) Deletion alleles of *hdf1Δ* (yKu70), *hdf2Δ* (yKu80), *rif1Δ*, *sir2Δ*, *sir3Δ*, and *sir4Δ* were introduced in each of the strains carrying the *URA3* insertions 2, 3, and 4 (panel A). The experiment was done as described in the legend to Fig. 1.

located 1.32 kb from the Chr E-R telomere, is silent in the wild-type strain but in the absence of Rif1 is strongly derepressed (insertion 4, Fig. 3B). The *URA3* reporter, placed 13.9 kb from the Chr E-R telomere (insertion 3, Fig. 3B), was strongly silenced in the parental strain, and this silencing was largely unaffected by the loss of *RIF1*. In the case of insertion 2, however (20.86 kb from the telomere), though the reporter is only slightly silenced in the parental strain, this small amount of silencing depends completely on *RIF1*. These results suggest that the dependence on *RIF1* for silencing at this telomere may be discontinuous. The expression of *EPA1*, *EPA2*, and *EPA3* is

induced in the absence of *RIF1* consistent with a role in silencing for Rif1 (Fig. 6).

In the case of Chr I-R telomere, Rif1 is required for silencing across the telomere as measured by derepression in a *rif1Δ* background of *EPA4/5* transcription, as well as of the three *URA3* reporters inserted in this region (insertions 5, 6, and 7; Fig. 4B). The dependence on Rif1 for silencing at each telomere of chromosome C is different. Figure 5B shows that absence of *RIF1* results in almost complete expression of the *URA3* reporter placed at the end of *EPA6* (insertion 8), but it is still strongly silenced when the re-

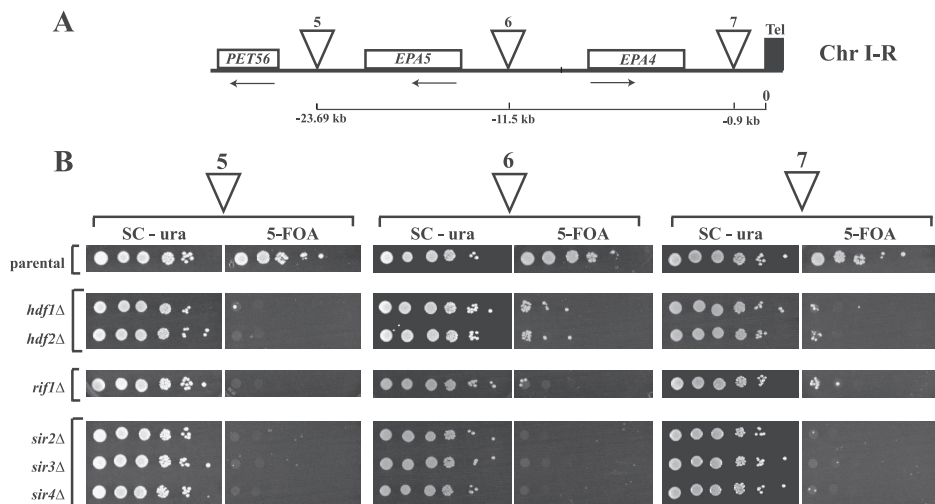


FIG. 4. TPE at the telomere where the *EPA4/5* cluster is localized depends on the Sir proteins, the yKu70/yKu80 heterodimer, and Rif1. (A) Map of the right telomere of chromosome I showing the position of *EPA4* and *EPA5* genes, as well as the *URA3* insertions 5, 6, and 7 placed in the intergenic regions of this telomere. (B) Deletion alleles of *hdf1Δ* (yKu70), *hdf2Δ* (yKu80), *rif1Δ*, *sir2Δ*, *sir3Δ*, and *sir4Δ* were introduced in each of the strains carrying the *URA3* insertions 5, 6, and 7 (panel A). The experiment was done as described in the legend to Fig. 1.

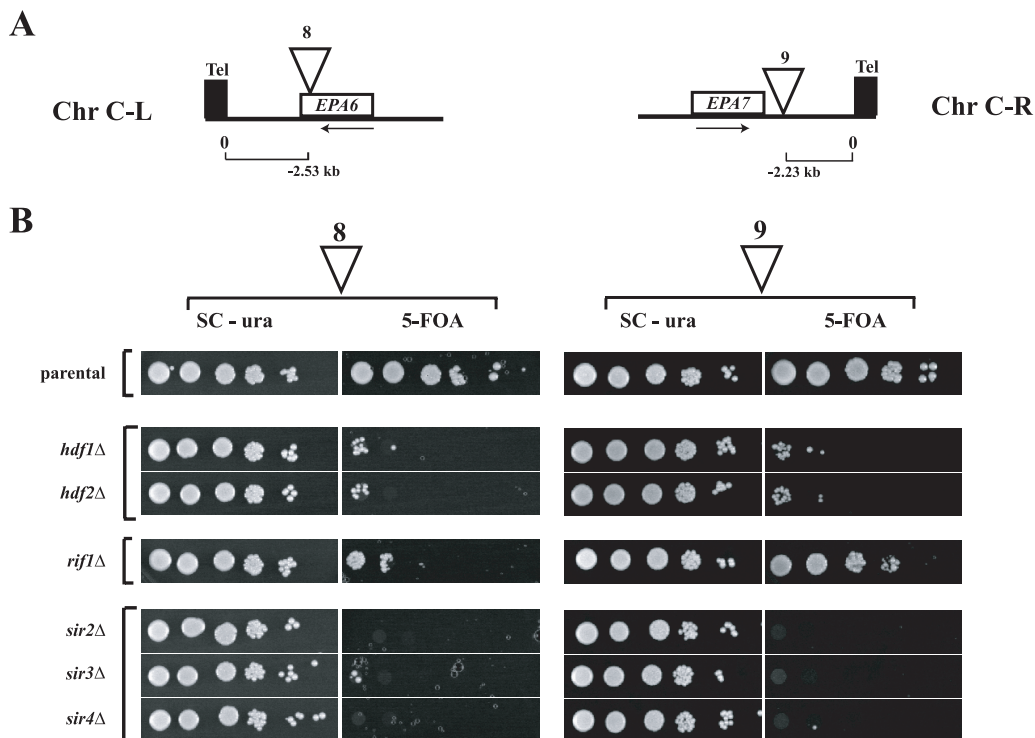


FIG. 5. Rif1 regulates differentially subtelomeric silencing at each telomere of chromosome C. Map of both telomeres of chromosome C showing the localization of *EPA6* and *EPA7*, as well as the *URA3* reporter insertions constructed in these loci. The distances of the insertions to the telomeres are indicated. (B) Deletion alleles of *hdf1Δ* (yKu70), *hdf2Δ* (yKu80), *rif1Δ*, *sir2Δ*, *sir3Δ*, and *sir4Δ* were introduced in each of the strains carrying the *URA3* insertions 8 and 9 (panel A). The experiment was done as described in the legend to Fig. 1.

porter is localized between *EPA7* (insertion 9) and the Chr C-R telomere. These results show that different telomeres display different levels of TPE in response to some of the proteins involved in subtelomeric silencing. *EPA6* and *EPA7* are both equally derepressed in a *rif1Δ* background as measured by RT-PCR (Fig. 6). However, as measured by S1 mapping, *EPA6* is strongly induced in a *rif1Δ* background,

whereas *EPA1* and *EPA7* are more modestly induced (9, 21), a finding which correlates well with the expression of the reporter at these positions.

**EPA1 telomere contains a cis-acting silencer region.** Since silencing of only the Chr E-R telomere was independent of the yKu complex, we hypothesized that this telomere might have *cis* elements responsible for this independence. Consistent with this view, we identified a *cis*-acting sequence that confers transcriptional repression on a *URA3* reporter gene placed far from the Chr E-R telomere. This *cis* element, contained in a 2.127-kb fragment, is normally located 1.329 kb upstream of the start of *EPA3*, (between *EPA3* and the telomere). Normally, *URA3* inserted at a position 31.9 kb from the telomere, 707 bp downstream of *ISCI*, is not silenced. However, when the *cis* element was also inserted next to *URA3* at the same position, the *URA3* gene is strongly silenced (Fig. 7A). These data suggest that the Chr E-R telomere contains at least one *cis*-acting element that can function to recruit silencing machinery and nucleate a silent chromatin structure at a position far from the telomere. The silencing of the reporter gene by this element depends on Sir3 and partially on Rif1 but not on yKu70 or yKu80 (Fig. 7B). In fact, silencing due to this element seems to increase in the *hdf1Δ* and *hdf2Δ* backgrounds. It is possible that the shortened telomeres in the *hdf1Δ* and *hdf2Δ* mutants could result in an increase in available silencing proteins to nucleate chromatin at discrete silencer elements like the one we have characterized here.

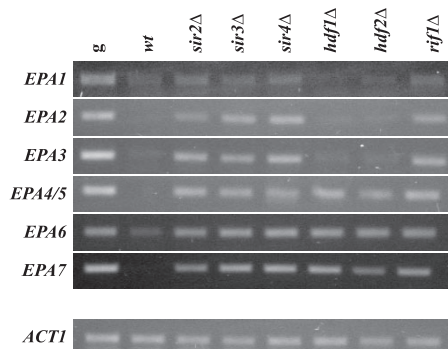


FIG. 6. Expression analysis by RT-PCR of *EPA1*, *EPA2*, *EPA3*, *EPA4/5*, *EPA6*, and *EPA7* in the wild-type and in *sir2Δ*, *sir3Δ*, *sir4Δ*, *hdf1Δ* (yKu70), *hdf2Δ* (yKu80), and *rif1Δ* mutant strains. All strains were grown to stationary phase, and the total RNA was isolated and used for RT-PCR (see Materials and Methods). Lane 1, DNA, as a positive control for PCR and *ACT1* RT-PCR, was used as internal control. Controls with no RT were also made and showed no bands (data not shown).

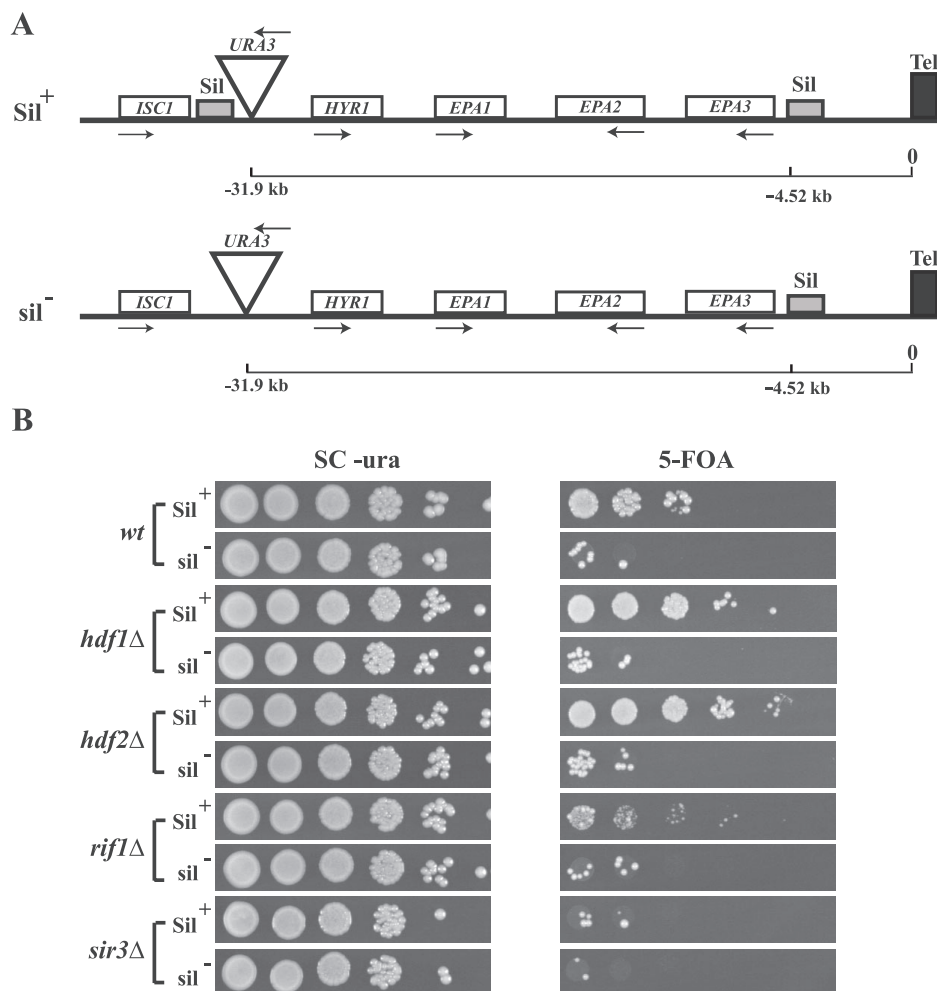


FIG. 7. A 2.14-kb *cis*-acting element between *EPA3* and its telomere mediates silencing when placed 31.9 kb from the telomere. (A) Schematic representation of the right telomere of chromosome E showing *EPA1* cluster and the position of the *cis*-acting element (*Sil*) normally found between *EPA3* and its telomere. The top map ( $Sil^+$ ) shows the position of the reporter *URA3* placed between *ISC1* and *HYR1* in a region not normally subject to subtelomeric silencing and the *cis*-acting silencer element inserted next to it. The bottom map ( $Sil^-$ ) shows the reporter placed between *ISC1* and *HYR1* and no *cis*-acting silencer element at this site. (B) The *URA3* reporter with ( $Sil^+$ ) or without ( $Sil^-$ ) silencer element integrated downstream from the reporter was introduced between *ISC1* and *HYR1* into the wild-type, *hdf1* $\Delta$  (yKu70), *hdf2* $\Delta$  (yKu80), *rif1* $\Delta$ , and *sir3* $\Delta$  mutant strains. The experiment was performed as described in the legend to Fig. 1.

## DISCUSSION

*C. glabrata* adheres efficiently to mammalian epithelial cells *in vitro*, an interaction that depends on the adhesin Epa1. Epa1 is a member of a large family of putative cell wall proteins in *C. glabrata*, most of which are localized to subtelomeric regions and are negatively controlled by subtelomeric silencing, which depends on the proteins Sir3, Sir4, Rap1, and Rif1 (9, 11, 21). In the present study, we determined in a systematic way the role of Sir2, Sir3, Sir4, Rif1, yKu70, and yKu80 in subtelomeric silencing of a reporter *URA3* gene placed at several positions in four different telomeres. We found that the silencing at different telomeres is subject to different genetic requirements, which points out a potential complexity in the regulation of the subtelomeric *EPA* genes. Some of the differences in silencing between telomeres may be explained by the action of telomere-specific *cis*-acting elements.

***C. glabrata hdf1* $\Delta$  and *hdf2* $\Delta$  mutants have shortened telomeres and are defective at NHEJ.** yKu mutants in *S. cerevisiae* display shorter average telomere length and are compromised for subtelomeric silencing (4, 23, 25, 26, 31). Here we show that *C. glabrata* yKu orthologues are the functional equivalents of *S. cerevisiae* proteins, since *hdf1* $\Delta$  and *hdf2* $\Delta$  mutants display shorter telomeres than wild-type cells. In contrast, telomere length is normal in *sir3* $\Delta$  (11), *sir2* $\Delta$ , or *sir4* $\Delta$  mutants (Fig. 2A). Also, similar to the *S. cerevisiae* yKu genes, *HDF1* and *HDF2* are required for efficient NHEJ (Fig. 2B).

**Subtelomeric silencing and TPE at loci *EPA1* to *EPA7* depend on Sir2, Sir3, Sir4.** Subtelomeric silencing affects larger regions of the telomere in *C. glabrata* than in *S. cerevisiae*. For example, at the *EPA1* cluster and the *EPA4,5* cluster, this regulation extends >20 kb from the telomere repeats (Fig. 3 and 4) (9, 11). The insertion between *EPA1* and *EPA2* (20.8 kb



from the telomere; Fig. 3B, insertion 2) is subject to weak silencing, which for this telomere might delimit the propagation of silencing from this telomere. Silencing in *C. glabrata* over 20 to 25 kb of the subtelomeric region stands in contrast with the 4- to 8-kb subtelomeric region typically subject to TPE in *S. cerevisiae* (31).

The *URA3* insertions we analyzed all display a high degree of silencing that depends on the Sir2, Sir3, and Sir4 proteins (Fig. 3B, 4B, and 5B); therefore, the Sir proteins appear to be absolutely required for silencing of the native subtelomeric genes, as well as for TPE at these telomeres. This is similar to *S. cerevisiae*, where subtelomeric silencing also depends absolutely on Sir2, Sir3, and Sir4 (reviewed in reference 35). In this regard, repression of the *FLO10* gene in *S. cerevisiae*, which encodes a cell wall protein, is interesting. *FLO10* is encoded at a locus 17.9 kb from the right telomere in chromosome XI. *FLO10* is subject to epigenetic repression that depends on *SIR3*, *HDF1*, and *HDF2* but, unlike classic subtelomeric silencing, requires the native *FLO10* promoter. Repression does not require Sir2; instead, it requires Hst1 and Hst2, NAD<sup>+</sup>-dependent histone deacetylases related to Sir2 (18).

***C. glabrata* and *S. cerevisiae* have different genetic requirements for silencing at telomeres.** In *S. cerevisiae*, subtelomeric silencing requires not only the Sir proteins but also Rap1, Rif1, Rif2, and the yKu70/yKu80 heterodimer. In *C. glabrata* the same proteins are important for silencing, but there are some apparent differences. Rap1 and the Sir proteins are also absolutely required for silencing in *C. glabrata* (9, 11, 21). It is noteworthy in this regard that *C. glabrata* does not have the *SIR1* gene (13) but nevertheless can establish and maintain subtelomeric silencing. In the case of yKu proteins, it is surprising that, while they are essential for TPE at all *S. cerevisiae* telomeres tested (natural or truncated) (4, 23, 25, 26, 31), they are not required for silencing at the *C. glabrata* Chr E-R telomere (for the reporter *URA3* or for *EPA1*, *EPA2*, and *EPA3* expression) (Fig. 3B and 6). This is not a general effect since silencing of the other three telomeres we tested depends completely on the yKu proteins (Fig. 4B, 5B, and 6). In this regard, it is interesting that in *Schizosaccharomyces pombe*, yKu70 is not required for TPE at the one telomere that was studied (24). It remains to be tested whether other telomeres (in addition to the Chr E-R telomere) do not require the Ku proteins for TPE (we have only tested 4 of 26). The fact that yKu70 and yKu80 are required for TPE and the expression of native subtelomeric genes in some but not all of the telomeres in *C. glabrata* indicates that the telomeres in *C. glabrata* are not equivalent and that both TPE and the expression of native subtelomeric genes are subject to complex regulation of expression that differs from telomere to telomere and even from gene to gene. This is parallel to what has been characterized in *S. cerevisiae*. The sequence of the subtelomeric regions of *S. cerevisiae* are different from one another and consist of repetitive elements immediately adjacent to the telomere tract and do not have the same level of TPE (27, 28). In addition, at two different truncated telomeres, the levels of TPE vary ~10-fold in the same strain background (16). Even when the subtelomeric elements of two different telomeres are identical in sequence, the TPE levels can be different. Therefore, there must be other factors (other than the sequence of the subtelomeric elements) that contribute

to the final expression level of marker or native subtelomeric genes at particular subtelomeres (27, 28).

**Rif1, yKu70, and yKu80 differentially regulate some telomeres of *C. glabrata*.** We found that different telomeres in *C. glabrata* respond differently to Rif1 and the yKu proteins. In the case of the Rif1, *C. glabrata* encodes only the *RIF1* gene, whereas *S. cerevisiae* encodes both *RIF1* and *RIF2*. Rif1 is quite divergent (24% identical in amino acid sequence) between *S. cerevisiae* and *C. glabrata*, but as for the *S. cerevisiae* Rif proteins (19, 40), *C. glabrata* Rif1 is required for correct telomere length regulation in *C. glabrata* (9). In *S. cerevisiae*, the Rif proteins play a negative role in subtelomeric silencing (19, 40). In contrast, *C. glabrata* Rif1 seems to play a positive role, since several subtelomeric *EPA* genes are derepressed in a *rif1*Δ background (9, 21). Rif1 has a strong positive role in silencing the reporter placed at the *EPA6* locus on Chr C-L but has only a modest effect on the reporter placed at the *EPA7* locus on Chr C-R (Fig. 5B). In addition, we found that at the Chr E-R telomere, Rif1, is required for silencing discontinuously across the telomere (Fig. 1B). This is reminiscent of discontinuous silencing in *S. cerevisiae*, which is attributed to telomere-specific elements (15). This may suggest the presence of *cis*-acting elements in the Chr E-R region that serve to recruit Rif1 and/or other silencing proteins.

**Chr E-R telomere contains a discrete *cis*-acting silencer element.** It is notable that the Rif1 and yKu proteins, which differentially affect different telomeres in *C. glabrata*, also affect telomere length. An attractive model to explain the differential effects of Rif1 and yKu proteins on silencing at different telomeres in *C. glabrata* is that certain telomeres encode *cis*-acting elements, analogous to silencers or proto-silencers previously described in *S. cerevisiae*. These sequences could provide an additional means of recruiting silencing complexes to certain telomeres, making these telomeres more or less sensitive to the effects of changes in telomere length. Indeed, we found a novel *cis*-acting element between *EPA3* and the telomere that can silence a *URA3* reporter inserted 31.9 kb from the telomere repeats, sufficiently distant from the telomeric repeats that it is not subject to subtelomeric silencing (Fig. 1B, insertion 1). In preliminary experiments, we have tested the function of this *cis* element at a second locus entirely removed from the normal subtelomeric context (400 kb from the telomere in chromosome F). Interestingly, in this position, the element does not confer silencing of a reporter *URA3* (data not shown). This position dependence suggests that this element may be similar to the subtelomeric proto-silencers described in *S. cerevisiae* (4, 23, 25, 26, 31), although this needs to be investigated further.

The silencing exerted by this *cis* element depends on Sir3 and partially on Rif1 but not on yKu70 or yKu80; in fact, silencing mediated by the element apparently increases in the *hdf1* and *hdf2* mutant strains (Fig. 7B). The genetic requirements for this element are similar to those described in *S. cerevisiae* for the silencers that flank and silence the silent copies of the mating type information cassettes (*HML* and *HMR*) (4, 29). Our data in *C. glabrata* are consistent with a model in which the effect of *hdf1*, *hdf2*, and *rif1* mutations on silencing mediated by the *cis*-acting element is the indirect result of changes in telomere length. The telomeric repeats bind Rap1 which in turn binds the Sir complex. In the current model from *S. cerevisiae* (35), telomere length affects silencing

because Sir proteins bound at the telomere are removed from the pool available to bind to a silencer or protosilencer element. Accordingly, in *hdf1Δ* and *hdf2Δ* mutants, decreased telomere length would increase the concentration of Sir proteins available to interact with a *cis*-acting element, thereby increasing silencing; by contrast in *rif1* mutants, the longer telomere length would decrease the concentration of Sir proteins available to interact with the *cis*-acting element, thereby decreasing silencing.

The silencer/proto-silencer element found next to *EPA3* may not be the only one that regulates the expression of *EPA* genes at this or other telomeres. We are currently in the process of mapping this element and testing whether there are other such elements at other positions near other *EPA* genes. Initial experiments have failed to find a functionally equivalent silencer downstream of *EPA6* or *EPA7* (data not shown).

The regulation of expression of the subtelomeric *EPA* family of adhesins is complex and includes several layers of regulation such as subtelomeric silencing, *cis*-acting subtelomeric silencer or proto-silencer elements, and complex promoters (longer than 2 kb in some cases) that may impose specific requirements on the expression of these genes. Even in terms of silencing, the four telomeres in *C. glabrata* are not equivalent in that they are differentially regulated by the silencing proteins yKu70, yKu80, and Rif1. This complexity may be important in the regulation of *EPA* genes during infection since it may mean that even though the *EPAs* are silenced by the general silencing machinery, expression of *EPAs* can be individually modulated in response to the host environment. For example, *EPA6*, which is transcriptionally repressed by subtelomeric silencing, has been shown to be induced during murine urinary tract infections in response to limitation for environmental nicotinic acid (NA). NA is a precursor of NAD<sup>+</sup>, which is a cofactor of the NAD<sup>+</sup>-dependent histone deacetylase Sir2, and under conditions of NA limitation Sir2 is not fully functional, leading to the derepression of some *EPA* genes (12). We suggest that different telomeres, which have different genetic requirements for silencing may, as a result, respond differently to environmental cues, including NAD<sup>+</sup>-limiting environments. This might allow *C. glabrata* to modulate the expression of different adhesins according to the signals that it receives from the environment during an infection.

#### ACKNOWLEDGMENTS

We thank Biao Ma for careful reading of the manuscript and for kindly providing strains and plasmids. We are indebted to A. González, G. Soberón, A. Bravo, M. Soberón, W. Hansberg, J. Aguirre, X. Soberón, E. Merino, B. Valderrama, J. Folch, P. León, M. Zurita, and F. Sánchez for providing reagents and supplies. We thank R. López-Revilla and L. Salazar-Olivo for kindly providing space, reagents, and equipment.

This study was supported by CONACyT fellowships to L.L.R.-H. (no. 20394) and to A.J.-R. (no.167877) and by CONACyT grant CB-2005-48304 to I.C.

#### REFERENCES

1. Aparicio, O. M., B. L. Billington, and D. E. Gottschling. 1991. Modifiers of position effect are shared between telomeric and silent mating-type loci in *Saccharomyces cerevisiae*. *Cell* **66**:1279–1287.
2. Ausubel, F., R. Brent, R. E. Kingston, D. D. Moore, J. G. Seidman, J. A. Smith, and K. Struhl. 2001. Current protocols in molecular biology. Wiley & Sons, Inc., New York, NY.
3. Boulton, S. J., and S. P. Jackson. 1996. Identification of a *Saccharomyces cerevisiae* Ku80 homologue: roles in DNA double strand break rejoining and in telomeric maintenance. *Nucleic Acids Res.* **24**:4639–4648.
4. 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.
5. Boulton, S. J., and S. P. Jackson. 1996. *Saccharomyces cerevisiae* Ku70 potentiates illegitimate DNA double-strand break repair and serves as a barrier to error-prone DNA repair pathways. *EMBO J.* **15**:5093–5103.
6. Bourns, B. D., M. K. Alexander, A. M. Smith, and V. A. Zakian. 1998. Sir proteins, Rif proteins, and Cdc13p bind *Saccharomyces* telomeres in vivo. *Mol. Cell. Biol.* **18**:5600–5608.
7. Buck, S. W., and D. Shore. 1995. Action of a RAP1 carboxy-terminal silencing domain reveals an underlying competition between HMR and telomeres in yeast. *Genes Dev.* **9**:370–384.
8. 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.
9. Castano, 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.
10. Conrad, M. N., J. H. Wright, A. J. Wolf, and V. A. Zakian. 1990. RAP1 protein interacts with yeast telomeres in vivo: overproduction alters telomere structure and decreases chromosome stability. *Cell* **63**:739–750.
11. 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**:2245–2258.
12. Domezgue, 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**:866–870.
13. 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.
14. Feeser, E. A., and C. Wolberger. 2008. Structural and functional studies of the Rap1 C terminus reveal novel separation-of-function mutants. *J. Mol. Biol.* **380**:520–531.
15. Fourrel, G., E. Revardel, C. E. Koering, and E. Gilson. 1999. Cohabitation of insulators and silencing elements in yeast subtelomeric regions. *EMBO J.* **18**:2522–2537.
16. Gottschling, D. E., O. M. Aparicio, B. L. Billington, and V. A. Zakian. 1990. Position effect at *Saccharomyces cerevisiae* telomeres: reversible repression of Pol II transcription. *Cell* **63**:751–762.
17. Gravel, S., M. Larrivee, P. Labrecque, and R. J. Wellinger. 1998. Yeast Ku as a regulator of chromosomal DNA end structure. *Science* **280**:741–744.
18. Halme, A., S. Bumgarner, C. Styles, and G. R. Fink. 2004. Genetic and epigenetic regulation of the FLO gene family generates cell-surface variation in yeast. *Cell* **116**:405–415.
19. 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.
20. Hecht, A., T. Laroche, S. Strahl-Bolsinger, S. M. Gasser, and M. Grunstein. 1995. Histone H3 and H4 N termini interact with SIR3 and SIR4 proteins: a molecular model for the formation of heterochromatin in yeast. *Cell* **80**:583–592.
21. Iraqui, I., S. Garcia-Sanchez, S. Aubert, F. Dromer, J. M. Ghigo, C. d'Enfert, and G. Janbon. 2005. The Yak1p kinase controls expression of adhesins and biofilm formation in *Candida glabrata* in a Sir4p-dependent pathway. *Mol. Microbiol.* **55**:1259–1271.
22. Kyrion, G., K. Liu, C. Liu, and A. J. Lustig. 1993. RAP1 and telomere structure regulate telomere position effects in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genes Dev.* **7**:1146–1159.
23. 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.
24. Manolis, K. G., E. R. Nimmo, E. Hartsuiker, A. M. Carr, P. A. Jeggo, and R. C. Allshire. 2001. Novel functional requirements for non-homologous DNA end joining in *Schizosaccharomyces pombe*. *EMBO J.* **20**:210–221.
25. Martin, S. G., T. Laroche, N. Suka, M. Grunstein, and S. M. Gasser. 1999. Relocalization of telomeric Ku and SIR proteins in response to DNA strand breaks in yeast. *Cell* **97**:621–633.
26. Mishra, K., and D. Shore. 1999. Yeast Ku protein plays a direct role in telomeric silencing and counteracts inhibition by Rif proteins. *Curr. Biol.* **9**:1123–1126.
27. Mondoux, M. A., J. G. Scaife, and V. A. Zakian. 2007. Differential nuclear localization does not determine the silencing status of *Saccharomyces cerevisiae* telomeres. *Genetics* **177**:2019–2029.
28. Mondoux, M. A., and V. A. Zakian. 2007. Subtelomeric elements influence but do not determine silencing levels at *Saccharomyces cerevisiae* telomeres. *Genetics* **177**:2541–2546.
29. Nugent, C. I., G. Bosco, L. O. Ross, S. K. Evans, A. P. Salinger, J. K. Moore, J. E. Haber, and V. Lundblad. 1998. Telomere maintenance is dependent on

- activities required for end repair of double-strand breaks. *Curr. Biol.* **8**:657–660.
30. **Pfaller, M. A., and D. J. Diekema.** 2007. Epidemiology of invasive candidiasis: a persistent public health problem. *Clin. Microbiol. Rev.* **20**:133–163.
  31. **Pryde, F. E., and E. J. Louis.** 1999. Limitations of silencing at native yeast telomeres. *EMBO J.* **18**:2538–2550.
  32. **Renauld, H., O. M. Aparicio, P. D. Zierath, B. L. Billington, S. K. Chhablani, and D. E. Gottschling.** 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.
  33. **Richardson, M. D.** 2005. Changing patterns and trends in systemic fungal infections. *J. Antimicrob. Chemother.* **56**(Suppl. 1):i5–i11.
  34. **Roy, R., B. Meier, A. D. McAinsh, 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.
  35. **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.
  36. **Sherman, F., G. R. Fink, and J. B. Hicks.** 1986. *Methods in yeast genetics.* Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, NY.
  37. **Strahl-Bolsinger, S., A. Hecht, K. Luo, and M. Grunstein.** 1997. SIR2 and SIR4 interactions differ in core and extended telomeric heterochromatin in yeast. *Genes Dev.* **11**:83–93.
  38. **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.
  39. **Tsukamoto, Y., J. Kato, and H. Ikeda.** 1997. Silencing factors participate in DNA repair and recombination in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nature* **388**:900–903.
  40. **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.
  41. **Wright, J. H., D. E. Gottschling, and V. A. Zakian.** 1992. *Saccharomyces* telomeres assume a non-nucleosomal chromatin structure. *Genes Dev.* **6**:197–210.
  42. **Wright, J. H., and V. A. Zakian.** 1995. Protein-DNA interactions in soluble telosomes from *Saccharomyces cerevisiae*. *Nucleic Acids Res.* **23**:1454–1460.

## **7.2 A protosilencer is responsible for yKu70/yKu80-independent subtelomeric silencing on chromosome E<sub>R</sub> in *Candida glabrata***

**Alejandro Juárez-Reyes, 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, México.

\* Corresponding author

Running Title:

**A protosilencer in telomere E<sub>R</sub> of *C. glabrata***

**Keywords:** *Candida glabrata*, protosilencer, subtelomeric silencing, yKu70, yKu80

\* Corresponding author:

Irene Castaño

Mailing address: Camino a la Presa San José # 2055. División de Biología

Molecular

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

Luis Potosí

78216, México

Phone (52) 444-834-2000 ext. 2038

Fax: (52) 444-834-2010

E-mail: icastano@ipicyt.edu.mx

## Abstract

Adherence to host cells is an important step in the pathogenicity of the opportunistic fungal pathogen *Candida glabrata*. This adherence is mediated by some members of the large family of cell wall proteins encoded by the *EPA* (Epithelial Adhesin) genes present in the *C. glabrata* genome. The majority of the *EPA* genes are localized close to different telomeres in *C. glabrata*, which results in a negative regulation of transcription of these genes through chromatin-based subtelo­meric silencing. In vitro, adherence to epithelial cells is mainly mediated by Epa1, which is the only member of the *EPA* family that is expressed in vitro. *EPA1* forms a cluster with *EPA2* and *EPA3* at the subtelo­meric region of telomere E<sub>R</sub>. *EPA2* and *EPA3* are subject to silencing that propagates from this telomere in a process that depends on the Sir2, 3, 4 and Rif1 proteins, but surprisingly not on the yKu70 and yKu80 proteins. Here we describe that the yKu70/yKu80-independent silencing of telomere E<sub>R</sub> is due to the presence of a cis-acting protosilencer (Sil2126) located between *EPA3* and the telomere. This element can silence a reporter gene when placed 31.9 kb away from this telomere, but not when it is removed from the telomere context or when it is inverted with respect to the reporter. Importantly, we show that the cis-acting Sil2126 element is required for the yKu70/80-independent silencing of this telomere, underscoring the importance of cis-elements for repressive chromatin formation and spreading on at least some telomeres in *C. glabrata*.

## Introduction

The fungal pathogen *C. glabrata* is able to adhere to host epithelial cells in vitro, a property thought to be important for the virulence of this organism. This ability is mediated primarily by Epa1, the founding member of a large family of cell wall proteins, some of which have been shown to be functional adhesins (CASTANO *et al.* 2005; CORMACK *et al.* 1999; DE LAS PENAS *et al.* 2003). Most of the genes encoding these adhesins, the *EPA* genes, are localized to subtelo meric regions of the *C. glabrata* genome, where they are subject to chromatin-based silencing.

Subtelo meric silencing in *C. glabrata* is a form of transcriptional repression that depends on Sir2, Sir3, Sir4, Rap1, and to different extents on yKu70, yKu80 (encoded by the *HDF1* and *HDF2* genes) and Rif1, depending on the particular subtelo meric region (CASTANO *et al.* 2005; DE LAS PENAS *et al.* 2003; ROSAS-HERNANDEZ *et al.* 2008). This form of repression is not promoter specific and can propagate over long distances from the telomere (up to 20 kb), silencing native genes as well as reporter genes inserted at these regions. *EPA1* is localized 21 kb from the right telomere of chromosome E (*E<sub>R</sub>*) and is the only *EPA* gene expressed in vitro (CASTANO *et al.* 2005; DE LAS PENAS *et al.* 2003). *EPA1* forms a cluster with *EPA2* and *EPA3*, and silencing at this telomere can propagate toward the centromere up to 20 kb from the telomeric repeats, resulting in a lack of expression of both *EPA2* and *EPA3* in vitro. This particular telomere is different from three other telomeres studied because it is the only example so far in *C. glabrata* of yKu70 and yKu80-independent subtelo meric silencing (ROSAS-HERNANDEZ *et al.* 2008).

Compared to *C. glabrata*, subtelo meric silencing in *Saccharomyces cerevisiae*, to which *C. glabrata* is closely related phylogenetically, generally propagates relatively short distances from the telomeric repeats (4 - 8 kb from the telomere) and depends on Sir2, Sir3, Sir4, Rap1, yKu70 and yKu80 (PRYDE and LOUIS 1999). Telomeres in *S. cerevisiae* consist of short heterogeneous tandem repeats with a consensus sequence T(G)<sub>2-3</sub>(TG)<sub>1-6</sub> (MCEACHERN 1994) about 350 bp in length forming non-histone nucleoprotein complexes with Rap1 and yKu proteins. Additionally, adjacent to the ends, the subtelo meric regions contain two types of repeats, the Y' and X elements that are organized into nucleosomes. About half of the chromosomes in *S. cerevisiae* contain Y' elements (1 to 4 copies per subtelo meric region) and all telomeres contain the X sequence which are very heterogeneous. The only highly conserved sequence within X is the ~ 500 bp sequence called core X that contains an origin of replication sequence or ARS which contributes to subtelo meric silencing, this sequence is present in some form at all telomeres of the sequenced strain (LOUIS 1995; THAM and ZAKIAN 2002).

Silencing at other chromosomal loci such as the silent mating loci *HML* and *HMR* of *S. cerevisiae*, is achieved through cis-acting elements known as silencers that recruit a subset of the silencing proteins that condense the chromatin and results in very efficient transcriptional silencing. Silencers function autonomously to repress nearby genes (or ectopically inserted genes), resulting in a regional, rather than gene-specific repression. In *S. cerevisiae* the silencers studied are composed of different arrangements of binding sites for the sequence-specific DNA-binding proteins Abf1, Rap1 and ORC (origin of recognition complex for

replication of DNA) and exert their effect over several kilobases with no requirement for additional silencer elements to repress expression of the target genes (reviewed in (BUHLER and GASSER 2009; FOUREL *et al.* 2002; FOX and MCCONNELL 2005). Protosilencers on the other hand, are repressive elements that enhance the action of silencers but do not act by themselves; instead they strongly depend on the presence of bona fide silencers to bring about repression (FOUREL *et al.* 1999; LEBRUN *et al.* 2001). Protosilencers include several different types of sequences that can enhance and extend repression in regions where silencing is already present (silencing promoting environments). These elements may be as simple as single binding sites for silencer proteins (Rap1, Abf1 and ORC), or complex repetitive sequences like the core X sequences in subtelomeric regions in *S. cerevisiae* (BOSCHERON *et al.* 1996; BRAND AH. 1985). The presence of these protosilencers at the subtelomeric regions thus can act as relays and propagate silencing over longer distances in a discontinuous manner (FOUREL *et al.* 1999; LEBRUN *et al.* 2001).

Silenced chromatin or heterochromatin is correlated with histone hypoacetylation and relatively lower gene density (reviewed in (OTTAVIANI 2008; RUSCHE *et al.* 2003; RUSCHE and LYNCH 2009)). Heterochromatin has the capacity to propagate and this is thought to be mediated by the histone deacetylase activity of Sir2 and subsequent binding of Sir3 and Sir4 to deacetylated histones H3 and H4 in neighboring nucleosomes. Sir3 and Sir4 in turn recruit more Sir2 molecules resulting in propagation of the silenced structure (HOPPE *et al.* 2002; RUSCHE *et al.* 2002). Propagation of this silenced chromatin is limited by the presence of other cis-acting elements called boundary or barrier elements that block spreading of the silenced chromatin thereby separating transcriptionally active from inactive domains (BI and BROACH 1999; RUSCHE and LYNCH 2009). Some boundary elements are associated with strong promoters that assemble RNA polymerase transcription complexes that can in turn recruit chromatin-remodeling complexes with histone acetyltransferase activity, like the tRNA gene on the telomere side of *HMR*. This transcription complex assembly can physically interfere with propagation of the silent chromatin, or can compete with the histone deacetylase activity of the Sir complex (DONZE *et al.* 1999; DONZE and KAMAKAKA 2001), since it has been reported that transcription per se is not required for boundary activity, but recruitment of histone acetyltransferases is reviewed in (FOX and MCCONNELL 2005; RUSCHE and LYNCH 2009). Therefore at *HMR*, repression of the native or reporter genes inserted between the silencers is almost complete, while silencing beyond the elements decreases sharply (BI *et al.* 1999; McNALLY FJ 1991; RUSCHE *et al.* 2003).

The level and degree of propagation of silencing at the subtelomeric regions of both *C. glabrata* and *S. cerevisiae*, depend on the particular subtelomeric context (PRYDE and LOUIS 1999; ROSAS-HERNANDEZ *et al.* 2008). In the E<sub>R</sub> telomere in *C. glabrata* we have found a cis-acting element adjacent to *EPA3* that can silence a reporter gene when inserted 31.9 kb from the telomere. In this paper we present evidence that indicates that this element, called Sil2126 is a protosilencer that contributes to silencing at this telomere, and is responsible for the independence that this telomere shows from the yKu proteins with respect to silencing.



## Materials and Methods

### Strains, Plasmids and Primers

All strains, plasmids and oligonucleotides used in the present study are listed in Tables S1, S2 and S3 respectively in supporting information.

### Media

Yeast were grown in standard yeast media as described previously (SHERMAN F. 1986) with 2% agar added for plates. Synthetic complete (SC) contains 1.7 g/liter yeast nutrient base (without  $\text{NH}_2\text{SO}_4$  and aminoacids), 5 g/liter  $\text{NH}_2\text{SO}_4$  and supplemented with 0.6% of Casamino Acids and 2% glucose. When needed, SC was supplemented with 25 mg of uracil/liter. To score for resistance to 5-fluoroorotic acid (5-FOA; Toronto Research Chemicals, North York, Canada), 0.9 g of 5-FOA and 25 mg of uracil/liter were added to the SC. Yeast extract-peptone-dextrose (YPD) medium contains 10 g/liter yeast extract, 20 g/liter peptone and supplemented with 2% glucose. When required, YPD plates were supplemented with hygromycin (Invitrogen) at 440  $\mu\text{g}/\text{ml}$ .

Bacteria were grown in LB medium as described previously (AUSUBEL 2001). LB medium contained 5 g/liter yeast extract, 10 g/liter tryptone, 5 g/liter NaCl. All plasmid constructs were introduced into strain DH10 by electroporation, and carbenicillin (Invitrogen) at a final concentration of 50  $\mu\text{g}/\text{ml}$  was added to select for plasmids. For plates, 1.5% agar was used.

### Yeast transformation

Yeast transformations with digested plasmids were performed as previously described (CASTANO *et al.* 2003).

### Reporter *URA3* gene expression assays (5-FOA sensitivity assays)

To assess the level of silencing of the *URA3* gene inserted at different positions throughout the telomeres, we carried out a plate growth assay as described previously (CASTANO *et al.* 2005; DE LAS PENAS *et al.* 2003). Briefly strains containing the different *URA3* insertions were grown in YPD for 36 h to stationary phase. The cultures were adjusted to an optical density of 1 with sterile water at 600 nm, and 10-fold serial dilutions were made in 96-well plates. 5  $\mu\text{l}$  of each dilution was spotted onto YPD, SC lacking uracil (SC-Ura), and SC+5-FOA plates, followed by incubation 48 h at 30°C, and photographed.

## Construction of *C. glabrata* strains with different Sil2126-*URA3* integrations

To generate all integration strains containing the Sil2126-*URA3* reporter system we first constructed a starting plasmid on integrative vector pYIp*lac211* containing an integration region and the complete Sil2126 regions as follows. A 0.671 kb PCR product containing the intergenic region between *ISC1* and *HYR1* with *Pst*I and *Sal*I ends, and a 2.126 kb PCR product containing the Sil2126 region with *Sal*I and *Bam*HI ends, were cloned into same sites in pYIp*lac211* which contains the *S. cerevisiae URA3* gene with its own promoter that is used as the reporter gene. In this construct (pAP430) the *URA3* gene and the Sil element are 511 bp apart (Figure 1). pAP430 plasmid was linearized with *Spe*I and integrated by homologous recombination in *C. glabrata* at - 32kb from telomere E<sub>R</sub> (between *ISC1* and *HYR1* genes). In this construct the *URA3* reporter start codon lies 35kb away from the telomere. The series of *C. glabrata* strains with 5' and 3' serial deletions of Sil2126 were constructed by transforming *C. glabrata* with the appropriate plasmids inducing homologous recombination. The serial deletion plasmids were constructed by double digestion of the starting plasmid using internal sites within the Sil2126 region and an external site, or replacing Sil2126 fragment by PCR products of progressively smaller fragments of the Sil2126 region. To construct the strains with Sil2126-*URA3* integrated at different genomic loci, the *Pst*I-*Sal*I integration fragment on starting plasmid was replaced by PCR products of different genomic locations containing a unique restriction enzyme site to linearize and integrate at the homologous genomic region after transformation of these plasmids in *C. glabrata*.

## Construction of *HDF1*, *HDF2* and Sil2126 deletion strains

To obtain the *HDF1* and *HDF2* deletion strains, fragments larger than 800 bp from the 5' and 3' intergenic regions of each gene were cloned into pAP599 (conserving the relative orientation of the chromosomal locus to be deleted), flanking the hygromycin expression cassette. The plasmids generated in this way (pAJ27 and pAJ28 respectively, Table S2 in supporting information) were used to generate allele replacements of each gene to be deleted by homologous recombination in a one-step gene replacement procedure. Briefly, each plasmid was digested with enzymes cutting at both ends and within the cloned 5' and 3' flanking fragments, generating ends homologous to each specific gene to be deleted in the *C. glabrata* genome. The released fragment was used to transform *C. glabrata*, selecting on plates supplemented with 440 µg of hygromycin/ml. Homologous recombination and allele replacement of each locus was verified by PCR analysis using a primer that anneals in the sequences external to the cloned fragments and a primer annealing within the hygromycin cassette. We also verified the absence of each gene deleted by the inability to PCR amplify an internal fragment from each deleted gene.

A similar strategy was used to construct a vector to delete Sil2126 region, flanking sequences at 5' and 3' of Sil2126 were PCR amplified and cloned at either side of hygromycin expression cassette on pAP599. This plasmid (pAJ25) was

digested with enzymes that cut within the cloned 5' and 3' ends, and the released fragment was used to transform *C. glabrata*. Allele replacement was verified as described above.

### Construction of double mutants

In order to generate double mutants (*silΔ hdf1Δ* or *silΔ hdf2Δ*), single *hdf1Δ::hph* or *hdf2Δ::hph* mutants which contain an insertion of the *hph* cassette flanked by FRT sites, were transformed with plasmid pLS9 (Table S2). This plasmid expresses *ScFLP1* recombinase that recognizes two direct repeats, the F<sub>LP1</sub> recognition target (FRT) sites, under the control of an inducible promoter. 50 μl of stationary phase cells harbouring this plasmid were resuspended in fresh YPD and were grown for 2 hours. The F<sub>LP1</sub> recombinase then induces recombination between FRT sites and the hygromycin marker is excised from the chromosome, resulting in an unmarked deletion of the corresponding gene and leaving one copy of the FRT site. Dilutions of the cell suspensions were plated on YPD, and replica plates were made on YPD hygromycin plates. Unmarked deletion strains (*hdf1Δ* or *hdf2Δ*) are identified as Hyg<sup>S</sup> colonies and the deletion is confirmed by PCR, using primers annealing in the chromosome outside the 5' and 3' regions used for the disruption.

To construct double mutants, the *hdf1Δ* and *hdf2Δ* unmarked deletion strains described above were transformed with the deletion/insertion construct to delete Sil2126 (pAJ25, see Table S2 in the supporting information). Transformants were screened to verify integration of the deletion/insertion plasmid at the correct chromosomal location by PCR using primers annealing in the chromosome outside of the cloned region used for the disruption. We removed the *hph* cassette by expressing the F<sub>LP1</sub> recombinase as described above.

In order to test whether the silencing proteins are required for Sil2126 activity, we used deletion alleles of *RIF1*, *SIR2*, *SIR3*, *HDF1*, *HDF2* and the *rap1-21* allele (since *RAP1* is an essential gene), to introduce into the strain containing the Sil-reporter system. The *rap1-21* allele is a deletion of the last 28 amino acids of Rap1 which has been shown in *S. cerevisiae* to be the domain that interacts with Sir3, resulting in a viable strain that is defective for subtelomeric silencing (LIU *et al.* 1994) and we have shown that in *C. glabrata* it has the same phenotype (DE LAS PENAS *et al.* 2003).

### 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 *EPA3* and *ACT1* gene are listed in Table S3 in the supporting information. 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 *EPA3* and *ACT1* genes. 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. RT-PCR experiments were performed three separate times with different RNA extractions. Results in Figure 4B are reproducible and show a representative experiment.

## Results

### Telomere E<sub>R</sub> of *C. glabrata* contains a cis-acting protosilencer element

We have previously identified a cis-acting element localized close to the right telomere of chromosome E (E<sub>R</sub>) of *C. glabrata* where *EPA1*, *EPA2* and *EPA3* reside. This element, called Sil2126, is a 2.126 kb DNA fragment that extends from nucleotide positions 684673 to 686798 (accession Number: CR380951) and can silence a *URA3* reporter gene when placed 31.9 kb away from this telomere in a region not normally subject to subtelo meric silencing (ROSAS-HERNANDEZ *et al.* 2008).

The *C. glabrata* genome contains only one more sequence very similar to Sil2126 at position 8061 to 10185 (Accession No. CR380947.2), from the left telomere of chromosome A (A<sub>L</sub>). A smaller fragment of this element (nucleotides 120 to 872 of Sil2126) is also present between *EPA5* and *EPA4* at position 15040 to 15850 from telomere I<sub>R</sub> (Accession No. AY344225.1) Figure S1.

In order to finely map the Sil2126 element at the E<sub>R</sub> telomere, we first constructed a reporter-Sil system to assay silencing activity by the Sil2126 element (Figure 1A middle line). This system consists of an integrative plasmid that contains a PCR fragment containing a 671 bp fragment of the intergenic region between *ISC1* (CAGL0E06556g) and *HYR1* (CAGL0E06600g), used as the integration site (*Spe1* site at -31.9 kb from telomere E<sub>R</sub>), and the Sil fragment (or the deletion derivatives) cloned immediately adjacent to it, followed by the *URA3* reporter gene in the vector. Silencing activity by the Sil2126 element (and the deletion derivatives) was assayed by the ability of the strains carrying each construct to grow on plates lacking uracil (SC -ura plates) where only cells expressing the *URA3* reporter can grow, and on plates containing 5-fluorootic acid (5-FOA plates) where cells expressing *URA3* convert 5-FOA into a toxic compound and do not grow.

We constructed 5' and 3' end deletion series of the Sil2126 element and integrated each one 31.9 kb away from telomere E<sub>R</sub> (the *URA3* promoter is positioned at -35 kb). We initially determined whether the complete Sil2126 could extend on the 5' side up to the start codon of *EPA3*. As shown in Figure 1B the entire region between *EPA3* and Sil2126 (3430 bp, line 1) confers essentially the same level of silencing as the previously described Sil2126 (ROSAS-HERNANDEZ *et al.* 2008) (Figure 1B compare lines 1 and 2) and therefore Sil2126 comprises the entire element. As shown in Figure 1B, deletions from the 5' essentially show the same silencing activity as the entire Sil2126 element, when the first 204 bp have been removed (Figure 1B lines 2 through 7). Deleting the next 58 nucleotides results in almost complete loss of silencing by this element, indicating that the sequence from nucleotides 204 to 262 is essential for the silencing activity of Sil2126 (Figure 1B compare line 7 with line 8). The 3' end deletion series on the other hand, shows a gradual decrease in silencing by the removal of up to nucleotide 1241 of Sil2126 (removal of the last 885 bp of Sil2126) (Figure 1B lines 13 and 14). The next deletion from the 3' end up to nucleotide 866 (removal of 1260 nucleotides) dramatically decreases silencing by this element (Figure 1B line

15) suggesting that between nucleotides 866 and 1241 resides an important module of the Sil2126 element. Progressive deletions from the 3' end from this point very gradually decrease the remaining silencing effect until there is no detectable silencing activity (deletion to nucleotide 334, Figure 1B line 18), and doesn't decrease with further deletion to nucleotide 106 (Figure 1B line 19). This indicates that the fragment from nucleotide 1 to 334 has no silencing activity by itself despite containing nucleotides 204 to 262, identified as essential in the 5' deletion series. This shows that nucleotides 204 to 262 are essential but not sufficient for silencing activity by the Sil2126 element. The last two fragments tested did not silence the reporter either, and include an internal fragment from nucleotide 334 to 1241 (Figure 1B line 20) and a combination of the 5' end of the element (from nucleotide 1 to 334) cloned adjacent to a fragment from nucleotide 1241 to the end of the element (nucleotide 2126). Taken together, this data indicate that Sil2126 is a cis-acting element composed of at least two distinct modules important for silencing activity: the first element is localized between nucleotides 204 to 262 (Figure 1B compare lines 2 with lines 7 and 8), and the other extends from nucleotides 866 and 1810 (Figure 1B compare lines 2 with 13, 14 and 15).

### **Sil2126 element depends on Rap1, Sir2 and Sir3, partially on Rif1 but not on yKu70/80**

Insertion of the Sil-reporter system 31.9 kb from telomere E<sub>R</sub> generates a duplication of the Sil2126 at this telomere (the original Sil2126 is localized 4.52 kb upstream from the telomere, see Figure 1C top line), therefore we wondered whether the silencing activity of Sil2126 depends on the presence of the original copy near the telomere. We deleted the original telomeric copy of Sil2126 leaving only one copy of the Sil-reporter system at -31.9 kb (Figure 1C compare bottom and top lines, +/- and +/+) and we found that this element silences the *URA3* reporter efficiently in the absence of the original copy, (Figure 1D lines 1, 2 and 3).

We have previously shown that the Sil2126 element depends on Sir3, and partially on Rif1 but not on yKu70/80 (ROSAS-HERNANDEZ *et al.* 2008). We have now extended these results by testing the dependence on Sir2 and Rap1. The Rap1-21 allele used is defective in subtelomeric silencing in *C. glabrata* (DE LAS PENAS *et al.* 2003). The results confirmed previous data (ROSAS-HERNANDEZ *et al.* 2008) and in addition we show that Sil2126 also depends on Rap1 and Sir2 to silence the reporter at -31.9 kb from the telomere E<sub>R</sub> (Figure 1D compare line 1 with lines 4 and 8).

### **Sil2126 requires the telomere context and is orientation dependent**

As shown above, the Sil2126 element mediates silencing of a *URA3* gene integrated at -35 kb away from the telomere, to test whether this element is a bona fide silencer or a protosilencer that requires the telomere context, we first integrated the Sil-reporter system further away from the same telomere at a

distance of -50 kb from telomere E<sub>R</sub>. We found that increasing the distance from 35 to 50 kb from the same telomere, completely abolishes the silencing activity of Sil2126 (Figure 2A compare lines 1 and 2 with 3 and 4). We also moved the Sil-reporter system to three different internal locations in different chromosomes, more than a 100 kb from either telomeres or centromeres, structures where chromatin is normally assembled into a repressive conformation. We chose a large intergenic region in chromosome F between CAGL0F04015g and CAGL0F04081g genes 160 kb away from the centromere, or an intergenic region in chromosome M between CAGL0M01870g and CAGL0M01892g localized 224 kb from the left telomere, and in an intergenic region in chromosome L between CAGL0L06072g and CAGL0L06094g, 263 kb from the centromere. As shown in Figure 2A the Sil-reporter system does not show silencing activity at any of the three internal chromosomal locations tested, suggesting that Sil2126 requires the telomere context, thus behaving as a protosilencer (compare lines 8, 9, 10, 11 and 12 with lines 1 and 2 in Figure 2A). In order to test whether any telomere can serve as a nucleating center for the silencing activity for Sil2126, we integrated the Sil-reporter system in both orientations with respect to the telomere, 34 kb away from the left telomere on chromosome E (E<sub>L</sub>), a distance similar to where we detect silencing activity by Sil2126 at E<sub>R</sub>. Interestingly, we found that Sil2126 cannot mediate silencing of the reporter at this position in either orientation, indicating that telomeres are not equivalent at propagating and or nucleating silencing (Figure 2 compare lines 5, 6 and 7 with 1 and 2).

Because these data indicate that Sil2126 behaves as a protosilencer rather than a silencer, we also tested whether its activity is orientation dependent like some other protosilencers (Bi *et al.* 1999; McNALLY 1991; SHEI 1995; ZOU *et al.* 2006). To this end we inverted Sil2126 with respect to the *URA3* gene and integrated it at the original location near telomere E<sub>R</sub> (*URA3* promoter is at -35 kb from the telomere repeats). As shown in Figure 2B line 15, inverting Sil2126 completely abolishes silencing activity of the element, further indicating that Sil2126 behaves as a protosilencer, probably strengthening the silencing originating at the telomere E<sub>R</sub>. Furthermore, inverting the whole Sil-reporter system with respect to the telomere E<sub>R</sub> (but maintaining the relative orientation between Sil2126 and the *URA3* reporter) and inserting it at -32 kb, also results in loss of silencing mediated by the Sil2126 element (Fig 2B line 16).

### **Subtelomeric silencing at telomere E<sub>R</sub> is strongly diminished by a strong promoter inserted close to the telomeric repeats**

A strong promoter close to a silenced region can work as a barrier to prevent spreading of the silent chromatin nucleated at a telomere or a silencer located close by (Bi and BROACH 1999; DONZE *et al.* 1999; DONZE and KAMAKAKA 2001; FOUREL *et al.* 2001). In order to test whether a strong promoter can interrupt silencing started at the E<sub>R</sub> telomere, we used the set of strains containing insertions of the *URA3* gene at different positions throughout the E<sub>R</sub> telomere, and replaced in each of them the Sil2126 element with the hygromycin-resistance cassette containing the strong promoter from the *PGK1* gene driving the *hph* gene.

We also constructed a simple deletion of Sil2126 in each reporter strain by removing the hygromycin cassette by recombination of the flanking FRT sites with Flp1 leaving only a 35 bp FRT “scar” as described in Materials and Methods. As shown in Figure 3 the presence of the *PGK1* promoter dramatically diminishes silencing nucleated at the telomere of different *URA3* reporter insertions located at increasing distances from telomere E<sub>R</sub> (Figure 3B compare lines 1 and 2 with line 3, lines 4 and 5 with line 6 and lines 7 and 8 with 9). Interestingly, silencing of the reporter insertions throughout this telomere is achieved even in the absence of the original copy of Sil2126 (*sil*Δ), that is in those constructs where the *PGK1* promoter has been deleted (Figure 3 compare lines 1, 4 and 7 with lines 2, 5 and 8).

### **yKu70/80 independent silencing of telomere E<sub>R</sub> is due to the Sil2126 element**

We next considered that the presence of the Sil2126 at this telomere might contribute to the silencing nucleated at the telomere and could account for the relative independence of this telomere to the silencing proteins yKu70 and yKu80, which are essential for subtelomeric silencing in *S. cerevisiae* and at least three other telomeres tested in *C. glabrata*. To test this, we introduced deletion alleles of Sil2126 (*sil*Δ), yKu70 (*hdf1*Δ), yKu80 (*hdf2*Δ) and double deletion mutants (*hdf1*Δ *sil*Δ and *hdf2*Δ *sil*Δ) into the four *URA3* reporter strains. As shown in Figure 4A, single deletions of Sil2126 or either of the *HDF1* or *HDF2* genes has almost no effect on the level of silencing on each of the *URA3* reporters (Figure 4A compare line 1 with lines 2, 3 and 4). However, double deletions of Sil2126 and either *HDF1* or *HDF2* results in complete loss of silencing of the four reporter genes assayed at this telomere (Figure 4A, compare line 1 with lines 5 and 6), indicating that Sil2126 and yKu70/80 perform overlapping functions for silencing at this telomere. In order to test whether silencing of the native gene *EPA3* also depends on both Sil2126 and yKu70/80, we assayed *EPA3* expression by RT-PCR in different deletion strains, and found that even though there is no detectable expression of *EPA3* in stationary phase cultures of the wild type and *sil*Δ strains (Figure 4B lanes 2 and 4), *EPA3* transcription is strongly derepressed in two types of strains: in the double *hdf2*Δ *sil*Δ as well as in the strain where the *PGK1* promoter has been inserted between the telomere and *EPA3* (Figure 4B lanes 5 and 9). These results indicate that the apparent independence of the yKu proteins for silencing of the native *EPA3* gene and the reporter *URA3* inserted at different distances from telomere E<sub>R</sub>, requires the presence of Sil2126 in this telomere, and that yKu proteins and Sil2126 perform overlapping functions to bring about silencing at this telomere.



## Discussion

Adherence of *C. glabrata* to host epithelial cells depends on the expression of some members of the *EPA* family of adhesins, in particular *Epa1* is the major protein mediating adherence to epithelial cells in vitro (CORMACK *et al.* 1999). The *C. glabrata* genome contains approximately 23 *EPA* genes (depending on the strain), the majority of which are encoded in subtelomeric regions where they are subject to chromatin-based silencing that depends on Rap1, the Sir proteins and to varying degrees on Rif1, yKu70 and yKu80 proteins, an effect determined by the particular telomeric context (ROSAS-HERNANDEZ *et al.* 2008). Of particular interest is the fact that the subtelomeric silencing of *EPA2* and *EPA3*, which are localized in a cluster close to the right telomere on chromosome E ( $E_{-R}$ ), does not depend on yKu70 and yKu80 proteins (ROSAS-HERNANDEZ *et al.* 2008). In this paper we characterized the cis-acting element Sil2126 localized between *EPA3* and the telomere  $E_{-R}$ , the data presented suggests first that Sil2126 is a protosilencer element that contributes to silencing at this telomere, and that Sil2126 and the Ku proteins perform overlapping functions to bring about silencing, so that the presence of Sil2126 in this telomere results in the apparent lack of dependence of this telomere on the yKu proteins.

### Sil2126 behaves as a protosilencer

Bona-fide silencers are elements that mediate silencing in any genomic context and are independent of other silencer elements in its vicinity to establish and/or maintain silencing. Protosilencers on the other hand are cis-acting elements that strengthen silencing originated at a bona fide silencer or a telomere, in a position and orientation dependent manner.

The cis-acting Sil2126 region described in this paper behaves as a protosilencer that depends on a specific subtelomeric context: that of the chromosome  $E_{-R}$  subtelomeric region. This conclusion is based on several pieces of evidence: a) The element does not mediate silencing of the reporter when it is moved to internal regions in three different chromosomes far from the telomere or centromere (Figure 2A, lines 8, 10 and 12); b) the silencing activity of Sil2126 is sensitive to the distance from its telomere, since the Sil-reporter system mediates silencing of *URA3* when placed 31.9 kb from the telomere  $E_{-R}$ , but increasing the distance to 50 kb from the same telomere, abolishes silencing (Figure 2A compare lines 1 with 3); c) Sil2126 activity is orientation dependent because inverting the element with respect to *URA3*, or inverting the entire Sil-reporter system with respect to the telomere, completely abolishes silencing of the reporter (Figure 2 B, lines 13, 15 and 16); and d) not every telomere provides the appropriate context for the silencing activity of Sil2126, since inserting Sil-reporter system at an equivalent distance in a different telomere, in either orientation (*URA3* promoter is localized 38.31 kb and 37.32 kb respectively from the telomere  $E_{-L}$ ) does not mediate silencing of *URA3* (Figure 2A compare line 1 with 5 and 7). This suggests that silencing at different telomeres in *C. glabrata* depends on the particular combination of cis-acting elements present at each subtelomeric region.

**A strong promoter can block spreading of the silent chromatin from the telomere E<sub>R</sub>.**

Interestingly, insertion of the strong promoter from the *PGK1* gene between the telomere and *EPA3* (deletion/insertion allele  $\text{sil}\Delta::P_{PGK1}::hph$ ), completely abolishes silencing not only of the reporter gene inserted at 4 different positions in telomere E<sub>R</sub> but also of the native *EPA3* gene (Figs. 3 and 4B, compare lanes 2 and 5). This effect is due most likely to the promoter and not to deletion of the Sil2126 element since elimination of the strong promoter by recombination between the FRT sites flanking the deletion/insertion mutation, returns to the same level of silencing present in the parental strains carrying the *URA3* gene, even though both constructs lack Sil2126 element (Figure 3B, compare line 1 with 2; line 4 with 5 and line 7 with 8; and Figure 4B, compare lanes 2, 4 and 5). This is similar to some strong promoters that recruit RNA Pol II or RNA Pol III complexes which can act as barriers (or boundary elements) for heterochromatin spreading as has been reported for the tRNA gene on telomere proximal side of *HMR* (DONZE and KAMAKAKA 2001; FOX and McCONNELL 2005; RUSCHE and LYNCH 2009). Additionally, some promoters that recruit chromatin remodeling complexes (containing histone acetyl-transferases like Sas2 and Gcn5) can also function as barriers to the spreading of the silent chromatin (OKI *et al.* 2004).

**Sil2126 is responsible for the apparent yKu70 yKu80 independent silencing at telomere E<sub>R</sub>.**

The presence of Sil2126 in the subtelomeric region of chromosome E<sub>R</sub> renders silencing at this telomere seemingly independent of yKu70 and yKu80, however, the participation of the yKu proteins in silencing at this telomere is uncovered in the strain carrying a deletion of Sil2126. It is likely that Sil2126 strengthens silencing established at this telomere leading to silencing of a large subtelomeric region spanning more than 20 kb. Protosilencers contain several different types of sequences that may be simple binding sites for Rap1, Abf1 and ORC, or complex sequences like the subtelomeric core X sequences in *S. cerevisiae* (BOSCHERON *et al.* 1996; BRAND AH. 1985). These elements have been proposed to act as relays for the propagation of the silent chromatin nucleated at the telomere repeats (or other silencing promoting environments where silencing is already present), thereby increasing the length of the silenced domain and enhancing silencing of the affected genes (FOUREL *et al.* 1999; LEBRUN *et al.* 2001). Silencing mediated by the combination of bona fide silencers (such as the telomere repeats) and protosilencers can even propagate discontinuously over long distances from the telomere due to the presence of so-called boundary elements (SUN and ELGIN 1999) that prevent spreading of the silent chromatin (FOUREL *et al.* 2001; FOUREL *et al.* 1999; LEBRUN *et al.* 2001; SUN and ELGIN 1999). This discontinuous propagation could be achieved by the formation of chromatin loops between the telomere and the protosilencer elements present at subtelomeric loci. Such loops

at the end of telomeres have been proposed to explain the presence of Rap1 and yKu at positions far away from the telomeric repeats and ends, where they normally bind (MARTIN *et al.* 1999; STRAHL-BOLSINGER *et al.* 1997; ZAMAN *et al.* 2002). Further support for the idea of telomeric looping comes from experiments where repression is observed “at a distance” in *S. cerevisiae* when the repressor Tup1 is tethered to the DNA near a telomere and far from the target promoter (ZAMAN *et al.* 2002). In the E<sub>R</sub> subtelomeric region silencing is propagated over more than 20 kb and the combination of the telomere environment with the cis-acting Sil2126 provides strong silencing of the native genes as determined by the very low (or absent) expression of *EPA3* detected by RT-PCR (Figure 4B compare lanes 2, 4, 6 and 7), and the strong silencing of the *URA3* reporter insertions in single *hdf1*Δ, *hdf2*Δ, or *sil* mutants. yKu70 and yKu80 must be normally contributing to silencing of this telomere since in the absence of Sil2126, these proteins become essential for silencing, because double *hdf1*Δ *sil*Δ or *hdf2*Δ *sil*Δ mutants derepress *EPA3* expression as well as the *URA3* reporter insertions throughout telomere E<sub>R</sub> (Figure 4A compare line 1 with lines 5 and 6; and Figure 4B compare lane 2 with lane 9, and data not shown). In this regard, it is noteworthy that in *S. cerevisiae* *hdf1*Δ mutants, loss of silencing at truncated telomeres that contain core X element is less severe than in truncated telomeres not containing core X (FOUREL *et al.* 1999); and in *hdf1*Δ mutants the presence of an ACS or Abf1 binding site at a truncated telomere can mediate partial silencing that compensates for the loss of yKu70 (LEBRUN *et al.* 2001). We are currently investigating whether the distribution of the Sir and yKu proteins along the E<sub>R</sub> telomere is continuous or discontinuous and what proteins are required or bind to Sil2126.

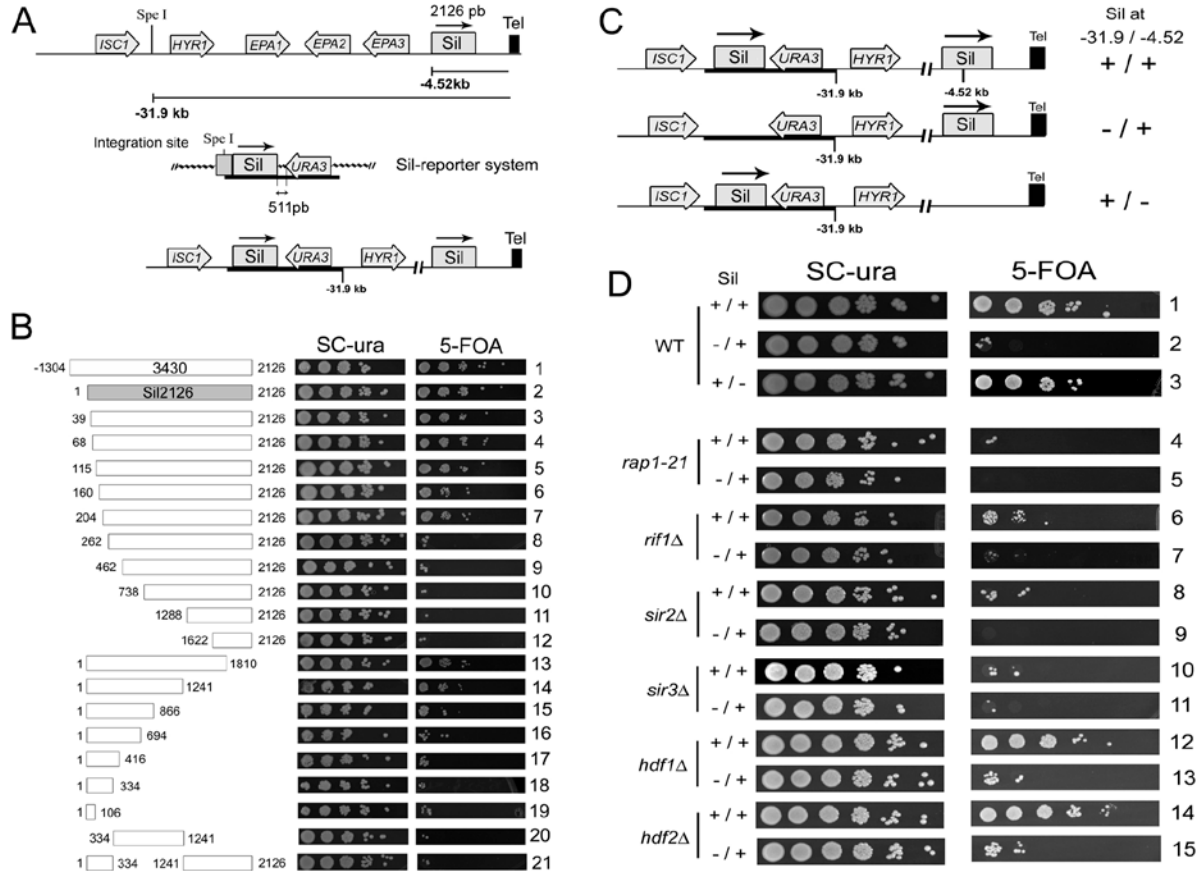
We have shown that Rif1 is required discontinuously for silencing at telomere E<sub>R</sub> (ROSAS-HERNANDEZ *et al.* 2008), contributing to the complexity of the regulation of this region, which contains *EPA1*, the major adhesin mediating adherence to epithelial cells in vitro. Therefore, it seems that the particular combination of cis-acting sequences at each telomere determines the level of silencing at each position in different telomeres and this could result in a particular pattern of *EPA* gene expression depending on the specific context where the genes reside. In addition it is possible that some of the proteins involved in silencing at the subtelomeric regions respond to environmental signals and modulate the level of repression differently at each telomere depending on the particular telomere context. The ability to express different *EPA* genes could allow *C. glabrata* to adhere to different surfaces and this could be important for the persistence of *C. glabrata* in different environments within the mammalian host.

## **Acknowledgements**

We thank Brendan Cormack for helpful discussions and for reagents. We are grateful to O. E. Arroyo-Helguera and C.Y. Ramirez-Zavaleta for excellent technical assistance. A.J.R. was supported by CONACyT fellowship No. 167877.

This study was supported by CONACyT grant No. CB-2005-48304 to I.C.N.

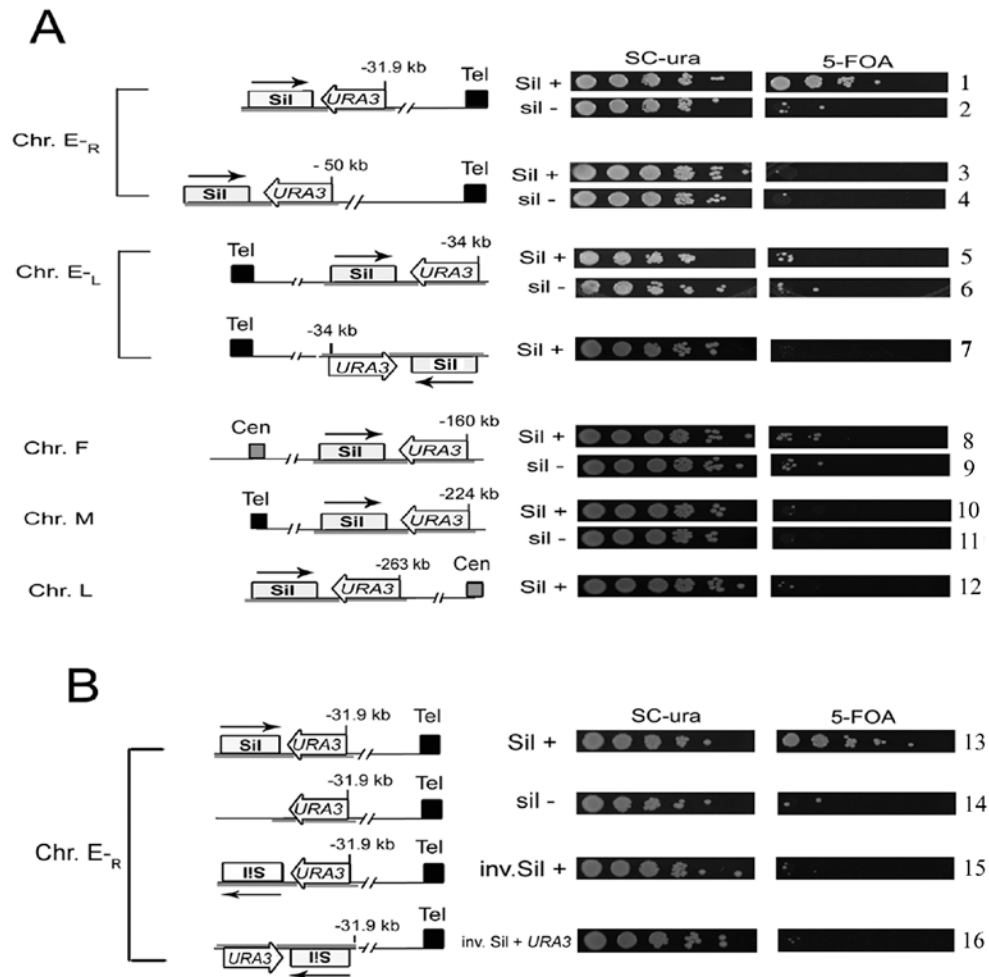
## Figures



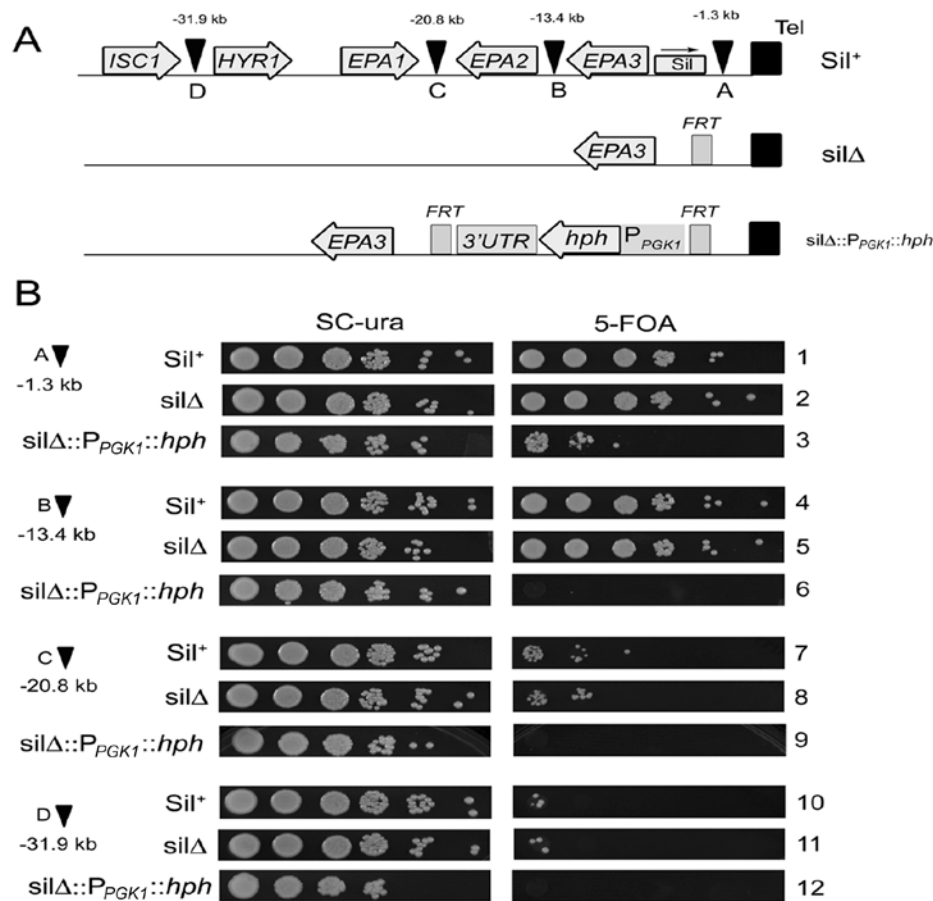
**FIGURE 1.** The cis-acting silencing element Sil2126 is composed of at least two functional modules and requires Sir2, Sir3, Rap1, Rif1 but not the yKu70/80 heterodimer. (A) Top line: Schematic representation of the  $E_R$  telomere showing the Sil2126 element (represented by a gray rectangle labeled 2126), and the nucleotide position of its 5' end (4.52 kb from the telomere). Arrowheads indicate 5' to 3' direction of Sil2126. Light gray arrows represent the different subteleromic *EPA* genes and indicate their direction of transcription. Middle line: Map of the Sil-reporter system used to integrate at the *SpeI* site between *ISC1* and *HYR1* consisting of a PCR fragment containing the integration region, cloned immediately adjacent to the 5' end of the Sil2126 element followed by the *URA3* reporter gene. The *SpeI* recognition site (at -31.9 kb) used to linearize and integrate the vector is indicated. Bottom line: schematic representation of the Sil2126-reporter system integrated between *ISC1* and *HYR1* (indicated by a thick black line). The telomere is represented by black rectangles labeled "Tel". (B) Assessment of the level of silencing of serial 5' and 3' deletions of the Sil2126 element. On the left side is shown the different constructs represented by empty rectangles, used to assay the level of silencing of the *URA3* gene conferred by the truncated versions of the Sil2126 element. Numbers on either side of the rectangles indicate the nucleotide position of the 5' and 3' ends of the truncated versions. The complete, original Sil2126 element is indicated by the gray rectangle. On the right side is shown the level of silencing conferred by the truncated Sil elements tested as measured by growth on SC – ura and 5-FOA plates. Strains of *C. glabrata* containing the different truncated versions of the Sil element integrated between *ISC1* and *HYR1* 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 hrs and photographed. (C) Schematic representation of different combinations of Sil2126 elements at telomere  $E_R$ . Top line: Map of the  $E_R$  telomere showing the original Sil2126 element at its native position (-4.52 kb

---

from the telomere repeats) plus the integrated Sil2126-reporter system integrated at -31.9 kb (SpeI site) generating a duplication of Sil2126 element, indicated by Sil+ / + on the right side. Middle line: Integration of the negative control used consisting of the *URA3* reporter integrated at -31.9 kb without Sil2126. This construct conserves the original Sil2126 at -4.52 kb and is indicated by sil - / +. Bottom line: map of the construct containing the Sil2126-reporter system integrated at -31.9 kb of telomere E<sub>R</sub> and deletion of the original Sil element at -4.52 kb, indicated by Sil + / -. (D) Level of silencing of the Sil-*URA3* reporter constructs (indicated to the left) in different mutants of the silencing machinery. The experiments were made as indicated for panel B of this Figure.

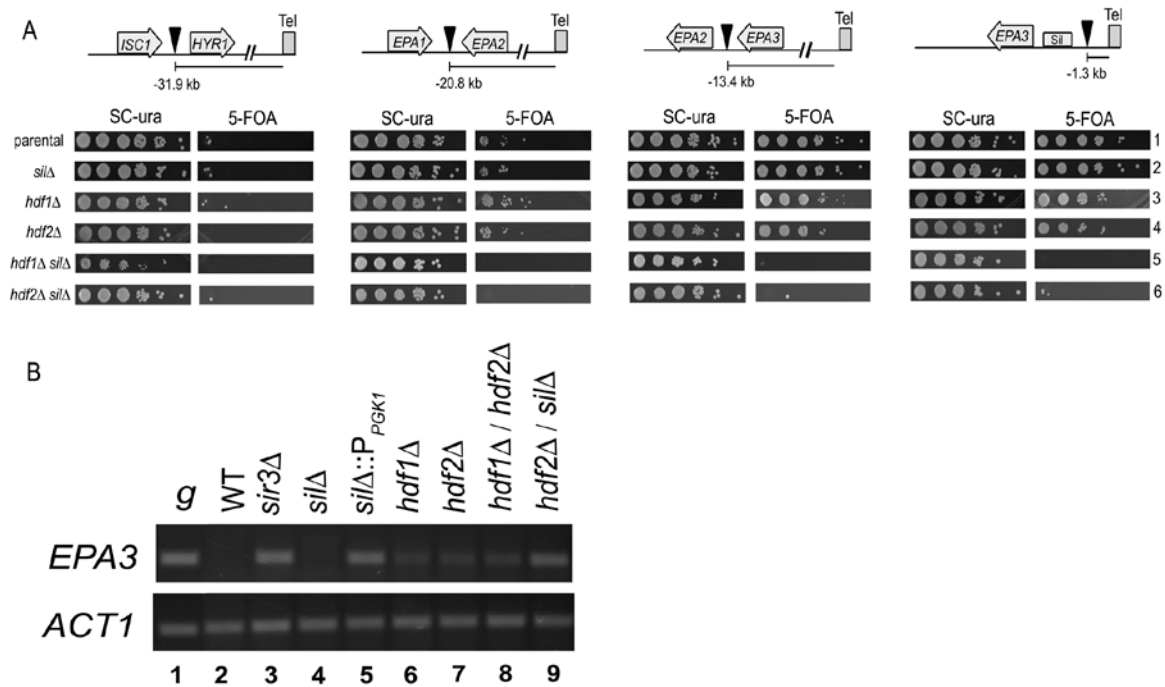


**FIGURE 2.** Sil2126 requires the telomere  $E_R$  context and is orientation dependent. (A) Dependence of the Sil element on the telomere context. Schematic representation of the Sil2126-reporter system is shown on the left side (Sil<sup>+</sup>). The schematic map of the negative control (sil<sup>-</sup>) consisting only of the *URA3* reporter with no Sil2126 is not shown. Both of these constructs are integrated at two positions in telomere  $E_R$ : at -31.9 kb (the *URA3* gene starts at position -35 kb), lines 1 and 2; and integration at -50 kb (lines 3 and 4). Insertion of Sil<sup>+</sup> and sil<sup>-</sup> reporter constructs in both orientations at -34 kb from telomere  $E_L$  (lines 5, 6 and 7). Integration of the Sil<sup>+</sup> or sil<sup>-</sup> constructs at an internal position in chromosome F (160 kb from the centromere, lines 8 and 9). Integration of the constructs at an internal position in chromosome M (224 kb from the telomere  $M_L$ , lines 10 and 11) and integration of the Sil<sup>+</sup> at an internal site in chromosome L at 263 kb from centromere  $L_R$  (line 12). On the right side the growth phenotype on SC – ura and on 5-FOA plates is shown for each construct to assess the level of silencing. Strains carrying the corresponding Sil-reporter constructs integrated at the indicated chromosomal locations were grown to stationary phase in YPD, and diluted and spotted on SC – ura and 5-FOA plates as described in Figure 1B. (B) Silencing activity of Sil2126 is orientation dependent. The orientation of the Sil2126 was inverted with respect to the *URA3* reporter and was integrated in the same position (the *URA3* promoter is at -35 kb from the telomere  $E_R$ ) (compare lines 13 and 15). Orientation of the entire module Sil2126-*URA3* was inverted, resulting in inversion of both elements of the system with respect to the original orientation but maintaining the same relative position to each other (line 16). Strains carrying each construct indicated on the left side were grown to stationary phase and spotted onto the indicated plates as described for Figure 1B. Arrowheads indicate the 5' to 3' direction of Sil2126.



**FIGURE 3.** Subtelomeric silencing in telomere E<sub>R</sub> is abolished by the presence of a strong promoter between the telomere and the *URA3* reporter. (A) Top line: Schematic representation of the subtelomeric region of chromosome E<sub>R</sub>. Empty, gray arrows indicate the 5 native genes present in this region and their respective direction of transcription. Inverted black triangles indicate *URA3* insertions at the shown positions with respect to the telomere. The gray rectangle indicates Sil2126 element at its original position. Arrowhead indicates the 5' to 3' direction of the element. Middle line: Sil deletion/insertion allele was integrated in each strain carrying the corresponding *URA3* reporter insertions at different positions throughout telomere E<sub>R</sub>. The *hph* gene driven by the strong promoter from *PGK1* is inserted replacing Sil2126 thus placing a strong promoter close to the telomere. Bottom line: *hph* cassette is excised from the deletion/insertion allele leaving one copy of the 35 bp FRT site. (B) Plate growth assay of strains containing the indicated *URA3* reporter insertions at increasing distances from the telomere in the wild-type Sil2126 genetic background (Sil<sup>+</sup>), the sil simple deletion (silΔ) and sil deletion/insertion allele (silΔ::P<sub>PGK1</sub>::hph) as indicated. Strains containing each of the *URA3* reporter insertions in each of the three backgrounds were grown to stationary phase in YPD and spotted onto the indicated plates as described for Figure 1B.





**FIGURE 4.**  $yKu70/80$  independence of subtelomeric silencing on chromosome  $E_R$  requires the Sil2126 element. (A) Silencing of four different *URA3* reporters (black triangles) in the  $E_R$  telomere as measured by the ability to grow on 5-FOA plates. Strains containing the indicated reporter insertions throughout the  $E_R$  telomere (shown at the top of each panel) were used as recipients to introduce the following deletion alleles: *sil*, *hdf1* $\Delta$  ( $yKu70$ ), *hdf2* $\Delta$  ( $yKu80$ ), or double deletions *hdf1* $\Delta$  *sil* $\Delta$  or *hdf2* $\Delta$  *sil* $\Delta$ . All of these strains were grown to stationary phase and spotted onto the indicated plates as described for Figure 1B. (B) *EPA3* transcription is strongly derepressed both when the Sil2126 element is deleted as well one of the *HDF* genes (*hdf1* $\Delta$  or *hdf2* $\Delta$ ), or when the strong promoter from *PGK1* is inserted between the telomere and *EPA3*. We used a *sir3* $\Delta$  strain as control since we have previously shown that *EPA3* is derepressed in the absence of Sir3. All strains were grown to stationary phase and total RNA was isolated and used for RT-PCR (see Materials and Methods). Lane 1 shows genomic DNA used as positive control for PCR. Actin specific primers were used as internal control for RT-PCR. A negative control without RT was also made and no bands were obtained (not shown).

## References

- AUSUBEL, F., R. BRENT, R. E. KINGSTON, D. D. MOORE, J. G. SEIDMAN, J. A. SMITH, AND K. STRUHL, 2001 Current protocols in molecular biology. Wiley and Sons, Inc., New York, N Y.
- 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.
- BI, X., and J. R. BROACH, 1999 UAS(rpg) can function as a heterochromatin boundary element in yeast. *Genes & Development* **13**: 1089-1101.
- BOSCHERON, C., L. MAILLET, S. MARCAND, M. TSAI, P. FLUGFELDER, S. M. GASSER *et al.*, 1996 Cooperation at a distance between silencers and proto-silencers at the yeast HML locus. *Embo Journal* **15**: 2184-2195.
- BRAND AH., B. L., ABRAHAM J., STERNGLAZ R. AND NASMYTH K., 1985 Characterization of a "silencer" in yeast: a DNA sequence with properties opposite to those of a transcriptional enhancer. *Cell* **41**: 41-48.
- BUHLER, M., and S. M. GASSER, 2009 Silent chromatin at the middle and ends: lessons from yeasts. *Embo Journal* **28**: 2149-2161.
- CASTANO, I., R. KAUR, S. PAN, R. CREGG, A. DE LAS PENAS *et al.*, 2003 Tn7-based genome-wide random insertional mutagenesis of *Candida glabrata*. *Genome Res* **13**: 905-915.
- CASTANO, I., S. J. PAN, M. ZUPANCIC, C. HENNEQUIN, B. DUJON *et al.*, 2005 Telomere length control and transcriptional regulation of subtelomeric adhesins in *Candida glabrata*. *Mol Microbiol* **55**: 1246-1258.
- CORMACK, B. P., N. GHORI and S. FALKOW, 1999 An adhesin of the yeast pathogen *Candida glabrata* mediating adherence to human epithelial cells. *Science* **285**: 578-582.
- DE LAS PENAS, A., S. J. PAN, I. CASTANO, J. ALDER, R. CREGG *et al.*, 2003 Virulence-related surface glycoproteins in the yeast pathogen *Candida glabrata* are encoded in subtelomeric clusters and subject to RAP1- and SIR-dependent transcriptional silencing. *Genes Dev* **17**: 2245-2258.
- DONZE, D., C. R. ADAMS, J. RINE and R. T. KAMAKAKA, 1999 The boundaries of the silenced HMR domain in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genes & Development* **13**: 698-708.
- DONZE, D., and R. T. KAMAKAKA, 2001 RNA polymerase III and RNA polymerase II promoter complexes are heterochromatin barriers in *Saccharomyces cerevisiae*. *Embo Journal* **20**: 520-531.
- FOUREL, G., C. BOSCHERON, E. REVARDEL, E. LEBRUN, Y. F. HU *et al.*, 2001 An activation-independent role of transcription factors in insulator function. *Embo Reports* **2**: 124-132.
- FOUREL, G., E. LEBRUN and E. GILSON, 2002 Protosilencers as building blocks for heterochromatin. *Bioessays* **24**: 828-835.
- FOUREL, G., E. REVARDEL, C. E. KOERING and E. GILSON, 1999 Cohabitation of insulators and silencing elements in yeast subtelomeric regions. *Embo J* **18**: 2522-2537.

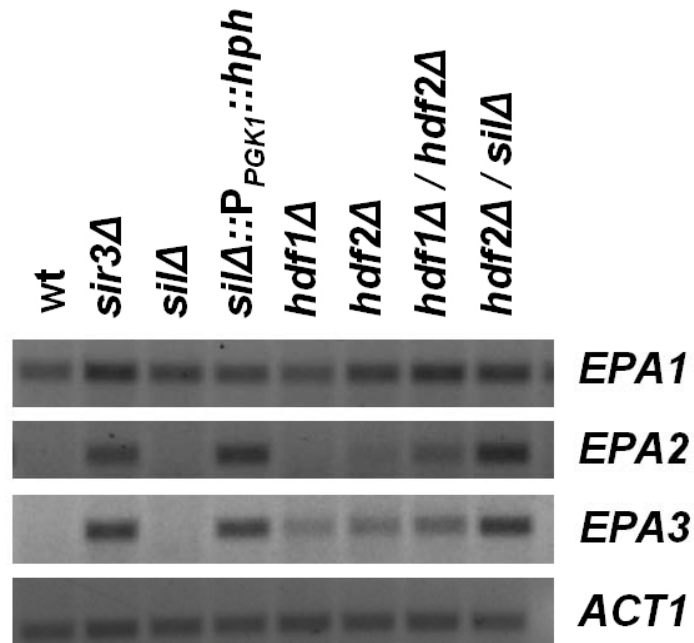
- FOX, C. A., and K. H. MCCONNELL, 2005 Toward biochemical understanding of a transcriptionally silenced chromosomal domain in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Biological Chemistry* **280**: 8629-8632.
- HOPPE, G. J., J. C. TANNY, A. D. RUDNER, S. A. GERBER, S. DANAIE *et al.*, 2002 Steps in assembly of silent chromatin in yeast: Sir3-independent binding of a Sir2/Sir4 complex to silencers and role for Sir2-dependent deacetylation. *Molecular and Cellular Biology* **22**: 4167-4180.
- LEBRUN, E., E. REVARDEL, C. BOSCHERON, R. LI, E. GILSON *et al.*, 2001 Protosilencers in *Saccharomyces cerevisiae* subtelomeric regions. *Genetics* **158**: 167-176.
- LIU, C., X. MAO AND A. J. LUSTIG 1994 Mutational analysis defines a C-terminal tail domain of RAP1 essential for telomeric silencing in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* **138**: 1025-1040.
- LOUIS, E. J., 1995 The chromosome ends of *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* **11**: 1553-1573.
- MARTIN, S. G., T. LAROCHE, N. SUKA, M. GRUNSTEIN and S. M. GASSER, 1999 Relocalization of telomeric Ku and SIR proteins in response to DNA strand breaks in yeast. *Cell* **97**: 621-633.
- MCEACHERN, M. J., BLACKBURN EH., 1994 A conserved sequence motif within the exceptionally diverse telomeric sequences of budding yeasts. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**: 3453-3457.
- MCNALLY, F., RINE J., 1991 A synthetic silencer mediates SIR-dependent functions in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* **11**: 5648-5659.
- MCNALLY FJ, R. J., 1991 A synthetic silencer mediates SIR-dependent functions in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* **11**: 5648-5659.
- OKI, M., L. VALENZUELA, T. CHIBA, T. ITO and R. T. KAMAKAKA, 2004 Barrier proteins remodel and modify chromatin to restrict silenced domains. *Molecular and Cellular Biology* **24**: 1956-1967.
- OTTAVIANI, A., GILSON, E., MAGDINIER, F., 2008 Telomeric position effect: From the yeast paradigm to human pathologies? *Biochimie* **90**: 93-107.
- PRYDE, F. E., and E. J. LOUIS, 1999 Limitations of silencing at native yeast telomeres. *Embo J* **18**: 2538-2550.
- ROSAS-HERNANDEZ, L. L., A. JUAREZ-REYES, O. E. ARROYO-HELGUERA, A. DE LAS PENAS, S. J. PAN *et al.*, 2008 yKu70/yKu80 and Rif1 Regulate Silencing Differentially at Telomeres in *Candida glabrata*. *Eukaryotic Cell* **7**: 2168-2178.
- RUSCHE, L. N., A. L. KIRCHMAIER and J. RINE, 2002 Ordered nucleation and spreading of silenced chromatin in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Biol Cell* **13**: 2207-2222.
- 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.
- RUSCHE, L. N., and P. J. LYNCH, 2009 Assembling Heterochromatin in the Appropriate Places: A Boost Is Needed. *Journal of Cellular Physiology* **219**: 525-528.

- SHEI, G. J., AND BROACH, J.R., 1995 Yeast Silencers can Act as Orientation-Dependent Gene Inactivation Centers that Respond to Environmental Signals. *Mol Cell Biol* **15**: 3496-3506.
- SHERMAN F., G. R. F., AND J. B. HICKS, 1986 *Methods in Yeast Genetics*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, NY.
- STRAHL-BOLSINGER, S., A. HECHT, K. LUO and M. GRUNSTEIN, 1997 SIR2 and SIR4 interactions differ in core and extended telomeric heterochromatin in yeast. *Genes Dev* **11**: 83-93.
- SUN, F. L., and S. C. R. ELGIN, 1999 Putting boundaries on silence. *Cell* **99**: 459-462.
- THAM, W. H., and V. A. ZAKIAN, 2002 Transcriptional silencing at *Saccharomyces* telomeres: implications for other organisms. *Oncogene* **21**: 512-521.
- ZAMAN, Z., C. HEID and M. PTASHNE, 2002 Telomere looping permits repression "at a distance" in yeast. *Current Biology* **12**: 930-933.
- ZOU, Y. F., Q. YU, Y. H. CHIU and X. BI, 2006 Position effect on the directionality of silencer function in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* **174**: 203-213.

## RESULTADOS ADICIONALES

### 8.1 La expresión de los genes *EPA* en el telómero E<sub>R</sub> se favorece en las mutantes que más afectan el silenciamiento de este telómero.

Para determinar si el elemento Sil2126 tiene efecto sobre la expresión de los otros genes *EPA* del locus, se realizaron ensayos de RT-PCR para los genes *EPA1* y *EPA2*. *EPA1* es el único de los tres genes del locus que se expresa en la cepa silvestre; sin embargo, su expresión se observa aumentada en las mutantes que más afectan el silenciamiento: *sir3Δ*, *silΔ::P<sub>PGK1</sub>::hph*, *hdf1Δ/hdf2Δ*, y *hdf2Δ/silΔ*. La expresión de *EPA2* y *EPA3* se encuentra notablemente aumentada en las mutantes que mayor efecto tienen en el silenciamiento (*sir3Δ*, *silΔ::P<sub>PGK1</sub>::hph*, *hdf2Δ/silΔ*) y ligeramente aumentada en las mutantes de Ku (Figura 10).



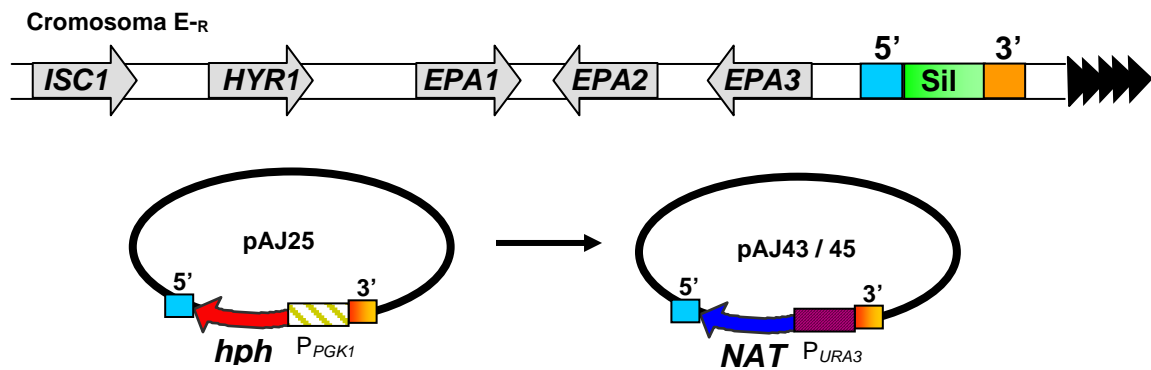
**Figura 10.** Análisis de expresión por RT-PCR de los genes *EPA1*, *EPA2* y *EPA3* localizados en el telómero E<sub>R</sub> en distintas mutantes de *C. glabrata*.

## 8.2 El promotor de *URA3* no es lo suficiente fuerte para contrarrestar el silenciamiento en la cercanía inmediata al telómero

Se ha encontrado que algunos promotores tienen la capacidad de bloquear la propagación del silenciamiento. Con el propósito de estudiar si además del promotor  $P_{PGK1}$ , existe otro promotor capaz de bloquear el silenciamiento subtelomérico en E-R se diseñaron vectores con el promotor de *URA3*.

Se construyeron los plásmidos integrativos pAJ43 y pAJ45 en los que el marcador de selección *NAT* que confiere resistencia a nourseotricina se encuentra bajo el promotor de *URA3* de *S. cerevisiae*. Estos plásmidos fueron diseñados para integrarse en el locus de Sil2126 y reemplazarlo. Las secuencias para integrar en *C. glabrata* por doble recombinación homóloga en estos plásmidos son las mismas que en el plásmido pAJ25, en el que el marcador de selección *hph* (resistencia a higromicina) se encuentra bajo el control del promotor *PGK1* (Figura 11).

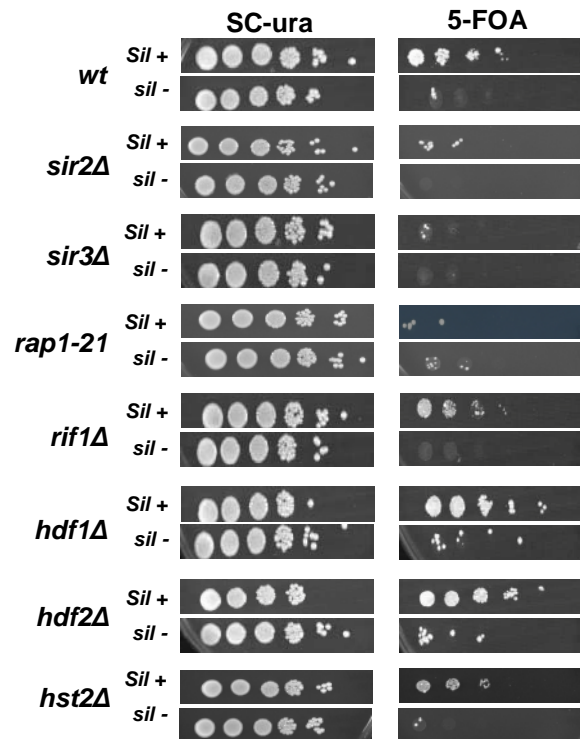
A diferencia de las cepas obtenidas al integrar pAJ25 en *C. glabrata* (CGM685 a CGM694 y más transformantes positivas extra), no se encontraron transformantes en las que pAJ43 y pAJ45 se integraran en el locus de Sil2126. Se analizaron más de 100 cepas transformantes obtenidas en transformaciones independientes y ninguna correspondió a la integración en el locus Sil2126. El dato anterior, a pesar de ser un resultado negativo, aporta evidencia que sugiere que la región inmediata al telómero está fuertemente silenciada y que solo ciertos promotores fuertes o con la capacidad de contrarrestar el silenciamiento local pueden dirigir suficiente expresión génica en este locus, como para permitir seleccionarlos.



**Figura 11.** Plásmidos diseñados para reemplazar por doble recombinación homóloga, la secuencia de Sil2126 por los genes reporteros *hph* y *NAT* bajo el control de los promotores de *PGK1* y *URA3* respectivamente.

### 8.3 El Silenciamiento mediado por Sil2126 es independiente de Hst2, y es dependiente de Rap1 y Sir2

Previamente se mostró que el silenciamiento mediado por Sil2126 es dependiente de Sir2, parcialmente dependiente de Rif1 y es independiente de Ku70 y Ku80. Para explorar la participación de la proteína Rap1, la cual se ha reportado se une a los telómeros, a silenciadores de los loci *HML* y *HMR*, y a silenciadores sintéticos con múltiples copias del sitio Rap1; se integró el sistema Sil-*URA3* a 32 kb del telómero E<sub>R</sub> en mutantes de Rap1. De igual forma se integró el sistema en mutantes de las sirtuinas *sir2Δ* y *hst2Δ*. Se encontró que el silenciamiento mediado por Sil2126 es dependiente de las proteínas Sir y de Rap1, y es independiente de Hst2. El menor crecimiento en 5-FOA en la cepa *hst2Δ* puede deberse a una diferencia en la velocidad de crecimiento de esta cepa respecto a la cepa silvestre. (Figura 12).



**Figura 12.** Efectos de diferentes mutantes sobre el silenciamiento mediado por Sil2126. El sistema reportero Sil2126-*URA3* fue integrado a 32 kb del telómero E<sub>R</sub>. El Silenciamiento mediado por Sil2126 es dependiente de Rap1 y de las proteínas del complejo Sir. No es dependiente de Ku70 (*HDF1*) y Ku80 (*HDF2*), y depende parcialmente de Rif1.

#### 8.4 Búsqueda de una clasificación de los telómeros de *C. glabrata*

Los telómeros de *S. cerevisiae* se clasifican en categorías con base en tres elementos internos a los repetidos teloméricos llamados: Y', secuencia core-X (XCS), y repetidos combinatorios X (XCR).

Secuencias en el XCS funcionan como protosilenciadores, por esta razón decidimos buscar si en las regiones subteloméricas de *C. glabrata* se podían identificar secuencias conservadas similares a estos elementos.

Al realizar un análisis con las únicas secuencias subteloméricas completas de la cepa *C. glabrata* BG2 de las que disponemos (A-L, B-L, C-L, C-R, E-R, I-R, y el telómero de EPA17), no fue posible identificar elementos conservados de suficiente extensión que pudieran ser los equivalentes al core X y Y' de las regiones subteloméricas de *S. cerevisiae*. En esta última, el core X se encuentra presente en todas las regiones subteloméricas de los 16 cromosomas, y presenta una alta identidad de secuencia entre las regiones homólogas que se extiende en casi 500 pb ([www.nottingham.ac.uk/biology/people/louis/telomere-data-sets.aspx](http://www.nottingham.ac.uk/biology/people/louis/telomere-data-sets.aspx)). Este dato podría indicar una diferencia notable entre las regiones subteloméricas de *C. glabrata* y *S. cerevisiae*. Sin embargo es necesario un análisis más detallado y con mayor número de secuencias de *C. glabrata* para determinar si existen elementos análogos a los reportados en *S. cerevisiae*.

Es importante notar que en este trabajo el silenciamiento es estudiado en telómeros naturales no truncados, a diferencia de la mayoría de trabajos en *S. cerevisiae*, en los que el silenciamiento puede ser alterado al hacer modificaciones extensas en la región subtelomérica (Figura 6). Esta característica es un punto a favor para conocer de forma más precisa el silenciamiento subtelomérico.



## DISCUSIÓN

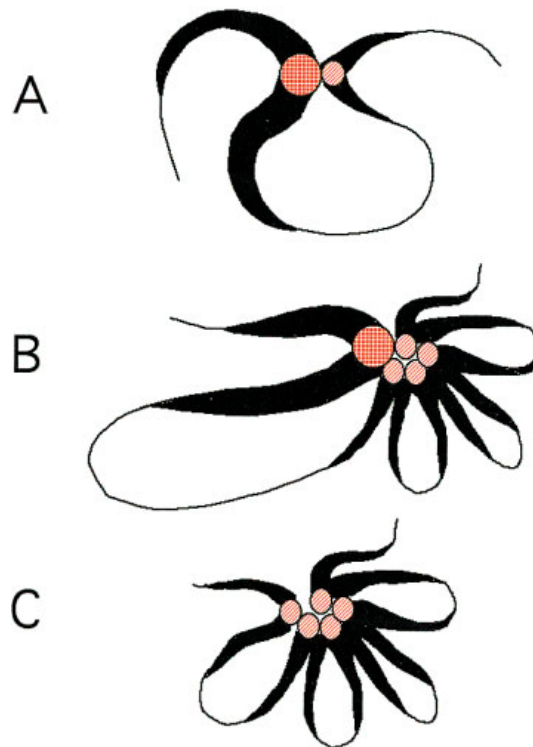
La adherencia de *C. glabrata* a las células epiteliales del huésped depende de la expresión de adhesinas de la familia de genes *EPA*. La mayoría de estos genes están codificados en regiones subteloméricas donde se encuentran sujetos a silenciamiento. El silenciamiento en estas regiones depende completamente de Sir2, Sir3, Sir4, Rap1, y de Rif1 y Ku70/yKu80, en diferente medida dependiendo el caso particular de cada telómero [21]. El brazo derecho del cromosoma E ( $E_R$ ), es un telómero particular, en el que el silenciamiento puede extenderse por lo menos 20 kb y apoyar el funcionamiento de un protosilenciador dependiente del telómero a 32 kb. Además, el telómero  $E_R$  de *Candida glabrata* junto con el único telómero estudiado de *Schizosaccharomyces pombe*, son los únicos casos reportados de silenciamiento subtelomérico no dependiente de Ku70/Ku80 [21, 92-93].

### 9.1 La región subtelomérica $E_R$ , un contexto adecuado para el silenciamiento

Una característica particular de la región subtelomérica  $E_R$ , es la presencia de secuencias repetitivas. La presencia de secuencias repetidas se ha correlacionado con la formación de heterocromatina. Una posibilidad que explique el por qué el silenciamiento subtelomérico del cromosoma  $E_R$  puede extenderse a mayor distancia que cualquier otro de los telómeros estudiados de levaduras, es esta naturaleza repetitiva de su región subtelomérica. Las regiones de repetidos directos en tándem que contienen los genes *EPA* podrían influir en la propagación del silenciamiento. *EPA1* y *EPA3* presentan mini satélites y *EPA2* presenta un mega satélite [94], estas secuencias son repetidos en tándem que en el caso de los genes *EPA* al traducirse generan secuencias ricas en serina importantes para la estructura de estas proteínas [91]. A diferencia del promotor *PGK1*, los promotores *EPA1*, *EPA2* y *EPA3* que son permisivos para la represión por el complejo Sir, permiten la extensión del silenciamiento a regiones más internas del cromosoma. Con relación a este último punto, *S. cerevisiae* cuenta con una familia de genes *PAU* constituida por 24 miembros, los cuales codifican para manoproteínas de pared celular. La mayoría de los genes *PAU* están localizados en regiones subteloméricas y se mostró que son sitios secundarios para la nucleación de Sir3, y posiblemente sean secuencias cooperativas para la propagación del complejo Sir [95]. Es posible que los telómeros ricos en genes *EPA* sean más favorables para el silenciamiento, que otros telómeros con otro tipo de genes, a pesar de que los repetidos teloméricos se presenten en igual cantidad y con la misma secuencia. Adicionalmente en esta región subtelomérica aparece una serie de 10.5 repetidos directos en tándem cuya secuencia consenso es (GGGAAGGATTTTCYT) a 1652pb de los repetidos teloméricos de secuencia consenso GGGTDCTGT(G<sub>3-5</sub>)TCT.

Además de la naturaleza repetitiva, la presencia de distintos elementos silenciadores o protosilenciadores espaciados a lo largo de la región subtelomérica  $E_R$  determina el grado de extensión del silenciamiento en este telómero. Una

explicación de esto podría ser que el silenciamiento originado en los repetidos del telómero se propague y/o establezca hacia el interior del cromosoma gracias a la presencia de distintos elementos en *cis* como Sil2126 y un elemento negativo localizado al 3' de *EPA1* (Gallegos *et al.*, datos no publicados) los cuales dependen del complejo Sir para ejercer sus efectos. Estos elementos pueden funcionar como puntos de relevo para la propagación del silenciamiento [89]. Su efecto podría ser mediante la formación de plegamientos estructurales que permiten interacciones funcionales en la región subtelo mérica (Figura 13). Esta hipótesis combina la propagación lineal del silenciamiento (oozing) en unas regiones, la formación de asas transitorias o permanentes entre puntos del DNA (looping) y la posible liberación de una enzima modificadora de histonas de un sitio para unirse a otros sitios cercanos de baja afinidad (hooping) [96]. Lo anterior, junto con la presencia de elementos de barrera, puede explicar los fenómenos de silenciamiento discontinuo observados en distintos telómeros.



**Figura 13.** Modelo de coalescencia para generar las interacciones funcionales entre elementos silenciadores. La cooperación funcional entre un silenciador y un protosilenciador (A), o entre un silenciador y un arreglo de protosilenciadores (B), forma una estructura coalescente al juntar diferentes elementos silenciadores en una única estructura. Arreglos repetitivos particulares de distintos elementos protosilenciadores pueden considerarse como un silenciador genuino, al crear una estructura de silenciamiento autónoma cuando se alcanza una adecuada eficiencia de reclutamiento de componentes de la heterocromatina (C). Tomada de "Protosilencers as building blocks for heterochromatin"[97].

## 9.2 Discontinuidad en la represión transcripcional

En el modelo más simplista de propagación del silenciamiento se asume que al originarse en los repetidos del telómero este se propaga de forma lineal y continua a lo largo de la fibra de cromatina. Sin embargo, la presencia de elementos de frontera naturales en las regiones subteloméricas ha mostrado que la propagación del silenciamiento es más compleja que este mecanismo. En la mayoría de los estudios de expresión en regiones subteloméricas, los genes reporteros reemplazan elementos subteloméricos importantes, lo que ocasiona que aparentemente se observe una disminución gradual y continua del silenciamiento conforme aumenta la distancia respecto al telómero (Figura 4).

En las regiones subteloméricas de todos los telómeros de *S. cerevisiae* se encuentra un elemento rico en secuencias repetidas llamado core-X, y el ~50% de los telómeros también poseen un elemento de mayor extensión denominado Y'. Estos elementos complejos contienen sitios de unión para los factores transcripcionales Tbf1 y Reb1, los cuales se ha mostrado que tienen efectos de barrera para la propagación de la cromatina (comúnmente llamadas STARS). Por otro lado el elemento X contiene sitios de unión de ORC y Abf1, los cuales tienen un efecto a favor en la formación de la cromatina silenciosa. El core-X funciona como un protosilenciador puesto que promueve y estabiliza el silenciamiento mediado por Sir3, pero no es un silenciador autónomo [32, 89]. Esto resulta en una discontinuidad en el silenciamiento subtelomérico y se ha propuesto que la discontinuidad puede ser debida a un pliegue (loop) en el telómero hacia regiones internas lo que evita la necesidad de una nucleación y transmisión lineal a partir de un único punto [32].

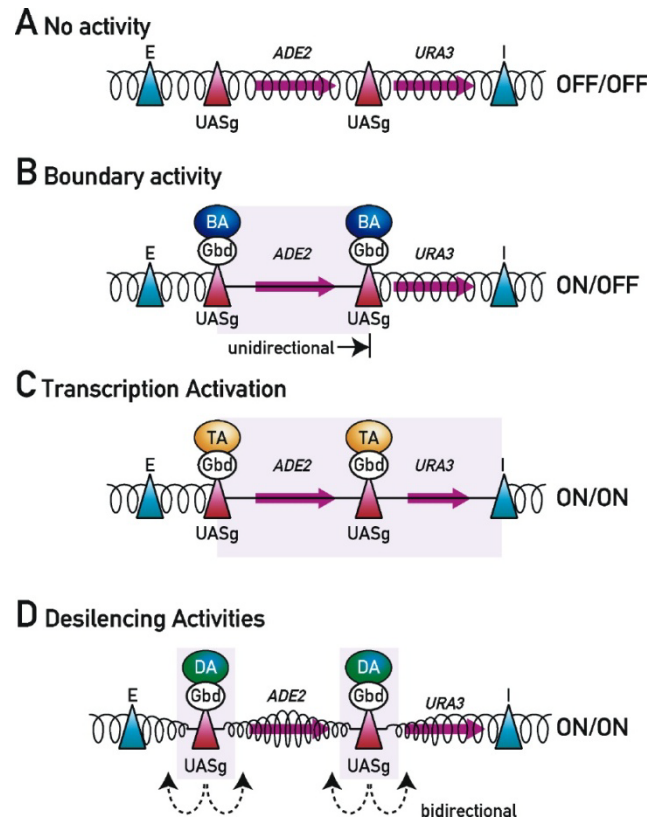
Por esta razón, los elementos de barrera, así como los posibles plegamientos para la propagación del silenciamiento pueden ser dos aspectos conectados del fenómeno de silenciamiento discontinuo.

## 9.3 El promotor *PGK1* como un elemento de barrera.

En el genoma eucariote los dominios activos e inactivos se encuentran adyacentes entre sí y separados funcionalmente por distintos elementos que modulan la extensión de la transcripción o represión en una región particular. Dichas secuencias en *cis* que permiten delimitar regiones son conocidas como elementos de frontera ("boundary elements"). En este trabajo se encontró que la secuencia del promotor *PGK1* contiene elementos que funcionan como barreras para la propagación del silenciamiento.

Algunos complejos remodeladores de nucleosomas pueden ser los responsables de ocasionar cambios en los nucleosomas que sean incompatibles con la propagación del silenciamiento, lo que permite la formación de una barrera debido a sus actividades. Un número grande de proteínas que funcionan como barreras para la propagación del silenciamiento originado en el silenciador E en *HMR*, pertenecen a complejos con multicomponentes. En este locus, el complejo Swi-Snf, TFIID y subunidades de complejos como Sas-I, SAGA, NuA3, NuA4, Spt10p, Rad6p y Dot1 han sido identificados como proteínas de barrera [98].

Es posible que los mismos complejos que puedan funcionar como barrera en el silenciamiento de *HMR*, que es similar en cuanto a composición del complejo Sir respecto al silenciamiento del telómero, también puedan tener el mismo efecto de contrarrestar la propagación del silenciamiento subtelomérico. Por tanto, el efecto mediado por el promotor fuerte *PGK1* podría tener una relación con el reclutamiento de estos mismos complejos, sus subunidades, o complejos con actividades similares. Sin embargo, no necesariamente se requiere de la transcripción misma dirigida por *PGK1* para su efecto de barrera, puesto que en varios estudios los factores de transcripción involucrados en la formación de la barrera, no requieren de la transcripción *per se* para ejercer dicha función. La forma en cómo el promotor *PGK1* impide la formación del silenciamiento podría ser estudiada en un ensayo similar al reportado por Ishi *et al.* [22]. En este sistema, se elige un locus silencioso, y la secuencia en estudio se coloca a ambos lados de un gen reportero; adicionalmente un segundo gen reportero que no esté completamente flanqueado por la secuencia en estudio se coloca adyacente a una de las dos copias de la primera secuencia, lo que permite distinguir entre más posibilidades de funcionamiento (Figura 14).



**Figura 14.** Diferentes estados de la cromatina en un sistema reportero ubicado en el locus silencioso *HML* de *S. cerevisiae* generados al reclutar diferentes tipos de proteínas con distintas capacidades de protección ante el silenciamiento. **(A)** Genes reporteros *ADE2* y *URA3* silenciados en el locus modificado de *HML* (“Sistema Reportero”) ubicado entre los silenciadores E e I. El locus ha sido modificado además con 2 secuencias UASg para reclutar proteínas fusionadas con el dominio Gbd como se indica. **(B)** Proteínas con actividad genuina de frontera, al ser reclutadas al sistema reportero delimitan un dominio, pero carecen de potencial para activación de la transcripción. **(C)** Activadores transcripcionales reclutados al sistema reportero establecen un dominio transcripcionalmente activo para ambos reporteros. **(D)** Proteínas con actividad desilenciadora bloquean la propagación de la heterocromatina de forma bidireccional. Tomada de “Structural and Dynamic Functions Establish Chromatin Domains” [22].

Al menos existen dos modelos propuestos de cómo funcionan los elementos de barrera.

a) En el modelo de modificación de la cromatina se propone que las proteínas de barrera unidas al DNA crean un dominio de cromatina abierta que previene la propagación del silenciamiento [99]. Estas proteínas de barrera se cree que funcionan reclutando enzimas modificadoras de la cromatina que al modificar los nucleosomas crean un estado desfavorable para la unión de las proteínas Sir lo que impide la propagación de la heterocromatina.

b) En el modelo topológico se propone que los elementos de barrera atan el DNA a una subestructura nuclear particular, lo que ocasiona un impedimento en la propagación de la heterocromatina. Sugiere también que al anclarse este DNA se generan distintos dominios funcionalmente independientes [100].

Con los experimentos realizados no se puede afirmar con seguridad si el efecto de bloqueo del silenciamiento mediado por el promotor  $P_{PGK1}$  es debido a una actividad de barrera (boundary) ó a una actividad dinámica de de-silenciamiento. La mayor parte de la evidencia apunta a que el mecanismo de acción es una actividad de de-silenciamiento. El plegamiento del telómero al subtelómero se ha propuesto que conlleva a un establecimiento multidireccional del silenciamiento, por propagación del telómero, por apareamiento de dos cadenas de DNA o también por clustering (Figura 15).

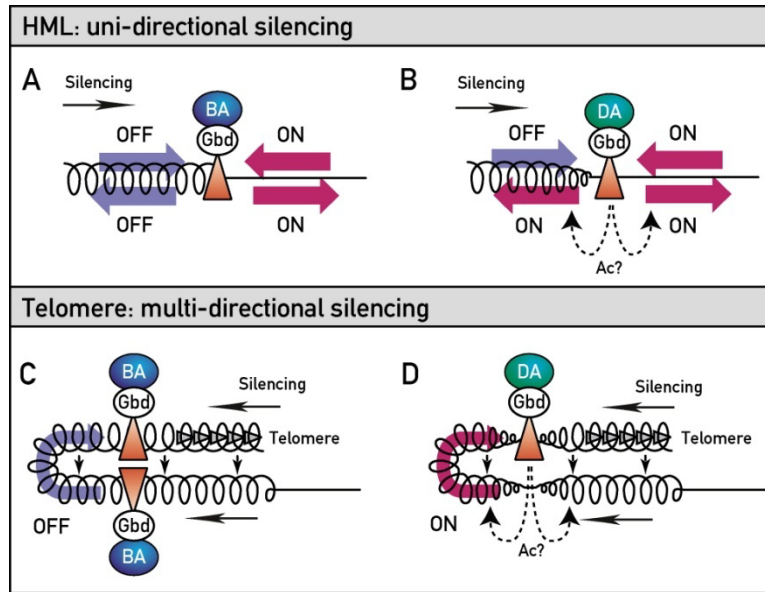
Basados en este modelo (Figura 15),  $P_{PGK1}$  no parece estar comportándose como una simple barrera pues la inserción de  $P_{PGK1}::hph$  no permite mantener silenciado el reportero *URA3* integrado a 1.4 kb del telómero aún cuando la inserción no se encuentra entre dicho reportero y el telómero. Este dato parece indicar una actividad de-silenciadora.

Sin embargo, en el modelo propuesto por Ishi & Laemmli [22], una proteína o complejo con actividad de-silenciadora tiene un efecto bidireccional sobre los genes inmediatamente adyacentes (~200 pb) y no sobre los situados a más de 1000 pb. En los resultados obtenidos de las integraciones de *URA3* a 14 kb y 20 kb del telómero, la pérdida de silenciamiento se presenta claramente a distancias mayores de 1 kb.

Esto puede indicar dos cosas:

- a) Existen varios plegamientos o enrollamientos del DNA en la región subtelomérica con el telómero, lo que ocasiona que la actividad desilenciadora propia de  $P_{PGK1}$  se acerque a loci relativamente cercanos atraídos a su proximidad por efectos de enrollamiento.
- b) El promotor  $P_{PGK1}$  tiene un efecto que impide la propagación del silenciamiento a partir del telómero ya sea la principal propagación lineal, o al interferir con el o los plegamientos del telómero que favorecen la propagación o refuerzo del silenciamiento.

El silenciamiento subtelomérico de un telómero particular no es debido a un agrupamiento de los otros telómeros que genere las condiciones necesarias básicas para este proceso. Se ha propuesto que el agrupamiento de los telómeros crea una zona con una concentración adecuada de factores de silenciamiento que favorece que el silenciamiento se produzca en los telómeros y regiones subteloméricas. Sin embargo, con los datos obtenidos podemos inferir que la presencia de los otros telómeros silvestres en la célula no puede cubrir los defectos en el silenciamiento generados por alteraciones en *cis* en un solo telómero particular.



**Figura 15.** La distinción experimental entre actividades de barrera (BA) y actividades desilenciadoras (DA) en una proteína o complejo está basada en sus diferentes modos de acción. Las BAs establecen un “rompeolas” ante la propagación de la heterocromatina posiblemente mediante un mecanismo pasivo de anclaje. Las DAs se propone que funcionan bidireccionalmente por una actividad enzimática como la hiperacetilación de histonas. Las BAs no tienen efecto en los telómeros posiblemente debido a que el mantenimiento y propagación del silenciamiento puede reforzarse por un loop en el telómero, por agrupamiento de los telómeros, o por apareamiento entre regiones del DNA que se apilan.

**(A)** Los BAs separan la heterocromatina de la eucromatina en una forma unidireccional cuando se colocan entre ambas regiones de cromatina.

**(B)** Los DAs separan los dominios de cromatina y su actividad desilenciadora tiene efecto bidireccional si los promotores de los genes adyacentes se encuentran en forma cercana.

**(C)** El plegamiento al final de los telómeros se propone que genera un silenciamiento multidireccional reforzado por interacciones simples en el mismo plegamiento. Los BA son insuficientes para contrarrestar la formación del silenciamiento.

**(D)** La actividad de los DAs en una región subtelo mérica puede eliminar el silenciamiento de genes que entren en proximidad con sus efectos enzimáticos debido a plegamientos del telómero o región subtelo mérica. Tomada de “Structural and Dynamic Functions Establish Chromatin Domains” [22].

#### 9.4 Plegamientos estructurales entre loci silenciosos

La regulación transcripcional tanto para activación como para represión génica generalmente implica procesos en los que las secuencias de control en *cis* se encuentran a varias kilobases de sus sitios de acción. La regulación génica por tanto requiere de la comunicación entre enhancers, silenciadores y promotores. Para llevar a cabo esta comunicación de señales entre dos secuencias separadas entre sí, se requiere de plegamientos en el DNA mediados por proteínas. Estas proteínas pueden participar en la formación del plegamiento, ó como intermediarios (conectores, puente) entre dos secuencias que se encuentren separadas. Las proteínas que se unen a un elemento pueden tener interacción con otras proteínas que reconocen otras secuencias localizadas a distancia.

Se ha propuesto que el complejo Sir promueve la formación de estructuras secundarias en la cromatina, mediante plegamientos [101-103]. De igual forma, se ha encontrado que distintos telómeros pueden interactuar con regiones internas del cromosoma. Las interacciones pueden ser transitorias o permanentes, y es probable que ocurran a larga distancia mediante plegamientos (looping).

Es posible que la formación de un loop entre el telómero y el interior del cromosoma permita la extensión del silenciamiento [104], y que la presencia de protosilenciadores facilite la formación de estos plegamientos. Los silenciadores podrían estabilizar y extender la propagación de los dominios de heterocromatina.

En *S. cerevisiae*, la evidencia de posibles plegamientos entre el telómero y regiones internas del cromosoma relativamente cercanas muestra que a ~3 Kb de los repetidos del telómero se pueden encontrar las proteínas Ku y Rap1 [105-106]. Otra evidencia que apunta a interacciones funcionales, es el hecho de que los silenciadores *HMR-E* y *HMR-I* se encuentran en estrecha proximidad espacial, posiblemente por la formación de un loop que los conecta. Dicha evidencia se ha obtenido por estudios de activación de un reportero *URA3* situado al 3' de *HMR-I* y un activador respectivo al 5' de *HMR-E*, y por ensayos de captura de conformación de la cromatina (3C). La mayor proximidad espacial se correlaciona con la presencia de Sir3 en la región silenciada, ya que en mutantes *sir3Δ* no se observa un enriquecimiento de los productos de PCR que corresponden a la interacción de estas dos regiones [107]. En otros ensayos, un sitio de unión del represor Tup1 colocado en las cercanías del telómero y a una distancia de 1.5 kb de un reportero *HIS3* puede reprimir la expresión de éste, posiblemente por la formación de un loop entre el telómero y regiones más internas del cromosoma. Dicho efecto se elimina en mutantes *sir3Δ* [104], mientras que la sobreexpresión de *SIR3* aumenta la extensión del silenciamiento subtelomérico [106].

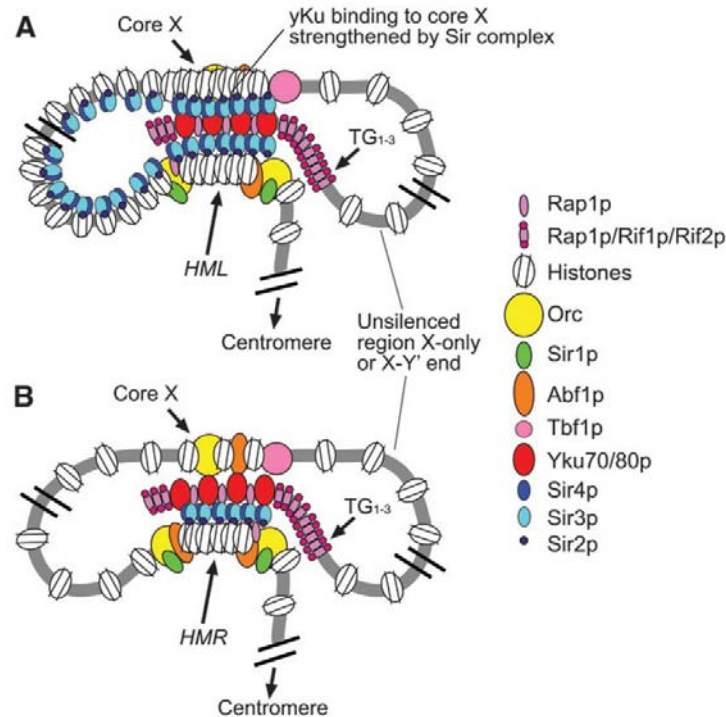


## 9.5 Ku70/Ku80 y Sil2126 en el silenciamiento subtelo mérico E-R

La evidencia experimental reportada aquí indica que Sil2126 compensa la ausencia de Ku70/Ku80 para el silenciamiento subtelo mérico. Mientras que mutantes sencillas *hdf1Δ* o *hdf2Δ* no desreprimen reporteros *URA3* localizados en cuatro diferentes localizaciones subtelo méricas, las mutantes dobles *hdf1Δ/sil2126Δ* o *hdf2Δ/sil2126Δ* eliminan el silenciamiento completamente. Una posibilidad que explique esto es que yKu70/yKu80 y Sil2126 tienen papeles redundantes, o parcialmente traslapados en el silenciamiento subtelo mérico.

Se ha reportado que las mutantes *hdf1Δ* y *hdf2Δ* afectan la localización subnuclear de los telómeros [108], así que Ku70/Ku80 ayudan a dirigir los telómeros a la periferia nuclear, sitios donde el silenciamiento puede ser promovido. Sil2126 podría tener sitios de unión para factores adicionales que ayuden a dirigir los telómeros a la periferia nuclear. Existe evidencia de telómeros que permanecen asociados a la periferia nuclear en mutantes *hdf1Δ* y *hdf2Δ*, lo que sugiere que existe un mecanismo adicional independiente de Ku para dirigir los telómeros a la periferia nuclear [109].

Otra posibilidad es que Sil2126 y Ku establezcan una conexión funcional parcial junto con algunas otras proteínas, similar al modelo propuesto por Marvin *et al.* en *S. cerevisiae* [110] (Figura 16). En este modelo yKu ubicado en los telómeros y el core X forman un loop en la región subtelo mérica importante para la estabilidad del genoma. Dicho loop podría también tener implicaciones importantes en el silenciamiento. Sil2126 podría contener secuencias equivalentes a las necesarias del core-X para que se produzca un plegamiento con el telómero, de modo que en ausencia de cualquiera de los dos, las primeras interacciones funcionales se encontrarían debilitadas. La mayor parte de las interacciones del loop serían mediadas principalmente por Ku con secuencias subtelo méricas, y Sil2126 sería necesario para apoyar este plegamiento al interaccionar con alguna otra proteína de los complejos al final del telómero.



**Figura 16.** Modelo propuesto de la arquitectura nuclear en los telómeros de *S. cerevisiae*. Los telómeros de cada cromosoma son doblados por la asociación directa o indirecta entre el heterodímero Ku y secuencias subtelo méricas como el core X a través de otros factores. Tomada de “The association of yKu with subtelo méric core X sequences prevents recombination involving telomeric silencing” [110].

De forma clásica, el silenciamiento se ha descrito como una forma de represión génica que no es promotor específica y que se puede extender sobre largas regiones cromosómicas. Sin embargo, resultados previos así como los mostrados en este trabajo indican que la presencia y características de los distintos promotores y genes subtelo méricos tienen un efecto sobre la capacidad de propagación de la cromatina silenciosa. Posiblemente el mecanismo de propagación del silenciamiento sea una combinación entre una propagación lineal a corta distancia en las regiones inmediatas a sitios fuertes de nucleación de los complejos, y una propagación a través de interacciones funcionales entre elementos secundarios con menor afinidad.

## 9.6 Elementos compuestos con aislantes, plegamientos estructurales y polaridad de silenciadores: fenómenos no excluyentes para explicar el silenciamiento direccional

En las regiones subtelo méricas de *S. cerevisiae* cohabitan elementos aislantes y silenciadores, que se propone son los responsables de ocasionar un fenotipo

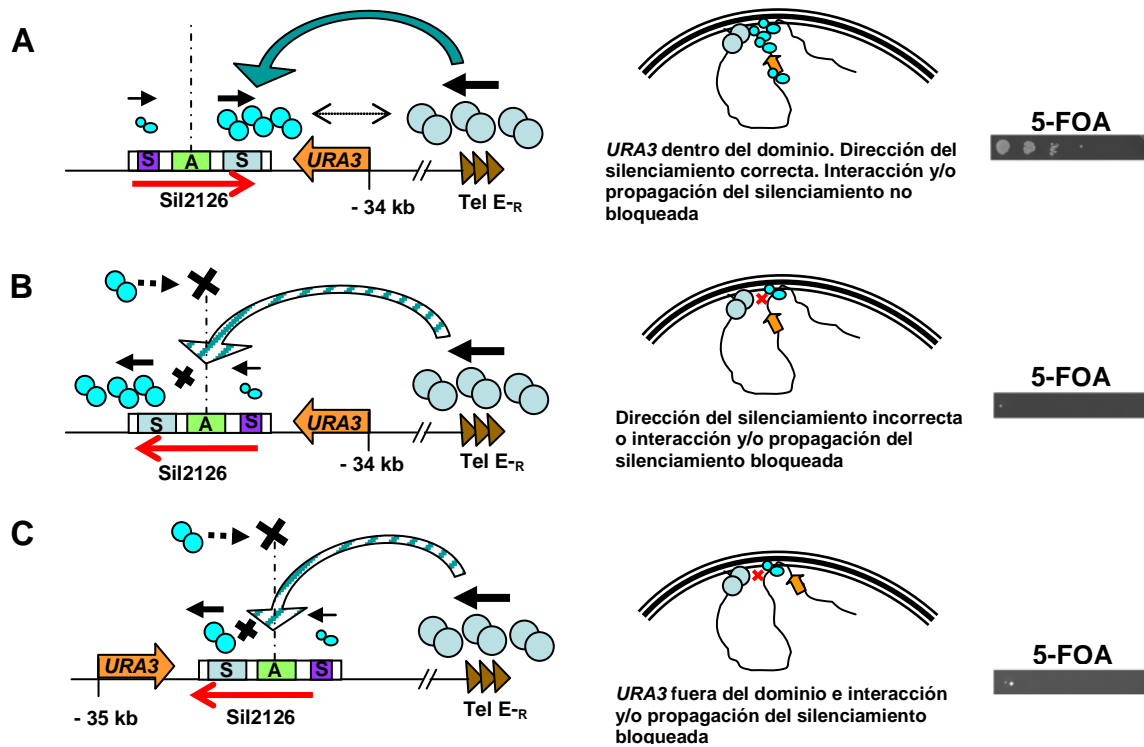
discontinuo en el silenciamiento [89]. Los elementos compuestos que contienen enhancers y elementos aislantes se espera que muestren una función dependiente de la orientación y posición relativa. Cuando el elemento compuesto se coloca en una orientación en la que el aislante está próximo al promotor, la actividad del enhancer se bloquea.

De una forma análoga, un elemento compuesto por silenciadores y elementos aislantes se espera que presente polaridad. El elemento Sil2126 de *C. glabrata* podría ser un elemento modular compuesto por silenciadores y aislantes que ocasionan que su actividad solo se observe cuando la presencia de los elementos funcionales para el silenciamiento se encuentren adyacentes al gen reportero, y cuando el elemento aislante se encuentre en el lado opuesto y no interfiera con la propagación del silenciamiento; ya sea el que se origina en el silenciador o el que se propaga a partir del telómero. Estas condiciones favorables para el silenciamiento, solo se cumplen en una sola orientación de las inserciones estudiadas tanto del elemento Sil2126, como del módulo completo Sil2126-*URA3* (Figura 17). Es importante notar que la simple inversión del elemento Sil2126 ocasiona la pérdida del silenciamiento, lo que podría indicar que el silenciamiento solo se produce de forma direccional. Sin embargo, esta propiedad no excluye la presencia de un elemento de barrera. Por otro lado, la inversión de todo el módulo Sil-*URA3* (que no modifica la orientación de Sil2126 respecto a *URA3* y que modifica mínimamente la distancia de *URA3* respecto al telómero) también elimina el silenciamiento. Con estos datos, la polaridad de Sil2126 no es suficiente para explicar la pérdida del silenciamiento. En la cepa con la inversión del módulo Sil-*URA3*, el reportero *URA3* ya no queda comprendido entre Sil2126 y el telómero. Una explicación de la pérdida del silenciamiento es que en caso de existir plegamientos estructurales entre el telómero y el silenciador que generen dominios del genoma independientes, la inversión del módulo Sil-*URA3* ocasiona que *URA3* no quede comprendido en un dominio al interior de un loop que se formara entre Sil2126 y el telómero, o entre una serie de plegamientos entre el telómero y elementos intermedios entre el telómero y Sil2126 (Figura 17-C).

En *S. cerevisiae* el silenciamiento de un reportero *URA3* es fuerte mientras se encuentre entre los silenciadores E e I en el interior de *HMR*, y se debilita cuando se coloca en el exterior de *HMR* antes del elemento de barrera a pesar de la presencia de proteínas de silenciamiento. Esto podría indicar que para que un gen se encuentre fuertemente silenciado debe encontrarse ubicado entre dos elementos de silenciamiento que delimiten un dominio, y no al exterior de ellos [111].

Los modelos propuestos de por qué Sil2126 solo produce silenciamiento en una orientación en las inserciones estudiadas en E-R se observan en la figura 17.

Para revelar con mayor exactitud cuál es el mecanismo por el que se produce la direccionalidad observada de este elemento, queda por determinar experimentalmente qué efecto tiene invertir el reportero *URA3* en el sistema de integración Sil-*URA3* o posicionarlo al exterior de la región comprendida entre el telómero y Sil2126 en una configuración adecuada. Adicionalmente, un segundo reportero colocado en el otro extremo de Sil2126 permitiría distinguir entre distintos modelos.



**Figura 17.** Modelos propuestos para explicar la polaridad del elemento Sil2126 en el silenciamiento de *URA3* en integraciones subtelo méricas en E-R a más de 30 kb del telómero.

(A) El elemento Sil2126 solo genera silenciamiento si ciertos elementos funcionales se encuentran contiguos al reportero *URA3* y el reportero se encuentra contenido entre ellos y el telómero. Ningún elemento aislante debe presentarse entre el telómero y la o las principales interacciones funcionales con el elemento Sil2126, representadas en conjunto por una flecha azul curva. Los elementos funcionales de Sil2126 pueden tener además una polaridad predominante que favorece el silenciamiento en alguna dirección.

(B) El silenciamiento sobre *URA3* se pierde cuando se invierte la orientación de Sil2126. Esto podría deberse parcialmente a que la polaridad de los principales elementos funcionales dentro de Sil2126 ya no se dirige hacia el reportero *URA3*. Otra posibilidad es que la inversión de Sil2126 puede interponer un aislante entre el telómero y los elementos que median la principal interacción funcional para el silenciamiento. Interacción representada por una flecha curva rayada. El elemento aislante también podría impedir la propagación de los complejos de silenciamiento hacia *URA3* en caso de que no exista una polaridad predominante.

(C) El silenciamiento de *URA3* se pierde cuando se invierte el módulo completo Sil2126-*URA3*. En este caso *URA3* no queda comprendido entre un dominio que se genere entre el telómero y Sil2126. La inversión completa del módulo también puede interponer un aislante entre los principales elementos funcionales de Sil2126 y el telómero. La polaridad predominante de los elementos en Sil2126 no es suficiente para mediar el silenciamiento de *URA3* si no se presentan las otras condiciones.

Las flechas negras indican una posible polaridad en los elementos que generan o extienden el silenciamiento. Las flechas rojas indican la orientación del elemento compuesto Sil2126. En el interior de Sil2126 las letras "S" indican regiones con características silenciadoras y la letra "A" indica un posible elemento aislante. Los círculos azules representan complejos de silenciamiento y su tamaño el nivel de participación para que se presente una interacción funcional básica entre ellos.

## CONCLUSIONES PARTICULARES

1. Existe un protosilenciador (Sil2126) ubicado entre el último gen (*EPA3*) y el telómero del brazo derecho del cromosoma E ( $E-R$ ) en *Candida glabrata*.
2. Secuencias con alta identidad a Sil2126, se encuentran presentes en los cromosomas A e I, al 5' de genes *EPA* en regiones cercanas a los telómeros.
3. Una copia de Sil2126 puede mediar silenciamiento de un reportero *URA3* a 32 kb de su telómero nativo ( $E-R$ ), una región que normalmente no está silenciada.
4. El silenciamiento de *URA3* mediado por Sil2126 a 32 kb no requiere de la copia nativa de Sil2126 presente entre *EPA3* y el telómero.
5. El silenciamiento producido por Sil2126 depende de las proteínas del complejo Sir, de Rap1, y parcialmente de Rif1 y Hst2. Este silenciamiento es independiente de las proteínas Ku70 y Ku80.
6. Sil2126 no es funcional sobre *URA3* fuera del contexto telomérico en los cromosomas F, L y M, a más de 200 kb del telómero. Tampoco es funcional a 50 kb de su telómero nativo.
7. El elemento Sil2126 no es funcional a una distancia similar (34 kb del telómero) en el brazo izquierdo ( $E-L$ ) del mismo cromosoma nativo.
8. La presencia o ausencia de Sil2126 no afecta el nivel de silenciamiento de inserciones *URA3* en la región subtelomérica ( $E-R$ ), ni la expresión de los genes nativos de este locus *EPA1*, *EPA2* y *EPA3*.
9. El efecto de silenciamiento mediado por Sil2126 en las cercanías del telómero  $E-R$ , es dependiente de la orientación relativa de Sil2126 respecto al telómero y la orientación respecto al reportero *URA3*.
10. Existe una redundancia funcional en el silenciamiento subtelomérico en  $E-R$  entre Sil2126 y las proteínas Ku70 y Ku80.
11. La inserción del promotor fuerte *PGK1* de *S. cerevisiae* en el locus de Sil2126 funciona como barrera al impedir la formación y/o propagación del silenciamiento subtelomérico de inserciones *URA3* al 5' y al 3' de dicha inserción, así como de los genes nativos *EPA1*, *EPA2* y *EPA3*.

## CONCLUSIÓN GENERAL

La región telomérica y la región subtelomérica, están habitadas por una gran cantidad de complejos de proteínas que participan en distintas funciones celulares. Muchas de las proteínas de dichos complejos son multifuncionales y desarrollan más de una función, aún asociadas al mismo complejo. Esto hace que al estudiar las proteínas que participan formando complejos en los telómeros se modifiquen en pequeña o gran medida las propiedades funcionales del complejo en distintos aspectos. Procesos como el silenciamiento subtelomérico o TPE que dependen en gran medida de la estructura y extensión de los telómeros pueden verse indirectamente afectados por defectos o mutaciones en un gran número de proteínas que afecten la extensión de los telómeros, su estructura o su conexión con el ciclo celular.

El silenciamiento subtelomérico se presenta con distinta extensión y con distinta fuerza entre los diferentes telómeros de los cromosomas. Estas diferencias son principalmente debidas a diferencias en los elementos en *cis*, y a la densidad y tipo de genes presentes en las regiones subteloméricas. En este trabajo se identificó la secuencia Sil2126 con actividad protosilenciadora presente entre *EPA3* y el telómero E<sub>-R</sub>.

Esta secuencia contribuye en el nivel de silenciamiento observado y en la no dependencia de Ku70 y Ku80 en este telómero. Las propiedades funcionales de este elemento son dependientes de su ubicación, posición y orientación relativa respecto a su telómero nativo. Es probable que Sil2126 posea propiedades funcionales en otro telómero si se encuentra a una distancia adecuada, y en un contexto en el que la combinación, densidad y posición de elementos en *cis* y genes sea favorable para el silenciamiento.

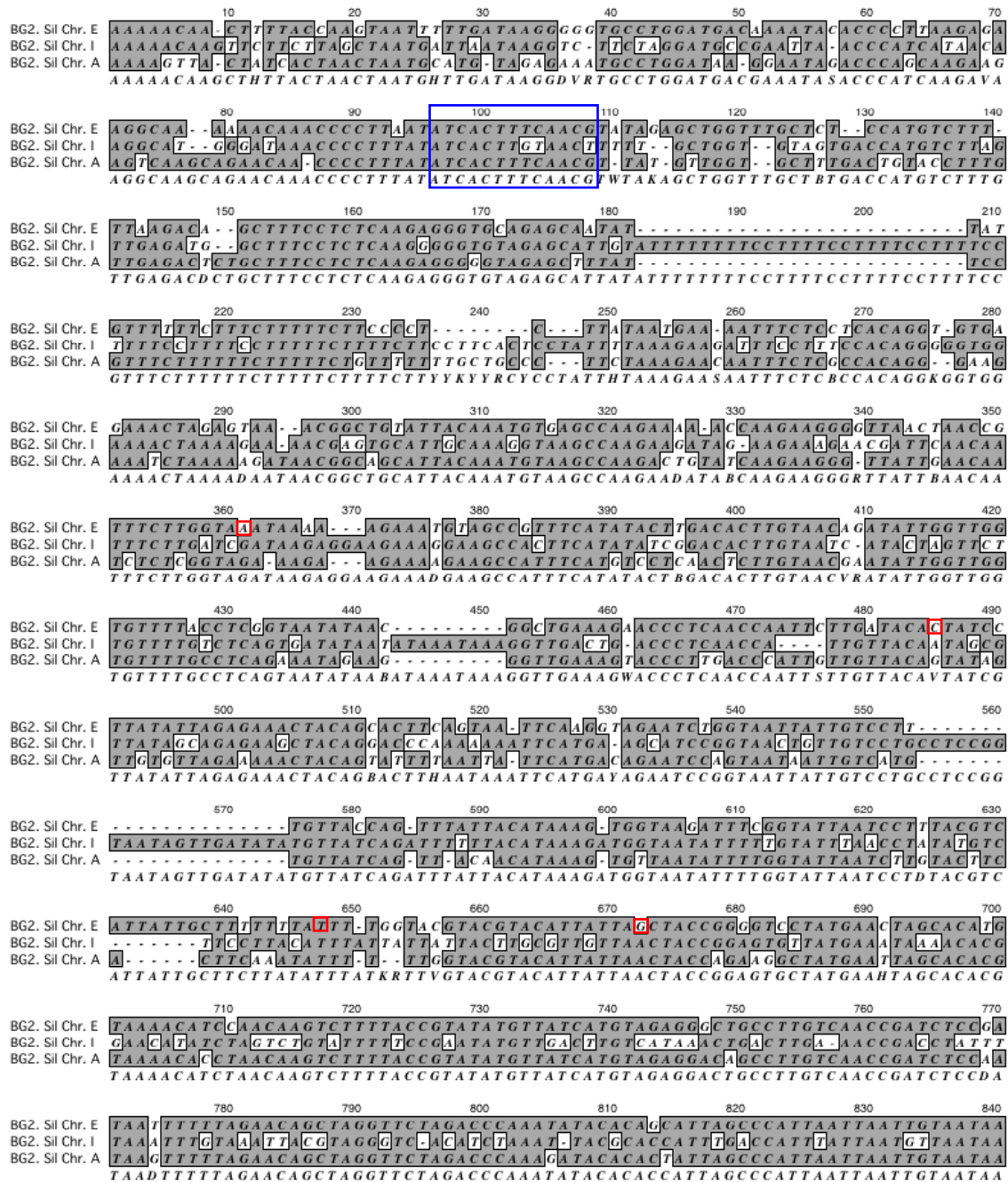
## PERSPECTIVAS

- 1) Estudiar el efecto del protosilenciador Sil2126 en la estructura de la cromatina de la región subtelomérica del brazo derecho del cromosoma E (E<sub>R</sub>). Se buscará evidencia indirecta de plegamientos del telómero hacia regiones internas del cromosoma cuando está presente Sil2126 (formación de loops) mediante las técnicas 3C y “Methyl Transferase Targeting Assay”.
- 2) Estudiar la localización de las proteínas de silenciamiento Sir3, Sir4, Ku70 y Ku80, etiquetadas con distintos epítomos, en la región subtelomérica del cromosoma E mediante ensayos de inmuno precipitación de la cromatina (ChIP).
- 3) Estudiar el efecto de Sil2126 en el silenciamiento del gen reportero *URA3* en regiones subteloméricas de cromosomas distintos al cromosoma E a no más de 32 kb del telómero. Esto permitirá determinar si las diferencias en las secuencias de diversas regiones subteloméricas son responsables de la actividad de Sil2126 como protosilenciador. Determinar si el sistema Sil-*URA3* puede mediar silenciamiento a una distancia aproximada de 32 kb del telómero, en una región subtelomérica cuyo silenciamiento nativo se extienda por lo menos a 20 kb, como en el telómero nativo de Sil2126 (E<sub>R</sub>).
- 4) Estudio funcional de la región de 2125 pb con alta identidad a Sil2126, que se encuentra presente en el brazo izquierdo del cromosoma A (A<sub>L</sub>). Se insertará Sil2125(A)-*URA3* en las siguientes regiones cromosómicas: a) a 32 kb del brazo derecho del cromosoma E (E<sub>R</sub>) y b) a 32 kb de su telómero nativo (A<sub>L</sub>), y se evaluará la expresión del reportero *URA3*.
- 5) Determinar si la presencia de Sil2126 en su cromosoma nativo es responsable de una localización nuclear particular. Estudiar la localización del cromosoma E en presencia y ausencia de la región Sil2126 (distintas cepas de *Candida glabrata*). Se etiquetará una de las proteínas de la periferia nuclear con una proteína fluorescente, adicionalmente se marcará la región cercana a SilE del cromosoma E con varias copias de la proteína verde fluorescente (GFP).
- 6) Estudios de elementos frontera presentes en la región subtelomérica E<sub>L</sub>. Efecto de las regiones promotoras de genes subteloméricos del cromosoma E<sub>L</sub> en la inhibición de la propagación del silenciamiento originado en el telómero E<sub>R</sub>. Para esto se integrará un marcador de selección bajo el control de los promotores en estudio en cepas que contengan el silenciador reportero a 32 kb del telómero E<sub>R</sub>.
- 7) Estudiar la capacidad de distintos promotores para funcionar como barrera en la propagación del silenciamiento subtelomérico al insertarse en la región adyacente e inmediata al telómero E<sub>R</sub>. En dicha región subtelomérica el silenciamiento de un

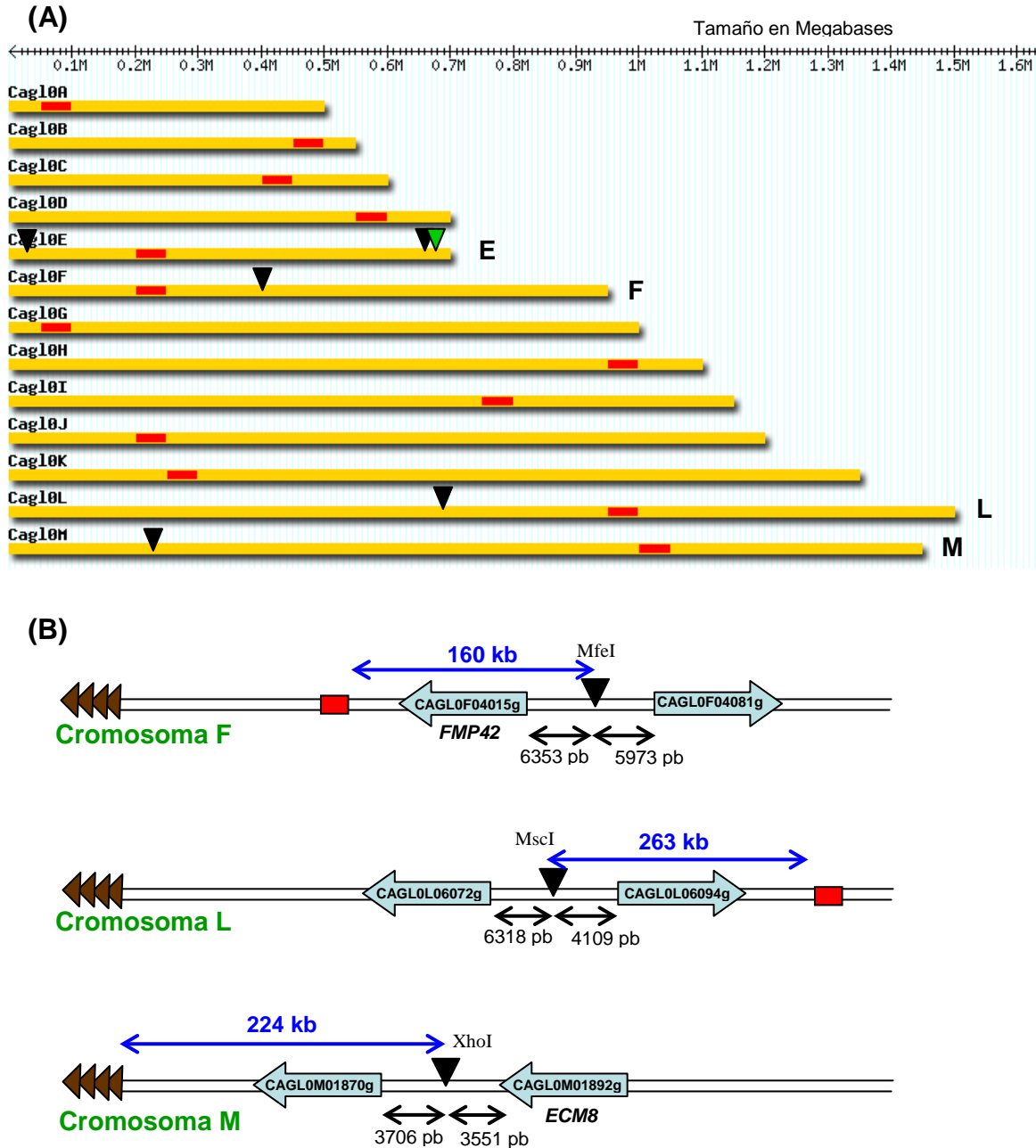
reportero Sil2126-*URA3* se mantiene a 32 kb del telómero y se encuentra abolido cuando se coloca un promotor fuerte (*PGK1*) entre el telómero y el sistema Sil2126-*URA3*. Esta estrategia ofrece la posibilidad de probar fácilmente y con gran sensibilidad, un alto número de promotores de forma cualitativa y parcialmente la fuerza de estos promotores. La información conjunta obtenida de los distintos promotores a estudiar permitirá hacer inferencias generales sobre el tipo funcional de promotores y complejos remodeladores que son capaces de contrarrestar una cromatina silenciosa particular, como la formada por el complejo Sir en el silenciamiento subtelomérico.



## FIGURAS SUPLEMENTARIAS



**Figura S1.** Alineamiento que muestra la identidad de Sil2126 del cromosoma E (nucleótido 120 al 872 de Sil2126) con regiones similares en los cromosomas A e I. Las secuencias mostradas de E, I y A corresponden a la cepa BG2 (este estudio). Los cuadros rojos en la secuencia de Sil Chr.E indican polimorfismos en esas posiciones entre la cepa BG2 y la cepa CBS138. Los porcentajes de identidad en las secuencias mostradas son ( Sil Chr. E vs Sil Chr. I = 62.5 %; Sil Chr. E vs Sil Chr. A = 75.5 %; Sil Chr. I vs Sil Chr. A = 62.3 %).



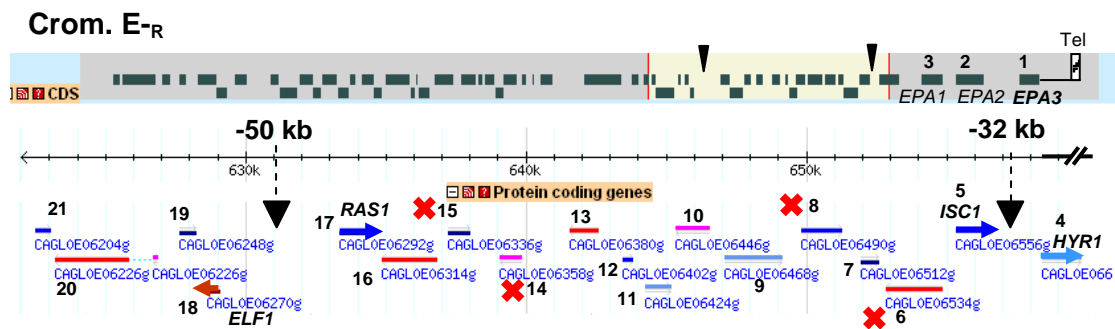
**Figura S2.** Integraciones del sistema Sil2126-URA3 en distintos lugares del genoma de *Candida glabrata*.

**(A)** Mapa de los 13 cromosomas de *C. glabrata* (A a M) con su tamaño aproximado en Megabases. Los rectángulos rojos representan los centrómeros, los triángulos invertidos representan los sitios de integración de los vectores con el sistema Sil2126-URA3 estudiados en este trabajo, y el triángulo verde representa el único locus encontrado en el que el sistema está silenciado.

**(B)** Diagrama que muestra las distancias de las integraciones del sistema Sil2126-URA3 respecto al centrómero o telómero más cercano. Se muestra el sitio de restricción empleado para integrar el sistema en regiones intergénicas de los cromosomas F, L y M estudiadas. La distancia del sitio de integración hacia los ORFs de los genes adyacentes se muestra en flechas negras. La serie de triángulos representa el telómero, el rectángulo rojo el centrómero y los triángulos invertidos la integración de Sil2126-URA3.

### Análisis de los sitios de inserción del sistema Sil2126-*URA3*

La presencia de varios genes y sus respectivos elementos reguladores entre los -32 y -50 kb del telómero E<sub>R</sub>, es posible que represente una mayor concentración de elementos que impide la propagación del silenciamiento hasta los 50 kb del telómero. Es importante notar que la primera inserción subtelomérica del sistema Sil2126-*URA3* a 32 kb del telómero aparece después del cuarto gen subtelomérico *HYR1*, mientras que la inserción a 50 kb se presenta después de diecisiete genes a partir del telómero. Además la primera inserción aparece después de 4 genes no esenciales mientras que en la segunda inserción quedan contenidos 4 genes cuyos correspondientes ortólogos son esenciales en *S. cerevisiae* (*NOP9*, *RPT1*, *SRP102* y *GPM1*) Dicha región que contiene genes esenciales es muy probable que contenga elementos reguladores que impidan que la extensión del silenciamiento subtelomérico abarque regiones tan extensas (Figura S3).

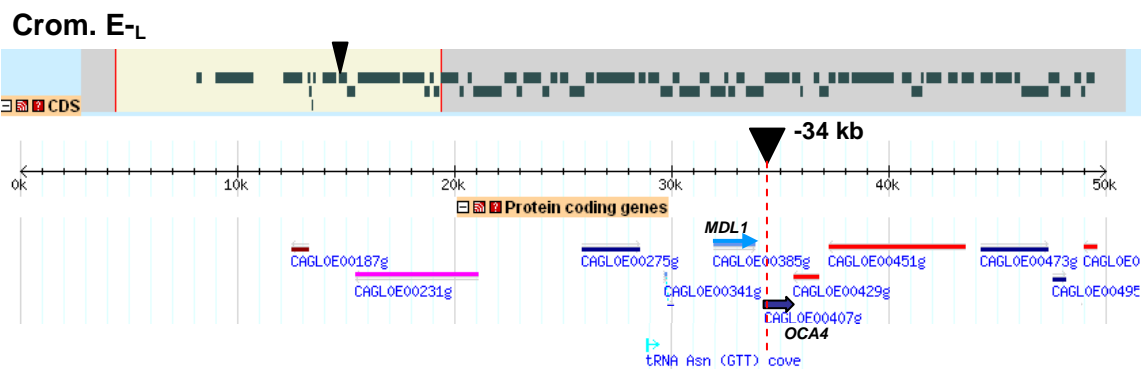


**Figura S3.** Esquema de las integraciones de Sil2126-*URA3* en la región subtelomérica del brazo derecho del cromosoma E (E<sub>R</sub>). El final del cromosoma se encuentra en la posición 687,738. En la parte superior se muestran rectángulos que representan los diferentes ORFs presentes en esta región. En la parte inferior se muestra una amplificación de la región delimitada por barras rojas en la parte superior. La numeración 1 al 18 representa el orden de aparición de los genes a partir del telómero. Las cruces rojas indican genes cuyos respectivos ortólogos en *S. cerevisiae* son esenciales. Los triángulos invertidos representan los sitios de inserción del sistema reportero Sil-*URA3* estudiados en este trabajo. Tomada y modificada de <http://www.genolevures.org/cgi-bin/gbrowse/genomes/>. Se integró Sil2126-*URA3* entre los genes *ISC1* y *HYR1* (-32 kb) y *ELF1* y *RAS1* (-50 kb).

Por distintas inserciones del reportero *URA3* se conoce que la región subtelo mérica  $E_{-L}$ , en la cual se encuentra el locus *MTL2* no se encuentra silenciada [113]. En el presente trabajo, se integró el sistema reportero Sil2126-*URA3* corriente abajo de *MTL2* (~30 kb del telómero) por la posibilidad de que este contuviera elementos equivalentes a los silenciadores E e I de *HML*. La integración de Sil2126-*URA3* se encuentra a 34.5 kb del telómero dentro del marco de lectura de *OCA4*, un gen no es esencial en *S. cerevisiae*. Entre la inserción Sil2126-*URA3* y el telómero  $E_{-L}$  se encuentran 6 genes. Uno de ellos es un tRNA codificante para Asn (GTT) (Figura S4). La presencia de dicho gen podría afectar la propagación del silenciamiento subtelo mérico a una distancia equivalente a la que se presenta en  $E_{-R}$  en presencia de Sil2126.

En el caso de la propagación del silenciamiento en el locus *HMR* de *S. cerevisiae* se ha reportado que la región frontera ó límite de la propagación en el extremo proximal al telómero coincide con un gen de tRNA y depende de que su promotor sea funcional [114]. Es difícil considerar hasta que punto puede propagarse el silenciamiento subtelo mérico de un telómero dado que las regiones subtelo méricas y los genes presentes en ellas no son los mismos en cada telómero, ni se presentan en igual densidad, ni a la misma distancia. Adicionalmente, la presencia de genes esenciales con sus respectivos promotores y elementos de regulación particulares implica la participación de complejos que compiten con los efectos producidos por el silenciamiento subtelo mérico de cada telómero.

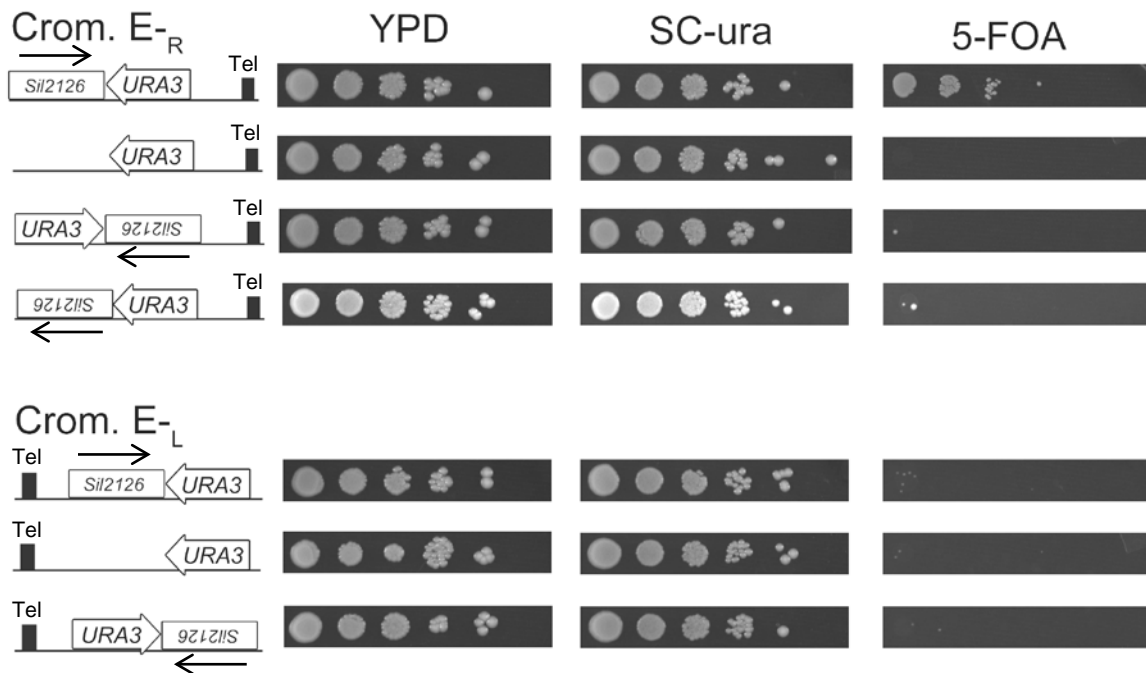
Posterior a la realización de este trabajo, se reportó en *S. cerevisiae* que secuencias en el promotor de *OCA4* correlacionan mas con una frontera para la propagación de Sir3 en la región de *HMR*, que la presencia del tRNA presente en las cercanías de dicho locus [95]. Estos datos junto con la posible ausencia de silenciadores en el locus *MTL2* podrían explicar el porque el silenciamiento no pueda extenderse hasta 34 kb en el telómero  $E_{-L}$ .



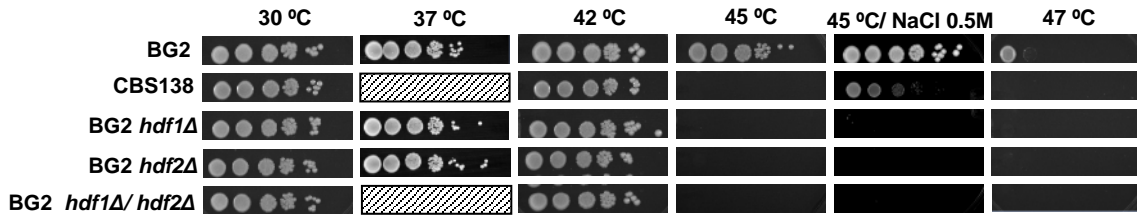
**Figura S4.** Esquema de la región subtelo mérica del brazo izquierdo del cromosoma E ( $E_{-L}$ ). El extremo del cromosoma se representa en la posición 0. En la parte superior se muestran rectángulos que representan los diferentes ORFs presentes en esta región. En la parte inferior se muestra una ampliación de la región delimitada por barras rojas en la parte superior. El triángulo invertido representa el sitio de inserción del sistema reportero Sil2126-*URA3* estudiado en este trabajo. Tomada y modificada de <http://www.genolevures.org/cgibin/gbrowse/genomes/>.

### Sil2126 es un elemento que depende de la localización subtelomérica particular, orientación relativa respecto al gen reportero, y orientación respecto al telómero

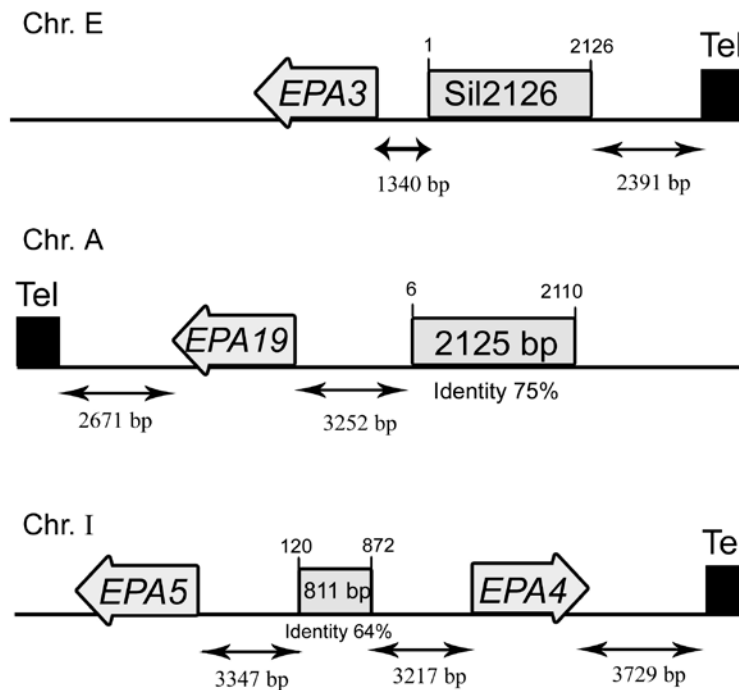
El silenciamiento de *URA3* mediado por Sil2126 solo se presenta cuando el reportero se encuentra entre el telómero y Sil2126, en una región telomérica fuertemente silenciada (Figura S5, línea 1). La orientación de Sil2126 apuntando hacia el 3' de *URA3* también es determinante para que se produzca el silenciamiento, puesto que la simple inversión de Sil2126 elimina el silenciamiento (Figura S5, comparar líneas 1 y 4).



**Figura S5.** Sil2126 es un elemento que depende de la localización subtelomérica particular, orientación relativa respecto al gen reportero, y orientación respecto al telómero. En la parte superior se muestran las integraciones del sistema Sil2126-*URA3* a 32 kb del telómero del brazo derecho del cromosoma E ( $E-R$ ), y en la parte inferior se muestran las integraciones a 34 kb del telómero del brazo izquierdo del cromosoma E ( $E-L$ ).



**Figura S6.** Ensayos de termosensibilidad en cepas de *C. glabrata*. Las cepas se crecieron en medio líquido YPD a 30 °C y posteriormente diluciones seriadas fueron incubadas en medio YPD sólido a la temperatura indicada. Las cepas *hdf1*Δ y *hdf2*Δ son termosensibles a 45 °C, una temperatura a la cual su parental BG2 no presenta termosensibilidad. La cepa BG2 presenta termosensibilidad a 47 °C a diferencia de la cepa CBS138 que es termosensible a los 45 °C. En la cepa CBS138 esta termosensibilidad puede ser rescatada parcialmente por la adición de NaCl 0.5M al medio.


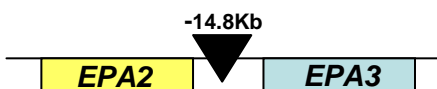
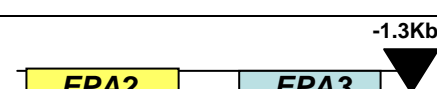
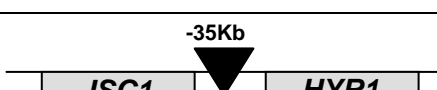
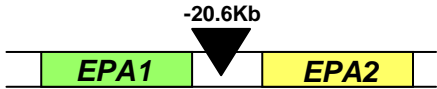
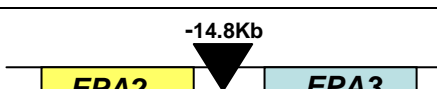
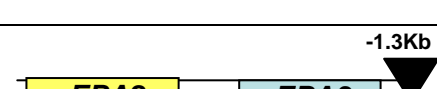



**Figura S7.** El genoma de *C. glabrata* contiene una copia adicional de Sil2126 cercana al telómero A<sub>L</sub>. Una secuencia de casi el mismo tamaño y con alta similitud con Sil2126 (75% de identidad) se encuentra cercana al telómero A<sub>L</sub>. Un fragmento de 811 pb con 65% de identidad con Sil2126 se encuentra presente entre *EPA5* y *EPA4*. Los números arriba de las regiones con alta similitud, indican la posición de las bases donde se ubica la similitud respecto a la secuencia de Sil2126.

**Tabla 2** Identidad y similitud entre las principales proteínas de silenciamiento subtelomérico estudiadas en este trabajo en *C. glabrata*, *C. albicans*, y *S. cerevisiae*.

Proteína	Comparación	% Identidad	% Similitud
Rap1p	( <i>C. glabrata</i> vs <i>C. albicans</i> )	14.7	25.8
Rap1p	( <i>C. glabrata</i> vs <i>S. cerevisiae</i> )	47.3	61.2
Rap1p	( <i>S. cerevisiae</i> vs <i>C. albicans</i> )	13.7	22.1
Rif1p	( <i>C. glabrata</i> vs <i>C. albicans</i> )	14.9	32.6
Rif1p	( <i>C. glabrata</i> vs <i>S. cerevisiae</i> )	22.2	40.1
Rif1p	( <i>S. cerevisiae</i> vs <i>C. albicans</i> )	12.0	29.1
Ku70p	( <i>C. glabrata</i> vs <i>S. cerevisiae</i> )	45.7	64.3
Ku80p	( <i>C. glabrata</i> vs <i>C. albicans</i> )	17.8	34.1
Ku80p	( <i>C. glabrata</i> vs <i>S. cerevisiae</i> )	39.2	58.1
Ku80p	( <i>S. cerevisiae</i> vs <i>C. albicans</i> )	16.3	34.8
Sir2p	( <i>C. glabrata</i> vs <i>C. albicans</i> )	30.3	48.3
Sir2p	( <i>C. glabrata</i> vs <i>S. cerevisiae</i> )	52.5	66.8
Sir2p	( <i>S. cerevisiae</i> vs <i>C. albicans</i> )	28.8	44.8
Sir3p	( <i>C. glabrata</i> vs <i>S. cerevisiae</i> )	19.2	38.1
Sir4p	( <i>C. glabrata</i> vs <i>S. cerevisiae</i> )	12.5	29.8
Ku70vsKu80	( <i>C. glabrata</i> )	11.9	30.1
Ku70vsKu80	( <i>S. cerevisiae</i> )	14.7	31.5
Abf1vsAbf1	* ( <i>C. glabrata</i> vs <i>S. cerevisiae</i> )	31.0	40.2

**Tabla 3.** Resumen del orden cronológico de construcción de las cepas dobles mutantes *hdf1Δ/silΔ*, *hdf2Δ/silΔ*.

Ubicación de <i>URA3</i> respecto al telómero E <sup>R</sup>	Distintas inserciones <i>URA3</i> en la región subtelomérica E <sup>R</sup>	Mutantes <i>hdf1Δ</i> <i>hdf2Δ</i> aún con cassette <i>hph</i>	Mutantes <i>hdf1Δ</i> <i>hdf2Δ</i> sin <i>hph</i> ni plásmido-flíapso pLS9	Mutantes dobles <i>hdf1Δ/silΔ</i> <i>hdf2Δ/silΔ</i> con <i>hph</i>	Mutantes dobles <i>hdf1Δ/silΔ</i> <i>hdf2Δ/silΔ</i> sin <i>hph</i> ni pLS9
		<b><i>hdf1Δ</i></b>			
	CGM147	CGM660 CGM661	CGM885 CGM886	CGM993 CGM994	CGM1045 CGM1046
	CGM148	CGM662 CGM663	CGM887 CGM888	CGM995 CGM996	CGM1047 CGM1048
	CGM149	CGM664 CGM665	CGM889	CGM997 CGM998	CGM1049 CGM1050
	CGM399	CGM666 CGM667	CGM890 CGM891	CGM999 CGM1000	CGM1043 CGM1044
		<b><i>hdf2Δ</i></b>			
	CGM147	CGM677 CGM678	CGM892 CGM893	CGM1001 CGM1002	CGM1053 CGM1054
	CGM148	CGM679 CGM680	CGM894	CGM1003 CGM1004	CGM1055 CGM1056
	CGM149	CGM681 CGM682	CGM895 CGM896	CGM1005 CGM1006	CGM1057 CGM1058
	CGM399	CGM683 CGM684	CGM897 CGM898	CGM1007 CGM1008	CGM1051 CGM1052



## RECURSOS EMPLEADOS DE INTERNET

Sherman DJ, Martin T, Nikolski M, Cayla C, Souciet JL, Durrens P; Génolevures Consortium (2009). **Génolevures: protein families and synteny among complete hemiascomycetous yeast proteomes and genomes.** *Nucleic Acids Res.* 37 (Database issue), pp. D550-4.  
<http://www.genolevures.org/>

**The Yeast Gene Order Browser: combining curated homology and syntenic context reveals gene fate in polyploid species.** Byrne KP and Wolfe KH; *Genome Research.* 2005 Oct;15(10):1456-61  
<http://wolfe.gen.tcd.ie/ygob/>

### Fungal Orthogroups Repository.

**“Orthogroup assignments for all predicted protein-coding genes across 23 Ascomycete fungal genomes”**

Wapinski I, et al: **Automatic genome-wide reconstruction of phylogenetic gene trees.** *Bioinformatics* 2007, 23: i549-i558.  
<http://www.broadinstitute.org/regev/orthogroups/>

Cherry JM, Ball C, Weng S, Juvik G, Schmidt R, Adler C, Dunn B, Dwight S, Riles L, Mortimer RK, Botstein D (1997) **Genetic and physical maps of *Saccharomyces cerevisiae*.** *Nature* 387(6632 Suppl):67-73  
**Saccharomyces Genome Database, SGD**  
<http://www.yeastgenome.org/>

Arnaud MB, Costanzo MC, Skrzypek MS, Binkley G, Lane C, Miyasato SR, Sherlock G. **The *Candida* Genome Database (CGD), a community resource for *Candida albicans* gene and protein information** ;*Nucl.Acids Res.* 2005 Jan 1;33(Database issue):D358-63.  
<http://www.candidagenome.org/>

● van Helden, J. (2003). **Regulatory sequence analysis tools.** *Nucleic Acids Res.* 2003 Jul 1;31(13):3593-6.

● Thomas-Chollier, M., Sand, O., Turatsinze, J. V., Janky, R., Defrance, M., Vervisch, E., Brohee, S. & van Helden, J. (2008). **RSAT: regulatory sequence analysis tools.** *Nucleic Acids Res.* 2008, 36 (suppl 2): W119-W127.  
<http://rsat.ulb.ac.be/rsat/>

● Timothy L. Bailey and Charles Elkan, **"Fitting a mixture model by expectation maximization to discover motifs in biopolymers"**, *Proceedings of the Second International Conference on Intelligent Systems for Molecular Biology*, pp. 28-36, AAAI Press, Menlo Park, California, 1994

● Timothy L. Bailey, Nadya Williams, Chris Mischak and Wilfred W. Li., **MEME: discovering and analyzing DNA and protein sequence motifs.** *Nucleic Acids Res.*(2006) Vol.34 Web Server issue W369-W373 (<http://meme.nbcr.net>)

**Telomere Data Sets in *Saccharomyces cerevisiae***

<http://www.nottingham.ac.uk/biology/people/louis/telomere-data-sets.aspx>

**Telomerase Database**

<http://telomerase.asu.edu/sequencestelomere.html>

**National Center for Biotechnology Information, NCBI**

- Pruitt KD, Tatusova T, Klimke W, Maglott DR. Nucleic Acids Res 2009 Jan;37(Database issue):D32-6. **NCBI Reference Sequences: current status, policy, and new initiatives.**

- Stephen F. Altschul, Thomas L. Madden, Alejandro A. Schäffer, Jinghui Zhang, Zheng Zhang, Webb Miller, and David J. Lipman (1997), "**Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs**", Nucleic Acids Res. 25:3389-3402.

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/index.html>

**Format sequence conversion tools**

<http://iubio.bio.indiana.edu/cgi-bin/readseq.cgi>

<http://www-bimas.cit.nih.gov/molbio/readseq/>

Mukund V. Katti, Meena K. Sakharkar, Prabhakar K. Ranjekar and Vidya S. Gupta., **TRES: comparative promoter sequence analysis**. Bioinformatics (2000) 16 (8): 739-740.

<http://bioportal.bic.nus.edu.sg/tres/>

Miguel C. Teixeira, Pedro Monteiro, Pooja Jain, Sandra Tenreiro, Alexandra R. Fernandes, Nuno P. Mira, Marta Alenquer, Ana T. Freitas, Arlindo L. Oliveira, and Isabel Sá-Correia, **The YEASTRACT database: a tool for the analysis of transcription regulatory associations in *Saccharomyces cerevisiae***, Nucl. Acids Res., 2006, 34: D446-D451, Oxford University Press

<http://www.yeasttract.com/index.php>

**Tandem Repeats Finder Tools**

G. Benson, "**Tandem repeats finder: a program to analyze DNA sequences**"; Nucl. Acids Res., 1999, 27, (2), pp. 573-580.

<http://tandem.bu.edu/trf/trf.basic.submit.html>

<http://tandem.sci.brooklyn.cuny.edu/Program.do>

**OTRO SOFTWARE EMPLEADO EN EL ANÁLISIS DE SECUENCIAS**

- MacVector, Inc. Software for Scientists, versión 11.0.1 Copyright© 2009
- ApE-A plasmid Editor, versión 1.17 Copyright© 2003-2008 by M. Wayne Davis
- DNA Strider 1.4f3
- DNASTar, Inc. versión 3.97 Copyright© 1989-1997

## REFERENCIAS

1. Pfaller MA, Diekema DJ: **Epidemiology of invasive candidiasis: a persistent public health problem.** *Clin Microbiol Rev* 2007, **20**(1):133-163.
2. Hitchcock CA, Pye GW, Troke PF, Johnson EM, Warnock DW: **Fluconazole resistance in *Candida glabrata*.** *Antimicrob Agents Chemother* 1993, **37**(9):1962-1965.
3. Fidel PL, Jr., Vazquez JA, Sobel JD: ***Candida glabrata*: review of epidemiology, pathogenesis, and clinical disease with comparison to *C. albicans*.** *Clin Microbiol Rev* 1999, **12**(1):80-96.
4. Csank C, Haynes K: ***Candida glabrata* displays pseudohyphal growth.** *FEMS Microbiol Lett* 2000, **189**(1):115-120.
5. Dujon B, Sherman D, Fischer G, Durrens P, Casaregola S, Lafontaine I, De Montigny J, Marck C, Neuveglise C, Talla E *et al*: **Genome evolution in yeasts.** *Nature* 2004, **430**(6995):35-44.
6. Pruitt KD, Tatusova T, Klimke W, Maglott DR: **NCBI Reference Sequences: current status, policy and new initiatives.** *Nucleic Acids Res* 2009, **37**(Database issue):D32-36.
7. Cochrane G, Akhtar R, Bonfield J, Bower L, Demiralp F, Faruque N, Gibson R, Hoad G, Hubbard T, Hunter C *et al*: **Petabyte-scale innovations at the European Nucleotide Archive.** *Nucleic Acids Res* 2009, **37**(Database issue):D19-25.
8. Barns SM, Lane DJ, Sogin ML, Bibeau C, Weisburg WG: **Evolutionary relationships among pathogenic *Candida* species and relatives.** *J Bacteriol* 1991, **173**(7):2250-2255.
9. Butler G, Rasmussen MD, Lin MF, Santos MA, Sakthikumar S, Munro CA, Rheinbay E, Grabherr M, Forche A, Reedy JL *et al*: **Evolution of pathogenicity and sexual reproduction in eight *Candida* genomes.** *Nature* 2009, **459**(7247):657-662.
10. Zhao X, Oh SH, Cheng G, Green CB, Nuessen JA, Yeater K, Leng RP, Brown AJ, Hoyer LL: **ALS3 and ALS8 represent a single locus that encodes a *Candida albicans* adhesin; functional comparisons between Als3p and Als1p.** *Microbiology* 2004, **150**(Pt 7):2415-2428.
11. Hoyer LL: **The ALS gene family of *Candida albicans*.** *Trends Microbiol* 2001, **9**(4):176-180.
12. Kaur R, Ma B, Cormack BP: **A family of glycosylphosphatidylinositol-linked aspartyl proteases is required for virulence of *Candida glabrata*.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007, **104**(18):7628-7633.
13. Cormack BP, Ghorri N, Falkow S: **An adhesin of the yeast pathogen *Candida glabrata* mediating adherence to human epithelial cells.** *Science* 1999, **285**(5427):578-582.
14. Castano I, Pan SJ, Zupancic M, Hennequin C, Dujon B, Cormack BP: **Telomere length control and transcriptional regulation of subtelomeric adhesins in *Candida glabrata*.** *Mol Microbiol* 2005, **55**(4):1246-1258.
15. Boothroyd CE, Dreesen O, Leonova T, Ly KI, Figueiredo LM, Cross GA, Papavasiliou FN: **A yeast-endonuclease-generated DNA break induces antigenic switching in *Trypanosoma brucei*.** *Nature* 2009, **459**(7244):278-281.

16. Su XZ, Heatwole VM, Wertheimer SP, Guinet F, Herrfeldt JA, Peterson DS, Ravetch JA, Wellems TE: **The large diverse gene family var encodes proteins involved in cytoadherence and antigenic variation of Plasmodium falciparum-infected erythrocytes.** *Cell* 1995, **82**(1):89-100.
17. Allshire RC, Nimmo ER, Ekwall K, Javerzat JP, Cranston G: **Mutations derepressing silent centromeric domains in fission yeast disrupt chromosome segregation.** *Genes Dev* 1995, **9**(2):218-233.
18. Allis A.D. JT, Reinberg D., Caparros, M.L.: **EPIGENETICS.** *Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, NY* 2006.
19. Gottschling DE: **Telomere-proximal DNA in Saccharomyces cerevisiae is refractory to methyltransferase activity in vivo.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 1992, **89**(9):4062-4065.
20. Lewis EB: **The phenomenon of position effect.** *Adv Genet* 1950, **3**:73-115.
21. Rosas-Hernandez LL, Juárez-Reyes A, Arroyo-Helguera OE, De Las Penas A, Pan SJ, Cormack BP, Castano I: **yKu70/yKu80 and Rif1 regulate silencing differentially at telomeres in Candida glabrata.** *Eukaryot Cell* 2008, **7**(12):2168-2178.
22. Ishii K, Laemmli UK: **Structural and dynamic functions establish chromatin domains.** *Mol Cell* 2003, **11**(1):237-248.
23. Smith CM, Haimberger ZW, Johnson CO, Wolf AJ, Gafken PR, Zhang Z, Parthun MR, Gottschling DE: **Heritable chromatin structure: mapping "memory" in histones H3 and H4.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002, **99 Suppl 4**:16454-16461.
24. Clarke DJ, O'Neill LP, Turner BM: **Selective use of H4 acetylation sites in the yeast Saccharomyces cerevisiae.** *Biochem J* 1993, **294 ( Pt 2)**:557-561.
25. Suka N, Suka Y, Carmen AA, Wu J, Grunstein M: **Highly specific antibodies determine histone acetylation site usage in yeast heterochromatin and euchromatin.** *Mol Cell* 2001, **8**(2):473-479.
26. Titia de Lange VL, Elizabeth Blackburn: **Telomeres.** *Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, NY* 2006.
27. Nugent CI, Bosco G, Ross LO, Evans SK, Salinger AP, Moore JK, Haber JE, Lundblad V: **Telomere maintenance is dependent on activities required for end repair of double-strand breaks.** *Curr Biol* 1998, **8**(11):657-660.
28. Boulton SJ, Jackson SP: **Components of the Ku-dependent non-homologous end-joining pathway are involved in telomeric length maintenance and telomeric silencing.** *Embo J* 1998, **17**(6):1819-1828.
29. Porter SE, Greenwell PW, Ritchie KB, Petes TD: **The DNA-binding protein Hdf1p (a putative Ku homologue) is required for maintaining normal telomere length in Saccharomyces cerevisiae.** *Nucleic Acids Res* 1996, **24**(4):582-585.
30. Hardy CF, Sussel L, Shore D: **A RAP1-interacting protein involved in transcriptional silencing and telomere length regulation.** *Genes Dev* 1992, **6**(5):801-814.
31. Edmonds D, Breikreutz BJ, Harrington L: **A genome-wide telomere screen in yeast: the long and short of it all.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004, **101**(26):9515-9516.
32. Pryde FE, Louis EJ: **Limitations of silencing at native yeast telomeres.** *Embo J* 1999, **18**(9):2538-2550.

33. Palmer JM, Mallareddy S, Perry DW, Sanchez JF, Theisen JM, Szewczyk E, Oakley BR, Wang CC, Keller NP, Mirabito PM: **Telomere position effect is regulated by heterochromatin-associated proteins and NkuA in *Aspergillus nidulans*.** *Microbiology* 2010, **156**(Pt 12):3522-3531.
34. Askree SH, Yehuda T, Smolikov S, Gurevich R, Hawk J, Coker C, Krauskopf A, Kupiec M, McEachern MJ: **A genome-wide screen for *Saccharomyces cerevisiae* deletion mutants that affect telomere length.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004, **101**(23):8658-8663.
35. Bell SP, Mitchell J, Leber J, Kobayashi R, Stillman B: **The multidomain structure of Orc1p reveals similarity to regulators of DNA replication and transcriptional silencing.** *Cell* 1995, **83**(4):563-568.
36. Stone EM, Pillus L: **Activation of an MAP kinase cascade leads to Sir3p hyperphosphorylation and strengthens transcriptional silencing.** *J Cell Biol* 1996, **135**(3):571-583.
37. Roy N RK: **Two paralogs involved in transcriptional silencing that antagonistically control yeast life span.** *Curr Biol* 2000, **10**(2):111-114.
38. Zhang Z, Buchman AR: **Identification of a member of a DNA-dependent ATPase family that causes interference with silencing.** *Mol Cell Biol* 1997, **17**(9):5461-5472.
39. Xie W, Gai X, Zhu Y, Zappulla DC, Sternglanz R, Voytas DF: **Targeting of the yeast Ty5 retrotransposon to silent chromatin is mediated by interactions between integrase and Sir4p.** *Mol Cell Biol* 2001, **21**(19):6606-6614.
40. Hediger F, Neumann FR, Van Houwe G, Dubrana K, Gasser SM: **Live imaging of telomeres: yKu and Sir proteins define redundant telomere-anchoring pathways in yeast.** *Curr Biol* 2002, **12**(24):2076-2089.
41. Wellinger RJ, Wolf AJ, Zakian VA: **Origin activation and formation of single-strand TG1-3 tails occur sequentially in late S phase on a yeast linear plasmid.** *Mol Cell Biol* 1993, **13**(7):4057-4065.
42. Lewis LK, Karthikeyan G, Westmoreland JW, Resnick MA: **Differential suppression of DNA repair deficiencies of Yeast rad50, mre11 and xrs2 mutants by EXO1 and TLC1 (the RNA component of telomerase).** *Genetics* 2002, **160**(1):49-62.
43. Teo SH, Jackson SP: **Telomerase subunit overexpression suppresses telomere-specific checkpoint activation in the yeast yku80 mutant.** *EMBO Rep* 2001, **2**(3):197-202.
44. Boulton SJ, and Jackson, S. P. : **Identification of a *Saccharomyces cerevisiae* Ku80 homologue: roles in DNA double strand break rejoining and in telomeric maintenance.** *Nucleic Acids Res* 1996, **24**(23):4639-4648.
45. Fisher TS, Taggart AK, Zakian VA: **Cell cycle-dependent regulation of yeast telomerase by Ku.** *Nat Struct Mol Biol* 2004, **11**(12):1198-1205.
46. Grandin N, Damon C, Charbonneau M: **Cdc13 cooperates with the yeast Ku proteins and Stn1 to regulate telomerase recruitment.** *Mol Cell Biol* 2000, **20**(22):8397-8408.
47. Meier B, Driller L, Jaklin S, Feldmann HM: **New function of CDC13 in positive telomere length regulation.** *Mol Cell Biol* 2001, **21**(13):4233-4245.

48. Peterson SE, Stellwagen AE, Diede SJ, Singer MS, Haimberger ZW, Johnson CO, Tzoneva M, Gottschling DE: **The function of a stem-loop in telomerase RNA is linked to the DNA repair protein Ku.** *Nat Genet* 2001, **27**(1):64-67.
49. Stellwagen AE, Haimberger ZW, Veatch JR, Gottschling DE: **Ku interacts with telomerase RNA to promote telomere addition at native and broken chromosome ends.** *Genes Dev* 2003, **17**(19):2384-2395.
50. Wotton D, Shore D: **A novel Rap1p-interacting factor, Rif2p, cooperates with Rif1p to regulate telomere length in *Saccharomyces cerevisiae*.** *Genes Dev* 1997, **11**(6):748-760.
51. Levy DL, Blackburn EH: **Counting of Rif1p and Rif2p on *Saccharomyces cerevisiae* telomeres regulates telomere length.** *Mol Cell Biol* 2004, **24**(24):10857-10867.
52. Kanoh J, Ishikawa F: **spRap1 and spRif1, recruited to telomeres by Taz1, are essential for telomere function in fission yeast.** *Curr Biol* 2001, **11**(20):1624-1630.
53. Boscheron C, Maillet L, Marcand S, Tsai-Pflugfelder M, Gasser SM, Gilson E: **Cooperation at a distance between silencers and proto-silencers at the yeast HML locus.** *Embo J* 1996, **15**(9):2184-2195.
54. Brand AH, Micklem G, Nasmyth K: **A yeast silencer contains sequences that can promote autonomous plasmid replication and transcriptional activation.** *Cell* 1987, **51**(5):709-719.
55. Foss M, McNally FJ, Laurenson P, Rine J: **Origin recognition complex (ORC) in transcriptional silencing and DNA replication in *S. cerevisiae*.** *Science* 1993, **262**(5141):1838-1844.
56. Loo S, Fox CA, Rine J, Kobayashi R, Stillman B, Bell S: **The origin recognition complex in silencing, cell cycle progression, and DNA replication.** *Mol Biol Cell* 1995, **6**(6):741-756.
57. Sussel L, Shore D: **Separation of transcriptional activation and silencing functions of the RAP1-encoded repressor/activator protein 1: isolation of viable mutants affecting both silencing and telomere length.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 1991, **88**(17):7749-7753.
58. Loo S, Laurenson P, Foss M, Dillin A, Rine J: **Roles of ABF1, NPL3, and YCL54 in silencing in *Saccharomyces cerevisiae*.** *Genetics* 1995, **141**(3):889-902.
59. Rusche LN, Kirchmaier AL, Rine J: **Ordered nucleation and spreading of silenced chromatin in *Saccharomyces cerevisiae*.** *Mol Biol Cell* 2002, **13**(7):2207-2222.
60. Brand AH, Breeden L, Abraham J, Sternglanz R, Nasmyth K: **Characterization of a "silencer" in yeast: a DNA sequence with properties opposite to those of a transcriptional enhancer.** *Cell* 1985, **41**(1):41-48.
61. Mahoney DJ, Broach JR: **The HML mating-type cassette of *Saccharomyces cerevisiae* is regulated by two separate but functionally equivalent silencers.** *Mol Cell Biol* 1989, **9**(11):4621-4630.
62. Loo S, Rine J: **Silencers and domains of generalized repression.** *Science* 1994, **264**(5166):1768-1771.
63. Rusche LN, Kirchmaier AL, Rine J: **The establishment, inheritance, and function of silenced chromatin in *Saccharomyces cerevisiae*.** *Annu Rev Biochem* 2003, **72**:481-516.

64. Sekinger EA, Gross DS: **Silenced chromatin is permissive to activator binding and PIC recruitment.** *Cell* 2001, **105**(3):403-414.
65. Terleth C, van Sluis CA, van de Putte P: **Differential repair of UV damage in *Saccharomyces cerevisiae*.** *Nucleic Acids Res* 1989, **17**(12):4433-4439.
66. Strathern JN, Klar AJ, Hicks JB, Abraham JA, Ivy JM, Nasmyth KA, McGill C: **Homothallic switching of yeast mating type cassettes is initiated by a double-stranded cut in the MAT locus.** *Cell* 1982, **31**(1):183-192.
67. Weiss K, Simpson RT: **High-resolution structural analysis of chromatin at specific loci: *Saccharomyces cerevisiae* silent mating type locus HML $\alpha$ .** *Mol Cell Biol* 1998, **18**(9):5392-5403.
68. Chen L, Widom J: **Mechanism of transcriptional silencing in yeast.** *Cell* 2005, **120**(1):37-48.
69. Bi X, Braunstein M, Shei GJ, Broach JR: **The yeast HML I silencer defines a heterochromatin domain boundary by directional establishment of silencing.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999, **96**(21):11934-11939.
70. Shei GJ, Broach JR: **Yeast silencers can act as orientation-dependent gene inactivation centers that respond to environmental signals.** *Mol Cell Biol* 1995, **15**(7):3496-3506.
71. Zou Y, Yu Q, Bi X: **Asymmetric positioning of nucleosomes and directional establishment of transcriptionally silent chromatin by *Saccharomyces cerevisiae* silencers.** *Mol Cell Biol* 2006, **26**(20):7806-7819.
72. Geyer PK, Clark I: **Protecting against promiscuity: the regulatory role of insulators.** *Cell Mol Life Sci* 2002, **59**(12):2112-2127.
73. Gerasimova TI, Corces VG: **Chromatin insulators and boundaries: effects on transcription and nuclear organization.** *Annu Rev Genet* 2001, **35**:193-208.
74. Recillas-Targa F, Pikaart MJ, Burgess-Beusse B, Bell AC, Litt MD, West AG, Gaszner M, Felsenfeld G: **Position-effect protection and enhancer blocking by the chicken beta-globin insulator are separable activities.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002, **99**(10):6883-6888.
75. Bi X, Broach JR: **UASrpg can function as a heterochromatin boundary element in yeast.** *Genes Dev* 1999, **13**(9):1089-1101.
76. Hardy CF, Balderes D, Shore D: **Dissection of a carboxy-terminal region of the yeast regulatory protein RAPI with effects on both transcriptional activation and silencing.** *Mol Cell Biol* 1992, **12**(3):1209-1217.
77. Shore D: **RAP1: a protean regulator in yeast.** *Trends Genet* 1994, **10**(11):408-412.
78. Geyer PK, Corces VG: **DNA position-specific repression of transcription by a *Drosophila* zinc finger protein.** *Genes Dev* 1992, **6**(10):1865-1873.
79. Simms TA, Dugas SL, Gremillion JC, Ibos ME, Dandurand MN, Toliver TT, Edwards DJ, Donze D: **TFIIC binding sites function as both heterochromatin barriers and chromatin insulators in *Saccharomyces cerevisiae*.** *Eukaryot Cell* 2008, **7**(12):2078-2086.
80. Scott KC, Taubman AD, Geyer PK: **Enhancer blocking by the *Drosophila* gypsy insulator depends upon insulator anatomy and enhancer strength.** *Genetics* 1999, **153**(2):787-798.
81. Cai HN, Zhang Z, Adams JR, Shen P: **Genomic context modulates insulator activity through promoter competition.** *Development* 2001, **128**(21):4339-4347.

82. Zhou J, Zhou BO, Lenzmeier BA, Zhou JQ: **Histone deacetylase Rpd3 antagonizes Sir2-dependent silent chromatin propagation.** *Nucleic Acids Res* 2009, **37**(11):3699-3713.
83. Ehrentraut S, Weber JM, Dybowski JN, Hoffmann D, Ehrenhofer-Murray AE: **Rpd3-dependent boundary formation at telomeres by removal of Sir2 substrate.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2010, **107**(12):5522-5527.
84. Wang SS, Zakian VA: **Sequencing of Saccharomyces telomeres cloned using T4 DNA polymerase reveals two domains.** *Mol Cell Biol* 1990, **10**(8):4415-4419.
85. McEachern MJ, Blackburn EH: **A conserved sequence motif within the exceptionally diverse telomeric sequences of budding yeasts.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994, **91**(8):3453-3457.
86. Kachouri-Lafond R, Dujon B, Gilson E, Westhof E, Fairhead C, Teixeira MT: **Large telomerase RNA, telomere length heterogeneity and escape from senescence in Candida glabrata.** *FEBS Lett* 2009, **583**(22):3605-3610.
87. Cormack BP, Falkow S: **Efficient homologous and illegitimate recombination in the opportunistic yeast pathogen Candida glabrata.** *Genetics* 1999, **151**(3):979-987.
88. Teixeira MT, Arneric M, Sperisen P, Lingner J: **Telomere length homeostasis is achieved via a switch between telomerase- extendible and -nonextendible states.** *Cell* 2004, **117**(3):323-335.
89. Fourel G, Revardel E, Koering CE, Gilson E: **Cohabitation of insulators and silencing elements in yeast subtelomeric regions.** *Embo J* 1999, **18**(9):2522-2537.
90. Fourel G, Boscheron C, Revardel E, Lebrun E, Hu YF, Simmen KC, Muller K, Li R, Mermod N, Gilson E: **An activation-independent role of transcription factors in insulator function.** *EMBO Rep* 2001, **2**(2):124-132.
91. De Las Penas A, Pan SJ, Castano I, Alder J, Cregg R, Cormack BP: **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* 2003, **17**(18):2245-2258.
92. Andrulis ED, Neiman AM, Zappulla DC, Sternglanz R: **Perinuclear localization of chromatin facilitates transcriptional silencing.** *Nature* 1998, **394**(6693):592-595.
93. Manolis KG, Nimmo ER, Hartsuiker E, Carr AM, Jeggo PA, Allshire RC: **Novel functional requirements for non-homologous DNA end joining in Schizosaccharomyces pombe.** *Embo J* 2001, **20**(1-2):210-221.
94. Thierry A, Dujon B, Richard GF: **Megasatellites: a new class of large tandem repeats discovered in the pathogenic yeast Candida glabrata.** *Cell Mol Life Sci* 2010, **67**(5):671-676.
95. Radman-Livaja M, Ruben G, Weiner A, Friedman N, Kamakaka R, Rando OJ: **Dynamics of Sir3 spreading in budding yeast: secondary recruitment sites and euchromatic localization.** *Embo J* 2011, **30**(6):1012-1026.
96. Phair RD, Scaffidi P, Elbi C, Vecerova J, Dey A, Ozato K, Brown DT, Hager G, Bustin M, Misteli T: **Global nature of dynamic protein-chromatin interactions in vivo: three-dimensional genome scanning and dynamic interaction networks of chromatin proteins.** *Mol Cell Biol* 2004, **24**(14):6393-6402.
97. Fourel G, Lebrun E, Gilson E: **Protosilencers as building blocks for heterochromatin.** *Bioessays* 2002, **24**(9):828-835.



98. Oki M, Valenzuela L, Chiba T, Ito T, Kamakaka RT: **Barrier proteins remodel and modify chromatin to restrict silenced domains.** *Mol Cell Biol* 2004, **24**(5):1956-1967.
99. Donze D, Kamakaka RT: **Braking the silence: how heterochromatic gene repression is stopped in its tracks.** *Bioessays* 2002, **24**(4):344-349.
100. Ishii K, Arib G, Lin C, Van Houwe G, Laemmli UK: **Chromatin boundaries in budding yeast: the nuclear pore connection.** *Cell* 2002, **109**(5):551-562.
101. Shogren-Knaak M, Ishii H, Sun JM, Pazin MJ, Davie JR, Peterson CL: **Histone H4-K16 acetylation controls chromatin structure and protein interactions.** *Science* 2006, **311**(5762):844-847.
102. Johnson A, Li G, Sikorski TW, Buratowski S, Woodcock CL, Moazed D: **Reconstitution of heterochromatin-dependent transcriptional gene silencing.** *Mol Cell* 2009, **35**(6):769-781.
103. Sperling AS, Grunstein M: **Histone H3 N-terminus regulates higher order structure of yeast heterochromatin.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2009, **106**(32):13153-13159.
104. Zaman Z, Heid C, Ptashne M: **Telomere looping permits repression "at a distance" in yeast.** *Curr Biol* 2002, **12**(11):930-933.
105. Martin SG, Laroche T, Suka N, Grunstein M, Gasser SM: **Relocalization of telomeric Ku and SIR proteins in response to DNA strand breaks in yeast.** *Cell* 1999, **97**(5):621-633.
106. Strahl-Bolsinger S, Hecht A, Luo K, Grunstein M: **SIR2 and SIR4 interactions differ in core and extended telomeric heterochromatin in yeast.** *Genes Dev* 1997, **11**(1):83-93.
107. Valenzuela L, Dhillon N, Dubey RN, Gartenberg MR, Kamakaka RT: **Long-range communication between the silencers of HMR.** *Mol Cell Biol* 2008, **28**(6):1924-1935.
108. Laroche T, Martin SG, Gotta M, Gorham HC, Pryde FE, Louis EJ, Gasser SM: **Mutation of yeast Ku genes disrupts the subnuclear organization of telomeres.** *Curr Biol* 1998, **8**(11):653-656.
109. Tham WH, Wyithe JS, Ko Ferrigno P, Silver PA, Zakian VA: **Localization of yeast telomeres to the nuclear periphery is separable from transcriptional repression and telomere stability functions.** *Mol Cell* 2001, **8**(1):189-199.
110. Marvin ME, Becker MM, Noel P, Hardy S, Bertuch AA, Louis EJ: **The association of yKu with subtelomeric core X sequences prevents recombination involving telomeric sequences.** *Genetics* 2009, **183**(2):453-467, 451SI-413SI.
111. Donze D, Adams CR, Rine J, Kamakaka RT: **The boundaries of the silenced HMR domain in *Saccharomyces cerevisiae*.** *Genes Dev* 1999, **13**(6):698-708.
112. Kmita M, Kondo T, Duboule D: **Targeted inversion of a polar silencer within the HoxD complex re-allocates domains of enhancer sharing.** *Nat Genet* 2000, **26**(4):451-454.
113. Ramirez-Zavaleta CY, Salas-Delgado GE, De Las Penas A, Castano I: **Subtelomeric silencing of the MTL3 locus of *Candida glabrata* requires yKu70, yKu80, and Rif1 proteins.** *Eukaryot Cell*, **9**(10):1602-1611.
114. Donze D, Kamakaka RT: **RNA polymerase III and RNA polymerase II promoter complexes are heterochromatin barriers in *Saccharomyces cerevisiae*.** *Embo J* 2001, **20**(3):520-531.

## ANEXOS

**Cepas de *Candida glabrata***

Las cepas generadas y utilizadas en este trabajo provienen de la cepa BG14 (CGM1) la cual contiene una mutación nula en el gen *URA3* por la inserción de el transposon Tn903 [Tn903 npt (Neo<sup>R</sup> G418<sup>R</sup>)] [84]. Dicha cepa es auxótrofa de uracilo o uridina.

**Tabla A1.** Cepas de *E. coli* y *C. glabrata* utilizadas en la sección 7.1 (yKu70/yKu80 and Rif1 regulate silencing differentially at telomeres in *Candida glabrata*).

<b><i>E. coli</i> strains</b>		Genotype	Reference
DH10B		F <sup>-</sup> <i>mcrA</i> Δ( <i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i> ) □B0Δ <i>lacZ</i> Δ <i>M15</i> Δ <i>lacX74</i> <i>deoR</i> <i>recA1</i> <i>endA1</i> <i>araD139</i> Δ( <i>ara,leu</i> )7697 <i>galU</i> <i>galK</i> □ <i>rpsL</i> <i>nupG</i>	[1]
BW23473		Δ <i>lac-169</i> <i>robA1</i> <i>creC510</i> <i>hsdR514</i> <i>endA</i> <i>recA</i> Δ <i>vidA::pir</i> <sup>+</sup>	[2]
Transposon			
Tn7		Tn7 R6K <sub>Yori</sub> <i>URA3</i> <i>npt</i> (Km <sup>R</sup> )	[3]
<b><i>Candida glabrata</i> strains</b>			
Strain	Parent	Genotype	
BG2		Clinical isolate	[4]
BG14	BG2	<i>ura3</i> Δ::Tn903 G418 <sup>R</sup>	[5]
Tn7 insertions at <i>EPA</i> loci			
BG684	BG14	<i>ura3</i> Δ::Tn903 G418 <sup>R</sup> Tn7 at intergenic region between <i>ISC1</i> and <i>HYR1</i> (pAP540 <i>Bcg</i> I). Insertion 1	[6]
BG646	BG14	<i>ura3</i> Δ::Tn903 G418 <sup>R</sup> Tn7 at intergenic region between <i>EPA1</i> and <i>EPA2</i> (pAP508 <i>Spe</i> I/ <i>Bcg</i> I). Insertion 2	[6]
BG833	BG14	<i>ura3</i> Δ::Tn903 G418 <sup>R</sup> Tn7 at intergenic region between <i>EPA2</i> and <i>EPA3</i> (pAP559 <i>BsrG</i> I/ <i>Sph</i> I). Insertion 3	[6]
BG432	BG14	<i>ura3</i> Δ::Tn903 G418 <sup>R</sup> Tn7 at intergenic region between <i>EPA3</i> and telomere (pAP553 <i>Pst</i> I/ <i>EcoR</i> I).	[6]

		Insertion 4	
BG694	BG14	<i>ura3Δ::Tn903 G418<sup>R</sup></i> Tn7 at intergenic region between <i>PET56</i> and <i>EPA5</i> (pAP541 <i>Bcg</i> I). Insertion 5.	[6]
BG693	BG14	<i>ura3Δ::Tn903 G418<sup>R</sup></i> Tn7 at unique region between <i>EPA5</i> and <i>EPA4</i> (pAP534 <i>Bcg</i> I). Insertion 6	[6]
BG526	BG14	<i>ura3Δ::Tn903 G418<sup>R</sup></i> Tn7 at intergenic region between <i>EPA4</i> and telomere (pAP471 <i>Apa</i> L I/ <i>Xba</i> I). Insertion 7	[6]
BG582	BG14	<i>ura3Δ::Tn903 G418<sup>R</sup></i> Tn7 98bp upstream of <i>EPA6</i> stop codon (pSP121 <i>Eco</i> RI). Insertion 8	[7]
BG826	BG14	<i>ura3Δ::Tn903 G418<sup>R</sup></i> Tn7 268 bp downstream from <i>EPA7</i> stop codon between <i>EPA7</i> and telomere (pIC44 <i>Kpn</i> I/ <i>Bcg</i> I). Insertion 9	[7]
<b><i>sir2Δ::hph</i></b>			
BG1048	BG14	<i>ura3Δ::Tn903 G418<sup>R</sup></i> <i>sir2Δ::hph Hyg<sup>R</sup></i> (pAP596/ <i>Sac</i> I- <i>Kpn</i> I).	[8]
CGM238	BG646	<i>ura3Δ::Tn903 G418<sup>R</sup></i> , <i>sir2Δ::hph Hyg<sup>R</sup></i> (pAP596/ <i>Sac</i> I- <i>Kpn</i> I). Tn7 at intergenic region between <i>EPA1</i> and <i>EPA2</i> (insertion 2).	This work
CGM243	BG833	<i>ura3Δ::Tn903 G418<sup>R</sup></i> , <i>sir2Δ::hph Hyg<sup>R</sup></i> (pAP596/ <i>Sac</i> I- <i>Kpn</i> I). Tn7 at intergenic region between <i>EPA2</i> and <i>EPA3</i> (insertion 3).	This work
CGM252	BG432	<i>ura3Δ::Tn903 G418<sup>R</sup></i> , <i>sir2Δ::hph Hyg<sup>R</sup></i> (pAP596/ <i>Sac</i> I- <i>Kpn</i> I). Tn7 at intergenic region between <i>EPA3</i> and telomere (insertion 4).	This work
CGM325	BG694	<i>ura3Δ::Tn903 G418<sup>R</sup></i> , <i>sir2Δ::hph Hyg<sup>R</sup></i> (pAP596/ <i>Sac</i> I- <i>Kpn</i> I). Tn7 at intergenic region between <i>PET56</i> and <i>EPA5</i> (insertion 5).	This work
CGM260	BG693	<i>ura3Δ::Tn903 G418<sup>R</sup></i> , <i>sir2Δ::hph Hyg<sup>R</sup></i> (pAP596/ <i>Sac</i> I- <i>Kpn</i> I). Tn7 at unique region between <i>EPA5</i> and <i>EPA4</i> (insertion 6).	This work
CGM177	BG526	<i>ura3Δ::Tn903 G418<sup>R</sup></i> , <i>sir2Δ::hph Hyg<sup>R</sup></i> (pAP596/ <i>Sac</i> I- <i>Kpn</i> I). Tn7 at intergenic region between <i>EPA4</i> and telomere (insertion 7).	This work

CGM219	BG582	<i>ura3Δ::Tn903 G418<sup>R</sup>, sir2Δ::hph Hyg<sup>R</sup></i> (pAP596/ <i>Sac I-Kpn I</i> ). Tn7 98bp upstream of <i>EPA6</i> stop codon (insertion 8).	This work
CGM248	BG826	<i>ura3Δ::Tn903 G418<sup>R</sup>, sir2Δ::hph Hyg<sup>R</sup></i> (pAP596/ <i>Sac I-Kpn I</i> ). Tn7 268 bp downstream from <i>EPA7</i> stop codon between <i>EPA7</i> and telomere (insertion 9).	This work
<b><i>sir3Δ::hph</i></b>			
CGM312	BG14	<i>ura3Δ::Tn903 G418<sup>R</sup>, sir3Δ::hph</i> (pIC120/ <i>Kpn I-Hpa I+T4 DNA</i> polymerase).	This work
CGM282	BG646	<i>ura3Δ::Tn903 G418<sup>R</sup>, sir3Δ::hph</i> (pIC120/ <i>Kpn I-Hpa I+T4 DNA</i> polymerase). Tn7 at intergenic region between <i>EPA1</i> and <i>EPA2</i> (insertion 2).	This work
CGM287	BG833	<i>ura3Δ::Tn903 G418<sup>R</sup>, sir3Δ::hph</i> (pIC120/ <i>Kpn I-Hpa I+T4 DNA</i> polymerase). Tn7 at intergenic region between <i>EPA2</i> and <i>EPA3</i> (insertion 3).	This work
CGM289	BG432	<i>ura3Δ::Tn903 G418<sup>R</sup>, sir3Δ::hph</i> (pIC120/ <i>Kpn I-Hpa I+T4 DNA</i> polymerase). Tn7 at intergenic region between <i>EPA3</i> and telomere (insertion 4).	This work
CGM291	BG694	<i>ura3Δ::Tn903 G418<sup>R</sup>, sir3Δ::hph</i> (pIC120/ <i>Kpn I-Hpa I+T4 DNA</i> polymerase). Tn7 at intergenic region between <i>PET56</i> and <i>EPA5</i> (insertion 5).	This work
CGM293	BG693	<i>ura3Δ::Tn903 G418<sup>R</sup>, sir3Δ::hph</i> (pIC120/ <i>Kpn I-Hpa I+T4 DNA</i> polymerase). Tn7 at unique region between <i>EPA5</i> and <i>EPA4</i> (insertion 6).	This work
CGM303	BG526	<i>ura3Δ::Tn903 G418<sup>R</sup>, sir3Δ::hph</i> (pIC120/ <i>Kpn I-Hpa I+T4 DNA</i> polymerase). Tn7 at intergenic region between <i>EPA4</i> and telomere (insertion 7).	This work
CGM299	BG582	<i>ura3Δ::Tn903 G418<sup>R</sup>, sir3Δ::hph</i> (pIC120/ <i>Kpn I-Hpa I+T4 DNA</i>	This work

		polymerase). Tn7 98bp upstream of <i>EPA6</i> stop codon (insertion 8).	
CGM301	BG826	<i>ura3Δ::Tn903 G418<sup>R</sup></i> , <i>sir3Δ::hph</i> (pIC120/ <i>Kpn</i> I- <i>Hpa</i> I+T4 DNA polymerase). Tn7 268 bp downstream from <i>EPA7</i> stop codon between <i>EPA7</i> and telomere (insertion 9).	This work
<b><i>sir4Δ::hph</i></b>			
BG1050	BG14	<i>ura3Δ::Tn903 G418<sup>R</sup></i> <i>sir4Δ::hph</i> Hyg <sup>R</sup> (pAP598 <i>Bsg</i> I).	This work
CGM239	BG646	<i>ura3Δ::Tn903 G418<sup>R</sup></i> , <i>sir4Δ::hph</i> Hyg <sup>R</sup> (pAP598 <i>Bsg</i> I). Tn7 at intergenic region between <i>EPA1</i> and <i>EPA2</i> . Insertion 2.	This work
CGM244	BG833	<i>ura3Δ::Tn903 G418<sup>R</sup></i> , <i>sir4Δ::hph</i> Hyg <sup>R</sup> (pAP598 <i>Bsg</i> I). Tn7 at intergenic region between <i>EPA2</i> and <i>EPA3</i> . Insertion 3.	This work
CGM340	BG432	<i>ura3Δ::Tn903 G418<sup>R</sup></i> , <i>sir4Δ::hph</i> Hyg <sup>R</sup> (pAP598 <i>Bsg</i> I). Tn7 at intergenic region between <i>EPA3</i> and telomere. Insertion 4.	This work
CGM256	BG694	<i>ura3Δ::Tn903 G418<sup>R</sup></i> , <i>sir4Δ::hph</i> Hyg <sup>R</sup> (pAP598 <i>Bsg</i> I). Tn7 at intergenic region between <i>PET56</i> and <i>EPA5</i> . Insertion 5.	This work
CGM261	BG693	<i>ura3Δ::Tn903 G418<sup>R</sup></i> , <i>sir4Δ::hph</i> Hyg <sup>R</sup> (pAP598 <i>Bsg</i> I). Tn7 at intergenic region between between <i>EPA5</i> and <i>EPA4</i> . Insertion 6.	This work
CGM196	BG526	<i>ura3Δ::Tn903 G418<sup>R</sup></i> , <i>sir4Δ::hph</i> Hyg <sup>R</sup> (pAP598 <i>Bsg</i> I). Tn7 at intergenic region between between <i>EPA4</i> and the telomere. Insertion 7.	This work
CGM221	BG582	<i>ura3Δ::Tn903 G418<sup>R</sup></i> , <i>sir4Δ::hph</i> Hyg <sup>R</sup> (pAP598 <i>Bsg</i> I). Tn7 98bp upstream of <i>EPA6</i> stop codon. Insertion 8.	This work
CGM250	BG826	<i>ura3Δ::Tn903 G418<sup>R</sup></i> , <i>sir4Δ::hph</i> Hyg <sup>R</sup> (pAP598 <i>Bsg</i> I). Tn7 268 bp downstream from <i>EPA7</i> stop codon between <i>EPA7</i> and telomere. Insertion 9.	This work

<b><i>hdf1Δ::hph (Ku70p)</i></b>			
BG1080	BG14	<i>ura3Δ::Tn903 G418<sup>R</sup> hdf1Δ::hph Hyg<sup>R</sup></i> (pAP611 <i>Bcg</i> I).	This work
CGM241	BG646	<i>ura3Δ::Tn903 G418<sup>R</sup>, hdf1Δ::hph Hyg<sup>R</sup></i> (pAP611 <i>Bcg</i> I). Tn7 at intergenic region between <i>EPA1</i> and <i>EPA2</i> . Insertion 2.	This work
CGM246	BG833	<i>ura3Δ::Tn903 G418<sup>R</sup>, hdf1Δ::hph Hyg<sup>R</sup></i> (pAP611 <i>Bcg</i> I). Tn7 at intergenic region between <i>EPA2</i> and <i>EPA3</i> . Insertion 3.	This work
CGM254	BG432	<i>ura3Δ::Tn903 G418<sup>R</sup>, hdf1Δ::hph Hyg<sup>R</sup></i> (pAP611 <i>Bcg</i> I). Tn7 at intergenic region between <i>EPA3</i> and telomere. Insertion 4.	This work
CGM258	BG694	<i>ura3Δ::Tn903 G418<sup>R</sup>, hdf1Δ::hph Hyg<sup>R</sup></i> (pAP611 <i>Bcg</i> I). Tn7 at intergenic region between <i>PET56</i> and <i>EPA5</i> . Insertion 5.	This work
CGM263	BG693	<i>ura3Δ::Tn903 G418<sup>R</sup>, hdf1Δ::hph Hyg<sup>R</sup></i> (pAP611 <i>Bcg</i> I). Tn7 at intergenic region between between <i>EPA5</i> and <i>EPA4</i> . Insertion 6.	This work
CGM182	BG526	<i>ura3Δ::Tn903 G418<sup>R</sup>, hdf1Δ::hph Hyg<sup>R</sup></i> (pAP611 <i>Bcg</i> I). Tn7 at intergenic region between between <i>EPA4</i> and the telomere. Insertion 7.	This work
CGM225	BG582	<i>ura3Δ::Tn903 G418<sup>R</sup>, hdf1Δ::hph Hyg<sup>R</sup></i> (pAP611 <i>Bcg</i> I). Tn7 98bp upstream of <i>EPA6</i> stop codon. Insertion 8.	This work
CGM275	BG826	<i>ura3Δ::Tn903 G418<sup>R</sup>, hdf1Δ::hph Hyg<sup>R</sup></i> (pAP611 <i>Bcg</i> I). Tn7 268 bp downstream from <i>EPA7</i> stop codon between <i>EPA7</i> and telomere. Insertion 9.	This work
<b><i>hdf2Δ::hph (Ku80p)</i></b>			
BG1081	BG14	<i>ura3Δ::Tn903 G418<sup>R</sup> hdf2Δ::hph Hyg<sup>R</sup></i> (pAP612 <i>Bcg</i> I).	This work
CGM342	BG646	<i>ura3Δ::Tn903 G418<sup>R</sup>, hdf2Δ::hph Hyg<sup>R</sup></i> (pAP612 <i>Bcg</i> I). Tn7 at intergenic region between <i>EPA1</i> and <i>EPA2</i> . Insertion 2.	This work
CGM247	BG833	<i>ura3Δ::Tn903 G418<sup>R</sup>, hdf2Δ::hph Hyg<sup>R</sup></i>	This work

		(pAP612 <i>Bcg</i> I). Tn7 at intergenic region between <i>EPA2</i> and <i>EPA3</i> . Insertion 3.	
CGM255	BG432	<i>ura3Δ::Tn903 G418<sup>R</sup></i> , <i>hdf2Δ::hph Hyg<sup>R</sup></i> (pAP612 <i>Bcg</i> I). Tn7 at intergenic region between <i>EPA3</i> and telomere. Insertion 4.	This work
CGM259	BG694	<i>ura3Δ::Tn903 G418<sup>R</sup></i> , <i>hdf2Δ::hph Hyg<sup>R</sup></i> (pAP612 <i>Bcg</i> I). Tn7 at intergenic region between <i>PET56</i> and <i>EPA5</i> . Insertion 5.	This work
CGM264	BG693	<i>ura3Δ::Tn903 G418<sup>R</sup></i> , <i>hdf2Δ::hph Hyg<sup>R</sup></i> (pAP612 <i>Bcg</i> I). Tn7 at intergenic region between between <i>EPA5</i> and <i>EPA4</i> . Insertion 6.	This work
CGM204	BG526	<i>ura3Δ::Tn903 G418<sup>R</sup></i> , <i>hdf2Δ::hph Hyg<sup>R</sup></i> (pAP612 <i>Bcg</i> I). Tn7 at intergenic region between between <i>EPA4</i> and the telomere. Insertion 7.	This work
CGM227	BG582	<i>ura3Δ::Tn903 G418<sup>R</sup></i> , <i>hdf2Δ::hph Hyg<sup>R</sup></i> (pAP612 <i>Bcg</i> I). Tn7 98bp upstream of <i>EPA6</i> stop codon. Insertion 8.	This work
CGM276	BG826	<i>ura3Δ::Tn903 G418<sup>R</sup></i> , <i>hdf2Δ::hph Hyg<sup>R</sup></i> (pAP612 <i>Bcg</i> I). Tn7 268 bp downstream from <i>EPA7</i> stop codon between <i>EPA7</i> and telomere. Insertion 9.	This work
<b><i>rif1Δ::hph</i></b>			
CGM314	BG14	<i>ura3Δ::Tn903 G418<sup>R</sup></i> <i>rif1Δ::hph Hyg<sup>R</sup></i> (pSP166 <i>Bsg</i> I).	This work
CGM192	BG646	<i>ura3Δ::Tn903 G418<sup>R</sup></i> , <i>rif1Δ::hph Hyg<sup>R</sup></i> (pSP166 <i>Bsg</i> I). Tn7 at intergenic region between <i>EPA1</i> and <i>EPA2</i> . Insertion 2.	This work
CGM194	BG833	<i>ura3Δ::Tn903 G418<sup>R</sup></i> , <i>rif1Δ::hph Hyg<sup>R</sup></i> (pSP166 <i>Bsg</i> I). Tn7 at intergenic region between <i>EPA2</i> and <i>EPA3</i> . Insertion 3.	This work
CGM200	BG432	<i>ura3Δ::Tn903 G418<sup>R</sup></i> , <i>rif1Δ::hph Hyg<sup>R</sup></i> (pSP166 <i>Bsg</i> I). Tn7 at intergenic region between <i>EPA3</i> and telomere. Insertion 4.	This work
CGM203	BG694	<i>ura3Δ::Tn903 G418<sup>R</sup></i> , <i>rif1Δ::hph Hyg<sup>R</sup></i> (pSP166 <i>Bsg</i> I).	This work

		Tn7 at intergenic region between <i>PET56</i> and <i>EPA5</i> . Insertion 5.	
CGM223	BG693	<i>ura3Δ::Tn903 G418<sup>R</sup></i> , <i>rif1Δ::hph Hyg<sup>R</sup></i> (pSP166 <i>Bsg</i> I). Tn7 at intergenic region between between <i>EPA5</i> and <i>EPA4</i> . Insertion 6.	This work
CGM270	BG526	<i>ura3Δ::Tn903 G418<sup>R</sup></i> , <i>rif1Δ::hph Hyg<sup>R</sup></i> (pSP166 <i>Bsg</i> I). Tn7 at intergenic region between between <i>EPA4</i> and the telomere. Insertion 7.	This work
CGM278	BG582	<i>ura3Δ::Tn903 G418<sup>R</sup></i> , <i>rif1Δ::hph Hyg<sup>R</sup></i> (pSP166 <i>Bsg</i> I). Tn7 98bp upstream of <i>EPA6</i> stop codon. Insertion 8.	This work
CGM268	BG826	<i>ura3Δ::Tn903 G418<sup>R</sup></i> , <i>rif1Δ::hph Hyg<sup>R</sup></i> (pSP166 <i>Bsg</i> I). Tn7 268 bp downstream from <i>EPA7</i> stop codon between <i>EPA7</i> and telomere. Insertion 9.	This work
<b>Strains with cis-acting element between <i>ISC1</i> and <i>HYR1</i></b>			
CGM399	BG14	<i>ura3Δ::Tn903 G418<sup>R</sup></i> pAP509 <i>Spe</i> I integrated between <i>ISC1</i> and <i>HYR1</i> .	This work
CGM397	BG14	<i>ura3Δ::Tn903 G418<sup>R</sup></i> pAP430 <i>Spe</i> I integrated in the chromosome	This work
CGM483	CGM31 2	<i>ura3Δ::Tn903 G418<sup>R</sup></i> <i>sir3Δ::hph</i> pAP509 <i>Spe</i> I integrated between <i>ISC1</i> and <i>HYR1</i> .	This work
CGM481	CGM31 2	<i>ura3Δ::Tn903 G418<sup>R</sup></i> <i>sir3Δ::hph</i> pAP430 <i>Spe</i> I integrated between <i>ISC1</i> and <i>HYR1</i> .	This work
CGM491	CGM78	<i>ura3Δ::Tn903 G418<sup>R</sup></i> <i>hdf1Δ::hph</i> pAP509 <i>Spe</i> I integrated between <i>ISC1</i> and <i>HYR1</i>	This work
CGM489	CGM78	<i>ura3Δ::Tn903 G418<sup>R</sup></i> <i>hdf1Δ::hph</i> pAP430 <i>Spe</i> I integrated between <i>ISC1</i> and <i>HYR1</i>	This work
CGM495	CGM79	<i>ura3Δ::Tn903 G418<sup>R</sup></i> <i>hdf2Δ::hph</i> pAP509 <i>Spe</i> I integrated between <i>ISC1</i> and <i>HYR1</i>	This work
CGM493	CGM79	<i>ura3Δ::Tn903 G418<sup>R</sup></i> <i>hdf2Δ::hph</i> pAP430 <i>Spe</i> I integrated between <i>ISC1</i> and <i>HYR1</i>	This work
CGM483	CGM31 4	<i>ura3Δ::Tn903 G418<sup>R</sup></i> <i>rif1Δ::hph</i> pAP509 <i>Spe</i> I integrated between <i>ISC1</i> and <i>HYR1</i>	This work
CGM485	CGM31 4	<i>ura3Δ::Tn903 G418<sup>R</sup></i> <i>rif1Δ::hph</i> pAP430 <i>Spe</i> I integrated between <i>ISC1</i> and <i>HYR1</i>	This work



1. Calvin NM, Hanawalt PC: **High-efficiency transformation of bacterial cells by electroporation.** *J Bacteriol* 1988, **170**(6):2796-2801.
2. Haldimann A, Prahalad MK, Fisher SL, Kim SK, Walsh CT, Wanner BL: **Altered recognition mutants of the response regulator PhoB: a new genetic strategy for studying protein-protein interactions.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996, **93**(25):14361-14366.
3. Castano I, Kaur R, Pan S, Cregg R, Penas Ade L, Guo N, Biery MC, Craig NL, Cormack BP: **Tn7-based genome-wide random insertional mutagenesis of *Candida glabrata*.** *Genome Res* 2003, **13**(5):905-915.
4. Fidel PL, Jr., Cutright JL, Tait L, Sobel JD: **A murine model of *Candida glabrata* vaginitis.** *J Infect Dis* 1996, **173**(2):425-431.
5. Cormack BP, Falkow S: **Efficient homologous and illegitimate recombination in the opportunistic yeast pathogen *Candida glabrata*.** *Genetics* 1999, **151**(3):979-987.
6. De Las Penas A, Pan SJ, Castano I, Alder J, Cregg R, Cormack BP: **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* 2003, **17**(18):2245-2258.
7. Castano I, Pan SJ, Zupancic M, Hennequin C, Dujon B, Cormack BP: **Telomere length control and transcriptional regulation of subtelomeric adhesins in *Candida glabrata*.** *Mol Microbiol* 2005, **55**(4):1246-1258.
8. Domergue R, Castano I, De Las Penas A, Zupancic M, Lockett V, Hebel JR, Johnson D, Cormack BP: **Nicotinic acid limitation regulates silencing of *Candida* adhesins during UTI.** *Science* 2005, **308**(5723):866-870.

**Tabla A2.** Plásmidos utilizados en la sección 7.1 (yKu70/yKu80 and Rif1 regulate silencing differentially at telomeres in *Candida glabrata*).

Plasmid	Relevant genotype	Reference
Cloning vectors		
pACYC184	Cloning vector Cm <sup>R</sup> Tc <sup>R</sup>	[1]
pBR322	Cloning vector Tc <sup>R</sup> Ap <sup>R</sup>	[2]
pGRB2.0	Cloning replicative vector <i>URA3</i> Ap <sup>R</sup> pRS406:: <i>C.g. CEN ARS</i>	[3]
pNEB193	Cloning vector Ap <sup>R</sup>	New England BioLabs
pRS306	Cloning, integrative vector <i>URA3</i> Ap <sup>R</sup>	[4]
pUC19	Cloning vector Ap <sup>R</sup>	[5]
pYIp <i>lac211</i>	Cloning, integrative vector <i>URA3</i> Ap <sup>R</sup>	[6]
pAP358	Cloning vector containing a hygromycin resistance cassette [ <i>P<sub>PGK</sub>::hph::3'UTR<sub>HIS3</sub></i> ]	[7]
pAP502	Cloning vector. Ap <sup>R</sup> pACYC177 cut with <i>Drd I/Dra III</i> and ligated to a <i>Drd I/Dra III</i> linker carrying a <i>BamH I</i> site flanked by 2 <i>Bcg I</i> sites.	[3]
pAP573	Cloning vector with a hygromycin resistance cassette. <i>URA3</i> , Hyg <sup>R</sup> , Amp <sup>R</sup> , integrative. For construction of knock-out mutants. [ <i>P<sub>PGK</sub>::hph::3'UTR<sub>HIS3</sub></i> ]	[8]
pBC599	Cloning vector with 2 FRT direct repeats flanking a Hygromycin resistance cassette. <i>URA3</i> , Hyg <sup>R</sup> , Amp <sup>R</sup> , integrative. For construction of multiple rounds of knock-out mutants [ <i>FRT-P<sub>PGK</sub>::hph::3'UTR<sub>HIS3</sub>-FRT</i> ]	[8]
<b>Plasmids for Tn7 (<i>URA3</i>) insertions at <i>EPA</i> loci</b>		
pAP540 Insertion 1	A 1.241kb <i>BamH I</i> PCR fragment carrying a Tn7 in the intergenic region between <i>ISC1</i> and <i>HYR1</i> cloned into pAP502. Insertion 1	[3]
pAP508 Insertion 2	A 1.6 kb <i>Hind III</i> PCR fragment carrying a Tn7 in the intergenic region between <i>EPA1</i> and <i>EPA2</i> cloned into pBR322. Insertion 2	[3]
pAP559 Insertion 3	A 2.9 kb <i>EcoR I</i> fragment carrying a Tn7 in the intergenic region between <i>EPA2</i> and <i>EPA3</i> cloned into pUC19. Insertion 3	[3]
pAP553 Insertion 4	A 3.2 kb <i>Hind III /EcoR I</i> fragment carrying a Tn7 in the intergenic region between <i>EPA3</i> and telomere cloned into pUC19.	[3]

	Insertion 4	
pAP541 Insertion 5	A 1.495 kb <i>Bam</i> H I PCR fragment carrying a Tn7 in the intergenic region between <i>PET56</i> and <i>EPA5</i> cloned into pAP502. Insertion 5	
pAP534 Insertion 6	A 1.6 kb <i>Bam</i> H I PCR fragment carrying a Tn7 in the unique region between <i>EPA5</i> and <i>EPA4</i> cloned into pAP502. Insertion 6	[3]
pAP471 Insertion 7	A 4.0 kb <i>Bgl</i> II fragment carrying a Tn7 in the intergenic region between <i>EPA4</i> and the telomere cloned into pACYC184. Insertion 7	[3]
pSP121 Insertion 8	A 1 kb <i>Eco</i> R I PCR fragment carrying a Tn7 insertion 90 bp upstream of the stop codon of <i>EPA6</i> cloned into pNEB193. Insertion 8	[9]
pIC44 Insertion 9	A 1.4 kb <i>Bam</i> H I PCR fragment carrying a Tn7 insertion 268 bp downstream from the stop codon of <i>EPA7</i> cloned into pAP502. Insertion 9	[9]
Plasmids for deletions of silencing proteins		
pAP596 ( <i>sir2</i> Δ::hph Hyg <sup>R</sup> )	<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	[10]
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.	[3]
pIC120 (FRT- <i>sir3</i> Δ::hph-FRT Hyg <sup>R</sup> )	<i>SIR3</i> deletion vector. A 2.1 kb <i>Hind</i> III- <i>Bam</i> HI fragment from pAP599 containing [FRT- <i>P<sub>PGK</sub></i> ::hph::3'UTR <sub>HIS3</sub> -FRT] cloned into pIC39 between <i>SIR3</i> 5' and 3' non-coding regions.	This work
pAP598 ( <i>sir4</i> Δ::hph Hyg <sup>R</sup> )	<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> I- <i>Bam</i> HI PCR fragment carrying <i>SIR2</i> 3' (primers #2283-#2284), non coding regions cloned into pAP573	This work
pAP611 ( <i>hdf1</i> Δ::hph Hyg <sup>R</sup> )	<i>HDF1</i> deletion vector. A 0.804 kb <i>Hind</i> III- <i>Kpn</i> I PCR fragment containing <i>HDF1</i> 5' (primers #2238-#2239), and a 0.836 kb <i>Bgl</i> II- <i>Sac</i> I PCR fragment containing <i>HDF1</i> 3' (primers #2240-#2241), non coding regions	This work

	cloned into pAP573.	
pAP612 ( <i>hdf2Δ::hph</i> Hyg <sup>R</sup> )	<i>HDF2</i> deletion vector. A 0.905 kb <i>Hind</i> III- <i>Kpn</i> I PCR fragment containing <i>HDF2</i> 5' (primers #2244-#2245), and a 0.813 kb <i>Bgl</i> II- <i>Sac</i> I PCR fragment containing <i>HDF1</i> 3' (primers #2246-#2247), non coding regions cloned into pAP573.	This work
pSP165 ( <i>rif1Δ</i> )	For <i>RIF1</i> deletion construct. A 0.934 kb <i>Hind</i> III- <i>Xho</i> I PCR fragment containing <i>RIF1</i> 5' (primers #2051-#2059), and a 0.884 kb <i>Xho</i> I- <i>Xma</i> I PCR fragment containing <i>RIF1</i> 3' (primers #1952-#2050), non coding regions cloned into pYIp/ <i>lac211</i> .	This work
pSP166 ( <i>rif1Δ::hph</i> Hyg <sup>R</sup> )	<i>RIF1</i> deletion vector. A 2.012 kb <i>Sac</i> I- <i>Kpn</i> I (blunt ended) fragment from pAP358 containing [ <i>P</i> <sub>PGK</sub> :: <i>hph</i> ::3'UTR <sub>HIS3</sub> ] cloned into pSP165 between <i>RIF1</i> 5' and 3' non coding regions.	This work
<b>Plasmids for protosilencer integration</b>		
<b>pAP430</b>	Plasmid to integrate the protosilencer and <i>URA3</i> at the intergenic region between <i>C.g. ISC1</i> and <i>C.g. HYR1</i> . Cloned into pYIp/ <i>lac211</i> . Ap <sup>R</sup>	[3]
pAP509	Vector to integrate <i>URA3</i> at the intergenic region between <i>C.g. ISC1</i> and <i>C.g. HYR1</i> . A 0.686 kb <i>Pst</i> I- <i>Sal</i> I PCR fragment (Primers #962, #963) carrying the intergenic region between <i>C.g. ISC1</i> cloned into pYIp/ <i>lac211</i> .	This work

1. Chang AC, Cohen SN: **Construction and characterization of amplifiable multicopy DNA cloning vehicles derived from the P15A cryptic miniplasmid.** *J Bacteriol* 1978, **134**(3):1141-1156.
2. Bolivar F, Rodriguez RL, Betlach MC, Boyer HW: **Construction and characterization of new cloning vehicles. I. Ampicillin-resistant derivatives of the plasmid pMB9.** *Gene* 1977, **2**(2):75-93.
3. De Las Penas A, Pan SJ, Castano I, Alder J, Cregg R, Cormack BP: **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* 2003, **17**(18):2245-2258.
4. Sikorski RS, Hieter P: **A system of shuttle vectors and yeast host strains designed for efficient manipulation of DNA in *Saccharomyces cerevisiae*.** *Genetics* 1989, **122**(1):19-27.
5. Yanisch-Perron C, Vieira J, Messing J: **Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of the M13mp18 and pUC19 vectors.** *Gene* 1985, **33**(1):103-119.
6. Gietz RD, Sugino A: **New yeast-*Escherichia coli* shuttle vectors constructed with in vitro mutagenized yeast genes lacking six-base pair restriction sites.** *Gene* 1988, **74**(2):527-534.
7. Castano I, Kaur R, Pan S, Cregg R, De Las Penas A, Guo N, Biery MC, Craig NL, Cormack BP: **Tn7-based genome-wide random insertional mutagenesis of *Candida glabrata*.** *Genome Res* 2003, **13**(5):905-915.
8. Cuellar-Cruz M, Briones-Martin-del-Campo M, Canas-Villamar I, Montalvo-Arredondo J, Riego-Ruiz L, Castano I, De Las Penas A: **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* 2008, **7**(5):814-825.
9. Castano I, Pan SJ, Zupancic M, Hennequin C, Dujon B, Cormack BP: **Telomere length control and transcriptional regulation of subtelomeric adhesins in *Candida glabrata*.** *Mol Microbiol* 2005, **55**(4):1246-1258.
10. Domergue R, Castano I, De Las Penas A, Zupancic M, Lockett V, Hebel JR, Johnson D, Cormack BP: **Nicotinic acid limitation regulates silencing of *Candida* adhesins during UTI.** *Science* 2005, **308**(5723):866-870.

**Table A3.** Cepas de *E. coli* y *C. glabrata* utilizadas en la sección 7.2 (A protosilencer is responsible for yKu70/yKu80-independent subtelomeric silencing on chromosome E-R in *Candida glabrata*).

<b><i>E. coli</i> strains</b>		Genotype	Reference
DH10B		F <sup>-</sup> <i>mcrA</i> Δ( <i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i> ) f80d <i>lacZ</i> Δ <i>M15</i> Δ <i>lacX74</i> <i>deoR</i> <i>recA1</i> <i>endA1</i> <i>araD139</i> Δ( <i>ara,leu</i> )7697 <i>galU</i> <i>galK1</i> <i>rpsL</i> <i>nupG</i>	[1]
<b>Transposon</b>			
Tn7		Tn7 R6Kg ori <i>URA3 npt</i> (Km <sup>R</sup> )	[2]
<b><i>Candida glabrata</i> strains</b>			
Strain	Parent	Genotype	
BG2		Clinical isolate	[3]
BG14	BG2	<i>ura3</i> Δ::Tn903 G418 <sup>R</sup>	[4]
Tn7 insertions at <i>EPA</i> loci			
BG684	BG14	<i>ura3</i> Δ::Tn903 G418 <sup>R</sup> Tn7 at intergenic region between <i>ISC1</i> and <i>HYR1</i> (pAP540 <i>Bcg</i> I). Insertion 1	[5]
BG646	BG14	<i>ura3</i> Δ::Tn903 G418 <sup>R</sup> Tn7 at intergenic region between <i>EPA1</i> and <i>EPA2</i> (pAP508 <i>Spe</i> I/ <i>Bcg</i> I). Insertion 2	[5]
BG833	BG14	<i>ura3</i> Δ::Tn903 G418 <sup>R</sup> Tn7 at intergenic region between <i>EPA2</i> and <i>EPA3</i> (pAP559 <i>BsrG</i> I/ <i>Sph</i> I). Insertion 3	[5]
BG432	BG14	<i>ura3</i> Δ::Tn903 G418 <sup>R</sup> Tn7 at intergenic region between <i>EPA3</i> and telomere (pAP553 <i>Pst</i> I/ <i>EcoR</i> I). Insertion 4	[5]

<b>Deletion analysis of Sil2126-URA3 reporter system at -31.9 kb</b>			
Strain	Parent	Genotype	
CGM399	BG14	<i>ura3</i> Δ::Tn903 G418 <sup>R</sup> pAP509 <i>Spe</i> I integrated between <i>ISC1</i> and <i>HYR1</i> .	[6]
CGM397	BG14	<i>ura3</i> Δ::Tn903 G418 <sup>R</sup> pAP430 <i>Spe</i> I integrated in the chromosome	[6]
CGM435	BG14	<i>ura3</i> Δ::Tn903 G418 <sup>R</sup> pAP566 <i>Spe</i> I integrated in the chromosome	This work
CGM401	BG14	<i>ura3</i> Δ::Tn903 G418 <sup>R</sup> pAP567 <i>Spe</i> I integrated in the chromosome	This work
CGM403	BG14	<i>ura3</i> Δ::Tn903 G418 <sup>R</sup> pAP568 <i>Spe</i> I integrated in the chromosome	This work
CGM405	BG14	<i>ura3</i> Δ::Tn903 G418 <sup>R</sup> pAP569 <i>Spe</i> I integrated in the chromosome	This work
CGM407	BG14	<i>ura3</i> Δ::Tn903 G418 <sup>R</sup> pAP570 <i>Spe</i> I integrated in the chromosome	This work
CGM409	BG14	<i>ura3</i> Δ::Tn903 G418 <sup>R</sup> pAP571 <i>Spe</i> I integrated in the chromosome	This work
CGM411	BG14	<i>ura3</i> Δ::Tn903 G418 <sup>R</sup> pAP572 <i>Spe</i> I integrated in the chromosome	This work
CGM437	BG14	<i>ura3</i> Δ::Tn903 G418 <sup>R</sup> pAJ1 <i>Spe</i> I integrated in the chromosome	This work
CGM438	BG14	<i>ura3</i> Δ::Tn903 G418 <sup>R</sup> pAJ2 <i>Spe</i> I integrated in the chromosome	This work
CGM984	BG14	<i>ura3</i> Δ::Tn903 G418 <sup>R</sup>	This work

		pAJ29 <i>Spe I</i> integrated in the chromosome	
CGM960	BG14	<i>ura3Δ::Tn903 G418<sup>R</sup></i> pAJ30 <i>Spe I</i> integrated in the chromosome	This work
CGM1009	BG14	<i>ura3Δ::Tn903 G418<sup>R</sup></i> PAJ31 <i>Spe I</i> integrated in the chromosome	This work
CGM1019	BG14	<i>ura3Δ::Tn903 G418<sup>R</sup></i> pAJ32 <i>Spe I</i> integrated in the chromosome	This work
CGM962	BG14	<i>ura3Δ::Tn903 G418<sup>R</sup></i> pAJ33 <i>Spe I</i> integrated in the chromosome	This work
CGM449	BG14	<i>ura3Δ::Tn903 G418<sup>R</sup></i> pAJ7 <i>Spe I</i> integrated in the chromosome	This work
CGM447	BG14	<i>ura3Δ::Tn903 G418<sup>R</sup></i> pAJ6 <i>Spe I</i> integrated in the chromosome	This work
CGM445	BG14	<i>ura3Δ::Tn903 G418<sup>R</sup></i> pAJ5 <i>Spe I</i> integrated in the chromosome	This work
CGM443	BG14	<i>ura3Δ::Tn903 G418<sup>R</sup></i> pAJ4 <i>Spe I</i> integrated in the chromosome	This work
CGM441	BG14	<i>ura3Δ::Tn903 G418<sup>R</sup></i> pAJ3 <i>Spe I</i> integrated in the chromosome	This work
CGM839	BG14	<i>ura3Δ::Tn903 G418<sup>R</sup></i> pAJ26 <i>Spe I</i> integrated in the chromosome	This work

<b>Mutants in silencing proteins</b>			
<b>Strain</b>	<b>Parent</b>	<b>Genotype</b>	<b>Reference</b>
CGM312	BG14	<i>ura3Δ::Tn903 G418<sup>R</sup></i> , <i>sir3Δ::hph</i> (pIC120/ <i>Kpn I-Hpa I</i> +T4 DNA polymerase).	[6]
CGM481	CGM312	<i>ura3Δ::Tn903 G418<sup>R</sup></i> , <i>sir3Δ::hph</i> pAP430 <i>Spe I</i> integrated between <i>ISC1</i> and <i>HYR1</i> .	[6]
CGM483	CGM312	<i>ura3Δ::Tn903 G418<sup>R</sup></i> , <i>sir3Δ::hph</i> pAP509 <i>Spe I</i> integrated between <i>ISC1</i> and <i>HYR1</i> .	[6]
CGM71 (BG1048)	BG14	<i>ura3Δ::Tn903 G418<sup>R</sup></i> , <i>sir2Δ::hph</i> (pAP596/ <i>Sac I-Kpn I</i> ).	[7]
CGM579	CGM71	<i>ura3Δ::Tn903 G418<sup>R</sup></i> , <i>sir2Δ::hph</i> pAP430 <i>Spe I</i> integrated between <i>ISC1</i> and <i>HYR1</i> .	This work
CGM571	CGM71	<i>ura3Δ::Tn903 G418<sup>R</sup></i> , <i>sir2Δ::hph</i> pAP509 <i>Spe I</i> integrated between <i>ISC1</i> and <i>HYR1</i> .	This work
BG592	BG14	<i>ura3Δ::Tn903 G418<sup>R</sup></i> , <i>rap1-21</i>	[5]
CGM587	BG592	<i>ura3Δ::Tn903 G418<sup>R</sup></i> , <i>rap1-21</i> pAP430 <i>Spe I</i> integrated between <i>ISC1</i> and <i>HYR1</i> .	This work
CGM589	BG592	<i>ura3Δ::Tn903 G418<sup>R</sup></i> , <i>rap1-21</i> pAP509 <i>Spe I</i> integrated between <i>ISC1</i> and <i>HYR1</i> .	This work
CGM314	BG14	<i>ura3Δ::Tn903 G418<sup>R</sup></i> , <i>rif1Δ::hph</i> Hyg <sup>R</sup> (pSP166 <i>Bsg I</i> ).	[6]
CGM485	CGM314	<i>ura3Δ::Tn903 G418<sup>R</sup></i> , <i>rif1Δ::hph</i> pAP430 <i>Spe I</i> integrated between <i>ISC1</i> and <i>HYR1</i> .	[6]
CGM487	CGM314	<i>ura3Δ::Tn903 G418<sup>R</sup></i> , <i>rif1Δ::hph</i> pAP509 <i>Spe I</i> integrated between <i>ISC1</i> and <i>HYR1</i> .	[6]
BG1080	BG14	<i>ura3Δ::Tn903 G418<sup>R</sup></i> , <i>hdf1Δ::hph</i> Hyg <sup>R</sup> (pAP611 <i>Bcg I</i> ).	[6]
CGM489	BG1080	<i>ura3Δ::Tn903 G418<sup>R</sup></i> , <i>hdf1Δ::hph</i> pAP430 <i>Spe I</i> integrated between <i>ISC1</i> and <i>HYR1</i> .	[6]
CGM491	BG1080	<i>ura3Δ::Tn903 G418<sup>R</sup></i> , <i>hdf1Δ::hph</i> pAP509 <i>Spe I</i> integrated between <i>ISC1</i> and <i>HYR1</i> .	[6]
CGM79 (BG1081)	BG14	<i>ura3Δ::Tn903 G418<sup>R</sup></i> , <i>hdf2Δ::hph</i> Hyg <sup>R</sup> (pAP612 <i>Bcg I</i> ).	[6]
CGM493	CGM79	<i>ura3Δ::Tn903 G418<sup>R</sup></i> , <i>hdf2Δ::hph</i> pAP430 <i>Spe I</i> integrated between <i>ISC1</i> and <i>HYR1</i> .	[6]
CGM495	CGM79	<i>ura3Δ::Tn903 G418<sup>R</sup></i> , <i>hdf2Δ::hph</i> pAP509 <i>Spe I</i> integrated between <i>ISC1</i> and <i>HYR1</i> .	[6]

<b>Sil2126-URA3 integration at different genomic loci</b>			
<b>Strain</b>	<b>Parent</b>	<b>Genotype</b>	<b>Reference</b>
CGM570	BG14	<i>ura3Δ::Tn903 G418<sup>R</sup></i>	This work

		pAJ8 <i>Mfe</i> I integrated at -160kb of centromere on chromosome F	
CGM572	BG14	<i>ura3Δ::Tn903</i> G418 <sup>R</sup> pAJ9 <i>Msc</i> I integrated at -263kb of centromere on chromosome L	This work
CGM574	BG14	<i>ura3Δ::Tn903</i> G418 <sup>R</sup> pAJ10 <i>Xho</i> I integrated at -224kb of left arm telomere on chromosome M	This work
CGM575	BG14	<i>ura3Δ::Tn903</i> G418 <sup>R</sup> pAJ19 <i>Mfe</i> I integrated at -160kb of centromere on chromosome F	This work
CGM577	BG14	<i>ura3Δ::Tn903</i> G418 <sup>R</sup> pAJ20 <i>Xho</i> I integrated at -224kb of left arm telomere on chromosome M	This work
CGM1011	BG14	<i>ura3Δ::Tn903</i> G418 <sup>R</sup> , pAJ35 <i>Mfe</i> I integrated at -34kb of telomere E <sub>L</sub>	This work
CGM1015	BG14	<i>ura3Δ::Tn903</i> G418 <sup>R</sup> , pAJ40 <i>Mfe</i> I integrated at -34kb of telomere E <sub>L</sub>	This work
CGM1027	BG14	<i>ura3Δ::Tn903</i> G418 <sup>R</sup> , pAJ34 <i>Cla</i> I integrated at -50kb of telomere E <sub>R</sub>	This work
CGM1013	BG14	<i>ura3Δ::Tn903</i> G418 <sup>R</sup> , pAJ39 <i>Cla</i> I integrated at -50kb of telomere E <sub>R</sub>	This work

<b><i>hdf1Δ</i>, <i>hdf2Δ</i>, <i>sil2126Δ</i> mutants in <i>URA3</i> reporter strains</b>			
Strain	Parent	Genotype	Reference
CGM399	BG14	<i>ura3Δ::Tn903</i> G418 <sup>R</sup> pAP509 <i>Spe</i> I integrated between <i>ISC1</i> and <i>HYR1</i> .	[6]
BG646	BG14	<i>ura3Δ::Tn903</i> G418 <sup>R</sup> Tn7 at intergenic region between <i>EPA1</i> and <i>EPA2</i> (pAP508 <i>Spe</i> I/ <i>Bcg</i> I). Insertion 2	[5]
BG833	BG14	<i>ura3Δ::Tn903</i> G418 <sup>R</sup> Tn7 at intergenic region between <i>EPA2</i> and <i>EPA3</i> (pAP559 <i>BsrG</i> I/ <i>Sph</i> I). Insertion 3	[5]
BG432	BG14	<i>ura3Δ::Tn903</i> G418 <sup>R</sup> Tn7 at intergenic region between <i>EPA3</i> and telomere (pAP553 <i>Pst</i> I/ <i>EcoR</i> I). Insertion 4	[5]
CGM903	CGM399	<i>sil2126Δ</i> , pAJ25- <i>Bcg</i> I <i>hyg</i> <sup>S</sup> <i>ura3Δ::Tn903</i> G418 <sup>R</sup> pAP509 <i>Spe</i> I integrated between <i>ISC1</i> and <i>HYR1</i> .	This work
CGM890	CGM399	<i>hdf1Δ::FRT</i> <i>ura3Δ::Tn903</i> G418 <sup>R</sup> pAP509 <i>Spe</i> I integrated between <i>ISC1</i> and <i>HYR1</i> .	This work
CGM897	CGM399	<i>hdf2Δ::FRT</i> <i>ura3Δ::Tn903</i> G418 <sup>R</sup> pAP509 <i>Spe</i> I integrated between <i>ISC1</i> and <i>HYR1</i> .	This work
CGM1043	CGM399	<i>sil2126Δ</i> , <i>hdf1Δ::FRT</i> <i>ura3Δ::Tn903</i> G418 <sup>R</sup> pAP509 <i>Spe</i> I integrated between <i>ISC1</i> and <i>HYR1</i> .	This work
CGM1051	CGM399	<i>Sil2126Δ</i> , <i>hdf2Δ::FRT</i> <i>ura3Δ::Tn903</i> G418 <sup>R</sup> pAP509 <i>Spe</i> I integrated between <i>ISC1</i> and <i>HYR1</i> .	This work
CGM899	BG646	<i>sil2126Δ</i> , pAJ25- <i>Bcg</i> I <i>ura3Δ::Tn903</i> G418 <sup>R</sup> <i>hdf1Δ</i> Tn7 at intergenic region between <i>EPA1</i> and <i>EPA2</i>	This work
CGM885	BG646	<i>ura3Δ::Tn903</i> G418 <sup>R</sup> <i>hdf1Δ</i> Tn7 at intergenic region between <i>EPA1</i> and <i>EPA2</i>	This work
CGM892	BG646	<i>ura3Δ::Tn903</i> G418 <sup>R</sup> <i>hdf2Δ</i> Tn7 at intergenic region between <i>EPA1</i> and <i>EPA2</i>	This work
CGM1045	BG646	<i>ura3Δ::Tn903</i> G418 <sup>R</sup> <i>sil2126Δ</i> , <i>hdf1Δ::FRT</i> Tn7 at intergenic region between <i>EPA1</i> and <i>EPA2</i>	This work
CGM1053	BG646	<i>ura3Δ::Tn903</i> G418 <sup>R</sup> <i>sil2126Δ</i> , <i>hdf2Δ::FRT</i>	This work



		Tn7 at intergenic region between <i>EPA1</i> and <i>EPA2</i>	
CGM900	BG833	<i>sil2126Δ</i> . pAJ25-Bcg I <i>ura3Δ::Tn903 G418<sup>R</sup> hdf1Δ</i> Tn7 at intergenic region between <i>EPA2</i> and <i>EPA3</i>	This work
CGM888	BG833	<i>ura3Δ::Tn903 G418<sup>R</sup> hdf1Δ</i> Tn7 at intergenic region between <i>EPA2</i> and <i>EPA3</i>	This work
CGM894	BG833	<i>ura3Δ::Tn903 G418<sup>R</sup> hdf2Δ</i> Tn7 at intergenic region between <i>EPA2</i> and <i>EPA3</i>	This work
CGM1047	BG833	<i>ura3Δ::Tn903 G418<sup>R</sup> sil2126Δ, hdf1Δ::FRT</i> Tn7 at intergenic region between <i>EPA2</i> and <i>EPA3</i>	This work
CGM1055	BG833	<i>ura3Δ::Tn903 G418<sup>R</sup> sil2126Δ, hdf2Δ::FRT</i> Tn7 at intergenic region between <i>EPA2</i> and <i>EPA3</i>	This work
CGM901	BG432	<i>sil2126Δ</i> . pAJ25-Bcg I <i>ura3Δ::Tn903 G418<sup>R</sup></i> Tn7 at intergenic region between <i>EPA3</i> and telomere	This work
CGM1213	BG432	<i>ura3Δ::Tn903 G418<sup>R</sup> hdf1Δ</i> Tn7 at intergenic region between <i>EPA3</i> and telomere	This work
CGM895	BG432	<i>ura3Δ::Tn903 G418<sup>R</sup> hdf2Δ</i> Tn7 at intergenic region between <i>EPA3</i> and telomere	This work
CGM1049	BG432	<i>ura3Δ::Tn903 G418<sup>R</sup> sil2126Δ, hdf1Δ</i> Tn7 at intergenic region between <i>EPA3</i> and telomere	This work
CGM1057	BG432	<i>ura3Δ::Tn903 G418<sup>R</sup> sil2126Δ, hdf2Δ</i> Tn7 at intergenic region between <i>EPA3</i> and telomere	This work

Insertion of <i>P<sub>PGK1</sub></i> promoter at the subtelomere E-R			
Strain	Parent	Genotype	Reference
CGM687	BG646	<i>silΔ::(FRT-P<sub>PGK1</sub>::hph::3'UTR<sub>HIS3</sub>-FRT)</i> <i>ura3Δ::Tn903 G418<sup>R</sup></i> Tn7 at intergenic region between <i>EPA1</i> and <i>EPA2</i>	This work
CGM689	BG833	<i>silΔ::(FRT-P<sub>PGK1</sub>::hph::3'UTR<sub>HIS3</sub>-FRT)</i> <i>ura3Δ::Tn903 G418<sup>R</sup></i> Tn7 at intergenic region between <i>EPA2</i> and <i>EPA3</i>	This work
CGM691	BG432	<i>silΔ::(FRT-P<sub>PGK1</sub>::hph::3'UTR<sub>HIS3</sub>-FRT)</i> <i>ura3Δ::Tn903 G418<sup>R</sup></i> Tn7 at intergenic region between <i>EPA3</i> and telomere	This work
CGM693	CGM399	<i>silΔ::(FRT-P<sub>PGK1</sub>::hph::3'UTR<sub>HIS3</sub>-FRT)</i> <i>ura3Δ::Tn903 G418<sup>R</sup></i> pAP509 <i>Spe</i> I integrated between <i>ISC1</i> and <i>HYR1</i> .	This work

<i>EPA3</i> RT-PCR strains			
Strain	Parent	Genotype	Reference
BG14	BG2	<i>ura3Δ::Tn903 G418<sup>R</sup></i>	[4]
BG676	BG14	<i>ura3Δ::Tn903 G418<sup>R</sup> sir3Δ</i>	[5]
CGM686	BG14	<i>ura3Δ::Tn903 G418<sup>R</sup> (pAJ25-Bcg I)</i> <i>silΔ::(P<sub>PGK1</sub>::hph::3'UTR<sub>HIS3</sub>::FRT)</i>	This work
CGM743	BG686	<i>ura3Δ::Tn903 G418<sup>R</sup> silΔ</i>	This work
CGM709	BG14	<i>ura3Δ::Tn903 G418<sup>R</sup> hdf1Δ</i>	This work
CGM710	BG14	<i>ura3Δ::Tn903 G418<sup>R</sup> hdf2Δ</i> colony 4	This work
CGM711	BG14	<i>ura3Δ::Tn903 G418<sup>R</sup> hdf2Δ</i> colony 8	This work
CGM792	CGM710	<i>ura3Δ::Tn903 G418<sup>R</sup> hdf1Δ/ hdf2Δ</i>	This work
CGM1052	BG14	<i>ura3Δ::Tn903 G418<sup>R</sup> hdf2Δ/ silΔ</i>	This work

Strains to study properties of <i>Sil2126-URA3</i> at -31.9 kb of telomere			
Strain	Parent	Genotype	Reference
CGM685	BG14	<i>ura3Δ::Tn903 G418<sup>R</sup></i> pAJ25/Bcg I -- <i>silΔ::(P<sub>PGK1</sub>::hph::3'UTR<sub>HIS3</sub>::FRT)</i>	This work
CGM742	CGM685	<i>ura3Δ::Tn903 G418<sup>R</sup></i> <i>silΔ::FRT</i>	This work
CGM815	CGM685	<i>ura3Δ::Tn903 G418<sup>R</sup></i> <i>silΔ::(P<sub>PGK1</sub>::hph::3'UTR<sub>HIS3</sub>::FRT)</i> pAP430/ <i>Spe</i> I integrated between <i>ISC1</i> and <i>HYR1</i>	This work

CGM817	CGM742	<i>ura3Δ::Tn903 G418<sup>R</sup></i> <i>silΔ::FRT</i> pAP430/Spe I integrated between <i>ISC1</i> and <i>HYR1</i>	This work
CGM1077	BG14	<i>ura3Δ::Tn903 G418<sup>R</sup></i> pAJ41/SpeI integrated between <i>ISC1</i> and <i>HYR1</i>	This work
CGM1300	BG14	<i>ura3Δ::Tn903 G418<sup>R</sup></i> pAJ47/SpeI integrated between <i>ISC1</i> and <i>HYR1</i>	This work

1. Calvin NM, Hanawalt PC: **High-efficiency transformation of bacterial cells by electroporation.** *J Bacteriol* 1988, **170**(6):2796-2801.
2. Castano I, Kaur R, Pan S, Cregg R, Penas Ade L, Guo N, Biery MC, Craig NL, Cormack BP: **Tn7-based genome-wide random insertional mutagenesis of *Candida glabrata*.** *Genome Res* 2003, **13**(5):905-915.
3. Fidel PL, Jr., Cutright JL, Tait L, Sobel JD: **A murine model of *Candida glabrata* vaginitis.** *J Infect Dis* 1996, **173**(2):425-431.
4. Cormack BP, Falkow S: **Efficient homologous and illegitimate recombination in the opportunistic yeast pathogen *Candida glabrata*.** *Genetics* 1999, **151**(3):979-987.
5. De Las Penas A, Pan SJ, Castano I, Alder J, Cregg R, Cormack BP: **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* 2003, **17**(18):2245-2258.
6. Rosas-Hernandez LL, Juárez-Reyes A, Arroyo-Helguera OE, De Las Penas A, Pan SJ, Cormack BP, Castano I: **yKu70/yKu80 and Rif1 regulate silencing differentially at telomeres in *Candida glabrata*.** *Eukaryot Cell* 2008, **7**(12):2168-2178.
7. Domergue R, Castano I, De Las Penas A, Zupancic M, Lockett V, Hebel JR, Johnson D, Cormack BP: **Nicotinic acid limitation regulates silencing of *Candida* adhesins during UTI.** *Science* 2005, **308**(5723):866-870.

**Tabla A4.** Plásmidos utilizados en la sección 7.2 (A protosilencer is responsible for yKu70/yKu80-independent subtelomeric silencing on chromosome E-R in *Candida glabrata*).

Plasmid	Relevant genotype	Reference
<b>Cloning or marker removal vectors</b>		
pGRB2.0	Cloning replicative vector <i>URA3</i> Ap <sup>R</sup> pRS406:: <i>C.g. CEN ARS</i>	[5]
pYIplac211	Cloning, integrative vector <i>URA3</i> Ap <sup>R</sup>	[8]
pGEM-T	Cloning vector, Amp <sup>R</sup>	Promega
pAP599	Cloning, integrative vector with 2 FRT direct repeats flanking a hygromycin resistance cassette [FRT- <i>P<sub>PGK1</sub>::hph::3'UTR<sub>HIS3</sub></i> -FRT] for construction of multiple rounds of knock-out mutants, Amp <sup>R</sup> , Hyg <sup>R</sup> , <i>URA3</i>	[7]
pMZ18	Replicative vector expressing <i>ScFLP1</i> (recombinase gene) for removing the hygromycin marker, <i>P<sub>EPA1</sub>::FLP1::(3' UTR of HIS3)</i> <i>Cg CEN ARS</i> , Amp <sup>R</sup> , <i>URA3</i>	Cormack lab collection
pLS9	Replicative vector expressing <i>ScFLP1</i> (recombinase gene) for removing the hygromycin marker, <i>P<sub>EPA1</sub>::FLP1::(3' UTR of HIS3)</i> <i>Cg CEN ARS</i> , Amp <sup>R</sup> , <i>URA3</i> , <i>nat1</i>	Lab collection
<b>Plasmids for Tn7 (<i>URA3</i>) insertions at <i>EPA</i> loci</b>		
pAP540 Insertion 1	A 1.241kb <i>Bam</i> H I PCR fragment carrying a Tn7 in the intergenic region between <i>ISC1</i> and <i>HYR1</i> cloned into pAP502. Insertion 1	[5]
pAP508 Insertion 2	A 1.6 kb <i>Hind</i> III PCR fragment carrying a Tn7 in the intergenic region between <i>EPA1</i> and <i>EPA2</i> cloned into pBR322. Insertion 2	[5]
pAP559 Insertion 3	A 2.9 kb <i>Eco</i> R I fragment carrying a Tn7 in the intergenic region between <i>EPA2</i> and <i>EPA3</i> cloned into pUC19. Insertion 3	[5]
pAP553 Insertion 4	A 3.2 kb <i>Hind</i> III / <i>Eco</i> R I fragment carrying a Tn7 in the intergenic region between <i>EPA3</i> and telomere cloned into pUC19. Insertion 4	[5]
<b>Plasmids for protosilencer integration at -31.9 kb of telomere E-R</b>		
<b>pAP430</b>	Plasmid to integrate the protosilencer Sil2126 and <i>URA3</i> at the intergenic region between <i>C.g. ISC1</i> and <i>C.g. HYR1</i> . Cloned into pYIplac211. Ap <sup>R</sup>	[5]
pAP509	Vector to integrate <i>URA3</i> at the intergenic region between <i>C.g. ISC1</i> and <i>C.g. HYR1</i> . A 0.686 kb <i>Pst</i> I- <i>Sal</i> I PCR fragment (Primers #962, #963) carrying the intergenic region between <i>C.g. ISC1</i> cloned into pYIplac211. Amp <sup>R</sup>	[6]
<b>Plasmids for protosilencer deletion analysis at -31.9 kb of telomere E-R</b>		
pAP566	A 316pb deletion (nucleotide 1810 to 2126) from the 3' end of Sil2126 in pAP430	This work
pAP567	A 885pb deletion (nucleotide 1241 to 2126) from the 3' end of Sil2126 in pAP430	This work
pAP568	A 1260pb deletion (nucleotide 866 to 2126) from the 3' end of Sil2126 in pAP430	This work
pAP569	A 1432pb deletion (nucleotide 694 to 2126) from the 3' end of sil2126 in pAP430	This work
pAP570	A 1710pb deletion (nucleotide 416 to 2126) from the 3' end of Sil2126 in pAP430	This work
pAP571	A 1792pb deletion (nucleotide 334 to 2126) from the 3' end of Sil2126 in pAP430	This work

pAP572	A 2020 deletion (nucleotide 106 to 2126) from the 3' end of Sil2126 in pAP430	This work
pAJ29	A 39pb deletion from the 5' end of Sil2126 (nucleotides 1-39) in pAP430.	This work
pAJ30	A 68pb deletion from the 5' end of Sil2126 (nucleotides 1-68) in pAP430	This work
pAJ31	A 115pb deletion from the 5' end of Sil2126 (nucleotides 1-115) in pAP430	This work
pAJ32	A 160pb deletion from the 5' end of Sil2126 (nucleotides 1-160) in pAP430	This work
pAJ33	A 204pb deletion from the 5' end of Sil2126 (nucleotides 1-204) in pAP430	This work
pAJ7	A 262pb deletion from the 5' end of Sil2126 (nucleotides 1-262) in pAP430	This work
pAJ6	A 462pb deletion from the 5' end of Sil2126 (nucleotides 1-462) in pAP430	This work
pAJ5	A 738pb deletion from the 5' end of Sil2126 (nucleotides 1-738) in pAP430	This work
pAJ4	A 1288pb deletion from the 5' end of Sil2126 (nucleotides 1-1288) in pAP430	This work
pAJ3	A 1622 deletion from the 5' end of Sil2126 (nucleotides 1-1622) in pAP430	This work
pAJ2	An internal deletion of 907pb from nucleotide 334 to 1241 of Sil2126 in pAP430	This work
pAJ1	An internal fragment of 907pb from nucleotide 334 to 1241 of Sil2126 replacing Sil2126 in pAP430	This work
pAJ26	A 3430 PCR fragment containing the entire Sil2126 and the remaining 1304pb next to 5' of this region to the ATG of the contiguous gene EPA3, cloned in pAP430 BamHI-Sall sites	This work

**Plasmids for protosilencer integration at internal locations on chromosomes F,L,M**

pAJ8	Vector to integrate Sil2126-URA3 at 160kb from centromere of chromosome F. A 789pb <i>PstI-SalI</i> PCR fragment (Primers #252,#253) of an intergenic region of chromosome F, replacing <i>Pst I-Sal I</i> integration sequence of pAP430. Amp <sup>R</sup>	This work
pAJ9	Vector to integrate Sil2126-URA3 at 263kb from centromere of chromosome L. A 628pb <i>PstI-SalI</i> PCR fragment (Primers #254,#255) of an intergenic region of chromosome L, replacing <i>Pst I-Sal I</i> integration sequence of pAP430. Amp <sup>R</sup>	This work
pAJ10	Vector to integrate Sil2126-URA3 at 224kb from left arm of telomere on chromosome M. A 556pb <i>PstI-SalI</i> PCR fragment (Primers #256,#257) of an intergenic region of chromosome M, replacing <i>Pst I-Sal I</i> integration sequence of pAP430. Amp <sup>R</sup>	This work
pAJ19	A deletion of Sil2126 protosilencer region from pAJ8. sil-control, AmpR	This work
pAJ20	A deletion of Sil2126 protosilencer region from pAJ10. sil-control, AmpR	This work

***hdf1Δ::hph* and *hdf2Δ::hph***

pAJ27	<i>HDF1</i> deletion vector. A 804pb <i>KpnI HindIII HDF1 5'</i> fragment and a 826pb <i>SacI-BglII HDF1 3'</i> fragment, cloned into pAP599 at both sides of <i>hph</i> marker	This work
pAJ28	<i>HDF2</i> deletion vector. A 905pb <i>KpnI HindIII 5' HDF1</i> fragment and a 813pb <i>SacI-BglII 3' HDF1</i> fragment, non-coding regions cloned into pAP599 on either side of <i>hph</i> marker	This work

Plasmid for deletion of Sil2126 region		
pAJ25	Sil2126 deletion vector. A 1025pb KpnI-XhoI fragment (Primers #339, #340) and a 935pb BamHI-SacI fragment (Primers #337, #338), cloned into pAP599 on either side of <i>hph</i> marker	This work
Plasmids to study location and orientation properties of Sil2126		
pAJ34	Vector to integrate Sil2126- <i>URA3</i> reporter system at 50Kb from telomere E <sub>-R</sub> . A 742pb <i>Pst</i> I- <i>Sal</i> I PCR fragment (Primers #654, #655), replacing <i>Pst</i> I- <i>Sal</i> I integration sequence in pAP430	This work
pAJ35	Vector to integrate Sil2126- <i>URA3</i> reporter system at ~ 34Kb from telomere E <sub>-L</sub> . A 622 <i>Pst</i> I- <i>Sal</i> I PCR fragment (Primers #658, #659), replacing <i>Pst</i> I- <i>Sal</i> I integration sequence in pAP430.	This work
pAJ39	A <i>Bam</i> H I- <i>Sal</i> I deletion on pAJ34 which eliminates Sil2126. Amp <sup>R</sup>	This work
pAJ40	A <i>Bam</i> H I- <i>Sal</i> I deletion on pAJ35 which eliminates Sil2126. Amp <sup>R</sup>	This work
pAJ41	Plasmid to integrate the protosilencer Sil2126 and <i>URA3</i> at the intergenic region between <i>C.g. ISC1</i> and <i>C.g. HYR1</i> . A Sil2126 inverted orientation respect to <i>URA3</i> on pAP430	This work
pAJ47	Plasmid to integrate the protosilencer Sil2126 and <i>URA3</i> at the intergenic region between <i>C.g. ISC1</i> and <i>C.g. HYR1</i> . The (Sil2126- <i>URA3</i> ) cassette is in inverted orientation with respect to pAP430	This work
pAJ49	Plasmid to integrate the protosilencer Sil2126 and <i>URA3</i> at ~ 34Kb from telomere E <sub>-L</sub> . The (Sil2126- <i>URA3</i> ) cassette is in inverted orientation with respect to pAJ35	This work

1. Calvin NM, Hanawalt PC: **High-efficiency transformation of bacterial cells by electroporation.** *J Bacteriol* 1988, **170**(6):2796-2801.
2. Castano I, Kaur R, Pan S, Cregg R, Penas Ade L, Guo N, Biery MC, Craig NL, Cormack BP: **Tn7-based genome-wide random insertional mutagenesis of *Candida glabrata*.** *Genome Res* 2003, **13**(5):905-915.
3. Fidel PL, Jr., Cutright JL, Tait L, Sobel JD: **A murine model of *Candida glabrata* vaginitis.** *J Infect Dis* 1996, **173**(2):425-431.
4. Cormack BP, Falkow S: **Efficient homologous and illegitimate recombination in the opportunistic yeast pathogen *Candida glabrata*.** *Genetics* 1999, **151**(3):979-987.
5. De Las Penas A, Pan SJ, Castano I, Alder J, Cregg R, Cormack BP: **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* 2003, **17**(18):2245-2258.
6. Rosas-Hernandez LL, Juárez-Reyes A, Arroyo-Helguera OE, De Las Penas A, Pan SJ, Cormack BP, Castano I: **yKu70/yKu80 and Rif1 regulate silencing differentially at telomeres in *Candida glabrata*.** *Eukaryot Cell* 2008, **7**(12):2168-2178.
7. Domergue R, Castano I, De Las Penas A, Zupancic M, Lockatell V, Hebel JR, Johnson D, Cormack BP: **Nicotinic acid limitation regulates silencing of *Candida* adhesins during UTI.** *Science* 2005, **308**(5723):866-870.
8. Gietz RD, Sugino A: **New yeast-*Escherichia coli* shuttle vectors constructed with in vitro mutagenized yeast genes lacking six-base pair restriction sites.** *Gene* 1988, **74**(2):527-534.

**Tabla A5.** Oligonucleótidos utilizados en la sección 7.2 (A protosilencer is responsible for yKu70/yKu80-independent subtelomeric silencing on chromosome E-R in *Candida glabrata*).

Primer	Name	Sequence (5'-3')	Site(s) added
<b>Primers used to construct vectors with progressive 5' deletions of Sil2126</b>			
237	EPA3@-1609 Sal Fw	CGCGT <b>CGAC</b> GCTTTTCTCTCAAGAGGGTGC	<i>Sal</i> I
238	EPA3@-1808 Sal Fw	AGT <b>GTCGAC</b> GACACTTGTAACAGATATTGG	<i>Sal</i> I
239	EPA3@-2086 Sal Fw	AGT <b>GTCGAC</b> CATCCAACAAGTCTTTTACCG	<i>Sal</i> I
240	EPA3@-2967 Sal Fw	CTAG <b>TTCGAC</b> GAAATCGAAGATGAAAGACC	<i>Sal</i> I
241	EPA3@-2575 Sal Fw	TGAG <b>TTCGAC</b> GTATCACTGTACAAAGTAACC	<i>Sal</i> I
564	EPA3@-1544 Sall Fw	TAG <b>GTCGAC</b> CCCTTAATATCACTTTCAACG	<i>Sal</i> I
565	EPA3@-1500 Sall Fw	GTA <b>GTCGAC</b> CTGGATGACAAAATACACCCC	<i>Sal</i> I
566	EPA3@-1455 Sall Fw	GCG <b>GTCGAC</b> ATAAGAAAAACAACCTTTTACC	<i>Sal</i> I
567	EPA3@-1408 Sall Fw	TCAG <b>TTCGAC</b> CAAAAATATACATTTCTCCCC	<i>Sal</i> I
568	EPA3@-1379 Sall Fw	CTC <b>GTCGAC</b> TAGATTGCTGAAATATTCTGG	<i>Sal</i> I
297	EPA3@-36Sal Fw	GAC <b>GTCGAC</b> ATTTAATTTCGATTATGATGGG	<i>Sal</i> I
964	EPA3@-1340 Fw	AGAATAG <b>TTCGAC</b> TGTTGCAGCAAGAACCA	<i>Sal</i> I
236	EPA3@-3466 BamHI Rv	AGT <b>GGATCC</b> ATAGATGCATGTAGCCATATC	<i>Bam</i> HI
<b>Primers to diagnose integration of these vectors at -31.9 kb from telomere E-R in <i>C. glabrata</i></b>			
13	Primer 13	GGCGATTAAGTTGGGTAACGCCAGGG	
14	Primer 14	TATGTTGTGTGGAATTGTGAGCGGA	
187	ISC1 @ 1232Fw	GGTCTGAAATCAGAGCATTATGGGAGG	
188	HYR1 @ -301Rv	GCATCAAATAATGGATAGGTTGAAATCCCC	
<b>Primers used to construct integrative vectors for (Sil2126-URA3) at chromosome F, L, M loci</b>			
252	IR Chr F Fw@399784 Pst	CGC <b>TTCGAC</b> GATAAACCTTCTTGAACCCTGCCA GC	<i>Pst</i> I
253	IR Chr F Rv@400572 Sal	CGCG <b>TTCGAC</b> TCAATCATCATCACCAATACGA GC	<i>Sal</i> I
254	IR Chr L Fw@686898 Pst	CGC <b>TTCGAC</b> ACATGTCTCCCTGCTAAGGTAT CC	<i>Pst</i> I
255	IR Chr L Rv@687525 Sal	CGCG <b>TTCGAC</b> AGTGGAGGATCAAGAGTAGAT TGG	<i>Sal</i> I
256	IR Chr M Fw@224158 Pst	CGC <b>TTCGAC</b> AGAGACTGTCTGTACAAATAGC GG	<i>Pst</i> I
257	IR Chr M Rv@224713 Sal	CGCG <b>TTCGAC</b> AATATCTGTTGCCGTTTGTGCA GG	<i>Sal</i> I
<b>Primers to diagnose integration of these vectors at -31.9 kb from telomere E-R</b>			
258	IR Chr F Fw@399593	GTA <b>ACTGGTAC</b> ATTATAATAGGAGCGGG	
259	IR Chr F Rv@400657	CGTGT <b>TTTTGGTAT</b> CGCATATTTCCC	
260	IR Chr L Fw@686777	CAACGGGAGGAATATTTGCTCAGGTGC	
261	IR Chr L Rv@687711	TTAAGGACATGCGCGTAAACATGGG	
262	IR Chr M Fw@223971	CCCTCTCTCTCTCTCTCTCTTTGTCCC	
263	IR Chr M Rv@224884	TGACTACCATGTTTCCTTTGCCAGC	
<b>Primers used to construct Sil2126 deletion vector</b>			
337	EPA3@-3460 Sac Bcg Rev	GGGGAGCTCGTT <b>CGAT</b> ATAAGT <b>GCGCAT</b> GT AGCCATATCTGTGAGAGAG	<i>Sac</i> I, <i>Bcg</i> I
338	EPA3@-2575 Bam Fwd	GGGG <b>GATCC</b> GTACAAAGTAACCACTTTTAAG ATGCC	<i>Bam</i> HI
339	EPA3@977 Kpn Bcg Fwd	GGCG <b>GTACCTTCGAC</b> TTGGTT <b>GCGG</b> ATAGT AGCATGATTTTTCAATGG	<i>Kpn</i> I, <i>Bcg</i> I
340	EPA3@-4 Xho Rev	GCG <b>TTCGAC</b> CAATATGTTCAACTGGATTATC GTATG	<i>Xho</i> I
<b>Primers for diagnosis of integration of this vector in <i>C. glabrata</i></b>			
342	Diag EPA3@1014 Rv	CAGGTTTTGGGTCCTCAGGTTTTGG	

343	Diag EPA3@-3528 fw	GTGTAATGATAGCCAGTACTAGTG	
<b>Primers used to construct integrative vector containing <i>PGK1</i> promoter driven <i>hph</i> between <i>Sil2126</i> and <i>Telomere E-R</i></b>			
648	EPA3@-3493 KpnI Bcgl Fw	GGCGGTACCCGACTTGGTTGCAACACTAAG AAACACTAGTACTGGC	<i>Kpn I, Bcgl</i>
649	EPA3@-4158 XhoI Rv	GCGCTCGAGTTCCATTTTCGACAATGAGGAT GCG	<i>Xho I</i>
650	EPA3@-4361 BamHI Fw	GGGGGATCCGCACAAGAACTCCAATTCAGG TCTTGG	<i>BamHI</i>
651	EPA3@-4930 SacI Bcgl Rv	TAGGAGCTCCGATATAAGTGCGAACTTGTCC ACGGCATTGTTTCC	<i>Sac I, Bcgl</i>
<b>Primers for diagnosis of integration of this vector in <i>C. glabrata</i></b>			
652	Diag 3' EPA3@-4962 Rv	CCCTAAACGAGAAAATCTTAAACG	
653	Diag 5' EPA3@-3436 Fw	CTCTCTCACAGATATGGCTACATGC	
<b>Primers used to construct <i>Sil2126-URA3</i> integrative vector at -34kb in chromosome E-L</b>			
658	OCA4@-112 Pst I Fw	agactgcagAGGGCGATCATTATTAATCGAGTC C	
659	OCA4@510 Sall Rv	cgagtcgacTTACCAAAGAAGTTTTGTCCACAAG C	
<b>Primers for diagnosis of integration of this vector in <i>C. glabrata</i></b>			
660	Diag 5' OCA4@-162 Fw	GTGACGGTTGCTTACCCATAGCGTGC	
661	Diag 3' OCA4@740 Rv	TTCAACGGGATTCGACTTGTGTTCG	
<b>Primers used to construct <i>Sil2126-URA3</i> integrative vector at -50 kb of chromosome E-R</b>			
654	ELF1@-2291 Sall Rv	gtagtcgacTTGAAAGAGTACTGTCCCATCTTCC	
655	ELF1@-1549 PstI Fw	agactgcagTGTACGTTTACAGCACCTTAAAGC	
<b>Primers for diagnosis of integration of this vector in <i>C. glabrata</i></b>			
656	Diag ELF1@-1376 Fw	GCTTAGAAGTTGATTGTTCAATTGCC	
657	Diag ELF1@-2339 Rv	GACCCGGTTTGTAACACACAGACC	
<b>EPA RT-PCR primers</b>			
219	ACT1Fw@70 RT	CGCCGGTGACGATGCTCC	
220	ACT1Rv@210 RT	CTTGGATTGAGCTTCGTC	
38	EPA3 RT-PCR Fw	GCATGTTGATAGTTCCAAAA	
24	EPA3 RT-PCR Rev	TAATTTGATCAGTAGCACCG	
37	EPA2 RT-PCR Fw	GGGATCAGATTATGCAAAAAG	
23	EPA2 RT-PCR Rev	GAATGATTTCTTATTAAT	
36	EPA1 RT-PCR Fw	GGGCTCAAAAACAGCTAAAG	
22	EPA1 RT-PCR Rev	TAACAGTGTTCGTTTGAT	
<b>Primers to diagnose <i>hdf1Δ</i> and <i>hdf2Δ</i></b>			
2242	HDF1@-1034Fw	AGCGAGGTACGAAGATATAGAACGC	
2243	HDF1@+971 Rev	CCCGTACTACAACATAACAATGCAGCT	
2248	HDF2@-1148 Fw	AGCCGCTGTATCGGGATCAAC	
2249	HDF2@+988 Rev	CGCACAACAAGAACAGCACCCCTTGG	
<b>Primers to diagnose (<i>P<sub>PGK1</sub>::hph::FRT</i>) cassette deletion</b>			
325	PGKp RI Rv	GGGAATTCTGTTTTATATTTGTTGTA AAAAGT AG	
326	PGKp Sac Fw	GGGGAGCTCCATAAAGCACGTGGCCTCTTAT CG	