



TESIS DOCTORAL

Papel de genes de recombinación homóloga en  
la estabilidad genómica y reparación de daño al  
DNA en *Candida albicans*

**Alberto Bellido Díaz**

Dpto. Anatomía, Biología Celular y Zoología

2015





TESIS DOCTORAL

Papel de genes de recombinación homóloga en  
la estabilidad genómica y reparación de daño al  
DNA en *Candida albicans*

**Alberto Bellido Díaz**

Dpto. Anatomía, Biología Celular y Zoología

Conformidad de los directores:

Fdo: Germán Larriba Calle

No firma por defunción

Fdo: Encarnación Andaluz López

2015





**DEPARTAMENTO DE CIENCIAS BIOMÉDICAS**

**ÁREA DE MICROBIOLOGÍA  
FACULTAD DE CIENCIAS**

Edificio de Biológicas, 2ª planta  
Avda. Elvas s/n  
06006 Badajoz  
Teléfono: +34 924 28 94 28

El **Dr. Germán Larriba Calle** y la **Dra. María Encarnación Andaluz López**,  
Catedráticos de Microbiología del Departamento de Ciencias Biomédicas de la  
Universidad de Extremadura

**CERTIFICAN:**

Que la Tesis Doctoral titulada: “Papel de genes de recombinación homóloga en la estabilidad genómica y reparación de daño al DNA en *Candida albicans*”, presentada por **D. Alberto Bellido Díaz**, para optar al grado de Doctor en Biología ha sido realizada bajo nuestra dirección en el Departamento de Ciencias Biomédicas de la Universidad de Extremadura.

Y para que así conste, expedimos y firmamos la presente certificación en Badajoz a 13 de Julio de 2015.

No firma por defunción

Fdo.: Dr. Germán Larriba Calle

Catedrático de Microbiología  
Director del trabajo

Fdo.: Dra. María Encarnación Andaluz López

Catedrática de Microbiología  
Directora del trabajo



Este trabajo ha sido financiado por los siguientes proyectos:

MEC Biomedicina SAF2007-60810, del Ministerio de Educación y Ciencia, titulado “Inestabilidad genética en *Candida albicans*: búsqueda de genes implicados en la generación/pérdida de heterozigosidad y longitud de los telómeros, y efecto de su delección en la biología y virulencia”, concedido al Dr. Germán Larriba Calle.

Ayuda a grupos de la Junta de Extremadura.

Durante la realización del trabajo me fue concedida una beca predoctoral FPI (PRE – 08054) de la Junta de Extremadura.







## **Agradecimientos**

Quisiera expresar mi más sincero agradecimiento a todos aquellos que de alguna forma han contribuido a realizar este trabajo.

A mis directores de Tesis. Al Dr. Germán Larriba Calle, Catedrático de Microbiología y Director de nuestro grupo de investigación RECA, por permitirme formar parte de su equipo y por su inestimable colaboración en mi formación en este Departamento y por todas las facilidades puestas a mi disposición a lo largo de la realización de esta Tesis Doctoral. A la Dra. Encarnación Andaluz López, Catedrática de Microbiología, por enseñarme tanto durante todos los años que duró mi formación y por su implicación directa en muchos de los experimentos (cariotipados, tratamientos de agentes que dañan el DNA) presentados en este trabajo.

A la Dra. Rosario Cueva Noval, por la ayuda mostrada; a la Dra. Antonia Ciudad Sánchez, por estar siempre dispuesta a responder todas mis dudas y por sus buenos consejos y aportaciones durante todos estos años.

A Belén Hermosa González, técnica de nuestro laboratorio, por estar siempre a mi lado, apoyándome y ayudándome cada día en mi trabajo.

Al Dr. Jonathan Gómez Raja por iniciarme en el trabajo de laboratorio en mis primeros años y por las largas charlas y buenos consejos. A la Lcda. Belén Naranjo Carrasco por ser tan buena compañera de trabajo. A Leocadia Franco, antigua técnico de nuestro laboratorio, por facilitarme el trabajo durante mis primeros años.

A mis abuelos y especialmente a mis Padres y mi Hermana por saber entenderme, comprenderme y apoyarme cuando tomé la decisión de empezar esta carrera, gracias a ellos he podido llegar hasta donde me encuentro hoy.

A todos mis amigos, Miguel, David, Eusebio, Maribel, Belén Mendoza (Área de Genética), Fede, Janio, que han sabido escucharme siempre que lo he necesitado y me han prestado su ayuda en momentos importantes de este trabajo. Su apoyo constante, su trato amable y su disponibilidad, han servido de estímulo necesario para que este trabajo fuese posible.

Al servicio de técnicas aplicadas a la biociencia (STAB) y al servicio de protección radiológica por permitirme usar sus instalaciones y facilitarme realizar algunos de los experimentos de este trabajo.

GRACIAS ¡



A Encarna

A mis Padres y mi Hermana, por estar siempre ahí



## **Índice general**



	Pág.
<b>Abreviaturas.....</b>	<b>19</b>
<b>I. Introducción.....</b>	<b>25</b>
I.1. <i>Candida albicans</i> : importancia como agente patógeno.....	27
I.2. Características de <i>Candida albicans</i> .....	28
I.2.1. Estructura del genoma de <i>C. albicans</i> .....	32
I.3. Recombinación homóloga e ilegítima.....	34
I.3.1. Sistemas de reparación del DNA.....	35
I.3.2. Mecanismos y modelos moleculares de HR.....	36
I.3.2.1. DSBR.....	37
I.3.2.2. SDSA.....	37
I.3.2.3. BIR.....	38
I.3.2.4. SSA.....	39
<b>II. Justificación y Objetivos.....</b>	<b>41</b>
<b>III. Materiales y métodos.....</b>	<b>45</b>
III.1. Microorganismos utilizados y conservación.....	47
III.2. Medios de cultivo y condiciones de crecimiento.....	49
III.3. Construcciones.....	49
III.4. Técnicas de manipulación de ácidos nucleicos.....	50
III.4.1. Extracción de DNA plasmídico de <i>E. coli</i> .....	50
III.4.2. Extracción de DNA cromosómico de levaduras.....	51
III.4.3. Digestión de DNA con enzimas de restricción y separación en geles de agarosa.....	51
III.4.4. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).....	52
III.4.5. Purificación de fragmentos de DNA.....	53
III.4.5. Ligación.....	53
III.5. Preparación de muestras para el análisis de SNPs (SNP-RFLP).....	53
III.6. Hibridación de ácidos nucleicos.....	54
III.6.1. Marcaje radiactivo de sondas de DNA.....	54
III.6.2. Análisis <i>Southern blot</i> .....	54

III.7. Electroforesis en campo pulsante (PFGE).....	55
III.8. Transformación.....	56
III.8.1. Transformación en <i>E. coli</i> .....	56
III.8.2. Transformación en <i>C. albicans</i> .....	57
III.9. Test de fluctuación: obtención de 5FOA <sup>R</sup> .....	57
III.10. Tratamiento de agentes que dañan el DNA.....	58
III.11. Generación de lesiones inducidas por MMS y CPT.....	60
III.12. Microscopía.....	60
III.13. Preparación y análisis de muestras para citometría de flujo (FACS).....	60
<b>IV. Resultados y Discusión.....</b>	<b>63</b>
IV.1. Capítulo I: Competencia entre vías de recombinación que llevan a la pérdida espontánea del marcador <i>URA3</i> : papel de los genes de HR <i>RAD51</i> , <i>RAD52</i> y <i>RAD59</i> .....	65
IV.1.1. Sistema Experimental.....	70
IV.1.1.1. Técnica del URA blaster.....	70
IV.1.1.2. <i>Loci</i> analizados.....	70
IV.1.1.3. Identificación del alelo <i>RAD52</i> y el test cromosoma en cepas heterocigóticas ( <i>RAD52/rad52</i> ) y en nulos homocigóticos <i>rad52</i> respectivamente.....	71
IV.1.1.4. Naturaleza de los eventos genéticos asociados con la inactivación del marcador <i>URA3</i> .....	72
IV.1.2. Inactivación del marcador <i>URA3</i> en cepas heterocigóticas <i>ORF/orf::hisG-URA3-hisG</i> .....	75
IV.1.3. Papel de <i>RAD59</i> en la tasa y eventos genéticos que llevan a la inactivación del marcador <i>URA3</i> .....	76
IV.1.4. Identificación de mecanismos que conducen a la pérdida de <i>URA3</i> en cepas <i>rad52-ΔΔ</i> .....	78
IV.1.5. Papel de Rad59 y Lig4 en recombinación entre repeticiones <i>hisG</i> con el casete URA blaster en cepas Rad52 <sup>-</sup> .....	81
IV.1.6. En cepas Rad52 <sup>+</sup> , la mayoría de los segregantes Uri <sup>-</sup> se formaron por SSA.....	84



IV.1.7. Discusión del capítulo I.....	86
IV.2. Capítulo II: Papel de la recombinación homóloga a la reparación de lesiones causadas por MMS y luz UV en <i>C. albicans</i> .....	93
IV.2.1. Papel de Rad59 en la sensibilidad de mutantes <i>rad51-ΔΔ</i> y <i>rad52-ΔΔ</i> de <i>C. albicans</i> y <i>S. cerevisiae</i> a MMS.....	99
IV.2.2. Papel de Rad59 en la sensibilidad de mutantes <i>rad51-ΔΔ</i> y <i>rad52-ΔΔ</i> de <i>C. albicans</i> y <i>S. cerevisiae</i> a luz UV.....	101
IV.2.3. Papel de genes HR en el crecimiento polarizado en respuesta a MMS.....	102
IV.2.4. Generación y reparación de lesiones lábiles al calor inducidas por MMS en <i>C. albicans</i> .....	104
IV.2.5. Papel de HR en la reparación de HDL.....	109
IV.2.6. Generación y recuperación de HDB en células paradas en G2/M.....	113
IV.2.7. Discusión del capítulo II.....	114
IV.3. Capítulo III: Papel de <i>RAD51</i> , <i>RAD52</i> y <i>RAD59</i> en la reparación de lesiones causadas por camptotecina.....	121
IV.3.1. Antecedentes.....	125
IV.3.1.1. Respuesta de la cepa silvestre y mutantes HR de <i>C. albicans</i> a tratamientos crónicos con CPT: papel de Rad59.....	126
IV.3.1.2. Los mutantes HR de <i>C. albicans</i> son significativamente más resistentes a CPT que sus homólogos en <i>S. cerevisiae</i> .....	127
IV.3.2. Resultados Capítulo III.....	129
IV.3.2.1. Recuperación de <i>C. albicans</i> y sus mutantes de recombinación del efectos inhibitorio por CPT en tratamientos crónicos.....	129
IV.3.2.2. Efecto de CPT en crecimiento y morfología de la cepa silvestre y mutantes HR de <i>C. albicans</i> en medio líquido.....	131
IV.3.2.3. CPT no induce fragmentación cromosómica en <i>C. albicans</i> incluso en ausencia de HR.....	133
IV.3.2.4. La acción combinada de CPT y defectos HR desencadena el <i>checkpoint</i> de G2/M y elongación celular en <i>C. albicans</i> .....	133

IV.3.2.5. Respuesta de la cepa silvestre y mutantes HR de <i>C. albicans</i> a tratamientos agudos con CPT.....	135
IV.3.3. Discusión del Capítulo III.....	138
<b>V. Conclusiones.....</b>	<b>141</b>
<b>VI. Bibliografía.....</b>	<b>147</b>
<b>VII. Publicaciones.....</b>	<b>165</b>

## **Abreviaturas**



Abreviatura	Significado
μ	Micro
5FOA	Ácido 5-fluoroorótico
AP	Sitio apúrico/apirimidínico
BER	Reparación por escisión de bases
BIR	<i>Break Induced Replication</i>
BLM	Bleomicina
BrEt	Bromuro de Etidio
CaCl <sub>2</sub>	Cloruro cálcico
CEN	Centrómero
CFU	Unidades Formadoras de Colonias
Chr	Cromosoma
CL	Pérdida de cromosoma
CO	<i>Crossover</i>
CT	Rotura de cromosoma
CTP	Camptotecina
dHJ	Doble intermediario de Holliday
DNA	Ácido desoxirribonucleico
dNTPs	Desoxirribonucleótidos trifosfato
DO	Densidad óptica
DSB	Rotura de doble cadena
DSBR	<i>Double Strand Break Repair</i>
dsDNA	DNA de cadena doble
DTT	Ditiotreitol
EDTA	EtilenDiaminoTetraAcético
et al.	Y colaboradores
FOA <sup>R</sup>	Resistencia a ácido 5-fluoroorótico
GC	Conversión génica
GCR	Grandes reordenamientos cromosómicos
HCl	Ácido Clorhídrico
hDNA	<i>DNA heterodúplex</i>
Hm	Homocigoto
HR	Recombinación homóloga

---

Ht	Heterocigoto
IPTG	Isopropil $\beta$ -d-tiogalactopiranosido
Kb	Kilopares de bases
LOH	Pérdida de heterozigosidad
MgCl <sub>2</sub>	Cloruro magnésico
min	Minuto
MMS	Metil metanosulfonato
MRS	<i>Major repeat sequence</i>
MTL	<i>Mating type locus</i>
NaCl	Cloruro sódico
NaOH	Hidróxido sódico
NER	Reparación por escisión de nucleótidos
NHEJ	Recombinación ilegítima
°C	Grados centígrados
ORF	<i>Open Reading Frame</i>
PABA	Ácido para-aminobenzoico
pb	Pares de bases
PCI	Fenol/Cloroformo/Ácido isoamílico
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PFGE	Electroforesis en campo pulsante
pg	Picogramos
RFLP	Polimorfismo de longitud de fragmento de restricción
RNA	Ácido ribonucleico
RPA	<i>Replication Protein A</i>
rpm	Revoluciones por minuto
SDS	Dodecil sulfato sódico
SDSA	<i>Sintesis Dependent Strand Annealing</i>
seg	Segundo
SNP	Polimorfismo de un solo nucleótido
SSA	<i>Single Strand Annealing</i>
SSC	Solución compuesta de 3M de NaCl y 300 mM de citrato trisódicodihidratado a pH = 7
ssDNA	DNA de cadena sencilla

---

---

T <sub>10</sub> E <sub>1</sub> N <sub>50</sub>	Solución compuesta de 10 mM de Tris-HCl pH 8, 50 mM de ClNa y 1 mM de EDTA pH 8.
TAE	Tris-Ácido acético-EDTA
TE	Tris EDTA
T <sub>m</sub>	Temperatura de fusión
URA	Uracilo
Uri	Uridina
UV	Ultravioleta
V	Volumen
Wt	Cepa silvestre
X-gal	5-bromo-4-cloro-3-indol β-D-galactósido
YEPD	<i>Yeast Peptone Dextrose</i>
YNB	<i>Yeast Nitrogen Base</i>
Δ	Delección

---





## **I. Introducción**



### **I.1. *Candida albicans*: importancia como agente patógeno**

*Candida albicans* es una levadura que vive como comensal en la piel y en las mucosas del hombre y otros animales de sangre caliente y está distribuida por todo el planeta. En los individuos sanos suele encontrarse de forma saprófita, donde existe en equilibrio con la microbiota y el sistema inmunitario del hospedador. Dicho equilibrio se mantiene gracias a la competencia con la flora bacteriana normal, la integridad de piel y mucosas y la actividad del sistema inmunológico, pero bajo determinadas condiciones puede invadir cualquier tejido del cuerpo, y manifestar carácter patógeno (Hube y Naglik, 2001). Por tanto, *C. albicans* es considerada un patógeno oportunista.

*C. albicans* puede producir distintos tipos de patologías llamadas genéricamente candidiasis. La incidencia de las candidiasis en las últimas décadas ha aumentado debido a la concurrencia de varios factores que hacen que hongos habitualmente saprófitos se conviertan en patógenos oportunistas. Entre estos factores se puede citar, la aplicación de tratamientos inmunosupresores, la utilización de antibióticos de amplio espectro o el empleo de materiales terapéuticos, tales como catéteres (Agabian *et al.*, 1994; Bodey, 1993; Dixon *et al.*, 1996; Kurtz *et al.*, 1988; Odds, 1988).

Las candidiasis se clasifican en superficiales e invasivas. Las superficiales afectan principalmente a la piel y mucosas e incluyen las candidiasis vaginal, oral y mucocutánea crónica. Las invasivas pueden ser localizadas cuando afectan a uno o más órganos, aunque por lo general van acompañadas de septicemias, en las que el hongo se distribuye a muchos órganos denominándose entonces candidiasis sistémica. Las infecciones sistémicas son las más peligrosas, afectando principalmente a individuos inmunocomprometidos. Tanto su diagnóstico como su tratamiento son poco eficaces (Calderone, 2002; Myskowski *et al.*, 1997).

El tratamiento de las candidiasis se realiza con diversos tipos de antifúngicos (Tabla 1). Durante mucho tiempo, la anfotericina B, que actúa sobre el ergosterol presente en la membrana plasmática de las células fúngicas, fue el único antifúngico disponible para controlar las infecciones fúngicas graves. La flucitosina se empezó a utilizar en los años 60, resultando útil únicamente en combinación con anfotericina B. A finales de los años 70, aumentaron las opciones para tratar infecciones sistémicas con el desarrollo de los azoles miconazol y ketoconazol. En la siguiente década se pusieron a punto nuevos azoles: el fluconazol y el itraconazol, que son los compuestos empleados con más frecuencia en la actualidad, aunque en muchas ocasiones no resultan útiles por

su falta de eficacia contra algunos patógenos y la aparición de resistentes (De Backer *et al.*, 2000).

<b>Tipo</b>	<b>Diana</b>	<b>Compuestos</b>	<b>Actividad frente a</b>
Polienos (unión a Ergosterol)	Ergosterol	Anfotericina B Nistatina	<i>Candida</i> , <i>Cryptococcus</i> , <i>Aspergillus</i>
5-fluorocitosina (AN, DNA) (Induce muchas resistencias)	Ácidos nucleicos	5-FC	Varios, combinado con otros
Inhibidores (biosíntesis Ergosterol)	Ergosterol	Azoles Morfolinas Tiocarbamatos Alil-aminas	Infecciones localizadas (imidazoles: miconazol) y sistémicas (triazoles: fluconazol)
Equinocandinas (inhiben síntesis de $\beta$ - glucano)	$\beta$ -glucano	Caspofungina Anidulafungina Micafungina	<i>Candida</i> , <i>Aspergillus</i> (infecciones sistémicas)

**Tabla 1. Drogas antifúngicas y modos de acción.**

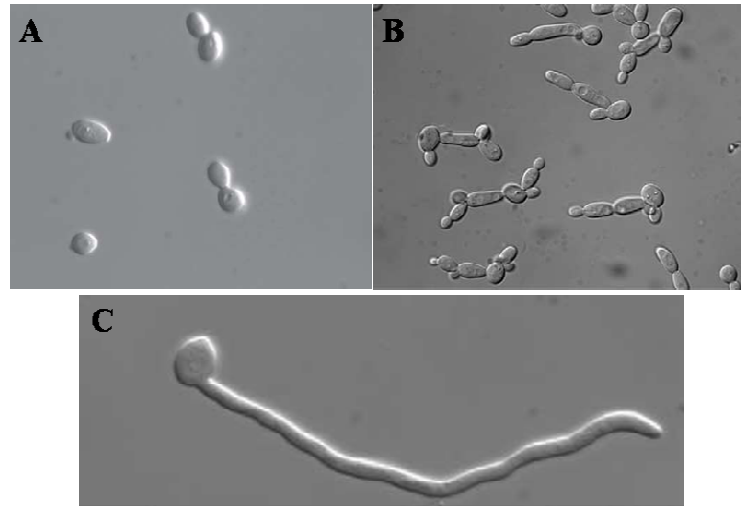
En los últimos años se han desarrollado compuestos azólicos más potentes y ha aparecido una nueva familia de agentes antifúngicos, las equinocandinas, cuya diana es la glucán sintetasa por lo que inhibe la formación de 1,3- $\beta$ -D-glucano, componente esencial de la pared celular fúngica. Entre ellas cabe destacar la caspofungina, un compuesto tan eficaz como la anfotericina B pero con menos efectos secundarios (Carrillo-Muñoz *et al.*, 2001). Otra equinocandina de reciente aparición es la anidulafungina, un lipopéptido obtenido a partir de un producto de fermentación de *Aspergillus nidulans*. Este compuesto presenta actividad fungicida frente a especies de *Candida* y se utiliza principalmente para tratar candidiasis invasivas (Sabol y Gumbo, 2008).

## **I.2. Características de *Candida albicans***

Además de ser un patógeno importante para el hombre, *C. albicans* muestra una serie de características biológicas que le convierten en un organismo interesante: la transición dimórfica, diploidía obligada sin que se haya descrito una fase haploide, alta adaptabilidad y reproducción predominantemente clonal.

*C. albicans* es un organismo polimórfico, debido a su alta capacidad para crecer como levadura (también conocidas como blastosporas, Figura 1A) o en forma de filamentos (pseudohifas y verdaderas hifas, Figura 1B y C respectivamente). El paso de una a otra morfología se conoce como transición dimórfica, proceso que puede

inducirse *in vitro* mediante cambios en pH y temperatura, así como por la presencia de determinados compuestos. A veces producen unas formas de resistencia conocidas como clamidosporas.



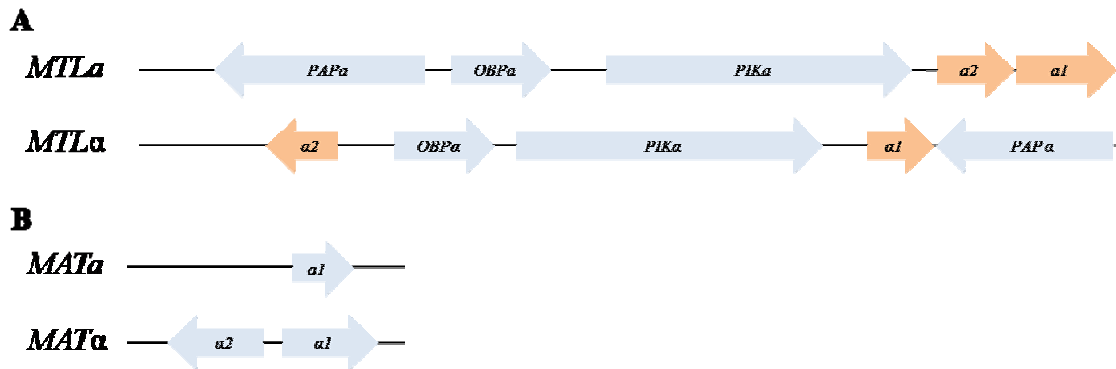
**Figura 1. Plasticidad morfológica de *C. albicans*.** A) Forma levaduriforme, B) Pseudohifa y C) Verdadera hifa. Imagen obtenida de Sudbery *et al.*, (2004).

Los primeros experimentos que sugerían diploidía en *C. albicans* compararon la cantidad de DNA entre células de *C. albicans* y de *Saccharomyces cerevisiae* de diferentes ploidías (haploide, diploide, tetraploide) utilizando microfluorometría (Olaiya y Sogin, 1979). Posteriormente, los análisis de cinética de reasociación (hibridación DNA-DNA) revelaron un valor de 18 pg de DNA para el genoma haploide, mientras que la cantidad de DNA por célula, determinado químicamente, era de aproximadamente el doble (37 pg) (Riggsby *et al.*, 1982; Riggsby, 1990). Estos datos concordaron con estudios genéticos que indicaban que cuando los aislados clínicos de *C. albicans* se trataban con moderadas dosis de luz UV, formaban una limitada progenie auxotrófica cuyo patrón era específico de cepa (Whelan *et al.*, 1980; Whelan y Magee, 1981). Este comportamiento es propio de un organismo con un alto y variable grado de heterozigosidad e indica la existencia de al menos dos alelos para los genes estudiados.

*C. albicans* es capaz de crecer y adaptarse a muchos órganos del cuerpo humano, y a los diversos medios de cultivo y condiciones de crecimiento en el laboratorio, incluyendo condiciones extremas de pH y temperatura (Odds *et al.*, 1989; Rustchenko-Bulgac y Howard, 1993; Calderone, 2002; Rustchenko, 2006). Esto incluye su capacidad para metabolizar fuentes de carbono inusuales como la L-sorbose y la D-arabinosa y crecer *in vitro* en presencia de concentraciones significativas de

antifúngicos como anfotericina B y azoles (Perepnikhatka *et al.*, 1999; Cowen *et al.*, 2000; Rustad *et al.*, 2002; Coste *et al.*, 2004), así como en medios de cultivo que presentan compuestos tóxicos como el 5'-FOA, utilizado para contra-seleccionar las células que no pueden sintetizar uridina (Uri<sup>-</sup>). Gran parte de esta adaptabilidad deriva de la condición diploide del organismo y de sus altos niveles de heterozigosis natural.

Estudios de genética de poblaciones en *C. albicans* realizados por Pujol *et al.* (1993) indicaban que la levadura se reproducía exclusivamente de forma clonal. Estos autores analizaron los haplotipos de 21 *loci* mediante análisis de restricción y concluyeron ausencia total de recombinación. Estudios posteriores usando métodos que se basaban en el análisis de marcadores bi-alélicos mediante RADP (DNA polimórfico amplificado aleatoriamente; Graser *et al.*, 1996) o MLST (*multi-locus sequence typing*; Tavanti *et al.*, 2004; Odds *et al.*, 2007), encontraron que existían trazas de recombinación entre alelos, sugiriendo que aunque la reproducción era predominantemente clonal, podría existir una baja frecuencia de conjugación. Hull y Johnson (1999) identificaron regiones del genoma de *C. albicans* similares a los *locus mating type*, *MATa* y *MATα*, de *S. cerevisiae* que denominaron regiones *MTL* (*mating-type locus*). Como podría esperarse del hecho de que ambas levaduras derivan de un precursor común, ambos *loci* sexuales, *MAT* en *S. cerevisiae* y *MTL* en *C. albicans*, codificaban para tres reguladores transcripcionales,  $\alpha 1$ ,  $\alpha 1$  y  $\alpha 2$ , con acentuadas homologías entre ambos organismos. La orientación y localización de estos genes estaba conservada. Sin embargo, también se encontraron diferencias entre ellos, como podría igualmente esperarse de su divergencia durante unos 300 millones de años. Mientras que *S. cerevisiae* posee copias silenciosas de ambos *loci*, *HMR* y *HML*, *C. albicans* posee copias únicas. El *locus MTL* (8.8 kb) es mucho mayor que el *MAT* (0.7 kb), y posee tres genes adicionales con un bajo grado de identidad entre los dos alelos de cada uno de ellos (66%) (Figura 2A). *MTLa* codifica para otro regulador transcripcional,  $\alpha 2$ , ausente en *S. cerevisiae* (Figura 2B), similar a proteínas HGM presentes en otros hongos (Tsong *et al.*, 2003). Como se indica en la figura 2A, la mayoría de las cepas de *C. albicans* son heterozigóticas para este *locus*: un alelo incluye los genes *MTLa1* y *MTLa2* y el otro los genes *MTLa1* y *MTLa2*.



**Figura 2.** Estructura del *Mating Type Like (MTL) Locus* en *C. albicans* y *S. cerevisiae*. A) *locus MTL* en *C. albicans*, donde cada alelo además de tener los genes reguladores de tipo sexual (naranja), se encuentran *ORFs* que codifican una poli (A) polimerasa (PAP), una fosfatidilinositol quinasa (PIK) y una proteína similar a proteínas de unión a oxiterol (OBP). B) *locus MAT* en *S. cerevisiae*. Figura tomada de Tsong *et al.* (2003).

Magee y Magee (2000) y Hull *et al.* (2000) construyeron cepas homo- o hemizigóticas a y  $\alpha$ , y demostraron que en *C. albicans* podía producirse conjugación si cepas homocigotas o hemizigotas complementarias (a y  $\alpha$ ) se mezclaban, pero no lo hacían las del mismo tipo sexual. Más adelante se demostró que sólo un tipo de células, denominadas células opacas, de *C. albicans* conjugaban, mientras que las células habituales, blancas, no lo hacían. El paso del fenotipo blanco a opaco, o viceversa, se denomina *switching*. Se ha demostrado recientemente que el *locus MTL* de *C. albicans* controla tanto el *switching* blanco/opaco como la conjugación (Miller y Johnson, 2002), ya que las proteínas  $\alpha 1$  y  $\alpha 2$  forman un heterodímero capaz de reprimir el *switching* y, como hemos dicho, sólo las células con fenotipo opaco son capaces de conjugarse de una manera eficiente. Debido a que las células que son homocigóticas para el *locus MTL* carecen de dicho heterodímero, pueden realizar *switching* y conjugarse. Las células que son homocigóticas para *MTL* pueden surgir de tetraploides que han sufrido pérdida de cromosomas al azar para recuperar la diploidía o un estado cercano a ella, o de diploides por pérdida de una copia del cromosoma 5 (Bennett y Johnson, 2003). La conversión de tetraploides a diploides parece ocurrir a través de un ciclo parasexual (Figura 3). No se ha observado meiosis y, además, *C. albicans* carece de los homólogos de varios genes que son esenciales para realizar meiosis en *S. cerevisiae* (*IME1*, *SPO13* y *ZIP2*) (Andaluz *et al.*, 1996; Andaluz *et al.*, 2001; Tzung *et al.*, 2001). Recientemente, Forche *et al.* (2008), han demostrado que la delección de la proteína Spo11 (esencial para la recombinación meiótica) impide la recombinación genética entre los cromosomas homólogos durante el ciclo parasexual de *C. albicans*. Esta observación indica que al

menos un gen específico de meiosis se ha re-programado para mediar recombinación genética durante el ciclo parasexual de la levadura.

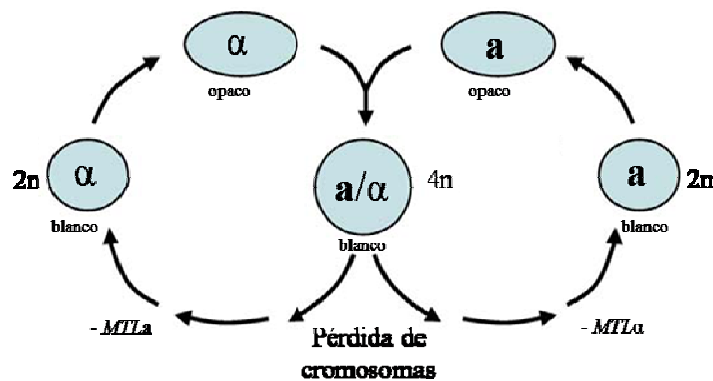


Figura 3. Ciclo parasexual en *C. albicans*. Figura tomada de Forche *et al.* (2008).

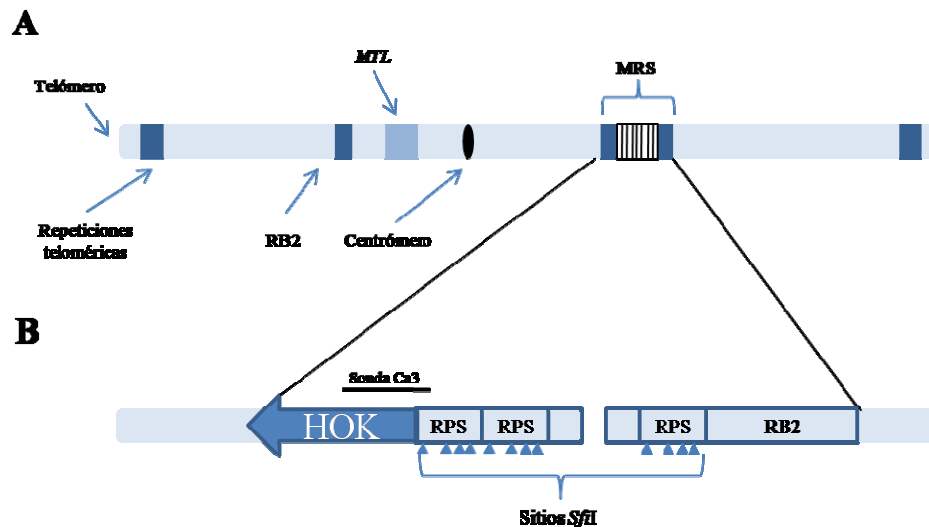
El ciclo parasexual resulta en nuevas combinaciones de cromosomas procedentes de los parentales, ya sean originales o recombinantes, lo que proporciona nuevas combinaciones de alelos y una alta variabilidad genética a nivel de especie.

### 1.2.1. Estructura del genoma de *C. albicans*

El genoma de *C. albicans* se agrupa en 8 pares de cromosomas homólogos de diferentes tamaños que se numeran del 1 al 7, siendo el cromosoma 1 el de mayor tamaño y el 7 el de menor. El cromosoma R contiene DNA ribosómico, y su tamaño varía en función de la cantidad de repeticiones de genes DNAr que contenga, lo que depende a su vez de las condiciones ambientales (Iwaguchi *et al.*, 1992). El tamaño total del genoma diploide es de 32 Mb (16 Mb para el haploide). Los cromosomas de *C. albicans* comparten un número de características que son raras entre los hongos. Entre ellas están las repeticiones subteloméricas conocidas como CARE-2 (Lasker *et al.*, 1992) y REL-2 (Thrash-Bingham y Gorman, 1993). Además, siete de los ocho cromosomas tienen una o más copias de otra secuencia compleja que contiene elementos repetidos denominada MRS, y todos tienen como mínimo una copia de parte de la secuencia (Chu *et al.*, 1993) (Figura 4A). Con elevada frecuencia, los aislados clínicos exhiben translocaciones cromosómicas que utilizan MRS como región de recombinación, si bien al tratarse de intercambios recíprocos no conllevan aparentemente pérdida o ganancia de información. No obstante, a veces aparecen aneuploidías (ciertos cromosomas están en tres copias) o nuevos cromosomas formados

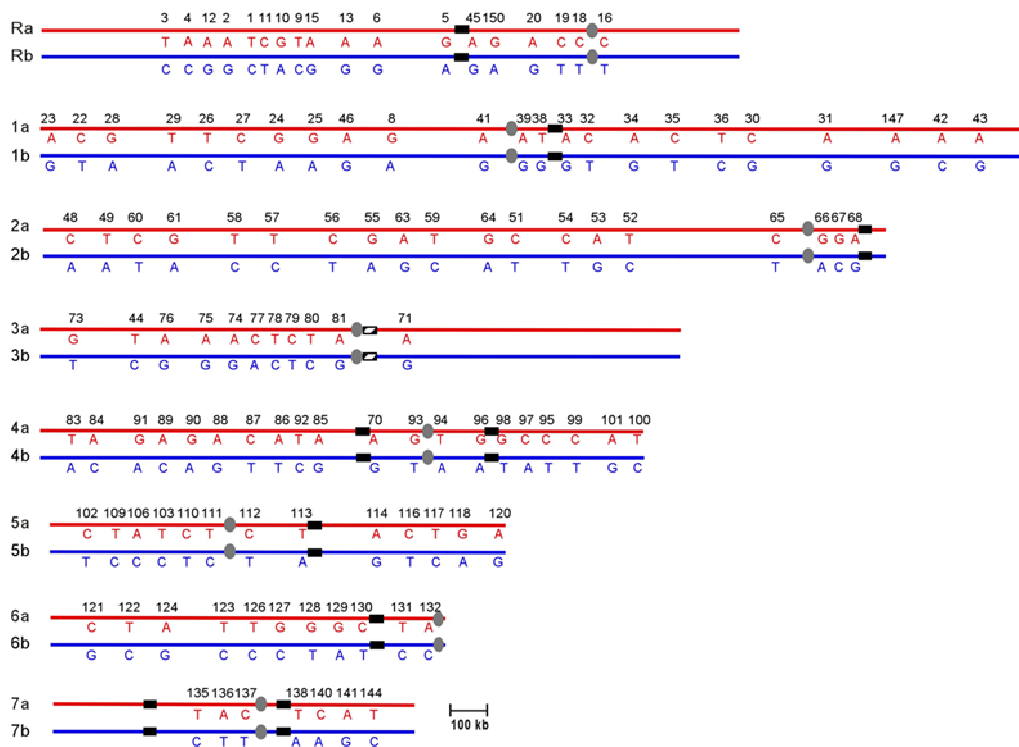


por la fusión de dos brazos idénticos de algún cromosoma. La plasticidad genómica es una de las características de *C. albicans*.



**Figura 4. Esquema del Chr5 de *C. albicans* y algunas partes del mismo.** A) Estructura del Chr5 que muestra alguna de las características mencionadas, las repeticiones subtelo méricas y las MRS. B) Detalle de los elementos que integran una MRS. Figura tomada de Magee (2007).

La secuenciación del genoma diploide de la cepa de referencia SC5314 en 2004 (Jones *et al.*, 2004), reveló una cantidad sorprendente de heterozigosidad para un organismo que se reproduce de forma clonal. En dicha secuencia se han encontrado más de 62000 heterozigosidades, aproximadamente 1 por cada 237 pb. Esta alta heterozigosidad incluye deleciones, inserciones, inversiones y un mínimo de 55700 (elevado recientemente a 67500; Braun *et al.*, 2005) polimorfismos de un solo nucleótido (SNPs) distribuidos a lo largo de todo el genoma (Jones *et al.*, 2004). La distribución no es sin embargo homogénea. Los brazos izquierdos de los cromosomas 5 y 6 contienen regiones con alta cantidad de SNPs, mientras que los brazos derecho del cromosomas 3 e izquierdo del 7 apenas contienen heterozigosidades. Actualmente se dispone de un mapa de SNP distribuidos entre los 8 cromosomas de la cepa de referencia SC5314 (Figura 5; Legrand *et al.*, 2008).



**Figura 5. Marcadores SNPs del genoma de la cepa SC5314 de *C. albicans*.** Figura tomada de Legrand *et al.* (2008).

Los polimorfismos mencionados varían entre las diferentes cepas, lo que confiere un alto grado de variabilidad genética a la especie. Esta variabilidad puede alterarse de dos maneras: primero mediante recombinación genética durante el ciclo mitótico, lo que conduce a pérdida de heterocigosidad (LOH) y/o nueva combinación de alelos; y segundo, mediante la redistribución de los cromosomas altamente polimórficos de los padres durante el ciclo parasexual.

### I.3. Recombinación homóloga e ilegítima

La recombinación homóloga (HR) consiste en el intercambio de secuencias similares entre dos moléculas diferentes de DNA. Este proceso genera variabilidad y promueve la reparación del DNA dañado, incluyendo los cortes en la doble cadena (DSBs). Existe otro tipo de recombinación conocida como recombinación por fusión de extremos o *non-homologous end-joining* (NHEJ), que puede utilizarse para reparar DSBs.

HR necesita una homología mínima de entre 50-100 pb (Paques y Haber, 1999), mientras que NHEJ une extremos con poca o ninguna homología. HR es precisa, y requiere a todo un conjunto de proteínas que pertenecen al grupo de epistasia de Rad52 (Rad51, Rad52, Rad54/Rad55, Rad57, Rad59), el complejo MRX (Mre11-Rad50-Xrs2),

DNA-RPA y la ligasa Cdc9. De todo el grupo de epistasis de Rad52, sólo la proteína Rad52 es requerida en *S. cerevisiae* para casi todos los acontecimientos que ocurren por HR, si bien los mutantes *rad52* de esta cepa pueden aún reparar por NHEJ. NHEJ es mutagénica y utiliza proteínas diferentes: Ku70, Ku80, ligasa 4 (Dnl4), así como sus proteínas asociadas Lif1 y Lif2 (Frank-Vaillant y Marcand, 2001; Kegel *et al.*, 2001; Valencia *et al.*, 2001).

### 1.3.1. Sistemas de reparación del DNA

En los organismos eucariotas, la existencia de diferentes lesiones en el DNA ha llevado al desarrollo de mecanismos para repararlas. Los sistemas de reparación del DNA consisten en sistemas que reparan desapareamientos provocados por defectos en la lectura de pruebas (*mismatch repair*, MMR), así como otros daños que surgen de procesos de metilación/oxidación de las bases. Entre estos últimos se encuentra la reparación por escisión de nucleótidos (NER) y la reparación por escisión de bases (BER). Además, las células poseen mecanismos de tolerancia a daño replicativo, en la que está implicado la ruta de *translesion synthesis* (TLS).

MMR repara bases y pequeñas inserciones/deleciones desapareadas generadas como errores en la replicación del DNA. En *S. cerevisiae* participa un heterodímero (Msh2-Msh6) que reconoce la lesión, mientras que Mlh1-Pms1 recluta otras proteínas para la reparación del desapareamiento. También participan una exonucleasa (Exo1) que hidroliza la región de desapareamiento en la doble cadena y una polimerasa (pol $\delta$ ) que incorpora el nucleótido correcto (Kunkel y Erie, 2005).

En BER la lesión (en *S. cerevisiae*) es reconocida por un conjunto de DNA glicosilasas que cortan el enlace glicosídico. El hueco generado (AP) puede ser procesado mediante una exonucleasa o bien por una fosfodiesterasa (ver Capítulo II).

La ruta NER elimina distorsiones en el DNA, y en *S. cerevisiae* participan Rad2 (cortando en el extremo 3') y el complejo proteico Rad1-Rad10 (cortando en el extremo 5') (Habraken *et al.*, 1993; Davies *et al.*, 1995) (ver Capítulo II).

Por último, el mecanismo de TLS es el proceso por el cual la lesión causada en el DNA es sobrepasada mediante la incorporación de nucleótidos opuestos a la lesión. En *S. cerevisiae* participan tres polimerasas TLS: Rev1, Pol $\zeta$  (Rev3/7) y Pol $\eta$  (Rad30).

En la introducción de cada capítulo de resultados de esta tesis se comentan aspectos más concretos de estas rutas de recombinación y reparación del DNA, por lo que en esta Introducción sólo haremos referencia a la recombinación homóloga (HR).

### 1.3.2. Mecanismos y modelos moleculares de HR

HR es iniciada por la introducción de un corte de doble cadena (DSB) en el DNA (Figura 6). Los extremos 5' generados son hidrolizados por exonucleasas que dejan ssDNA con extremos 3' protuberantes, a los cuales se va a unir la proteína Rad51. La unión de Rad51 es facilitada por la unión previa del RPA (*Replication Protein A*) que se piensa que es capaz de eliminar la formación de estructuras secundarias del DNA. El reclutamiento de Rad51 al complejo ssDNA-RPA es mediado por Rad52 que interactúa con Rad51 a través de los residuos 409-412 (Shinohara y Ogawa, 1998; Song y Sung, 2000), desplaza al complejo RPA y lo sustituye por Rad51 para formar el correspondiente nucleofilamento (Sung, 1997). Otras proteínas pueden también cooperar en su formación, como Rad55 y Rad57. El filamento-Rad51 es capaz de localizar un donador homólogo y con la ayuda de Rad54 causar una remodelación de la cromatina, desenrollamiento del DNA homólogo no dañado y el intercambio de cadenas. Las etapas siguientes dependen de cada uno de los tipos o modelos de HR: la reparación de la rotura de doble cadena (DSBR, *Double Strand Break Repair*) que resulta en conversión génica (LOH local si es una región polimórfica) o en *crossing over* (LOH en largos fragmentos polimórficos del cromosoma), SDSA (*Sintesis Dependent Strand Annealing*) que resulta en conversión génica local, el apareamiento de cadena sencilla (SSA, *Single Strand Annealing*) que resulta en deleciones entre repeticiones directas, y la recombinación inducida por rotura (BIR, *Break Induced Replication*) que resulta en conversión génica masiva desde el punto de rotura hasta el telómero del cromosoma copiado, generalmente el homólogo.

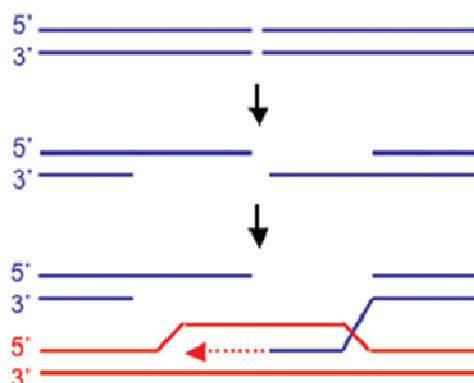


Figura 6. Inicio de la reparación de DSB en el DNA.

### I.3.2.1. DSBR

El modelo de la reparación de DSB (DSBR) fue propuesto por primera vez para explicar el mecanismo de reparación en plásmidos y es actualmente el modelo más aceptado para racionalizar el entrecruzamiento con la conversión génica durante la recombinación homóloga (Orr-Weaver *et al.*, 1981; Szostak *et al.*, 1983). En este modelo, los extremos 5' de un DSB son degradados para producir extremos 3' de cadena sencilla que puedan iniciar la invasión del dúplex homólogo. Siguiendo a esta invasión, y ya en el dúplex homólogo, el extremo 3' es extendido mediante síntesis de DNA. El bucle formado por la invasión es ligado con el otro lado del DSB, y el extremo 3' de la cadena no invadida es también extendido mediante síntesis de DNA, generándose un doble intermediario de Holliday (dHJ) (Figura 7). Para separar los dúplex recombinantes el dHJ debe ser eliminado mediante la actividad de una helicasa y de una topoisomerasa para producir sólo productos de GC sin intercambio de cadenas (NCO, *non crossover*), o bien por escisión endonucleolítica generando productos con intercambio de cadenas o entrecruzamiento (CO, *crossover*). El DNA heterodúplex (hDNA), que se forma por el emparejamiento de una hebra de un dúplex con una hebra complementaria del otro dúplex, es un distintivo de recombinación homóloga y puede formarse durante la invasión inicial de cadena y/o por captura del segundo extremo. La reparación de los emparejamientos erróneos presentes en el hDNA pueden dar lugar a conversión génica o restauración de la secuencia original (Boiteux y Jinks-Robertson, 2013) (Figura 7, parte central).

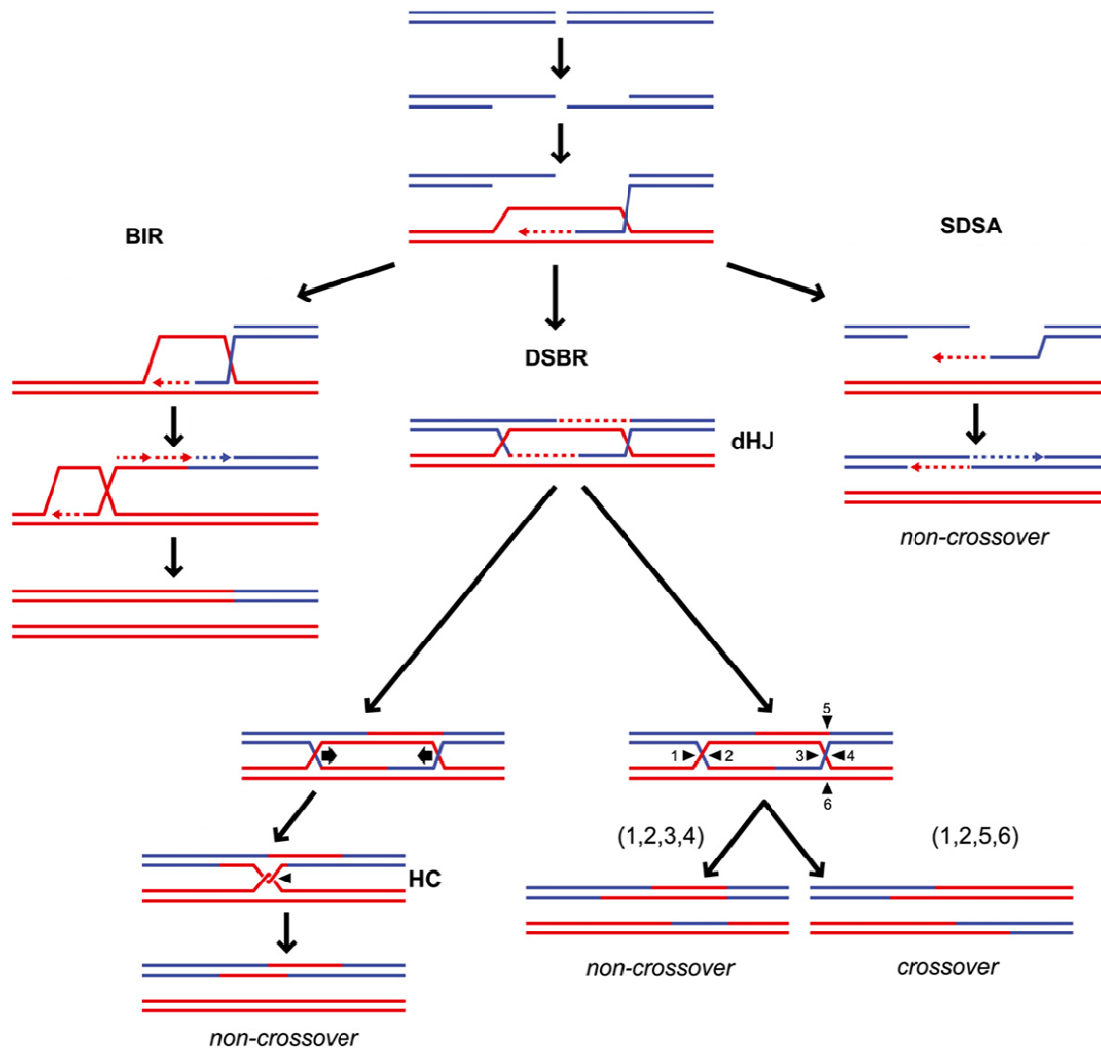
### I.3.2.2. SDSA

Mientras que el modelo DSBR explica muchas de las propiedades de la recombinación meiótica, la recombinación mitótica muestra una asociación entre entrecruzamiento (CO) y la conversión génica (GC) menor que la observada durante la recombinación meiótica. Esta observación dio lugar a una variación del modelo DSBR, el modelo SDSA, para explicar la menor incidencia de los COs asociados durante la reparación mitótica del DSB (Nassif *et al.*, 1994; Ferguson y Holloman, 1996; Paques *et al.*, 1998). El modelo SDSA propone que ambos extremos 3' ssDNA invaden el dúplex homólogo y después de la síntesis de DNA son desplazados por DNA helicasas; las cadenas nacientes complementarias hibridan y después de la síntesis de los huecos y

posterior ligación se generan exclusivamente productos NCO (Nassif *et al.*, 1994) (Figura 7, derecha).

### I.3.2.3. BIR

La recombinación inducida por rotura (BIR) es un proceso de replicación dependiente de recombinación que da lugar a la transferencia no recíproca del DNA donante al cromosoma receptor. Para la reparación por BIR, sólo un extremo del DSB invade el dúplex homólogo de DNA e inicia la replicación hasta el final del cromosoma (Kraus *et al.*, 2001; Llorente *et al.*, 2008) (Figura 7, izquierda). Como BIR puede resultar en LOH masiva, este proceso se suprime cuando los DSBs tienen dos extremos homólogos finales con el fin de que la reparación se produzca mediante un mecanismo HR más conservador. De hecho, la frecuencia de BIR en un DSB inducido por endonucleasa es  $< 1\%$ , pero puede ser sustancialmente mayor si la conversión génica es prevenida por la limitación de homología a un lado de la rotura (Malkova *et al.*, 1996, 2005; Bosco y Haber, 1998). Los pasos iniciales de BIR parecen ser similares a los de DSBR y SDSA (Davis y Symington, 2004). BIR puede incluir varias rondas de invasión de banda – síntesis de DNA – disociación, resultando en reordenamientos cromosómicos cuando la disociación y re-invasión ocurren en secuencias repetidas dispersas (Smith *et al.*, 2007; Ruiz *et al.*, 2009). Por tanto, la naturaleza altamente mutagénica de BIR podría contribuir a la evolución del genoma y el desarrollo de enfermedades en los seres humanos.

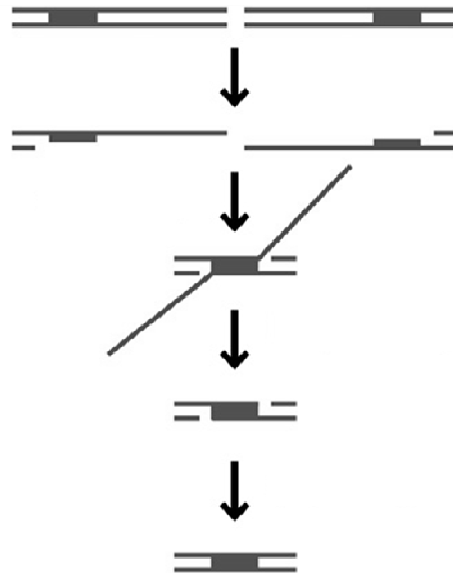


**Figura 7. Modelos para la reparación de DSB dependientes de homología.** La reparación de un DSB se inicia con la resección por exonucleasas que dejan extremos monohebra 3'. La banda 3' resultante de cadena sencilla invade un dúplex homólogo intacto (en rojo). En el caso de BIR (izquierda), el extremo con homología puede llevar a cabo la invasión de banda en un cromosoma homólogo o no homólogo formando una horquilla de replicación. En este caso, la síntesis de DNA continúa hasta el final de la molécula. En DSBR (centro), la banda desplazada captura ahora el segundo extremo resecionado e hibrida en el D-loop (segunda captura). La síntesis de DNA desde el segundo extremo, y ligación resultan en un doble intermediario de Holliday (dHJ). El dHJ puede disolverse, lo que conduce a productos sin entrecruzamiento (NCO) o resolverse por escisión endonucleolítica para generar productos NCO (posiciones 1, 2, 3 y 4) o productos CO (posiciones 1, 2, 5 y 6). En SDSA (derecha), la banda recién sintetizada se disocia del molde y vuelve a hibridar con el otro extremo resecionado del DNA. Después de la síntesis y ligación, las moléculas recombinogénicas son resueltas exclusivamente como productos sin entrecruzamiento (NCO). Figura tomada de Symington *et al.*, 2014.

#### I.3.2.4. SSA

El mecanismo de SSA se ha estudiado más ampliamente en el contexto de la reparación de un DSB inducido entre repeticiones directas (Paques y Haber, 1999). SSA podría ser responsable también de la eliminación espontánea de un segmento de DNA localizado entre repeticiones directas, pero otros mecanismos podrían operar. SSA repara eficientemente DSBs que se encuentran entre repeticiones > 200 pb, pero la

frecuencia se reduce significativamente para repeticiones  $< 50$  pb (Sugawara *et al.*, 2000). Después de la resección de los extremos de un DSB, las colas 3' de ssDNA pueden hibridar cuando la resección es lo suficientemente extensa para alcanzar las regiones homólogas complementarias que flanquean el DSB (Figura 8). Las colas de cadena sencilla sobrante pueden ser eliminadas mediante la acción de nucleasas, y los huecos que quedan pueden ser rellenados por síntesis de DNA y posterior ligación (Fishman-Lobell *et al.*, 1992; Ivanov y Haber, 1995). Este proceso produce la delección de una de las repeticiones existentes y la región del DNA entre ambas repeticiones, de manera que está considerado como mutagénico (Symington, 2002). El proceso es independiente de Rad51 pero fuertemente dependiente de Rad52 y si la longitud de las repeticiones es corta, de Rad59 (Paques y Haber, 1999). Rad59, requerida en los procesos de recombinación homóloga independientes de Rad51, interactúa con Rad52 promoviendo el apareamiento de cadenas complementarias (Davis y Symington, 2001). Rad59 está implicada en la reparación de DSBs entre repeticiones invertidas por SSA (Sugawara *et al.*, 2000), y ayuda también a la maquinaria requerida para el corte de colas no homólogas.



**Figura 8. Modelo de SSA.** La reparación de un DSB flanqueado por repeticiones directas (caja gris) puede ocurrir mediante SSA, si hay resección más allá de las repeticiones. Las repeticiones complementarias de una sola cadena pueden hibridar, dejando colas de cadena sencilla sobrantes que serán eliminadas por la endonucleasa Rad1-Rad10, antes de rellenar los huecos y la ligación completando la reparación. Este modelo resulta en delección de una de las repeticiones y la región entre ambas. Figura tomada de Symington *et al.*, 2014.



## **II. Justificación y Objetivos**



Cada vez hay más evidencias que muestran que, durante el proceso de infección, el éxito del organismo depende en gran medida de su capacidad para adaptarse a los diferentes nichos en el huésped humano a través de cambios genéticos, principalmente por mutaciones puntuales, translocaciones, pérdida de heterocigosidad (LOH) y aneuploidías (Ford *et al.*, 2015). En las células humanas, estas alteraciones acompañan o preceden cáncer (Aguilera y García-Muse, 2013; Gaillard *et al.*, 2015), pero en *C. albicans* no sólo son toleradas (Bouchonville *et al.*, 2009), sino que se utilizan como un mecanismo de adaptación al estrés ambiental, incluyendo la presencia de fármacos antifúngicos. La presencia de LOH y aneuploidías son comunes entre los aislados clínicos. Por ejemplo, aislados de pacientes tratados con azoles, frecuentemente presentan un isocromosoma formado por dos brazos izquierdos del Chr5. Este evento puede ser acompañado por reordenamientos adicionales, incluyendo quimeras de otros cromosomas. Es importante destacar que las cepas resistentes a azoles que llevan LOH y aneuploidías exhiben una alto *fitness*, incluso en ausencia de la droga, lo que sugiere que las alteraciones genéticas subyacentes no afectan o incluso pueden mejorar la tasa de crecimiento (Selmecki *et al.*, 2008). Otros estreses, como el peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) inducen LOH y pérdida de cromosoma (CL) (Forche *et al.*, 2011). En pacientes con cáncer, las células endógenas de *C. albicans* están sometidas a estreses específicos derivados de tratamientos con radiación ionizante (IR) y de la administración de drogas que causan DSB (bleomicina -BLM-) o interfieren con la replicación del DNA (camptotecina -CPT-, o temozolomida -TMZ-, un agente alquilante). Tenemos evidencias de que la reparación de los daños causados en el DNA resultan en cepas que llevan LOH y GCR. Es importante destacar finalmente, que un estudio ha demostrado que el tratamiento de *C. albicans* con un número de medicamentos contra el cáncer (5-fluorouracilo, cis-platino, peflomicina) o la irradiación con <sup>137</sup>Cs, generan supervivientes con virulencia incrementada, como se observa en sus mayores tasas de crecimiento, aumento de la adherencia celular, capacidad de unión a lectinas, secreción de proteasas, resistencia a neutrófilos y a los medicamentos antifúngicos (Tanida *et al.*, 2001). Sin embargo, no hay investigaciones adicionales sobre el origen de estas alteraciones fenotípicas.

Nuestro principal objetivo es conocer el daño que causan estas drogas, y en particular, el agente alquilante MMS y el antitumoral CPT, sobre el DNA, así como los mecanismos de supervivencia de *C. albicans*, en concreto, el papel que juega HR en

dicha supervivencia (Capítulos II y III). También nos propusimos analizar el papel de genes HR en la reparación de lesiones causadas por luz ultravioleta (Capítulo II).

Otras alteraciones implican cambios en el número de repeticiones. Casi la mitad de las *ORFs* de *C. albicans* (alrededor de 2600) contienen repeticiones, un número de tres y diez veces superior a la encontrada en los genomas de *Saccharomyces cerevisiae* y *Schizosaccharomyces pombe* respectivamente (Braun *et al.*, 2005). Se cree que la variación en el número de repeticiones causadas por el deslizamiento durante la replicación y la recombinación puede proporcionar ventajas evolutivas, ya que aporta a la población un número de proteínas que difieren en propiedades funcionales y pueden ser seleccionadas en condiciones apropiadas en un entorno altamente cambiante. Nos hemos propuesto analizar la competencia entre las vías de recombinación que llevan a la pérdida espontánea de un marcador flanqueado por repeticiones directas (*hisG*) en *C. albicans* (Capítulo I).

### **III. Materiales y métodos**



### III.1. Microorganismos utilizados y conservación

Las siguientes tablas muestran las cepas de *C. albicans* (Tabla 2) y las de *S. cerevisiae* (Tabla 3) utilizadas, así como la procedencia de las mismas.

Cepa (nombre antiguo)	Genotipo	Cepa parental	Fenotipo	Referencia
SC5314	Wild type		Wild type	Gillum <i>et al.</i> , 1984
CAF2-1	$\Delta ura3::imm434/URA3$	SC5314	Wild type	Fonzi e Irwin, 1993
CAI4	$\Delta ura3::imm434/ \Delta ura3::imm434$	CAF2-1	Uri <sup>-</sup>	Fonzi e Irwin, 1993
CAGL1	$\Delta ura3::imm434/ \Delta ura3::imm434$ $RAD52/\Delta rad52::hisG-URA3-hisG$	CAI-4	Uri <sup>+</sup> Rad52 <sup>+</sup>	Este trabajo
CAGL2 (TCR1)*	$\Delta ura3::imm434/ \Delta ura3::imm434$ $RAD52/\Delta rad52::hisG-URA3-hisG$	CAI-4	Uri <sup>+</sup> Rad52 <sup>+</sup>	Ciudad <i>et al.</i> , 2004
CAGL3	$\Delta ura3::imm434/ \Delta ura3::imm434$ $\Delta rad59::hisG/\Delta rad59::hisG$ $RAD52/\Delta rad52::hisG-URA3-hisG$	CAGL17	Uri <sup>+</sup> Rad59 <sup>+</sup>	Este trabajo
CAGL4	$\Delta ura3::imm434/ \Delta ura3::imm434$ $\Delta rad59::hisG/\Delta rad59::hisG$ $RAD52/\Delta rad52::hisG-URA3-hisG$	CAGL17	Uri <sup>+</sup> Rad59 <sup>+</sup>	Este trabajo
CAGL5	$\Delta ura3::imm434/ \Delta ura3::imm434$ $\Delta rad51::hisG/\Delta rad51::hisG$ $RAD52/\Delta rad52::hisG-URA3-hisG$	CAGL19	Uri <sup>+</sup> Rad51 <sup>-</sup> Rad52 <sup>+</sup>	Este trabajo
CAGL6	$\Delta ura3::imm434/ \Delta ura3::imm434$ $\Delta rad51::hisG/\Delta rad51::hisG$ $RAD52/\Delta rad52::hisG-URA3-hisG$	CAGL19	Uri <sup>+</sup> Rad51 <sup>-</sup> Rad52 <sup>+</sup>	Este trabajo
CAGL7 (TCR2.1)*	$\Delta ura3::imm434/ \Delta ura3::imm434$ $\Delta rad52::hisG / \Delta rad52::hisG-URA3-hisG$	CAGL13	Uri <sup>+</sup> Rad52 <sup>-</sup>	Ciudad <i>et al.</i> , 2004
CAGL8 (TCR2.2)*	$\Delta ura3::imm434/ \Delta ura3::imm434$ $\Delta rad52::hisG / \Delta rad52::hisG-URA3-hisG$	CAGL13	Uri <sup>+</sup> Rad52 <sup>-</sup>	Ciudad <i>et al.</i> , 2004
CAGL9	$\Delta ura3::imm434/ \Delta ura3::imm434$ $\Delta rad52::hisG / \Delta rad52::hisG-URA3-hisG$	CAGL1	Uri <sup>+</sup> Rad52 <sup>-</sup>	Este trabajo
CAGL10	$\Delta ura3::imm434/ \Delta ura3::imm434$ $\Delta rad59::hisG/\Delta rad59::hisG$ $\Delta rad52::hisG/\Delta rad52::hisG-URA3-hisG$	CAGL4	Uri <sup>+</sup> Rad59 <sup>-</sup> Rad52 <sup>-</sup>	Este trabajo
CAGL11 (TYB6.1)*	$\Delta ura3::imm434/ \Delta ura3::imm434$ $\Delta rad59::hisG/\Delta rad59::hisG$ $\Delta rad52::hisG/\Delta rad52::hisG-URA3-hisG$	CAGL17	Uri <sup>+</sup> Rad59 <sup>-</sup> Rad52 <sup>-</sup>	Bellido <i>et al.</i> , 2015
CAGL12 (EAT2)*	$\Delta ura3::imm434/ \Delta ura3::imm434$ $\Delta lig4::hisG/\Delta lig4::hisG$ $\Delta rad52::hisG/\Delta rad52::hisG-URA3-hisG$	EAT1.1	Uri <sup>+</sup> Lig4 <sup>-</sup> Rad52 <sup>-</sup>	Ciudad <i>et al.</i> , 2004
CAGL13 (TCR1.1)*	$\Delta ura3::imm434/ \Delta ura3::imm434$ $RAD52/\Delta rad52::hisG$	CAGL2	Uri <sup>-</sup> Rad52 <sup>+</sup>	Ciudad <i>et al.</i> , 2004
CAGL14 (TCR2.1.1)*	$\Delta ura3::imm434/ \Delta ura3::imm434$ $\Delta rad52::hisG / \Delta rad52::hisG$	CAGL7	Uri <sup>+</sup> Rad52 <sup>-</sup>	Ciudad <i>et al.</i> , 2004
CAGL15 (TCR2.2.1)*	$\Delta ura3::imm434/ \Delta ura3::imm434$ $\Delta rad52::hisG / \Delta rad52::hisG$	CAGL8	Uri <sup>+</sup> Rad52 <sup>-</sup>	Ciudad <i>et al.</i> , 2004
CAGL16 (BNC1.1)*	$\Delta ura3::imm434/ \Delta ura3::imm434$ $\Delta rad59::hisG/\Delta rad59::hisG-URA3-hisG$	CAI4	Uri <sup>+</sup> Rad59 <sup>-</sup>	García-Prieto <i>et al.</i> , 2010
CAGL17 (BNC23.1)*	$\Delta ura3::imm434/ \Delta ura3::imm434$ $\Delta rad59::hisG/\Delta rad59::hisG$	CAGL16	Uri <sup>-</sup> Rad59 <sup>-</sup>	Bellido <i>et al.</i> , 2015
CAGL18 (JGR5)*	$\Delta ura3::imm434/ \Delta ura3::imm434$ $\Delta rad51::hisG/\Delta rad51::hisG-URA3-hisG$	CAI4	Uri <sup>+</sup> Rad51 <sup>-</sup>	García-Prieto <i>et al.</i> , 2010

CAGL19 (JGR5A)*	$\Delta ura3::imm434/\Delta ura3::imm434$ $\Delta rad51::hisG/\Delta rad51::hisG$	CAGL18	Uri <sup>-</sup> Rad51 <sup>-</sup>	García-Prieto <i>et al.</i> , 2010
CAGL20 (BYJ26)*	$\Delta ura3::imm434/\Delta ura3::imm434$ $\Delta rad59::hisG/\Delta rad59::hisG$ $\Delta rad51::hisG/\Delta rad51::hisG-URA3-hisG$	CAGL17	Uri <sup>+</sup> Rad59 <sup>-</sup> Rad51 <sup>-</sup>	Bellido <i>et al.</i> , 2015
CAGL21 (BYJ261)*	$\Delta ura3::imm434/\Delta ura3::imm434$ $\Delta rad59::hisG/\Delta rad59::hisG$ $\Delta rad51::hisG/\Delta rad51::hisG$	CAGL20	Uri <sup>-</sup> Rad59 <sup>-</sup> Rad51 <sup>-</sup>	Bellido <i>et al.</i> , 2015
CAGL22 (TYB7.1)*	$\Delta ura3::imm434/\Delta ura3::imm434$ $\Delta rad59::hisG/\Delta rad59::hisG$ $\Delta rad52::hisG/\Delta rad52::hisG$	CAGL11	Uri <sup>-</sup> Rad59 <sup>-</sup> Rad52 <sup>-</sup>	Bellido <i>et al.</i> , 2015
CAGL23	$URA3/\Delta ura3::imm434$	CAI4	Uri <sup>+</sup>	Este trabajo
CAGL24	$URA3/\Delta ura3::imm434$ $\Delta rad59::hisG/\Delta rad59::hisG$	CAGL17	Uri <sup>+</sup> Rad59 <sup>-</sup>	Este trabajo
CAGL25	$URA3/\Delta ura3::imm434$ $\Delta rad51::hisG/\Delta rad51::hisG$	CAGL19	Uri <sup>+</sup> Rad51 <sup>-</sup>	Este trabajo
CAGL26	$URA3/\Delta ura3::imm434$ $\Delta rad59::hisG/\Delta rad59::hisG$ $\Delta rad51::hisG/\Delta rad51::hisG$	CAGL21	Uri <sup>+</sup> Rad59 <sup>-</sup> Rad51 <sup>-</sup>	Este trabajo

**Tabla 2. Cepas de *C. albicans* utilizadas en este trabajo.** Las cepas señalizadas con asterisco (\*) han sido renombradas, entre paréntesis aparece el nombre original.

Cepa	Genotipo	Referencia
W303 haploide	$MATa; ADE2 RAD5 met17-s ade2-1 trp1-1 his3-11,15 can1-100 ura3-1 leu2-3,112$	Cedida por L. Symington
Scrad59- $\Delta$	$MATa; ADE2 RAD5 rad59::LEU2 met17-s ade2-1 trp1-1 his3-11,15 can1-100 ura3-1 leu2-3,112$	Cedida por L. Symington
Scrad51- $\Delta$	$MATa; ADE2 RAD5 rad51::LEU2 met17-s ade2-1 trp1-1 his3-11,15 can1-100 ura3-1 leu2-3,112$	Cedida por L. Symington
Scrad59- $\Delta$ rad51- $\Delta$	$MATa; ADE2 RAD5 rad51::HIS3 rad59::LEU2 met17-s ade2-1 trp1-1 his3-11,15 can1-100 ura3-1 leu2-3,112$	Cedida por L. Symington
Scrad52- $\Delta$	$MATa; ADE2 RAD5 rad52::TRP1 met17-s ade2-1 trp1-1 his3-11,15 can1-100 ura3-1 leu2-3,112$	Cedida por L. Symington
Scrad59- $\Delta$ rad52- $\Delta$	$MATa; ADE2 RAD5 rad59::LEU2 rad52::TRP1 met17-s ade2-1 trp1-1 his3-11,15 can1-100 ura3-1 leu2-3,112$	Cedida por L. Symington
W303 diploide	$MATa/\alpha; ADE2 RAD5 met17-s/met17-s ade2-1/ade2-1 trp1-1/trp1-1 his3-11,15/his3-11,15 can1-100/can1-100 ura3-1/ura3-1 leu2-3,112/leu2-3,112$	Cedida por L. Symington
Scrad59- $\Delta\Delta$	$MATa/\alpha; ADE2 RAD5 rad59::LEU2/rad59::LEU2 met17-s/met17-s ade2-1/ade2-1 trp1-1/trp1-1 his3-11,15/his3-11,15 can1-100/can1-100 ura3-1/ura3-1 leu2-3,112/leu2-3,112$	Este trabajo
Scrad51- $\Delta\Delta$	$MATa/\alpha; ADE2 RAD5 rad51::LEU2/rad51::LEU2 met17-s/met17-s ade2-1/ade2-1 trp1-1/trp1-1 his3-11,15/his3-11,15 can1-100/can1-100 ura3-1/ura3-1 leu2-3,112/leu2-3,112$	Este trabajo
Scrad59- $\Delta\Delta$ rad51- $\Delta\Delta$	$MATa/\alpha; ADE2 RAD5 rad59::LEU2/rad59::LEU2 rad51::HIS3/rad51::HIS3 met17-s/met17-s ade2-1/ade2-1 trp1-1/trp1-1 his3-11,15/his3-11,15 can1-100/can1-100 ura3-1/ura3-1 leu2-3,112/leu2-3,112$	Este trabajo
Scrad52- $\Delta\Delta$	$MATa/\alpha; ADE2 RAD5 rad59::TRP1/rad59::TRP1 met17-s/met17-s ade2-1/ade2-1 trp1-1/trp1-1 his3-11,15/his3-11,15 can1-100/can1-100 ura3-1/ura3-1 leu2-3,112/leu2-3,112$	Bellido <i>et al.</i> , 2015
Scrad59- $\Delta\Delta$ rad52- $\Delta\Delta$	$MATa/\alpha; ADE2 RAD5 rad59::LEU2/rad59::LEU2 rad52::TRP1/rad52::TRP1 met17-s/met17-s ade2-1/ade2-1 trp1-1/trp1-1 his3-11,15/his3-11,15 can1-100/can1-100 ura3-1/ura3-1 leu2-3,112/leu2-3,112$	Este trabajo
JKM139	Wild type	Oum <i>et al.</i> , 2011
Scrad59- $\Delta$ *	$\Delta rad59::KAN$	Oum <i>et al.</i> , 2011
Scrad51- $\Delta$ *	$\Delta rad51::URA3$	Oum <i>et al.</i> , 2011



<i>Scrad51-Δ</i> <i>Scrad59-Δ</i> *	<i>Δrad51::URA3 Δrad59::KAN</i>	Oum <i>et al.</i> , 2011
--	---------------------------------	--------------------------

**Tabla 3. Cepas de *S. cerevisiae* utilizadas en este trabajo.** Con asterisco (\*) se indican las cepas que proceden de JKM139.

Las cepas se conservaron a corto plazo a 4°C. Para poder mantenerlas periodos más prolongados se utilizaron ultracongeladores a -80°C, en este caso se guardaban en glicerol al 40% las bacterias y en glicerol al 16% las levaduras.

### III.2. Medios de cultivo y condiciones de crecimiento

Las levaduras se crecieron en medio complejo YEPD (Lodder, 1970) (2% glucosa, 1% extracto de levadura y 2% peptona bacteriológica) o medio mínimo selectivo SC (2% glucosa, 0,7% YNB sin aminoácidos) a 28°C. Cuando se trataba de medios líquidos, los cultivos eran crecidos en agitadores orbitales a 200 rpm, y cuando se trataba de medios sólidos, se añadía agar a una concentración final del 2% y las placas eran incubadas en estufas a 28°C. A los medios selectivos se les añadía 0,2% de mezcla completa de aminoácidos<sup>1</sup> y en el caso de las cepas con auxotrofias *Ura*<sup>-</sup> o *His*<sup>-</sup> de *C. albicans*, los medios se suplementaban con uridina o histidina a una concentración final de 25 μg/ml o de 10 μg/ml, respectivamente. Durante la construcción de los distintos mutantes de *C. albicans*, los transformantes *Uri*<sup>+</sup> fueron seleccionados en medio SD sin uridina y las cepas *Uri*<sup>-</sup> en medio 5FOA (2% Glucosa, 0,7% YNB con aminoácidos, 0,1% ácido 5-fluoroorótico, 25 μg/ml uridina) (Boeke *et al.*, 1984; Andaluz *et al.*, 2001; Ciudad *et al.*, 2004).

Las bacterias se crecieron en medio LB (1% bacto triptona, 0,5% extracto de levadura, 1% NaCl pH 7) a 37°C. En el caso de medios líquidos, los cultivos eran crecidos en agitadores orbitales a 200 rpm, y cuando se trataba de medios sólidos se añadió agar al 2%, incubando las bacterias en estufas a 37°C. Cuando fue necesario, los medios fueron suplementados con ampicilina a una concentración final de 100 μg/ml.

### III.3. Construcciones

Para obtener los mutantes que llevaban una copia (CAGL1, CAGL3, CAGL4, CAGL5 y CAGL6) o dos copias (CAGL9 y CAGL10) interrumpidas del gen *RAD52*, se siguió el protocolo descrito en Ciudad *et al.*, (2004). En este caso, tanto los mutantes

<sup>1</sup> La Mezcla completa de aminoácidos contiene: 4,5% Ala, Arg, Asn, Asp, Cys, Gln, Glu, Gly, His, Ile, Lys, Met, Phe, Pro, Ser, Thr, Trp, Tyr y Val; 8,9% Leu; 1,1% Ade; 0,5% PABA (Rose *et al.*, 1989)

heterocigóticos (*RAD52/rad52::hisG-URA3-hisG*) como los homocigóticos  $Ura^+$  (*rad52::hisG/rad52::hisG-URA3-hisG*) se comprobaron por PCR usando los oligonucleótidos RV3 y URA2 (Tabla 4).

Para la construcción de los mutantes que llevaban una copia de *URA3* en su propio *locus* (CAGL23, CALG24, CAGL25 y CALG26), se usó el fragmento de 4,9 Kb digerido con *Pst*I-*Bgl*III del plásmido pLUBP que contiene una copia funcional del marcador *URA3* de *C. albicans* (Noble y Johnson, 2005). Los transformantes  $Uri^+$  (que llevan inserto una copia de *URA3* en su propio *locus*), fueron seleccionados en medio sin uridina, y la integración se comprobó por PCR usando los oligonucleótidos *URA3 left flank* y *URA3 right flank* (Tabla 4, Noble y Johnson, 2005).

### III.4. Técnicas de manipulación de ácidos nucleicos

#### III.4.1. Extracción de DNA plasmídico de *E. coli*

El proceso se basa en el método de lisis alcalina descrito por Birnboim y Doly (1979).

Cultivos crecidos durante toda la noche en 50 ml de LB ampicilina a 37°C hasta saturación se recogieron por centrifugación, desechando el sobrenadante. El precipitado obtenido se resuspende en 1 ml de solución P1 (25 mM Tris-HCl pH 8, 10 mM EDTA pH 8, 50 mM Glucosa) incubándolo 5 minutos a temperatura ambiente, tras lo cual se adicionan 2 ml de solución alcalina P2 (200 mM NaOH, 1% SDS) invirtiendo el tubo hasta la formación de una solución mucosa. Se incuba en hielo durante 5 minutos y se añade finalmente 1,5 ml de solución de acetato potásico P3 (3 M acetato potásico, 11,5% ácido acético glacial) mezclándolo bien por inversión e incubándolo posteriormente durante 30 minutos en hielo, centrifugando y traspasando el sobrenadante a un nuevo tubo. Se adiciona 2,5V de etanol al 100% frío, para precipitar el DNA, se centrifuga y se lava posteriormente con etanol al 70%. El precipitado obtenido se resuspende en 500  $\mu$ l de agua estéril, se traspasa a un eppendorf y se adiciona RNAsa a una concentración final de 20  $\mu$ g/ml, incubando 30 minutos a 37°C. Pasado ese tiempo se realizan dos extracciones fenol/cloroformo (1:1) y una extracción con cloroformo/alcohol isoamílico (24:1). La fase acuosa finalmente se precipita con 0,1V de acetato sódico 3M pH 5,3 y 2,5V de etanol al 100%, se lava con etanol al 70% y se resuspende el DNA obtenido en 50 – 100  $\mu$ l de agua.

#### III.4.2. Extracción de DNA cromosómico de levaduras

Para la extracción de DNA genómico se usó el método de “*Smash and Grab*” (Hoffman y Winston, 1987), partiendo de cultivos de 15 ml crecidos durante toda la noche hasta una  $DO_{600}$  de 1 – 2. Se recogen las células por centrifugación para resuspenderlas en 200  $\mu$ l de “*Breaking buffer*” (2% Triton X-100, 1% SDS, 100 mM NaCl, 100 mM Tris-HCl pH 8, 1 mM EDTA pH 8), las células en la solución se traspasan a un eppendorf que contiene 200  $\mu$ l de bolas de vidrio ( $\phi$ 425 – 600  $\mu$ ; Sigma) y 200  $\mu$ l de PCI (25:24:1). La mezcla se agita durante 5 minutos vigorosamente, tras lo cual se añaden 200  $\mu$ l de TE (10 mM Tris-HCl pH 8, 1 mM EDTA pH 8) para centrifugar a 12000 rpm y recuperar la fase acuosa en un nuevo eppendorf. A continuación la muestra se precipita con 0,1V de acetato sódico 3 M pH 5,3 y 2,5V de etanol al 100%, lavando posteriormente con 1ml de etanol 70%. Seguidamente se resuspende en 400  $\mu$ l de TE y se incuba con RNasa (20  $\mu$ g/ml) a 37°C durante 30 minutos. Finalmente se precipita el DNA con 0,013V de acetato amónico 7,5 M pH 8 y 2,5V de etanol al 100%, se lava con etanol al 70% y se resuspende en un volumen adecuado (30 – 50  $\mu$ l) de agua.

#### III.4.3. Digestión de DNA con enzimas de restricción y separación en geles de agarosa

Se utilizaron enzimas de restricción de Fermentas siguiendo las indicaciones de la casa comercial. El volumen final de reacción fue entre 20 – 50  $\mu$ l según los casos. La separación de los fragmentos generados se realizó mediante electroforesis en geles de agarosa al 1% en tampón TAE 1x (TAE 50x: 5,6% ácido acético glacial, 50 mM EDTA pH 8, 2 M Tris-Base) al que se le adicionó bromuro de etidio (BrEt) a una concentración final de 0,5  $\mu$ g/ml. Cuando queríamos distinguir entre bandas pequeñas de tamaño parecido, los geles se hicieron al 2% en las mismas condiciones.

Las muestras se mezclaban con 1/6 de tampón de muestra (5 mM EDTA pH 8; 30% glicerol; 0,025% azul de bromofenol y 52,5% de  $T_{10}E_{1}N_{50}$  (10 mM Tris-HCl pH 8, 50 mM ClNa, 1 mM EDTA pH 8)) para darles densidad y visualizar el frente de electroforesis. La electroforesis se realizó a voltajes constantes que oscilaron entre 50 – 100 voltios en tampón TAE 1x. Los geles fueron fotografiados con un procesador de imágenes *gelprinter plus*.

#### III.4.4. Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

La amplificación de fragmentos de DNA se llevó a cabo con diferentes finalidades, pero de una forma general se trataba de muestras de 25  $\mu$ l que contenían: 1  $\mu$ l de  $MgCl_2$  (50 mM); 2,5  $\mu$ l de tampón comercial sin  $MgCl_2$  10X (Boline); 1  $\mu$ l de mezcla de dNTP 10mM (Fermentas), 0,2  $\mu$ l de Biotaq polimerasa 5 u/ $\mu$ l (Bioline), 1  $\mu$ l de cada uno de los oligonucleótidos (10  $\mu$ M); 0,1 – 0,5  $\mu$ g del DNA molde y agua hasta completar los 25  $\mu$ l de reacción.

Se utilizó un termociclador *T100<sup>TM</sup> ThermalCycler* (Bio-Rad) con el siguiente programa:

1. Etapa de inicio (2 min a 94°C).
2. Etapa de desnaturalización (1 min a 94°C).
3. Etapa de hibridación de los oligonucleótidos, 30'' a 50°C (aunque para optimizar la PCR en algunos casos se varió la temperatura de hibridación).
4. Etapa de elongación (2 min a 72°C).
5. 30 ciclos (de la etapa 2 a la etapa 4).
6. 10 min a 72°C para terminar de amplificar las hebras incompletas.

Los oligonucleótidos utilizados en este trabajo se detallan en las Tablas 4 y 5 (casa comercial StabVida).

Oligonucleótido	Secuencia 5' → 3'	Fragmento amplificado (pb)
<i>Oligonucleótidos usados para comprobar interrupción del gen RAD52</i>		
RV3	CGTGGCATTATGGCCTCTC	2500
URA2	CGAATCAATGGCACTACAGC	
<i>Oligonucleótidos usados para comprobar integración de URA3 en su locus*</i>		
URA3 left flank	GATGTTCTTGAAGCGTAAAAC	1658
URA3 right flank	CACCGTCGATAGTTTTACGG	
<i>Oligonucleótidos usados para comprobar evento de SSA</i>		
RV1	CAACCACGACCACCACAACAA	Wt: 1600 <i>rad52::hisG</i> : 1300
RV2	TGCGGTATACCCGAAGAAGGA	
<i>Oligonucleótidos usados para comprobar la inactivación mutacional</i>		
RV1	CAACCACGACCACCACAACAA	1300
URA3-det-R	GTATGGGGTTGTTGCTCAGG	
<i>Oligonucleótidos usados para comprobar el test cromosoma del Chr6</i>		
RAD52 501F	AGCGGTAAATTTTCAGTA	793
RAD52 1290R	GTCCATTGTTTGTCTGTTT	

**Tabla 4. Oligonucleótidos utilizados en las reacciones de PCR.** \* Noble y Johnson, 2005.

#### III.4.5. Purificación de fragmentos de DNA

Para la purificación de fragmentos de DNA obtenidos mediante PCR se usó el kit “*PCR Purification Kit*” (Qiagen). Mientras que para el aislamiento de fragmentos específicos de DNA a partir de geles de agarosa se utilizó el kit “*GeneClean II*” (Q-Bio-Gene). En ambos se siguieron las instrucciones del fabricante.

#### III.4.6. Ligación

Las reacciones de ligación se realizaban en un volumen de 20  $\mu$ l, con una relación 1/10 vector/fragmento, 2  $\mu$ l de tampón comercial 10x (Fermentas), 1  $\mu$ l (U/ $\mu$ l) de ligasa del fago T4 (Fermentas) y agua; se incubaban a 16°C durante toda la noche.

### III.5. Preparación de muestras para el análisis de SNPs (SNP-RFLP)

Las muestras para el análisis de SNPs se obtuvieron por amplificación en PCR a partir de DNA genómico de cada una de las cepas a estudiar, utilizando los oligonucleótidos adecuados, Forche *et al.*, 2009 (Tabla 4). La reacción de PCR utilizada fue la siguiente (volumen final de 50  $\mu$ l):

1. Etapa de inicio (3 min a 95°C).
2. Etapa de desnaturalización (1 min a 94°C).
3. Etapa de hibridación de los oligonucleótidos, 30’’ a 57°C.
4. Etapa de elongación (1 min a 72°C).
5. 35 ciclos (de la etapa 2 a la etapa 4).
6. 5 min a 72°C para terminar de amplificar las hebras incompletas.

Las muestras fueron visualizadas en un gel de agarosa 1% (5  $\mu$ l de muestra). El resto de la muestra (45  $\mu$ l) se precipitó con 0,1V de acetato sódico y 2,5V de etanol 100%. Se centrifugó a 12000 rpm durante 10min, se lavó con etanol 70% y se resuspendió finalmente en un volumen adecuado de agua estéril (20 – 30  $\mu$ l). Las muestras posteriormente se trataron con la enzima de restricción adecuada según el SNP amplificado (Tabla 4). Tras la digestión, las muestras se sometieron a electroforesis en un gel al 2% de agarosa.

Oligonucleótidos	Tamaño (pb)	Enzima	Fragmentos generados tras la digestión (pb)
122-F	227	<i>ApoI</i> *	a: 91 + 136
122-R			b: 227
123-F	268	<i>BfaI</i> *	a: 122 + 144
123-R			b: 268
132-F	256	<i>Sau96I</i> *	a: 256
132-R			b: 47 + 209
RAD52_501F	793	<i>TaqI</i>	a: 305 + 251 + 237
RAD52_1290R			b: 542 + 251

**Tabla 5. Oligonucleótidos usados en este trabajo con la técnica SNP-RFLP.** “a” y “b” corresponde a cada uno de los homólogos del cromosoma (\* Tomado de Forche *et al.*, 2009).

### III.6. Hibridación de ácidos nucleicos

#### III.6.1. Marcaje radiactivo de sondas de DNA

Fragmentos de DNA amplificados por PCR u obtenidos por digestión de DNA plasmídico fueron marcados con  $^{32}\alpha$ -PdCTP (PerkinElmer) utilizando el kit “*Randomprimed DNA Labeling kit*” (Roche). La mezcla de reacción fue la siguiente: entre 20 – 25 ng de DNA, 1  $\mu$ l (10 mM) de cada uno de los dNTPs (excepto dCTP), 2  $\mu$ l (10x) de hexanucleótidos, 2,5  $\mu$ l de  $^{32}\alpha$ -PdCTP (10  $\mu$ Ci/ $\mu$ l) y 1  $\mu$ l (2 U) de enzima klenow, todo ello en un volumen final de 20  $\mu$ l.

La reacción se deja incubar durante 30 min a 37°C, y posteriormente el DNA marcado se purifica mediante columnas de purificación *MicroSpin* (GE Healthcare). Para ello se drenó la columna durante 2 min a 3000 rpm, y seguidamente se añadieron los 20  $\mu$ l de reacción más 30  $\mu$ l de agua. Finalmente se centrifugó durante 4 min a 3000 rpm recuperando en un eppendorf un volumen final de 50  $\mu$ l.

#### III.6.2. Análisis Southern blot

Una vez extraído el DNA genómico de las levaduras y digerido con la enzima específica (según caso), los fragmentos fueron separados en un gel de agarosa al 1% para posteriormente ser transferidos a una membrana de Nylon (Biodyne) mediante capilaridad. Para ello el gel es sometido a desnaturalización durante 45 min en agitación en 200 ml de la solución desnaturalizante (1,5 M NaCl, 0,5 M NaOH), posteriormente se neutraliza durante 30 min en agitación en 200 ml de la solución neutralizante (1 M Tris-Base, 1,5 M NaCl, ajustada con HCl a pH 7,5). Para realizar la transferencia se dispusieron los siguientes elementos, enumerados según su orden de colocación: una bandeja que contenía SSC 20x (3 M NaCl, 0,45 M ácido cítrico, ajustado a pH 7 con NaOH 10N), dentro de ella un soporte sobre el que se dispuso un papel de filtro

Whatmann 3MM embebido en esta solución de transferencia y con sus extremos en contacto con dicha solución, el gel invertido con el DNA a transferir, la membrana de Nylon humedecida en la solución de transferencia (cortada a la misma medida del gel y colocada asegurando que no quedaran burbujas entre ambas capas) y tres papeles de filtro Whatmann 3MM humedecidos en dicha solución SSC 20x. Por último se colocó papel de filtro y un soporte sobre el que se depositó un objeto de peso con el fin de asegurar el contacto entre todos los elementos. Se dejó transfiriendo durante toda la noche, y al día siguiente la membrana se lavó durante 5 min en solución SSC 2x. Por último se fijó el DNA en un Spectrolinker (120 mJ/cm<sup>2</sup>) *XL-1000 UV Crosslinker* (Spectronics Corporation).

Una vez tenemos el DNA transferido, la membrana se somete a pre-hibridación en un horno de hibridación *ProBlotHybridization Oven* (Labnet) durante 2 horas a 65°C en 15 ml de una solución que contiene SSC 6x, solución Denhardt's 12,5x (1% ficoll, 1% polivinilpirrolidona, 1% BSA fracción V), 0,5% SDS y 100 µg/ml de DNA de esperma de salmón (Stratagene).

Pasado ese tiempo de pre-hibridación se añade la sonda previamente desnaturalizada a 95°C durante 10 min y se deja hibridando a 65°C durante toda la noche. Al día siguiente se lava la membrana dos veces con solución SSC 5x, 0,1% SDS y otras dos veces con solución SSC 0,1x, 0,1% SDS, manteniendo de 20 a 25 min cada lavado. Finalmente se lava en SSC 2x para quitarle los restos de SDS y se empaqueta en un "film" transparente para ponerlo finalmente en el casete de exposición. Las bandas marcadas se revelaron utilizando el *Molecular Imager FX* (BioRad) a las 4 – 6 horas de exposición. La cuantificación de las bandas marcadas isotópicamente se realizó utilizando el Quantity ONE-1D Software (BioRad).

### **III.7. Electroforesis en campo pulsante (PFGE)**

Una muestra de 0,1 ml de un cultivo exponencial de *C. albicans* fue utilizada para inocular 10 ml de medio YEPD, que fue mantenido en agitación a 28°C durante 48 horas. Las células fueron centrifugadas y lavadas dos veces con agua estéril, y resuspendidas en 0,45 ml de tampón CPES (40 mM ácido cítrico, 120 mM fosfato de sodio, 20 mM EDTA pH 8, 1,2 M sorbitol, 5 mM DTT), suplementado con 0,2 mg de Zymoliasa 20000A. Una alícuota de 0,5 ml de CPE (igual que el tampón CPES pero sin sorbitol, sin DTT y sin Zymoliasa), que contiene agarosa al 1% de bajo punto de fusión a 50°C, se adicionó y el total fue mezclado vigorosamente. Alícuotas de 200 µl fueron

transferidas después a un molde de muestras y se mantuvieron a  $-20^{\circ}\text{C}$  durante 20 min. Cuando los bloques formados (*plugs*) se solidificaron, fueron transferidos a tubos de 15 ml, suplementados con 6 ml de CPE, e incubados a  $30^{\circ}\text{C}$  durante 4 horas. El CPE se reemplazó después por 5 ml de tampón TEST (1 M Tris-HCl pH 8, 0,5 M EDTA pH 8, 2% SDS, 1 mg/ml de proteinasa K) y se incubó durante toda la noche a  $30^{\circ}\text{C}$  o  $55^{\circ}\text{C}$  (ver sección III.10). Las muestras fueron lavadas después 3 veces con TE (10 mM Tris-HCl pH 8, 1 mM EDTA pH 8) a  $50^{\circ}\text{C}$  y 6 veces a temperatura ambiente. Los *plugs* se almacenaron a  $4^{\circ}\text{C}$  en 50 mM EDTA pH 8.

El protocolo estándar de separación de los cromosomas de *C. albicans*, permite visualizar todos los cromosomas excepto los homólogos del Chr6 y Chr7. Las muestras fueron sometidas a electroforesis en campo pulsante (BIO-RAD), en un gel al 0,6% de agarosa durante 24 horas a 80 voltios con una rampa lineal de 120-300 seg, y después 48 horas a 80 voltios con 420-900 seg de rampa lineal. Se usó también un segundo protocolo para separar ambos homólogos de los cromosomas más pequeños, Chr6 y Chr7 (Legrand *et al.*, 2004; Lephart *et al.*, 2005). En este caso, las muestras se corrieron en un gel al 1% de agarosa a 180 voltios con una rampa lineal de 60-120 seg,  $120^{\circ}$  de ángulo durante 48 horas; y después a 120 voltios con 300-420 seg de rampa lineal,  $120^{\circ}$  durante 48 horas, en el mismo aparato.

### III.8. Transformación

#### III.8.1. Transformación en *E. coli*

La transformación de bacterias requiere dos pasos: la obtención de células competentes y la transformación de dichas células. La obtención de células competentes de *E. coli* se basó en el método descrito por Chung *et al.* (1989).

Células de la cepa JM109 son crecidas durante toda la noche a  $37^{\circ}\text{C}$  en LB ampicilina para inocular un matraz de 250 ml a una DO de 0,2. Las células son incubadas a  $37^{\circ}\text{C}$  durante dos horas hasta que alcancen una densidad óptica aproximada de 0,5 y se incuban en hielo otras dos horas. Posteriormente se recogen por centrifugación a 3000 rpm durante 15 min, deseamos el sobrenadante y las bacterias son resuspendidas en 10 ml de “*trituration buffer*” (100 mM  $\text{CaCl}_2$ , 70 mM  $\text{MgCl}_2$  40 mM acetato sódico pH 5,5). Se incuban en hielo durante 45 min y se recogen las células por centrifugación (3000 rpm durante 15 min). Finalmente las células son resuspendidas en una solución formada por el “*trituration buffer*” con glicerol al 15%. Se distribuyen



en alícuotas de 200  $\mu$ l, rápidamente son congeladas en nieve carbónica y se mantienen a  $-80^{\circ}\text{C}$  hasta su utilización.

Para transformar las bacterias se utilizaron alícuotas de *E. coli* competentes congeladas a  $-80^{\circ}\text{C}$ , y se utilizó el método descrito por Kushner (1988). Una vez descongeladas se mezcla 10  $\mu$ l del producto de la ligación con las células competentes, manteniéndolo en hielo durante 30 min. Tras lo cual calentamos a  $42^{\circ}\text{C}$  durante 45 – 90 seg y se vuelve a poner en hielo 2 min. Se añaden 200  $\mu$ l de medio LB precalentado a  $37^{\circ}\text{C}$  y se incuba durante 1 hora a  $37^{\circ}\text{C}$ . Tras la hora se centrifugan a 12000 rpm durante 1 min para bajar las células, se resuspenden en 300  $\mu$ l de agua, se siembran en las placas LB ampicilina y se incuban a  $37^{\circ}\text{C}$ .

### III.8.2. Transformación en *C. albicans*

El método utilizado para transformar a células de *C. albicans* se basó en el descrito por Wilson *et al.* (1999). A partir de cultivos crecidos durante toda la noche, se inoculan 50 ml de medio YEPD con uridina a una  $\text{DO}_{600}$  0,3. Tras aproximadamente 3 horas de incubación y llegar hasta una DO aproximada de 1,2 – 1,3 se recogen las células y se lavan con agua estéril. El precipitado obtenido se pasa a un eppendorf, donde es lavado nuevamente con 1 ml de agua estéril y se resuspende en 300  $\mu$ l de solución LATE (100 mM acetato de litio, 10 mM Tris-HCl pH 8, 1 mM EDTA pH 8).

Una vez tenemos las células en la solución LATE, se prepara la mezcla de transformación que llevará 100  $\mu$ l de suspensión celular, 10  $\mu$ l de DNA de esperma de salmón 10 mg/ml, 5  $\mu$ g de DNA (plásmido pL1 digerido con *Bam*HI/*Kpn*I) y 600  $\mu$ l del tampón PLATE (50% de Polietilenglicol 4000 en el tampón LATE); todo ello se mezcla vigorosamente durante aproximadamente 10 seg y se incuba a  $30^{\circ}\text{C}$  durante toda la noche. Al día siguiente se le da un choque térmico durante 15 min a  $45^{\circ}\text{C}$ , tras el cual las células son lavadas con 1 ml de agua para finalmente sembrarlas en placas de selección SC-ura e incubarlas  $28^{\circ}\text{C}$  durante aproximadamente 3 días hasta la aparición de colonias.

### III.9. Test de fluctuación: obtención de 5FOA<sup>R</sup>

Las cepas fueron sacadas en medio sólido YEPD de cultivos a  $-80^{\circ}\text{C}$  e incubadas a  $30^{\circ}\text{C}$  durante 48 horas. Una vez crecidas, fueron resembradas en nuevas placas de medio sólido YEPD para aislar colonias e incubadas a  $30^{\circ}\text{C}$  durante 2-4 días. Diez o más colonias independientes fueron resuspendidas en 100  $\mu$ l de agua estéril. 10  $\mu$ l

fueron usados para las diluciones seriadas y sembrar en placas de YEPD para determinar el número total de células sembradas en 5FOA; mientras que los otros 90  $\mu\text{l}$  fueron sembrados en placas 5FOA (Figura 9). Sólo colonias de tamaños parecidos se contaron para asegurar que se habían generado durante la formación de la colonia y no durante la incubación de las placas 5FOA. Todas las placas fueron incubadas a 30°C durante 3-4 días y las colonias fueron contadas. Las tasas de 5FOA<sup>R</sup> fueron calculadas por el método de la mediana (Lea y Coulson, 1949) como describe Reenan y Kolodner (1992).

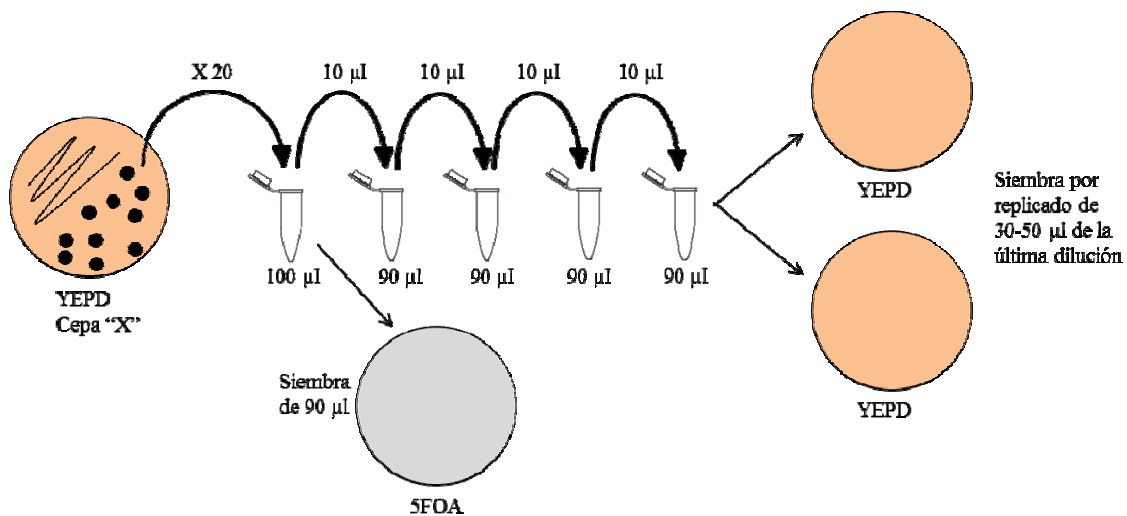


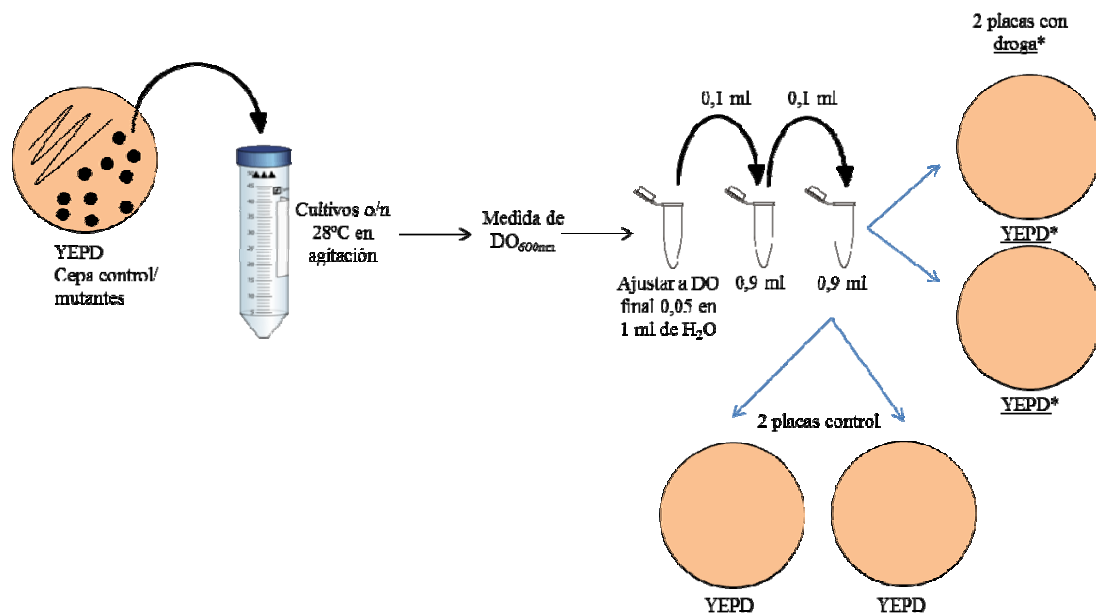
Figura 9. Esquema del protocolo seguido para obtener segregantes 5FOA<sup>R</sup>.

### III.10. Tratamiento de agentes que dañan el DNA

Todos los ensayos se iniciaron con cultivos de *C. albicans* y *S. cerevisiae* crecidos a 28°C durante toda la noche (en fase estacionaria).

En el efecto de la exposición crónica (siempre en presencia de la droga) en los ensayos de CFU (Figura 10), se realizaron las diluciones necesarias para obtener 300-400 unidades formadoras de colonias (CFU) aproximadamente en las placas de YEPD control. Con las mismas diluciones se sembraron las placas con los agentes mutagénicos (MMS, Camptotecina). Las placas se incubaron a 28°C durante 48 horas en oscuridad (para evitar la degradación de algunas drogas como el MMS) y se contaron para calcular el porcentaje de supervivencia en cada caso. El MMS fue suministrado por Sigma-Aldrich, y la camptotecina por *MBL International Corporation*. Todos los ensayos se realizaron por duplicado y repetidos tres o más veces.

En el caso de la luz UV, las placas de YEPD (una vez sembradas tras las diluciones) fueron irradiadas con las dosis indicadas en un *Spectrolinker-XL-1000UV Crosslinker*. Se incubaron a 28°C durante 48 horas en oscuridad para evitar la reparación mediante fotoliasa y se contaron para calcular el porcentaje de supervivientes en cada caso. La fotoliasa está presente en *S. cerevisiae*, pero no se ha encontrado en *C. albicans* (Ciudad *et al.*, 2004; Legrand *et al.*, 2008; Miller y Sarachek, 1974). Todos los ensayos se realizaron por duplicado y fueron repetidos tres o más veces.



**Figura 10. Esquema del protocolo seguido en el tratamiento crónico de agentes que dañan al DNA.** Las placas marcadas con \* se suplementaron con las concentraciones del agente mutagénico en cada caso (en los experimento con luz UV, no se suplementaron y fueron irradiadas con las dosis señaladas en cada caso).

Para determinar la supervivencia después de un tratamiento agudo (en presencia de la droga durante un periodo de tiempo), alrededor de  $5 \times 10^5$  células en crecimiento exponencial se resuspendieron en 1 ml de solución salina tamponada con fosfato (PBS) (para ensayos con MMS) o en 1 ml de medio rico YEPD (para ensayos con CPT) y se incubaron con MMS durante 30 min a temperatura ambiente y con CPT 120 min a 30°C. Los controles se mantuvieron en PBS (MMS) o en YEPD sin adicionar droga. Las mezclas incubadas se diluyeron  $10^{-3}$  veces con PBS, y 50  $\mu$ l (que contiene de 300-400 CFU) se sembraron en placas de YEPD e incubadas a 30°C durante 48 horas para determinar el número de colonias.

### III.11. Generación de lesiones inducidas por MMS y CPT

La alquilación se indujo como describe Lundin *et al.*, (2005). Las cepas de *C. albicans* se crecieron durante toda la noche en medio rico YEPD. Las células se lavaron y se resuspendieron en YEPD a densidades ópticas de 5. A continuación se añadió MMS a una concentración final de 0,05% o CPT (40 µg/ml) y las suspensiones celulares se pusieron en agitación a 30°C hasta 120 min (MMS) o hasta 8 horas (CPT). Se recogieron muestras a diferentes tiempos de incubación (30, 60, 90 y 120 min para MMS y 2, 4 y 8 horas para CPT) y se neutralizó con tiosulfato sódico (para MMS; 10% de tiosulfato sódico en proporción 1:1). Se lavaron las células con YEPD y se prepararon los *plugs* a 55°C o 30°C para PFGE.

En el caso de la recuperación de lesiones lábiles al calor después de un tratamiento agudo, un cultivo en fase exponencial se trató con 0,05% MMS durante 30 min en tampón PBS. Pasado el tiempo, el MMS se neutralizó con tiosulfato sódico (1:1), se lavaron las células con YEPD y se tomó la primera muestra para PFGE (tratada). Posteriormente el resto de células se incubaron en medio YEPD sin la droga y se incubaron a 30°C con agitación. A diferentes tiempos (1, 2, 4, 8 y 24 horas) se tomaron muestras para la determinación tanto de CFU y para PFGE. Los *plugs* para PFGE se prepararon y posteriormente se trataron con proteinasa K (1 mg/ml; ver apartado III.7) a 55°C o 50°C durante 24 horas. Este mismo protocolo se siguió para recuperar células en tampón PBS y para recuperar células paradas en G2 mediante la adición previa de nocodazol (a concentración final de 20 µg/ml). En este caso, las células se dejaron en reposo con el tampón durante las 24 horas de recuperación a fin de minimizar la muerte celular debido a la mitosis con el DNA dañado (Ma *et al.*, 2011). Paralelamente a la recogida de cada una de las muestras, se tomaron datos de DO<sub>600</sub>.

### III.12. Microscopía

La observación y fotografiado de microorganismos fueron realizados con un microscopio *Nikon eclipse 600*, con un objetivo de 40x acoplado a un sistema de fotografía *Nikon FDX-35*.

### III.13. Preparación y análisis de muestras para citometría de flujo (FACS)

Se refrescó un cultivo o/n hasta una DO de 0,3 y se incubó durante dos horas a 30°C con agitación. A continuación, se adicionó CPT a una concentración final de 40 µg/ml (tratamiento agudo) y se mantuvo a 30°C en agitación durante 24 horas con la

droga. Se tomaron muestras (alrededor de  $10^6$  células) para análisis FACS a diferentes tiempos (2, 4, 8 y 24 horas) y se centrifugaron para lavar las células dos veces con YEPD. Seguidamente las muestras se fijaron en 500  $\mu$ l con etanol 70% y se lavaron dos veces con PBS centrifugando a 5000 rpm durante 5 min. Se desechó el sobrenadante y las células se resuspendieron en 950  $\mu$ l de PBS. Se añadió 50  $\mu$ l de RNAsa (10 mg/ml) y 1  $\mu$ l de *Sybr Green* (SG). Toda la mezcla se incubó durante 2 horas a 37°C en oscuridad y agitación suave. Pasado el tiempo se analizaron las muestras en citómetro de flujo.



## **IV. Resultados y Discusión**





**IV.1. Capítulo I:** Competencia entre rutas de recombinación responsables de la pérdida espontánea del marcador *URA3* flanqueado por repeticiones directas (*hisG*) en *C. albicans*: Papel de los genes de HR *RAD51*, *RAD52* y *RAD59*



Las lesiones en el DNA surgen espontáneamente durante la proliferación normal de las células (endógenas) a tasas bajas ( $2,2 \times 10^{-10}$  eventos por generación celular), pero su frecuencia puede aumentar significativamente en presencia de un número de compuestos (exógenos) denominados genéricamente genotoxinas. La reparación de estas lesiones por parte de los varios sistemas de reparación del DNA restablece la información genética de la célula. Sin embargo, la reparación también puede causar reordenamientos genómicos cuya ubicación y frecuencia está influenciada en gran medida por la estructura del genoma, en particular, por la presencia de elementos repetitivos (Chan y Kolodner, 2011). Las copias repetidas de segmentos de DNA son blancos potenciales para la recombinación homóloga (HR) si la resección de las roturas de doble cadena (DSB) expone secuencias complementarias.

La recombinación mediada por homología puede ser conservativa o no conservativa. Los mecanismos conservativos incluyen las dos principales vías/modelos de recombinación homóloga: síntesis dependiente del apareamiento de banda (SDSA) y reparación de roturas de doble cadena (DSBR) (Heyer *et al.*, 2010), lo que puede conducir a conversión génica de alelos con o sin *crossovers* (y, por lo tanto, pérdida de heterocigosidad –LOH– si hay regiones heterocigóticas involucradas). Sin embargo, la reparación a través de estas vías también puede resultar en la alteración del número de copias de genes (mediado por *crossovers* desiguales entre las regiones que llevan repeticiones directas) o en grandes reordenamientos cromosómicos (GCR) (mediados por translocaciones recíprocas utilizando un donante ectópico) (Pardo y Aguilera, 2012). Los mecanismos HR no conservativos, incluyen la recombinación inducida por rotura (BIR) y el apareamiento de cadena sencilla (SSA), que resultan en pérdida de la información genética y pueden generar inversiones, deleciones, LOH y translocaciones no recíprocas (Chaleff y Fink, 1980; Roeder y Fink, 1982; Surosky y Tye, 1985; Dunham *et al.*, 2002; Umezu *et al.*, 2002). HR utiliza genes que pertenecen al grupo de epistasis de *RAD52* (Symington *et al.*, 2014).

El proceso de SSA se postuló por primera vez para explicar algunas características de recombinación extracromosómica en células de mamíferos (Lin *et al.*, 1984; Chakrabarti y Seidman, 1986) y también se propuso para explicar la recombinación espontánea de repeticiones directas con la pérdida de la secuencia entre ellas en levaduras (McDonald y Rothstein, 1994; Maines *et al.*, 1998; Smith y Rothstein, 1999). Además de mediar en la reparación de DSBs entre repeticiones directas causando deleciones, SSA está implicado en la recombinación entre

repeticiones invertidas (Vanhulle *et al.*, 2007; Mott y Symington, 2011), reemplazamiento génico (*gene targeting*) (Gao *et al.*, 2008), formación de translocaciones usando repeticiones localizadas en diferentes cromosomas (Pannunzio *et al.*, 2008; 2010) y fusión de cromosomas (Wang y Baumann, 2008). Puesto que SSA no implica invasión de banda, es un proceso independiente de Rad51 que requiere la actividad de reasociación de ssDNA complementarios de Rad52 y algunas veces la de Rad59, un parálogo de Rad52. Rad59 tiene aproximadamente la mitad de tamaño que Rad52 y muestra homología con los dominios N-terminal de unión al DNA y de multimerización de Rad52, lo que permite la interacción entre ambas proteínas (Davis y Symington, 2001; 2003). Rad59 también tiene actividad de reasociación de ssDNA *in vitro* y se cree que aumenta la actividad de reasociación de bandas de Rad52 *in vivo* (Petukhova *et al.*, 1999; Wu *et al.*, 2006). De hecho, mutantes *rad59* fueron defectivos en SSA cuando las repeticiones directas eran cortas (Sugawara *et al.*, 2000; Davis y Symington, 2001; Pannunzio *et al.*, 2008). Además de las proteínas de recombinación, Rad52 y Rad59, SSA requiere factores adicionales, incluyendo nucleasas de resección 5' → 3' así como la endonucleasa Rad1-Rad10 y el complejo de reconocimiento Msh2-Msh3.

La caracterización de SSA se llevó inicialmente a cabo en cepas haploides de *S. cerevisiae* (es decir, en ausencia de competencia con otros mecanismos de recombinación basados en homología como la recombinación entre cromosomas homólogos) e implicó la creación de un DSB entre las repeticiones. Bajo estas condiciones, se encontró que SSA era dependiente de Rad52 cuando la longitud de las repeticiones era de 1-2 Kb (Rudin y Haber, 1988; Fishman-Lobell *et al.*, 1992; Sugawara y Haber, 1992) pero no cuando las repeticiones eran mucho más grandes como las del gen *CUPI* o las de los genes de RNAr (Ozenberger y Roeder, 1991). Nuevos trabajos revelaron que otros genes del grupo de epistasis de *RAD52*, incluyendo *RAD51* y sus parálogos *RAD54*, *RAD55* y *RAD57*, eran prescindibles para SSA (Ivanov *et al.*, 1996), mientras que este proceso se vio significativamente afectado (40 veces para repeticiones de 205 pb) en ausencia de *RAD59* (Sugawara *et al.*, 2000). En presencia de Rad52 y Rad59, HO indujo SSA utilizando repeticiones de tan solo 29 pb y mostró una dependencia lineal de la longitud de repeticiones homologas hasta 415 pb.

Un mecanismo SSA espontáneo (es decir, sin inducir DSB) también puede conducir a la pérdida de una copia de las repeticiones directas y de la secuencia que las separa. En *S. cerevisiae*, la tasa espontánea de recombinación entre repeticiones directas

también fue directamente proporcional a la longitud de la repetición, pero la longitud mínima de repetición para una recombinación eficiente fue de 285 pb. Apenas se detectó recombinación para repeticiones de 80 pb, y ninguna para repeticiones de 37 pb (Jinks-Robertson *et al.*, 1993). Esto sugiere la existencia de diferencias específicas entre SSA inducido por HO y espontáneo.

El genoma de *C. albicans*, el hongo patógeno más común, es particularmente rico en repeticiones. Cerca de la mitad de las *ORFs* de *C. albicans* (alrededor de 2600) contienen repeticiones, un número tres y diez veces superior a la mostrada por *S. cerevisiae* y *Schizosaccharomyces pombe*, respectivamente (Braun *et al.*, 2005). Se cree que la variación en el número de repeticiones causadas por el deslizamiento durante la replicación y la recombinación puede proporcionar una ventaja evolutiva, ya que genera una población de especies proteicas que difieren en propiedades funcionales en un entorno altamente cambiante. Por ejemplo, los cambios en el número de repeticiones de las proteínas Als5 o Hwp1 localizadas en la superficie de la pared celular, afecta a su potencial adhesivo (Staab *et al.*, 2004, Rauceo *et al.*, 2006). Otros genes parcialmente caracterizados, como *EAP1*, *PIR1*, *CEK1*, *HYR1*, *HYR2*, *RLM1* y *ALS* de la familia de las adhesinas también llevan repeticiones. En Pir1, las repeticiones están involucradas en la localización de la proteína, mientras que en Eap1 posicionan sus sitios de unión. El papel de la variación en el número de repeticiones en otras proteínas está lejos de ser clara. Para *PNG2*, que codifica para una glicosilasa de la pared celular, parece que la variación en el número de repeticiones no está relacionada con la adaptación a corto plazo; más bien puede ayudar a optimizar las interacciones entre *C. albicans* y el hospedador a largo plazo, mediante la adaptación de la combinación de alelos al fondo genético específico proporcionado por la mezcla de alelos (Zhang *et al.*, 2010).

En *C. albicans* la mayoría de las repeticiones son cortas, pero otras como las presentes en las proteínas *ALS* alcanzan los 108 pb. Debido al alto número de *ORFs* que llevan repeticiones en *C. albicans*, hemos tratado de identificar vías que conducen a la modificación de repeticiones directas y analizar el papel de Rad51, Rad52 y Rad59 en la selección de las vías de recombinación que participan en esos procesos. Estos procesos pueden alterar el número de repeticiones y por lo tanto generar nuevos alelos de una *ORF* específica; además, la recombinación entre las repeticiones de dos genes de la misma familia (por ejemplo, *ALS*) podría conducir a la formación de quimeras dotadas con propiedades que pueden ser ventajosas para la supervivencia en el huésped (Zhao *et al.*, 2011).

### IV.1.1. Sistema experimental

#### IV.1.1.1. Técnica del URA blaster

Nuestros ensayos están basados en la técnica del URA blaster que utiliza el marcador reciclable *URA3* flanqueado por repeticiones *hisG* de *Salmonella typhimurium*. Desde su desarrollo y aplicación en la introducción de mutaciones en cepas  $Uri^-$  de *C. albicans* por Fonzi e Irwin (1993), esta construcción se ha utilizado ampliamente para la interrupción de genes y la generación de nuevas cepas auxotróficas de este hongo patógeno oportunista. Cada casete de interrupción específico de *ORF*, consiste en la construcción *hisG-URA3-hisG* flanqueada por 200-300 pb de las regiones promotora y terminadora del gen diana. Los heterocigotos  $Uri^+$  se generan por sustitución del gen diana por el casete de interrupción en la cepa CAI4 (Figura 1). Los derivados  $Uri^-$  que surgen espontáneamente durante el crecimiento en medio rico por recombinación entre las repeticiones directas de *hisG* u otros eventos, pueden ser seleccionados en placas de agar suplementadas con 5FOA y posteriormente utilizarse para interrumpir el segundo alelo (Figura 11).

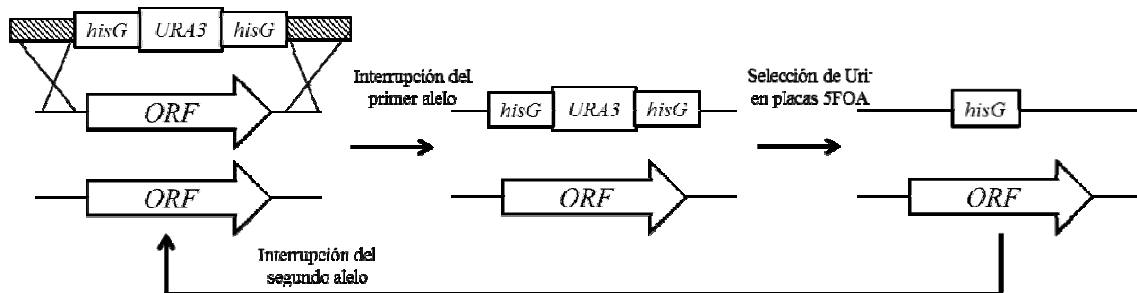


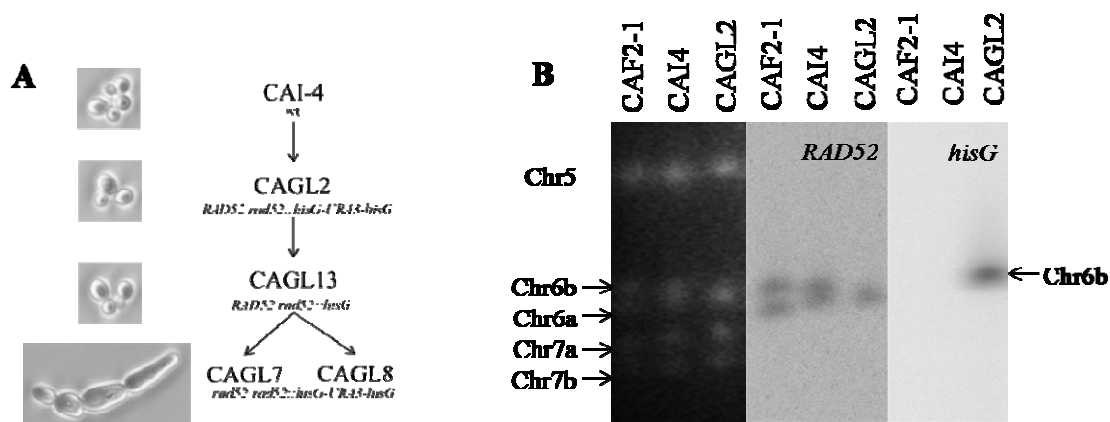
Figura 11. Esquema de la interrupción secuencial de una *ORF* en la cepa CAI4 utilizando la técnica del URA blaster.

#### IV.1.1.2. Loci analizados

Hemos elegido *CaRAD52* (Chr6L – brazo izquierdo del Chr6 – coordenadas 97,417 a 95,723) como el *locus* test para determinar la pérdida de *URA3* en cepas  $Rad52^+$  (*RAD52/rad52::hisG-URA3-hisG*) de *C. albicans*, ya que también permite el análisis de mutantes nulos *rad52-ΔΔ* (*rad52::hisG/rad52::hisG-URA3-hisG*) que son refractarios al reemplazamiento génico (Ciudad *et al.*, 2004).

IV.1.1.3. Identificación del alelo *RAD52* y el test cromosoma en cepas heterocigóticas (*RAD52/rad52*) y en nulos homocigóticos *rad52* respectivamente

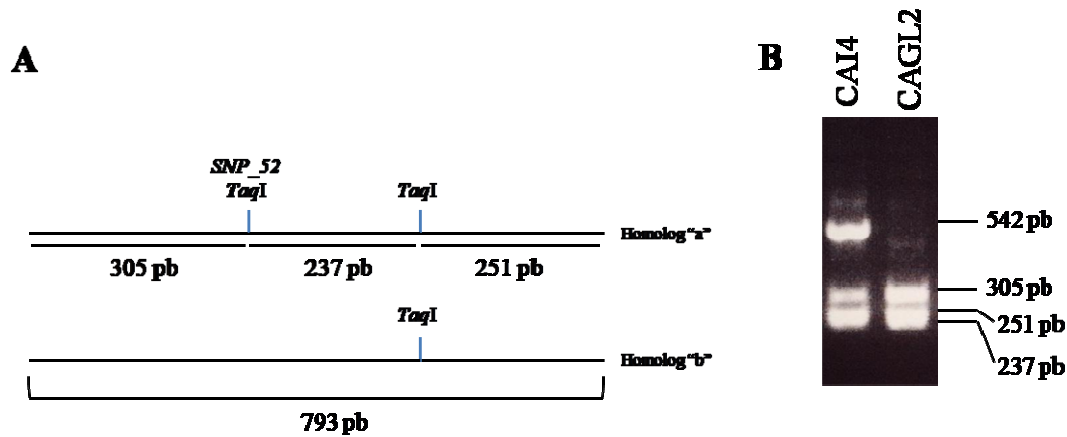
Las cepas CAGL7 y CAGL8 son dos mutantes nulos independientes *rad52*- $\Delta\Delta$  *Uri*<sup>+</sup> que derivan del mismo parental heterocigótico, CAGL13 (un segregante 5FOA<sup>R</sup> de la cepa CAGL2) (Figura 12A). Hemos demostrado en trabajos anteriores que CAGL7 y CAGL8 conservan ambos homólogos del Chr6 (Andaluz *et al.*, 2011; Chauhan *et al.*, 2005). La presencia de los dos homólogos del Chr6 en los mutantes CAG2, CAGL7, CAGL8, así como en el resto de mutantes utilizados en este trabajo, los convierten en apropiados para la generación de 5FOA<sup>R</sup> y posterior análisis genético de los derivados *Uri*<sup>-</sup>. Para identificar el test cromosoma en las cepas CAGL7 y CAGL8, primero se realizó un análisis físico de los homólogos del Chr6 presentes en la cepa parental CAGL2. La hibridación *Southern blot* de los cariotipos (PFGE) de la cepa CAGL2 utilizando varias sondas localizó *RAD52* (sonda de *RAD52*) en el homólogo pequeño del Chr6 (Chr6a) y *rad52::hisG* (sonda *hisG*) en el más grande (Chr6b) (Figura 12B). Por tanto, durante la generación de los mutantes nulos CAGL7 y CAGL8, *RAD52*b presente en el Chr6 de mayor tamaño (Chr6b) fue el primer alelo interrumpido primero.



**Figura 12. Identificación de test cromosoma en cepa heterocigótica CAGL2.** A) Esquema de la construcción de CAGL7 y CAGL8 a partir de CAI4. B) Cariotipos electroforéticos y *Southern blot* usando sondas indicadas.

El análisis mediante RFLP (utilizando los oligonucleótidos *RAD52*<sub>591F</sub> y *RAD52*<sub>1290R</sub>, Comunicación personal del Dr. Gómez-Raja, Ver materiales y métodos, Tabla 5) de un SNP (G/A) situado en la *ORF* del gen *RAD52* también identificó *RAD52a* como el alelo presente en CAGL2 tras la digestión con la enzima *TaqI* (bandas de 305 + 251 + 237 pb) (Figura 13B). Es importante destacar que ambos homólogos tienen un sitio adicional común de corte para *TaqI*, por ello ambos tienen en

común la banda de 251 pb (Figura 13A). Esta estrategia se utilizó rutinariamente para identificar el test cromosoma (Chr6) de todos los mutantes construidos.



**Figura 13. Identificación del test cromosoma en cepas heterocigóticas (*RAD52/rad52::hisG-URA3-hisG*).** A) Esquema del patrón de bandas que se obtiene tras la digestión con la enzima señalada. B) Electroforesis en gel de agarosa 2%.

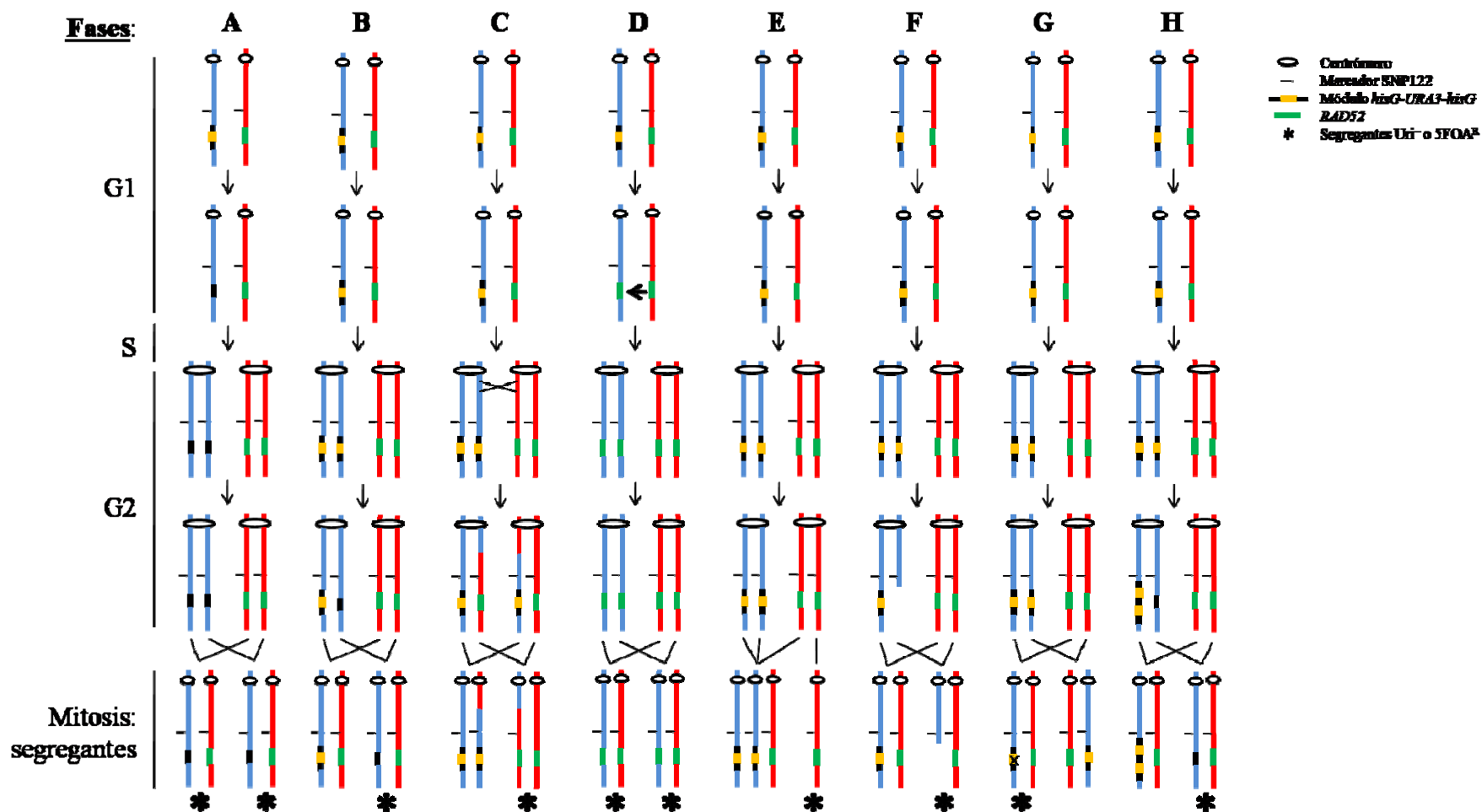
#### IV.1.1.4. Naturaleza de los eventos genéticos asociados con la inactivación del marcador *URA3*

En cepas  $Rad52^+$ , los derivados  $Uri^-$  que aparecen en las placas 5FOA pueden formarse por: 1) Deleción (“pop-out” -PO-) del *URA3* y una copia de las dos repeticiones de *hisG* [lo cual a su vez puede surgir por a) un mecanismo similar a SSA que implica recombinación espontánea intracromátida entre repeticiones directas, b) sobrecruzamiento -crossover- intracromosómico o intracromátida (ICCO), c) intercambio desigual entre cromátidas hermanas (USCE), o d) microhomología mediada por recombinación no homóloga (MMEJ)], 2) HR entre cromosomas homólogos (IH) [incluyendo conversión génica (GC), “crossover” (CO) o BIR], 3) recombinación ectópica (ECT), 4) pérdida de cromosoma (CL) y 5) rotura de cromosoma (CT) (Cauwood *et al.*, 2013) (Figura 14). SSA, ICCO y USCE originan el genotipo *RAD52/rad52::hisG* (Figura 14A, B y H), mientras que el resto de eventos generan genotipos *RAD52/RAD52* o *RAD52/-*. Por lo tanto, la amplificación por PCR usando cebadores que flanquean la *ORF* de *RAD52* pueden distinguir los eventos que implican deleción (“looping”) (banda de 1,6 Kb para *RAD52* y banda de 1,3 Kb para *rad52::hisG*) del resto de eventos (una sola banda de amplificación de *RAD52*). El análisis SNP-RFLP permitió acotar el fragmento genómico en que ocurrieron los eventos genéticos que producen el genotipo *RAD52*. Por ejemplo, un evento de CO



entre *CEN6* y el SNP122 seguido por la migración de las dos cromátidas *RAD52* a la misma célula, resulta en homocigosis de *RAD52* y SNP122 (SNP122a si *RAD52* está en Chr6a, o SNP122b si *RAD52* está en Chr6b) (Figura 14C), mientras que un CO entre el SNP122 y *RAD52*, seguido por la segregación de las cromátidas *RAD52* a la misma célula, dejará el SNP122 heterocigótico. Un patrón similar será generado por un evento de GC local utilizando *RAD52* como donante (Figura 14D). Todos estos eventos genéticos han sido caracterizados en *S. cerevisiae* (Cauwood *et al.*, 2013; Rattray y Symington, 1995; Paques y Haber, 1999).

El genotipo *RAD52/RAD52* también puede originarse por pérdida de cromosoma seguido de la duplicación del cromosoma residual (Figura 14E). Para identificar estos eventos en las células homocigóticas para *RAD52*, analizamos los marcadores SNP 122, 123 y 132. Cuando los tres marcadores eran homocigóticos (Legrand *et al.*, 2008), se consideró que las cepas se generaron por pérdida de cromosoma. Estudios anteriores (Andaluz *et al.*, 2011) sugieren que sólo las cepas que tienen interrumpido el gen *RAD52* con el casete en el homólogo b (test Chr6b) podrían generar segregantes *Uri*<sup>-</sup> mediante pérdida de cromosoma. Finalmente, el genotipo *RAD52* puede ser también generado por rotura de cromosoma (CT) que resulta en la hemicigosis de *RAD52* y de todos los genes entre *RAD52* y el telómero izquierdo (Figura 14F). Es importante destacar que no detectamos rotura de cromosomas entre los segregantes *Uri*<sup>-</sup> derivados de cepas *Rad52*<sup>+</sup>, pero este evento fue muy común entre los segregantes derivados de una cepa *rad52::hisG/rad52:hisG-URA3-hisG* (Andaluz *et al.*, 2011).



**Figura 14. Mecanismos de inactivación del marcador *URA3*.** Una cepa diploide heterocigótica lleva una sola copia del módulo *hisG-URA3-hisG* y fue crecida bajo condiciones específicas y posteriormente seleccionados los resistentes a 5FOA. Los eventos moleculares que pueden llevar a la inactivación del marcador *URA3* son: A) SSA entre repeticiones directas en G1 o B) en G2; C) CO en G2 entre *CEN6* y *RAD52*; D) GC en G1 (nótese que también puede ocurrir en G2); E) CL tras segregación defectiva (no disyunción) de cromátidas en G2; F) CT; G) inactivación mutacional del marcador *URA3* y H) USCE en G2. Ver también Cauwood *et al.*, 2013.

#### IV.1.2. Inactivación del marcador *URA3* en cepas heterocigóticas *ORF/orf::hisG-URA3-hisG*

Cuando se creció en placas con 5FOA, la cepa *RAD52/rad52::hisG-URA3-hisG* (CAGL2) generó segregantes  $Uri^-$  (5FOA<sup>R</sup>) con una tasa de  $1,045 \times 10^{-5}$  eventos por generación celular (Tabla 6). El análisis de los electrocariotipos de 12 segregantes independientes, no evidenció alteraciones cromosómicas (datos no mostrados). El análisis por PCR reveló que 11 de los 12 segregantes independientes (92%, Tabla 7) habían surgido por recombinación intracromátida (SSA, ICCO o USCE), ya que conservaron el alelo *RAD52* mientras que el alelo interrumpido (*rad52::hisG-URA3-hisG*) había sido procesado a *rad52::hisG*. El otro segregante (8%, Tabla 7) llevaba sólo el alelo *RAD52*, lo que sugiere eventos de recombinación entre homólogos (GC, CO o BIR). La heterocigosidad del SNP132 confirmó la presencia de ambos homólogos del Chr6 en todos los segregantes, mientras que la homocigosis tanto del SNP122 como del SNP123 en el segregante *RAD52/RAD52* sugiere que se había formado por eventos de *crossover* o BIR entre *CEN6* y el SNP123. La cepa utilizada (CAGL2) lleva la configuración *RAD52a/rad52b::hisG-URA3-hisG* (Test Chr6b). Una cepa con la configuración opuesta (CAGL1, test Chr6a) produjo segregantes  $Uri^-$  con una tasa de  $2,1 \times 10^{-5}$  eventos/célula/generación (Tabla 6), que es sólo el doble de la mostrada por la cepa CAGL2. Además, el 100% de los segregantes independientes analizados (24/24) se formaron por SSA/ICCO/USCE (Tabla 7). Finalmente, los cariotipos electroforéticos tampoco mostraron reordenamientos cromosómicos. Estos datos no son significativamente diferentes de los generados por la cepa CAGL2. Por tanto, concluimos que la pérdida del marcador en presencia de Rad52 1) ocurre preferentemente a través de SSA/ICCO/USCE frente a IH u otros eventos, 2) los eventos CL o CT, si existen, son extremadamente raros, y 3) los resultados son independientes del homólogo del Chr6 usado como test cromosoma.

Cepas	Genotipo	Test Chr	Tasa FOA <sup>R</sup> (evento/célula/ Generación)	Media
CAGL1	<i>RAD52/rad52::hisG-URA3-hisG</i>	a	2,100 x 10 <sup>-5</sup>	1,572 x 10 <sup>-5</sup>
CAGL2		b	1,045 x 10 <sup>-5</sup>	
CAGL3	<i>rad59::hisG/rad59::hisG</i>	a	4,390 x 10 <sup>-6</sup>	4,495 x 10 <sup>-6</sup>
CAGL4		b	4,600 x 10 <sup>-6</sup>	
CAGL5	<i>rad51::hisG/rad51::hisG</i>	a	3,090 x 10 <sup>-6</sup>	3,928 x 10 <sup>-6</sup>
CAGL6		b	4,767 x 10 <sup>-6</sup>	
CAGL7	<i>rad52/rad52::hisG-URA3-hisG</i>	a	4,150 x 10 <sup>-6</sup>	6,104 x 10 <sup>-6</sup>
CAGL8		a	7,680 x 10 <sup>-6</sup>	
CAGL9		b	6,481 x 10 <sup>-6</sup>	
CAGL10	<i>rad59::hisG/rad59::hisG</i>	a	3,570 x 10 <sup>-5</sup>	3,285 x 10 <sup>-5</sup>
CAGL11		b	3,000 x 10 <sup>-5</sup>	
CAGL12	<i>lig4::hisG/lig4::hisG</i> <i>rad52/rad52::hisG-URA3-hisG</i>	b	9,630 x 10 <sup>-5</sup>	-

**Tabla 6. Resumen de los experimentos de fluctuación FOA<sup>R</sup>.** Tabla resumen con las cepas, sus genotipos, cromosoma testado (Test Chr6a: cuando el casete de interrupción se encontraba en el homólogo a; y Test Chr6b: cuando el casete de interrupción se encontraba en el homólogo b), tasas de aparición de 5FOA<sup>R</sup> y medias entre cepas con el mismo genotipo de los experimentos de fluctuación realizados.

Cepas	Eventos genéticos				
	SSA	IH (GC/CO)	CL	CT	IM
CAGL1	100 % (24)	-	-	-	-
CAGL2	92% (11)	8% (1)	-	-	-
CAGL3	85% (17)	10% (2)	-	-	5% (1)
CAGL4	83% (20)	12,5% (3)	5% (1)	-	-
CAGL5 (Exp. 1)	65% (13)	-	-	20% (4)	15% (3)
CAGL5 (Exp. 2)	80% (8)	-	-	10% (1)	10% (1)
CAGL6	85% (17)	-	10% (2)	-	5% (1)
CAGL7	-	-	-	90% (9)	10% (1)
CAGL8	12,5% (1)	-	-	87,5% (7)	-
CAGL9	15% (3)	-	30% (6)	55% (11)	-
CAGL10	-	-	-	90% (9)	10% (1)
CAGL11 (Exp. 1)	-	-	11,1% (1)	66,7% (6)	22,2% (2)
CAGL11 (Exp. 2)	-	-	20% (3)	73,3% (11)	6,7% (1)
CAGL12	4,2% (1)	-	45,8% (11)	50% (12)	-

**Tabla 7. Frecuencias de eventos genéticos que llevan a la inactivación de URA3 en colonias 5FOA<sup>R</sup>.** GC: conversión génica; CO: crossover; CL: pérdida de cromosoma; CT: rotura de cromosoma; IM: inactivación mutacional. En las cepas CAGL5 y CAGL11 se obtuvieron 5FOA<sup>R</sup> de dos experimentos independientes (Exp. 1 y Exp. 2).

#### IV.1.3. Papel de *RAD59* en la tasa y eventos genéticos que llevan a la inactivación del marcador *URA3*

Rad59, un parálogo de Rad52, participa en eventos mediados por SSA en *S. cerevisiae*, siendo su papel más decisivo cuando las repeticiones directas son cortas (Sugawara *et al.*, 2000; Pannunzio *et al.*, 2008). Por tanto, hemos examinado el efecto

de la ausencia de Rad59 en la frecuencia de eventos genéticos que conducen a la aparición de segregantes  $Uri^-$ . Dos cepas *rad59-ΔΔ*, cada una con un test cromosoma diferente (CAGL3 con Chr6a y CAGL4 con Chr6b) produjeron segregantes  $Uri^-$  (5FOA<sup>R</sup>) con unas frecuencias medias de  $4,39 \times 10^{-6}$  y  $4,6 \times 10^{-6}$  eventos por generación celular respectivamente (Tabla 6), que son aproximadamente de 5 y 2,5 veces inferiores, respectivamente, a las mostradas por cepas *RAD59/RAD59*. Además, el 85% (17/20) y el 83% (20/24) de los segregantes de las cepas *rad59-ΔΔ RAD52/rad52a::hisG-URA3-hisG* y *rad59-ΔΔ RAD52/rad52b::hisG-URA3-hisG* respectivamente, se formaron por SSA/ICCO/USCE (Tabla 7). Los 2 segregantes residuales (10%) de la cepa test Chr6a y 3 segregantes (12,5%) de la cepa test Chr6b se formaron por IH (GC, CO o BIR), mientras que un segregante de la segunda cepa (Chr6b) llevaba una inactivación mutacional del marcador *URA3* (Tabla 7). Estas proporciones no fueron estadísticamente diferentes de las mostradas por cada una de las cepas *Rad59<sup>+</sup>*. Además, el análisis de PFGE tampoco reveló reordenamientos en el Chr6 (Figura 15). Concluimos que en presencia de Rad52, Rad59 parece favorecer la tasa de los eventos de recombinación dependientes de homología responsables de la formación de segregantes  $Uri^-$ , pero apenas afecta, si algo, la tendencia hacia SSA/ICCO/USCE frente a HR. Ello implicaría que Rad59 contribuye en igual medida a los eventos *pop-out* y a los eventos IH o favorece ligeramente los proceso IH en las condiciones ensayadas.

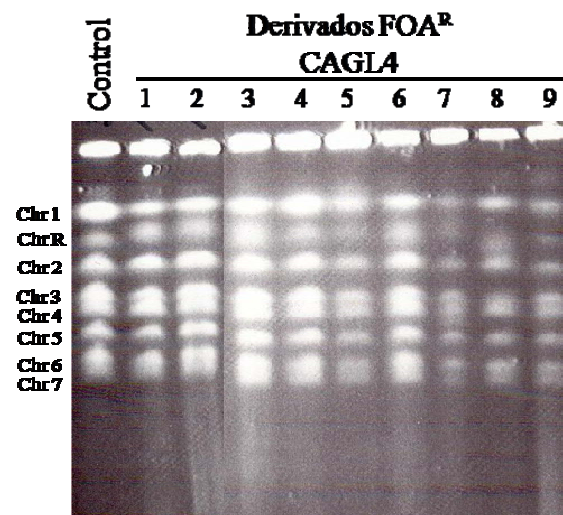


Figura 15. Cariotipos electroforéticos de una cepa *rad59-ΔΔ RAD52/rad52::hisG-URA3-hisG* (CAGL4) y sus derivados 5FOA<sup>R</sup>. Análisis PFGE de algunos segregantes 5FOA<sup>R</sup> de la cepa CAGL4 (Chr6b).

#### IV.1.4. Identificación de mecanismos que conducen a la pérdida de *URA3* en cepas *rad52-ΔΔ*

Debido a la inestabilidad intrínseca de cepas *rad52-ΔΔ* (Andaluz *et al.*, 2011), en primer lugar comparamos dos cepas isogénicas independientes *rad52::hisG/rad52::hisG-URA3-hisG*, CAGL7 y CAGL8 (Figura 12). Ambas cepas generan segregantes 5FOA<sup>R</sup> en tasas similares ( $4,15 \times 10^{-6}$  y  $7,68 \times 10^{-6}$  eventos por generación celular) (Tabla 6), cuya media es sólo dos veces menor que la tasa calculada para la cepa control CAGL2 (*RAD52/rad52::hisG-URA3-hisG*) ( $1,045 \times 10^{-5}$  eventos por generación de células). Los cariotipos electroforéticos, tinción con BrEt y posterior hibridación *Southern*, revelaron que el 80-90% de los segregantes Uri<sup>-</sup> de cada cepa se formaron por roturas del Chr6 (Figura 16A y B). El tamaño aparente de los C6Fs se correlacionó bien con la zigosidad del marcador SNP122. Entre los segregantes Uri<sup>-</sup> que muestran rotura cromosómica derivados de la cepa CAGL8, el marcador SN122 sólo permaneció heterocigótico en uno de ellos, que correspondía al que exhibe el CF de mayor tamaño. La segunda cepa *rad52-ΔΔ*, CAGL7, generó en promedio C6F de mayor tamaño; en concordancia, sólo dos segregantes que llevaban fragmentos pequeños del Chr6, se habían hecho homocigóticos para el SNP122b. Independientemente de la cepa *rad52-ΔΔ* usada, todos los segregantes fueron heterocigóticos para los marcadores SNP123 y SNP132, lo que excluye eventos de CL. Dado que el Chr6 tiene un tamaño de 1,032 Mb y puesto que el marcador SNP123 está a 237 Kb centrómero proximal del SNP122 y a 443 Kb del telómero izquierdo, concluimos que no se generan CFs menores de 540 Kb. La falta de eventos CL está en consonancia con la configuración de las cepas usadas CAGL7 y CAGL8, cuyo test cromosoma corresponde a Chr6a. Es importante destacar que estos resultados dan una estimación del rango de variabilidad esperado para la tasa de formación de Uri<sup>-</sup>, para el porcentaje de cada uno de los eventos que condujeron a la inactivación del marcador *URA3* y para el tamaño de los CF en cepas isogénicas independientes Rad52<sup>-</sup> de *C. albicans*.

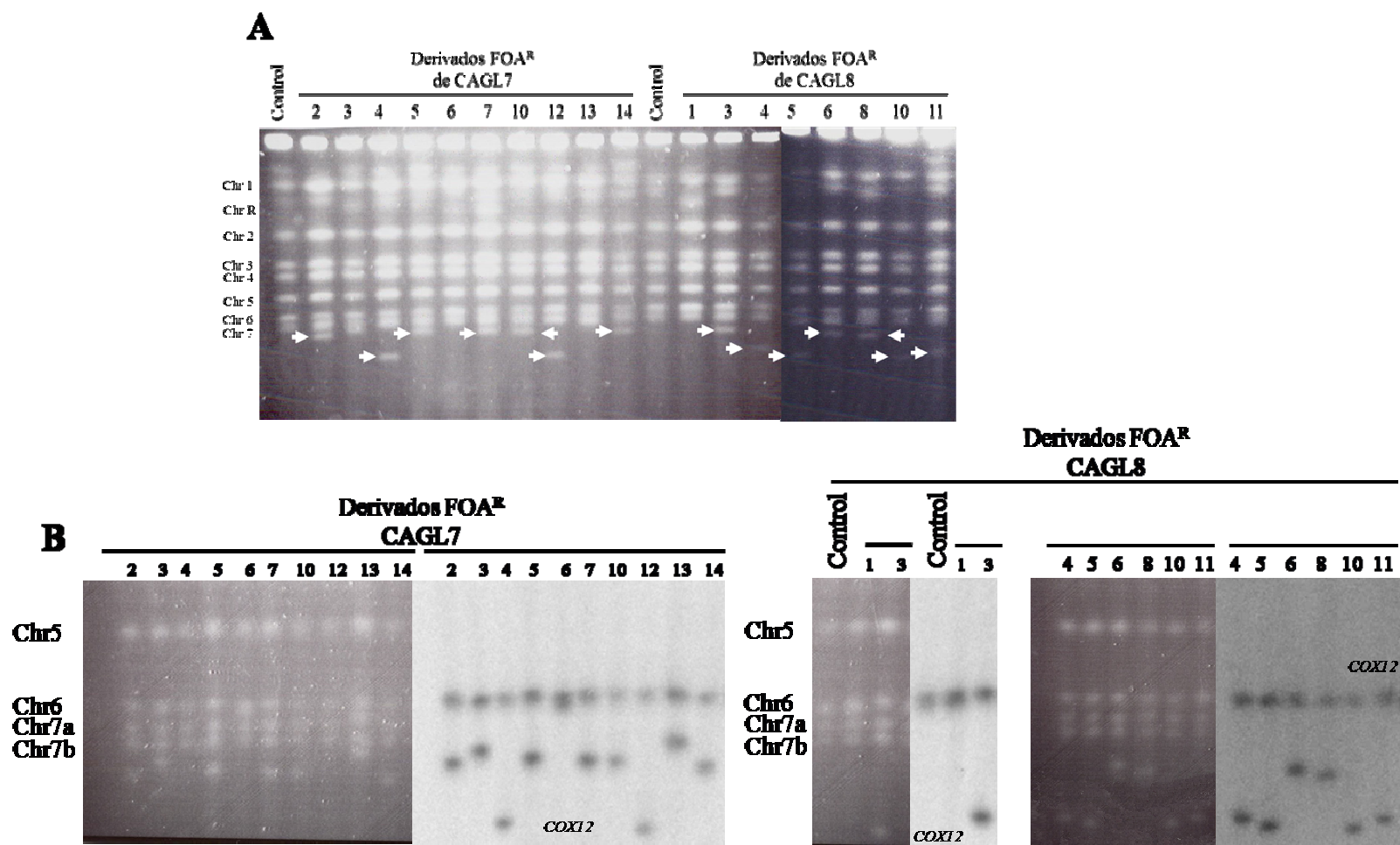
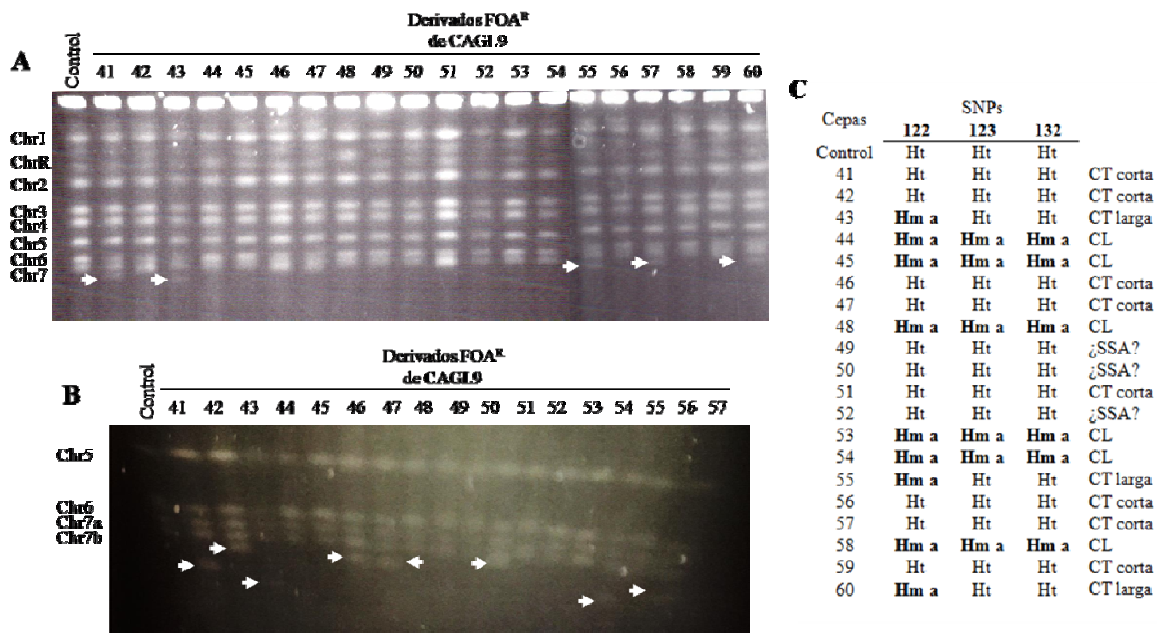


Figura 16. Cariotipos electroforéticos de cepas *rad52::hisG/rad52::hisG-URA3-hisG* (CAGL7 y CAGL8) y sus derivados FOA<sup>R</sup>. A) Cariotipos electroforéticos (carrera estándar) de los derivados 5FOA<sup>R</sup> de cepas CAGL7 y CAGL8. B) Cariotipos electroforéticos (carrera larga) (izquierda) y *Southern* usando sonda indicada (derecha) de los derivados 5FOA<sup>R</sup> de cepas CAGL7 y CAGL8. Las cabezas de flechas blancas en el panel A indican fragmentos que derivan del Chr6a.

El análisis de una cepa *rad52*- $\Delta\Delta$  con Test Chr6b (CAGL9), generó segregantes 5FOA<sup>R</sup> con una tasa de  $6,481 \times 10^{-6}$  eventos por generación celular (Tabla 6), que es similar a la de las dos cepas con configuración contraria. Como era de esperar del test cromosoma presente en la cepa CAGL9, sus segregantes 5FOA<sup>R</sup> exhibieron un número significativo de eventos CL (30%, 6/20) (Tabla 7; Figura 17C). El resto de segregantes (70%, 14/20) eran heterocigóticos para los marcadores SNP132 y SNP123 (Figura 17C). El análisis PFGE/*Southern blot* indicó que, con excepción de las 6 cepas que exhiben CL, casi todos los segregantes (11/20) presentaban C6Fs cuyas longitudes se correlacionaron bien con la zigosidad del SNP122 (8 heterocigóticos y 3 homocigóticos) (Tabla 7; Figura 17A y B). Además, ningún CF fue menor de 540 Kb como se deduce de la heterocigosidad del marcador SNP123 (Figura 17C). Es importante destacar que, independientemente de la cepa *rad52*- $\Delta\Delta$  utilizada, unos pocos segregantes (1/8 en CAGL8 y 3/20 en CAGL9) no mostraron cambios aparentes en la movilidad de los homólogos del Chr6, y permanecieron heterocigóticos para los marcadores SNP122, SNP123 y SNP132, abriendo la posibilidad de que se formaran por un mecanismo similar a SSA (Tabla 7; Figura 17C).

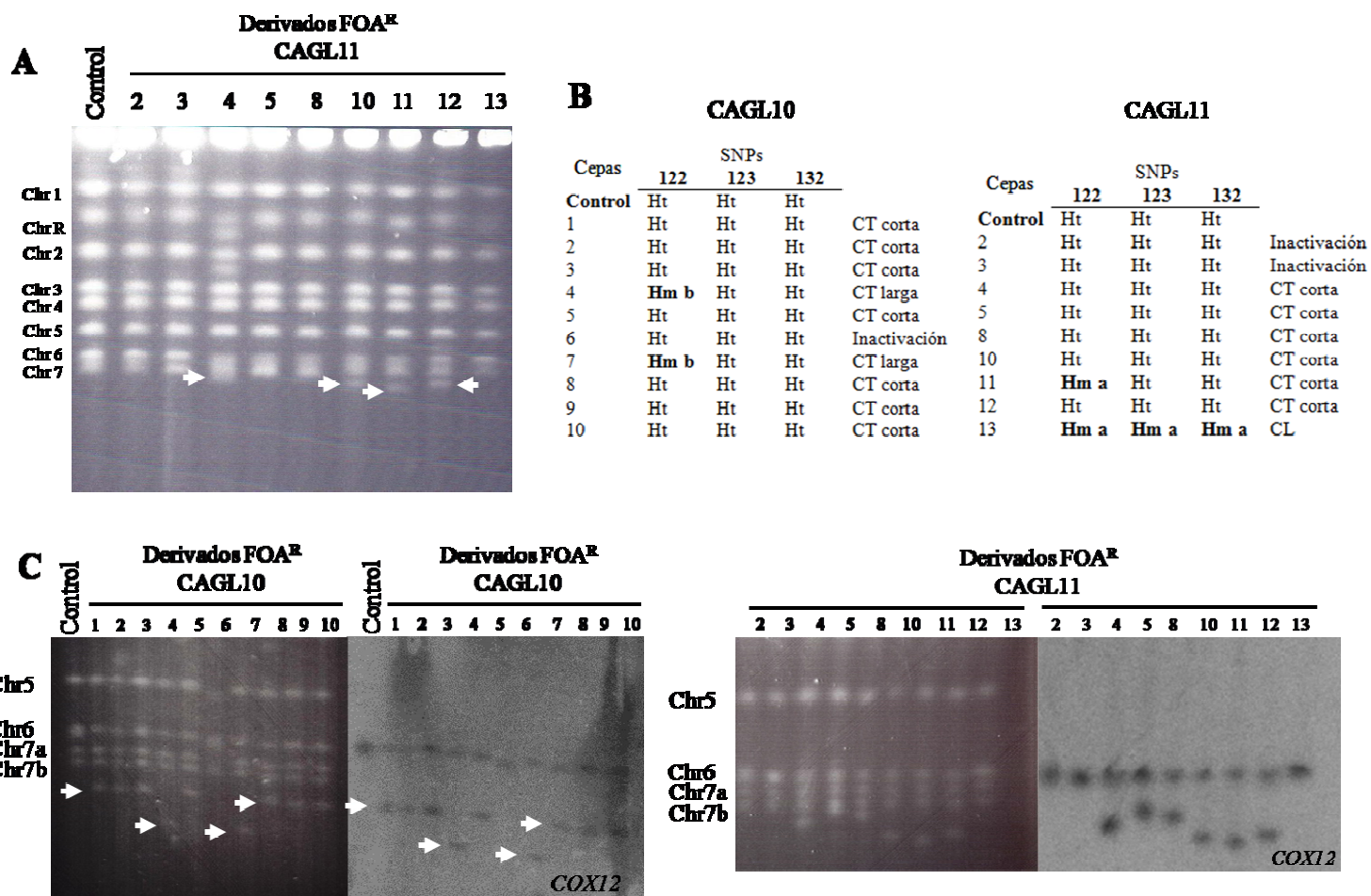


**Figura 17. Cariotipos electroforéticos y análisis de SNPs de la cepa *rad52::hisG/rad52::hisG-URA3-hisG* (CAGL9, test Chr6b). A y B) Cariotipos electroforéticos de los derivados 5FOA<sup>R</sup> de la cepa *rad52*- $\Delta\Delta$  utilizando PFGE estándar (A) y en carrera larga (B). C) Tabla de resultados con los SNPs. Las cabezas de flechas blancas en los paneles A y B indican fragmentos que derivan del Chr6b.**



#### IV.1.5. Papel de Rad59 y Lig4 en recombinación entre repeticiones *hisG* con el casete URA blaster en cepas Rad52<sup>-</sup>

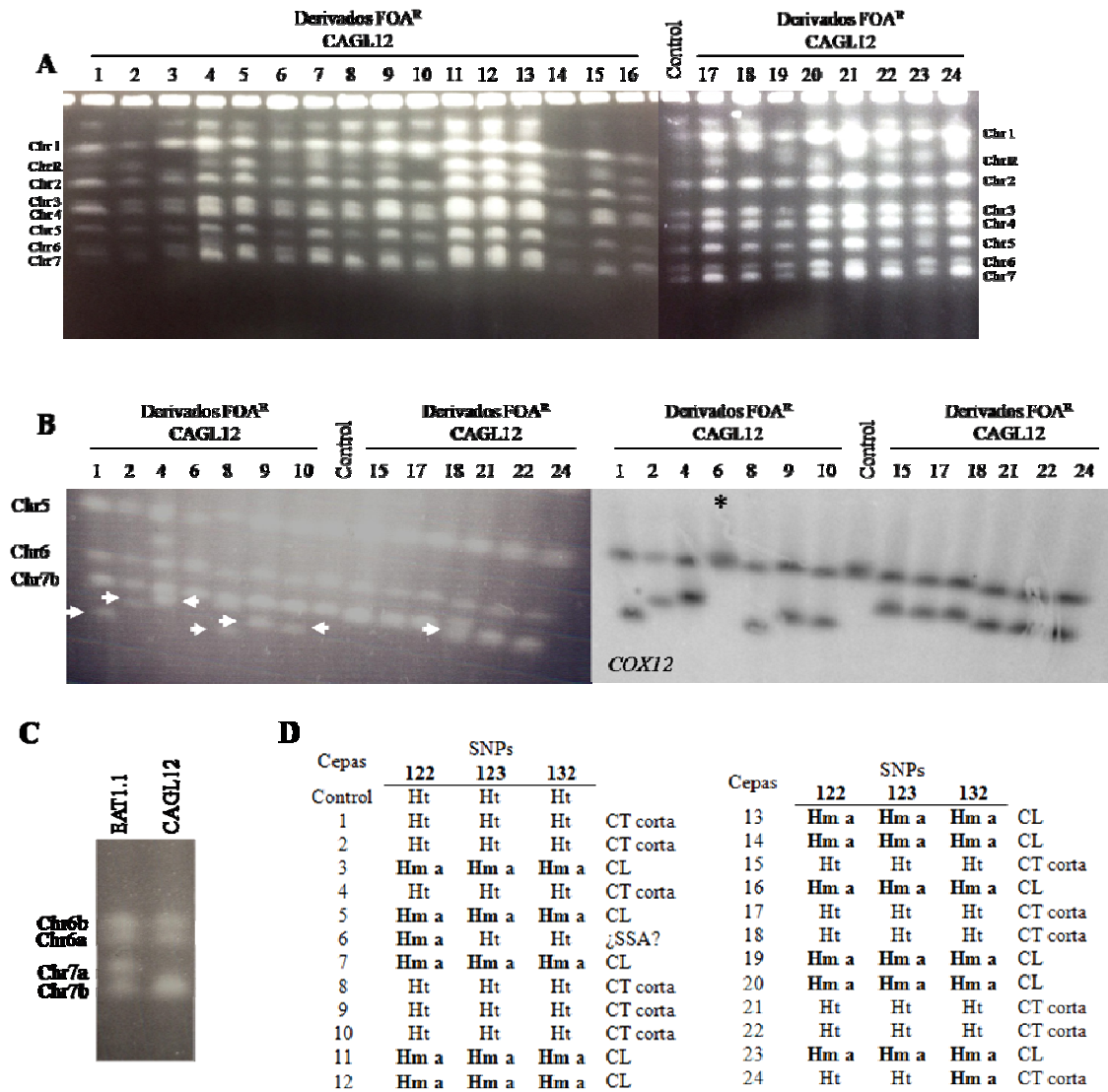
Aunque en células Rad52<sup>+</sup> la ausencia de Rad59 no modificó la proporción en el tipo silvestre de SSA frente a HR, uno podría esperar que la actividad de apareamiento de bandas (“*strand annealing*”) de Rad59 fuese la responsable de los pocos eventos SSA detectados en ausencia de Rad52 (Figura 17). Si esto es cierto, un doble mutante *rad59-ΔΔ rad52::hisG/rad52::hisG-URA3-hisG* no debería generar segregantes 5FOA<sup>R</sup> mediante SSA. Dos cepas independientes *rad59-ΔΔ rad52-ΔΔ* que difieren en el homólogo del Chr6 usado como test cromosoma, Chr6a (CAGL10) y Chr6b (CAGL11), generaron segregantes 5FOA<sup>R</sup> con tasas de  $3,570 \times 10^{-5}$  y  $3,570 \times 10^{-5}$  eventos por generación celular (Tabla 6), significativamente mayores (unas 10 veces) que las mostradas por los mutantes simples *rad52-ΔΔ* (CAGL7, CAGL8 y CAGL9). El análisis físico de los cromosomas de estos segregantes indicó que 6 de 9 (CAGL11) y 9 de 10 (CAGL10) exhibían C6Fs (Figura 18A y C, Tabla 7), una proporción similar o incluso menor que la encontrada para clones 5FOA<sup>R</sup> derivados de un mutante simple *rad52::hisG/rad52::hisG-URA3-hisG*. Por lo tanto, parece que en ausencia de Rad52, Rad59 disminuye el rendimiento de los supervivientes 5FOA<sup>R</sup> (cepas Uri<sup>-</sup>), pero no influye en la naturaleza ni en la proporción relativa de los eventos responsables de la formación de segregantes. Aunque los tamaños de los C6Fs eran en promedio más grande que los mostrados por derivados *rad52-ΔΔ* Rad59<sup>+</sup>, permanecieron dentro del rango permitido para dos cepas isogénicas *rad52-ΔΔ* (Figura 18A y C). De acuerdo con el tamaño mayor de los C6F, la mayoría de los segregantes 5FOA<sup>R</sup> derivados de CAGL10 permaneció heterocigótico para el SNP122 y sólo dos derivados, que corresponden a segregantes que llevan los C6F con mayor movilidad, se habían hecho homocigóticos para SNP122b (Figura 18B). El segundo doble mutante, CAGL11, tuvo una proporción similar de segregantes homocigóticos y heterocigóticos para el SNP122a (Figura 18B). Un derivado 5FOA<sup>R</sup> del doble mutante CAGL11 fue homocigótico para los tres marcadores analizados (SNP122a, SNP123a y SNP132a), lo que sugiere que había perdido el Chr6b (Figura 18B). El resto fueron heterocigóticos para el marcador SNP123.



**Figura 18.** Cariotipos electroforéticos y análisis de SNPs de cepas *rad59-ΔΔ rad52::hisG/rad52::hisG-URA3-hisG* (CAGL10 y CAGL11). A) Cariotipos electroforéticos (carrera estándar) de los derivados 5FOA<sup>R</sup> de la cepa *rad59-ΔΔ rad52-ΔΔ* (test Chr6b). B) Tabla de resultados con los SNPs analizados a los derivados 5FOA<sup>R</sup> de las cepas *rad59-ΔΔ rad52-ΔΔ* test Chr6a (izquierda) y *rad59-ΔΔ rad52-ΔΔ* test Chr6b (derecha). C) Cariotipos electroforéticos (carrera larga) y *Southern blot* usando la sonda indicada de los derivados 5FOA<sup>R</sup> de *rad59-ΔΔ rad52-ΔΔ* test Chr6b (izquierda) y de *rad59-ΔΔ rad52-ΔΔ* test Chr6a (derecha). Las cabezas de flechas blancas en los paneles A y C indican fragmentos que derivan del Chr6.

Es importante destacar que, como se muestra en la Figura 18, no observamos un solo evento SSA en cepas *rad59-ΔΔ rad52-ΔΔ*, lo que sugiere que los eventos SSA identificados entre los segregantes de cepas *rad52-ΔΔ* podrían haber sido generados por la actividad de apareamiento a ssDNA de Rad59.

Una fuente alternativa de eventos SSA en células *rad52-ΔΔ* podría ser MMEJ, a través del apareamiento de repeticiones cortas dentro de los fragmentos *hisG* expuestas por resección de extremos. Para investigar esta posibilidad, hemos analizado una cepa *lig4-ΔΔ rad52a::hisG/rad52b::hisG-URA3-hisG* (CAGL12). Este mutante generó segregantes  $Uri^-$  con una tasa de  $9,630 \times 10^{-5}$  eventos por generación celular (Tabla 6), que es aproximadamente 6 veces más alta que la de tipo silvestre. Los cariotipos electroforéticos indicaron que esta cepa había perdido el Chr7 de mayor tamaño, y dada la intensidad del Chr7 residual, presumiblemente había duplicado el de menor tamaño, mientras que su parental *lig4-ΔΔ* conservaba ambos homólogos del Chr7 (Figura 19C). El análisis mediante PFGE y SNP-RFLP de 24 segregantes  $5FOA^R$  indicó que el 45,8% (11/24) surgió por CL y el 50% (12/24) por CT (Tabla 7; Figura 19D). Los derivados  $FOA^R$  generados mediante CT fueron confirmados mediante hibridación *Southern* (Figura 19B). El segregante residual (Figura 19B, cepa 6) parece haberse formado por un evento de SSA, ya que no mostró CF, conservaba ambos homólogos del Chr6 y era heterocigótico para SNPs 123 y 132. Esta observación sugiere que los eventos tipo SSA pueden ocurrir en ausencia de MMEJ. Sorprendentemente, todos los C6F tenían un tamaño similar o muy próximo al del Chr7, lo que sugiere que Lig4 regula de alguna manera el tamaño de C6F en cepas *rad52-ΔΔ* (Figura 19A y B).



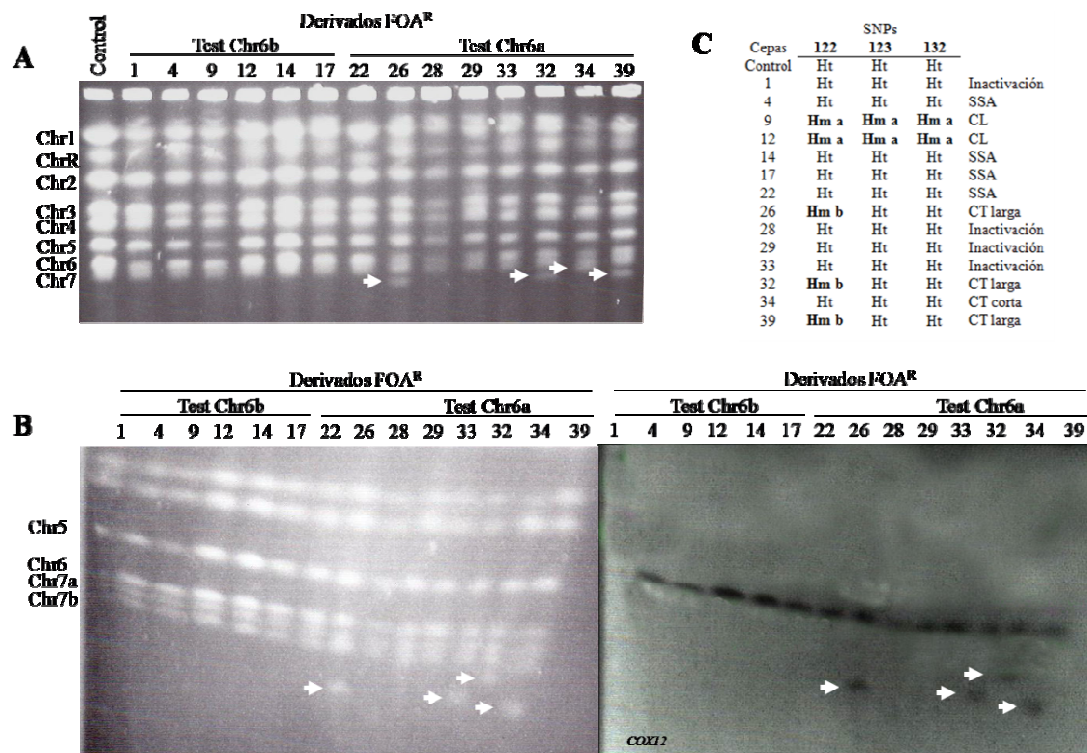
**Figura 19. Cariotipos electroforéticos y análisis de SNPs de segregantes Uri<sup>-</sup> de una cepa *lig4-ΔΔ rad52::hisG/rad52::hisG-URA3-hisG* (CALG12). A) Cariotipos electroforéticos (carrera estándar) de los derivados 5FOA<sup>R</sup> de la cepa *lig4-ΔΔ rad52-ΔΔ* (test Chr6b). B) Cariotipos electroforéticos (carrera larga) y *Southern blot* usando la sonda indicada de los derivados 5FOA<sup>R</sup> de la cepa *lig4-ΔΔ rad52-ΔΔ* (test Chr6b) que no exhibían CL. C) Cariotipos electroforéticos de cepas EAT1.1 (*lig4::hisG/lig4::hisG*) y CAGL12 (*lig4::hisG/lig4::hisG rad52::hisG/rad52::hisG-URA3-hisG*) D) Tabla de resultados con los SNPs analizados a los derivados 5FOA<sup>R</sup> de las cepas *lig4-ΔΔ rad52-ΔΔ* (test Chr6b). Las cabezas de flechas blancas indican roturas que derivan del Chr6b.**

#### IV.1.6. En cepas Rad52<sup>+</sup>, la mayoría de los segregantes Uri<sup>-</sup> se formaron por SSA

Como se indicó anteriormente, el patrón *ORF/orf::hisG* derivado de un heterocigótico *ORF/orf::hisG-URA3-hisG* fue generado principalmente por recombinación intracromátida (ya sea a través de *crossover* entre las repeticiones *hisG* o por mecanismos de SSA) o eventos USCE. Estos mecanismos poseen diferentes requerimiento; mientras los eventos de *crossover* y USCE requieren invasión de banda y por lo tanto son dependientes de Rad51, los eventos SSA son independientes de

Rad51 (Ivanov *et al.*, 1996) e incluso algunos eventos SSA son inhibidos por esta recombinasa (Manthey y Bailis, 2010). Hemos construido dos versiones de una cepa *rad51-ΔΔ RAD52/rad52::hisG-URA3-hisG*, cada una con un homólogo diferente del Chr6 interrumpido. Ambos mutantes generaron segregantes  $Uri^-$  con tasas aproximadamente cuatro veces menores que la de tipo silvestre, en concreto  $3,09 \times 10^{-6}$  (CAGL5 – cromosoma test, Chr6a) a  $4,767 \times 10^{-6}$  (CAGL6 – cromosoma test, Chr6b) eventos por generación celular (Tabla 6).

En la cepa CAGL5 (test Chr6a, Exp. 1), el 65% de los segregantes (13/20) se formó por delección (*pop-out*), mientras que sólo el 20% (4/20) recuperó el genotipo *RAD52* (Tabla 7). El análisis PFGE reveló que estos últimos llevaban versiones rotas del Chr6 (C6F) (Figura 20A y B). Además, se detectó un número anormalmente alto de cepas (15%, 3/20) que mostraron inactivación mutacional del marcador *URA3*, no encontrándose eventos CL (Figura 20C). En un segundo experimento utilizando la misma cepa (n = 10), la frecuencia de inactivación de *URA3* se redujo al 10% (1/10), mientras que las delecciones (*pop-out*) y CT representaron el 80% y 10%, respectivamente (datos no mostrados). Para la cepa CAGL6 (test Chr6b), el 85% (17/20) de los segregantes se formó por delección. En esta cepa no observamos eventos de CT, y en su lugar detectamos CL (10%, 2/20), lo que no es extraño a juzgar por el test cromosoma. Sólo un segregante (5%) surgió por inactivación mutacional del marcador *URA3* (Tabla 7; Figura 20C).



**Figura 20. Cariotipos electroforéticos y análisis de SNPs de cepas *rad51-ΔΔ RAD52/rad52::hisG-URA3-hisG* (CAGL5 y CAGL6) y sus derivados FOA<sup>R</sup>. A) Cariotipos electroforéticos (carrera estándar) de los derivados 5FOA<sup>R</sup> de cepas indicadas *rad51-ΔΔ RAD52/rad52::hisG-URA3-hisG*. B) Cariotipos electroforéticos (carrera larga) y *Southern blot* usando sonda indicada de los derivados 5FOA<sup>R</sup> de cepas *rad51-ΔΔ RAD52/rad52::hisG-URA3-hisG*. C) Tabla de resultados con los SNPs analizados a las cepas *rad51-ΔΔ RAD52/rad52::hisG-URA3-hisG*. Las cabezas de flechas blancas en los paneles A y B indican fragmentos que derivan del Chr6a. Nótese que tanto en PFGE como en análisis de SNPs, sólo se muestran los resultados de los derivados 5FOA<sup>R</sup> que tuvieron eventos de CT, CL, inactivación mutacional y algunos de los segregantes que surgieron por SSA.**

Concluimos que la ausencia de Rad51 apenas disminuyó la frecuencia de los eventos de *pop-out* (genotipo *ORF/orf::hisG*) relativo a la cepa silvestre, los cuales se mantuvieron como el evento principal responsable de la pérdida del marcador *URA3*. Puesto que los eventos ICCO o USCE son dependientes de Rad51, se deduce que la pérdida del marcador en la cepa silvestre ocurrió por SSA. Es importante destacar que no detectamos eventos IH que probablemente fueron sustituidos por CL y CT.

#### IV.1.7. Discusión del capítulo I

El objetivo del presente estudio fue determinar las tasas e identificar las vías de recombinación que conducen a la pérdida de un marcador flanqueado por dos repeticiones directas en una cepa silvestre y en mutantes HR del hongo diploide *C. albicans*. El uso de células diploides complica el análisis de SSA inducido o espontáneo debido a la competencia entre la recombinación IC e IH. Además, debido a los altos niveles de heterocigosidad de la cepa de referencia SC5314, los dos homólogos de cada

cromosoma se comportan de una manera diferente. Recientes trabajos han indicado que sólo un homólogo de cada cromosoma se puede perder o, al menos, se pierde preferentemente (Andaluz *et al.*, 2011; Hickman *et al.*, 2013). Por lo tanto, la naturaleza y la frecuencia relativa de los acontecimientos responsables de la pérdida del marcador, puede depender en gran medida del homólogo utilizado como test cromosoma (ver más abajo).

Hemos encontrado que, para el tipo silvestre, la delección es el principal evento responsable de la pérdida del marcador *URA3* en la construcción *hisG-URA3-hisG* (*hisG*  $\approx$  1100 pb) (80-90%), mientras que otros eventos, identificados aquí como HR y, en menor medida, la inactivación mutacional de *URA3*, son mucho menos frecuentes (10-20% y 1-2% respectivamente). Por tanto, la tendencia hacia SSA/ICCO/USCE fue similar a la publicada recientemente para cepas diploides de *S. cerevisiae* (Cauwood *et al.*, 2013), lo que indica que, como se ha demostrado para *S. cerevisiae* (Kadyk y Hartwell, 1992), las cromátidas hermanas tienen preferencia frente a los homólogos como sustratos para la reparación por HR en *C. albicans*. No se observaron eventos de CL y CT en la cepa silvestre, los cuales contribuyeron sin embargo en una proporción significativa a la inactivación de *URA3* en ausencia de Rad51 y, en mayor medida, de Rad52.

En comparación con la cepa de tipo silvestre, las tasas de inactivación del marcador *URA3* generadas para cada mutante simple de HR (*rad51*, *rad52* y *rad59*), mostraron poca variación. Las tasas se mantuvieron en el rango de  $3,09 \times 10^{-6}$  a  $7,680 \times 10^{-6}$  eventos por generación celular, sólo de 4 a 2,5 veces menor, respectivamente, que las tasas medias calculadas para el tipo silvestre. Esto puede ser un reflejo tanto de la diploidía y la plasticidad del genoma de *C. albicans* que puede sufrir eventos de recombinación, así como de eventos CL y CT que no alteran la viabilidad o el *fitness* en condiciones de laboratorio (Selmecki *et al.*, 2009). Sólo en los dobles mutantes *rad59- $\Delta\Delta$  rad52- $\Delta\Delta$*  y *lig4- $\Delta\Delta$  rad52- $\Delta\Delta$*  se incrementó significativamente la tasa de inactivación del marcador *URA3* comparado con el tipo silvestre.

Para el tamaño de las repeticiones utilizadas (*hisG*, 1,1 Kb), Rad59 no influyó en la tasa de SSA en *C. albicans*. Este resultado contrasta con trabajos previos en *S. cerevisiae* que muestran que, comparados con la cepa silvestre, los mutantes *rad59- $\Delta$*  fueron parcialmente defectivos en la formación del producto SSA y el número de supervivientes, independientemente de la longitud de las repeticiones (Sugawara *et al.*, 2000). Una diferencia importante entre los dos sistemas es que Sugawara *et al.*, (2000)

utilizaron cepas haploides de *S. cerevisiae* y crearon un DSB entre las repeticiones, mientras que nosotros estamos estudiando recombinación espontánea en células diploides. Sin embargo, otros estudios en cepas diploides de *S. cerevisiae* han encontrado que, bajo ciertas condiciones, Rad59 es requerido para eventos de SSA espontáneos. En concreto, para repeticiones de 223 pb, la frecuencia espontánea de SSA se redujo 15,2 veces en ausencia de Rad59 (Pannunzio *et al.*, 2010). Una posibilidad es que la falta de dependencia de Rad59 para los eventos SSA en *C. albicans* sea debida a la longitud mayor de las repeticiones *hisG* (1,1 Kb) usadas en este estudio. Sería interesante investigar si la pérdida del marcador *URA3* flanqueado por repeticiones de menor tamaño en *C. albicans* se ve también afectada en ausencia de Rad59. Debemos hacer notar que, a diferencia del tipo silvestre, las cepas *rad59-ΔΔ* llevan una repetición de *hisG* sustituyendo cada alelo de *RAD59* en el Chr4; estos fragmentos de *hisG* podrían servir como un sitio para la recombinación ectópica (ECT) acompañada de la pérdida del marcador *URA3*. Aunque no podemos descartarlo, no es probable que ECT afecte a nuestros resultados ya que todos los segregantes  $Uri^-$  se caracterizaron de forma inequívoca, y los cariotipos electroforéticos de 20 derivados  $FOA^R$  de la cepa *rad59-ΔΔ* no mostraron reordenamientos cromosómicos. Además, en *S. cerevisiae* los recombinantes ectópicos entre las repeticiones directas Ty1 dispersas por el genoma o entre copias de fragmentos *HIS3* de 300 pb localizadas en los cromosomas ChrXV y ChrIII que originan GCRs ocurrieron a tasas mucho más bajas ( $10^{-8}$  y  $10^{-9}$ ) (Pannunzio *et al.*, 2008; Chan y Kolodner, 2011) que los recombinantes analizados en este estudio.

En *S. cerevisiae*, SSA es independiente de Rad51 y, si las repeticiones directas son cortas, tiene una fuerte dependencia de Rad59, mientras que los eventos de sobrecruzamiento (CO) son dependientes de Rad51. Hemos encontrado que para repeticiones de 1,1 Kb (*hisG*), la ausencia de Rad51 no alteró significativamente la frecuencia de deleciones intracromosómicas mientras que desaparecieron los eventos IH que fueron canalizados a CL y CT. Sin embargo, en un trabajo anterior (García-Prieto, 2011; Tesis doctoral) utilizando otro *locus test* (*SHE9/she9::hisG-URA3-hisG*) situado en el Chr2, la ausencia de Rad51 redujo significativamente (9%) pero no eliminó los procesos que requieren invasión de banda (CG, CO o BIR), mientras en su presencia todos los eventos de LOH que condujeron a la homocigosis de *SHE9* fueron generados por IH (GC o CO o BIR) (22%). Una posibilidad es que la dosis de Rad52 (una copia en nuestro trabajo y dos copias en el de García-Prieto, 2011) sea determinante para la aparición de ciertos eventos IH en ausencia de Rad51. Al igual que en nuestro estudio,



la ausencia de Rad51 no afectó la frecuencia de SSA en el Chr2 y la reducción de eventos IH se vio compensada por la aparición de eventos CL y CT. Otra posibilidad es que algunos de estos eventos HR sean consecuencia de half-CO (Smith *et al.*, 2009; Malkova *et al.*, 1996) derivados de células que han iniciado eventos IH; en ausencia de Rad51 estos eventos no se pueden completar y probablemente generan half-CO usando la actividad de apareamiento de Rad52. Alternativamente, podrían corresponder a verdaderos productos de CO o BIR catalizados por Dmc1, homólogo de Dlh1 (Diener y Fink, 1996) que se expresa durante el ciclo mitótico en *C. albicans* (nuestros resultados). Finalmente, confirmando los resultados anteriores, sólo se observó CL cuando el test cromosoma fue Chr6b; mientras que cuando el test cromosoma fue Chr6a, no se observó CL y CT aumentó significativamente.

Estudios previos en nuestro laboratorio, han utilizado con diversos fines las cepas nulas  $Uri^- rad52-\Delta\Delta$  CAGL14 y CAGL15. CAGL14 lleva dos homólogos del Chr6 que pueden ser separados por PFGE (Andaluz *et al.*, 2011). La segunda cepa, CAGL15, se utilizó para obtener un reintegrante *RAD52* que exhibió un Chr6 roto (Chauhan *et al.*, 2005). Nuestros resultados indican que esta rotura se produjo durante la generación de CAGL15 a partir de CAGL8 que aún conserva los dos homólogos del Chr6. De hecho, hemos encontrado que CT fue el evento principal que originó segregantes  $Uri^-$  en ausencia de Rad52, por lo que CAGL14 sería una excepción. También hemos demostrado que los fragmentos céntricos de cromosomas rotos presentes en cepas  $Rad52^-$  se sellan y estabilizan mediante la adición de telómeros *de novo*, utilizando secuencias de unión comunes al fragmento de cromosoma y a la secuencia telomérica (Andaluz *et al.*, 2011). Por lo tanto, es probable que tenga lugar alguna resección de los extremos de los DSB antes de que las bases complementarias a la secuencia telomérica queden expuestas en el cromosoma roto.

Por definición, nuestros ensayos no seleccionan segregantes  $5FOA^R$  derivados de *rad52* que llevan un C6F centromérico con un *URA3* funcional. Dado el tamaño del Chr6 (1032 Kb) y la distancia entre *RAD52* y el telómero izquierdo ( $\approx 95$  Kb), el tamaño máximo esperado para un C6F es de 940 Kb. Confirmando esta hipótesis, la mayoría, si no todos los fragmentos del Chr6 detectados tenían tamaños a lo sumo similares y por lo general inferiores al Chr7 (935 Kb). Sin embargo, en teoría no hay restricciones que limiten el tamaño mínimo de un C6F aparte de la retención de *CEN6*. Dada la proximidad de *CEN6* al telómero derecho (53 Kb), uno podría esperar el mantenimiento de CFs tan pequeños como 55-60 Kb. Sin embargo, como se deduce de

la heterocigosidad del marcador SNP123, el tamaño de C6Fs generados por cepas *rad52* fue siempre superior a 535 Kb, y en la mayoría de los casos, no fue menor de 700 Kb.

Hemos considerado varias posibilidades que pueden explicar esta situación. Una se basa en la observación de que la mayoría de los eventos IH en la cepa silvestre se produjeron entre *CEN6* y el marcador SNP123. Si tanto la frecuencia como la localización de DSBs espontáneos son independientes de la presencia de mutaciones en genes HR, la mayoría de las roturas en las células *rad52* deben ocurrir en la misma región. En este escenario, el límite inferior para el tamaño del fragmento de C6F estaría condicionado por la presencia de un gen esencial que es inactivo en el homólogo truncado. Esto es improbable ya que, aunque el Chr6b completo puede perderse, este homólogo nunca produjo CF menor de 535 kb. Este resultado contrasta con los de Baum *et al.*, (2006) quienes demostraron que células de *C. albicans* conservaron un fragmento centromérico del Chr6 de 95 Kb tras fragmentación del Chr6 *in vivo*. Sin embargo, hay dos diferencias importantes entre ambos protocolos. En primer lugar, el fragmento de 95 Kb derivado de Chr6 contenía un telómero completo, mientras que nuestros fragmentos sólo poseen unas pocas repeticiones teloméricas (Andaluz *et al.*, 2011). Existen evidencias de interacciones complejas entre los centrómeros y telómeros que afectan a la inestabilidad de los plásmidos circulares y lineales (Enomoto *et al.*, 2014). En segundo lugar, y más importante, hemos demostrado que cepas *Carad52* pierden cromosomas con una alta frecuencia. Por lo tanto, es posible que células *rad52* de *C. albicans* no puedan soportar la presencia de CFs menores de 535 Kb que podrían ser mantenidas eficientemente en células silvestres.

Una posibilidad alternativa es que el módulo *hisG-URA3-hisG* se comporte como una zona de replicación lenta (RSZ) (debido a las estructuras inusuales de DNA o cromatina), y por tanto un sitio frágil, cuya tendencia a romperse aumenta durante la replicación del DNA en ausencia de Rad52. Recientemente, González-Prieto *et al.*, (2013) han descrito que Rad51 y Rad52 se cargan en la horquilla de replicación y esta función (replicativa) se requiere para la replicación del DNA dañado. La ausencia de cada una de estas proteínas, conduce en la muerte celular en células haploides tratadas con MMS. En células diploides de *C. albicans*, la generación frecuente de DSB dentro del módulo *hisG-URA3-hisG* seguida de la resección podría explicar el restringido rango de tamaños de los C6F (> 535 Kb) encontrado en segregantes Uri<sup>-</sup> de células *rad52*. Es importante destacar que RSZ no son sitios de recombinación en diploides de *S. cerevisiae* (Cauwood *et al.*, 2013). Si esto se aplica a *C. albicans*, explicaría por qué

los eventos de recombinación IH en la cepa “silvestre” (Rad52<sup>+</sup>) ocurren mayoritariamente entre *CEN6-SNP123* a pesar de la presencia de *rad52::hisG-URA3-hisG*, que sin embargo originaría roturas en cepas carentes de Rad52.

Una observación inesperada fue la presencia de eventos de SSA en ausencia de Rad52. Nuestros resultados sugieren que son catalizados por la actividad de apareamiento de Rad59, en lugar de por eventos MMEJ, ya que no se observaron entre 19 segregantes *rad52-ΔΔ rad59-ΔΔ*, mientras que se detectó un caso entre 24 segregantes de una cepa *lig4-ΔΔ rad52-ΔΔ*. Sin embargo, dada la rareza de estos eventos en ausencia de Rad52, se requieren experimentos adicionales para confirmar estas conclusiones preliminares.

Finalmente, la mayor frecuencia de segregantes 5FOA<sup>R</sup> en los dobles mutantes *rad59-ΔΔ rad52-ΔΔ* y *lig4-ΔΔ rad52-ΔΔ* en comparación con *rad52-ΔΔ*, sugiere que en ausencia de Rad52, tanto Rad59 como Lig4 son deletéreos para la generación de supervivientes. Teniendo en cuenta que el tamaño de C6Fs de los segregantes 5FOA de la cepa *rad59-ΔΔ rad52-ΔΔ* está en el rango permitido para cepas *rad52*, una posibilidad es que una fracción significativa de los eventos SSA promovidos por Rad59 en ausencia de Rad52 no es productiva y resultan en muerte celular. Por el contrario, el tamaño de C6F entre los segregantes de *lig4-ΔΔ rad52-ΔΔ* fue significativamente mayor que en su equivalente de *rad52*. En este caso, Lig4 interfiere con la adición de telómeros a los DSBs generados durante la replicación del DNA en el casete URA blaster en células *rad52*. Se ha publicado que, en *Kluyveromyces lactis*, Lig4 desempeña un papel en la protección de extremos de DNA (Carter *et al.*, 2007). Obviamente, se necesita trabajo adicional para investigar el papel de Rad59 y Lig4 en SSA espontáneos en células *rad52*.

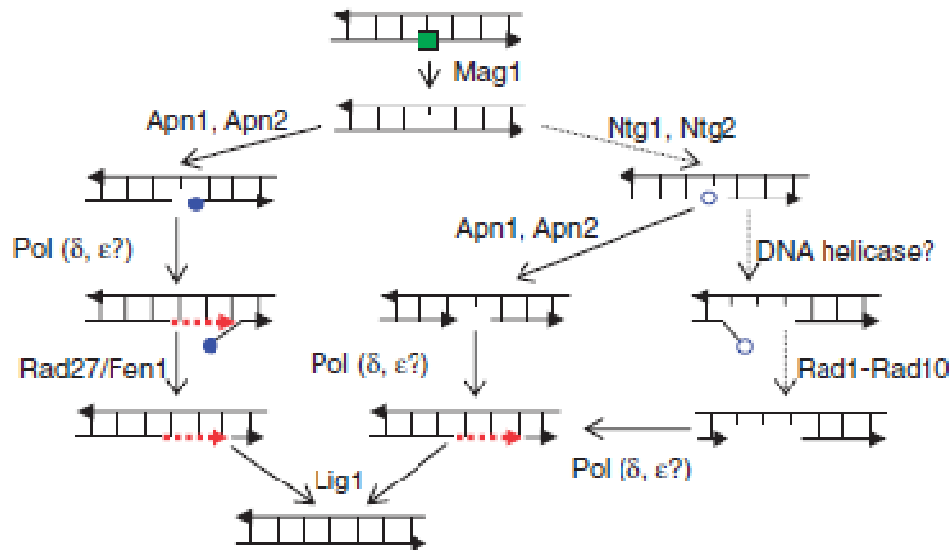


**IV.2. Capítulo II:** Papel de la recombinación homóloga en la reparación de lesiones causadas por MMS y luz UV en *C. albicans*



La recombinación homóloga (HR) es crucial para la reparación de roturas de doble cadena (DSB) que surgen del colapso de la horquilla de replicación, o por daño espontáneo o inducido al DNA. Puesto que HR requiere una homología (50-100 pb) entre la secuencia que va a ser reparada y el molde no dañado (Paques y Haber, 1999), es de esperar que este proceso sea especialmente importante para los diploides asexuales cuasi obligados, como *C. albicans*, donde hay siempre una pareja homóloga para la recombinación. De hecho, se ha descrito que la mayoría de los genes de HR de *S. cerevisiae* también se encuentran presentes en *C. albicans* (Larriba y Calderone, 2012) y los mutantes *Carad52* son avirulentos (Chauhan *et al.*, 2005).

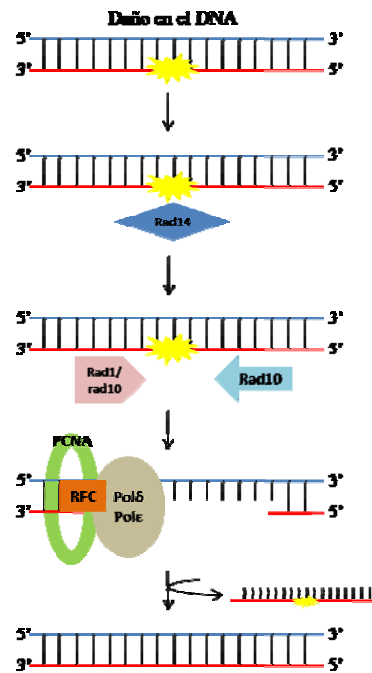
Aunque muchos agentes que dañan al DNA no causan DSB, la reparación de las lesiones puede resultar en HR. Por ejemplo, en el modelo de la levadura *S. cerevisiae*, el nivel de HR aumenta después de la inducción de daño por MMS o radiación UV, dos agentes que causan principalmente roturas de cadena sencilla (SSB), como lo demuestra la sensibilidad de los mutantes HR a ambas genotoxinas (Paques y Haber, 1999; Symington, 2002). El Metil-Metano-Sulfonato (MMS) se utiliza para el análisis de las vías implicadas en la reparación/tolerancia a la metilación. Aunque las bases metiladas se pueden eliminar directamente por la DNA metiltransferasa, la vía principal consiste en un proceso en etapas conocido como reparación por escisión de bases (BER) (Figura 21), que también está implicado en la reparación de otras lesiones “no voluminosas” tales como bases oxidadas (Sedgwick *et al.*, 2007; Boiteux y Jinks-Robertson, 2013). BER se inicia por DNA-N-glicosilasas específicas que eliminan las bases dañadas. Los sitios AP (apúrico o apirimidínico) generados se separan por las endonucleasas Apn1 y Apn2, que escinden el sitio AP 5' para formar huecos con un 5' fosfato desoxiribosa (5'dRP). La eliminación del 5'dRP se lleva a cabo por la acción coordinada de la DNA polimerasa ( $\delta$  o  $\epsilon$ ) y la endonucleasa Rad27/Fen1, seguido de la ligación. Alternativamente, los sitios AP pueden ser procesados por las liasas Ntg1 o Ntg2 que generan sitios 3'AP (3'-dRP), que pueden ser a su vez eliminados por la actividad 3'-diesterasa de Apn1/Apn2 o como parte de un oligonucleótidos generado por la endonucleasa Rad1-Rad10. Por último, los huecos son rellenados por la DNA polimerasa y sellados por una DNA ligasa (Ma *et al.*, 2008, 2011; Boiteux y Jinks-Robertson, 2013).



**Figura 21. Reparación por escisión de bases (BER) en *S. cerevisiae*.** Tras producirse el daño en el DNA, las bases dañadas son eliminadas por DNA-N-glicosilasas. Los sitios AP generados pueden ser procesados por las endonucleasas Apn1 y Apn2 (parte izquierda) o bien por las liasas Ntg1 y Ntg2 (parte derecha). Las bases alquiladas se muestran como un cuadrado relleno verde; la 5' y 3' fosfato desoxiribosa (5'-dRP y 3'-dRP) como círculos azules rellenos o sin relleno, respectivamente; las puntas de flecha en las hebras del DNA corresponden a extremos 3'; y las líneas discontinuas rojas representan la reparación asociada a la síntesis de DNA. Figura modificada de Ma *et al.* (2008).

La luz UV induce lesiones “voluminosas” en el DNA, incluyendo dímeros de pirimidina, que se eliminan mediante la reparación por escisión de nucleótidos (NER) (Figura 22), una vía de reparación conservada que implica aproximadamente 30 proteínas (Hanawalt, 2002; Boiteux y Jinks-Robertson, 2013). Tras el reconocimiento de la lesión, una escisión endonucleolítica en los sitios 3' y 5' de las lesiones elimina de 25-30 nucleótidos, lo que es seguido por la síntesis de DNA complementario y ligación. La transformación de los huecos de ssDNA en DSBs secundarios se cree que es prevenida por la estrecha coordinación entre formación de huecos y la síntesis de DNA lo que conduce a una rápida reparación (Staresincic *et al.*, 2009; Giannattasio *et al.*, 2010; Luijsterburg *et al.*, 2010; Sertic *et al.*, 2012; Ma *et al.*, 2013).





**Figura 22. Reparación por escisión de nucleótidos (NER) en *S. cerevisiae*.** Se muestra el daño en el DNA en amarillo y las principales proteínas implicadas en NER. Figura Modificada de Boiteux y Jinks-Robertson, (2013).

En *C. albicans*, se han identificado y caracterizado parcialmente varios genes BER (*APN1*, *NTG1* y *OGG1*) y NER (*RAD2* y *RAD10*) (Legrand *et al.*, 2008). Los mutantes nulos en cada uno de estos genes BER mostraron sensibilidades a MMS parecidas a las del tipo silvestre, lo que sugiere la presencia de enzimas redundantes implicadas en la reparación de las bases metiladas. De hecho, en *S. cerevisiae*, existen dos endonucleasas *APN* (*APN1* y *APN2*) y tres liasas inespecíficas (*NTG1*, *NTG2* y *OGG1*) (Ma *et al.*, 2011). Por el contrario, los mutantes *Carad2* y *Carad10* exhibieron una gran sensibilidad a luz UV, que fue mayor que la de sus correlativos de *S. cerevisiae*.

Estudios recientes han indicado que HR no juega ningún papel en la reparación de lesiones por MMS en células estacionarias en G1 haploides de *S. cerevisiae* (Ma *et al.*, 2008) que no tienen un homólogo para recombinar, mientras que Rad51 y, en mayor medida Rad52 fueron cruciales para que la reparación de células paradas en G2 en ausencia de las endonucleasas *Apn1* y *Apn2* pero no en su presencia (Ma *et al.*, 2011). Esto sugiere que HR actúa como apoyo para reparar lesiones producidas por las AP-liasas *Ntg1/2* y *Ogg1* en ausencia de BER, siempre que exista una secuencia homóloga para recombinar. Además, Rad51 y Rad52 se requieren para la replicación del DNA metilado (Vázquez *et al.*, 2008), así como para la reparación en G2 de los huecos

generados en la cadena de DNA durante ese proceso (González-Prieto *et al.*, 2013). Confirmando la importancia de HR en la reparación del DNA metilado, los mutantes de HR de *C. albicans* (*rad52*, *rad50* y *mre11*) fueron significativamente más sensibles a MMS que los mutantes simples de genes BER (Legrand *et al.*, 2007; 2008).

Es importante destacar que, en el DNA metilado, los sitios AP pueden surgir de la eliminación de bases metiladas por la acción de la glicosilasa (Ma *et al.*, 2008) o, no enzimáticamente, a través de la depurinización espontánea de purinas metiladas N3 y N7, que se acelera por calor (Wyatt y Pittmann, 2006). Se sabe que los sitios AP son lábiles al calor (Lindahl y Andersson, 1972), y se pueden convertir en roturas de cadena sencilla a 55°C (HDBs, por *heat-dependent breaks*), una temperatura usada generalmente durante la preparación de los *plugs* para PFGE (Lundin *et al.*, 2005). De hecho, en células estacionarias de *S. cerevisiae* (paradas en G1) se detecta degradación cromosómica (DSB) cuando el DNA metilado o DNA que lleva sitios AP se incuban a 55°C (Lundin *et al.*, 2005; Ma *et al.*, 2008). Además de los HDBs, los cortes sencillos independientes de calor (HIB) generado *in vivo* en cadenas opuestas por Apn1 o AP-liasas pueden resultar en DSBs secundarios (con la subsiguiente fragmentación cromosómica) si están poco espaciados (Ma *et al.*, 2011).

Además del MMS, un número de agentes endógenos y ambientales incluyendo drogas frente al cáncer pueden causar daño por metilación (Drablos *et al.*, 2004; Sedgwick *et al.*, 2007) y afectar a la viabilidad y virulencia de patógenos comensales oportunistas como *C. albicans*. Nuestro grupo de investigación ha demostrado que células *rad52-ΔΔ* y, en menor medida, *rad51-ΔΔ* de *C. albicans* exhiben fenotipos acusados, incluyendo disminución de la tasa de crecimiento, morfología filamentosa y aumento en la sensibilidad de varios agentes que dañan al DNA como MMS y luz UV (Andaluz *et al.*, 2006; García-Prieto *et al.*, 2010; Bellido *et al.*, 2015). En este capítulo, se muestra que no hay sinergia entre las mutaciones *rad59* y *rad51* o *rad52* en la reparación de daños en el DNA provocados por MMS y UV. Con el fin de revelar posibles características de la maquinaria de reparación del DNA de *C. albicans*, la cepa silvestre y mutantes HR del diploide W303 de *S. cerevisiae* se han analizado en paralelo. También hemos determinado daños por metilación en *C. albicans*, aprovechando las roturas secundarias y la fragmentación cromosómica que originan durante la preparación de las muestras para PFGE a 55°C. Finalmente, se ha analizado el papel que juegan los genes de HR en la prevención y recuperación de las roturas

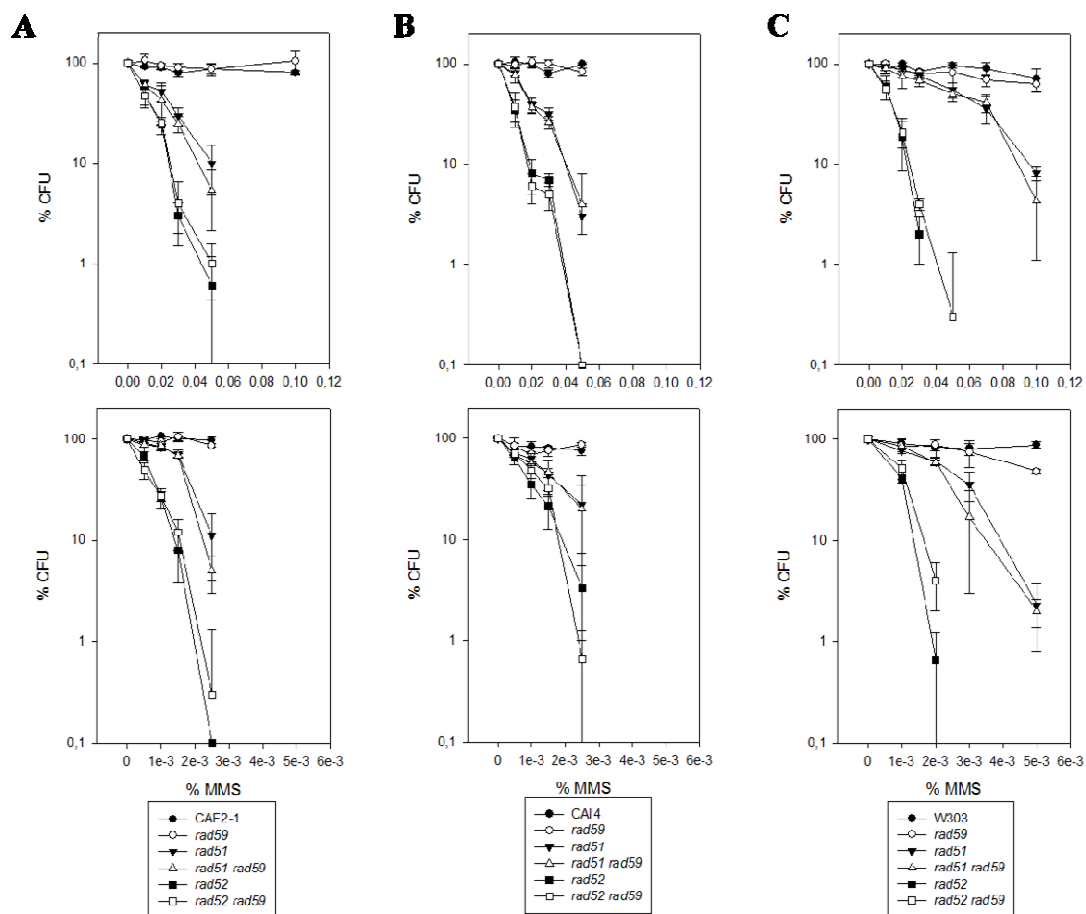
dependientes de calor inducidas por MMS, tanto en células en división como en células paradas en G2.

#### IV.2.1. Papel de Rad59 en la sensibilidad de mutantes *rad51-ΔΔ* y *rad52-ΔΔ* de *C. albicans* y *S. cerevisiae* a MMS

El MMS genera bases metiladas en el dsDNA cuya reparación mediante por BER (reparación por escisión de bases) puede causar cortes, huecos, e indirectamente DSBs que pueden requerir HR directamente o bloquear la progresión de la horquilla durante la replicación (Wyatt y Pittman, 2006; Budzowska y Kanaar, 2009; Heyer *et al.*, 2010; Ma *et al.*, 2011). Trabajos recientes han demostrado que un doble mutante *rad51-Δ rad59-Δ* derivado de la cepa haploide de *S. cerevisiae* JKM139 fue significativamente más sensible a MMS que cualquiera de los mutantes simples, llegando a la sensibilidad del mutante *rad52-Δ* (Oum *et al.*, 2011). En nuestros ensayos, hemos investigado si esta sinergia es extensible a las mutaciones *rad51* y *rad59* en *C. albicans*. A efectos comparativos, se ha utilizado el diploide de *S. cerevisiae* W303, ya que la pobre eficiencia de esporulación de la cepa BY4743 utilizada en estudios anteriores (García-Prieto *et al.*, 2010) dificulta la construcción de dobles mutantes utilizando cruces genéticos rutinarios.

La eliminación de los dos alelos *RAD59* no modificó la supervivencia de las cepas parentales, CAF2-1 (*Uri*<sup>+</sup>) de *C. albicans* y el diploide de *S. cerevisiae* W303, a MMS, tanto en ensayos agudos como crónicos (Figura 23A y C). Además, los dobles mutantes *Carad51-ΔΔ rad59-ΔΔ* y *Carad52-ΔΔ rad59-ΔΔ* (versiones *Uri*<sup>+</sup>) exhibieron la misma supervivencia a MMS que los mutantes simples *Carad51-ΔΔ* y *Carad52-ΔΔ* respectivamente (Figura 23A). El mismo resultado se obtuvo para los mutantes de *S. cerevisiae* (Figura 23C). Estos resultados descartan la interacción funcional entre las mutaciones *rad59* y *rad51* o *rad52* en la reparación de lesiones provocadas por MMS en ambos organismos. Resultados similares se obtuvieron cuando las versiones *Uri*<sup>-</sup> de los mismos mutantes de *C. albicans* se compararon con la cepa silvestre CAI4 (*Uri*<sup>-</sup>) (Figura 23B). También encontramos que *Carad51-ΔΔ* y, en menor medida, *Carad52-ΔΔ* fueron significativamente más sensibles a tratamientos agudos con MMS que *Scrad51-ΔΔ* y *Scrad52-ΔΔ* respectivamente, tanto en fondos *RAD59/RAD59* (CAF2-1) como *rad59-ΔΔ* (Figura 23A y C), lo que sugiere que, como se describió en trabajos anteriores usando “*drop test*” y la cepa BY4743 de *S. cerevisiae* (García-Prieto *et al.*, 2010), las vías HR dependientes de Rad51 y Rad52 son más importantes para la

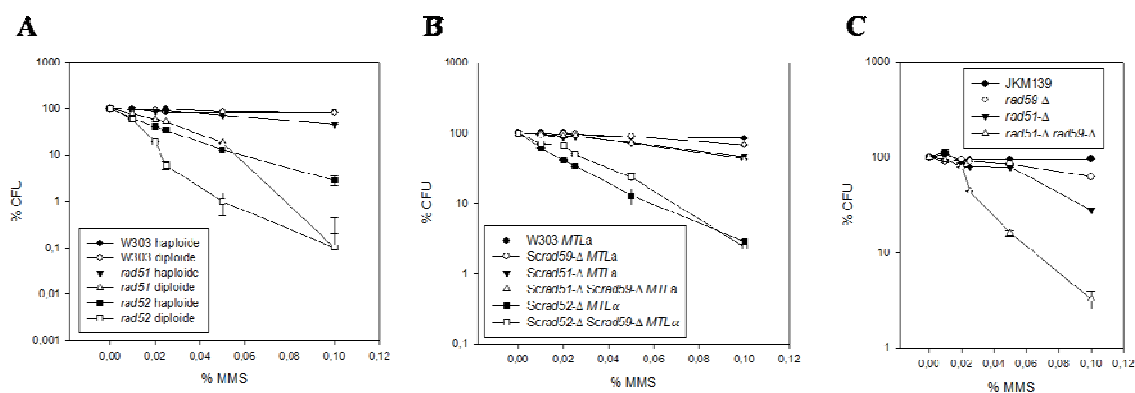
supervivencia al daño inducido por MMS en *C. albicans* que en *S. cerevisiae*. A la misma conclusión se llegó cuando la sensibilidad a MMS se evaluó utilizando tratamientos crónicos cuantitativos (Figura 23A, B y C).



**Figura 23. Sensibilidad frente a MMS de mutantes de *C. albicans* y *S. cerevisiae*.** A) Sensibilidad a MMS de mutantes  $Uri^+$  de *C. albicans* en tratamiento agudo (arriba) y crónico (abajo). B) Sensibilidad a MMS de mutantes  $Uri^-$  de *C. albicans* en tratamiento agudo (arriba) y crónico (abajo). C) Sensibilidad a MMS de mutantes diploides de *S. cerevisiae* en tratamiento agudo (arriba) y crónico (abajo). Para determinar la supervivencia tras un tratamiento agudo, unas  $5 \times 10^5$  células en crecimiento exponencial se resuspendieron en 1 ml de PBS y se incubaron con concentraciones crecientes de MMS durante 30 min en oscuridad. Pasado el tiempo, las mezclas se diluyeron  $10^{-3}$  veces con PBS y 50  $\mu$ l se sembraron en placas YEPD. Para determinar la supervivencia tras un tratamiento crónico, unas 300-400 CFUs fueron sembradas en placas de YEPD con diferentes concentraciones de MMS. En ambos tratamientos, las placas fueron incubadas a 30°C en oscuridad durante 48 horas antes de contar colonias (CFUs). Los datos mostrados son la media de tres experimentos independientes.

Para investigar si la hipersensibilidad sinérgica de mutantes *rad51*- $\Delta$  *rad59*- $\Delta$  de la cepa JKM139 (Oum *et al.*, 2011) es una característica específica de las cepas haploides de *S. cerevisiae*, se determinó la sensibilidad a MMS de la cepa haploide W303 *MATa* y sus derivados *rad* utilizando tratamientos de MMS agudos. Encontramos que 1) aunque la cepa haploide de W303 mostró la misma sensibilidad que la diploide, los mutantes haploides *rad51*- $\Delta$  y *rad52*- $\Delta$  eran más resistentes que sus homólogos

diploides, lo que sugiere que NHEJ, que está inhibida en diploides (Daley *et al.*, 2005), podría desempeñar un papel en la reparación de lesiones provocadas por MMS en haploides deficientes en HR (Figura 24A), 2) *rad52-Δ* fue significativamente más sensible que *rad51-Δ rad59-Δ* (Figura 24B), y 3) no hubo diferencias en la sensibilidad entre *rad51-Δ* y *rad51-Δ rad59-Δ* o entre *rad52-Δ* y *rad52-Δ rad59-Δ* (Figura 24B). Puesto que hemos confirmado la hipersensibilidad sinérgica del mutante *rad51-Δ rad59-Δ* derivado de la cepa JKM139 (Figura 24C), concluimos que la contribución de la vía independiente de Rad51 y dependiente de Rad59 a la reparación de las lesiones provocadas por MMS puede variar entre las cepas de *S. cerevisiae* o que la cepa JKM139 ha sufrido alguna mutación adicional no identificada.

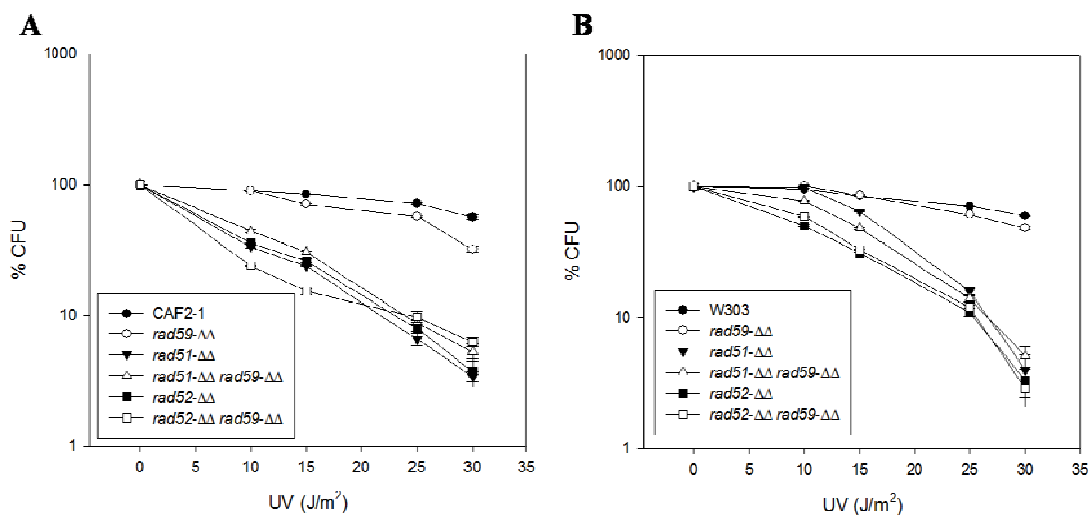


**Figura 24. Sensibilidad frente a MMS (tratamiento agudo) de mutantes de *S. cerevisiae*.** A) Sensibilidad a MMS de mutantes haploides y diploides de *S. cerevisiae*; B) de mutantes haploides de *S. cerevisiae*; y C) de la cepa haploide JKM139 y sus derivados *rad*. Para más detalle sobre el protocolo de tratamiento agudo ver pie de Figura 23. Los datos mostrados son la media de dos experimentos independientes.

#### IV.2.2. Papel de Rad59 en la sensibilidad de mutantes *rad51-ΔΔ* y *rad52-ΔΔ* de *C. albicans* y *S. cerevisiae* a luz UV

Al igual que el MMS, la luz UV causa SSB en el DNA (Paques y Haber, 1999; Symington, 2002). Los dímeros de pirimidina y otros fotoproductos son reparados eficientemente mediante la reparación por escisión de nucleótidos (NER) en las fases G1 o G2, generando cortes y huecos de ssDNA de unos 30 nt (ver discusión Capítulo II) que pueden iniciar HR directamente o después de la resección por Exo1 (Kadyk y Hartwell, 1993; Galli y Schiestl, 1999; Covo *et al.*, 2012; Ma *et al.*, 2013). Si no se reparan, SSB causa detención de las horquillas y DSBs durante la siguiente replicación. La cepa silvestre de *C. albicans* y los mutantes simples de HR mostraron diferentes sensibilidades a UV que siguieron el siguiente patrón: wt  $\approx$  *rad59-ΔΔ*  $\ll$  *rad51-ΔΔ*  $\approx$  *rad52-ΔΔ* (Figura 25A). Resultados similares se obtuvieron para las cepas diploides de

*S. cerevisiae*, es decir,  $W303 \approx rad59-\Delta\Delta \ll rad51-\Delta\Delta \approx rad52-\Delta\Delta$  (Figura 25B). Cabe destacar que, a diferencia de resultados anteriores obtenidos en nuestro laboratorio (García-Prieto *et al.*, 2010), no hemos podido detectar diferencias significativas entre las sensibilidades de *rad59*- $\Delta\Delta$  y la cepa silvestre. Es importante destacar que, a dosis bajas (10 y 15  $J/m^2$ ), pero no en dosis elevadas de UV (25-30  $J/m^2$ ), *Scrad51*- $\Delta\Delta$  y *Scrad52*- $\Delta\Delta$  parecían exhibir menor sensibilidad que *Carad51*- $\Delta\Delta$  y *Carad52*- $\Delta\Delta$  respectivamente (Figura 25). No se observaron diferencias entre los mutantes *Carad51*- $\Delta\Delta$  y *Carad51*- $\Delta\Delta$  *rad59*- $\Delta\Delta$  o *Carad52*- $\Delta\Delta$  y *Carad52*- $\Delta\Delta$  *rad59*- $\Delta\Delta$  independientemente de la dosis de UV utilizada (10-30  $J/m^2$ ), una conducta mostrada también por los mutantes correlativos de *S. cerevisiae*. Concluimos que Rad59 juega como mucho un papel secundario en la reparación de daños provocados por UV en ausencia de Rad51 o Rad52 en ambas levaduras. Resultó finalmente llamativo que *Scrad51*- $\Delta\Delta$  fuera menos sensible que *Scrad52*- $\Delta\Delta$  a dosis bajas de luz UV, mientras que ambos mutantes fueron igualmente sensibles a dosis altas. Ello podría sugerir la existencia de diferencias en la naturaleza de las lesiones y/o mecanismos de reparación en función de la dosis de luz UV.

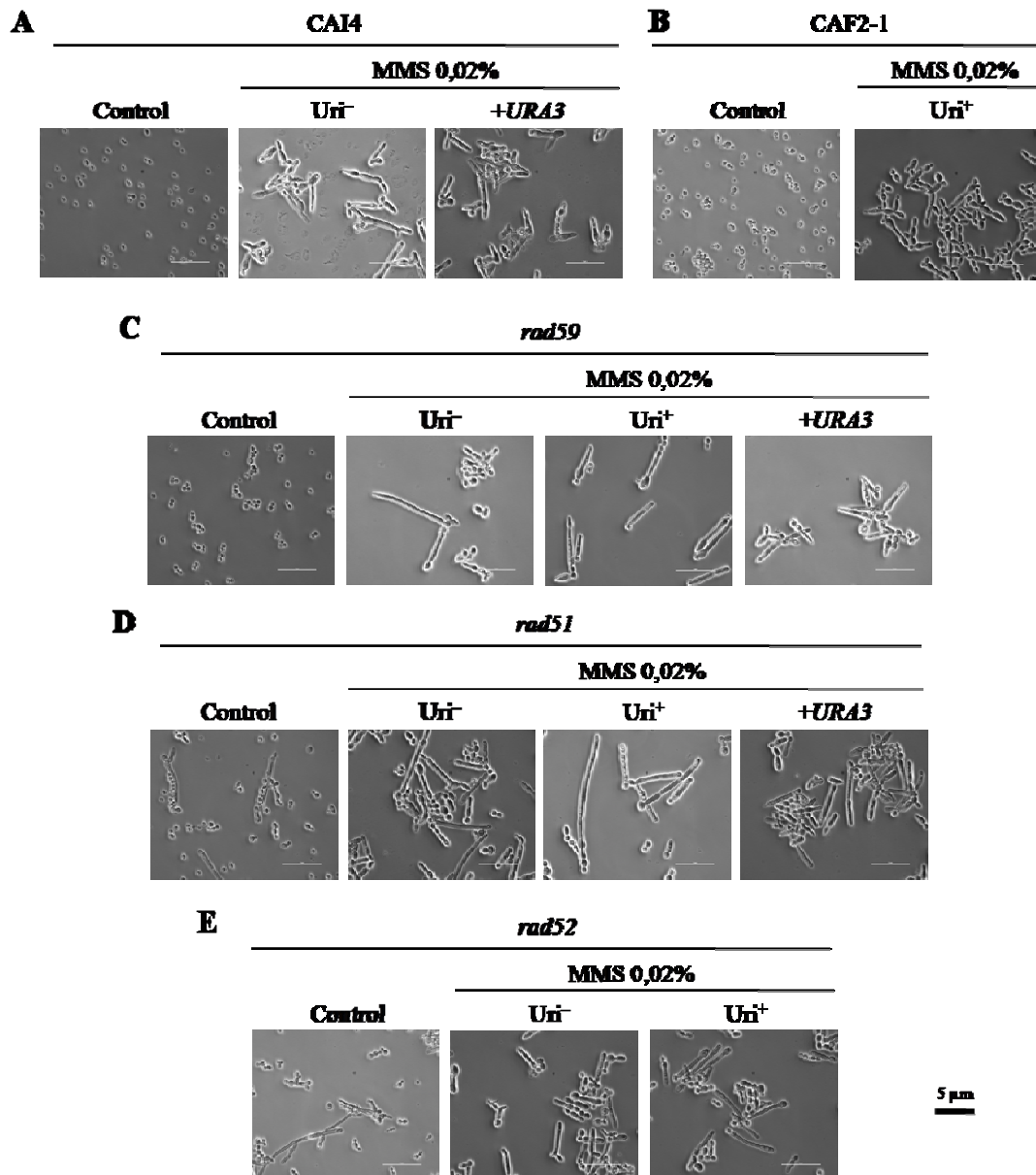


**Figura 25. Sensibilidad frente a UV de mutantes de *C. albicans* y *S. cerevisiae*.** A) Sensibilidad a UV de mutantes Uri<sup>+</sup> de *C. albicans*. B) Sensibilidad a UV de mutantes diploides de *S. cerevisiae*. Unas 300-400 CFUs se sembraron en placas de YEPD, las cuales fueron irradiadas con las dosis indicadas. Las placas fueron incubadas a 30°C en oscuridad hasta que las colonias alcanzaron un tamaño adecuado para ser contadas (48 horas). Los datos mostrados son la media de tres experimentos independientes.

#### IV.2.3. Papel de genes HR en el crecimiento polarizado en respuesta a MMS

Se ha descrito que el estrés genotóxico, incluyendo tratamiento con hidroximetilurea y MMS, desencadena el crecimiento polarizado en células de tipo silvestre de *C. albicans* lo que genera células alargadas (Shi *et al.*, 2007; Legrand *et al.*, 2011). Para

investigar si la filamentación inducida por MMS estaba afectada por las mutaciones HR, sometimos a la cepa silvestre y a mutantes a dosis de 0,02% de MMS durante 16 horas a 30°C en YEPD. La cepa silvestre (CAF2-1) mostró cadenas de células alargadas, pero no se observaron filamentos, mientras que su derivado  $Uri^-$  (CAI4) mostró filamentos largos. La reintegración de una copia de *URA3* en su propio *locus*, no afectó al comportamiento de la cepa CAI4 (Figura 26A y B). Estos resultados sugieren que los cambios genéticos producidos durante la generación de la cepa CAI4, y no la presencia o ausencia del gen *URA3*, fueron los responsables de estas diferencias. Los mutantes *rad59-ΔΔ* se comportaron como la cepa CAI4, independiente si eran  $Uri^+$  o  $Uri^-$ , o si una copia de *URA3* había sido reintegrada en su propio *locus* en el mutante  $Uri^-$  (Figura 26C). Lo mismo sucedió para las cepas *rad51-ΔΔ*, con independencia de si eran  $Uri^+$ ,  $Uri^-$ , o si una copia de *URA3* había sido reintegrada (Figura 26D) y para cepas *rad52-ΔΔ*  $Uri^-$  o  $Uri^+$  (Figura 26E). Es importante destacar que, aparte de una disminución de las células filamentosas originales (posiblemente como consecuencia de muerte celular), una porción significativa de células levaduriformes de los mutantes *rad51-ΔΔ* y *rad52-ΔΔ* formó “tubos germinativos” en presencia de MMS, cuya forma y longitud fueron similares a sus equivalentes de *rad59-ΔΔ* o CAI4. El grado de crecimiento polarizado en los dobles mutantes *rad51-ΔΔ rad59-ΔΔ* y *rad52-ΔΔ rad59-ΔΔ* en respuesta a MMS fue similar a la de mutantes simples *rad51-ΔΔ* y *rad52-ΔΔ* respectivamente (no mostrado).



**Figura 26. Efecto del MMS en el crecimiento polarizado.** Crecimiento polarizado en respuesta a MMS de las cepas silvestre A) CAI4 y B) CAF2-1, y de los mutantes HR C) *rad59*- $\Delta\Delta$ , D) *rad51*- $\Delta\Delta$  y E) *rad52*- $\Delta\Delta$  de *C. albicans*. Uri<sup>-</sup> (*ura3::imm434/ura3::imm434*), Uri<sup>+</sup> (*orf::hisG/orf::hisG-URA3-hisG*) y +URA3 (*URA3/ura3::imm434*). Un cultivo en fase exponencial se refrescó a DO<sub>600</sub> de 1 y se incubó durante 2 horas a 30°C con agitación, momento en que se adicionó MMS a concentración final de 0,02%. Las fotografías se tomaron tras 16 horas de incubación con la droga.

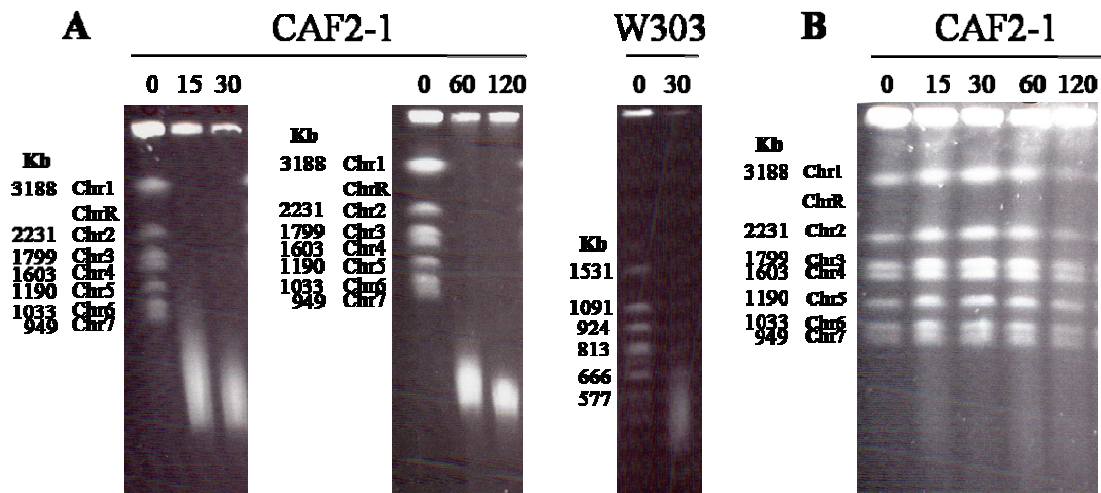
#### IV.2.4. Generación y reparación de lesiones lábiles al calor inducidas por MMS en *C. albicans*

Tanto en *S. cerevisiae* como en el hombre, el tratamiento *in vivo* con MMS no causa DSBs. Sin embargo, se ha demostrado que las bases metiladas y los sitios AP inducidos por MMS son termolábiles y se convierten en roturas de cadena sencilla (HDBs, *heat-dependent breaks*) (SSB) durante el tratamiento con proteinasa K a 55°C utilizado para preparar los *plugs* de PFGE. Además, si los SSBs se localizan muy cerca



en las cadenas opuestas de DNA, pueden originar DSBs y por tanto fragmentación cromosómica (Lindahl y Andersson, 1972; Lundin *et al.*, 2005; Ma *et al.*, 2008). Hemos investigado si el MMS también genera HDBs en *C. albicans*.

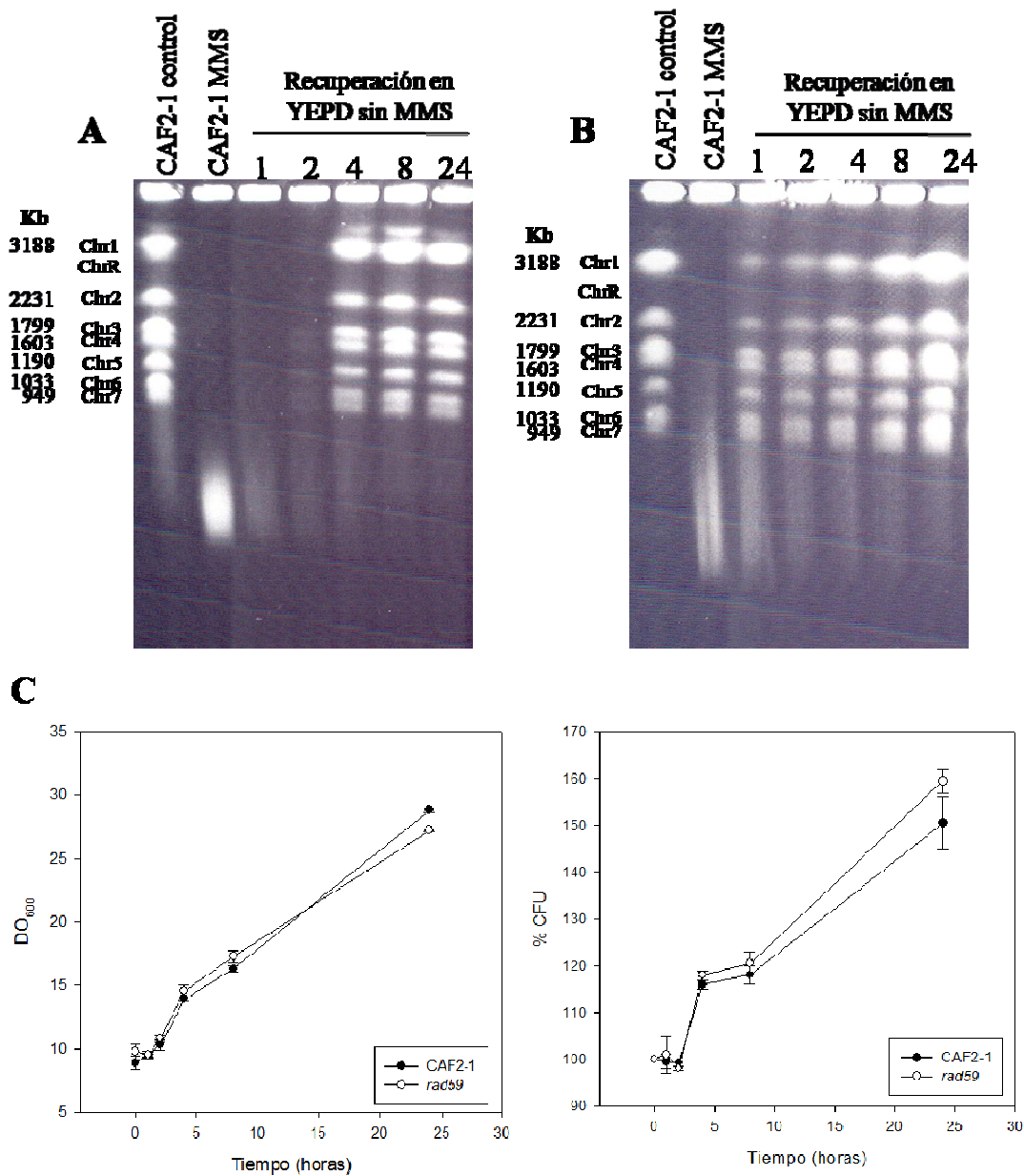
La cepa parental CAF2-1 exhibe el cariotipo estándar de *C. albicans*. Sin embargo, cuando células en fase exponencial ( $DO_{600} = 9$ ; *C. albicans* alcanza  $DO_{600}$  de 18) se sometieron a un tratamiento agudo con MMS (0,05%, 15 min) en PBS y se prepararon las muestras para PFGE a 55°C, se observó una pérdida completa de bandas cromosómicas, que migraron como una mancha por debajo del Chr7, indicando la presencia de DSBs. Además, el tamaño promedio del material difuso de cromosomas degradados obtenido a 55°C disminuyó con el tiempo de incubación en MMS (15, 30, 60 y 120 min), lo que sugiere una progresiva fragmentación cromosómica (Figura 27A). Como era de esperar (Lundin *et al.*, 2005), las muestras tratadas con MMS en la cepa W303 de *S. cerevisiae* y sometidas al mismo procesamiento (preparación de muestras para PFGE a 55°C) mostraron también fragmentación cromosómica (Figura 27A). Por el contrario, cuando tras un tratamiento agudo con MMS (0,05%, 15 min en PBS), la incubación con proteinasa K se realizó a 30°C, la cepa CAF2-1 exhibió un cariotipo estándar, y apenas se observó degradación cromosómica (Figura 27B). Además, una prolongación del tratamiento agudo con MMS hasta 120 min no modificó los resultados (Figura 27B). Parte de la degradación observada a 30°C era probablemente debida a la generación espontánea de algunos SSBs opuestos y cercanos, o DSBs producidos directamente durante la manipulación de las muestras, ya que también aparece ocasionalmente cuando se analizan células de la cepa parental sin tratar a 55°C. Estos resultados indican que, como se ha demostrado para *S. cerevisiae* y células humanas (Lundin *et al.*, 2005), casi todos los DSBs detectados fueron producidos durante la incubación de los *plugs* con proteinasa K a 55°C de *C. albicans* y no por MMS *in vivo*, por lo que representan cortes dependientes de calor (HDB; Ma *et al.*, 2008).



**Figura 27. Determinación de HDBs causados por MMS (PFGE).** A) Cariotipos electroforéticos de tratamiento agudo de MMS 0,05% y preparación de muestras con proteinasa K a 55°C de la cepa parental CAF2-1 de *C. albicans* a diferentes tiempos (minutos) y del diploide de *S. cerevisiae* W303. B) Cariotipos electroforéticos de tratamiento agudo de MMS 0,05% y preparación de muestras con proteinasa K a 30°C de la cepa parental CAF2-1 a diferentes tiempos (minutos). Cultivos líquidos en fase exponencial de las cepas indicadas fueron tratados con MMS 0,05% durante los tiempos indicados (minutos). Pasado el tiempo, una alícuota de cada muestra tratada se neutralizó con tiosulfato sódico y se lavó con YEPD para la determinación de los cariotipos.

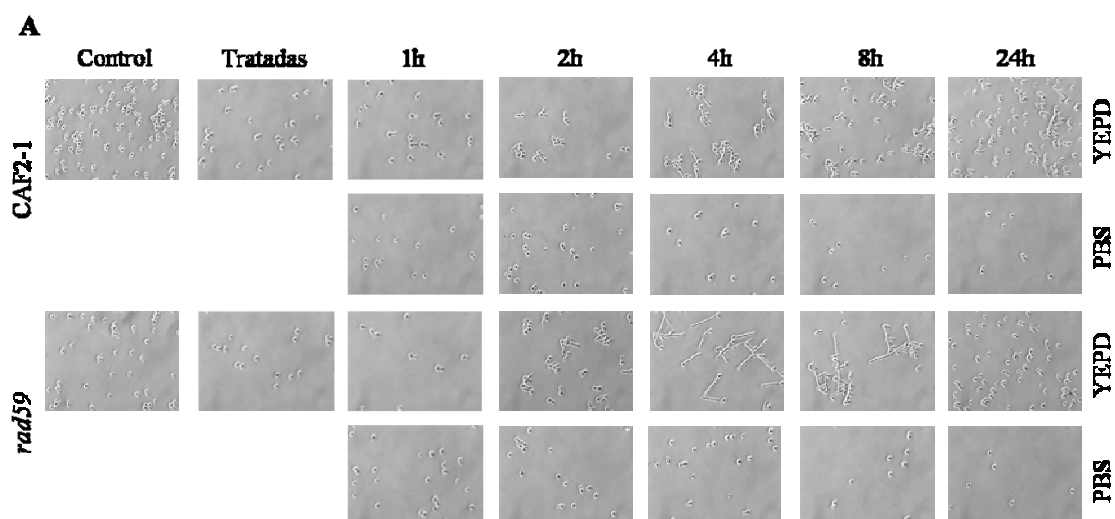
En este escenario, sería de esperar que, como se describe para *S. cerevisiae*, la reparación *in vivo* de HDB (roturas dependientes de calor) inducidos por MMS impediría la degradación cromosómica durante la incubación a 55°C con proteinasa K. Con el fin de determinar el margen de tiempo necesario para la reparación de HDB, células de la cepa parental tratadas con MMS fueron incubadas en YEPD en ausencia de MMS y analizadas por PFGE a lo largo del tiempo. Tras un tratamiento estándar con MMS (0,05% MMS durante 30 min en PBS) e incubaciones a 55°C con proteinasa K, resultó en una fragmentación cromosómica acusada (Figura 28A). No se detectaron cambios tras una hora de recuperación en YEPD en ausencia de MMS, pero se detectaron trazas de bandas cromosómicas después de dos horas (Figura 28A). Pasadas cuatro horas, las bandas cromosómicas se encontraban totalmente restauradas y este evento fue acompañado de una reducción significativa de la intensidad del material difuso. El mismo patrón se mantuvo después de 8 horas en YEPD, lo que indica que la mayoría de la reparación de HDB se produjo durante las primeras 4 horas (Figura 28A). Es importante destacar que, cuando se llevó a cabo la incubación de los *plugs* a 50°C, en lugar de 55°C, las muestras cromosómicas mostraron una migración reducida del material difuso de bajo peso molecular en PFGE, acompañada por la presencia de bandas cromosómicas, sugiriendo que la rotura cromosómica es función de la temperatura (Figura 28B). Como era de esperar de la menor cantidad de SSBs

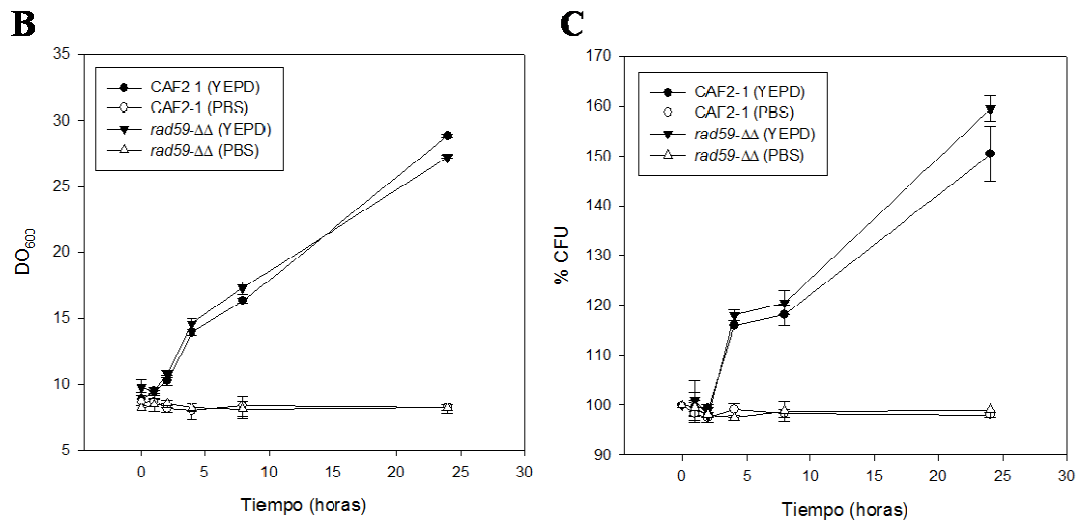
generados a 50°C, se produjeron menos DSBs y la aparente “restauración” de los cromosomas fue más rápida (1 hora) (Figura 28B).



**Figura 28.** Efecto del MMS tras recuperación en medio rico YEPD (PFGE). Cariotipos electroforéticos de células de la cepa parental CAF2-1 de *C. albicans* tras tratamiento agudo con MMS 0,05% y recuperación en medio rico YEPD durante los tiempos indicados (horas). A) Incubación con proteinasa K a 55°C. B) Incubación con proteinasa K a 50°C. C) Representaciones gráficas de los valores de DO<sub>600</sub> (izquierda) y n° de CFU (derecha) obtenidos durante la recuperación en YEPD tras un tratamiento agudo de MMS (0,05% durante 30 min). Cultivos líquidos en fase exponencial de las cepas indicadas fueron tratadas con MMS 0,05% durante 30 minutos. Pasado el tiempo, las muestras se neutralizaron con tiosulfato sódico (1:1) y se lavaron con YEPD. Se resuspendieron en medio fresco YEPD y se tomaron alícuotas a diferentes tiempos (0, 1, 2, 4, 8 y 14 horas) para la determinación de los cariotipos.

Es importante destacar que el número de CFU, que se había reducido al 85% tras el tratamiento con MMS, se mantuvo constante hasta las 2 horas, aumentó ligeramente entre las 2 y 8 horas de recuperación en YEPD, y sólo mostró un mayor aumento (1,5 veces) entre las 8 y 24 horas, lo que sugiere que después de las reparación de HDB, los supervivientes experimentan una fase de latencia antes de iniciar el crecimiento (Figura 28C). Sin embargo, el valor de la DO<sub>600</sub> aumentó de forma constante durante la recuperación, incluyendo la primera hora, cuando el número de CFU se mantuvo o disminuyó ligeramente y aún no se observaba recuperación de cromosomas, sugiriendo que pocas lesiones HDB a 55°C habían sido aún reparadas (Figura 28C). Este comportamiento aparentemente anómalo fue probablemente debido a la elongación celular inducida por MMS durante las primeras 2-4 horas y, más tarde, a la aparición de cadenas de células alargadas que al no separarse dan lugar a la formación de una única colonia, mientras que contribuyen a aumentar el valor de la DO<sub>600</sub> (Figura 29A). Con el fin de evitar interferencias con el crecimiento, se realizó un tratamiento de MMS y se siguió la recuperación posterior en PBS en ausencia de la droga. Bajo estas condiciones, las células de la cepa silvestre y el mutante *rad59-ΔΔ* no se elongaron (Figura 29A), sino que se mantuvieron levaduriformes, y los valores de DO<sub>600</sub> y CFU no sufrieron variaciones significativas (Figura 29B y C), lo que sugiere que habían detenido el ciclo celular. De ello se deduce que la elongación inducida por MMS en *C. albicans* sólo se produce en células creciendo en medio rico YEPD, pero no en células en reposo.



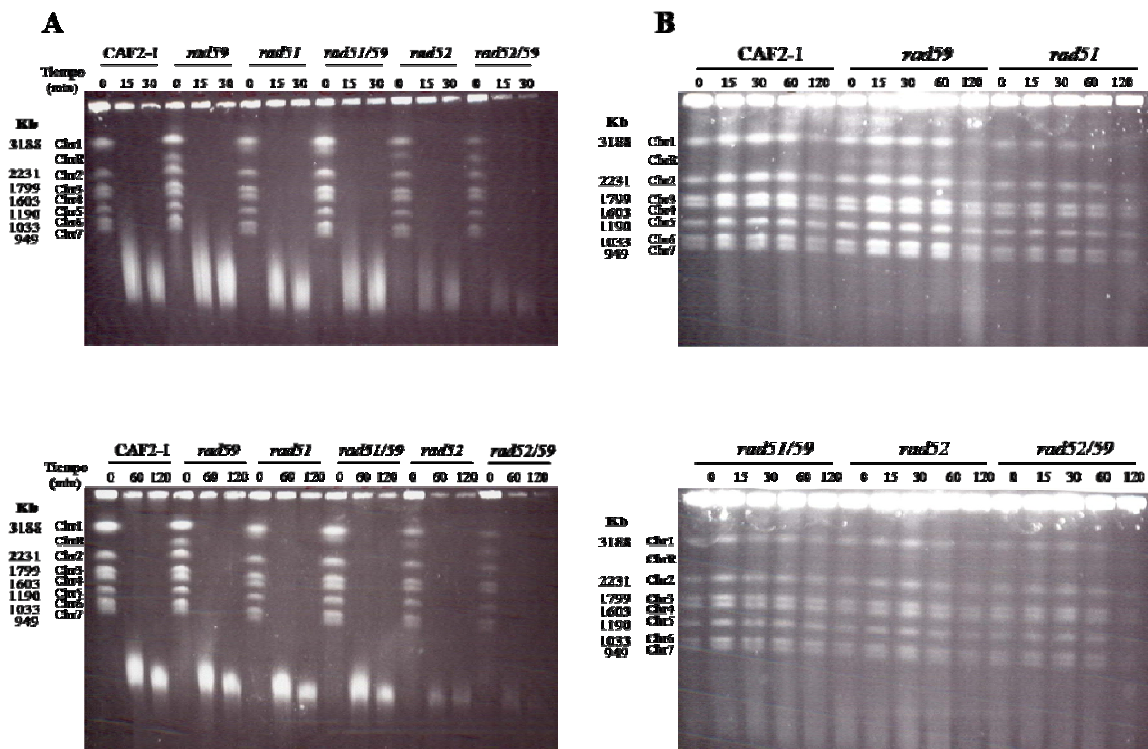


**Figura 29. Morfología celular tras tratamiento agudo con MMS y recuperación en medio rico YEPD y en tampón PBS de las cepas CAF2-1 y *rad59-ΔΔ*.** A) Un cultivo en fase exponencial se refrescó a DO<sub>600</sub> de 1 y se incubó durante 2 horas a 30°C con agitación (control). Pasado el tiempo se lavaron las células y se añadió MMS a concentración final de 0,05% durante 30 min en PBS. Se neutralizó con tiosulfato sódico y se lavó con PBS (tratadas). Posteriormente se incubó en medio rico YEPD sin MMS a 30°C con agitación y en PBS sin agitación. Se tomaron fotografías a diferentes tiempos (1, 2, 4, 8 y 24 horas). B) y C) Representaciones gráficas de los valores de DO<sub>600</sub> (izquierda) y n° de CFU (derecha) obtenidos durante la recuperación en YEPD y PBS tras un tratamiento agudo de MMS (0,05% durante 30 min). Los datos mostrados (B y C) son la media de dos experimentos independientes.

#### IV.2.5. Papel de HR en la reparación de HDL

A continuación, estudiamos el papel de los genes HR en la generación y recuperación de HDB a 55°C y 50°C. En trabajos anteriores (García-Prieto *et al.*, 2010) hemos demostrado que los mutantes simples de *C. albicans* *rad51-ΔΔ*, *rad52-ΔΔ* y *rad59-ΔΔ*, así como los dobles mutantes *rad51-ΔΔ rad59-ΔΔ*, *rad52-ΔΔ rad59-ΔΔ* y *rad51-ΔΔ rad52-ΔΔ* (Bellido *et al.*, 2015) exhibían cariotipos estándar sin alteraciones cromosómicas detectables. Cuando las células de los mutantes fueron sometidas a tratamientos agudos con MMS y las muestras se incubaron a 55°C y posteriormente se sometieron a PFGE, todos los mutantes generaron una mancha difusa de degradación similar a la mostrada por células de CAF2-1 (Figura 30A). Además, como se muestra para CAF2-1, el tamaño promedio del material difuso de degradación también disminuyó con el tiempo de incubación en MMS, lo que sugiere una acumulación progresiva de las lesiones al DNA sensibles al calor (Figura 30A). Sin embargo, con independencia del tiempo de incubación (15, 30, 60 y 120 min) en 0,05% MMS en PBS, el grado de fragmentación cromosómica fue ligeramente superior en la cepa *rad51-ΔΔ* y, en mayor medida, en *rad52-ΔΔ*, que en la cepa parental CAF2-1 (Figura 30A). Puesto que la ausencia de proteínas de recombinación no debe afectar a la extensión de HDB inducida por MMS, es probable que exista cierta reparación HR o protección del

DNA en el tipo silvestre durante el tratamiento agudo de MMS que está bloqueada o ralentizada en los mutantes *rad51-ΔΔ* y/o *rad52-ΔΔ*. Finalmente, como se mostró para la cepa CAF2-1, los mutantes simples y dobles de HR tratados con MMS (0,05% a diferentes tiempos en PBS) también mostraron un cariotipo estándar cuando las muestras se incubaron a 30°C con proteinasa K, y la prolongación del tratamiento con MMS hasta los 120 min, no generó degradación cromosómica adicional (Figura 30B).



**Figura 30.** PFGE tras tratamiento con MMS agudo de la cepa silvestre CAF2-1 y los mutantes de HR a diferentes tiempos de incubación con proteinasa K a las temperaturas indicadas. A) Incubación con proteinasa K a 55°C. B) Incubación con proteinasa K a 30°C. Para más detalle sobre el protocolo ver pie Figura 27.

Una vez establecido que el grado de la degradación cromosómica a alta temperatura se vio ligeramente afectado por la ausencia de proteínas HR, nos propusimos examinar el papel de estas proteínas en la recuperación de HDB. Es importante destacar que, comparado con la cepa silvestre, el mutante *rad59-ΔΔ* exhibió un retraso en la reparación de HDB a 55°C (Figura 31A). Así, las bandas cromosómicas reaparecieron después de 2 horas de recuperación en YEPD en ausencia del MMS en la cepa silvestre pero no en el mutante *rad59-ΔΔ*, aunque ambas cepas restauraron el cariotipo estándar después de 4 horas de incubación. El retraso exhibido por *rad59-ΔΔ* se observó más claramente en las muestras tratadas a 50°C (Figura 31B). Sin embargo, este retraso no afectó significativamente el número de CFU ni a los valores de  $DO_{600}$  del

mutante *rad59-ΔΔ*, que se mantuvieron paralelos a los del tipo silvestre (Figura 32). El retraso en la recuperación de la escalera cromosómica fue mucho mayor en el mutante *rad51-ΔΔ*, que sin embargo mostró un aumento progresivo del tamaño medio del material difuso durante las primeras 8 horas de recuperación, aunque las bandas cromosómicas no fueron visibles hasta las 24 horas (Figura 31C). No se detectó banda cromosómica alguna en el mutante *rad52-ΔΔ*, incluso después de 24 horas de incubación en ausencia de MMS, con independencia de la temperatura de incubación de los *plugs* (55°C o 50°C).

Como era de esperar de los resultados anteriores, el número de CFU en la cepa *rad51-ΔΔ* disminuyó al 15% después del tratamiento con MMS. Además, se observó una disminución adicional y progresiva en el número de CFU a lo largo de las primeras 8 horas de recuperación, lo que parece indicar que las células mantenidas en el medio intentan dividirse y mueren, mientras que son capaces de sobrevivir cuando son plaqueadas a medio sólido (Figura 32B). Sólo después de 8 horas, los supervivientes fueron capaces de proliferar en YEPD líquido, lo que indica que algunas células reparan sus genomas hasta el punto de reiniciar el crecimiento; es probable, que estos supervivientes sean los responsables de la escalera cromosómica observada a las 24 horas. En el caso de células *rad52-ΔΔ*, la bajada inicial de CFU (10%) provocada por el tratamiento agudo, fue seguida de un decrecimiento paulatino adicional durante las primeras 8 horas en YEPD, pero no mostró ningún aumento obvio entre 8 y 24 horas (Figura 31D y 32B). Los mutantes dobles *rad51-ΔΔ rad59-ΔΔ* y *rad52-ΔΔ rad59-ΔΔ* se comportaron como *rad51-ΔΔ* y *rad52-ΔΔ* (Figura 31C y D), respectivamente, indicando que en ausencia de Rad51 o Rad52, Rad59 juega un papel menor. Estos resultados indican que Rad51, y en mayor medida, Rad52 se requieren para la reparación de HDB causada por MMS en YEPD en células de *C. albicans*. Es probable que los supervivientes de *rad51-ΔΔ* y *rad52-ΔΔ* correspondan a las células detenidas por los *checkpoint* de daño al DNA en G1 o G2 y pueden reparar HDB utilizando enzimas NER y BER o por la vía de *RAD6*.

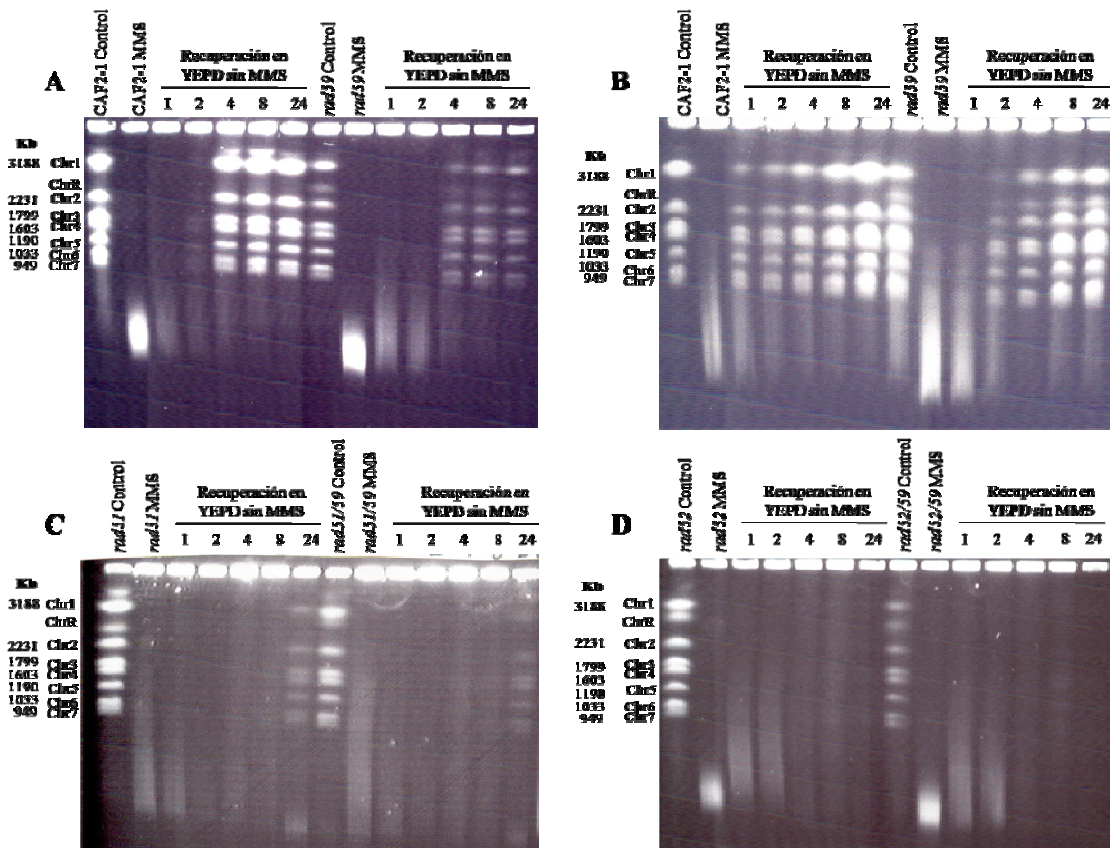


Figura 31. PFGE de muestras de la cepa silvestre CAF2-1 y los mutantes de HR tras tratamiento agudo con MMS y durante la recuperación en medio rico sin MMS a los tiempos indicados (1-24 horas). A) CAF2-1 y *rad59-ΔΔ* con muestras incubadas a 55°C. B) CAF2-1 y *rad59-ΔΔ* con muestras incubadas a 50°C. C) *rad51-ΔΔ* y *rad51-ΔΔ rad59-ΔΔ* con muestras incubadas a 55°C. D) *rad52-ΔΔ* y *rad52-ΔΔ rad59-ΔΔ* con muestras incubadas a 55°C. Para más detalle sobre el protocolo ver pie Figura 28.

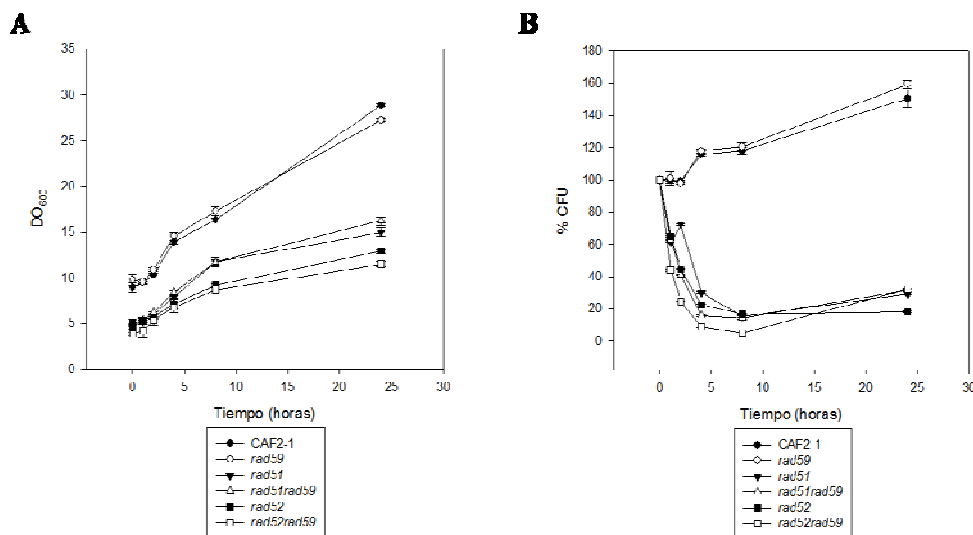
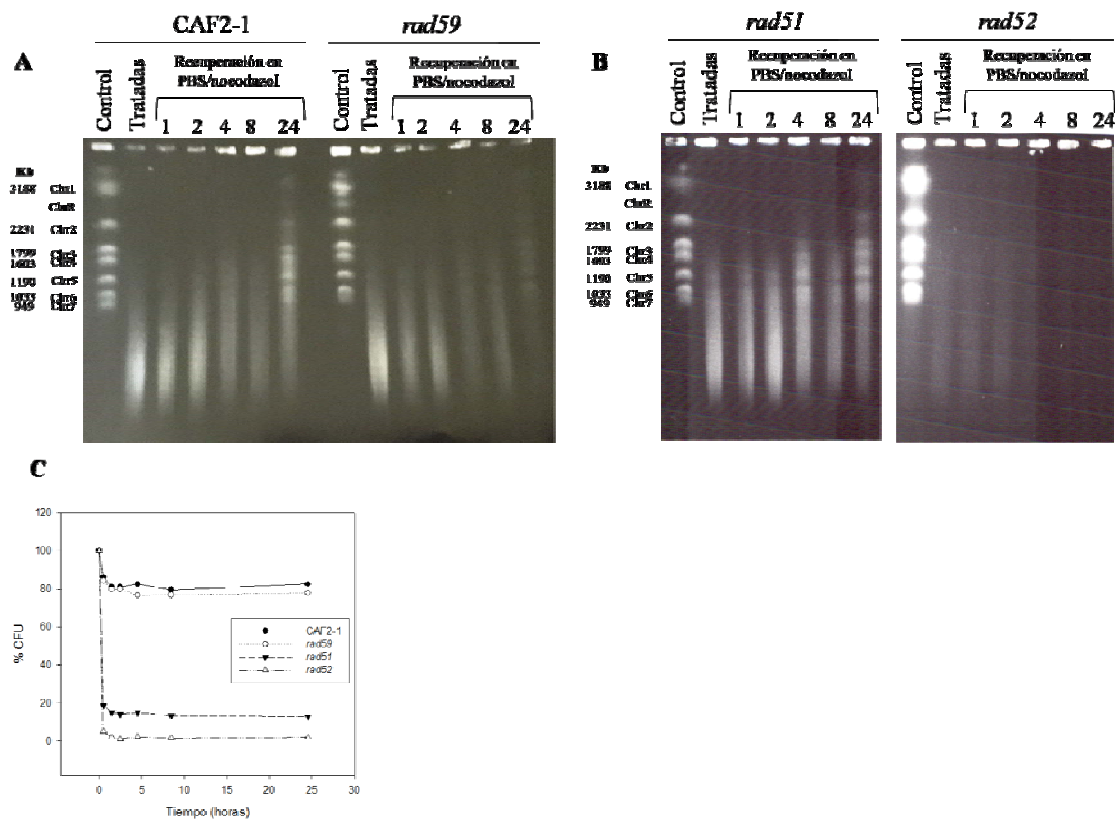


Figura 32. Gráficas obtenidas durante la recuperación de la cepa silvestre CAF2-1 y los mutantes HR en medio rico YEPD tras tratamiento agudo con MMS. A) Datos de DO<sub>600</sub> y B) N° de CFU obtenidos a los tiempos indicados.



#### IV.2.6. Generación y recuperación de HDB en células paradas en G2/M

Durante tratamientos agudos con MMS de células en división, la muerte celular puede sobrevenir cuando las células transitan por la fase S, especialmente si carecen de las proteínas Rad51 y Rad52 de HR (González-Prieto *et al.*, 2013). Esto podría explicar la bajada en el número de CFU mostrada por mutantes *rad51* y *rad52* tras la eliminación de MMS. Sin embargo, cuando las células se mantuvieron en G2/M mediante la adición de nocodazol (Ma *et al.*, 2011; Thakur y Sanyal, 2012), mostraron una tasa de muerte celular similar a la observada para células en crecimiento activo cuando se someten a tratamientos idénticos con MMS (Figura 33C). Además, se produjo una cantidad similar de HDBs en base a la gama de tamaños observados en el material difuso. Durante la recuperación, las células se mantuvieron sin agitación en PBS con nocodazol, con el fin de evitar la progresión del ciclo celular y minimizar la muerte celular debida a la mitosis con DNA dañado (Ma *et al.*, 2010). En estas condiciones, ninguna de las cuatro cepas mostró cambios significativos en el número de CFU (Figura 33C) y en los valores de DO<sub>600</sub>, y las células levaduriformes se mantuvieron como los típicos dobletes de G2/M. La cepa de tipo silvestre y el mutante *rad59-ΔΔ* mostraron una disminución progresiva similar en la migración del material difuso durante las primeras 8 horas de recuperación. La muestra de 24 horas reveló, además del material difuso, una escalera cromosómica, en la que aparecieron los cromosomas más pequeños (Chr5-7) más marcados que los de mayor tamaño (Chr1-2) (Figura 33A). Sorprendentemente, las células del mutante *rad51-ΔΔ* repararon los HDBs con una cinética similar o incluso más rápida que en la cepa silvestre, ya que las bandas correspondientes a los cromosomas más pequeños ya eran visibles en las muestras de 4 y 8 horas (Figura 33B). Por el contrario, en ausencia de Rad52 no se observaron cambios en la migración del material difuso o bandas cromosómicas durante la recuperación (Figura 33B). Estos resultados indican que Rad51 es prescindible, sino inhibitorio, para la reparación de los HDBs provocados por MMS en células paradas en G2/M de *C. albicans*, mientras que Rad52 es absolutamente necesario para la restitución de la escalera cromosómica.



**Figura 33. Tratamiento agudo de MMS tras parada de células en G2/M (nocodazol).** Cariotipo electroforético de muestras paradas en G2/M (nocodazol) y tratadas con MMS (tratamiento agudo 30 min 0,05%), así como las recuperadas en medio PBS sin MMS a los tiempos indicados de A) CAF2-1 y *rad59*- $\Delta\Delta$  y B) *rad51*- $\Delta\Delta$  y *rad52*- $\Delta\Delta$ . C) Datos del número de CFU obtenidos durante el tratamiento y posterior recuperación. Cultivos líquidos en fase exponencial de las cepas indicadas fueron refrescados hasta  $DO_{600} = 0,6$  e incubados a 30°C durante 2 horas. Pasado el tiempo se adicionó nocodazol (20  $\mu\text{g/ml}$ ) para parar las células en G2/M (Thakur y Sanyal, 2012). A continuación las células fueron tratadas con MMS 0,05% durante 30 minutos. Pasado el tiempo, las muestras se neutralizaron con tiosulfato sódico (1:1) y se lavaron con YEPD. Se resuspendieron en PBS con nocodazol y se tomaron alícuotas a diferentes tiempos (0, 1, 2, 4, 8 y 14 horas) para la determinación de los cariotipos.

#### IV.2.7. Discusión del capítulo II

Estudios recientes sugieren que *S. cerevisiae* utiliza dos subvías HR dependientes de Rad52, una que depende de Rad51 y otra que es dependiente de Rad59. Esta última opera en la recombinación espontánea entre repeticiones invertidas, en una vía minoritaria BIR, y en el rescate de telómeros erosionados en ausencia de telomerasa (Bai y Symington, 1996; Chen *et al.*, 2001; Vaze *et al.*, 2002). Por ejemplo, en el ensayo de recombinación espontánea entre repeticiones invertidas, la ausencia de Rad51 disminuyó la tasa de recombinación 5-10 veces, pero la eliminación de *RAD59* en un fondo *rad51* disminuyó la tasa de recombinación a niveles del mutante *rad52* (50-3000 veces). Además, la tasa de recombinación espontánea heteroalélica intercromosómica de una cepa *rad52*- $\Delta\Delta$  de *S. cerevisiae* incrementó tres veces en ausencia de Rad59

(Lettier *et al.*, 2006), sugiriendo que en ausencia de Rad52, Rad59 puede interferir con algunos procesos mediados por HR. En un ensayo genético diferente que mide la reparación de DSB inducida por HO, el doble mutante *rad51-Δ rad59-Δ* estaba más afectado que *rad51-Δ* pero no tanto como *rad52-Δ*, en este ensayo el grueso de la reparación en el doble mutante ocurrió mediante BIR (Signon *et al.*, 2001).

Hemos investigado las posibles sinergias entre *rad59* y mutaciones *rad51* o *rad52* en la recuperación de células de *C. albicans* del daño inducido por MMS y UV. Se pueden extraer varias conclusiones. En primer lugar, para ambas levaduras, la reparación mediada por HR de lesiones provocadas por MMS o UV no utiliza la subruta dependiente de Rad59. Por lo tanto, es probable que la reparación dependiente de Rad59 se limita a regiones específicas del DNA con alguna característica estructural (por ejemplo, repeticiones) que representan un bajo porcentaje en el genoma de levaduras y/o sólo funciona en la reparación de DSBs. En segundo lugar, nuestra observación de que la cepa *Carad52-ΔΔ* era mucho más sensible a MMS que *Carad51-ΔΔ* o *Carad51-ΔΔ rad59-ΔΔ* sugiere que, como se describe para *S. cerevisiae* (Coic *et al.*, 2008), las vías dependientes de Rad52 que usan otros factores distintos de Rad51 o Rad59 también son operativas en *C. albicans* para la reparaciones de lesiones causadas por MMS. Sin embargo, para luz UV, las sensibilidades de *Carad51-ΔΔ* y *Carad52-ΔΔ* eran indistinguibles lo que sugiere que la mayoría de la reparación dependiente de HR de lesiones UV en *C. albicans* utiliza mecanismos de invasión de banda. En tercer lugar, también encontramos algunas diferencias entre las sensibilidades de mutantes HR de *C. albicans* y *S. cerevisiae* a MMS. Tanto en tratamientos agudos como crónicos, las vías de HR dependientes de Rad52 y, en mayor medida, de Rad51 parecen jugar un papel ligeramente más importante en la recuperación de lesiones por MMS en *C. albicans* en comparación con *S. cerevisiae*, independientemente de la presencia o ausencia de Rad59. Una posibilidad sugerida previamente por Legrand *et al.*, (2008).

La mayor resistencia de mutantes HR de *S. cerevisiae* en comparación con los homólogos de *C. albicans* a dosis bajas pero no a altas dosis de luz UV, sugiere que *S. cerevisiae* tiene una ruta NER más eficiente (Legrand *et al.*, 2008), o que otras vías de emergencia puedan mantener controladas las brechas de ssDNA cuando son cortas y/o no muy abundantes, pero no si se han extendido por exonucleasas o su frecuencia traspasa un umbral. *Scrad51-ΔΔ* fue menos sensible que *Scrad52-ΔΔ* a bajas dosis de UV pero la diferencia en la sensibilidad disminuyó a medida que la dosis de UV aumentó. Una posibilidad es que altas dosis de UV desencadenen la resección por Exo1

y la mayor longitud de los subsiguientes fragmentos de ssDNA active la invasión de banda (Ma *et al.*, 2013).

Las diferencias en la sensibilidad a MMS entre mutantes *rad51* y *rad59* de dos cepas haploides de *S. cerevisiae* aconsejan cautela en la comparación de sensibilidades a genotoxinas entre *S. cerevisiae* y otras levaduras. En *S. cerevisiae* (JKM139), el doble mutante *rad51-Δ rad59-Δ* mostró sensibilidad sinérgica en comparación con los mutantes simples, mientras que no se observó sinergismo cuando las mismas mutaciones estaban presentes en el fondo genético W303 independientemente de si eran haploides o diploides. Una posibilidad es que, dado que la sensibilidad a MMS es un rasgo complejo, la combinación de alelos débiles de genes implicados en BER, HR, vías de remodelación de la cromatina, etc, influye en la respuesta de la cepa JKM139 de *S. cerevisiae*. Por otro lado, la respuesta de HR de las cepas BY4743 y W303 a luz UV y MMS fue similar, indicando que las pequeñas diferencias entre los genomas de ambas cepas (Ralser *et al.*, 2012) no afectan la sensibilidad de ambos agentes. Puesto que hemos confirmado la hipersensibilidad sinérgica del mutante *rad51-Δ rad59-Δ* de la cepa JKM139, la explicación más probable es que esta cepa ha sufrido alguna mutación desconocida. De lo contrario, debemos concluir que la contribución de la vía independiente de Rad51 y dependiente de Rad59 a la reparación de lesiones causadas por MMS puede variar entre las cepas de *S. cerevisiae*.

Hemos analizado con cierto detalle la naturaleza de las lesiones causadas por MMS y el papel de HR en su reparación tanto en células en crecimiento como detenidas en fase G2/M en *C. albicans*. Para ello, hemos utilizado concentraciones de MMS que no causan DSBs directamente en *S. cerevisiae* (Redon *et al.*, 2003; Covo *et al.*, 2010; González-Prieto *et al.*, 2013). Además, hemos demostrado que las concentraciones de MMS utilizadas no originan fragmentación cromosómica de las células de *C. albicans in vivo* mediante el análisis de los cariotipos PFGE, siempre y cuando las incubaciones de los *plugs* se realizaran a 30°C. Nuestro ensayo se basa en la detección de HDBs a través de su transformación en DSBs a alta temperatura (55°C). Cuando las roturas se encuentran lo suficientemente cerca en cadenas opuestas, SSBs se convierten en DSBs secundarios, que se manifiestan como fragmentación cromosómica en geles PFGE (Lundin *et al.*, 2005; Ma *et al.*, 2008). Nuestros resultados son consistentes con la observación de que depurinización de DNA metilado está en función de la temperatura (Wyatt y Pittman, 2006). Cuando la temperatura bajó de 55°C a 50°C, menos HDBs/SSBs y por tanto menos DSB fueron generados *in vitro*; lo que se reflejó en el

menor grado de fragmentación cromosómica y en una reparación más rápida. En *S. cerevisiae*, la reparación de bases metiladas por BER es constante y requiere la presencia de la glicosilasa Mag1, que elimina bases metiladas, dejando sitios apúricos sensibles al calor (Figura 21). Mag1 es activa y esencial para la reparación de células paradas en G1 (Ma *et al.*, 2008) o G2 (Ma *et al.*, 2011), o durante la replicación del DNA (Vázquez *et al.*, 2008). Rad51 y Rad52 son necesarias para la replicación del DNA en presencia de MMS (Vázquez *et al.*, 2008; González-Prieto *et al.*, 2013).

En células en crecimiento activo de *C. albicans*, encontramos que la reparación de HDB fue relativamente rápida y fuertemente dependiente de HR. No sólo Rad59 aceleró la restitución de la escalera cromosómica, sino que tanto Rad51 como, en mayor medida, Rad52 eran necesarios para la supervivencia de un tratamiento agudo de MMS (0,05% MMS, 30 min en PBS), así como para la reparación de HDBs durante la recuperación. La necesidad de Rad51 y Rad52 durante la replicación del DNA en presencia de MMS se explica por el reciente hallazgo de que ambas proteínas desempeñan dos funciones reguladas por el ciclo celular: 1) durante la replicación del DNA ambas proteínas se unen a regiones ssDNA de las horquillas de replicación activas y, al hacerlo, facilitan el avance de la horquilla a través del DNA metilado; en ausencia de Rad51 o Rad52 la restauración de la horquilla dañada (metilada) es defectiva y resulta en muerte celular; y 2) la incorporación de Rad51 y Rad52 a regiones de ssDNA aguas arriba de la lesión durante la replicación es un requisito previo para la reparación de los ssDNA en G2/M (González-Prieto *et al.*, 2013). Sugerimos que después de la eliminación del MMS, muchas células de *rad51* o *rad52* tratan de replicar el DNA metilado antes de reparar por BER y mueren, como lo demuestra la bajada en la supervivencia. También sugerimos que Rad59 puede acelerar la replicación del DNA metilado o su reparación en G2/M en presencia de Rad51 y Rad52.

Además de las proteínas de HR, la reparación de lesiones provocadas por MMS en células silvestres requiere fuentes de carbono y energía, ya que no se observó reparación de HDBs cuando células tratadas se incubaron en PBS. La elongación celular en respuesta a MMS también requiere medio rico, pero fue independiente de las proteínas de HR. Es importante destacar que la elongación celular se observó también en células *rad51-ΔΔ* y *rad52-ΔΔ* tratadas con MMS que son incapaces de replicarse durante su posterior recuperación en YEPD, o incluso morir (células *rad52-ΔΔ*), lo que sugiere que la elongación celular inducida por MMS no sólo es independiente de la replicación del DNA, sino que como hemos indicado nosotros

(Andaluz *et al.*, 2006) y otros autores (Shi *et al.*, 2007; Legrand *et al.*, 2011), más bien puede derivarse del estrés replicativo que lanza el *checkpoint* intra-S.

La supervivencia a MMS de células paradas en G2/M de *C. albicans* fue similar a las mostradas por las células en proliferación. La reparación de HDBs seguida de la eliminación de MMS se produjo lentamente en ausencia de división celular (PBS con nocodazol), como lo revela el aumento continuo en el tamaño del material difuso y la eventual, aunque incompleta recuperación de la escalera cromosómica después de 24 horas de incubación. La recuperación de las lesiones en células paradas en G2/M también se produjo en ausencia de Rad59. Sorprendentemente, Rad51 resultó prescindible, sino inhibitorio, para la reparación de HDBs, mientras que Rad52 fue esencial, lo que sugiere que la reparación involucra la actividad de apareamiento en lugar de invasión de banda, a pesar de que las células tienen posibilidades para la reparación recombinacional usando cromátidas hermanas. Una posibilidad es que en las células detenidas en G2/M, las endonucleasas Apn1,2 o las AP-liasas cortan eficientemente los sitios AP generados por la acción de Mag1 produciendo SSB cercanos opuestos (o cortes distantes procesados) capaces de generar fragmentos de DNA con colas protuberantes complementarias. En presencia de la actividad de reasociación de Rad52 la estrecha asociación de las colas complementarias de cadena simple permite la reparación por BER, mientras que en su ausencia la asociación de la banda debilita el emparejamiento BER. Esta situación imita a la observada en células paradas en G2/M de *S. cerevisiae* carentes de endonucleasa AP, en las que la reparación de roturas independientes de calor (HIB) generadas *in vivo* son absolutamente dependientes de Rad52 pero no de Rad51 (Ma *et al.*, 2011). En este escenario, las AP-liasas probablemente juegan *in vivo* un papel similar al que sucede *in vitro* a alta temperatura en la generación de huecos cercanamente opuestos. En vista de estos resultados, proponemos que Rad52 debe ser un miembro de la vía BER, donde coordina la acción de las endonucleasas ANP o las liasas NTG con actividad corrientes abajo (incluyendo la endonucleasa “flag rad27 5”, la DNA pol  $\epsilon$  y Lig1). Resulta llamativo que las células *rad52* de *S. cerevisiae* detenidas en G1 repararon HDB igual que las silvestres sugiriendo que un BER eficiente hace dispensable la actividad de reasociación de Rad52 (Lundin *et al.*, 2005; Ma *et al.*, 2008). Una posibilidad es que la regulación BER en *C. albicans* es diferente a la de *S. cerevisiae*. A este respecto, sólo se ha detectado una endonucleasa ANP (*ANP1*) y una liasa NTG (*NTG1*), además de una liasa *OGG1* en *C. albicans*. Además, los mutantes simples (*anp1*, *ntg1*, *ogg1*) y dobles

(*anp1 ntg1* y *oggl ntg1*) de BER mostraron sensibilidad silvestre a MMS (Legrand *et al.*, 2008), lo que sugiere que BER puede ser menos importante para la reparación del daño por MMS en *C. albicans* comparado con *S. cerevisiae*. Una segunda posibilidad es que la regulación de BER es diferente en células en G1 con respecto a células en G2/M. Con respecto a esto, sería interesante estudiar el papel de Rad52 en la reparación de HDBs en células de *S. cerevisiae* paradas en G2/M. Se necesitan más estudios antes de que se pueda obtener una imagen coherente de los intermediarios de DNA y de las vías de HR implicadas en la reparación de lesiones por MMS.



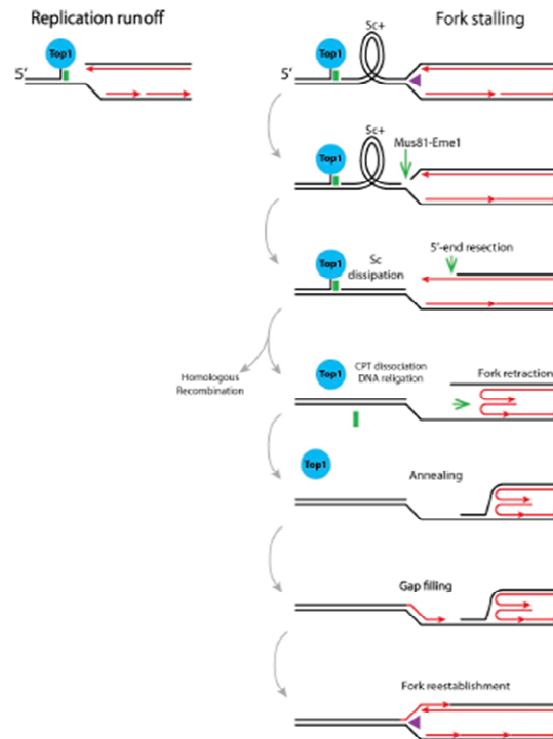


**IV.3. Capítulo III:** Papel de *RAD51*, *RAD52* y *RAD59* en la reparación de lesiones de DNA causadas por Camptotecina



La principal condición que desencadena la patogénesis de *C. albicans* es la inmunosupresión inducida por tratamientos no quirúrgicos del cáncer que dañan el DNA humano o inhiben la reparación de daños en el DNA y matan a las células proliferantes. Estos tratamientos incluyen la radiación ionizante (IR), y un número creciente de fármacos quimioterapéuticos tales como el cisplatino, etopósido, inhibidores de PARP, doxorubicina, bleomicina, camptotecina, etc (de la Loza y Wellinger, 2009; Cheung-Ong *et al.*, 2013). La camptotecina (CPT), en la forma de sus derivados como topotecán e irinotecán, se utiliza en el tratamiento del cáncer colorrectal, de pulmón y de ovarios (Pommier, 2006). CPT estabiliza los intermediarios Top1-DNA que relajan el DNA durante la transcripción o la replicación del DNA (Hsiang *et al.*, 1985; 1989). Durante años, se ha sugerido que la CPT provoca principalmente roturas de cadena sencilla (SSB) (Pouliot *et al.*, 2001; Dexheimer y Pommier, 2008; Cortés-Ledesma *et al.*, 2009) que, si no son reparadas, se pueden convertir en DSB durante la fase S del siguiente ciclo celular (replicación “*run-off*”) (Kuzminov, 2001; Pommier, 2006; Kouzminova y Kuzminov, 2006; Caldecott, 2008). Este modelo clásico ha sido cuestionado recientemente por el hallazgo de que los inhibidores de Top1 interfieren con la actividad relajante de la enzima (Koster *et al.*, 2007). El superenrollamiento positivo acumulado delante de la maquinaria de replicación impediría la progresión de la horquilla causando muerte celular con generación de pocos DSBs (Chaudhuri *et al.*, 2012; Berti *et al.*, 2013) (Figura 34). En células animales, se ha sugerido que el atasco persistente de la horquilla causa una regresión de ésta, la cual se acumula en presencia de PARP1, una enzima asociada a la cromatina que modifica diversas proteínas nucleares mediante poli-ADP-ribosilación. Tras la disociación de CPT, la horquilla puede reiniciarse estimulada por helicasas RecQ (Chaudhuri *et al.*, 2012; Berti *et al.*, 2013) (Figura 34). Otros estudios con células humanas han involucrado la acción de Mus81-Eme1 (Mms4 en *S. cerevisiae*), una endonucleasa que corta estructuras de DNA ramificadas como es el caso de horquillas de replicación detenidas y estructuras de *Holliday* dañadas *in vitro*. En el modelo propuesto, el superenrollamiento positivo detiene la replicación del DNA e induce el corte de la horquilla por Mus81-Eme1, con lo cual se relaja el DNA. Después de la resección del extremo 5' y la disociación de CPT, los DSB son reparados bien utilizando HR o bien a través de la retracción de la horquilla para formar estructuras denominadas “*chicken foot*”. En este último caso, tras el apareamiento de las cadenas

molde y relleno de huecos, puede restablecerse la horquilla y reiniciar la replicación (Regairaz *et al.*, 2011) (Figura 34).



**Figura 34. Modelo para el procesamiento del atasco de horquillas de replicación por Mus81-Eme1.** Modelo clásico independiente de Mus81 que muestra la inducción de la replicación del DNA asociado a DSE (*Double Strand End*) por replicación “run-off” (izquierda). Nuevo modelo mediado por Mus81-Eme1 (derecha). Sc+: superenrollamiento positivo; rectángulo verde: CPT; triángulo púrpura: DNA polimerasa. Figura tomada de Regairaz *et al.*, 2011.

*S. cerevisiae* se ha utilizado como modelo para entender la acción de drogas dirigidas frente a topoisomerasas, tales como CPT y derivados. Aunque CPT provocó un retraso detectable en la progresión del 79% de las horquillas de replicación en *S. cerevisiae* (Chaudhuri *et al.*, 2012), apenas afectó a la replicación del DNA y se indujo sólo un cuarto de los genes de G1/S de los inducidos por MMS (Travesa *et al.*, 2012). Además, contrariamente a MMS, CPT no induce la fosforilación de Rad53 o dispara el *checkpoint* de la fase S en células silvestres (Alcasabas *et al.*, 2001; Tercero y Diffley, 2001; Redon *et al.*, 2003; Novarina *et al.*, 2011); el daño acumulado durante la replicación es reparado en G2/M (Redon *et al.*, 2003). La inducción del *checkpoint* de daño al DNA por CPT sólo pudo ser detectada en ausencia de Rad52 y ocurrió después de la finalización de la replicación del grueso del genoma, de tal manera que las células *rad52* tratadas con CPT se detienen permanentemente en G2/M. De acuerdo con el

modelo del estancamiento de la horquilla (causada por el superenrollamiento positivo inducido por CPT), no se observaron indicios de fragmentación cromosómica en geles de PFGE, incluso en ausencia de Rad52 (Chaudhuri *et al.*, 2012). Aunque en levaduras no se ha encontrado PARP, otras proteínas podrían desempeñar un papel similar.

*C. albicans* es un comensal natural del tracto oral, genital y gastrointestinal de los seres humanos, que está presente en el 30-70% en individuos sanos (Perlroth *et al.*, 2007). Si los portadores desarrollan cáncer y son irradiados o tratados con fármacos quimioterapéuticos, sus cepas de *C. albicans* también se verán afectadas. El gen topoisomerasa 1 de *C. albicans* ha sido clonado y se ha construido una cepa nula condicional. Esta cepa mostró morfología anormal y una virulencia significativamente reducida, lo que sugiere que Top1 puede desempeñar un papel en la infección (Jiang *et al.*, 1997). Existen evidencias de que el tratamiento de *C. albicans* con una serie de fármacos contra el cáncer (5-fluorouracilo, cis-platino, peplomicina) o la irradiación con  $^{137}\text{Cs}$  generan supervivientes con virulencia incrementada, a juzgar por el aumento de la adherencia celular, capacidad de unión de lectinas, secreción de proteasas, resistencia a los neutrófilos y resistencia a antifúngicos (Tanida *et al.*, 2001). Sin embargo, no se ha investigado el origen de estas alteraciones fenotípicas.

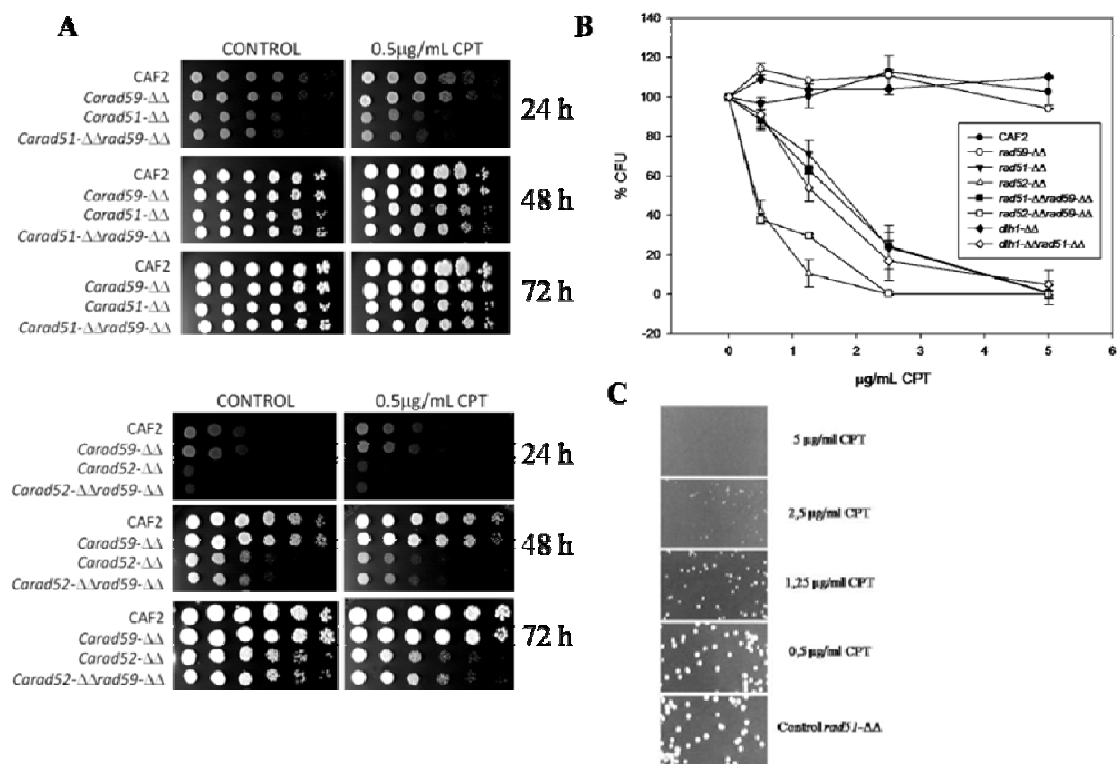
En el presente estudio, hemos analizado el efecto citotóxico causado por CPT tanto en *C. albicans* como en un diploide de *S. cerevisiae* y el papel de HR en la reparación de las lesiones inducidas. Hemos encontrado que para concentraciones bajas de CPT y tratamientos crónicos, HR juega un papel más importante en la supervivencia en *S. cerevisiae* en comparación con *C. albicans*. En presencia de 40  $\mu\text{g/ml}$  de CPT no afectó el crecimiento de la cepa silvestre de *C. albicans*, pero inhibió el de los mutantes *rad51* y causó muerte progresiva en células *rad52* cuya supervivencia se redujo al 25% en 8 horas, sin causar niveles detectables de la fragmentación del DNA. En los tratamientos de CPT agudos, la capacidad de supervivencia de los mutantes *rad51* y *rad52* alcanzó una meseta a 5  $\mu\text{g/ml}$ , lo que sugiere la saturación de los transportadores.

#### **IV.3.1. Antecedentes**

A continuación, se muestran algunos resultados obtenidos por la Dra. Fátima García Prieto que son necesarios para entender los resultados que se muestran posteriormente en este capítulo.

IV.3.1.1. Respuesta de la cepa silvestre y mutantes HR de *C. albicans* a tratamientos crónicos con CPT: papel de Rad59

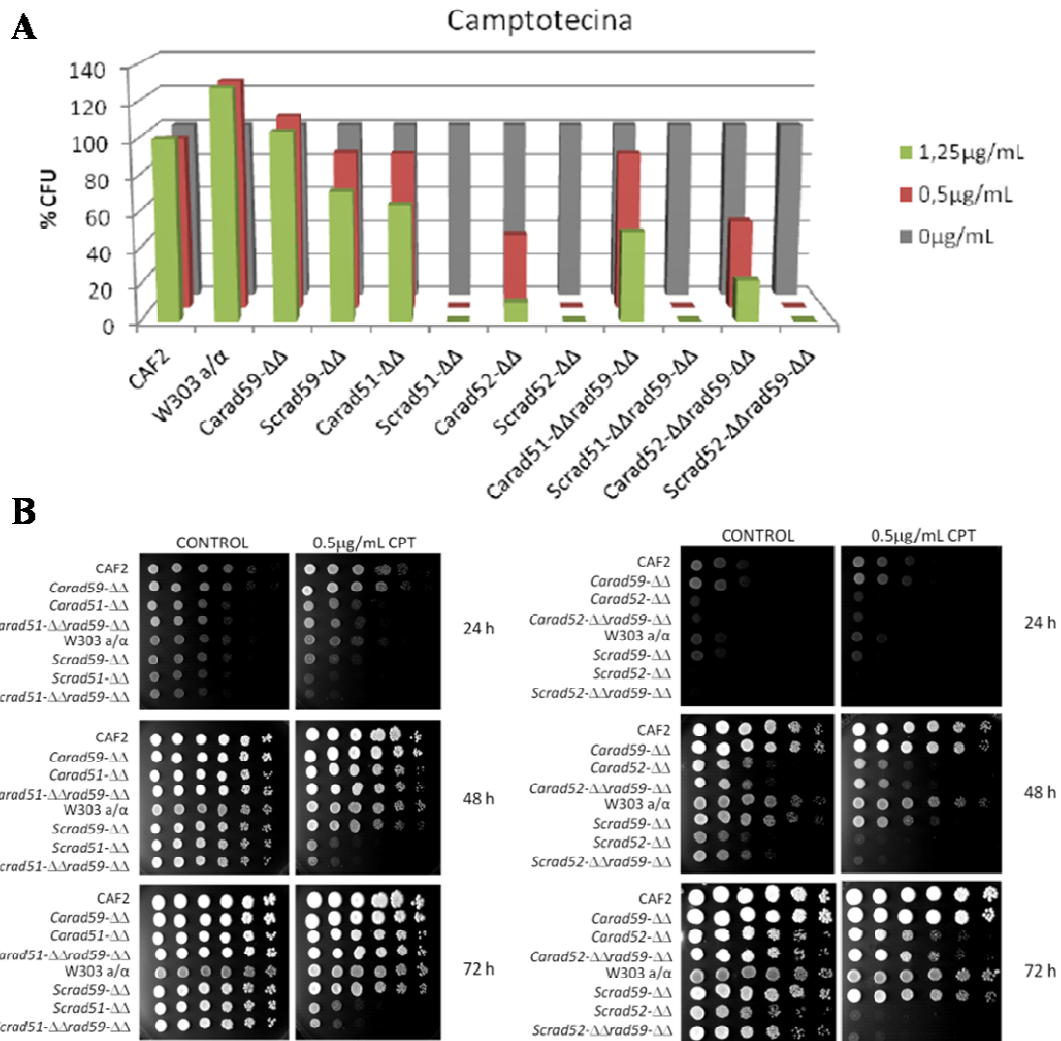
Previamente, García-Prieto *et al.*, (2010) demostró que *Carad51-ΔΔ* y, en mayor medida, *Carad52-ΔΔ* eran sensibles a CPT, mientras que *Carad59-ΔΔ* se comportaba como la cepa silvestre (CAF2-1) (Figura 35). El uso de tratamientos crónicos, incluyendo ensayos cuantitativo (CFU) y “drop test”, indicó que *Carad51-ΔΔ rad59-ΔΔ* y *Carad52-ΔΔ rad59-ΔΔ* muestran la misma sensibilidad a CPT que los mutantes simples *Carad51-ΔΔ* y *Carad52-ΔΔ* respectivamente (Figura 35A y B), lo que sugiere que la reparación de lesiones provocadas por CPT es independiente de Rad59, tanto en presencia o ausencia de Rad51 o Rad52. Es importante destacar que cuando se siembran en placas YEPD suplementadas con diferentes concentraciones de CPT que aún permiten el crecimiento de *Carad51-ΔΔ*, este mutante mostró colonias retrasadas (Figura 35C), lo que sugiere que la replicación del DNA se ralentiza o se para, pero algunas células se adaptan y son capaces de replicarse en estas condiciones.



**Figura 35. Sensibilidad frente a CPT.** A) Ensayo “drop test”. B) Ensayo cuantitativo (CFU). C) Tamaño colonial de un mutante *Carad51-ΔΔ* en función de la concentración de CPT usada. Figuras tomadas o modificadas de García-Prieto *et al.*, 2010 y García-Prieto, 2011 (Tesis Doctoral).

*IV.3.1.2. Los mutantes HR de C. albicans son significativamente más resistentes a CPT que sus homólogos en S. cerevisiae*

En ensayos crónicos cuantitativos (CFU), realizados por García-Prieto (2011), los mutantes de HR de *S. cerevisiae* fueron mucho más sensibles que sus homólogos de *C. albicans*, a pesar de que las cepas de tipo silvestre de ambas levaduras fueron igualmente resistentes a 0,5 y 1,25  $\mu\text{g}/\text{m}$  de CPT (Figura 36A). Mientras que *Carad59- $\Delta\Delta$*  se comportó como la cepa silvestre y *Carad51- $\Delta\Delta$*  y *Carad52- $\Delta\Delta$*  fueron inhibidos en un 50% y 90% respectivamente en presencia de 1,25  $\mu\text{g}/\text{ml}$  de CPT, *Scrad59- $\Delta\Delta$*  mostró una significativa sensibilidad y *Scrad51- $\Delta\Delta$*  y *Scrad52- $\Delta\Delta$*  no crecieron en absoluto a concentraciones menos de CPT (0,5  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) (Figura 36A). Esto sugiere que la reparación de lesiones causadas por CPT se basa más en HR en *S. cerevisiae* que en *C. albicans*. La misma conclusión se dedujo de los ensayos “*drop test*”. El ensayo “*drop test*” también reveló una recuperación significativa de *Carad51- $\Delta\Delta$*  y *Carad52- $\Delta\Delta$*  con el tiempo de incubación (Figura 36B), reminiscente de las colonias retrasadas mostradas por estos mutantes (CFU) en ensayos crónicos. Comparativamente, *Scrad51- $\Delta\Delta$*  y *Scrad52- $\Delta\Delta$*  mostraron poca o ninguna recuperación respectivamente durante el mismo periodo (y lo mismo ocurrió con *Scrad51- $\Delta\Delta$  rad59- $\Delta\Delta$*  y *Scrad52- $\Delta\Delta$  rad59- $\Delta\Delta$* ) (Figura 36B). Estos resultados sugieren que la incapacidad para reparar las lesiones provocadas por CPT mediante HR resulta en graves defectos de crecimiento que conducen a muerte celular.



**Figura 36. Comparación de la sensibilidad frente a CPT de los mutantes HR de *C. albicans* y *S. cerevisiae*, así como de sus cepas parentales. A) Ensayo crónico (CFU). B) Ensayo “drop test”. Figuras tomadas de García-Prieto, 2011 (Tesis Doctoral).**

García-Prieto encontró algunas diferencias en la sensibilidad a CPT entre los mutantes HR de *S. cerevisiae* de BY4743 (García prieto *et al.*, 2010) y W303, utilizando el ensayo “drop test” (Figura 37). *Scrad51-ΔΔ* y *Scrad52-ΔΔ* derivados de la cepa BY4743 mostraron un crecimiento significativo en presencia de CPT a 0,5 µg/ml pero no sus correlativos en la cepa W303, ya que *Scrad52-ΔΔ* no mostró ningún crecimiento en placas con 0,5 µg/ml de CPT en el mismo ensayo. Estas diferencias fueron confirmadas y cuantificadas en tratamientos crónicos con CPT que determinan CFUs (datos no mostrados). Una posibilidad es la presencia de alelos deletéreos de algunos genes implicados en la supervivencia de W303 a las lesiones causadas por CPT y cuyo efecto sólo se evidencia cuando se ve comprometida HR. Alternativamente, ambas cepas pueden mostrar diferencias en la permeabilidad celular a CPT.



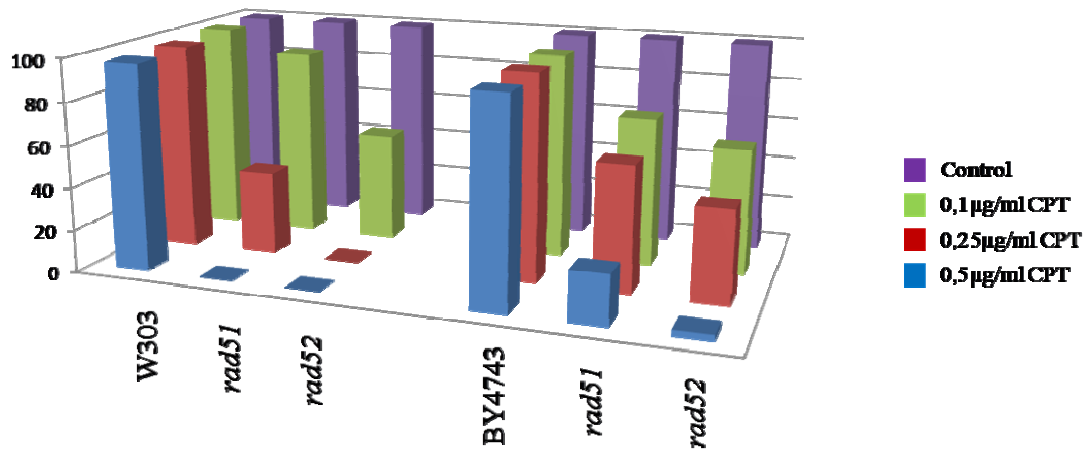


Figura 37. Comparación de la sensibilidad frente a CPT de los mutantes HR de *S. cerevisiae* BY4743 y W303. Figura de García-Prieto.

### IV.3.2. Resultados Capítulo III

#### IV.3.2.1. Recuperación de *C. albicans* y sus mutantes de recombinación del efecto inhibitorio por CPT en tratamientos crónicos

Con el fin de confirmar la “recuperación” de células deficientes en HR en presencia de CPT, se realizó un estudio directo de la aparición de colonias en placas. Como se esperaba de las diferentes sensibilidades mostradas por los mutantes a CPT en *C. albicans*, no se observaron colonias de *rad52-ΔΔ* en placas YEPD suplementadas con 2,5 µg/ml de CPT incubadas durante 96 y 120 horas (y sólo unas pocas y minúsculas colonias se detectaron en 1,25 µg/ml), mientras que podían verse algunas colonias de *rad51-ΔΔ* en placas con 2,5 µg/ml de CPT a 72 y 96 horas (Figura 38). Sin embargo, la mayoría de estas colonias retrasadas fueron capaces de originar colonias visibles en 24 horas tras ser replicadas a placas de YEPD que carecen de CPT (Figura 38). En *S. cerevisiae* también se detectaron colonias con retraso en el mutante *rad51-ΔΔ* y, en mayor medida, en *rad52-ΔΔ* (Figura 38) a dosis 10 veces más bajas que las utilizadas para *C. albicans*. A diferencia de los mutantes *Carad51-ΔΔ* y *Carad52-ΔΔ* las cepas silvestre y *Carad59-ΔΔ* de *C. albicans* no mostraron colonias con retraso, al igual que la cepa W303 de *S. cerevisiae* (Figura 38). Estos resultados confirman que CPT actúa como agente fungistático para células de *C. albicans* deficientes en HR a concentraciones que resultan fungicidas para sus correlativas de *S. cerevisiae*.

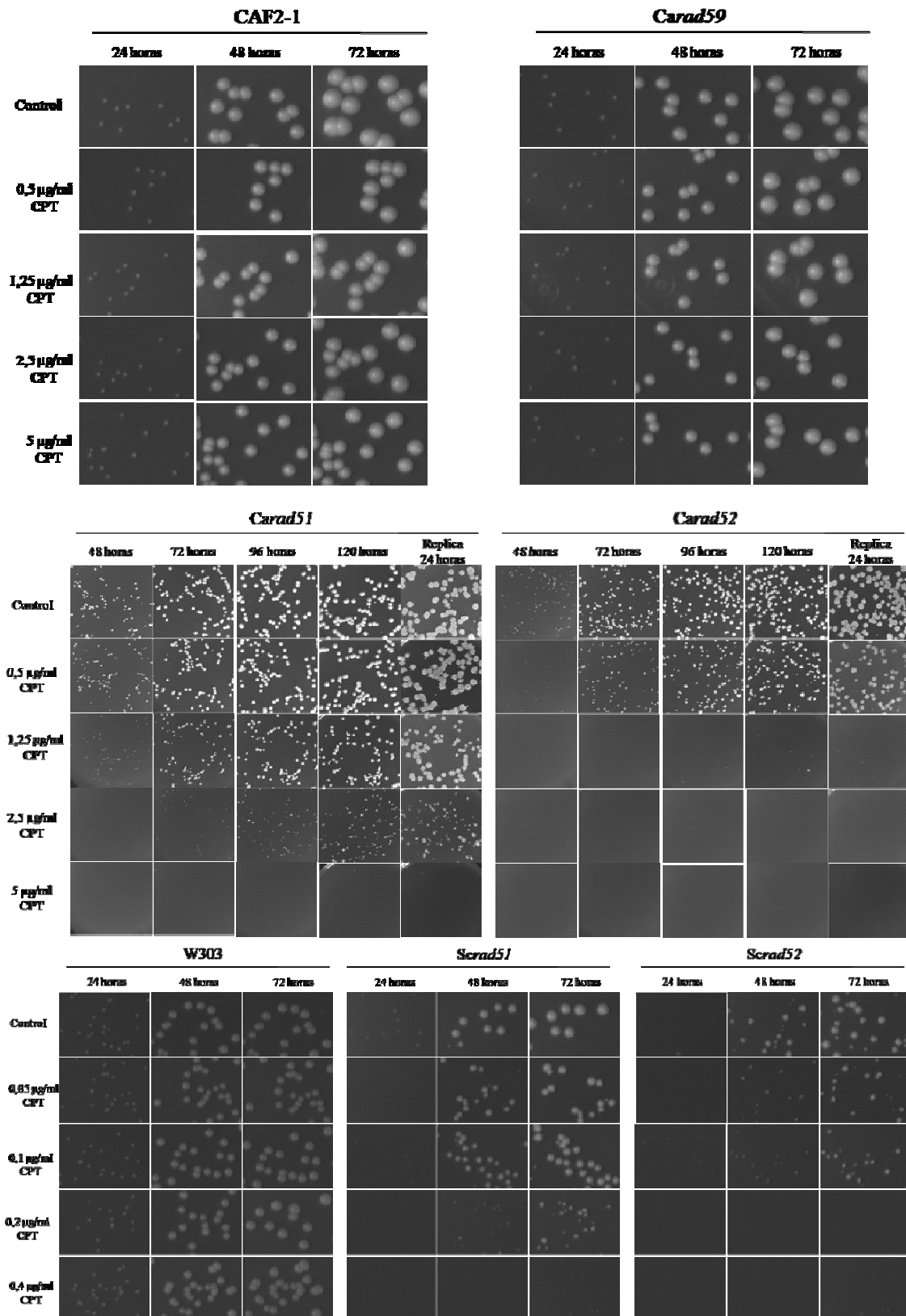
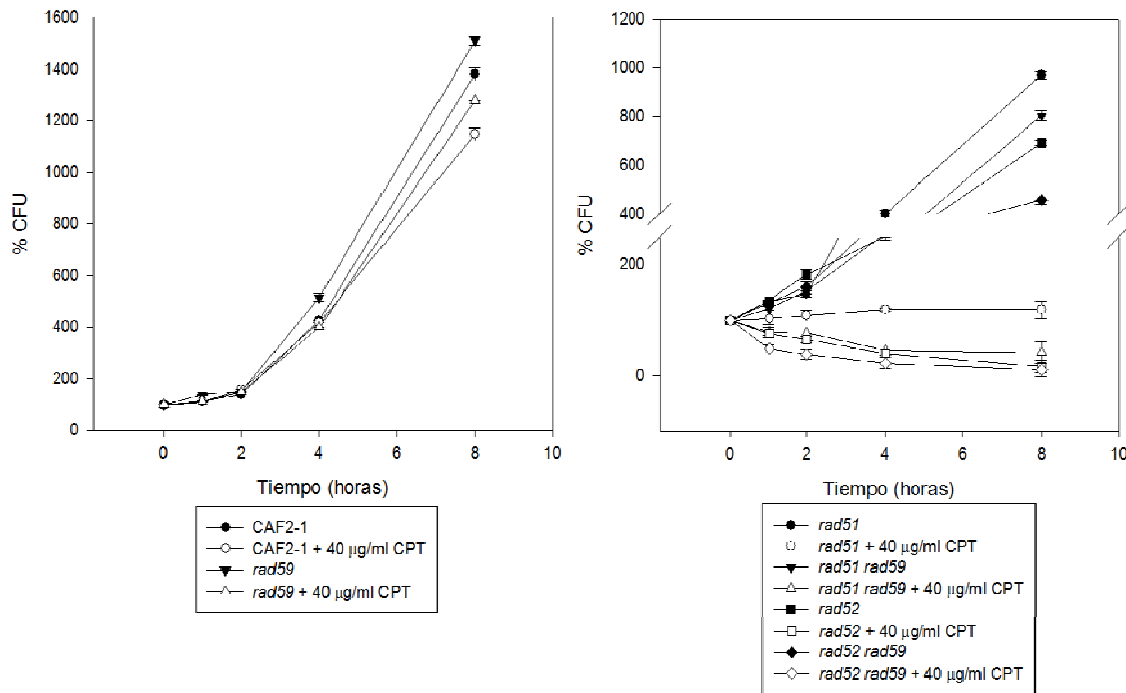


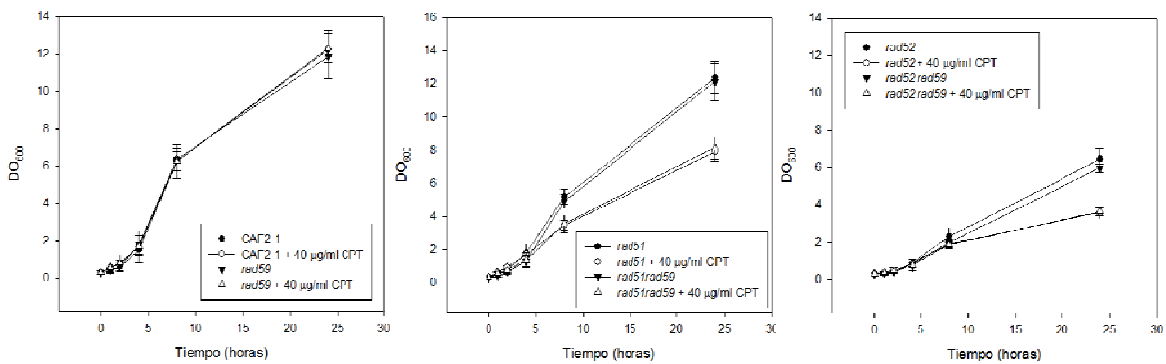
Figura 38. Sensibilidad de mutantes HR en tratamiento crónico de *C. albicans* y *S. cerevisiae* a Camptotecina. Unas 300 células se sembraron en placas YEPD suplementadas con las concentraciones de CPT indicadas. Las placas fueron incubadas a 30°C en oscuridad y fotografiadas a los tiempos indicados. La columna “replica 24 horas” corresponde a las placas de 120 horas replicadas en medio YEPD sin la droga y fotografiadas tras 24 horas de incubación a 30°C. Se usó como control placas de YEPD sin droga. Nótese que para *S. cerevisiae* se utilizaron concentraciones de CPT unas 10 veces menores que para *C. albicans*.

#### IV.3.2.2. Efecto de CPT en crecimiento y morfología de la cepa silvestre y mutantes HR de *C. albicans* en medio líquido

Con el fin de conocer con mayor precisión el grado de inhibición del crecimiento causado por CPT en *C. albicans*, determinamos las curvas de crecimiento de las diferentes cepas utilizando medio YEPD suplementado con 40  $\mu\text{g/ml}$  de CPT a lo largo del tiempo. De acuerdo con los experimentos anteriores, la cepa silvestre (CAF2-1) mostró una tasa de crecimiento similar a la del mutante *rad59*- $\Delta\Delta$ , con independencia de que se determinara mediante CFU (Figura 39) o  $\text{DO}_{600}$  (Figura 40). Además, ambas cepas fueron ligeramente afectadas y en la misma medida por la presencia de CPT (Figura 39), siendo los valores de  $\text{DO}_{600}$  paralelos a los de CFU (Figura 40). Como era de esperar, en ausencia de CPT el mutante *rad51*- $\Delta\Delta$  creció a una tasa menor que la cepa de tipo silvestre, y este defecto de crecimiento se vio agravado en *rad52*- $\Delta\Delta$  (Figura 39). Cuando los cultivos se suplementaron con CPT (40  $\mu\text{g/ml}$ ), las CFUs del mutante *rad51*- $\Delta\Delta$  se mantuvieron constantes a lo largo del experimento, mientras que las del mutante *rad52*- $\Delta\Delta$  disminuyeron paulatinamente hasta alcanzar 1/5 del valor inicial a las 8 horas, lo que sugiere una progresiva muerte celular (Figura 39). Es importante destacar que, los dobles mutantes *rad51*- $\Delta\Delta$  *rad59*- $\Delta\Delta$  y *rad52*- $\Delta\Delta$  *rad59*- $\Delta\Delta$  fueron ligeramente más sensibles al tratamiento de CPT (40  $\mu\text{g/ml}$ ) que los mutantes simples respectivamente, lo que indica que en estas condiciones la ausencia de Rad59 afectó negativamente a la supervivencia de células *rad51* y *rad52*. Sorprendentemente, los valores de  $\text{DO}_{600}$  aumentaron en los cultivos de *rad51*- $\Delta\Delta$  y *rad52*- $\Delta\Delta$  en presencia de CPT (Figura 40), a pesar de que se mantuvo o se redujo el número de CFU respectivamente. Este aumento en la  $\text{DO}_{600}$  fue probablemente debido a la polarización del crecimiento continuo de la mayoría de las células de levaduras de los mutantes *rad51*- $\Delta\Delta$  y *rad52*- $\Delta\Delta$  (así como de los dobles mutantes *rad51*- $\Delta\Delta$  *rad59*- $\Delta\Delta$  y *rad52*- $\Delta\Delta$  *rad59*- $\Delta\Delta$ ) (ver después). Dado que este fenotipo no lo muestran las células de CAF2-1 o del mutante *rad59*- $\Delta\Delta$  tratadas con CPT, se deduce que la polarización del crecimiento requiere la acción combinada de CPT y una HR defectiva. Esta polarización es diferente a la observada en mutantes *rad51*- $\Delta\Delta$  y *rad52*- $\Delta\Delta$  en ausencia de CPT y es similar a la inducida en el tipo silvestre (CAI4) por MMS (ver Capítulo II, apartado IV.2.3). MMS desencadena los *checkpoints* de replicación y de G2/M en células silvestres de *S. cerevisiae*, así como la fosforilación de Rad53 en *C. albicans*. Por tanto, sugerimos que es la detención en G2/M y no el posible retraso de replicación lo que induce la filamentación de células *rad51* y *rad52* de *C. albicans* en presencia de CPT.



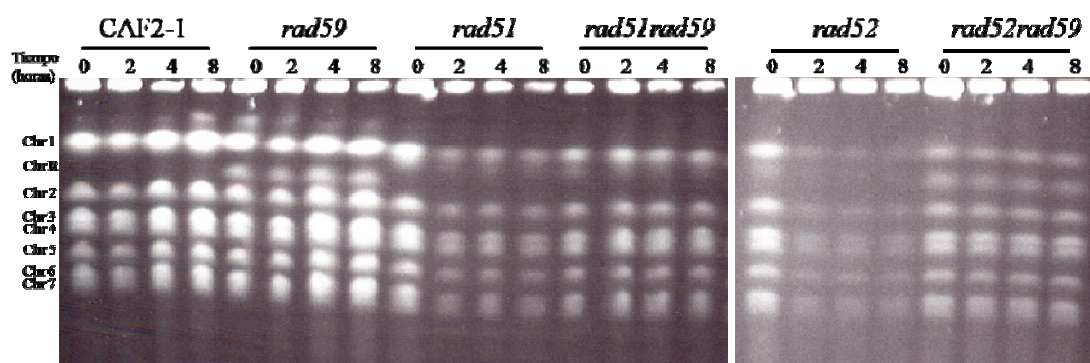
**Figura 39. Crecimiento (CFU) de la cepa silvestre CAF2-1 y los mutantes HR de *C. albicans* en presencia de CPT.** Unas  $5 \times 10^5$  células en crecimiento exponencial se resuspendieron en 1 ml de YEPD suplementado con 40  $\mu\text{g/ml}$  de CPT y se incubaron a 30°C. Posteriormente, a los tiempos indicados se realizaron dos diluciones 1/10 en medio YEPD y se sembraron 50  $\mu\text{l}$  de la última en placas de YEPD sin droga. Como controles se usó paralelamente el mismo número de células en YEPD sin droga. Los datos son medias de dos experimentos independientes.



**Figura 40. Crecimiento ( $\text{DO}_{600}$ ) de la cepa silvestre CAF2-1 y los mutantes HR de *C. albicans* en presencia de CPT.** Cultivos crecidos durante toda la noche fueron refrescados al día siguiente a  $\text{DO} = 0,3$  en 20 ml de medio fresco YEPD. A continuación se añadió CPT para una concentración final de 40  $\mu\text{g/ml}$  y se incubó a 30°C. Paralelamente a estos cultivos se pusieron otros idénticos que carecían de la droga (controles). Se midió la  $\text{DO}_{600}$  a los tiempos indicados. Los datos son medias de dos experimentos independientes.

#### IV.3.2.3. CPT no induce fragmentación cromosómica en *C. albicans* incluso en ausencia de HR

En *S. cerevisiae* CPT no causa fragmentación cromosómica, incluso después de la inactivación de Rad52. La cepa silvestre y los mutantes HR de *C. albicans* se sometieron a un tratamiento con CPT (40  $\mu\text{g/ml}$ ) y las muestras se recogieron a diferentes tiempos para investigar la posible fragmentación cromosómica utilizando PFGE. Ni la cepa silvestre ni los mutantes mostraron alteraciones en los cariotipos electroforéticos iniciales tras 8 horas en presencia de CPT (Figura 41), lo que sugiere que no se generaron DSBs bajo estas condiciones. Esto contrasta con los DSBs directos generados por la radiación ionizante y la bleomicina en los cromosomas de *C. albicans* (nuestros resultados) o con las roturas dependientes de calor causadas por MMS en el DNA de *C. albicans in vitro* bajo las condiciones de PFGE usadas (55°C). Por tanto, concluimos que las lesiones causadas por CPT en los mutantes de HR son probablemente SSBs, cuyo número no excede el umbral necesario para causar DSBs secundarios.

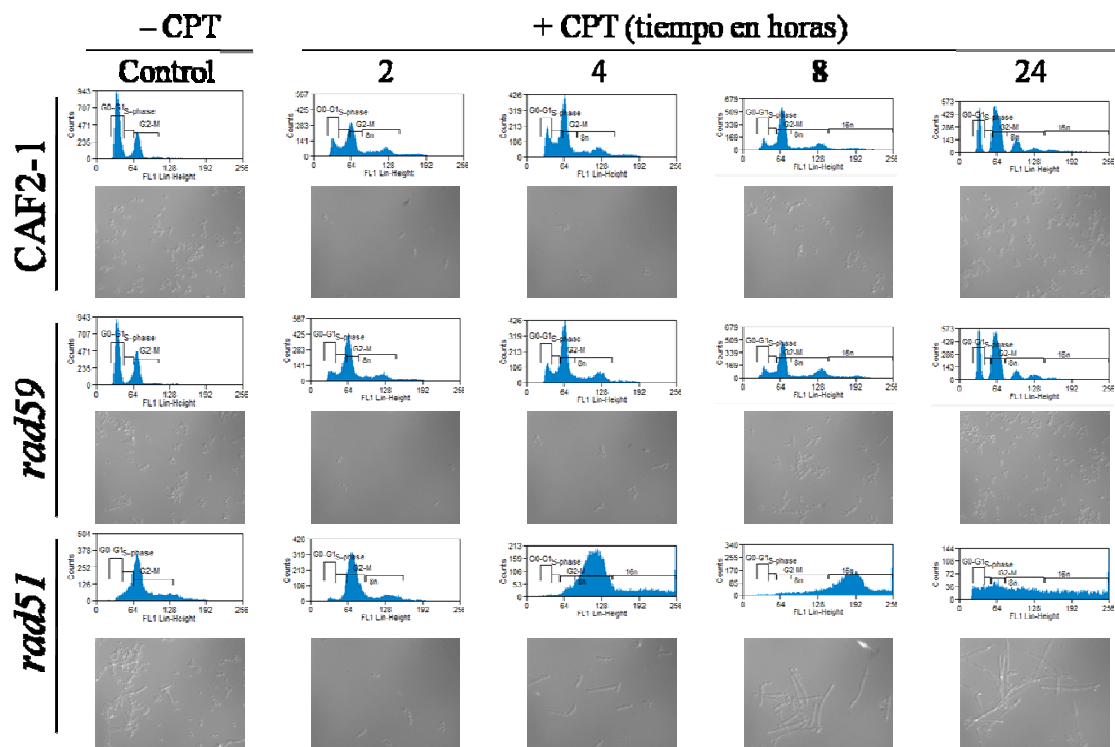


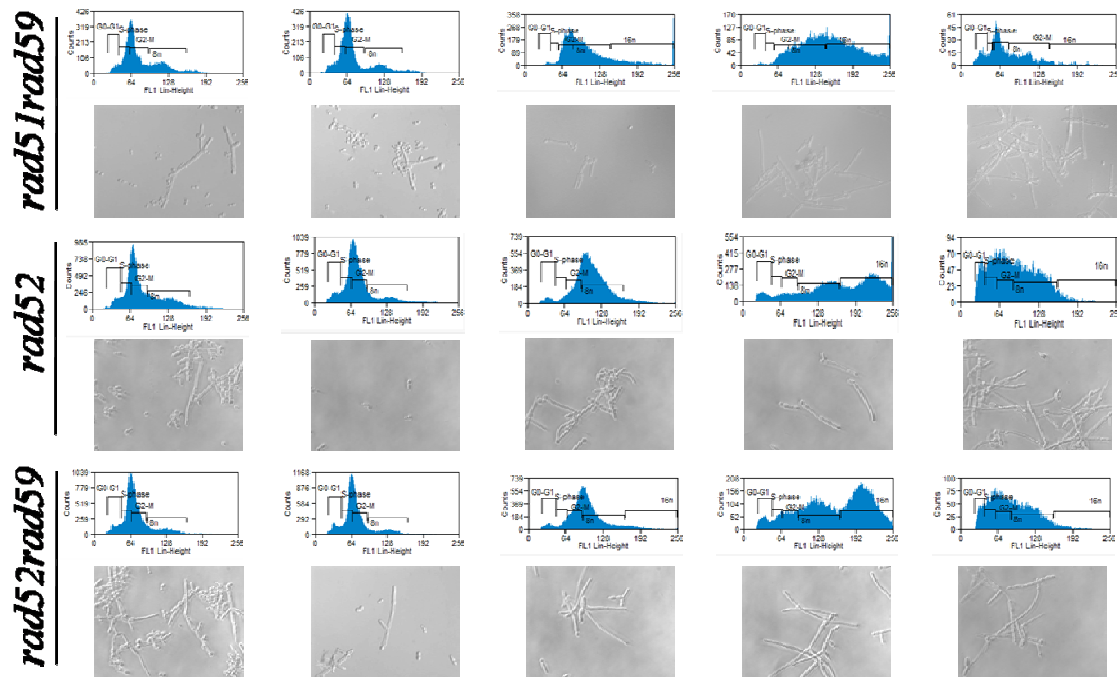
**Figura 41.** Cariotipos electroforéticos (PFGE) tras tratamiento de las cepas indicadas de *C. albicans* con CPT (40  $\mu\text{g/ml}$ ) durante los tiempos indicados. Cultivos líquidos de las cepas indicadas fueron tratados con 40  $\mu\text{g/ml}$  de CPT. Se recogió una alícuota de cada muestra a diferentes tiempos (2, 4 y 8 horas) para análisis PFGE.

#### IV.3.2.4. La acción combinada de CPT y defectos HR desencadena el checkpoint de G2/M y elongación celular en *C. albicans*

A continuación, se investigó si las lesiones causadas por CPT en *C. albicans* inducen el *checkpoint* del daño al DNA. En base a la ausencia de fosforilación de Rad53, se ha sugerido que CPT no induce los *checkpoints* intra-S o del daño al DNA en *S. cerevisiae* y que el daño durante la replicación puede ser reparado en G2 (Redon *et al.*, 2003).

Para investigar la fase del ciclo celular en que las células de *Carad51-ΔΔ* y *Carad52-ΔΔ* se detienen en presencia de CPT se realizaron paralelamente análisis FACS y microscópicos de las células de tipo silvestre y mutantes HR mantenidos en YEPD suplementado con 40 μg/ml de CPT (Figura 42). Los cultivos refrescados de la cepa silvestre y del mutante *rad59-ΔΔ* mantienen la distribución inicial de células durante al menos 24 horas y esta distribución apenas se vio afectada por la presencia de CPT (Figura 42). Como hemos publicado recientemente (Bellido *et al.*, 2015), los perfiles FACS de los mutantes *rad51-ΔΔ* y *rad51-ΔΔ rad59-ΔΔ* y, en mayor grado, los mutantes más defectivos *rad52-ΔΔ* y *rad52-ΔΔ rad59-ΔΔ*, estaban sesgados hacia la acumulación de células en G2/M en ausencia de CPT. Este sesgo se exacerbó significativamente en presencia de la droga (Figura 42). Es importante destacar que esta alteración fue acompañada de una elongación progresiva de las células levaduriformes y desaparición de los filamentos típicos de mutantes de HR (Figura 42), sugiriendo que en ausencia de HR, CPT desencadena el *checkpoint* de daño al DNA en G2/M, como se describe para células *rad52* de *S. cerevisiae*.

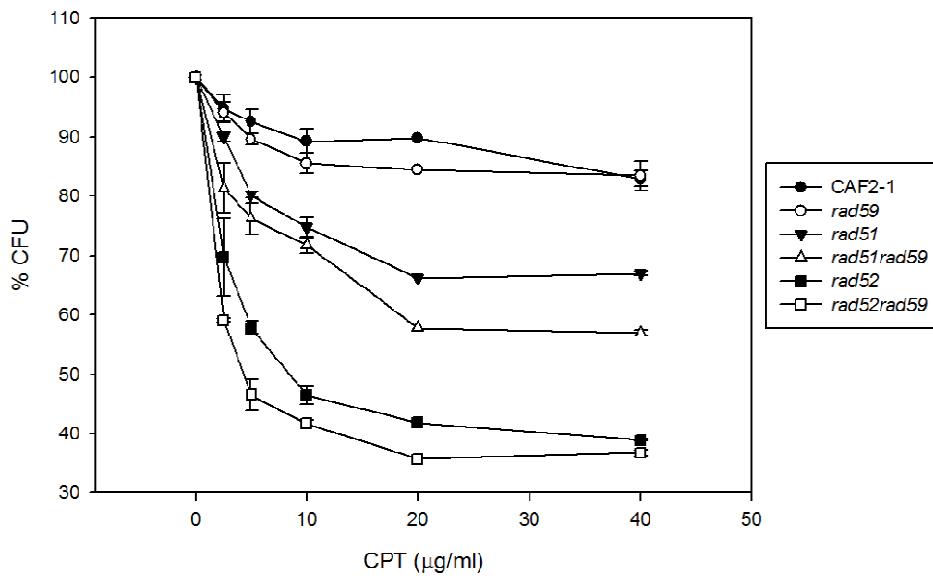




**Figura 42. Análisis FACS y microscópico de la cepa de tipo silvestre y mutantes HR durante tratamiento agudo con CPT en *C. albicans*.** Se refrescó un cultivo o/n hasta una DO de 0,3 y se incubó durante 2 horas a 30°C con agitación. A continuación, se adicionó CPT a una concentración final de 40  $\mu\text{g/ml}$  y se mantuvo a 30°C en agitación durante 24 horas. A los tiempos indicados, se tomaron muestras para FACS y microscopía DIC. Nótese la desaparición de células levaduriformes en los mutantes *rad51*- $\Delta\Delta$  y *rad52*- $\Delta\Delta$  tratados con CPT y la presencia casi exclusiva de células filamentosas.

#### IV.3.2.5. Respuesta de la cepa silvestre y mutantes HR de *C. albicans* a tratamientos agudos con CPT

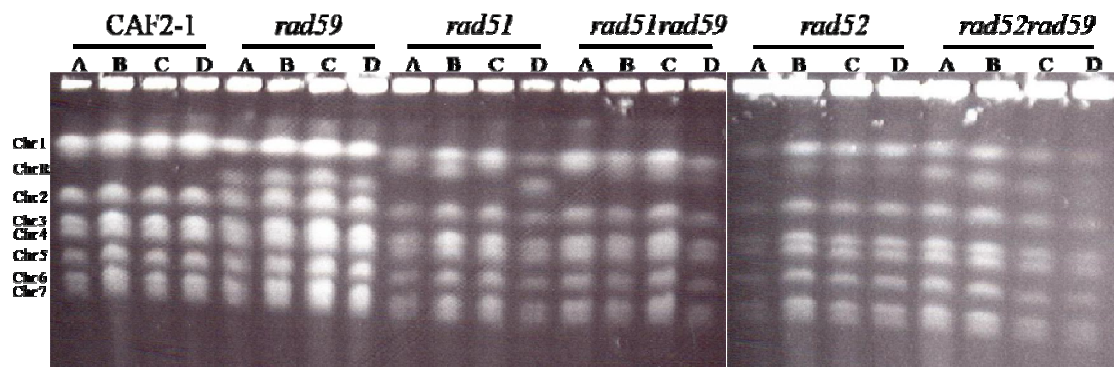
En tratamientos agudos, CPT no causó muerte masiva de células de tipo silvestre y mutantes HR de *C. albicans*, e incluso después de 2 horas en YEPD suplementado con 40  $\mu\text{g/ml}$  de CPT los mutantes más sensibles mostraron más del 30% de supervivencia (Figura 43). El análisis del efecto de la concentración de CPT indicó que para todos los mutantes la supervivencia disminuyó al aumentar la dosis de la droga hasta 2,5-5  $\mu\text{g/ml}$ ; a continuación, el número de supervivientes se estabilizó y mantuvo constante hasta concentraciones mucho más altas (40  $\mu\text{g/ml}$ ) (Figura 43).



**Figura 43. Sensibilidad frente a Camptotecina en tratamientos agudos.** Alrededor de  $5 \times 10^5$  células en crecimiento exponencial se resuspendieron en 1ml de YEPD y se incubaron con concentraciones crecientes de CPT durante 2 horas en oscuridad. Pasado el tiempo, las mezclas se diluyeron  $10^{-3}$  veces con YEPD y 50  $\mu$ l se sembraron en placas YEPD sin la droga. Las placas fueron incubadas a 30°C durante 48 horas en oscuridad hasta que las colonias (CFU) fueron contadas. Los datos son medias de tres experimentos independientes.

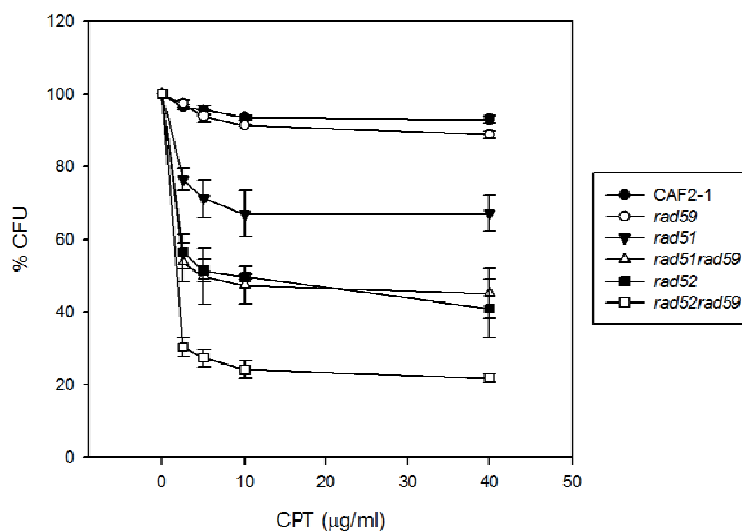
Independientemente de la cepa, las colonias de los supervivientes a 40  $\mu$ g/ml de CPT crecieron como sus respectivos parentales sugiriendo que las lesiones provocadas por CPT habían sido reparadas. Además, los cariotipos electroforéticos de cuatro supervivientes (de tratamiento agudo con 40  $\mu$ g/ml de CPT durante 2 horas) seleccionados al azar de cada cepa no mostraron reordenamientos cromosómicos (Figura 44). El alto índice de supervivencia observado en la cepa silvestre y el mutante *rad59- $\Delta\Delta$*  y la ausencia de roturas de cromosomas sugiere que las lesiones causadas por CPT se reparan fácilmente. La supervivencia disminuyó significativamente en el mutante *rad51- $\Delta\Delta$*  y fue menor aún en *rad52- $\Delta\Delta$* , siendo apenas modificada por la ausencia adicional de Rad59 en ambos mutantes. Estos resultados sugieren que la cepa silvestre de *C. albicans* usa HR, principalmente las vías dependientes de Rad52 para sobrevivir a las lesiones causadas por CPT, y esta reparación es independiente de la presencia de Rad59. Sin embargo, las vías de reparación independientes de Rad51 o Rad52 deben ser importantes para la supervivencia, ya que una fracción grande (> 40%) de la población de las cepas más sensibles (*rad52- $\Delta\Delta$*  y *rad52- $\Delta\Delta$  rad59- $\Delta\Delta$* ) sobrevivieron a tratamientos agudos de CPT (40  $\mu$ g/ml durante dos horas).





**Figura 44. Cariotipos electroforéticos (PFGE) de supervivientes obtenidos tras tratamiento agudo con CPT (40 µg/ml) en *C. albicans*.** En tratamiento agudo con CPT, de cada cepa se seleccionaron cuatro colonias independientes (A, B, C y D) que fueron crecidas en medio líquido YEPD para la determinación de los cariotipos.

En un intento por determinar si los supervivientes representan una población intrínsecamente resistente a CPT o han adquirido alguna resistencia durante el tratamiento agudo (40 µg/ml CPT durante dos horas), una colonia de cada cepa elegida al azar entre los supervivientes al tratamiento agudo fue sometida a un nuevo tratamiento con la droga. Para el tipo silvestre y los mutantes simples, las curvas de mortalidad de las cepas siguieron un patrón similar al de las cepas no tratadas; sin embargo, sorprendentemente las cepas que habían reparado las lesiones en ausencia de Rad51 y Rad59 o Rad52 y Rad59 eran mucho más sensibles que las mismas cepas antes de ser tratadas (Figura 45). De hecho el comportamiento de las cepas sensibilizadas sugiere la existencia de sinergismo entre *rad51* y *rad59* y entre *rad52* y *rad59* en respuesta a CPT. Una posibilidad es que la reparación de lesiones provocadas por CPT en ausencia de Rad51 y Rad59 y Rad52 y Rad59 introduzca cambios en el DNA que lo hace más sensible a la acción de CPT en ausencia de uno u otro par de proteínas. Sin embargo, otras explicaciones, tales como alteración de genes implicados en el transporte en células supervivientes de estos mutantes, podrían ser posibles, por lo que este comportamiento llamativo debe investigarse más.



**Figura 45. Tratamiento agudo con CPT a supervivientes obtenidos de otro experimento en CAF2-1 y mutante HR de *C. albicans*.** En un primer tratamiento agudo con CPT a diferentes concentraciones, de cada cepa se seleccionó un superviviente. Éstos fueron sometidos a un segundo tratamiento con la droga. Los datos son medias de tres experimentos independientes. Para más detalle ver pie de figura 43.

#### IV.3.3. Discusión del Capítulo III

Experimentos realizados en nuestro laboratorio (García-Prieto, 2011) habían concluido que, en presencia de CPT (experimentos crónicos), la ausencia de Rad59 no alteraba significativamente la supervivencia de cualquiera de los mutantes *Carad51-ΔΔ* o *Carad52-ΔΔ* sometidos a lesiones provocadas por CPT y lo mismo ocurría en los mutantes respectivos de la cepa diploide W303 de *S. cerevisiae*. Estos resultados sugerían que, para ambas levaduras, en presencia de CPT, la reparación de lesiones provocadas por CPT no utiliza la subruta dependiente de Rad59 que opera en algunos eventos de recombinación independiente de Rad51 en *S. cerevisiae*. Además, la cepa *Carad52-ΔΔ* siempre fue mucho más sensible a CPT que *Carad51-ΔΔ* o *Carad51-ΔΔ rad59-ΔΔ* sugiriendo la implicación de vías dependientes de Rad52 que no utilizan Rad51 o Rad59 en la reparación de lesiones en *C. albicans*.

García-Prieto (2011) también había encontrado diferencias significativas entre las sensibilidades a CPT de mutantes HR de *C. albicans* y *S. cerevisiae* en tratamientos crónicos con CPT. Como vimos en el Capítulo II, Rad51 y Rad52 juegan un papel más importante en la recuperación de lesiones causadas por MMS en *C. albicans* que en *S. cerevisiae*. Sin embargo, las diferencias en la sensibilidad entre los mutantes *rad51* y *rad52* de ambas levaduras a MMS resultan menores en comparación con la observada frente a CPT, que, además, exhibieron el patrón opuesto: los mutantes *rad51* y *rad52* de *S. cerevisiae* fueron significativamente más sensibles que sus homólogos de *C.*

*albicans*, aunque las cepas silvestres y los mutantes *rad59-ΔΔ* fueran igualmente resistentes a las concentraciones de CPT utilizadas. Estos resultados confirman las observaciones anteriores sobre la hipersensibilidad de los deletantes *Scrad52* a CPT (Eng *et al.*, 1988; Nitiss y Wang, 1988; Kaufmann, 1998) y extienden estos resultados a mutantes *rad51*.

Las diferencias en la sensibilidad entre los mutantes de HR de *S. cerevisiae* y *C. albicans* son sorprendentes, ya que esta droga parece provocar respuestas similares en ambas levaduras. Por ejemplo, en ambas levaduras el mutante *rad52* es significativamente más sensible que sus homólogos *rad51* y CPT parece desencadenar el *checkpoint* de G2/M en ausencia de HR. Varias situaciones no excluyentes entre sí pueden explicar la mayor resistencia de los mutantes de HR de *C. albicans* a CPT. La más simple es que la supervivencia se ve comprometida por la concentración efectiva intracelular de CPT por célula en *C. albicans*. En este escenario, *C. albicans* alcanzaría niveles intracelulares estables inferiores de CPT que *S. cerevisiae* debido a la baja tasa de influxo (por ejemplo, por saturación de los transportadores) o por poseer más bombas de eflujo activas. Se ha sugerido que, en levaduras, la accesibilidad de la diana a la droga es determinante para la susceptibilidad a la misma (Nitis *et al.*, 1996). En este contexto, es pertinente señalar que CPT se ha utilizado con éxito en combinación con anfotericina B, un polieno que actúa principalmente mediante la unión a los esteroides de la membrana y, al hacerlo, se forman poros en la membrana de la levadura. Varios derivados de CPT mostraron actividades sinérgicas con anfotericina B en la cepa A39 de *C. albicans*, lo que proporciona nuevas evidencias de que la entrada en la célula es uno de los principales obstáculos para que CPT pueda ejercer su acción (del Poeta *et al.*, 1999). Para explicar las diferencias en susceptibilidad a CPT entre *C. albicans* y *S. cerevisiae*, también hemos considerado la posibilidad de una eliminación más eficiente de los complejos Top1-DNA en *C. albicans*. Una búsqueda en WU-BLAST2 utilizando la bien conservada tirosil-DNA fosfodiesterasa (Tdp1) de *S. cerevisiae* como cebo, no reveló un ortólogo potencial Tdp1 en *C. albicans* que en cambio fue mostrado por la especie vecina *C. parapsilosis*. Por lo tanto, es posible que *C. albicans* utilice de manera eficiente los mecanismos alternativos para liberar fragmentos Top1-DNA, incluyendo el procesamiento por las endonucleasas Anp1, Mus81/Mms4, Mre11 o Rad1/Rad10 (Liu *et al.*, 2002; Pommier, 2004; Deng *et al.*, 2005). La alta resistencia de *C. albicans* a CPT podría ser también debida a un menor nivel de Top1, la existencia de rutas de inactivación de CPT, o mecanismos más eficientes de recombinación independientes de

Rad51 o Rad52. Dado que, CPT se usa como un agente quimioterapéutico para algunos tipos de cáncer, incluyendo carcinomas de ovarios y de colon (Pommier, 2006) su efecto sobre el comensal humano y el patógeno oportunista *C. albicans* merece de investigaciones adicionales.

La muerte de células de *C. albicans* por CPT requiere no sólo defectos en HR, sino también la exposición continua y prolongada a la droga, ya que el 100% de las células de *Carad52-ΔΔ* murieron en experimentos crónicos a concentraciones de 2,5 μg/ml, mientras que a concentraciones de CPT 15 veces superior no mataron a más del 66% de la población en tratamientos agudos (dos horas). Incluso en el ensayo *drop test* (García-Prieto, 2011) así como en experimentos crónicos cuantitativos (presente trabajo) algunas células de *rad52*, cuyo crecimiento había sido inicialmente inhibido, reanudaron el crecimiento en tiempos posteriores dando lugar a césped o microcolonias cuyas células eran viables. Esto sugiere que la concentración intracelular eficaz para causar la muerte no se alcanza, bien por el alto número de células o porque CPT es parcialmente degradada. Alternativamente, tras la detención en G2/M, algunas células podrían adaptarse y dividirse incluso originando células hijas genéticamente alteradas. El hecho de que concentraciones subletales de CPT retardaran el crecimiento, pero no mataran a las células en ausencia de Rad51 o Rad52 sugiere que rutas de reparación independientes de Rad51 y Rad52 pueden reparar lesiones con la condición de que no sean muy abundantes y/o no se produzcan DSBs. En este escenario, es probable que altas concentraciones de CPT impidan que se complete la replicación y conduzcan a un estancamiento persistente de la horquilla, lo que, a su vez, genera DSBs por colapso de la horquilla (*run-off*) y/o procesamiento por endonucleasas (Figura 34). Por el contrario, un estrés replicativo leve causado por bajas dosis de CPT podría aumentar los eventos de iniciación en orígenes cercanos con sentido opuesto, lo que a su vez, permitiría la fusión de las dos horquillas y la terminación de la replicación en ausencia de DSB. Puesto que CPT no induce la fosforilación de Rad53 en células silvestres de *S. cerevisiae* (Alcasabas *et al.*, 2001; Tercero y Diffley, 2001), estamos investigando si la cepa silvestre y mutantes HR de *C. albicans* exhiben fosforilación de Rad53 en respuesta a CPT. La fosforilación de Rad53 en mutantes defectivos en HR pero no en el silvestre explicaría el diferente comportamiento de ambos tipos de células en crecimiento y filamentación en presencia de CPT.

## **V. Conclusiones**



1. La inactivación del marcador *URA3* en la construcción *hisG-URA3-hisG*, en la cepa silvestre, ocurrió con una tasa de  $1,572 \times 10^{-5}$  por división celular. Tuvo lugar mayoritariamente por deleción (pérdida del marcador *URA3* y una copia de la repetición *hisG*). La recombinación con el homólogo fue minoritaria y no se observaron eventos CL y CT.
2. La tasa de inactivación del marcador *URA3* en cada mutante de recombinación simple (*rad51*, *rad52* y *rad59*) fue similar a la de la cepa parental. Sólo se incrementó significativamente dicha tasa en los dobles mutantes *rad59-ΔΔ rad52-ΔΔ* y *lig4-ΔΔ rad52-ΔΔ*, lo que sugiere que Rad59p y Lig4p son deletéreos para la generación de supervivientes en ausencia de *RAD52*.
3. La ausencia de Rad59p no alteró el porcentaje de los procesos de pérdida del marcador (deleción versus recombinación entre homólogos -IH-), mientras que la ausencia de Rad51p anuló los eventos IH que fueron canalizados a CL y CT, aunque no alteró significativamente la frecuencia de deleciones intracromosómicas. Estos resultados sugieren que la deleción en el silvestre ocurrió por SSA y no por *crossover* intracromátida o por recombinación desigual entre cromátidas hermanas. CT fue el evento principal que originó segregantes  $Uri^-$  en ausencia de Rad52p, y se observó CL cuando el test cromosoma fue el cromosoma dispensable Chr6b; mientras que cuando el test cromosoma fue Chr6a, no se observó CL y CT aumentó significativamente.
4. Nuestros ensayos no seleccionaron segregantes  $5FOA^R$  que llevan un C6F centromérico con un *URA3* funcional. Dado que el Chr6 tiene un tamaño de 1,032 Mb y que la distancia entre *RAD52* y el telómero izquierdo es de  $\approx 95$  Kb, el tamaño máximo esperado para un C6F fue por lo general inferior al Chr7 (935 Kb).
5. Hemos analizado la sensibilidad de *C. albicans* y sus mutantes HR a concentraciones de MMS que no producen fragmentación cromosómica en las células de *C. albicans in vivo* a juzgar por el análisis de los cariotipos PFGE, siempre y cuando las incubaciones de los *plugs* se realizaran a 30°C.
6. El mutante *Carad52-ΔΔ* fue mucho más sensible a MMS que los mutantes *Carad51-ΔΔ* o *Carad51-ΔΔ rad59-ΔΔ*, sugiriendo que las vías dependientes de Rad52 que usan otros factores distintos de Rad51 o Rad59 son operativas en *C. albicans*. Sin embargo, para luz UV, las sensibilidades de mutantes *Carad51-ΔΔ* y *Carad52-ΔΔ* eran indistinguibles lo que sugiere que la mayoría de la reparación dependiente de HR de lesiones UV en *C. albicans* utiliza mecanismos de invasión de banda.

7. Tanto en tratamientos agudos como crónicos de MMS, las vías de HR dependientes de Rad52 y, en mayor medida, de Rad51 parecen jugar un papel ligeramente más importante en la recuperación de lesiones por MMS en *C. albicans* en comparación con *S. cerevisiae*, independientemente de la presencia o ausencia de Rad59.
8. En células en crecimiento activo de *C. albicans*, la reparación de HDB causados por MMS fue relativamente rápida (1-2 h) y fuertemente dependiente de HR. No sólo Rad59 aceleró la restitución de la escalera cromosómica, sino que tanto Rad51 como, en mayor medida, Rad52 eran necesarios tanto para la supervivencia de un tratamiento agudo de MMS (0,05% MMS, 30 min en PBS), como para la reparación de HDBs durante la recuperación en ausencia de MMS. La reparación de lesiones provocadas por MMS en células en crecimiento requiere de la existencia de un metabolismo activo, ya que las células silvestres mantenidas en PBS no restauraron los HDBs, mientras que las incubadas en YEPD sí lo hicieron.
9. La supervivencia a MMS de células paradas en G2/M de *C. albicans* fue similar a la mostrada por células proliferativas de la misma cepa, si bien la reparación de HDBs tras la eliminación de MMS se produjo más lentamente y fue independiente de la presencia o ausencia de Rad59. En esta reparación, Rad51 fue prescindible, sino inhibitorio, mientras que Rad52 resultó esencial, lo que sugiere que la reparación involucra la actividad de apareamiento de Rad52 en lugar de invasión de banda dependiente de Rad51.
10. Los mutantes *rad51* y *rad52* de *S. cerevisiae* fueron significativamente más sensibles que sus homólogos de *C. albicans* a las concentraciones de CPT utilizadas, aunque las cepas silvestres y los mutantes *rad59-ΔΔ* fueran igualmente resistentes.
11. La muerte por CPT en *C. albicans* requiere no sólo defectos en HR, sino también la exposición continua y prolongada a la droga, ya que en experimentos crónicos (y en ausencia de Rad52p), el 100% de las células murieron a concentraciones de 2,5 µg/ml, mientras que en tratamientos agudos (a concentraciones de CPT 15 veces superior) no mataron a más del 66% de la población. Esto sugiere que la concentración intracelular eficaz para causar la muerte no se alcanza, bien por el alto número de células o porque CPT es degradada parcialmente. El hecho de que concentraciones subletales no mataran a las células en ausencia de Rad51 o Rad52 sugiere que rutas de reparación independientes de Rad51 y Rad52 pueden reparar lesiones con la condición de que no sean muy abundantes y/o no se produzcan DSBs. En este escenario, sugerimos que altas concentraciones de CPT impiden que



se complete la replicación manteniendo un estancamiento persistente de la horquilla, mientras que bajas dosis de CPT podrían aumentar los eventos de iniciación en orígenes cercanos con sentido opuesto, permitiendo la fusión de las dos horquillas y la terminación de la replicación.



## **VI. Bibliografia**



- Agabian, N., *et al.*, 1994. Pathogenesis invasive candidiasis. *J Med Vet Mycol.* **32 Suppl 1**, 229-37.
- Aguilera, A., García-Muse, T., 2013. Causes of genome instability. *Annu Rev Genet.* **47**, 1-32.
- Alby, K., Bennett, R. J., 2009. Stress-induced phenotypic switching in *Candida albicans*. *Mol Biol Cell.* **20**, 3178-91.
- Alcasabas, A. A., *et al.*, 2001. Mrc1 transduces signals of DNA replication stress to activate Rad53. *Nat Cell Biol.* **3**, 958-65.
- Andaluz, E., *et al.*, 1996. A *Candida albicans* gene encoding a DNA ligase. *Yeast.* **12** (9), 789-98.
- Andaluz, E., *et al.*, 2001. Phenotypic analysis and virulence of *Candida albicans* *LIG4* mutants. *Infect Immun.* **69**, 137-47.
- Andaluz, E., *et al.*, 2006. Rad52 depletion in *Candida albicans* triggers both the DNA-damage checkpoint and filamentation accompanied by but independent of expression of hypha-specific genes. *Mol Microbiol.* **59**, 1452-72.
- Andaluz, E., *et al.*, 2011. Rad52 function prevents chromosome loss and truncation in *Candida albicans*. *Mol Microbiol.* **79**, 1462-82.
- Bai, Y., Symington, L. S., 1996. A Rad52 homolog is required for *RAD51*-independent mitotic recombination in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genes Dev.* **10**, 2025-37.
- Baum, M., *et al.*, 2006. Formation of functional centromeric chromatin is specified epigenetically in *Candida albicans*. *Proc Natl Acad Sci USA.* **103**, 14877-82.
- Bellido, A., *et al.*, 2015. Genetic interactions among homologous recombination mutants in *Candida albicans*. *Fungal Genetic Biol.* **74**, 10-20.
- Bernet, R. J., Johnson, A. D., 2003. Completion of a parasexual cycle in *Candida albicans* by induced chromosome loss in tetraploid strains. *EMBO J.* **22**, 2505-15.
- Berti, M., *et al.*, 2013. Human RECQ1 promotes restart of replication forks reversed by DNA topoisomerase I inhibition. *Nat Struct Mol Biol.* **20**, 347-54.
- Birnboim, H. C., Doly, J., 1979. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res.* **7**, 1513-23.
- Bodey, G. P., 1993. What's new in fungal infection in leukemic patients. *Leukemia & lymphoma.* **11 suppl 2**, 127-35.

- Boeke, J. D., *et al.*, 1984. A positive selection for mutants lacking orotidine-5'-phosphate decarboxylase activity in yeast: 5-fluoro-orotic acid resistance. *Mol Gen Genet.* **197**, 345-6.
- Boiteux, S., Jinks-Robertson, S., 2013. DNA repair mechanisms and the bypass of DNA damage in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics.* **193**, 1025-64.
- Bosco, G., Haber, J. E., 1998. Chromosome break-induced DNA replication leads to nonreciprocal translocations and telomere capture. *Genetics.* **150**, 1037-47.
- Bouchonville, K., *et al.*, 2009. Aneuploid chromosomes are highly unstable during DNA transformation of *Candida albicans*. *Eukaryot Cell.* **8**, 1554-66.
- Braun, B. R., *et al.*, 2005. A human-curated annotation of the *Candida albicans* genome. *PLOS Genetics.* **1**, 36-57.
- Budzowska, M., Kanaar, R., 2009. Mechanisms of dealing with DNA damage-induced replication problems. *Cell Biochem Biophys.* **53**, 17-31.
- Caldecott, K. W., 2008. Single-strand break repair and genetic disease. *Nat Rev Genet.* **9**, 619-31.
- Calderone, R.A. (ed.). 2002. *Candida* and candidiasis. *American Society for Microbiology*, Washington DC.
- Carrillo-Muñoz, A., *et al.*, 2001. Una nueva generación de fármacos antifúngicos. *Revista iberoamericana de microbiología.* **18**, 2-5.
- Carter, S. D., *et al.*, 2007. The role of nonhomologous end-joining components in telomere metabolism in *Kluyveromyces lactis*. *Genetics.* **175**, 1035-45.
- Cauwood, J. D., *et al.*, 2013. Recombinogenic conditions influence partner choice in spontaneous mitotic recombination. *PLoS Genetic.* **9**, e1003931.
- Chakrabarti, S., and Seidman, M. N., 1986. Intramolecular recombination between transfected repeated sequences in mammalian cells is nonconservative. *Mol Cell Biol.* **6**, 2520-6.
- Chaleff, D. T., Fink, G. R., 1980. Genetic events associated with an insertion mutation in yeast. *Cell.* **21**, 227-37.
- Chan, J. E., Kolodner, R. D., 2011. A genetic and structural study of genome rearrangements mediated by high copy repeat Ty1 elements. *PLoS Genetic.* **7**, e1002089.
- Chaudhuri, A., *et al.*, 2012. Topoisomerase I poisoning results in PARP-mediated replication fork reversal. *Nat Struct Mol Biol.* **19**, 417-23.

- Chauhan, N., *et al.*, 2005. Virulence and karyotype analyses of *rad52* mutants of *Candida albicans*: regeneration of a truncated chromosome of a reintegrant strain (*rad52/RAD52*) in the host. *Infect Immun.* **73**, 8069-78.
- Chen, Q., *et al.*, 2001. Two survivor pathways that allow growth in the absence of telomerase are generated by distinct telomere recombination events. *Mol Cell Biol.* **21**, 1819-27.
- Cheung-Ong, K., *et al.*, 2013. DNA-damaging agents in cancer chemotherapy: serendipity and chemical biology. *Chem Biol.* **20**, 648-59.
- Chu, W. S., *et al.*, 1993. Construction of an SfiI macrorestriction map of the *Candida albicans* genome. *J Bacteriol.* **175**, 6637-51.
- Chung, C. T., *et al.*, 1989. One-step preparation of competent *Escherichia coli*: transformation and storage of bacterial cells in the same solution. *Proc Natl Acad Sci USA.* **86**, 2172-75.
- Ciudad, T., *et al.*, 2004. Homologous recombination in *Candida albicans*: role of CaRad52p in DNA repair, integration of linear DNA fragments and telomere length. *Mol Microbiol.* **53**, 1177-94.
- Coic, E., *et al.*, 2008. Mechanisms of Rad52-independent spontaneous and UV-induced mitotic recombination in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics.* **179**, 199-211.
- Cortés-Ledesma, F., *et al.*, 2009. A human 5'-tyrosyl DNA phosphodiesterase that repairs topoisomerase-mediated DNA damage. *Nature.* **461**, 674-8.
- Coste, A. T., *et al.*, 2004. TAC1, transcriptional activator of CDR genes, is a new transcription factor involved in the regulation of *Candida albicans* ABC transporters CDR1 and CDR2. *Eukaryot Cell.* **3**, 1639-52.
- Covo, S., *et al.*, 2010. Cohesin Is limiting for the suppression of DNA damage-induced recombination between homologous chromosomes. *PLoS Genet.* **6**, e1001006.
- Covo, S., *et al.*, 2012. Understanding the origins of UV-induced recombination through manipulation of sister chromatid cohesion. *Cell Cycle.* **11**, 3937-44.
- Cowen, L. E., *et al.*, 2000. Evolution of drug resistance in experimental populations in *C. albicans*. *J Bacteriol.* **182**, 1515-22.
- Daley, J. M., *et al.*, 2005. Nonhomologous end joining in yeast. *Annu Rev Genet.* **39**, 431-51.
- Davies, A. A., *et al.*, 1995. Role of the Rad1 and Rad10 proteins in nucleotide excision repair and recombination. *J Biol Chem.* **270**, 24638-41.

- Davis, A. P., Symington, L. S., 2001. The yeast recombinational repair protein Rad59 interacts with Rad52 and stimulates single-strand annealing. *Genetics*. **159**, 515-25.
- Davis, A. P., Symington, L. S., 2004. RAD51-dependent break induced replication in *Yeast Mol Cell Biol*. **24**, 2344-51.
- Davis, A.P., Symington, L.S., 2003. The Rad52-Rad59 complex interacts with Rad51 and replication protein A. *DNA Repair*. **2**, 1127-34.
- De Backer, M. D., *et al.*, 2000. Recent developments in molecular genetics of *Candida albicans*. *Annual review of microbiology*. **54**, 463-98.
- De la Loza, M. C., Wellinger, R. E., 2009. A novel approach for organelle-specific DNA damage targeting reveals different susceptibility of mitochondrial DNA to the anticancer drugs camptothecin and topotecan. *Nucleic Acids Res*. **37**, e26.
- Del Poeta, M., *et al.*, 1999. Comparison of in vitro activities of camptothecin and nitidine derivatives against fungal and cancer cells. *Antimicrob Agents Chemother*. **43**, 2862-8.
- Deng, C., *et al.*, 2005. Multiple endonucleases function to repair covalent topoisomerase I complexes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*. **170**, 591-600.
- Dexheimer, T. S., Pommier, Y., 2008. DNA cleavage assay for the identification of topoisomerase I inhibitors. *Nat Protoc*. **3**, 1736-50.
- Diener, A.C. and Fink, G.R., 1996. *DLHI* is a functional *Candida albicans* homologue of the meiosis-specific gene *DMC1*. *Genetics*. **143**, 769-776.
- Dixon, D. M., *et al.*, 1996. Fungal infections: a growing threat. *Public Health Rep*. **111**, 226-35.
- Drablos, F., *et al.*, 2004. Alkylation damage in DNA and RNA-repair mechanisms and medical significance. *DNA Repair*. **3**, 1389-407.
- Dunham, M. J., *et al.*, 2002. Characteristic genome rearrangements in experimental evolution of *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc Natl Acad Sci USA*. **99**, 16144-9.
- Eng, W. K., *et al.*, 1988. Evidence that DNA topoisomerase I is necessary for the cytotoxic effects of camptothecin. *Mol Pharmacol*. **34**, 755-60.
- Enomoto, S., *et al.*, 2014. TEL+CEN antagonism on plasmids involves telomere repeat tracts and gene products that interact with chromosomal telomeres. *Chromosoma*. **103**, 237-250.



- Ferguson, D. O., Holloman, W. K., 1996. Recombinational repair of gaps in DNA is asymmetric in *Ustilago maydis* and can be explained by a migrating D-loop model. *Proc Natl Acad Sci USA*. **93**, 5419-24.
- Fishman-Lobell, J., *et al.*, 1992. Two alternative pathways of double-strand break repair that are kinetically separable and independently modulated. *Mol Cell Biol*. **12**, 1292-303.
- Fonzi, W. A., Irwin, M. Y., 1993. Isogenic strain construction and gene mapping in *Candida albicans*. *Genetics*. **134**, 717-28.
- Forche, A., *et al.*, 2008. The parasexual cycle in *Candida albicans* provides an alternative pathway to meiosis for the formation of recombinant strains. *PLOS Biol*. **6**, 1-14.
- Forche, A., *et al.*, 2009. Efficient and rapid identification of *Candida albicans* allelic status using SNP-RFLP. *FEMS Yeast Res*. **9**, 1061-9.
- Forche, A., *et al.*, 2011. Stress alters rates and types of loss of heterozygosity in *Candida albicans*. *MBio*. Pii e00129-11.
- Ford, C. B., *et al.*, 2015. The evolution of drug resistance in clinical isolates of *Candida albicans*. *eLife*. **4**, e00662.
- Frank-Vaillant, M., Marcand, S., 2001. NHEJ regulation by mating type is exercised through a novel protein, Lif2p, essential to the ligase IV pathway. *Genes Dev*. **15**, 3005-12.
- Gaillard, H., *et al.*, 2015. Replication stress and cancer. *Nat Rev Cancer*. **15**, 276-89.
- Galli, A., Schiestl, R. H., 1999. Cell division transforms mutagenic lesions into deletion-recombinagenic lesions in yeast cells. *Mutat Res*. **429**, 13-26.
- Gao, G., *et al.*, 2008. A powerful method combining homologous recombination and site-specific recombination for targeted mutagenesis in *Drosophila*. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **105**, 13999-4004.
- García-Prieto, F., 2011. Efecto de la delección de las recombinasas *RAD51* y *DLH1* y de *RAD59* en recombinación homóloga en *Candida albicans*. Tesis Doctoral.
- García-Prieto, F., *et al.*, 2010. Role of the homologous recombination genes *RAD51* and *RAD59* in the resistance of *Candida albicans* to UV light, radiomimetic and anti-tumor compounds and oxidizing agents. *Fungal Genet Biol*. **47**, 433-45.
- Giannattasio, M., *et al.*, 2010. Exo1 competes with repair synthesis, converts NER intermediates to long ssDNA gaps, and promotes checkpoint activation. *Mol Cell*. **40**, 50-62.

- Gillum, A. M., *et al.*, 1984. Isolation of the *Candida albicans* gene for orotidine-5'-phosphate decarboxylase by complementation of *S. cerevisiae* *ura3* and *E. coli* *pyrF* mutations. *Mol Gen Genet.* **198**, 179-82.
- González-Prieto, R., *et al.*, 2013. Rad51 replication fork recruitment is required for DNA damage tolerance. *EMBO J.* **32**, 1307-21.
- Graser, Y., *et al.*, 1996. Molecular markers reveal that population structure of the human pathogen *Candida albicans* exhibits both clonality and recombination. *Proc Natl Acad Sci USA.* **93**, 12473-7.
- Habraken, Y., *et al.*, 1993. Yeast excision repair gene *RAD2* encodes a single-stranded DNA endonuclease. *Nature.* **366**, 365-8.
- Hanawalt, P. C., 2002. Subpathways of nucleotide excision repair and their regulation. *Oncogene.* **21**, 8949-56.
- Heyer, W. D., *et al.*, 2010. Regulation of homologous recombination in eukaryotes. *Annu Rev Genet.* **44**, 113-39.
- Hickman, M. A., *et al.*, 2013. The “obligate diploid” *Candida albicans* forms mating-competent haploids. *Nature.* **494**, 55-9.
- Hoffman, C. S., Winston, F., 1987. A ten-minute DNA preparation from yeast efficiently releases autonomous plasmids for transformation of *Escherichia coli*. *Gene.* **57**, 267-72.
- Hsiang, Y. H., *et al.*, 1985. Camptothecin induces protein-linked DNA breaks via mammalian DNA topoisomerase I. *J Biol Chem.* **260**, 14973-8.
- Hsiang, Y. H., *et al.*, 1989. Arrest of replication forks by drug-stabilized topoisomerase I-DNA cleavable complexes as a mechanism of cell killing by camptothecin. *Cancer Res.* **49**, 5077-82.
- Hube, B., Naglik, J., 2001. *Candida albicans* proteinases: resolving de mystery of a gene family. *Microbiology.* **147**, 1997-2005.
- Hull, C. M., *et al.*, 2000. Evidence for mating of the asexual yeast *Candida albicans*. *Science.* **289**, 307-10.
- Hull, C. M., Johnson, A. D., 1999. Identification of a mating type-like locus in the asexual pathogenic yeast *Candida albicans*. *Science.* **285**, 1271-5.
- Ivanov, E. L., Haber, J. E., 1995. *RAD1* and *RAD10*, but not other excision repair genes, are required for double-strand break-induced recombination in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol.* **15**, 2245-51.
- Ivanov, E.L., *et al.*, 1996. Genetics requirements for the single-strand break annealing

- pathway of double strand break repair in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*. **142**, 693-704.
- Iwaguchi, S., *et al.*, 1992. Clonal variation of chromosome size derived from the rDNA cluster region in *Candida albicans*. *J Gen Microbiol*. **138**, 1177-84.
- Jiang, W., *et al.*, 1997. The topoisomerase I gene from *Candida albicans*. *Microbiology*. **143**, 377-86.
- Jinks-Robertson, S., *et al.*, 1993. Substrate length requirements for efficient mitotic recombination in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol*. **13**, 3937-50.
- Jones, T., *et al.*, 2004. The diploid genome sequence of *Candida albicans*. *Proc Natl Acad Sci USA*. **101**, 7329-34.
- Kadyk, L. C., Hartwell, L. H., 1992. Sister chromatids are preferred over homologs as substrates for recombinational repair in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*. **132**, 387-402.
- Kadyk, L. C., Hartwell, L. H., 1993. Replication-dependent sister chromatid recombination in *rad1* mutants of *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*. **133**, 469-87.
- Kaufmann, S. H., 1998. Cell death induced by topoisomerase-targeted drugs: more questions than answers. *Biochim Biophys Acta*. **1400**, 195-211.
- Kegel, A., *et al.*, 2001. Nej1p, a cell type-specific regulator of non-homologous end-joining in yeast. *Curr Biol*. **11**, 1611-7.
- Koster, D. A., *et al.*, 2007. Single-molecule observations of topotecan-mediated TopIB activity at a unique DNA sequence. *Nucleic Acids Res*. **36**, 2301-10.
- Kouzminova, E. A., Kuzminov, A., 2006. Fragmentation of replicating chromosomes triggered by uracil in DNA. *J Mol Biol*. **355**, 20-33.
- Kraus, E., *et al.*, 2001. Break-induced replication: a review and an example in budding yeast. *Proc Natl Acad Sci USA*. **98**, 8255-62.
- Kunkel, T. A., Erie, D. A., 2005. DNA mismatch repair. *Annu Rev Biochem*. **74**, 681-710.
- Kurtz, M. B., *et al.*, 1988. The molecular genetics of *Candida albicans*. *Microbiological sciences*. **5**, 58-63.
- Kushner, S. 1988. An improved method for transformation of *Escherichia coli* with *colE1* derived plasmid; in Genetic engineering (Boyer, H., Nicosia, S., Eds.), pp. 17-24, Elsevier, Amsterdam.

- Kuzminov, A., 2001. DNA replication meets genetic exchange: chromosomal damage and its repair by homologous recombination. *Proc Natl Acad Sci USA*. **98**, 8461-8.
- Larriba, G., Calderone, R. A., 2012. Genome Instability and DNA Repair. In: R. A. Calderone, C. J. Clancy (Eds.), *Candida and candidiasis*. ASM Press, Washington, DC.
- Lasker, B. A., *et al.*, 1992. Isolation, characterization, and sequencing of *Candida albicans* repetitive sequence element 2. *Gene*. **116**, 51-7.
- Lea, D. E., Coulson, C. A., 1949. The distribution of the numbers of mutants in bacterial populations. *J. Genet.* **49**, 264-85.
- Legrand, M., *et al.*, 2004. Homozygosity at the *MTL locus* in clinical strains of *Candida albicans* is correlated with karyotypic rearrangements. *Mol Microbiol.* **52**, 1451-62.
- Legrand, M., *et al.*, 2007. Role of DNA mismatch repair and double-strand break repair in genome stability and antifungal drug resistance in *Candida albicans*. *Eukaryot Cell*. **6**, 2194-205.
- Legrand, M., *et al.*, 2008. Analysis of base excision and nucleotide excision repair in *Candida albicans*. *Microbiology*. **154**, 2446-56.
- Legrand, M., *et al.*, 2011. The contribution of the S-phase checkpoint genes *MEC1* and *SGS1* to genome stability maintenance in *Candida albicans*. *Fungal Genet Biol.* **48**, 823-30.
- Lephart, P. R., *et al.*, 2005. Effect of the major repeat sequence on chromosome loss in *Candida albicans*. *Eukaryot Cell*. **4**, 733-41.
- Lettier, G., *et al.*, 2006. The role of DNA double-strand breaks in spontaneous homologous recombination in *S. cerevisiae*. *PLoS Genet.* **2**, e194.
- Lin, F. L., *et al.*, 1984. Model for homologous recombination during transfer of DNA into mouse L cells: role for DNA ends in the recombination process. *Mol Cell Biol.* **4**, 1020-34.
- Lindahl, T., Andersson, A., 1972. Rate of chain breakage at apurinic sites in double-stranded deoxyribonucleic acid. *Biochemistry*. **11**, 3618-23.
- Liu, E., *et al.*, 2002. Repair of topoisomerase I covalent complexes in the absence of the tyrosyl-DNA phosphodiesterase Tdp1. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **99**, 14970-5.
- Llorente, B., *et al.*, 2008. Break-induced replication: What is it and what is it for?. *Cell Cycle*. **7**, 859-64.

- Lodder, J., 1970. The yeast. A taxonomic study 2<sup>nd</sup>. Amsterdam & London, North Holland Publishers. pp, 34-113.
- Luijsterburg, M. S., *et al.*, 2010. Stochastic and reversible assembly of a multiprotein DNA repair complex ensures accurate target site recognition and efficient repair. *J Cell Biol.* **189**, 445-63.
- Lundin, E., *et al.*, 2005. Methyl methanesulfonate (MMS) produces heat-labile DNA damage but no detectable *in vivo* DNA double-strand breaks. *Nucleic Acids Res.* **33**, 3799-811.
- Ma, W., *et al.*, 2008. Apn1 and Apn2 endonucleases prevent accumulation of repair-associated DNA breaks in budding yeast as revealed by direct chromosomal analysis. *Nucleic Acids Res.* **36**, 1836-46.
- Ma, W., *et al.*, 2011. Alkylation base damage is converted into repairable double-strand breaks and complex intermediates in G2 cells lacking AP endonuclease. *PLoS Genet.* **7**, e1002059.
- Ma, W., *et al.*, 2013. Homologous recombination rescues ssDNA gaps generated by nucleotide excision repair and reduced translesion DNA synthesis in yeast G2 cells. *Proc Natl Acad Sci USA.* **110**, e2895-904.
- Magee, B. B., Magee, P. T., 2000. Induction of mating in *Candida albicans* by construction of MTL $\alpha$  and MTL strains. *Science.* **289**, 310-3.
- Magee, P. T., 2007. Genome structure and dynamics in *Candida albicans*. In *Candida: Comparative and Functional Genomics*, B. Hube and C. d'Enfert eds. (Caister Academic Press), pp. 7-26.
- Maines, S., *et al.*, 1998. Novel mutations in the *RAD3* and *SSL1* genes perturb genome stability by stimulating recombination between short repeats in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics.* **150**, 963-76.
- Malkova, A., *et al.*, 1996. Double-strand break repair in the absence of *RAD51* in yeast: a possible role for break-induced replication. *Proc Natl Acad Sci USA.* **93**, 7131-7136.
- Malkova, A., *et al.*, 1996. Meiotic recombination initiated by a double-strand break in *rad50D* yeast cells otherwise unable to initiate meiotic recombination. *Genetics.* **143**, 741-54.
- Malkova, A., *et al.*, 2005. RAD51-dependent break-induced replication differs in kinetics and checkpoint responses from RAD51-mediated gene conversion. *Mol Cell Biol.* **25**, 933-44.

- Manthey, G. M., Bailis, A. M., 2010. Rad51 inhibits translocation formation by non-conservative homologous recombination in *Saccharomyces cerevisiae*. *PLoS One*. **5**, e11889.
- McDonald, J. P., Rothstein, R., 1994. Unrepaired heteroduplex DNA in *Saccharomyces cerevisiae* is decreased in *RAD1 RAD52*-independent recombination. *Genetics*. **137**, 393-405.
- Miller, G. R., Saracheck, A., 1974. Absence of photoreactivating enzyme in *Candida albicans*, *Candida stellatoidea*, and *Candida tropicalis*. *Infect Immun*. **10**, 398-9.
- Miller, M. G., Johnson, A. D., 2002. White-opaque switching in *Candida albicans* is controlled by mating-type (*MTL*) locus homeodomain proteins and allows efficient mating. *Cell*. **110**, 293-302.
- Mott, C., Symington, L. S., 2011. *RAD51*-independent inverted-repeat recombination by a strand-annealing mechanism. *DNA Repair (Amst)*. **10**, 408-15.
- Myskowski, P. L., et al., 1997. Fungal disease in the immunocompromised host. *Dermatologic clinics*. **15**, 295-305.
- Nassif, N., et al., 1994. Efficient copying of nonhomologous sequences from ectopic sites via P-element-induced gap repair. *Mol Cell Biol*. **14**, 1613-25.
- Nitiss, J. L., et al., 1996. Using yeast to understand drugs that target topoisomerases. *Ann N Y Acad Sci*. **13**, 32-43.
- Nitiss, J. L., Wang, J. C., 1988. DNA topoisomerase-targeting antitumor drugs can be studied in yeast. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **85**, 7501-5.
- Noble, S. M., Johnson, A. D., 2005. Strains and strategies for large-scale gene deletion studies of the diploid human fungal pathogen *Candida albicans*. *Eukaryot cell*. **4**, 298-309.
- Novarina, D., et al., 2011. Mind the gap: keeping UV lesions in check. *DNA Repair (Amst)*. **10**, 751-9.
- Odds, F. C., 1988. *Candida and candidiasis*. London: Balliere-Tindall.
- Odds, F. C., et al., 1989. Biotyping of *Candida albicans*: results of an international collaborative survey. *J Clin Microbiol*. **27**, 1506-9.
- Odds, F. C., et al., 2007. Molecular Phylogenetics of *Candida albicans*. *Eukaryot Cell*. **6**, 1041-52.
- Olaiya, A. F., Sogin, S. J., 1979. Ploidy determination of *Candida albicans*. *J. Bacteriol*. **140**, 1043-49.

- Orr-Weaver, T. L., *et al.*, 1981. Yeast transformation: a model system for the study of recombination. *Proc Natl Acad Sci USA*. **78**, 6354-8.
- Oum, J. H., *et al.*, 2011. RSC facilitates Rad59-dependent homologous recombination between sister chromatids by promoting cohesin loading at DNA double-strand breaks. *Mol Cell Biol*. **31**, 3924-37.
- Ozenberger, B. A., Roeder, G. S., 1991. A unique pathway of double-strand break repair operates in tandemly repeated genes. *Moll Cell Biol*. **11**, 1222-31.
- Pannunzio, N. R., *et al.*, 2008. *RAD59* is required for efficient repair of simultaneous double-strand breaks resulting in translocations in *Saccharomyces cerevisiae*. *DNA Repair (Amst)*. **7**, 788-800.
- Pannunzio, N. R., *et al.*, 2010. *RAD59* and *RAD1* cooperate in translocation formation by single-strand annealing in *Saccharomyces cerevisiae*. *Curr Genet*. **56**, 87-100.
- Paques, F., *et al.*, 1998. Expansions and contractions in a tandem repeat induced by double-strand break repair. *Moll Cell Biol*. **18**, 2045-54.
- Paques, F., Haber, J. E., 1999. Multiple pathways of recombination induced by double-strand breaks in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol Mol Biol Rev*. **63**, 349-404.
- Pardo, B., Aguilera, A., 2012. Complex chromosomal rearrangements mediated by break-induced replication involve structure-selective endonucleases. *PLoS Genet*. **8**, e1002979.
- Perepnikhatka, V., *et al.*, 1999. Specific alterations in fluconazol-resistant mutants of *Candida albicans*. *J Bacteriol*. **181**, 4041-9.
- Perlroth, J., *et al.*, 2007. Nosocomial fungal infections: epidemiology, diagnosis, and treatment. *Med Mycol*. **45**, 321-346.
- Petukhova, G., *et al.*, 1999. Single strand DNA binding and annealing activities in the yeast recombination factor Rad59. *J Biol Chem*. **274**, 33839-42.
- Pommier, Y., 2004. Camptothecins and topoisomerase I: a foot in the door. Targeting the genome beyond topoisomerase I with camptothecins and novel anticancer drugs: importance of DNA replication, repair and cell cycle checkpoints. *Curr Med Chem Anticancer Agents*. **4**, 429-34.
- Pommier, Y., 2006. Topoisomerase I inhibitors: camptothecins and beyond. *Nat Rev Cancer*. **6**, 789-802.

- Pouliot, J. J., *et al.*, 2001. Pathways for repair of topoisomerase I covalent complexes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genes Cells*. **6**, 677-87.
- Pujol, D., *et al.*, 1993. The yeast *Candida albicans* has a clonal mode of reproduction in a population of infected human immunodeficiency virus-positive patients. *Proc Natl Acad Sci USA*. **90**, 9456-9.
- Ralsler, M., *et al.*, 2012. The *Saccharomyces cerevisiae* W303-K6001 cross-platform genome sequence: insights into ancestry and physiology of a laboratory mutt. *Open Biol*. **2**, 120093.
- Ratray, A.J., Symington, L.S., 1995. Multiple pathways for homologous recombination in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*. **139**, 45-56.
- Rauceo, J. M., *et al.*, 2006. Threonine-rich repeats increase fibronectin binding in the *Candida albicans* adhesin Als5p. *Eukaryot Cell*. **5**, 1664-73.
- Redon, C., *et al.*, 2003. Yeast histone 2A serine 129 is essential for the efficient repair of checkpoint-blind DNA damage. *EMBO Rep*. **4**, 678-84.
- Reenan, R. A. G., Kolodner, R. D., 1992. Characterization of insertion mutations in the *Saccharomyces cerevisiae* Msh1 and Msh2 genes: evidence for separate mitochondrial and nuclear functions. *Genetics*. **132**, 975-85.
- Regairaz, M., *et al.*, 2011. Mus81-mediated DNA cleavage resolves replication forks stalled by topoisomerase I-DNA complexes. *J Cell Biol*. **195**, 739-49.
- Riggsby, W. S., 1990. Physical characterization of *Candida albicans* genome. In: The Genetics of *Candida*. D.R. Kirsch, R. Kelly, and M.B. Kurtz, eds. CRC Press, Boca Raton, FL. p. 125-146.
- Riggsby, W. S., *et al.*, 1982. DNA content, kinetic complexity, and the ploidy question in *Candida albicans*. *Mol Cell Biol*. **2**, 853-62.
- Roeder, G. S., Fink, G. R., 1982. Movement of yeast transposable elements by gene conversion. *Proc Natl Acad Sci USA*. **79**, 5621-5.
- Rose, M.D., *et al.*, 1989. Laboratory Course Manual for Methods in yeast genetics. *Cold Spring Harbor Laboratory Press*. Cold Spring Harbor, New York.
- Rudin, N., Haber, J. E., 1988. Efficient repair of HO-induced chromosomal breaks in *Saccharomyces cerevisiae* by recombination between flanking homologous sequences. *Mol Cell Biol*. **8**, 3918-28.
- Ruiz, J. F., *et al.*, 2009. Chromosomal translocations caused by either pol32-dependent or pol32-independent triparental break-induced replication. *Mol Cell Biol*. **29**, 5441-54.



- Rustad, T. R., *et al.*, 2002. Homozygosity at the *Candida albicans* *MTL* locus associated with azole resistance. *Microbiology*. **148**, 1061-72.
- Rustchenko, E., 2006. Chromosome instability in *Candida albicans*. *FEMS Yeast Res.* **7**, 2-11.
- Rustchenko-Bulgac, E. P, Howard, D. H., 1993. Multiple chromosomal and phenotypic changes in spontaneous mutants of *Candida albicans*. *J Gen Microbiol.* **139**, 1195-207.
- Sabol, L., Gumbo, T., 2008. Anidulafungin in the treatment of invasive fungal infections. *Therapeutics and clinical risk managements.* **4**, 71-8.
- Sedgwick, B., *et al.*, 2007. Repair of alkylated DNA: recent advances. *DNA Repair.* **6**, 429-42.
- Selmecki, A. M., *et al.*, 2009. Acquisition of aneuploidy provided increased fitness during the evolution of antifungal drug resistance. *PLoS Genetic.* **5**, e1000705.
- Selmecki, A., *et al.*, 2008. An isochromosome confers drug resistance in vivo by amplification of two genes, *ERG11* and *TAC1*. *Mol Microbiol.* **68**, 624-41.
- Sertic, S., *et al.*, 2012. NER and DDR: classical music with new instruments. *Cell Cycle.* **11**, 668-74.
- Shi, Q. M., *et al.*, 2007. Critical role of DNA checkpoints in mediating genotoxic-stress-induced filamentous growth in *Candida albicans*. *Mol Biol Cell.* **18**, 815-26.
- Shinohara, A., Ogawa, T., 1998. Stimulation by Rad52 of yeast Rad51-mediated recombination. *Nature.* **391**, 404-407.
- Signon, L., *et al.*, 2001. Genetic requirements for *RAD51*- and *RAD54*-independent break-induced replication repair of a chromosomal double-strand break. *Mol Cell Biol.* **21**, 2048-56.
- Smith, C. E., *et al.*, 2007. Template switching during break-induced replication. *Nature.* **447**, 102-5.
- Smith, C. E., *et al.*, 2009. Aberrant double-strand break repair resulting in half crossovers in mutants defective for Rad51 or the DNA polymerase delta complex. *Mol Cell Biol.* **29**, 1432-41.
- Smith, J., Rothstein, R., 1999. An allele of *RFA1* suppresses *RAD52*-dependent double-strand break repair in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics.* **151**, 447-58.
- Song, B., Sung, P., 2000. Functional interactions among yeast Rad51 recombinase, Rad52 mediator, and replication protein A in DNA strand exchange. *J Biol Chem.* **275**, 15895-904.

- Staab, J. F., *et al.*, 2004. Expression of transglutaminase substrate activity on *Candida albicans* germ tubes through a coiled, disulfide-bonded N-terminal domain of Hwp1 requires C-terminal glycosylphosphatidylinositol modification. *J Biol Chem.* **279**, 40737-47.
- Staresinic, L., *et al.*, 2009. Coordination of dual incision and repair synthesis in human nucleotide excision repair. *EMBO J.* **28**, 1111-20.
- Sudbery, P., *et al.*, 2004. The distinct morphogenic states of *Candida albicans*. *Trends Microbiol.* **12**, 317-24.
- Sugawara, N., *et al.*, 2000. DNA length dependence of the single-strand annealing pathway and the role of *Saccharomyces cerevisiae* RAD59 in double-strand break repair. *Mol Cell Biol.* **20**, 5300-9.
- Sugawara, N., Haber, J. E., 1992. Characterization of double-strand break-induced recombination: homology requirements and single-stranded DNA formation. *Moll Cell Biol.* **12**, 563-75.
- Sung, P., 1997. Yeast Rad55 and Rad57 proteins form a heterodimer that functions with replication protein A to promote DNA strand exchange by Rad51 recombinase. *Genes Dev.* **11**, 1111-21.
- Surosky, R. T., Tye, B. K., 1985. Resolution of dicentric chromosomes by Ty-mediated recombination in yeast. *Genetics.* **110**, 397-419.
- Symington, L. S., 2002. Role of RAD52 epistasis group genes in homologous recombination and double-strand break repair. *Microbiol Mol Biol Rev.* **66**, 630-70.
- Symington, L. S., *et al.*, 2014. Mechanisms and regulation of mitotic recombination in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics.* **198**, 795-835.
- Szostak, J. W., *et al.*, 1983. The double-strand-break repair model for recombination. *Cell.* **33**, 25-35.
- Tanida, T., *et al.*, 2001. Lactoferrin peptide increases the survival of *Candida albicans*-inoculated mice by upregulating neutrophil and macrophage functions, especially in combination with amphotericin B and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. *Infect Immun.* **69**, 3883-90.
- Tavanti, A., *et al.*, 2004. Genetic evidence for recombination in *Candida albicans* based on haplotype analysis. *Fungal Genet Biol.* **41**, 553-62.
- Tercero, J. A., Diffley, J. F., 2001. Regulation of DNA replication fork progression through damaged DNA by the Mec1/Rad53 checkpoint. *Nature.* **412**, 553-7.

- Thakur, J., Sanyal, K., 2012. A coordinated interdependent protein circuitry stabilizes the kinetochore ensemble to protect CENP-A in the human pathogenic yeast *Candida albicans*. *PLoS Genet.* **8**, e1002661.
- Thrash-Bingham, C., Gorman, J. A., 1993. Identification, characterization and sequence of *Candida albicans* repetitive DNAs Rel-1 and Rel-2. *Curr Genet.* **22**, 93-100.
- Travesa, A., *et al.*, 2012. DNA replication stress differentially regulates G1/S genes via Rad53-dependent inactivation of Nrm1. *EMBO J.* **31**, 1811-22.
- Tsong, A. E., *et al.*, 2003. Evolution of a combinatorial transcriptional circuit: a case study in yeasts. *Cell.* **115**, 389-9.
- Tzung, K. W., *et al.*, 2001. Genomic evidence for a complete sexual cycle in *Candida albicans*. *Proc Natl Acad Sci USA.* **98**, 3249-53.
- Umezu, K., *et al.*, 2002. Structural analysis of aberrant chromosomes that occur spontaneously in diploid *Saccharomyces cerevisiae*: retrotransposon Ty1 plays a crucial role in chromosomal rearrangements. *Genetics.* **160**, 97-110.
- Valencia, M., *et al.*, 2001. NEJ1 controls non-homologous end-joining in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nature.* **414**, 666-9.
- VanHulle, K., *et al.*, 2007. Inverted DNA repeats channel repair of distant double-strand breaks into chromatid fusions and chromosomal rearrangements. *Mol Cell Biol.* **27**, 2601-14.
- Vaze, M. B., *et al.*, 2002. Recovery from checkpoint-mediated arrest after repair of a double-strand break requires Srs2 helicase. *Mol Cell.* **10**, 373-85.
- Vázquez, A., *et al.*, 2008. Multiple pathways cooperate to facilitate DNA replication fork progression through alkylated DNA. *DNA repair.* **7**, 1693-704.
- Wang, X., Baumann, P., 2008. Chromosome fusions following telomere loss are mediated by single-strand annealing. *Mol Cell.* **31**, 463-73.
- Whelan, W. L., *et al.*, 1980. Heterozygosity and segregation in *Candida albicans*. *Mol Gen Genet.* **180**, 107-13.
- Whelan, W. L., Magee, P.T., 1981. Natural heterozygosity in *Candida albicans*. *J Bacteriol.* **145**, 896-903.
- Wilson, R. B., *et al.*, 1999. Rapid hypothesis testing with *Candida albicans* through gene disruption with short homology regions. *J. Bacteriol.* **181**, 1868-74.
- Wu, Y., *et al.*, 2006. DNA annealing mediated by Rad52 and Rad59 proteins. *J Biol Chem.* **281**, 15441-9.

- Wyatt, M. D., Pittman, D. L., 2006. Methylating agents and DNA repair responses: Methylated bases and sources of strand breaks. *Chem Res Toxicol.* **19**, 1580-94.
- Zhang, N., *et al.*, 2010. Impact of genetic background on allele selection in a highly mutable *Candida albicans* gene, *PNG2*. *PLoS One.* **5**, e9614.
- Zhao, X., *et al.*, 2011. *ALS51*, a newly discovered gene in the *Candida albicans ALS* family, created by intergenic recombination: analysis of the gene and protein, and implications for evolution of microbial gene families. *FEMS Immunol Med Microbiol.* **61**, 245-57.

**Publicaciones**



# Rad52 function prevents chromosome loss and truncation in *Candida albicans*

E. Andaluz,<sup>1†</sup> A. Bellido,<sup>1†</sup> J. Gómez-Raja,<sup>1</sup>  
A. Selmecki,<sup>2</sup> K. Bouchonville,<sup>2</sup> R. Calderone,<sup>3</sup>  
J. Berman<sup>2</sup> and G. Larriba<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Ciencias Biomédicas, Area Microbiología, Facultad de Ciencias, Universidad de Extremadura, 06071 Badajoz, Spain.

<sup>2</sup>Department of Genetics, Cell Biology and Development, University of Minnesota, Minneapolis, MN 55455, USA.

<sup>3</sup>Microbiology and Immunology, Georgetown University, School of Medicine, Washington, DC 20007, USA.

## Summary

**RAD52 is required for almost all recombination events in *Saccharomyces cerevisiae*. We took advantage of the heterozygosity of *HIS4* in the *Candida albicans* SC5314 lineage to study the role of Rad52 in the genomic stability of this important fungal pathogen. The rate of loss of heterozygosity (LOH) at *HIS4* in *rad52-ΔΔ* strains was  $\sim 10^{-3}$ , at least 100-fold higher than in Rad52<sup>+</sup> strains. LOH of whole chromosome 4 or truncation of the homologue that carries the functional *HIS4* allele was detected in all 80 *rad52-ΔΔ* His auxotrophs (GLH – GL lab His<sup>-</sup>) obtained from six independent experiments. Isolates that had undergone whole chromosome LOH, presumably due to loss of chromosome, carried two copies of the remaining homologue. Isolates with truncations carried centric fragments of broken chromosomes healed by *de novo* telomere addition. GLH strains exhibited variable degrees of LOH across the genome, including two strains that became homozygous for all the heterozygous markers tested. In addition, GLH strains exhibited increased chromosomal instability (CIN), which was abolished by reintroduction of *RAD52*. CIN of GLH isolates is reminiscent of genomic alterations leading to cancer in human cells, and support the mutator hypothesis in which a mutator mutation or CIN phenotype facilitate more mutations/aneuploidies.**

Accepted 28 December, 2010. \*For correspondence. E-mail glarriba@unex.es; Tel. (+34) 924 289428; Fax (+34) 924 289428. †These authors contributed equally to the work.

## Introduction

The opportunistic fungal pathogen *Candida albicans* is a diploid organism (Olaiya and Sogin, 1979) that, according to population studies, reproduces mainly by clonal propagation while exhibiting some recombination (Pujol *et al.*, 1993; Gräser *et al.*, 1996; Odds *et al.*, 2007). Nonetheless, phenotypic and genotypic variability can be extensive following growth *in vitro* or *in vivo* clonal propagation (Sudbery *et al.*, 2004; Magee, 2007). Phenotypic variability may be derived from (i) changes to the proteome due to flexibility of the genetic code (Gomes *et al.*, 2007), (ii) reversible changes in gene expression, such as the dimorphic transition (Brown, 2002), (iii) epigenetic heritable changes in gene expression, such as white/opaque switching (Huang *et al.*, 2006; Srikantha *et al.*, 2006; Zordan *et al.*, 2006), or (iv) genetic alterations ranging from point mutations to extensive genome rearrangements that result in new combinations of alleles (Rustchenko and Sherman, 2003; Forche *et al.*, 2008).

Organisms with complete sexual cycles generate diversity during meiosis. In *C. albicans*, mating and karyogamy between cells of opposite mating type have been accomplished in the laboratory (Hull *et al.*, 2000; Magee and Magee, 2000), yet there is no evidence for a complete sexual cycle or for meiotic recombination. Rather, it appears that a parasexual process involving concerted chromosome loss (CL) results in the reduction of ploidy seen after diploids mate to form a tetraploid (Bennett and Johnson, 2003). Recent results indicate that this parasexual cycle is a source of genetic variability since it generates new combinations of the chromosomes present in the mating partners and yields a subset of progeny that underwent extensive genetic recombination between homologous chromosomes (Forche *et al.*, 2008). However, since recombination between homologues also occurs during the mitotic cycle (Lephart and Magee, 2006), the extent to which the parasexual cycle contributes to the variability detected in population studies is not known.

An important source of genetic variability in *C. albicans* derives from the high levels of heterozygous alleles (Whelan *et al.*, 1980; Whelan and Soll, 1982; Jones *et al.*, 2004) and the ability of the organism to undergo mitotic recombination events that result in loss of heterozygosity

(LOH). LOH is crucial for a number of processes that dramatically influence the biology, virulence and antifungal susceptibility of *C. albicans* (Larriba and Calderone, 2008). For instance, homozygosis of the *MTL* locus yields cells that can mate (Hull *et al.*, 2000; Magee and Magee, 2000) and LOH of specific *TAC1* and *ERG11* alleles underlies resistance to azoles in clinical isolates (White, 1997; Coste *et al.*, 2004; 2007). Following colonization of different individuals by the same strain, LOH events lead to microevolution (Lockhart *et al.*, 1995; Forche *et al.*, 2005). Similarly, isolates from a single patient are highly related, yet frequently show small changes (microvariations) due to LOH events (Bougnoux *et al.*, 2006; Odds *et al.*, 2006). Thus, local LOH events largely contribute to the expansion of diploid sequence types and, accordingly, to the variability/diversity of *C. albicans* (Odds *et al.*, 2007; Odds, 2010).

Processes leading to LOH are under the control of the DNA integrity network that includes the mitotic recombination systems (Paques and Haber, 1999). In wild-type diploid *Saccharomyces cerevisiae* cells that are hemizygous or heterozygous for a *URA3* marker, spontaneous LOH can occur by allelic recombination (crossing over, break-induced replication and local gene conversion), CL, or by chromosome aberrations caused by ectopic recombination between homologous sequences (Hiraoka *et al.*, 2000; Tourrette *et al.*, 2007). LOH is significantly increased in *S. cerevisiae* mutants defective in homologous recombination (HR), including *rad50*, *rad51* and *rad52* mutants, mainly because the frequency of CL and intragenic point mutation is increased, suggesting that, in the absence of HR, other mutagenic pathways generate genetic variability. An analysis of chromosomal alterations in HR mutants has provided clues about the molecular mechanisms leading to LOH in *S. cerevisiae* (Yoshida *et al.*, 2003).

In *C. albicans*, LOH at several loci may occur during propagation *in vitro* and during interaction with the host, but LOH accompanied by changes in karyotypes was only observed under the *in vivo* condition (Forche *et al.*, 2004; 2009a). Furthermore, adaptation of *C. albicans* to different stresses, including those caused by 5-fluorotic acid (5-FOA) or the antifungal compound fluconazole, is accompanied by specific gross chromosomal rearrangements (GCRs) as well as by additional uncharacterized aneuploidies that likely increase fitness in the presence of the drug (Selmecki *et al.*, 2006; Rustchenko, 2007; Bouchonville *et al.*, 2009; reviewed by Selmecki *et al.*, 2010). These observations suggest that adaptive mutations that allow survival under stress conditions often arise due to chromosome instability.

To know how LOH and GCR occur or are regulated in *C. albicans*, we analysed *C. albicans* Rad52, a member of the DNA integrity network that is crucial for DNA repair,

gene replacement and virulence in a murine model of haematogenously disseminated candidiasis (Ciudad *et al.*, 2004; Chauhan *et al.*, 2005; García-Prieto *et al.*, 2010). Here, we analysed the appearance of spontaneous His auxotrophs in *rad52* null homozygous (*Carad52-ΔΔ*) mutants. We found that *Carad52-ΔΔ* mutants exhibited an increased rate of LOH and a high frequency of genetic variability in the form of chromosome instability (CIN). CIN occurred by whole chromosome homozygosis, or by chromosome truncation (CT) and *de novo* telomere addition, but, unlike the case of *S. cerevisiae rad52* mutants, *Carad52-ΔΔ* strains did not undergo frequent translocations. These observations highlight the critical role of Rad52 recombination in protecting the genome from processes that generate extreme and anomalous genetic instability.

## Results

### *Spontaneous generation of His auxotrophs by parental strains CAF2 and CAI-4 and rad52 null homozygous derivatives*

Previously, we showed that *C. albicans* SC5314 and its derivative CAI-4 are heterozygous for the *HIS4* locus due to the presence of a SNP (G929T), such that one of the alleles (T) is inactive. Furthermore, all the UV-induced His auxotrophs derived from CAI-4 were complemented with a wild-type copy of *HIS4*, indicating that the heterozygous *HIS4* locus is responsible for histidine (His) auxotrophy in this *C. albicans* strain (Gómez-Raja *et al.*, 2008). Accordingly, the frequency of LOH at the *HIS4* locus can be measured by the appearance of His auxotrophs in the strain. When incubated in YPD broth, *rad52-ΔΔ* strains TCR2.1 (Uri<sup>+</sup>) and TCR2.1.1 (Uri<sup>-</sup>) (Table 1) produced spontaneous His auxotrophs (e.g. 6 out of 1100 colonies in one experiment), detected by replica-plating from complete medium to medium lacking histidine. Similar results were obtained with a second independent *rad52-ΔΔ* Uri<sup>-</sup> strain (TCR2.2.1, Table 1) (not shown). In contrast, no His auxotrophs were detected in parallel cultures of the parental *RAD52/RAD52* strains (CAF2 or CAI-4). LOH rates were determined by fluctuation analysis (Table 2, Lea and Coulson, 1949; Reenan and Kolodner, 1992; Spell and Jinks-Robertson, 2004). For the parental Rad52<sup>+</sup> strains, His auxotrophs were not observed among nearly 25 000 colonies of CAF2 (eight sets of ~3000 cells each, each set derived from a different colony), nor were they detected in ~100 000 colonies of CAI-4, indicating a frequency of spontaneous LOH at the *HIS4* locus of less than  $1 \times 10^{-5}$  events per viable cell. Similarly, no His auxotrophs were detected among ~25 000 colonies of a *RAD52* reintegrand (ABY0) (Table 1). In contrast, in the *rad52-ΔΔ* strain TCR2.1.1 we obtained an average of one



**Table 1.** Strains used in this study.

Strain	Genotype	Parental	Phenotype	Reference
SC5314	Wild type		Wild type	Gillum <i>et al.</i> (1984)
CAF2	<i>ura3::imm434/URA3</i>	SC5314	Wild type	Fonzi and Irwin (1993)
CAI-4	<i>ura3::imm434/ura3::imm434</i>	CAF2	Uri <sup>-</sup>	Fonzi and Irwin (1993)
TCR2.1	<i>ura3::imm434/ura3::imm434 rad52::hisG/rad52::hisG-URA3-hisG</i>	CAI-4	Rad52 <sup>-</sup> Uri <sup>+</sup>	Ciudad <i>et al.</i> (2004)
TCR2.1.1	<i>ura3::imm434/ura3::imm434 rad52::hisG/rad52::hisG</i>	TCR2.1	Rad52 <sup>-</sup> Uri <sup>-</sup>	Ciudad <i>et al.</i> (2004)
TCR2.2.1	<i>ura3::imm434/ura3::imm434 rad52::hisG/rad52::hisG</i>	TCR2.2	Rad52 <sup>-</sup> Uri <sup>-</sup>	Ciudad <i>et al.</i> (2004)
ABY0	<i>ura3::imm434/ura3::imm434 rad52::hisG/RAD52::URA3-hisG</i>	TCR2.1.1	Rad52 <sup>+</sup> Uri <sup>+</sup>	This work
ABY1 to ABY7	<i>ura3::imm434/ura3::imm434 rad52::hisG/RAD52::URA3-hisG</i>	GLH1-1 to GLH1-7	Rad52 <sup>+</sup> Uri <sup>+</sup> His <sup>-</sup>	This work

His auxotroph (GLH strains – GL lab Histidine auxotrophs) from each set of 500–1000 cells plated, although the frequency varied widely between the experiments and/or individual colonies (Table 2, Expts. 1 and 2; for details,

see Table S1). These results suggest that the frequency at which *C. albicans* cells undergo LOH, detected here as His auxotrophy, increased significantly in the absence of *RAD52*.

**Table 2.** Summary of fluctuation experiments measuring rates of loss of heterozygosity (LOH) at *HIS4*.

Expt.	Age of colony (h)	Size/morphology	NCS	Selected His auxotrophs from each experiment <sup>a</sup>	Total His <sup>-</sup> /total cells	Rate (events per cell per generation)
1	Nd	Not selected/filamentous	8	(GLH1-1, GLH1-2, GLH1-3, GLH1-4, GLH1-5, GLH1-6, GLH1-7) <sup>b</sup>	8/6971	1.59 × 10 <sup>-3</sup>
2	Nd	Not selected/filamentous	12	GLH2-1, (GLH2-2, GLH2-4) (GLH2-3, GLH2-5)	16/8155	2.04 × 10 <sup>-3</sup>
3	48	Large/filamentous	19	GLH3-1, GLH3-2, GLH3-3, GLH3-4, (GLH3-5, GLH3-6), GLH3-7, GLH3-8, GLH3-9	10/31 326	2.85 × 10 <sup>-4</sup>
4	72	Large	13	None	6/20 839	7.31 × 10 <sup>-4</sup>
	144	Small	13	None	49/10 942	5.95 × 10 <sup>-3</sup>
5	72	Large/smooth	6	None	3/6099	Nd
	144	Small/smooth	8	(GLH4-1, GLH4-2, GLH4-3, GLH4-4, GLH4-5), (GLH4-6, GLH4-7, GLH4-8, GLH4-9, GLH4-10), (GLH4-11, GLH4-12, GLH4-13, GLH4-14), GLH4-15	45/5871	5.44 × 10 <sup>-3</sup>
	144	Small/filamentous	4	(GLH5-1, GLH5-2, GLH5-3, GLH5-4, GLH5-5, GLH5-6, GLH5-7, GLH5-8, GLH5-9, GLH5-10, GLH5-11), (GLH5-12, GLH5-13), GLH5-14	91/2415	Nd
6	48	Large/filamentous	4	GLH6-1, GLH6-2	2/2360	Nd
	96	Not selected/filamentous	4	(GLH6-3, GLH6-4, GLH6-5, GLH6-6, GLH6-7, GLH6-8, GLH6-9, GLH6-10, GLH6-11), (GLH6-12, GLH6-13, GLH6-14, GLH6-15, GLH6-16), GLH6-17, (GLH6-18, GLH6-19, GLH6-20, GLH6-21, GLH6-22 and GLH6-23)	21/3319	Nd
	144	Not selected/filamentous	4	(GLH6-24, GLH6-25, GLH6-26, GLH6-27, GLH6-28, GLH6-29 and GLH6-30)	18/1112	Nd
7	144	Large/filamentous	4	None	3/1884	Nd

**a.** Only *rad52-ΔΔ HIS4* auxotrophs (GLH strains) selected for further studies are indicated. Strains indicated within parentheses derive from the same colony. Results corresponding to each colony are shown in Fig. S1. Nd, not determined.

**b.** Small colony.

Colonies of strain TCR2.1.1 were obtained by first streaking a –80°C stock culture onto YPD plates. Large and small colonies were initially selected when they were 48 h old. They were subsequently analysed for histidine auxotrophy when they reached approximately 1.5 mm diameter (about 72 h and 144 h of growth on YPD plates for large and small colonies respectively) regardless of whether they were initially large or small except in Expt. 6 and Expt. 7. In Expt. 6, colonies were not selected by size and, at the time of analysis, colonies 96 h and 144 h old had variable sizes and in Expt. 7, 144-h-old colonies were larger than 1.5 mm. NCS: number of *rad52-ΔΔ* colonies screened in each experiment for the presence of His auxotrophs. Rates were only calculated when the number of colonies screened was ≥ 8.

To better understand the variability in the yield of His auxotrophs, we analysed the effect of the size, morphology and colony age on LOH frequencies. When samples from frozen cultures of a *rad52-ΔΔ* Uri<sup>-</sup> strain (TCR2.1.1) were inoculated on YPD plates, they formed colonies of variable size (Fig. S1A). Large colonies yielded a lower rate of His auxotrophs (Table 2, Expt. 3), which was confirmed by a new fluctuation test: large colonies yielded 25-fold fewer His auxotrophs (0.03%) than small colonies (0.45%) (Expt. 4) ( $P = 0.012$ ), which translated to a 10-fold lower LOH rate. Furthermore, within each group, the range of fluctuation in the rate of appearance of histidin auxotrophs was lower than for colonies that were not size-selected (Table 2, Expts. 3 and 4 respectively; for details, see Table S1).

Regardless of size, *rad52-ΔΔ* colonies also exhibited varying degrees of filamentation, from those that were smooth with no apparent filaments to the most abundant group: wrinkled colonies with filaments protruding into the medium (Fig. S1A) (Andaluz *et al.*, 2006). It is important to note that the distinction between smooth and filamentous colonies is simply operative, defining the appearance of the colony at the time of the selection. Not only do some apparently smooth colonies go on to produce filaments with increasing age, but, upon passage on YPD plates, most colonies become filamentous colonies regardless of the morphology assigned to the parent colony (Fig. S1A and B). Nonetheless, selected small smooth colonies as well as small filamentous colonies produced His auxotrophs at a rate similar to that calculated for the whole set of small colonies (Table 2, Expt. 5; Table S1). Six large smooth colonies as well as large filamentous yielded fewer His auxotrophs than smaller colonies. Thus, colony size appears to be more critical than colony morphology. Nonetheless, the frequency of appearance of His auxotrophs ranged widely in the small filamentous colonies; for one colony, 10% of the cells were His<sup>-</sup>, whereas 0–1% of cells from three other colonies were auxotrophs.

Overall, the number of His auxotrophs from unselected colonies of different ages did not show a consistent increase in LOH frequencies (Table 2, Expt. 6; Table S1), suggesting that colony age is not a major factor influencing the LOH frequency. In support of this, 144-h-old large colonies produced His auxotrophs at a similar frequency to younger large colonies sampled at 48 h and 72 h (Table 2, compare Expt. 7 with Expts. 3 and 4).

Methylene blue staining indicated that both large and small colonies had a similar, small proportion of dead cells (not shown), suggesting that the increased LOH rate observed for small colonies is associated with slow growth rather than with a higher cell mortality rate. Importantly, neither colony size nor colony morphology (filamentous growth) was a heritable phenotype, since upon transfer to new plates all colonies gave rise to both small

and large colonies, regardless of their size and degree of filamentation on the initial plate. Thus, small colonies produce His auxotrophs at a higher rate than large colonies, and there exists a substantial level of colony phenotypic variation which likely derives from the genetic instability associated with GLH strains.

#### *His auxotrophs lose the functional allele of HIS4*

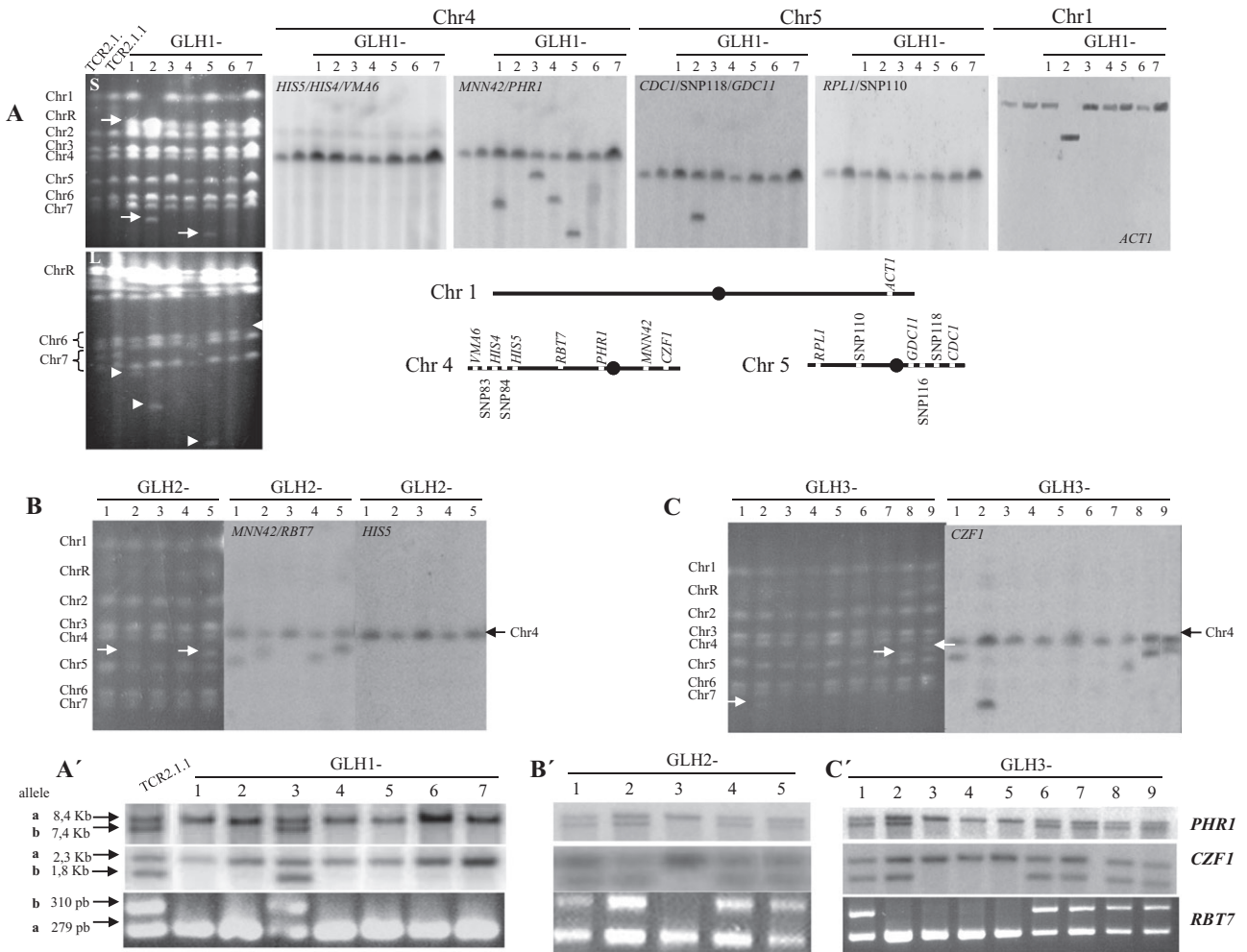
To characterize the genetic alterations associated with the His<sup>-</sup> phenotype, we analysed 80 *rad52-ΔΔ* His<sup>-</sup> strains from six independent sets of isolates (GLH1 to GLH6; Table 2). Like the parental *rad52-ΔΔ* strain (TCR2.1.1) (Ciudad *et al.*, 2004), each GLH strain grew slower than wild-type strains. Colony morphology varied among the strains, but smooth, filamentous and sectorized colonies were observed in all six sets (not shown).

To ask if loss/inactivation of the functional *HIS4* allele accounted for the His auxotrophy in selected GLH isolates, we attempted to transform these strains with plasmid pRMH1 which carries the *HIS4* gene from strain 1001 of *C. albicans* and complements a *his4* null homozygote in a wild-type background (Gómez-Raja *et al.*, 2008). The results of these studies were inconclusive for two reasons. First, *rad52* null homozygous strains of *C. albicans* are refractory to transformation with standard *C. albicans* plasmids (our unpublished results). Second, the His auxotrophs frequently reverted to His<sup>+</sup> (not shown), which complicated the analyses. Thus, instead, we focused on the structure of the *his4* alleles in the His auxotrophs to ask if the LOH events were due to alterations at this locus.

We next used an allele-specific PCR that discriminates between the two *HIS4* alleles in strain CAI-4 (Gómez-Raja *et al.*, 2008). In CAI-4 and in the parental *rad52-ΔΔ* strains (TCR2.1.1 and TCR2.2.1), both alleles were maintained. Importantly, in each of the 21 GLH isolates selected from Expts. 1 to 3, only the non-functional *his4* allele was retained (data not shown), implying that the His<sup>-</sup> phenotype was due to loss of the functional *HIS4* allele rather than to point mutations within the functional allele. This could have occurred by (i) loss of the Chr4 homologue carrying the active *HIS4* allele, (ii) a large deletion removing *HIS4* and surrounding regions, or (iii) a HR event including cross-over on Chr4L, local gene conversion using the *his4* allele as the template, or break-induced replication (BIR) on Chr4L.

#### *Most rad52-ΔΔ His auxotrophs exhibit altered karyotypes*

Next, we analysed the 80 GLH isolates for chromosomal rearrangements by separating whole chromosomes on PFGE karyotype gels stained with ethidium bromide. Compared with the parental strain TCR2.1.1, GLH1 isolates showed dramatic reductions in chromosome (Chr) R mobil-



**Fig. 1.** A, B, C. Karyotype analysis by PFGE of GLH isolates from the first (A), second (B) and third (C) sets. Line drawing of Chrs1, 4 and 5 illustrated under (A) indicates the relative positions of probes used in Southern blots. Centromeres are indicated by dark circles. Within each set, membranes were stripped before being hybridized to the next probe. Southern blots labelled with more than one probe gave identical patterns when probed separately with each of the indicated probes. For the first set (A), Standard (separation of all the chromosomes; panel S) and Long run (separation of both homologues of the smaller chromosomes Chr6 and Chr7; panel L) electrophoresis are shown. Arrows indicate extra-bands not seen in the standard karyotype. Lane numbers refer to the GLH strains. For further explanation and details, see text. TCR2.1, *rad52-ΔΔ Uri*<sup>+</sup>; TCR2.1.1, *rad52-ΔΔ Uri*<sup>-</sup>. A', B', C'. Analysis of Chr4 polymorphic markers in GLH1 (A'), GLH2 (B') and GLH3 (C') isolates respectively (see *Experimental procedures*).

ity (Fig. 1A, panel S, upper arrow). Furthermore, they carry only the smaller homologue of Chr7, detected by electrophoretic conditions that distinguish homologues of the smaller chromosomes (Fig. 1A, panel L). In contrast, in the GLH2 and GLH3 isolates, ChrR mobility was normal and both homologues of Chr6 and Chr7 were retained. Such differences in chromosome mobility are often due to changes in the size of repetitive DNA (e.g. rDNA on ChrR and MRS repeats on Chr7, as reviewed in Rustchenko and Sherman, 2003; Chibana and Magee, 2009).

GLH isolates exhibited additional types of chromosomal alterations. Isolate GLH1-2 had dramatically reduced sizes of both Chr1 homologues. Isolate GLH1-7 carried only the smaller homologue of Chr6 (Fig. 1A, panel L,

arrowhead, far right). Extrachromosomal bands smaller than Chr7 (supernumerary chromosomes, SNCs) (Chu *et al.*, 1993) were also evident in isolate GLH1-1 (Fig. 1A, panel L, arrowhead, far left) as well as in isolate GLH1-5 (Fig. 1A, panel S, arrow) and GLH2 and GLH3 strains (Fig. 1B and C, arrows). SNCs were also evident in GLH4, GLH5 and GLH6 strains (Figs S2, S3 and S4, respectively, arrowheads).

Since *HIS4* maps near the telomere of Chr4L, we first asked if any of the SNCs or chromosomes with altered mobility included DNA from Chr4. Southern blots of karyotype gels were probed with markers for each of the Chr4 arms (Fig. 1A). Probes for *HIS4* and *HIS5*, which are ~23 and ~113 kb proximal to the left telomere, respectively,

**Table 3.** Summary of Chr4 and Chr5 alterations in the GLH strains as deduced from Southern blot, CGH and polymorphism analyses.

Strains	Chr 4b	Chr 4a	<i>MTL</i>	SNP 116	Strains	Chr 4b	Chr 4a	<i>MTL</i>	SNP 116
CAI4	1	1	$\frac{a}{\alpha}$	Ht	GLH5-1 GLH5-2 GLH5-3 GLH5-4 GLH5-5 GLH5-6 GLH5-7 GLH5-8 GLH5-9 GLH5-10 GLH5-11 GLH5-12 GLH5-13 GLH5-14	CL	$\cong 1$	$\frac{a}{\alpha}$	Hma
TCR2.1.1	1	1	$\frac{a}{\alpha}$	Ht		CL	$\cong 1$	$\frac{a}{\alpha}$	Ht
{ GLH1-1 GLH1-2 GLH1-3 GLH1-4 GLH1-5 GLH1-6 GLH1-7	CL	2 + 4L <sup>693</sup>	$\frac{a}{\alpha}$	Hmb		CL	$\cong 1$	$\frac{a}{\alpha}$	Ht
	CL	2	$\frac{a}{\alpha}$	Hmb		4L <sup>500</sup>	$\cong 1$	$\frac{a}{\alpha}$	Ht
	4L <sup>322</sup>	2	$\frac{a}{\alpha}$	Hmb		CL	$\cong 1$	$\frac{a}{\alpha}$	Ht
	CL	2 + 4L <sup>590</sup>	$\frac{a}{\alpha}$	Hmb		CL	$\cong 1$	$\frac{a}{\alpha}$	Ht
	CL	2 + 4L <sup>1000</sup>	$\frac{a}{\alpha}$	Hmb		CL	$\cong 1$	$\frac{a}{\alpha}$	Ht
	CL	2	$\frac{a}{\alpha}$	Hmb		CL	$\cong 1$	$\frac{a}{\alpha}$	Ht
	CL	2	$\frac{a}{\alpha}$	Hmb		4L <sup>500</sup>	$\cong 1$	$\frac{a}{\alpha}$	Ht
{ GLH2-1 GLH2-2 GLH2-4 GLH2-3 GLH2-5	4L <sup>350</sup>	2*	$\frac{a}{\alpha}$	Ht		CL	$\cong 1$	$\frac{a}{\alpha}$	Ht
	4L <sup>250</sup>	1*	$\frac{a}{\alpha}$	Hmb		CL	$\cong 1$	$\frac{a}{\alpha}$	Ht
	4L <sup>320</sup>	1*	$\frac{a}{\alpha}$	Hmb		CL	$\cong 1$	$\frac{a}{\alpha}$	Ht
	CL	$\cong 1$	$\frac{a}{\alpha}$	Hmb		CL	$\cong 1$	$\frac{a}{\alpha}$	Ht
	4L <sup>220</sup>	1*	$\frac{a}{\alpha}$	Hmb					
{ GLH3-1 GLH3-2 GLH3-3 GLH3-4 GLH3-5 GLH3-6 GLH3-7 GLH3-8 GLH3-9	4L <sup>235</sup>	2	$\frac{a}{\alpha}$	Ht	{ GLH6-1 GLH6-2 GLH6-3 GLH6-4 GLH6-5 GLH6-6 GLH6-7 GLH6-8 GLH6-9 GLH6-10 GLH6-11 GLH6-12 GLH6-13 GLH6-14 GLH6-15 GLH6-16 GLH6-17 GLH6-18 GLH6-19 GLH6-20 GLH6-21 GLH6-22 GLH6-23 GLH6-24 GLH6-25 GLH6-26 GLH6-27 GLH6-28 GLH6-29 GLH6-30	4L <sup>250</sup>	$\cong 1$	$\frac{a}{\alpha}$	Ht
	4L <sup>786</sup>	2	$\frac{a}{\alpha}$	Ht		4L <sup>420</sup>	$\cong 1$	$\frac{a}{\alpha}$	Hma
	CL	2	$\frac{a}{\alpha}$	Ht		CL	$\cong 1$	$\frac{a}{\alpha}$	Hmb
	CL	2	$\frac{a}{\alpha}$	Ht		4L <sup>100</sup>	$\cong 1$	$\frac{a}{\alpha}$	Hmb
	CL	2	$\frac{a}{\alpha}$	Ht		4L <sup>250</sup>	$\cong 1$	$\frac{a}{\alpha}$	Hmb
	CL	2	$\frac{a}{\alpha}$	Ht		CL	$\cong 1$	$\frac{a}{\alpha}$	Hmb
	1	1	$\frac{a}{\alpha}$	Ht		CL	$\cong 1$	$\frac{a}{\alpha}$	Hmb
	4L <sup>420</sup>	2	$\frac{a}{\alpha}$	Ht		4L <sup>620</sup>	$\cong 1$	$\frac{a}{\alpha}$	Hmb
	4L <sup>314</sup>	2	$\frac{a}{\alpha}$	Ht		CL	$\cong 1$	$\frac{a}{\alpha}$	Hmb
4L <sup>175</sup>	1	$\frac{a}{\alpha}$	Ht	4L <sup>670</sup>	$\cong 1$	$\frac{a}{\alpha}$	Hmb		
{ GLH4-1 GLH4-2 GLH4-3 GLH4-4 GLH4-5 GLH4-6 GLH4-7 GLH4-8 GLH4-9 GLH4-10 GLH4-11 GLH4-12 GLH4-13 GLH4-14 GLH4-15	CL	$\cong 1$	$\frac{a}{\alpha}$	Hmb	4L <sup>250</sup>	$\cong 1$	$\frac{a}{\alpha}$	Hmb	
	CL	$\cong 1$	$\frac{a}{\alpha}$	Hmb	CL	$\cong 1$	$\frac{a}{\alpha}$	Hmb	
	CL	$\cong 1$	$\frac{a}{\alpha}$	Hmb	4L <sup>1000</sup>	$\cong 1$	$\frac{a}{\alpha}$	Hmb	
	CL	$\cong 1$	$\frac{a}{\alpha}$	Hmb	4L <sup>650</sup>	$\cong 1$	$\frac{a}{\alpha}$	Hmb	
	CL	$\cong 1$	$\frac{a}{\alpha}$	Hmb	4L <sup>200</sup>	$\cong 1$	$\frac{a}{\alpha}$	Hmb	
	CL	$\cong 1$	$\frac{a}{\alpha}$	Hmb	CL+CT	$\cong 1$	$\frac{a}{\alpha}$	Ht	
	CL	$\cong 1$	$\frac{\alpha}{\alpha}$	Hma	4L <sup>1000</sup>	$\cong 1$	$\frac{a}{\alpha}$	Ht	
	CL	$\cong 1$	$\frac{\alpha}{\alpha}$	Hma	4L <sup>670</sup>	$\cong 1$	$\frac{a}{\alpha}$	Ht	
	CL	$\cong 1$	$\frac{\alpha}{\alpha}$	Hma	CL	$\cong 1$	$\frac{a}{\alpha}$	Hmb	
	CL	$\cong 1$	$\frac{\alpha}{\alpha}$	Hma	CL	$\cong 1$	$\frac{a}{\alpha}$	Hmb	
	CL	$\cong 1$	$\frac{a}{\alpha}$	Hmb	CL	$\cong 1$	$\frac{a}{\alpha}$	Hmb	
	CL	$\cong 1$	$\frac{a}{\alpha}$	Hmb	CL	$\cong 1$	$\frac{a}{\alpha}$	Hmb	
	CL	$\cong 1$	$\frac{a}{\alpha}$	Hmb	CL	$\cong 1$	$\frac{a}{\alpha}$	Hmb	
	CL	$\cong 1$	$\frac{a}{\alpha}$	Hmb	4L <sup>290</sup>	$\cong 1$	$\frac{a}{\alpha}$	Hmb	
	CL	$\cong 1$	$\frac{a}{\alpha}$	Hmb	CL	$\cong 1$	$\frac{a}{\alpha}$	Hmb	

Siblings are grouped by brackets. Chr5 was characterized for both *MTL* and the SNP116 marker. For details see text. Symbols: CL (chromosome loss) means homozygosity of all markers analysed. For Chr4a and Chr4b, superscripts indicate the size of the truncation in kb. For Chr4a, numbers indicate the copy number according to CGH (GLH1 and GLH3 isolates, except for GLH1-1, whose alterations were deduced from karyotype analysis) (Table 4) or to the intensity ratio yielded by the polymorphic markers (GLH2 isolates, \*). Strain GLH3-6 likely carries a very small terminal deletion of Chr4a, restricted to little more than the *HIS4* locus or a loss-of-function mutation in *HIS4*. For SNP116, Hm, homozygote (the allele found is indicated); Ht, heterozygote.

labelled only Chr4 in all the GLH1 isolates. Interestingly, probes for *MNN42on* Chr4R, or *PHR1* which is near the centromere (CEN) on Chr4L hybridized to the intact Chr4 band and also hybridized to smaller SNCs in four strains (GLH1-1, GLH1-3, GLH1-4 and GLH1-5) (Fig. 1A). Together, these data suggest that one homologue of Chr4, including *CEN4* and Chr4R, is missing the distal

portion of Chr4L that encodes *HIS4*. Based on the assumption that these SNCs arose only from Chr4 DNA, we suggest that 693, 322, 590 and 1000 kb of Chr4L were lost from strains GLH1-1, GLH1-3, GLH1-4 and GLH1-5 respectively (summarized in Table 3).

A similar analysis of the karyotypes of the other GLH isolates using the same or additional probes (*CZF1*)

indicated that 80% (4 of 5) of the GLH2 isolates (GLH2-1, GLH2-2, GLH2-4 and GLH2-5) (Fig. 1B) and 55% (5 of 9) of the GLH3 isolates (GLH3-1, GLH3-2, GLH3-7, GLH3-8 and GLH3-9) (Fig. 1C), as well as 14% (2 of 14) of the GLH5 isolates (Fig. S3) and 53% (16 of 30) of the GLH6 strains carried SNCs that hybridize to genes from Chr4 (Fig. S4). In contrast, no SNCs were detected with Chr4 probes in the GLH4 isolates (Fig. S2). A summary of truncations affecting Chr4, with the deletion size indicated, is provided in Table 3.

To ask if alterations also occurred on other chromosomes, we probed Southern blots of karyotype gels with probes of Chr5. Three probes from Chr5R (*GCD11*, *CDC1* and SNP118) detected a SNC smaller than Chr7 in strain GLH1-2, in addition to the expected detection of Chr5-sized bands. However, Chr5L probes (SNP110 and *RPL1*, the ORF closest to the telomere) detected only intact Chr5 bands. Therefore, the SNC was most likely generated by deletion of ~250 kb from Chr5L.

Other chromosome rearrangements were also detected in GLH1 isolates, including a ~1 Mb deletion of Chr1 in strain GLH1-2, that did not delete *ACT1* which maps near the Chr1R telomere (Fig. 1A). In contrast, probes from Chr6L (*orf19.5525* and *COX12*) and Chr7R (*ARG4*) detected only Chr6 and Chr7 bands, respectively, suggesting that these chromosomes had not undergone rearrangements (data not shown).

To better characterize deletions of Chr4, we used the *HIS4* gene itself (24 kb from the telomere) and *VMA6* (the ORF closest to the telomere) (Fig. 1A) to probe karyotypes of all GLH1 isolates. For all strains, these two Chr4L probes labelled only intact Chr4, and none of its shorter derivatives (Fig. 1A and data not shown), implying that the shorter Chr4 SNCs arose via a chromosome break telomere-proximal to *PHR1*. We assume that the chromosome break was followed by addition of a telomere sequence to the centric fragment to form a stable truncated chromosome (e.g. Selmecki *et al.*, 2005). Similarly, we assume that the Chr5b SNC in GLH1-2 arose via CT and telomere addition. Taken together, these results indicate that, in addition to causing an increase in the LOH rate, the absence of Rad52 results in a high occurrence of CT that forms SNCs.

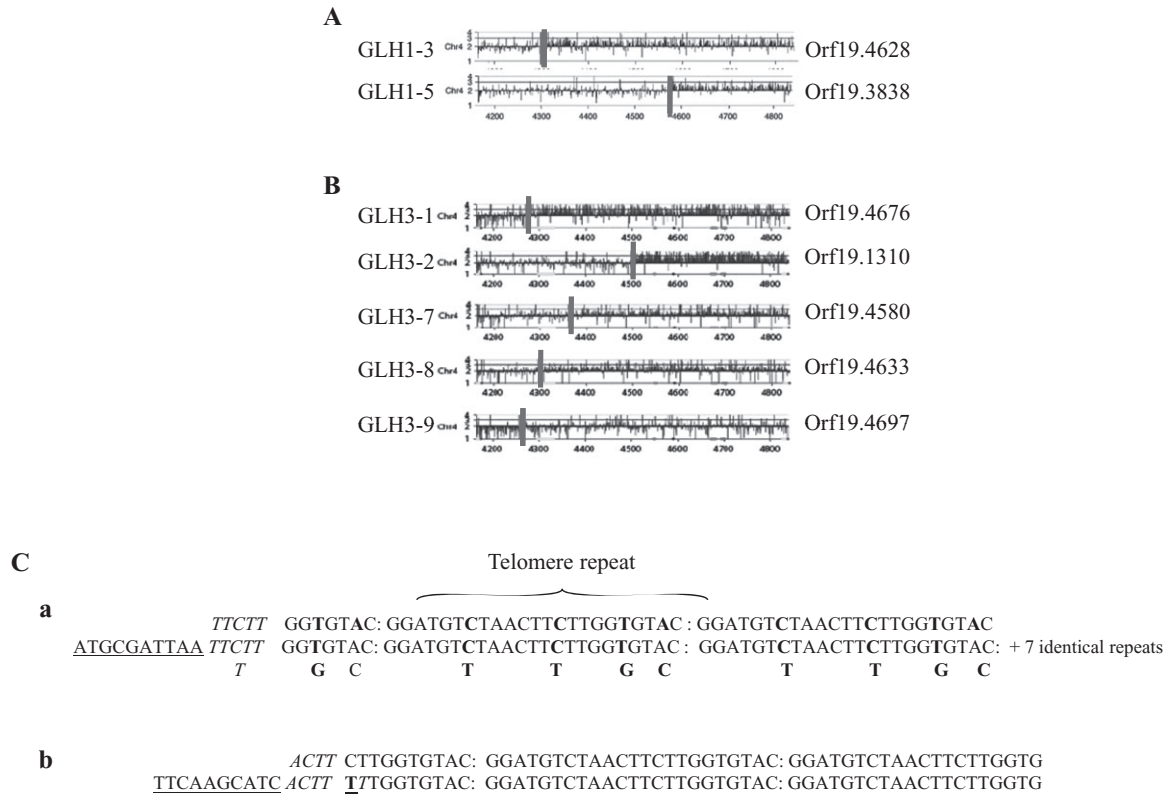
#### *Comparative genomic hybridization (CGH) identifies segmental aneuploidies and reveals chromosome break points*

While PFGE analysis of SNC size provides a good estimate of the presumed truncation and Southern analysis points to the likely chromosome fragments involved, comparative genomic hybridization (CGH) analysis (Fig. 2) provides a more comprehensive view of changes in genome copy number (reviewed by Selmecki *et al.*,

2010). Importantly, aneuploidy is widespread in the GLH isolates as revealed by CGH performed with microarrays carrying two copies of each *C. albicans* ORF (Selmecki *et al.*, 2005). For example, among the GLH1 and GLH3 isolates, 71% (5 of 7) and 55% (5 of 9), respectively, had segmental aneuploidy for one or more chromosomes (Table 4), implying that chromosome breaks had occurred. Strains with truncated Chr4 SNCs were usually trisomic for the DNA on the SNC and disomic for the region missing from the SNC (Fig. 2B), with the exception of strain GLH3-9, which was disomic for the retained region and monosomic for the region that had been truncated.

For some GLH1 isolates (e.g. GLH1-3 and GLH1-5), the trisomic regions corresponded well with the sizes of the SNCs. In other isolates, the correspondence with the SNC size predicted by Southern analysis (Fig. S5) was less clear (Table 4 and Fig. S5). For instance, for GLH1-2, PFGE analysis suggested altered sizes for Chrs1, R and a SNC including Chr5R DNA (Fig. 1A), while CGH revealed trisomies in selected regions of Chr1, R and 6 (Table 4, Fig. S5). This highlights the different aspects of genome rearrangements detected with the two techniques: PFGE detects changes in chromosome size and geometry, but requires Southern analysis with a large number of probes to determine exactly which portions of each chromosome are included in specific bands; CGH identifies those genome regions that are present in altered copy number, but does not reveal their geometry (Selmecki *et al.*, 2010). In this case, several chromosome fragments may have broken and now run with a mobility similar to that of other chromosomes, which makes their detection more difficult (e.g. a fragment of Chr1, detected with the *ACT1* probe, has a mobility like that of ChrR, and Chr6 appears to contain extra DNA, Fig. 1A), or are too small and may have been lost from the gel (e.g. the ~300 kb trisomic region of ChrR). Notably, all the trisomic fragments detected by CGH carry a CEN region which allows them to be stably maintained. However, because the PFGE and CGH analyses required transfer of the strains between two laboratories, we cannot rule out (and indeed it is entirely possible as described below) that some GLH1 isolates underwent additional chromosome alterations between the two analyses. Analysis of chromosomal instability helped to explain the conflicting results between PFGE and CGH in some isolates (see below). Simple rearrangements in GLH3 strains resulted in clear correlations between the karyotype gel analysis and the CGH results; alternatively, the GLH3 strains were simply more stable than those from the first set.

Notably, CGH analysis pointed to specific break points of the truncated chromosomes, which were confirmed for strains GLH1-3 and GLH1-5 by Southern blot hybridization using probes predicted to be within and outside the



**Fig. 2.** A and B. CGH for Chr4 of the indicated His<sup>-</sup> strains. GLH from set 1 (A) and set 3 (B). The last genes present in the aneuploid (extra copies) region at the position of the vertical bar are indicated.

C. Alignment of the telomere repeat (top line) and the *de novo* added telomere (bottom line) found in strains GLH1-3 (a) and GLH1-5 (b). Unambiguous chromosomal sequences are underlined. The junction sequence (italics) carries bases that could be derived from the chromosome or the telomere (Putnam *et al.*, 2004). In isolate GLH1-3 the sequence yields two bases (C/T) at the middle of the junction sequence **TTC/TTT**. Note also the presence of two bases, one identical to its counterpart in the canonical telomere sequence and the other different (in bold) at four specific positions of the sequenced *de novo* added telomere of strain GLH1-3 (see text). Telomere repeats are separated by colons. In strain GLH1-5, either there was a mutation in the first base after the putative junction sequence (underlined) or the junction sequence is reduced to the next T (italicized).

truncation (summarized in Table 4). To further evaluate if the SNCs had been generated by CT and telomere addition, we performed PCR using a primer complementary to sequences telomere-proximal to the last probe that hybridized to the truncated chromosome, and a primer from the telomere. In both isolates, GLH1-3 and GLH1-5, we isolated PCR fragments and sequenced them, confirming that telomere addition to truncated chromosome ends was a common mechanism to rescue broken chromosome ends. For strain GLH1-3, the junction sequence was (**TTC/TTT**), where *TTCTT* is common to both the promoter of the *orf19.4629* and the telomere. In contrast, in GLH1-5 we found no more than a single bp of homology to the template sequence single T (italicized in Fig. 2C, b) or a sequence with only five nucleotides of homology (Fig. 2C, a and b) within six nucleotides of the telomere template. Resequencing of the template region of the gene that encodes the telomerase RNA component (McEachern and Hicks, 1993; Hsu *et al.*, 2007) did not detect any ambiguity in the sequence in these strains.

Given that the *rad52-ΔΔ* strains are defective in HR (an alternative mechanism of telomere addition in wild-type cells; Le *et al.*, 1999), we propose that telomerase elongated the broken chromosome despite minimal homology to the template sequence.

#### *His auxotrophy in rad52-ΔΔ cells occurred through loss or truncation of Chr4*

Although PFGE karyotype and CGH analyses indicate that several His<sup>-</sup> strains carry a truncated Chr4, we could not determine whether the deletion was preceded by CL. To address this issue, we took advantage of the polymorphism of three genes on Chr4, *CZF1*(Chr4R) and *PHR1*and *RBT7*(Chr4L) (Yesland and Fonzi, 2000; Chen *et al.*, 2004) (Fig. 1). For a given chromosome, homozygosity of markers located on both sides of the centromere supports the idea of whole chromosome homozygosity, and is usually taken as an evidence of CL. Even though the definitive proof of CL requires the analysis of addi-

**Table 4.** Summary of DNA copy number from CGH analysis.

Strain	Copy change	Chromosome	Region of aneuploidy (orf19)
TCR2.1.1	None		No aneuploidies detected
GLH1-1	None		No aneuploidies detected
GLH1-2	3×	R	19.6119–19.7279
	3×	1	19.6248–19.4883
	3×	6	19.3474–right end
GLH1-3	3×	4	19.4628–right end
GLH1-4	3×	R	19.4349.6–19.7281
GLH1-5	3×	4	19.3838–right end
GLH1-6 <sup>a</sup>	3×	R	19.3848–right end
	3×	1	19.4451–right end
GLH1-7	None		No aneuploidies detected
GLH3-1	3×	4	19.4676–right end
GLH3-2	3×	4	19.1310–right end
GLH3-3	None		No aneuploidies detected
GLH3-4	3×	R	19.5286–19.449; 19.413.1–right end
GLH3-5	None		No aneuploidies detected
GLH3-6	None		No aneuploidies detected
GLH3-7	3×	4	19.4580–right end
GLH3-8	3×	4	19.4633–right end
GLH3-9	1×	4	Left end–19.4697

a. In ChrR of this strain, there is also partial trisomy between orfs 19.6306 and 19.6640, then it increases slightly to trisomy between orfs 19.6640 and 19.3848.

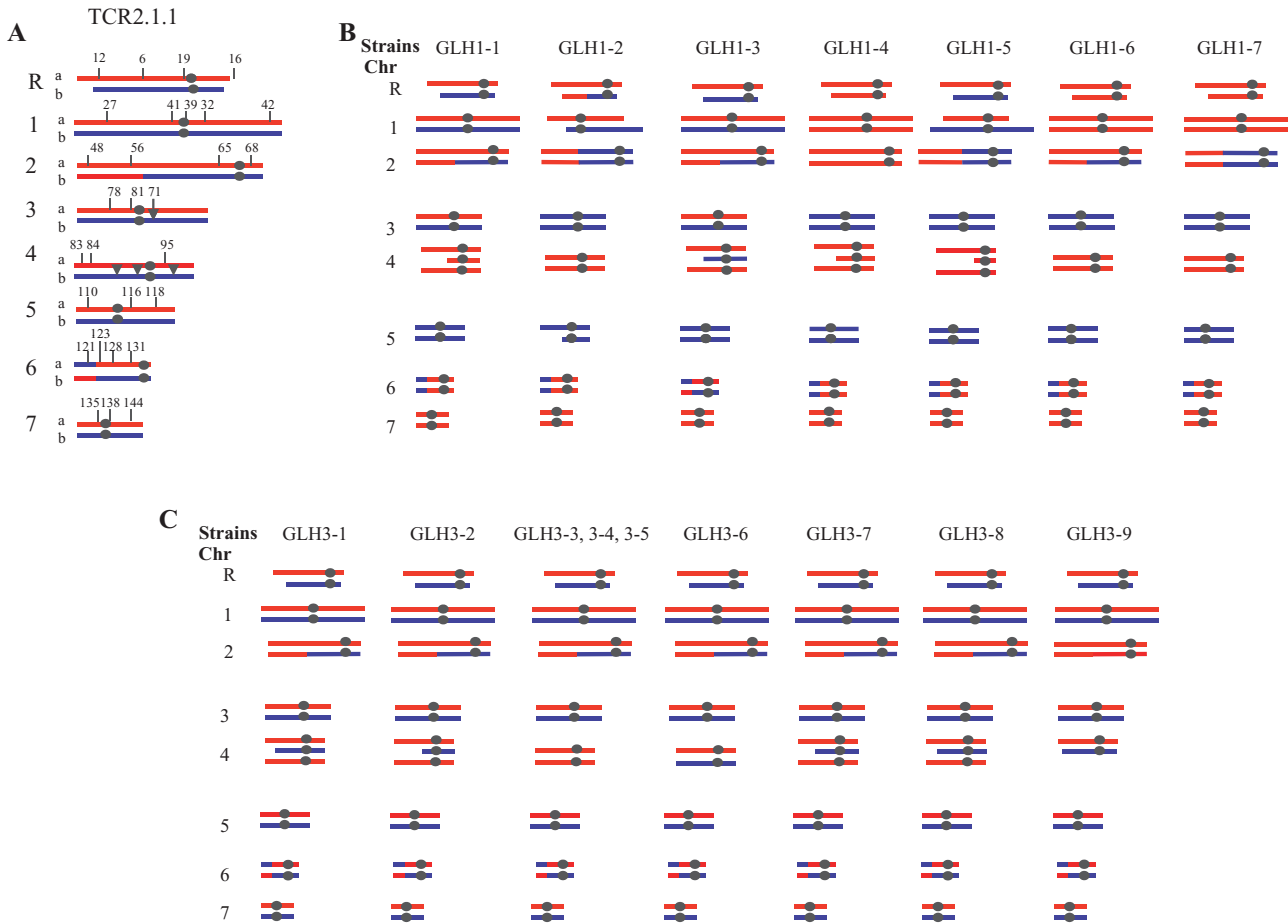
tional markers, this reasoning is especially appropriate for strains lacking Rad52, in which allelic conversion events are unlikely. A RFLP (restriction fragment length polymorphism) analysis (Fig. 1A') indicated that the parental strain TCR2.1.1 was heterozygous at all three loci, whereas all three markers had become homozygous in six of the seven GLH1 strains. In all cases, the same allele was identified. Further analysis of two SNPs of Chr4 (see below) indicated that this allele corresponds to 'homologue a' (Legrand *et al.*, 2008), which therefore is the one that carries the non-functional copy of *HIS4*. In 3 strains (GLH1-1, GLH1-4 and GLH1-5) the Chr4b homologue was lost and three copies of Chr4a were present: two were full length and the other was truncated. In strain GLH1-3 two intact copies of Chr4a (based on CGH results) and one truncated copy of Chr4b was retained, as determined from the heterozygosity of all three RFLP markers (Fig. 1A') and homozygosity of two SNP markers (SNP83, SNP84) located within 300 kb of the left telomere (Fig. 1A, summarized in Table 3 and Fig. 3B). Therefore, for six out of seven (86%) isolates, His auxotrophy was due to loss of both arms of Chr4b; and in three of these six Chr4a was truncated as well. The isolate that remained heterozygous, GLH1-3, became His<sup>-</sup> by truncation of the Chr4b homologue, resulting in loss of the functional *HIS4* allele.

These same types of genetic events, loss of the Chr4b homologue or truncation of Chr4L, were responsible for His auxotrophy in GLH2 through GLH6 isolates as well. Interestingly, GLH4 and GLH5 isolates, which, like GLH1, were derived from small colonies (Table 2), gave rise to

isolates that exhibited high levels of Chr4b loss (100%, 15 of 15, and 86%, 13 of 15 respectively) (Table 3 and Figs S2 and S3). This suggests that slow growth of colonies was associated with CL. Consistent with this idea, GLH strains derived from large colonies were less likely to have undergone CL (20%, 1 of 5, and 33%, 3 of 9, for GLH2 and GLH3 isolates respectively). Finally, 53% (16 of 30) of the GLH6 isolates (Table 2, Expt. 7), which were not size-selected, carried Chr4 SNCs, and most also included SNCs composed of other chromosome fragments; the remaining 14 GLH6 isolates apparently lost the Chr4b homologue (Fig. S4 and Table 3). These results indicate that in GLH isolates LOH occurred by either CL and/or CT, and the frequency of the two types of events fluctuated in different sets of strains, with CL being a more frequent event in small colony isolates. Importantly, additional CTs that were not responsible for generating His auxotrophy, often arose in the isolates.

*Several rad52-ΔΔ His<sup>-</sup> strains simultaneously lost one copy of most, if not all, chromosomes*

To further evaluate the extent of the homozygosity of GLH1 strains, we analysed LOH of the remaining chromosomes using the *C. albicans* SNP map constructed by Forche *et al.* (2004). We selected 24 SNPs distant from each other and on both arms of each chromosome when possible. As shown in Fig. 3A (which is based on Table S2), the parental *rad52-ΔΔ* strain TCR2.1.1 conserved all but two of the 24 heterozygosities previously reported for strain SC5314 (Legrand *et al.*, 2008). Chr6



**Fig. 3.** A. A summary of the SNPs found in the parental *rad52*- $\Delta\Delta$  (TCR2.1.1). SNPs (numbers) and heterozygous markers (present in both red and blue) analysed are shown. Arrowheads indicate *RBT7*, *PHR1* and *CZF1* (see Fig. 1). The arrow indicates the homozygosity of SNP71. B and C. A summary of the SNPs detected His<sup>-</sup> strains of the GLH1 (B) and GLH3 (C) sets. For a detailed description of the SNP markers analysed in (B) and (C), see Table S1. Colours denote homologues 'a' (red) and 'b' (blue) (Legrand *et al.*, 2008). Centromeres are indicated by full black circles. Rearrangements in Chr1 from strains GLH1-2 and GLH1-5 are only based on the SNP marker results and thus, are provisional. Note that Chr2 has undergone a rearrangement in parental strain TCR2.1.1. Therefore, strain GLH1-4 has lost the rearranged homologue 'b', whereas strains GLH1-2, GLH1-5 and GLH1-7 have lost homologue 'a'. For GLH1-1 we have used the PFGE/Southern blot instead of the CGH results. When a pair of chromosomes are homozygous but carry segments of both homologues, the segments ascribed to each homologue are also provisional. *RBT7*, *PHR1* and *CZF1* alleles present in the homozygous strains have been ascribed to homologue 'b'.

exhibited a rearrangement that suggests that a cross-over in the left arm likely caused a reciprocal exchange between homologues or more complex events. Because either alternative includes events that are Rad52-dependent, it is likely that they occurred before the deletion of both *RAD52* alleles (TCR2.1.1), as indicated in Fig. 3A. A large region of Chr2L was homozygous (SNPs 48 and 56), due to a cross-over or a BIR event that occurred in the CAI-4 strain used in our laboratory. Curiously, the same event was also observed in a diploid segregant derived via concerted CL from a tetraploid product of a parasexual cross as well as in a strain recovered from a mouse following experimental infection (Forche *et al.*, 2008; 2009a), suggesting there may be a recombination hot spot in the region between SNPs 65 and 56.

All of the GLH1 isolates underwent some degree of genome-wide homozygosity. Most dramatic are two strains (GLH1-4 and GLH1-7) that became completely homozygous for all the markers tested (Fig. 3B). In contrast, strain GLH1-3 became homozygous for markers on Chr5, Chr7 and the Chr4L distal region but remained heterozygous for most markers on the remaining chromosomes. By combining the SNP marker profiles with the Southern blot hybridization results and using the haplotype map of strain SC5314 as a reference (Legrand *et al.*, 2008), we inferred the chromosome complement of the GLH1 isolates (Fig. 3B and Table S2). Interestingly, homozygosity of the smaller chromosomes was very common: Chr5 and Chr7 were homozygous in all seven GLH1 isolates, and Chr4 and Chr6 were homozygous in six of them. Importantly, each chromosome became



homozygous in at least one strain, indicating that homozygosity of a portion of any chromosome is possible. Interestingly, the homologue that was retained was the same for each chromosome (homologue *a* for Chrs R, 1, 2, 4, 7 and most of Chr6; homologue *b* for Chrs 3 and 5), suggesting that recessive deleterious or lethal alleles may be present on the homologue that was lost.

SNP markers were used to detect LOH and/or aneuploidies in GLH2, GLH3 and GLH4 isolates. GLH2 and GLH3 isolates (Table 3, Fig. 3C) remained generally heterozygous, like the parent strain TCR2.1.1, although two alleles on Chr5 (*MTL* and SNP116) were homozygous in five GLH2 isolates, suggesting that the Chr5 homologue carrying *MTL* $\alpha$  had been lost. GLH4 isolates exhibited a level of homozygosity intermediate between GLH1 and GLH3 isolates (Table 3, Fig. S9). The same homologues were homozygous for Chrs 4, 6 and 7, whereas Chr5 homozygosity was mixed (5 with homologue *a* and 10 with homologue *b*). This is consistent with previous work showing that both alleles of Chr5 can be lost (Magee and Magee, 2000; Lephart *et al.*, 2005; Wu *et al.*, 2005). We conclude that all chromosomes can become at least partially homozygous, that the degree of homozygosity varies in different isolates, and that for most chromosomes, there appears to be a preference to retain a particular homologue.

#### *Chromosomes frequently become unstable in rad52- $\Delta\Delta$ His<sup>-</sup> strains*

GLH1 strains displayed a significant number of chromosomal rearrangements (i.e. loss of the larger homologue of Chr7; a dramatic reduction in the length of ChrR), suggesting that, as also indicated by the CGH results, they had acquired an exceptional level of CIN. This was further confirmed by the karyotype analysis of different culture samples of these strains. The GLH1 isolates were stored in two series of frozen cultures (A and B), each stored from parallel liquid cultures inoculated with the same original colony of each His auxotroph. Three samples derived from frozen culture A (A1, A2 and A3), and one from frozen culture B (B1) (see *Experimental procedures*) were analysed by PFGE and Southern analyses using the *CZF1* probe from Chr4R. Chr4 SNCs seen in the initial samples were generally retained in these cultures (Fig. S6, right panels). In addition, new SNC bands appeared in several strains (arrowheads in Fig. S6; summarized in Table 5), including a new Chr4 SNC that appeared in isolate GLH1-6 (Fig. S6, sample B1, right arrow). Because GLH1-6 samples A1 and A2 also exhibited a diffuse band of the same size, we suggest that the starting isolate likely contained subpopulations of cells with different karyotype changes, and that the new Chr4 SNC became more prevalent in the B1 culture than in the

**Table 5.** Summary of the chromosomal alterations identified in GLH1 isolates.

Trains	A1	A2	A3	B1
TCR2.1.1				
GLH1-1	Chr4L <sup>693</sup>	Chr4L <sup>693</sup>	Chr4L <sup>693</sup>	Chr4L <sup>693</sup>
GLH1-2	Chr1L <sup>?</sup>	Chr1L <sup>?</sup>	Chr1L <sup>?</sup>	Chr1L <sup>?</sup>
	Chr5 <sup>350</sup>	—	—	—
	—	Chr? <sup>Chr2–Chr3</sup>	—	—
		Chr? <sup>Chr4–Chr5</sup>	—	—
		Chr? <sup>–Chr7*</sup>	—	Chr? <sup>&lt;&lt;Chr7*</sup>
GLH1-3	Chr4L <sup>322</sup>	Chr4L <sup>322</sup>	Chr4L <sup>322</sup>	Chr4L <sup>322</sup>
GLH1-4	Chr4L <sup>590</sup>	Chr4L <sup>590</sup>	Chr4L <sup>590</sup>	Chr4L <sup>590</sup>
		ChrR <sup>Chr2</sup>	ChrR <sup>Chr2</sup>	ChrR <sup>Chr2</sup>
		Chr? <sup>–Chr7</sup>	—	—
GLH1-5	Chr4L <sup>1000</sup>	Chr4L <sup>1000</sup>	Chr4L <sup>1000</sup>	Chr4L <sup>1000</sup>
GLH1-6	—	—	—	Chr4L <sup>520</sup>
GLH1-7	—	—	—	—

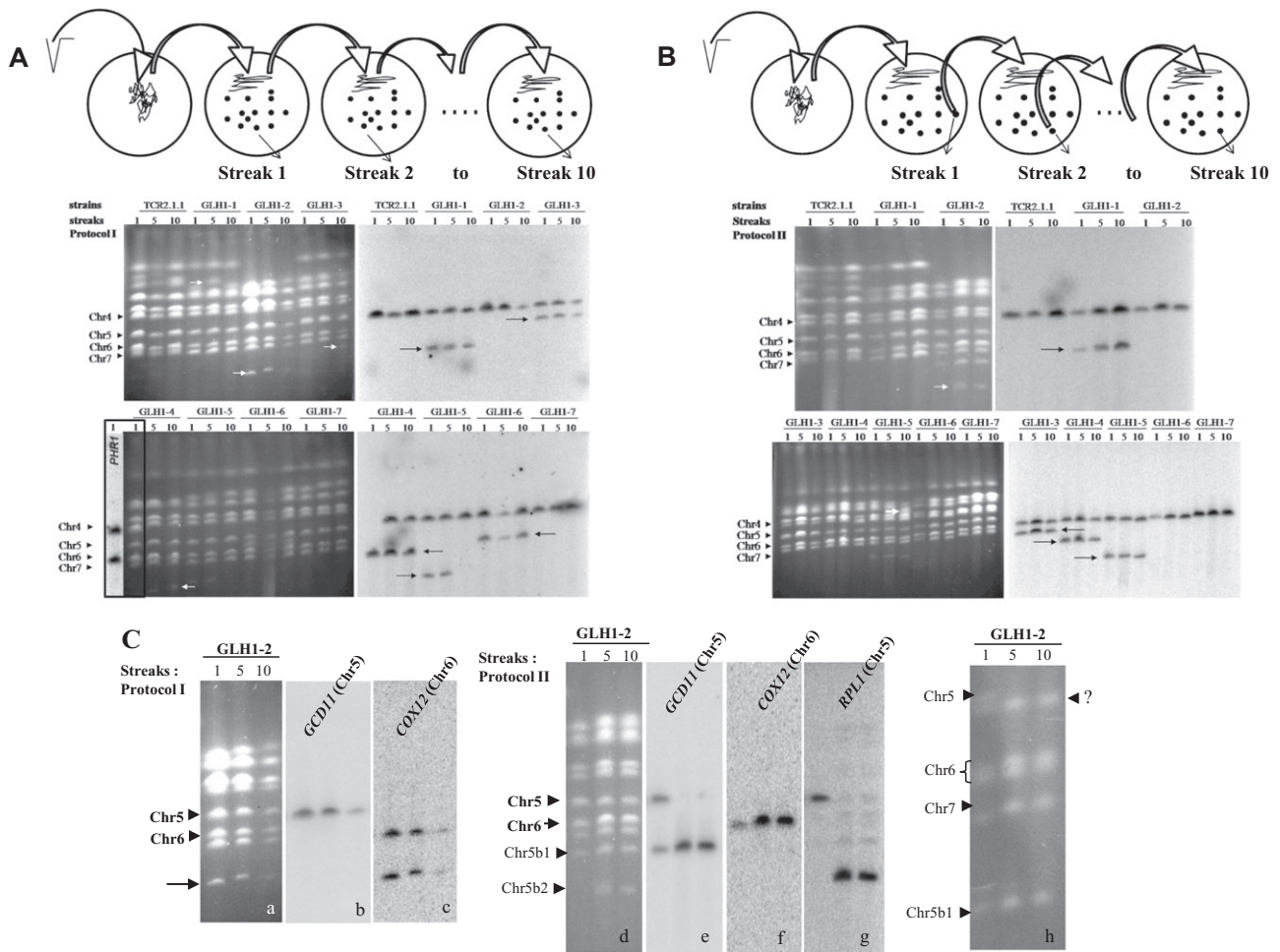
\*The chromosomal band likely corresponds to a fragment of Chr6 (see Fig. 4B).

Column A1 summarizes karyotype analysis shown in Fig. 1A. Columns A2, A3 and B1 are different samples of the GLH strains from the first set and correspond to the analysis shown in Fig. S6. For additional detail, see the text. Superscripts indicate the approximate size of the deletions (kb).

A1 and A2 cultures. Despite some instability in the cultures, isolates often retained distinguishing karyotype features (e.g. GLH1-2 retained a truncated Chr1).

To follow the stability of GLH1 strains over time we serially streaked each strain 10 times using two protocols. Protocol I was designed to maintain the original population diversity whereas protocol II followed cumulative changes in individual isolates (see *Experimental procedures*). We then analysed the strains on karyotype gels. Regardless of the protocol used, the Chr4 SNCs were usually retained, and new alterations in karyotypes continued to be detected (Fig. 4A and B; summarized in Table 6, where prominent changes are highlighted). It should be noted that: (i) the three colonies from GLH1-6 (protocol I) had the Chr4L<sup>520</sup> fragment (Fig. 4A, lower left and lower right, arrows) first seen in sample B (see above, Fig. S6), suggesting that the subpopulation represented by these three clones was initially present in both series, A and B, (ii) GLH1-7 did not exhibit obvious karyotype changes, and (iii) fewer changes were detected during passages following protocol II as compared with protocol I.

CIN was most extreme in GLH1-2, the most unstable strain (Fig. 4C). The original version of Chr5 (Chr5L<sup>350</sup>, Fig. 1A), which had the faster electrophoretic mobility, was not detected in the new clones from protocol I (Fig. 4C, b); instead, a new SNC migrating far below (Fig. 4C, a, arrows), identified as Chr6 truncated by ~400 kb (Chr6L<sup>~400</sup>; Fig. 4C, c) that was similar to the SNC in sample B1 (Fig. S5), was detected. This result is consistent with CGH results that detected aneuploidies of



**Fig. 4.** A and B. Electrochromosomes of the GLH1 strains (series A) following passages according to protocols I (A) (1, 5, 10) and II (B) (1, 5, 10) and Southern blots (right panels) using the *CZF1* probe, which is located on the right arm of Chr4 (see Fig. 1). The membranes were also hybridized to *PHR1*, *VMA6*, *VID21* and *SNP19* probes (not shown). A drawing illustrating the difference between protocols I and II is shown above the corresponding karyotype gels (for details see *Experimental procedures*). Note that in protocol II the same colony was used for inoculation as well as for karyotype analysis. White arrows on the karyotype gels indicated SCN that were not detected in Southern blots. C. Karyotypes of isolate GLH1-2 in the successive passages as in (A) using protocols I (left) and II (right). Membranes were hybridized to *COX12* (Chr6L), *GCD11* (Chr5R) and *RPL1* (adjacent to Chr5L telomere) probes.

Chr6 in this strain. The original Chr5L<sup>350</sup>, but not Chr6L<sup>~400</sup>, was present in the three clones from protocol II (Fig. 4C, d–f). In addition, a smaller SNC, identified as a truncated Chr5R (e.g. labelled with *RPL1* – Fig. 4C, g – but not with *GCD11* – Fig. 4C, e), appeared in clones from passages 5 and 10 (Fig. 4C, d; arrowheads). Since neither of these Chr5 probes labelled an intact Chr5 in these two clones, it is likely that before passage 5, the remaining full Chr5 homologue underwent a truncation that covered most of Chr5R. Surprisingly, a Chr5-sized band was detected in the EtBr stained gels (Fig. 4C, d). PFGE using conditions that separate the smaller chromosomes detected two Chr5-sized bands in sample 1: one corresponded to Chr5 and the other was slightly smaller (Fig. 4C, h). The latter is likely derived from one of the larger chromosomes.

Karyotypes continued to change throughout the passages for the GLH2 through GLH5 isolates as well; SNC bands, likely derived from breakage of the larger chromosomes, were detected in the EtBr stained gels (Figs S2, S3, S7 and S8 – white arrowheads; summarized in Table 6). Levels of karyotype change varied among the starting strains and individual isolates, consistent with the idea that CIN arises stochastically. For example, Chr4 SNCs were relatively stable among GLH3, GLH4 and GLH5 isolates and were highly unstable in GLH2 isolates (Table 6). The size of ChrR frequently varied during the passages, presumably due to ribosomal DNA rearrangements (Iwaguchi *et al.*, 1992; Rustchenko *et al.*, 1993) that occurred despite the absence of Rad52. Consistent with this, rDNA size alterations were reported for a S.

**Table 6.** Summary of truncations identified in the karyotypes of GLH strains throughout the passages.

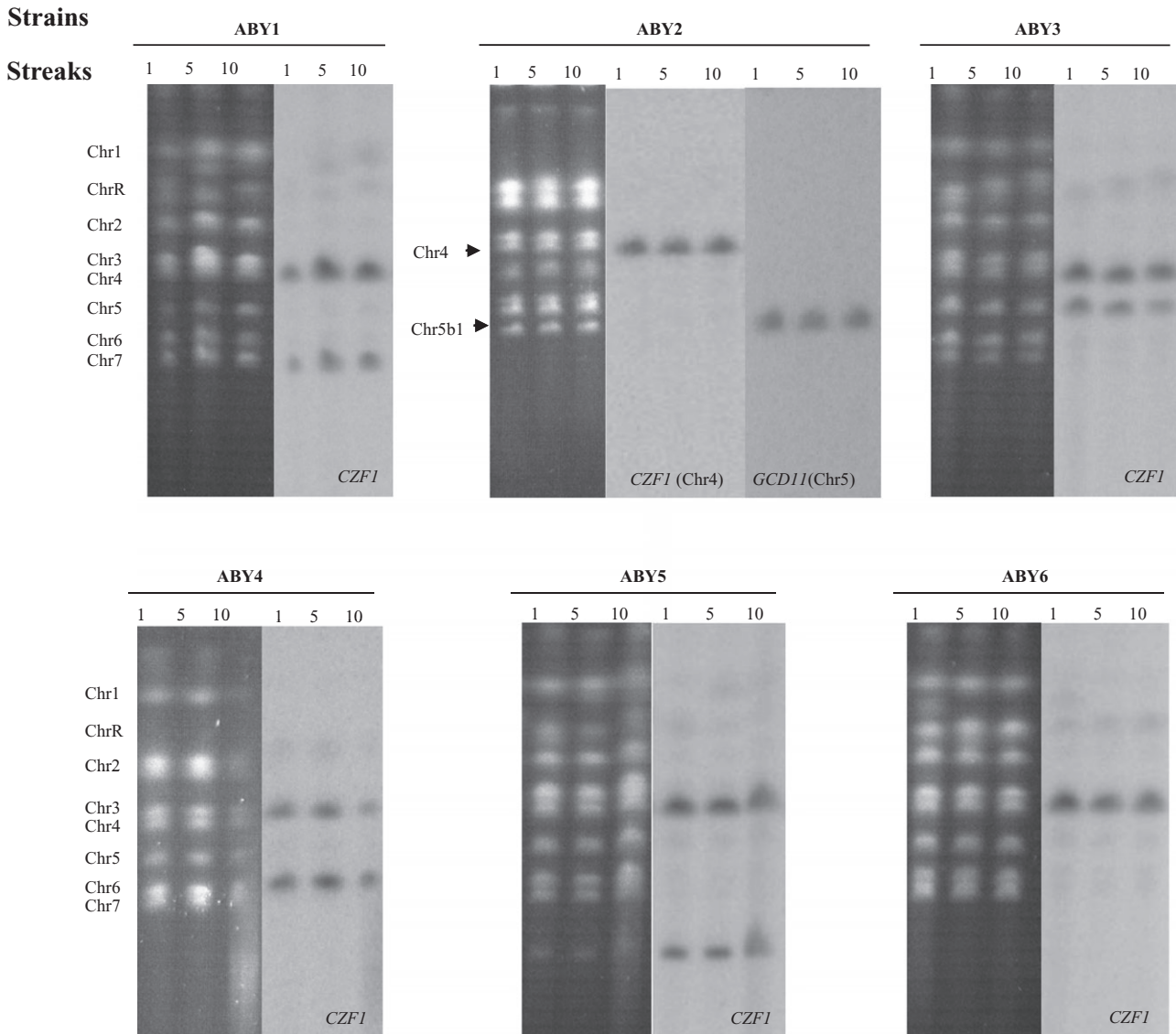
Strains	Changes in passages					
	Protocol I (streaks)			Protocol II (streaks)		
	1	5	10	1	5	10
TCR2.1.1	None	None	None	None	None	None
GLH1-1	Chr4L <sup>693</sup>	ChrR*	Chr4L <sup>693</sup>	Chr4L <sup>693</sup>	Chr4L <sup>693</sup>	Chr4L <sup>693</sup>
GLH1-2	Chr1L <sup>?</sup>	Chr1L <sup>?</sup>	Chr1L <sup>?</sup>	Chr1L <sup>?</sup>	Chr1L <sup>?</sup>	Chr1L <sup>?</sup>
	–	–	–	Chr5L <sup>350</sup>	Chr5L <sup>350</sup>	Chr5L <sup>350</sup>
	–	–	–	–	–	–
GLH1-3	Chr6 <sup>–400**</sup>	Chr6 <sup>–400**</sup>	Chr6 <sup>–400**</sup>	–	Chr5 <sup>–600</sup>	Chr5 <sup>–600</sup>
	Chr4L <sup>322</sup>	Chr4L <sup>322</sup>	Chr4L <sup>322</sup>	Chr4L <sup>322</sup>	Chr4L <sup>322</sup>	Chr4L <sup>322</sup>
	–	–	Chr(?) <sup>&lt;Chr7</sup>	–	–	–
GLH1-4	Chr4L <sup>590†</sup>	Chr4L <sup>590</sup>	Chr4L <sup>590</sup>	Chr4L <sup>590</sup>	Chr4L <sup>590</sup>	Chr4L <sup>590</sup>
	Chr4R <sup>100</sup>	–	–	–	–	–
GLH1-5	Chr4L <sup>1000</sup>	Chr4L <sup>1000</sup>	–	Chr4L <sup>1000</sup>	Chr4L <sup>1000</sup>	Chr4L <sup>1000</sup>
	–	–	–	–	–	Chr(?) <sup>Chr2–Chr3</sup>
GLH1-6	Chr4L <sup>520</sup>	Chr4L <sup>520</sup>	Chr4L <sup>520</sup>	–	–	–
GLH1-7	–	–	–	–	–	–
GLH2-1	Chr4L <sup>350</sup>	–	–	Chr4L <sup>350</sup>	–	–
	–	Chr(?) <sup>Chr4–Chr5</sup>	Chr(?) <sup>Chr4–Chr5</sup>	–	–	–
GLH2-2	Chr4L <sup>200</sup>	–	–	Chr4L <sup>350</sup>	Chr4L <sup>350</sup>	Chr4L <sup>350</sup>
	–	–	Chr(?) <sup>&lt;&lt;Chr7</sup>	–	–	–
	–	Chr(?) <sup>&lt;&lt;Chr7</sup>	Chr(?) <sup>&lt;&lt;Chr7</sup>	–	–	–
GLH2-3	–	Chr(?) <sup>Chr4–Chr5</sup>	–	–	–	–
GLH2-4	Chr4L <sup>300</sup>	–	–	Chr4L <sup>300</sup>	Chr4L <sup>300</sup>	Chr4L <sup>300</sup>
GLH2-5	Chr4L <sup>210</sup>	Chr4L <sup>210</sup>	–	Chr4L <sup>210</sup>	Chr4L <sup>210</sup>	Chr4L <sup>210</sup>
GLH3-1	Chr4L <sup>235</sup>	Chr4L <sup>235</sup>	Chr4L <sup>235</sup>	–	–	–
GLH3-2	Chr4L <sup>786</sup>	Chr4L <sup>786</sup>	Chr4L <sup>786</sup>	–	–	–
GLH3-3	–	–	–	–	–	–
GLH3-4	–	–	–	–	–	–
GLH3-5	–	–	–	–	–	–
GLH3-6	–	–	–	–	–	–
GLH3-7	Chr4L <sup>420</sup>	Chr4L <sup>420</sup>	Chr4L <sup>420</sup>	–	–	–
GLH3-8	Chr4L <sup>314</sup>	Chr4L <sup>314</sup>	Chr4L <sup>314</sup>	–	–	–
GLH3-9	Chr4L <sup>175</sup>	Chr4L <sup>175</sup>	Chr4L <sup>175</sup>	–	–	–
GLH4-1	Chr(?) <sup>&lt;Chr7</sup>	Chr(?) <sup>&lt;Chr7</sup>	Chr(?) <sup>&lt;Chr7</sup>	–	–	–
GLH4-2	Chr(?) <sup>Chr4–Chr5</sup>	Chr(?) <sup>Chr4–Chr5</sup>	Chr(?) <sup>Chr4–Chr5</sup>	–	–	–
GLH4-3	–	–	–	–	–	–
GLH4-4	Chr(?) <sup>Chr4–Chr5</sup>	–	Chr(?) <sup>Chr4–Chr5</sup>	–	–	–
GLH4-5	Chr1L <sup>?</sup>	Chr1L <sup>?</sup>	Chr1L <sup>?</sup>	–	–	–
	–	–	Chr4La <sup>175</sup>	–	–	–
	–	–	Chr4Lb <sup>786</sup>	–	–	–
	Chr(?) <sup>&lt;&lt;Chr7</sup>	–	Chr(?) <sup>&lt;&lt;Chr7</sup>	–	–	–
GLH4-6	Chr(?) <sup>Chr2–Chr3</sup>	Chr(?) <sup>Chr2–Chr3</sup>	Chr(?) <sup>Chr2–Chr3</sup>	–	–	–
GLH4-7	–	–	–	–	–	–
GLH4-8	–	–	–	–	–	–
GLH4-9	–	–	–	–	–	–
GLH4-10	–	Chr(?) <sup>Chr4–Chr5</sup>	Chr(?) <sup>Chr4–Chr5</sup>	–	–	–
GLH4-11	–	–	–	–	–	–
GLH4-12	Chr1L <sup>?</sup>	Chr1L <sup>?</sup>	Chr1L <sup>?</sup>	–	–	–
GLH4-13	–	–	–	–	–	–
GLH4-14	–	–	Chr(?) <sup>Chr5–Chr6</sup>	–	–	–
GLH4-15	–	–	–	–	–	–
GLH5-1	Chr(?) <sup>&lt;&lt;Chr7</sup>	–	–	–	–	–
GLH5-2	–	–	–	–	–	–
GLH5-3	–	–	Chr(?) <sup>Chr2–Chr3</sup>	–	–	–
GLH5-4	–	Chr(?) <sup>Chr5–Chr6</sup>	–	–	–	–
GLH5-5	Chr4L <sup>500</sup>	Chr4L <sup>500</sup>	Chr4L <sup>500</sup>	–	–	–
GLH5-6	–	Chr(?) <sup>Chr4–Chr5</sup>	–	–	–	–
GLH5-7	Chr(?) <sup>&lt;&lt;Chr7</sup>	–	–	–	–	–
GLH5-8	–	Chr(?) <sup>Chr4–Chr5</sup>	Chr(?) <sup>Chr4–Chr5</sup>	–	–	–
GLH5-9	–	–	–	–	–	–
GLH5-10	Chr4L <sup>500</sup>	Chr4L <sup>500</sup>	Chr4L <sup>630</sup>	–	–	–
GLH5-11	–	–	–	–	–	–
GLH5-12	–	–	–	–	–	–
GLH5-13	–	–	–	–	–	–
GLH5-14	–	–	–	–	–	–

\*Increase in size.

\*\*The size of this band varied in the passages.

†Based on hybridization of the new band to *PHR1* and *VAM6* probes, but not to *CZF1* and *VID21* (Fig. 4A, bottom left panel, left lane).

Superscripts indicate the approximate size of the deletions observed (kb), according to the CGH results (Table 4) when possible. Because the size of ChrR is not fixed in wild type, no references to this chromosome are made except for strains GLH1-1, passage 6 of the first protocol, and GLH1-5, passage 10 of the second protocol where a sudden increase in size and an additional truncation, respectively, of ChrR were observed.



**Fig. 5.** Karyotypes of the *RAD52* reintegrants (ABY1–ABY7) from GLH1 strains after successive streaks and Southern blot using the *CZF1* (Chr4) and/or *GCD1* (Chr5) probes.

*cerevisiae rad52* wine strain (Carro *et al.*, 2003). We conclude that GLH isolates of *C. albicans* exhibit continuing karyotype instability.

#### *Reintegration of RAD52 restores the chromosomal stability of unstable strains*

To investigate whether the chromosomal instability was a consequence of the absence of Rad52, we reintegrated one copy of *RAD52* into the GLH strains (GLH1-1 through GLH1-6) and randomly selected one reintegrant from each. As shown previously, *RAD52* can be reintegrated into *rad52* strains, presumably because, once inside

the cell, exogenous *RAD52* is expressed and the protein synthesized is sufficient to allow integration by HR (Ciudad *et al.*, 2004). All of the reintegrants (ABY1 to ABY7) recovered colony and cell morphology of the wild type (CAF2) (not shown). We then passaged these reintegrants using protocol I and analysed the karyotypes of the resulting isolates (Fig. 5). Importantly, the reintegrant strains ABY1 through ABY6 retained the extra-bands present in the parental strains. Importantly, the karyotypes did not change with the passages, except for the general tendency for both homologues of ChrR to increase in size. This suggests that a Rad52-dependent pathway is responsible for karyotype stability.

## Discussion

We studied the effect of *RAD52* on genome stability in *C. albicans* by exploiting the heterozygosity of *HIS4* in laboratory strains derived from SC5314 (Gómez-Raja *et al.*, 2008) by measuring the rate of appearance of spontaneous His auxotrophs in *rad52-ΔΔ* isolates. Overall, the *rad52-ΔΔ* mutants produced more than 100-fold more His auxotrophs than the wild-type *RAD52/RAD52* strains. Furthermore, the LOH rate at the *HIS4* locus was ~10-fold higher for small colonies than for large colonies, and small colony size is a reflection of a slow growth rate. We propose that progenitors of small colonies acquired aneuploidies that caused enhanced genome instability and therefore were more prone to generate His auxotrophs or other types of mutants, based on previous observations that small colonies isolated from laboratory strains often carry monosomies or other aneuploidies (Janbon *et al.*, 1998; Rustchenko, 2007). Similarly, the instability of the colony size phenotype upon restreaking suggests that cells from small colonies regain a 'wild-type' growth rate, presumably by regaining a more balanced chromosome complement. In contrast, small smooth colonies that remain stably small likely acquired irreversible damage events such as point mutation or loss of critical alleles.

In a selective assay that permitted the analysis of a very large number of colonies, the *in vitro* LOH rate at the heterozygous *GAL1/gal1* locus was  $6 \times 10^{-6}$  recombination events per cell per generation (Forche *et al.*, 2009a). Because His auxotrophy is determined by screening rather than by counter-selection, it was not possible to analyse the large number of colonies necessary to detect the low frequency of events that occurs in the wild-type strain. Nonetheless, it is clear that the frequency of spontaneous events became high enough to be detectable in *rad52-ΔΔ* strains. Furthermore, our phenotypic screen did not utilize selective reagents such as 5-FOA (Chen and Kolodner, 1999; Yoshida *et al.*, 2003), which can lead to additional genetic changes (Wellington and Rustchenko, 2005) that may be difficult to distinguish from those caused exclusively by the absence of *RAD52*. Interestingly, 61 *S. cerevisiae* homozygous diploid deletion strains, including strains lacking *RAD50*, *RAD51* and *RAD54*, but no mutants lacking *RAD52*, were identified in a genetic screen for increased LOH rate (twofold increase compared with wild type) (Andersen *et al.*, 2008).

### *Chr4b* loss or truncation caused most His auxotrophy in *rad52-ΔΔ* cells

With one possible exception, LOH leading to His auxotrophy in the *rad52-ΔΔ* strains always arose either by CL of the *Chr4b* homologue or by truncation of the left arm of the *Chr4b* homologue, including the functional *HIS4* allele. In diploid *S. cerevisiae* *rad52* null homozygous

strains, CL has been described (Mortimer *et al.*, 1981; Haber and Hearn, 1985; Yoshida *et al.*, 2003), and the CL frequency is chromosome-specific (Santos-Rosa and Aguilera, 1994; Hiraoka *et al.*, 2000) and is rarely followed by chromosome reduplication (CRD) (Yoshida *et al.*, 2003). However, in this study of *C. albicans rad52-ΔΔ* cells, CL was usually followed by CRD and is reminiscent of the CL followed by CRD detected for Chr5 in wild-type *C. albicans* (Janbon *et al.*, 1998; Wu *et al.*, 2005). Here, we extend the analysis using more comprehensive CGH analysis. One possibility is that the signal that triggers CRD is a reduction in the fitness of the strain, which in turn would depend on both the nature of the missing genes (i.e. essential, non-essential, haploinsufficient, etc.) and concomitant alterations in other chromosomes.

Loss of one homologue was not limited to Chr4; it was detected on other chromosomes. For example, loss of one homologue of Chr5 generates *MTL* homozygous strains, which are found in 3–7% of clinical isolates (Lockhart *et al.*, 2002; Legrand *et al.*, 2004; Wu *et al.*, 2005). In GLH strains the frequency of CL for Chr5 was much higher than this (64%, 51 out of 80) suggesting that Chr5 stability may be particularly affected by the stress conditions imposed by loss or truncation of Chr4b, at least in the absence of Rad52. Consistent with this, 20 randomly selected TCR2.2.1 (*rad52-ΔΔ*) colonies (with apparently intact Chr4 according to PGFE) were heterozygous for *MTL*. In contrast, copy number variation or truncation of Chr5 does not seem to influence CL or CT of Chr4, since both homologues of Chr4 were maintained in Rad52<sup>+</sup>Sou<sup>+</sup> and Rad52<sup>-</sup>Sou<sup>+</sup> strains that lost one copy of Chr5 (Andaluz *et al.*, 2007). Chr5 truncation was relatively rare among the His auxotrophs, since this event was only seen in GLH1-2 and GLH6-17 isolates.

Although speculative, an attractive explanation for the high levels of homozygosity observed in some GLH isolates is that during mitosis chromosomes rather than chromatids separate as in the first meiotic division. It has been recently reported that Rad51 associates with the centromeres of fission yeast (Nakamura *et al.*, 2008). Since Rad52 and Rad51 form supramolecular complexes, it is possible that, in the absence of Rad52, centromeric chromatin assembly is defective, resulting in frequent chromosome non-disjunction events.

The frequent aneuploidies and chromosome breaks observed in GLH isolates are likely due to additional defects due to absence of Rad52. In *S. cerevisiae*, chromosome fragmentation induces the DNA-damage checkpoint, which arrests cells prior to anaphase, providing time for DNA repair while chromatids remain cohered so that checkpoint functions can act synergistically with the HR (Klein, 2001; Myung *et al.*, 2001; Myung and Kolodner, 2002; 2003). Interestingly, in wild-type cells at metaphase, the two halves of the broken chromosome are held

together by components of the recombination machinery, including the Rad50–Mre11–Xrs2 complex and Rad52, which bind and tether DNA ends. Elimination of these components promotes the loss of the intrachromosomal association between the centric and acentric fragments upon entry into metaphase, but maintains the interchromosomal association that tethers broken sister chromatids (cohesins). This situation results in missegregation of both the acentric (CT) and, to a lesser extent, the centric fragments (non-disjunction, CL) (Kaye *et al.*, 2004; Lobachev *et al.*, 2004). We propose that similar mechanisms operate in *C. albicans rad52-ΔΔ* mutants.

#### *CT occurs at a high rate in C. albicans rad52-ΔΔ cells*

Interestingly, spontaneous CT occurred at a very high frequency in *C. albicans rad52-ΔΔ* cells (40% of the His auxotrophs analysed), while CT was not reported in *S. cerevisiae rad52-ΔΔ* diploid strains (Yoshida *et al.*, 2003). Furthermore, while CT contributed to 45% of GCRs in a haploid wild-type *S. cerevisiae* strain (Chen and Kolodner, 1999; Motegi and Myung, 2007), in a *rad52* derivative of the strain, the frequency of GCR increased, but translocations using microhomology were the most frequent events and telomere additions were detected only in the absence of Pif1, an inhibitor of telomerase, or in the absence of Lig4, the ligase involved in non-homologous end-joining (NHEJ) (Schultz and Zakian, 1994; Myung *et al.*, 2001; Pennaneach *et al.*, 2006). Why is telomere addition to truncated chromosomes much more frequent in *C. albicans rad52-ΔΔ* than in *S. cerevisiae rad52* strains, while translocations involving a non-homologous chromosome are frequent in *S. cerevisiae* but not detected in *C. albicans*? One possibility is that the DNA damage checkpoint in *C. albicans rad52-ΔΔ* cells (Andaluz *et al.*, 2006) facilitates telomere addition; alternatively, Pif1 inhibition of telomerase or the Lig4-dependent NHEJ pathway could be less effective or absent in *C. albicans*. In *S. cerevisiae*, the NHEJ pathway is active in haploids but not in diploids (Daley *et al.*, 2005). In *C. albicans*, an obligate diploid, the importance of the NHEJ pathway is less well understood (Andaluz *et al.*, 2001). It is also possible that translocations in *C. albicans* require Rad52 since they usually involve regions of extensive homology such as the major repeat sequence (e.g. MRS) (Chu *et al.*, 1993) or other repeats (Selmecki *et al.*, 2006).

It should be emphasized that Chr4b loss or truncation was frequently accompanied by simultaneous loss and/or truncations of a homologue of other chromosomes, which were unrelated to the scored mutation. Chr4 seems to be particularly prone to undergo truncation events. It is clear that some of these truncations arose because of selection in our screen; however, others truncations arose in strains

that were already His<sup>-</sup> (GLH1-1, GLH1-4, GLH1-5 and GLH4-5), suggesting an abundance of fragile sites in Chr4 (Arlt *et al.*, 2006), which might arise if genes on Chr4 were more actively transcribed genes (Aguilera, 2002). This situation has not been described in *S. cerevisiae* and may reflect the higher tolerance of *C. albicans* to aneuploidy (Bouchonville *et al.*, 2009). In support of this idea, *C. albicans* exhibits a higher frequency of multiple aneuploid chromosomes and chromosomal rearrangements in the presence of fluconazole as compared with an *S. cerevisiae* diploid strain (Anderson *et al.*, 2004; Selmecki *et al.*, 2006, 2009).

#### *The frequency of CIN varies among the rad52-ΔΔ His<sup>-</sup> strains*

Variation in both the level of CIN and the nature of the associated GCR among different GLH strains supports the mutator hypothesis initially advanced to explain the appearance of cancer cells in higher eukaryotes. These cells must acquire a mutator mutation that may facilitate more mutations in order to account for a high rate of accumulation of genetic changes (Kolodner, 1996; Kolodner *et al.*, 2002; Motegi and Myung, 2007). While the CIN phenotype of *rad52-ΔΔ* cells contributes to additional mutations (a process that would be facilitated by the high level of polymorphisms present in the genome of *C. albicans*) and/or aneuploidies (which are prone to more non-disjunction; Bouchonville *et al.*, 2009) that could exacerbate genetic instability, the restoration of chromosome stability in the *RAD52* reintegrants indicates that instability is likely a direct effect of the absence of Rad52. Interestingly, when analysed using protocol II karyotypes of GLH1 and GLH2 isolates appeared to be more stable than when using protocol I. This suggests that (i) variants arise at a measurable frequency within the population, and (ii) if the mutation confers a higher growth rate, it may out-compete the original strain upon passaging. Selection can occur along the passages of the cell mass (protocol I) but is prevented when individual colonies are passaged (protocol II). In summary, our results suggest that the mutator phenotype of *rad52-ΔΔ* cells facilitated the acquisition of a CIN phenotype which always manifested as CL and/or CT. Given its obligate diploidy and tolerance to aneuploidy, *C. albicans* appears to be a better model than *S. cerevisiae* for studying CIN processes that occur in mammalian mutator strains.

Interestingly, the break points detected here have not been observed previously in either clinical or laboratory strains of *C. albicans* (although similar GCRs have been reported in clinical isolates of *Candida glabrata* – Poláková *et al.*, 2009), even when they were subjected to evolution in the presence of fluconazole (Selmecki *et al.*, 2010). Conversely, *C. albicans* strains adapted to grow in

the presence of fluconazole (Flu<sup>R</sup>) exhibited a recurrent break point on Chr5 that was not observed here. Since *rad52-ΔΔ* strains are more sensitive to fluconazole than wild-type cells (Legrand *et al.*, 2007; our unpublished results), CaRad52 may be a useful target for the design of antifungal compounds.

Finally, this study identified strains that appear to be homozygous for markers across all eight chromosomes. This suggests that there is no particular region of the genome that must be heterozygous for the survival of the organism. However, it is interesting to note that, for most of chromosomes, homozygosity always involved loss of the same homologue and retention of the other. Indeed this could explain the discrepancy between our work and that of Tagaki *et al.* (2008), who reported that *C. albicans rad52-ΔΔ* strains were defective in both spontaneous and UV-induced LOH based upon homozygosity of *ade2::URA3/ADE2*. Perhaps the *ADE2* allele disrupted by *URA3* could not be lost because it is in the Chr3 homologue that cannot be lost. Importantly, the completely homozygous isolates obtained here will be useful for studies of the general importance of heterozygosity in *C. albicans*.

## Experimental procedures

### Strains and media

The *C. albicans* strains used in this study are indicated in Table 1. *C. albicans* cells were grown routinely at 28°C in YPD (1% yeast extract, 2% Bacto Peptone, 2% glucose). For the isolation of His auxotrophs, cells from each strain were plated on YPD medium at a density  $\leq$  200 cells per plate. At the indicated times or colony size, colonies were replica-plated on SC without histidine and incubated for 24 h (CAI-4) or 48 h (*rad52-ΔΔ*). Each His auxotroph isolate was re-isolated in YPD and checked for His auxotrophy. One of the new colonies derived from each auxotroph was used to inoculate one flask containing liquid YPD. The culture was harvested, divided in small lots and kept at -80°C. For His auxotrophs from set 1, each colony was used to inoculate two parallel flasks. Each culture was harvested independently (series A and B), and processed as above.

Reintegration of *RAD52* into the GLH isolates was performed essentially as described before (Ciudad *et al.*, 2004). A large fraction of *rad52-ΔΔ* colonies have a spiny appearance and contain filamentous cells whereas those of the reintegrants are smooth and contain regular yeast cells (Andaluz *et al.*, 2007). Randomly selected smooth colonies were analysed for the correct reintegration of *RAD52* into its own locus using PCR and Southern blot (ABY strains) (Ciudad *et al.*, 2004).

### Fluctuation test

Several fluctuation tests were performed to calculate the rate of the production of His auxotrophs in the *rad52-ΔΔ* strain (Table 2). For this purpose, colonies isolated on YPD from a

-80°C culture, selected by size and/or filamentous/smooth morphology, were excised from the plate and resuspended in sterile water. Appropriate dilutions were then plated on YPD medium at a density  $\leq$  200 cells per plate. At the indicated times or colony size (Table 2), colonies were replica-plated on SC without histidine and incubated for 48 h (*rad52-ΔΔ*) to identify and score His auxotrophs, which were further verified. When possible (i.e. when all or near all the cultures had mutants), we used the method of Lea and Coulson (1949), as described by Reenan and Kolodner (1992), to determine the rate of appearance of His auxotrophs. When a large fraction of cultures had no mutants, the mutation rate was estimated by an alternative method (Lea and Coulson, 1949; Spell and Jinks-Robertson, 2004).

### DNA extraction and analysis

Extraction of genomic DNA, Southern blot hybridization, chromosomal preparations and electrophoretic separations of chromosomes (PFGE), and PCR analysis of the *MTL* loci were performed as described (Andaluz *et al.*, 2007; Gómez-Raja *et al.*, 2008). For Southern analysis, probes consisted of markers of Chr5 (*CDC1*, *GCD11*), Chr4 (*HIS5* and *YJR61/MNN42*), Chr1 (*ACT1*), Chr6 (*COX12* and *orf19.5525*) and Chr7 (*ARG4*) kindly provided by BB Magee (Chu *et al.*, 1993), and PCR products of markers of Chr4 (*HIS4*, *PHR1*, *VMA6*, and SNP markers SNP83 and SNP84), Chr5 (*RPL1*, *VID21*, SNP110 and SNP118) and ChrR (SNP19), synthesized using appropriate oligonucleotides. These primers can be provided upon request. The Quantity ONE-1D Software (Bio-Rad) was used to determine the intensity bands in Southern blots. The presence of one or both homologues of each chromosome was investigated by analysing previously characterized single-nucleotide polymorphisms (SNP). For these experiments, the regions containing the polymorphisms were amplified using the appropriate oligonucleotides and the PCR product sequenced. Primer sequences can be obtained upon request from Anja Forche (<http://albicansmap.ahc.umn.edu/html/snp.html>). Analysis of the indicated SNP-RFLP markers was carried out as described (Forche *et al.*, 2009b). Other polymorphic markers were analysed as described (Gómez-Raja *et al.*, 2008).

### Comparative genomic hybridization (CGH)

Comparative genomic hybridization analysis was performed as described previously (Selmecki *et al.*, 2005). All strains were compared with the same reference control strain, SC5314. Genomic DNA from the experimental strain was labelled with Cy3-dUTP and DNA from the reference control strain was labelled with Cy5-dUTP (Roche). Arrays were printed in-house, and one array per strain was analysed. Chromosome\_map, written in Matlab (Selmecki *et al.*, 2005), was used to plot all microarray data points as a function of gene position along the eight *C. albicans* chromosomes. All CGH data (mean fluorescence ratios) were plotted on a log<sub>2</sub> scale and clipped to the range corresponding to one to four gene copies. Break points were predicted from an increase or decrease in gene copy number and were determined using a running average over 2.3 ORFs per chromosome.

### Analysis of karyotype instability in *His<sup>-</sup>* strains

To address this issue, we first looked for possible variations in two series of cultures derived from the GLH1 isolates kept at  $-80^{\circ}\text{C}$  (series A and B; see *Strains and media*). Three samples were taken from series A (A1, A2 and A3), and one from series B (B1). In each case, electrokaryotypes were obtained from a randomly selected colony from the first plate and then subjected to Southern blot hybridization with a probe of Chr4 (*CZF1*). In a second set of experiments, we analysed the karyotypes shown by the descendants of TCR2.1.1 and the indicated GLH isolates according to two theoretically complementary protocols (illustrated in Fig. 4). Protocol I was designed to determine random non-cumulative changes in the population. For this purpose, cellular mass from a culture kept at  $-80^{\circ}\text{C}$  was streaked onto a YPD plate. Cell mass taken from the region of confluent growth was successively passaged by streaking it sequentially, at 3-day intervals, over 10 passages. Protocol II was designed to detect cumulative changes in individuals within the population. A new YPD plate from a frozen culture stock from series A was prepared as above, but single colonies, rather than cell mass were used to inoculate each successive passage. Single colonies from the successive passages of each protocol were then grown in liquid YPD for the preparation of frozen culture stocks. Liquid cultures from passages 1, 5 and 10 of each protocol were also processed for DNA and karyotype analysis.

### Acknowledgements

This study was supported by Grant SAF2007-60810 from Ministerio de Educación y Ciencia to G.L., a Public Health Service grant, NIH-NIAID 1 R01 AI51949, to R.C. and G.L., and NIH-NIAID 1 R01 AI 01062427 to J.B. We thank Tahía Benítez for critical reading of the manuscript, Bebe Magee for providing the markers *HIS5*, *YJR61/MNN42*, *GCD11* and *CDC1*, and Anja Forche for providing the SNP marker information used in this study. We also thank Belén Hermosa, partially supported by Grant 3PR07A029 from Junta de Extremadura to G.L., for their technical support. J.G.-R. was the recipient of a fellowship from the NIH-NIAID 1 R01 AI51949 grant. A.B. was supported by a contract from the SAF2007-60810 grant and a fellowship from Junta de Extremadura.

### References

- Aguilera, A. (2002) The connection between transcription and genomic instability. *EMBO J* **21**: 195–201.
- Andaluz, E., Calderone, R., Reyes, G., and Larriba, G. (2001) Phenotypic analysis and virulence of *Candida albicans* *LIG4* mutants. *Infect Immun* **69**: 137–147.
- Andaluz, E., Ciudad, T., Gómez-Raja, J., Calderone, R., and Larriba, G. (2006) Rad52 depletion in *Candida albicans* triggers both the DNA-damage checkpoint and filamentation accompanied by but independent of expression of hypha-specific genes. *Mol Microbiol* **59**: 1452–1472.
- Andaluz, E., Gómez-Raja, J., Hermosa, B., Ciudad, T., Rustchenko, E., Calderone, R., *et al.* (2007) Loss and fragmentation of chromosome 5 are major events linked to the adaptation of *rad52-ΔΔ* strains of *Candida albicans* to sorbose. *Fungal Genet Biol* **44**: 789–798.
- Andersen, M.P., Nelson, Z.W., Hetrick, E.D., and Gottschling, D.E. (2008) A genetic screen for increased loss of heterozygosity in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* **179**: 1179–1195.
- Anderson, J.B., Sirjusingh, C., and Ricker, N. (2004) Haploidy, diploidy and evolution of antifungal drug resistance in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* **168**: 1915–1923.
- Arit, M.F., Durkin, S.G., Ragland, R.L., and Glover, T.W. (2006) Common fragile sites as targets for chromosome rearrangements. *DNA Repair (Amst)* **5**: 1126–1135.
- Bennett, R.J., and Johnson, A.D. (2003) Completion of a parasexual cycle in *Candida albicans* by induced chromosome loss in tetraploid strains. *EMBO J* **22**: 2505–2515.
- Bouchonville, K., Forche, A., Tang, K.E.S., Semecki, A., and Berman, J. (2009) Aneuploid chromosomes are highly unstable during DNA transformation of *Candida albicans*. *Eukaryot Cell* **8**: 1554–1566.
- Bougnoix, M.E., Diogo, D., François, N., Sendid, B., Veirmeire, S., Colomber, J.F., *et al.* (2006) Multilocus sequence typing reveals intrafamilial transmission and microevolutions of *Candida albicans* isolates from the human digestive tract. *J Clin Microbiol* **44**: 1810–1820.
- Brown, A.J.P. (2002) Expression of growth form-specific factors during morphogenesis in *Candida albicans*. In *Candida and Candidiasis*. Calderone, R.A. (ed.). Washington, DC: American Society for Microbiology Press, pp. 95–106.
- Carro, D., Bartra, E., and Peña, B. (2003) Karyotype rearrangements in a wine yeast strain by *rad52*-dependent and *rad52*-independent mechanisms. *Appl Environ Microbiol* **69**: 2161–2165.
- Chauhan, N., Ciudad, T., Rodríguez-Alejandre, A., Larriba, G., Calderone, R., and Andaluz, E. (2005) Virulence and karyotype analyses of *rad52* mutants of *Candida albicans*: regeneration of a truncated chromosome of a reintegrant strain (*rad52/RAD52*) in the host. *Infect Immun* **73**: 8069–8078.
- Chen, C., and Kolodner, R.D. (1999) Gross chromosomal rearrangements in *Saccharomyces cerevisiae* replication and recombination defective mutants. *Nat Genet* **23**: 81–85.
- Chen, X., Magee, B.B., Dawson, D., Magee, P.T., and Kumamoto, C.A. (2004) Chromosome 1 trisomy compromises the virulence of *Candida albicans*. *Mol Microbiol* **51**: 551–565.
- Chibana, H., and Magee, P.T. (2009) The enigma of the major repeat sequence in *Candida albicans*. *Future Microbiol* **4**: 171–179.
- Chu, W.S., Magee, B.B., and Magee, P.T. (1993) Construction of an *Sfi*I macrorestriction map of the *Candida albicans* genome. *J Bacteriol* **175**: 6637–6651.
- Ciudad, T., Andaluz, E., Steinberg-Neifach, O., Lue, N.F., Lue, N.F., Gow, N.A.R., *et al.* (2004) Homologous recombination in *Candida albicans*: role of CaRad52p in DNA repair, integration of linear DNA fragments and telomere length. *Mol Microbiol* **53**: 1177–1194.
- Coste, A.T., Karababa, M., Ischer, F., Bille, J., and Sanglard, D. (2004) *TAC1*, transcriptional activator of *CDR* genes, is a new transcription factor involved in the regulation of



- Candida albicans* ABC transporters *CDR1* and *CDR2*. *Eukaryot Cell* **3**: 1639–1652.
- Coste, A., Selmecki, A., Forche, A., Diogo, D., Bougnoux, M.E., d'Enfert, C., *et al.* (2007) Genotypic evolution of azole resistance mechanisms in sequential *Candida albicans* isolates. *Eukaryot Cell* **6**: 1889–1904.
- Daley, J.M., Palmbo, P.L., Wu, D., and Wilson, T.E. (2005) Nonhomologous end joining in yeast. *Annu Rev Genet* **39**: 431–451.
- Fonzi, W.A., and Irwin, M.Y. (1993) Isogenic stain construction and gene mapping in *Candida albicans*. *Genetics* **134**: 717–728.
- Forche, A., Magee, P.T., Magee, B.B., and May, G. (2004) Genome-wide single nucleotide polymorphism map for *Candida albicans*. *Eukaryot Cell* **3**: 705–714.
- Forche, A., May, G., and Magee, P.T. (2005) Demonstration of loss of heterozygosity by single-nucleotide polymorphism microarray analysis and alterations in strain morphology in *Candida albicans* strains during infection. *Eukaryot Cell* **4**: 156–165.
- Forche, A., Alby, K., Schaefer, D., Johnson, A.D., Berman, J., and Bennett, R.J. (2008) The parasexual cycle in *Candida albicans* provides an alternative pathway to meiosis for the formation of recombinant strains. *PLoS Biol* **6**: 1–14.
- Forche, A., Magee, P.T., Selmecki, A., Berman, J., and May, G. (2009a) Evolution of *Candida albicans* populations during a single passage through a mouse host. *Genetics* **182**: 799–811.
- Forche, A., Steinbach, M., and Berman, J. (2009b) Efficient and rapid identification of *Candida albicans* allelic status using SNP-RFLP. *FEMS Yeast Res* **9**: 1061–1069.
- García-Prieto, F., Gómez-Raja, J., Andaluz, E., Calderone, R., and Larriba, G. (2010) Role of the homologous recombination genes *RAD51* and *RAD59* in the resistance of *Candida albicans* to UV light, radiomimetic and anti-tumor compounds and oxidizing agents. *Fungal Genet Biol* **47**: 433–445.
- Gillum, A.M., Tsay, E.Y., and Kirsch, D.R. (1984) Isolation of the *Candida albicans* gene for orotidine-5'-phosphate decarboxylase by complementation of *S. cerevisiae* *ura3* and *E. coli* *pyF* mutations. *Mol Gen Genet* **198**: 179–182.
- Gomes, A.C., Miranda, I., Silva, R.M., Moura, G.R., Thomas, B., Akoulitchev, A., and Santos, M.A. (2007) A genetic code alteration generates a proteome of high diversity in the human pathogen *Candida albicans*. *Genome Biol* **8**: R206.
- Gómez-Raja, J., Andaluz, E., Magee, B.B., Calderone, R., and Larriba, G. (2008) A single SNP, G929T (Gly310Val), determines the presence of a functional and a non-functional allele of *HIS4* in *Candida albicans* SC5314: detection of the non-functional allele in laboratory strains. *Fungal Genet Biol* **45**: 527–541.
- Gräser, Y., Volovsek, M., Arrington, J., Schönian, G., Presber, W., Mitchell, T.G., *et al.* (1996) Molecular markers reveal that population structure of the human pathogen *Candida albicans* exhibits both clonality and recombination. *Proc Natl Acad Sci USA* **93**: 12473–12477.
- Haber, J.E., and Hearn, M. (1985) Rad52-independent mitotic gene conversion in *Saccharomyces cerevisiae* frequently results in chromosomal loss. *Genetics* **111**: 7–22.
- Hiraoka, M., Watanabe, K., Umezu, K., and Maki, H. (2000) Spontaneous loss of heterozygosity in diploid *Saccharomyces cerevisiae* cells. *Genetics* **156**: 1531–1548.
- Hsu, M., McEachern, M.J., Dandjinou, A.T., Tzfati, Y., Orr, E., Blackburn, E.H., *et al.* (2007) Telomerase core components protect *Candida* telomeres from aberrant overhang accumulation. *Proc Natl Acad Sci USA* **104**: 11682–11687.
- Huang, G., Wang, H., Chou, S., Nie, X., Chen, J., and Liu, H. (2006) Bistable expression of *WOR1*, a master regulator of white-opaque switching in *Candida albicans*. *Proc Natl Acad Sci USA* **103**: 12813–12818.
- Hull, C.M., Raisner, R.M., and Johnson, A.D. (2000) Evidence for mating of the asexual yeast *Candida albicans*. *Science* **289**: 307–310.
- Iwaguchi, S.-I., Homma, M., and Tanaka, K. (1992) Clonal variation of chromosome size derived from the rRNA cluster region in *Candida albicans*. *J Gen Microbiol* **138**: 1177–1184.
- Janbon, G., Sherman, F., and Rustchenko, E. (1998) Monosomy of a specific chromosome determines L-sorbose utilization: a novel regulatory mechanism in *Candida albicans*. *Proc Natl Acad Sci USA* **95**: 5150–5155.
- Jones, T., Federspiel, N.A., Chibana, H., Dungan, J., Kalman, S., Magee, B.B., *et al.* (2004) The diploid genome sequence of *Candida albicans*. *Proc Natl Acad Sci USA* **101**: 7329–7334.
- Kaye, J.A., Melo, J.A., Cheung, S.K., Vaze, M.B., Haber, J.E., and Toczyski, D.P. (2004) DNA breaks promote genomic instability by impeding proper chromosome segregation. *Curr Biol* **4**: 2096–2106.
- Klein, H.L. (2001) Spontaneous chromosome loss in *Saccharomyces cerevisiae* is suppressed by DNA damage checkpoint functions. *Genetics* **159**: 1501–1509.
- Kolodner, R. (1996) Biochemistry and genetics of eukaryotic mismatch repair. *Genes Dev* **10**: 1433–1442.
- Kolodner, R.D., Putnam, C.D., and Myung, K. (2002) Maintenance of genome stability in *Saccharomyces cerevisiae*. *Science* **297**: 552–557.
- Larriba, G., and Calderone, R. (2008) Heterozygosity and loss of heterozygosity in *Candida albicans*. In *Pathogenic Fungi: Host Interactions and Emerging Strategies for Control*. San Blas, G., and Calderone, R. (eds). Norkfold, UK: Horizon Press, pp. 43–73.
- Le, S., Moore, J.K., Haber, J.E., and Greider, C.W. (1999) *RAD50* and *RAD51* define two pathways that collaborate to maintain telomeres in the absence of telomerase. *Genetics* **152**: 143–152.
- Lea, D.E., and Coulson, C.A. (1949) The distribution of the numbers of mutants in bacterial populations. *J Genet* **49**: 264–285.
- Legrand, M., Lephart, P., Forche, A., Magee, P.T., and Magee, B.B. (2004) Homozygosity at the *MTL* locus in clinical strains of *Candida albicans* is correlated with karyotypic rearrangements. *Mol Microbiol* **52**: 1451–1462.
- Legrand, M., Chan, C.L., Jauert, P.A., and Kirkpatrick, D.T. (2007) Role of DNA mismatch repair and double-strand break repair in genome stability and antifungal drug resistance in *Candida albicans*. *Eukaryot Cell* **6**: 2194–2205.
- Legrand, M., Forche, A., Selmecki, A., Chan, D., Kirkpatrick, D.T., and Berman, J. (2008) Haplotype mapping of a diploid non-meiotic organism using existing and induced aneuploidies. *PLoS Genet* **4**: 18–28.

- Lephart, P.R., and Magee, P.T. (2006) Effect of the major repeat sequence on mitotic recombination in *Candida albicans*. *Genetics* **174**: 1737–1744.
- Lephart, P.R., Chibana, H., and Magee, P.T. (2005) Effect of the major repeat sequence on chromosome loss in *Candida albicans*. *Eukaryot Cell* **4**: 733–741.
- Lobachev, K., Vitriol, E., Stemple, J., Resnick, M.A., and Bloom, K. (2004) Chromosome fragmentation after induction of a double-strand break is an active process prevented by the RMX repair complex. *Curr Biol* **14**: 2107–2112.
- Lockhart, S.R., Fritch, J.J., Meier, A.S., Schröppel, K., Srikantha, T., Galask, R., *et al.* (1995) Colonizing populations of *Candida albicans* are clonal in origin but undergo microevolution through C1 fragment reorganization as demonstrated by DNA fingerprinting and C1 sequencing. *J Clin Microbiol* **33**: 1501–1509.
- Lockhart, S.R., Pujol, C., Daniels, K.J., Miller, M.G., Johnson, A.D., Pfaller, M.A., *et al.* (2002) In *Candida albicans*, white-opaque switchers are homozygous for mating type. *Genetics* **162**: 737–745.
- McEachern, M.J., and Hicks, J.B. (1993) Unusually large telomeric repeats in the yeast *Candida albicans*. *Mol Cell Biol* **13**: 551–560.
- Magee, B.B., and Magee, P.T. (2000) Induction of mating in *Candida albicans* by construction of *MTLa* and *MTLalpha* strains. *Science* **289**: 310–313.
- Magee, P.T. (2007) Genome structure and dynamics in *Candida albicans*. In *Candida: Comparative and Functional Genomics*. Hube, B., and d'Enfert, C. (eds). Norkfold, UK: Caister Academic Press, pp. 7–26.
- Mortimer, R.K., Contopoulou, R., and Schild, D. (1981) Mitotic chromosome loss in a radiation sensitive strain of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc Natl Acad Sci USA* **78**: 5778–5782.
- Motegi, A., and Myung, K. (2007) Measuring the rate of gross chromosomal rearrangements in *Saccharomyces cerevisiae*: a practical approach to study genomic rearrangements observed in cancer. *Methods* **41**: 168–176.
- Myung, K., and Kolodner, R.D. (2002) Suppression of genome instability by redundant S-phase checkpoint pathways in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc Natl Acad Sci USA* **99**: 4500–4507.
- Myung, K., and Kolodner, R.D. (2003) Induction of genome instability by DNA damage in *Saccharomyces cerevisiae*. *DNA Repair* **2**: 243–258.
- Myung, K., Datta, A., and Kolodner, R.D. (2001) Suppression of spontaneous chromosomal rearrangements by S phase checkpoint functions of *Saccharomyces cerevisiae*. *Cell* **104**: 397–408.
- Nakamura, K., Okamoto, A., Katou, Y., Yadani, C., Shitanda, T., Kaweeteerawat, C., *et al.* (2008) Rad51 suppresses gross chromosomal rearrangement at centromere in *Schizosaccharomyces pombe*. *EMBO J* **27**: 3036–3046.
- Odds, F.C. (2010) Molecular phylogenetic and epidemiology of *Candida albicans*. *Future Microbiol* **5**: 67–79.
- Odds, F.C., Davidson, A.D., Jacobsen, M.D., Tavanti, A., Whyte, J.A., Kibler, C.C., *et al.* (2006) *Candida albicans* strain maintenance, replacement, and microvariation, demonstrated by multilocus sequence typing. *J Clin Microbiol* **44**: 3647–3658.
- Odds, F.C., Bounoux, M.E., Shaw, D.J., Bain, J.M., Davidson, A.D., Diogo, D., *et al.* (2007) Molecular phylogenetics of *Candida albicans*. *Eukaryot Cell* **6**: 1041–1052.
- Olaiya, A.F., and Sogin, S.J. (1979) Ploidy determination of *Candida albicans*. *J Bacteriol* **140**: 1043–1049.
- Pâques, F., and Haber, J.E. (1999) Multiple pathways of recombination induced by double-strand breaks in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol Mol Biol Rev* **63**: 349–404.
- Pennaneach, V., Putnan, C.D., and Kolodner, R.D. (2006) Chromosome healing by *de novo* telomere addition in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Microbiol* **59**: 1357–1368.
- Poláková, S., Blume, C., Zarate, J.A., Mentel, M., Jorck-Ramberg, D., Stenderup, J., *et al.* (2009) Formation of new chromosomes as a virulence mechanism in yeast *Candida glabrata*. *Proc Natl Acad Sci USA* **106**: 2688–2693.
- Pujol, C., Reynes, J., Renaud, F., Raymond, M., Tibayrenc, M., Ayala, F.J., *et al.* (1993) The yeast *Candida albicans* has a clonal mode of reproduction in a population of infected human immunodeficiency virus-positive patients. *Proc Natl Acad Sci USA* **90**: 9456–9459.
- Putnam, C.D., Pennaneach, V., and Kolodner, R.D. (2004) Chromosome healing through terminal deletions generated by *de novo* telomere additions in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc Natl Acad Sci USA* **101**: 13262–13267.
- Reenan, R.A.G., and Kolodner, R.D. (1992) Characterization of insertion mutations in the *Saccharomyces cerevisiae* Msh1 and Msh2 genes: evidence for separate mitochondrial and nuclear functions. *Genetics* **132**: 975–985.
- Rustchenko, E. (2007) Chromosome instability in *Candida albicans*. *FEMS Yeast Res* **7**: 2–11.
- Rustchenko, E., and Sherman, F. (2003) Genetic instability in *Candida albicans*. In *Pathogenic Fungi in Humans and Animals*. Howard, D.H. (ed.). New York, NY: Marcel Dekker, pp. 723–776.
- Rustchenko, E.P., Curran, T.M., and Sherman, F. (1993) Variation in the number of ribosomal DNA units in morphological mutants of normal strains of *Candida albicans* and in normal strains of *Saccharomyces cerevisiae*. *J Bacteriol* **175**: 7189–7199.
- Santos-Rosa, H., and Aguilera, A. (1994) Increase in incidence of chromosome instability and non-conservative recombination between repeats in *Saccharomyces cerevisiae hpr1 delta* strains. *Mol Gen Genet* **245**: 224–236.
- Schultz, V.P., and Zakian, V.A. (1994) The *Saccharomyces cerevisiae PIF1* helicase inhibits telomere elongation and *de novo* telomere formation. *Cell* **76**: 145–155.
- Selmecki, A., Bergmann, S., and Berman, J. (2005) Comparative genome hybridization reveals widespread aneuploidy in *Candida albicans* laboratory strains. *Mol Microbiol* **55**: 1553–1565.
- Selmecki, A., Forche, A., and Berman, J. (2006) Aneuploidy and isochromosome formation in drug-resistant *Candida albicans*. *Science* **313**: 367–370.
- Selmecki, A.M., Dulmage, K., Cowen, L.E., Anderson, J.B., and Berman, J. (2009) Acquisition of aneuploidy provides increased fitness during the evolution of antifungal drug resistance. *PLoS Genet* **5**: e1000705.
- Selmecki, A., Forche, A., and Berman, J. (2010) Genomic plasticity of the human fungal pathogen *Candida albicans*. *Eukaryot Cell* **9**: 991–1008.
- Spell, R.M., and Jinks-Robertson, S. (2004) Determination of

- mitotic recombination rates by fluctuation analysis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Methods Mol Biol* **262**: 3–12.
- Srikantha, T., Borneman, A.R., Daniels, K.J., Pujol, C., Wu, W., Seringhaus, M.R., *et al.* (2006) TOS9 regulates white-opaque switching in *Candida albicans*. *Eukaryot Cell* **5**: 1674–1687.
- Sudbery, P.E., Gow, N., and Berman, J. (2004) The distinct morphogenetic states of *Candida albicans*. *Trends Microbiol* **12**: 317–324.
- Tagaki, Y., Akada, R., Kumagai, H., Yamamoto, K., and Tamaki, H. (2008) Loss of heterozygosity is induced in *Candida albicans* by ultraviolet irradiation. *Appl Microbiol Biotechnol* **77**: 1073–1082.
- Tourrette, Y., Schacherer, J., Fritsch, E., Potier, S., Souciet, J.L., and de Montigny, J. (2007) Spontaneous deletions and reciprocal translocations in *Saccharomyces cerevisiae*: influence of ploidy. *Mol Microbiol* **64**: 382–395.
- Wellington, M., and Rustchenko, E. (2005) 5-Fluoro-orotic acid induces chromosome alterations in *Candida albicans*. *Yeast* **22**: 57–70.
- Whelan, W.L., and Soll, D.R. (1982) Mitotic recombination in *Candida albicans*: recessive lethal alleles linked to a gene required for methionine biosynthesis. *Mol Gen Genet* **187**: 477–485.
- Whelan, W.L., Partridge, R.M., and Magee, P.T. (1980) Heterozygosity and segregation in *Candida albicans*. *Mol Gen Genet* **180**: 107–113.
- White, T.C. (1997) The presence of an R467K amino acid substitution and loss of allelic variation correlate with an azole-resistant lanosterol 14 $\alpha$  demethylase in *Candida albicans*. *Antimicrob Agents Chemother* **41**: 1488–1494.
- Wu, W., Pujol, C., Lockhart, S.R., and Soll, D. (2005) Chromosome loss followed by duplication is the major mechanism of spontaneous mating-type homozygosity in *Candida albicans*. *Genetics* **169**: 1311–1327.
- Yesland, K., and Fonzi, W.A. (2000) Allele-specific gene targeting in *Candida albicans* results from heterology between alleles. *Microbiology* **146**: 2097–2104.
- Yoshida, J., Umezu, K., and Maki, H. (2003) Positive and negative roles of homologous recombination in the maintenance of genome stability in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* **164**: 31–46.
- Zordan, R.E., Galgoczy, D.J., and Johnson, A.D. (2006) Epigenetic properties of white-opaque switching in *Candida albicans* are based on a self-sustaining transcriptional feedback loop. *Proc Natl Acad Sci USA* **103**: 12807–12812.

### Supporting information

Additional supporting information may be found in the online version of this article.

Please note: Wiley-Blackwell are not responsible for the content or functionality of any supporting materials supplied by the authors. Any queries (other than missing material) should be directed to the corresponding author for the article.





## Genetic interactions among homologous recombination mutants in *Candida albicans*



Alberto Bellido<sup>a</sup>, Encarnación Andaluz<sup>a</sup>, Jonathan Gómez-Raja<sup>a</sup>, Alberto Álvarez-Barrientos<sup>b</sup>, Germán Larriba<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup>Departamento de Ciencias Biomédicas, Área de Microbiología, Facultad de Ciencias, Universidad de Extremadura, 06071 Badajoz, Spain

<sup>b</sup>Servicio de Técnicas Aplicadas a la Biociencia, Universidad de Extremadura, 06071 Badajoz, Spain

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 22 July 2014

Accepted 27 October 2014

Available online 1 November 2014

#### Keywords:

*Candida albicans*

RAD59

RAD52

RAD51

Aberrant cell morphology viability

### ABSTRACT

*rad52-ΔΔ* and, to a lesser extent, *rad51-ΔΔ* deletants of *Candida albicans* displayed slow growth and aberrant filamentous morphology whereas *rad59-ΔΔ* mutants, both by growth rate and morphology resembled wild type. In this study, we have constructed pair-wise double deletants to analyze genetic interactions among these homologous recombination (HR) proteins that affect growth and morphology traits. When grown in liquid YPD medium, double mutant *rad51-ΔΔ rad59-ΔΔ* exhibited growth rates, cell and colony morphologies, and plating efficiencies that were not significantly different from those observed for *rad51-ΔΔ*. The same was true for *rad52-ΔΔ rad59-ΔΔ* compared to *rad52-ΔΔ*. Slow growth and decreased plating efficiency were caused, at least in part, by a decreased viability, as deduced from FUN1 staining. Flow cytometry and microscopic studies of filamentous mutant populations revealed major changes in cell ploidy, size and morphology, whereas DAPI staining identified complex nuclear rearrangements in yeast and filamentous cells. These phenotypes were not observed in the *rad59-ΔΔ* mutant populations. Our results show that abolishing Rad51 functions induces the appearance of a subpopulation of aberrant yeast and filamentous forms with increased cell size and ploidy. The size of this complex subpopulation was exacerbated in *rad52-ΔΔ* mutants. The combination of filamentous cell morphology and viability phenotypes was reflected on the colony morphology of the respective mutants. We conclude that the *rad52* mutation is epistatic to *rad51* for all the morphological traits analyzed. We discuss these results in the light of the several functions of these recombination genes.

© 2014 Elsevier Inc. All rights reserved.

### 1. Introduction

The opportunistic fungal pathogen *Candida albicans* is a diploid organism that can grow as unicellular yeast and in two filamentous multicellular forms—pseudohyphae and hyphae. Several lines of evidence suggest that environmental cues determine transition between these morphological (Berman, 2006; Shapiro et al., 2011; Sudbery et al., 2004; Sudbery, 2011). In addition, *C. albicans* can polarize growth and generate a filamentous phenotype in response to several genotoxins that activate the DNA-damage checkpoint (MMS, UV light), cause replication stress (hydroxyurea) (Loll-Kripplbeber et al., 2014; Shi et al., 2007), or interfere with the spindle body function (nocodazole) (Bai et al., 2002). Growth polarization has also been reported in strains deficient in DNA repair. These include deletion mutants lacking homologous recombination (HR) genes (*RAD52*, *RAD51*, and *RAD54*), exonucleases genes (*RAD50*

and *MRE11*) involved in resection of double strand breaks to generate ssDNA, the substrate for Rad51 binding (Andaluz et al., 2006; Hoot et al., 2011; Legrand et al., 2007), or chromatin-modifying genes, such as *RTT109* or *HAT1* (Lopes da Rosa et al., 2010; Tscherner et al., 2012). Growth polarization in response to genotoxins appears to be mediated by both the DNA-replication and DNA-damage checkpoint pathways, since deletion of effector kinase *RAD53* abolishes filamentation (Loll-Kripplbeber et al., 2014; Shi et al., 2007). Very little is known about the events that trigger filamentation in HR, exonucleases, or chromatin-modifying mutants. Although there are indications that *rad52* polarization is preceded by activation of the DNA-damage checkpoint (Andaluz et al., 2006), identification of the triggering lesions or the signaling pathway involved is missing.

In *Saccharomyces cerevisiae*, HR uses the *RAD52* epistasis group of genes (*RAD51*, *RAD52*, *RAD54*, *RAD55*, *RAD57*, *RAD59*, and the MRX complex formed by *RAD50*, *MRE11*, and *XRS2*). Rad51, assisted by its paralogs Rad55 and Rad57 and stimulated by Rad54, is required for all recombination mechanisms involving strand invasion such

\* Corresponding author.

E-mail address: [glarriba@unex.es](mailto:glarriba@unex.es) (G. Larriba).

as gene conversion (GC) crossovers (CO), and most break-induced replication (BIR) events (Davis and Symington, 2004; Kang and Symington, 2000; Krogh and Symington, 2004; Malkova et al., 1996). Rad52 plays a central role in HR as the *rad52* mutation is epistatic to mutation in any other gene of the epistasis group. First, Rad52 has a mediator activity in loading Rad51 onto ssDNA to form the invading nucleofilament; second, it has an annealing activity between complementary ssDNA (Ivanov et al., 1996; Nimonkar et al., 2009; Sugiyama et al., 1998), which is essential for the second end capture in the double-strand break-repair (DSBR) model as well as for other non-conservative recombination events (Krogh and Symington, 2004; Paques and Haber, 1999; Prado et al., 2003; Symington, 2002). Rad51- and Rad52-independent pathways of recombination have been reported in *S. cerevisiae*. Whereas the latter remains poorly characterized (Coic et al., 2008; Pohl and Nickoloff, 2008), Rad51-independent mechanisms, such as single strand annealing (SSA) and a minor BIR pathway, have been investigated in some detail (Ivanov et al., 1996; Mortensen et al., 1996). Both SSA and Rad51-independent BIR require Rad52, Rad59, and the MRX complex. Rad59 is a Rad52 paralog, first identified in *S. cerevisiae*, which displays high similarity to the N-terminal half of Rad52. Rad59 is thought to function as an accessory factor in SSA by potentiating the single-strand annealing activity of Rad52. RAD52, when present in more than one copy, suppresses the radiation sensitivity and recombination defects of *rad59* mutants, but not vice versa (Bai and Symington, 1996).

Epistatic and synergistic interactions between mutations in HR genes have been extensively studied in *S. cerevisiae* by analyzing phenotypic traits such as  $\gamma$ -ray sensitivity, recombination rates, sporulation efficiency, and mating type switching (Paques and Haber, 1999; Krogh and Symington, 2004). Since HR mutants of *S. cerevisiae* do not display any aberrant filamentous phenotype, genetic interactions among HR genes affecting morphology have not been analyzed yet. However, morphological control mechanisms are important for adaptation of fungal cell pathogens to stress and antifungal drugs as well as for their virulence and survival in the host (Harrison et al., 2014; Kadosh, 2013). We previously reported that *rad52- $\Delta\Delta$*  and, to a lesser extent, *rad51- $\Delta\Delta$*  cells from *C. albicans* exhibit severe phenotypes including a decreased growth rate and a filamentous morphology, whereas *rad59- $\Delta\Delta$*  cells showed wild type phenotypes (Andaluz et al., 2006; Ciudad et al., 2004; Garcia-Prieto et al., 2010). In the present study, we have extended the phenotypic analysis of single mutants. In addition, because the genetic interactions between RAD51, RAD52 and RAD59 in several HR-dependent processes in *S. cerevisiae*, we have constructed pairwise-double deletants to establish synergistic as well as epistatic relationships between those mutations that could affect growth rate, and cell and colony morphologies. Based on colony morphology in several solid media, as well as loss of cell viability and changes in ploidy, and filamentation ability we conclude that *rad52* mutation was epistatic to *rad51*. Besides, our phenotypic analysis strongly suggests that *rad52* and *rad51* mutations were epistatic to *rad59*. We discuss these results on the light of the several functions of these recombination genes.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Strains and culture media

The strains used in this study are shown in Table 1. They were routinely grown in YPD medium or synthetic complete (SC) medium (Andaluz et al., 2006). Uri<sup>+</sup> prototrophs were selected on SC plates lacking uridine. Uri<sup>-</sup> segregants were selected on YPD plates supplemented with 5-fluoroorotic acid (5-FOA). The haploid

strains W303 and its *rad52* derivative (LSY1029-13B), both ADE2 RAD5, were kindly provided by Lorraine Symington, from Columbia University. To inspect for hyphal growth stationary phase cultures were inoculated on agar plates with SPIDER medium, M199 medium, pH 7.9 (Gifco BRL, Life technologies), or Leés medium (Lee et al., 1975; Liu et al., 1994), prepared as described before (Andaluz et al., 2006). Colonies were visualized with the naked eye and then microscopically inspected. To induce germinative tubes, exponentially growing cells in YPD were supplemented with calf serum (10% final concentration) and incubated a 37 °C for 1–2 h.

### 2.2. DNA extraction and analysis and cell transformation

Extraction of genomic DNA, PFGE, and Southern blot hybridization have been described before (Andaluz et al., 2007; Gomez-Raja et al., 2008). *C. albicans* cells were transformed by electroporation in a BTX electroporation system (Andaluz et al., 2006) or using the lithium acetate method (Walther and Wendland, 2003). Plugs for PFGE were prepared and subsequently treated with proteinase K (1 mg/ml) at 55 °C for 24 h.

### 2.3. Construction of double mutants *rad51- $\Delta\Delta$ rad59- $\Delta\Delta$* , *rad52- $\Delta\Delta$ rad59- $\Delta\Delta$* and *rad51- $\Delta\Delta$ rad52- $\Delta\Delta$*

To construct the double mutant *rad59- $\Delta\Delta$  rad52- $\Delta\Delta$* , both alleles of RAD52 were sequentially disrupted in the *rad59- $\Delta\Delta$*  background, as previously described (Ciudad et al., 2004; Garcia-Prieto et al., 2010). The analysis of the resulting strains by Southern blot using the Rad52 disruption cassette as a probe is shown in Supplemental Fig. S1. To construct the double mutant *rad59- $\Delta\Delta$  rad51- $\Delta\Delta$* , both alleles of RAD51 were disrupted sequentially in the *RAD59/rad59::hisG* background. The resulting strains were verified by Southern blot using a 891 bp *EcoRI/SpeI* probe from the RAD51 clone (Garcia-Prieto et al., 2010). Then the second allele of RAD59 was disrupted as described above (Supplemental Fig. S2).

To construct the *rad51- $\Delta\Delta$  rad52- $\Delta\Delta$*  double mutant, both RAD52 alleles were sequentially disrupted in a *rad51::hisG/rad51::hisG* background, as previously described (Ciudad et al., 2004). Constructs were verified by Southern blot using the RAD52 disruption cassette as a probe (Supplemental Fig. S3A).

Single and double mutant strains conserved essentially the PFGE karyotype of the parental CAF2-1 strains (Supplemental Fig. S3B), apart from changes in the sizes of both ChrR homologs, suggesting that gene disruptions did not generate gross chromosomal rearrangements detected by this technique.

### 2.4. Determination of growth rate and cell morphology

Liquid cultures grown until OD<sub>600</sub> of 6 were used to inoculate 250 ml flasks containing 50 ml of the indicated liquid medium at an OD<sub>600</sub> of 0.05. After 2 h at 30 °C with shaking samples were taken every 30 min and OD<sub>600</sub> calculated from dilutions with DO<sub>600</sub> < 0.4. Because some strains had a filamentous phenotype, the ratio between DO<sub>600</sub> and CFUs was calculated for each strain within the OD<sub>600</sub> range 0–0.4. The cell morphology of fresh cells was inspected microscopically using a Nikon Eclipse 600 fluorescence microscope with a 60 × DIC objective. A CC-12 digital camera interfaced with Soft Imaging System software was used for imaging.

### 2.5. Cell staining procedures

Aliquots (100  $\mu$ l) from overnight cultures of the indicated strains (DO<sub>600</sub>  $\approx$  5) were pelleted, resuspended in Phloxine B (5 mg/ml) and observed under the microscope. DAPI and Calcofluor

**Table 1**  
Strains used in this study.

Strain	Parental	Genotype	Reference
<i>C. albicans</i>			
CAF2-1	SC5314	<i>ura3::imm434/URA3</i>	Fonzi and Irwin (1993)
CAI4	CAF2-1	<i>ura3::imm434/ura3::imm434</i>	Fonzi and Irwin (1993)
<i>rad59-ΔΔ</i> (BNC1.1)	CAI-4	<i>ura3::imm434/ura3::imm434</i> <i>rad59::hisG/rad59::hisG-URA3-hisG</i>	García-Prieto et al. (2010)
<i>rad59-ΔΔ</i> (BNC23.1)	BNC1.1	<i>ura3::imm434/ura3::imm434</i> <i>rad59::hisG/rad59::hisG</i>	This work
<i>rad59-ΔΔ</i> (BNC35.1)	CAI4	<i>ura3::imm434/ura3::imm434</i> <i>rad59::hisG/rad59::hisG</i>	This work
<i>rad51-ΔΔ</i> (JGR5)	CAI4	<i>ura3::imm434/ura3::imm434</i> <i>rad51::hisG/rad51::hisG-URA3-hisG</i>	García-Prieto et al. (2010)
<i>rad51-ΔΔ</i> (JGR5A)	JGR5	<i>ura3::imm434/ura3::imm434</i> <i>rad51::hisG/rad51::hisG</i>	García-Prieto et al. (2010)
<i>rad51-ΔΔ</i> (JGR16A)	CAI4	<i>ura3::imm434/ura3::imm434</i> <i>rad51::hisG/rad51::hisG</i>	García-Prieto et al. (2010)
<i>rad51-ΔΔ</i> <i>rad59-ΔΔ</i> (BYJ26)	CAI4	<i>ura3::imm434/ura3::imm434</i> <i>rad59::hisG/rad59::hisG</i> <i>rad51::hisG/rad51::hisG-URA3-hisG</i>	This work
<i>rad51-ΔΔ</i> <i>rad59-ΔΔ</i> (BYJ261)	BYJ26	<i>ura3::imm434/ura3::imm434</i> <i>rad59::hisG/rad59::hisG</i> <i>rad51::hisG/rad51::hisG</i>	This work
<i>rad51-ΔΔ</i> <i>rad59-ΔΔ</i> (BYJ262)	BYJ26	<i>ura3::imm434/ura3::imm434</i> <i>rad59::hisG/rad59::hisG</i> <i>rad51::hisG/rad51::hisG</i>	This work
<i>rad52-ΔΔ</i> (TCR2.1)	CAI4	<i>ura3::imm434/ura3::imm434</i> <i>rad52::hisG/rad52::hisG-URA3-hisG</i>	Ciudad et al. (2004)
<i>rad52-ΔΔ</i> (TCR2.1.1)	TCR2.1	<i>ura3::imm434/ura3::imm434</i> <i>rad52::hisG/rad52::hisG</i>	Ciudad et al. (2004)
<i>rad52-ΔΔ rad59-ΔΔ</i> (TYB6.1)	CAI4	<i>ura3::imm434/ura3::imm434</i> <i>rad59::hisG/rad59::hisG</i> <i>rad52::hisG/rad52::hisG-URA3-hisG</i>	This work
<i>rad52-ΔΔ</i> <i>rad59-ΔΔ</i> (TYB7.1)	TYB6.1	<i>ura3::imm434/ura3::imm434</i> <i>rad59::hisG/rad59::hisG</i> <i>rad52::hisG/rad52::hisG</i>	This work
<i>S. cerevisiae</i>			
W303-haploid		<i>MAT a</i> ; <i>met17-s ADE2 RAD5 ade2-1 trp1-1 his3-11,15 can1-100 ura3-1 leu2-3,112</i>	L. Symington (LSY0826)
W303-diploid		<i>MAT a/α</i> ; <i>ADE2 RAD5 met17-s/met17-s ade2-1/ade2-1 trp1-1/trp1-1 his3-11,15/his3-11,15 can1-100/can1-199 ura3-1/ura3-1 leu2-3,112/leu2-3,112</i>	This work (LSY0826 derivative)
LSY-EA4 <i>rad52-ΔΔ</i>		<i>MAT a/α</i> ; <i>ADE2 RAD5 rad52: TRP1/rad52::TRP1 met17-s/met17-s ade2-1/ade2-1 trp1-1/trp1-1 his3-11,15/his3-11,15 can1-100/can1-199 ura3-1/ura3-1 leu2-3,112/leu2-3,112</i>	This work (LSY1029-13B derivative)

White (CFW) staining was carried out as previously reported (Andaluz et al., 2006). For FUN1 staining, yeast cells were washed in buffer (2% glucose and 10 mM Na-HEPES at pH 7.2), resuspended in the same buffer supplemented with 1 μM FUN1 (Molecular Probes), and incubated at 30 °C in the dark for 30 min, before being observed by confocal microscopy (FV1000 Olympus). Estimation of the number of FUN1-stained dead cells was done by flow cytometry. Between 50,000 and 100,000 cells were counted per experiment.

## 2.6. Flow cytometry preparation and analysis

About  $10^6$  cells in 1 ml YPD were centrifuged and the pellet carefully resuspended in 500 μl of 70% ethanol. After gentle shaking for 2 min yeast were centrifuged and the pellet resuspended in 1 ml PBS, washed twice with 1 ml PBS and resuspended in 950 μl PBS. Following addition of 50 μl de RNase (20 mg/ml) and 1 μl sybr-green (SG) the mixture was incubated for 2 h at 37 °C in the dark with gentle shaking. For calibration of cell size, 3 μm diameter beads from Miltenyi Biotech and 6 and 12 μm diameter beads from Molecular Probes were used. For this purpose, one drop from each bead vial was diluted in PBS (1 ml final volume) and 50 μL were added to each cell sample. In this way, we could relate FSC-H channel distribution from each set of beads with its size, building a size standard curve. Later we could relate FSC-H mean channel from each yeast population with their correspondent size (Supplemental Fig. S6). Sizes 1 to 5 denote sub-populations of cells

that have a determined ploidy (2 N, 4 N, 8 N) but within each ploidy they exhibit different cell sizes (For instance, in Supplemental Fig. S6, 4 N cells may have sizes 2, 3, 4 and 5, and 8 N cells sizes 3, 4 and 5). Size 1 corresponds to the lowest size and 5 to the highest one. The flow cytometry analysis was carried out in a MACS-QUANT VYB Flow Cytometer (Miltenyi Biotech). Chains of cells that had undergone cytokinesis but remained attached were subtracted from the pool of G2 cells using the doublet discriminator protocol (Watson, 1991). Yeast sorting was done using a MoFlo XDP (Beckman Coulter) flow cytometer.

## 3. Results

### 3.1. Interactions between *rad51*, *rad52*, and *rad59* mutations affecting growth rate, plating efficiency, and cell viability

We earlier reported growth defects in *rad51-ΔΔ* and *rad52-ΔΔ* mutants of *C. albicans* (Andaluz et al., 2006; Garcia-Prieto et al., 2010). When grown in YPD broth, the double mutant *rad51-ΔΔ rad59-ΔΔ* displayed the same generation time (*g*), determined by the viable counting method (CFU), as the *rad51-ΔΔ* null (~85 min). Likewise, the double mutant *rad59-ΔΔ rad52-ΔΔ* grew at a rate that was similar to that of *rad52-ΔΔ* (*g* ~ 115 min), whereas *rad59-ΔΔ* showed the same *g* as the parental strain CAF2-1 (*g* ~ 73 min) (Table 2). These results suggest that Rad59 does not participate in the repair of spontaneous DNA damage

**Table 2**

Generation time (*g*) of different strains of *C. albicans* in YPD was calculated by the viable counting method (CFU) or directly from OD<sub>600</sub> values. Both number of CFU/ml (OD<sub>600</sub> = 1) and cell viability are expressed as percent of reduction versus wild type (100%) ± standard error. For FUN1 staining between 50,000 and 100,000 cells were counted per experiment using flow cytometry. Results are mean of three independent experiments.

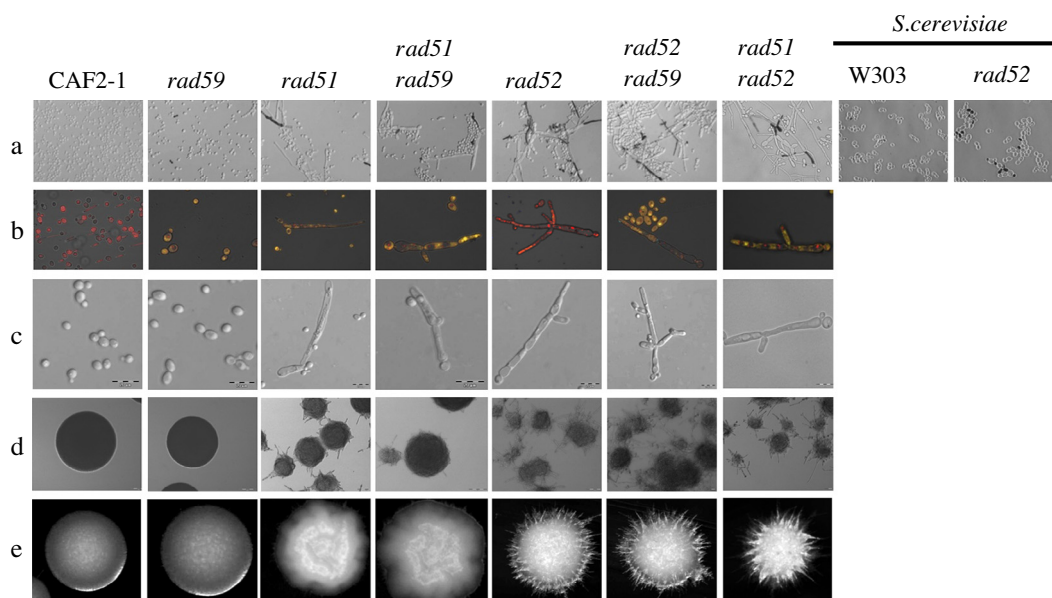
Strains	<i>g</i> (min)		CFU/ml (DO <sub>600</sub> = 1)	Viability (%) FUN1
	CFU	DO <sub>600</sub>		
CAF2-1	73	70	13.8 ± 0.27 × 10 <sup>6</sup> (100)	100
BNC1.1 ( <i>rad59-ΔΔ</i> )	73	70	13.4 ± 0.29 × 10 <sup>6</sup> (97.1)	98 ± 3.21
JGR5 ( <i>rad51-ΔΔ</i> )	85	83	7.2 ± 0.22 × 10 <sup>6</sup> (52.2)	93 ± 5.37
BYJ2.276 ( <i>rad51-ΔΔ rad59-ΔΔ</i> )	81	85	7.2 ± 0.24 × 10 <sup>6</sup> (52.2)	91 ± 4.46
TCR2.1 ( <i>rad52-ΔΔ</i> )	120	115	3.1 ± 0.15 × 10 <sup>6</sup> (22.4)	76 ± 7.19
TYB6.1 ( <i>rad52-ΔΔ rad59-ΔΔ</i> )	123	117	3.7 ± 0.14 × 10 <sup>6</sup> (26.7)	73 ± 2.87
TYJ5.1.19 ( <i>rad51-ΔΔ rad52-ΔΔ</i> )	135	123	2.5 ± 0.15 × 10 <sup>6</sup> (18.3)	71 ± 4.65

affecting growth rate regardless whether Rad51 or Rad52 are present or not. Surprisingly, the *rad51-ΔΔ rad52-ΔΔ* double mutant displayed a *g* higher than *rad52-ΔΔ* (130 min versus 115 min) suggesting synergism between both mutations for this phenotype (see below).

To investigate the reasons for the increase in the generation time in several HR mutants, we first determined the plating efficiency of each strain. For a OD<sub>600</sub> = 1, liquid cultures of filamentous single and double HR mutants yielded significantly lower CFU/ml than parallel cultures of non-filamentous strains CAF2-1 and *rad59-ΔΔ*, as follows: CAF2-1 ≥ *rad59* > *rad51* = *rad51 rad59* > *rad52* ≥ *rad52 rad59* > *rad51 rad52* (Table 2). This could be due to several reasons, including the presence of a significant amount of dead cells in cultures of filamentous mutants. In support of this possibility, the *Scrad52-ΔΔ* mutant, which does not form filaments, also showed a significant lower yield of CFUs (~37%) than *S. cerevisiae* wild type cultures harvested at a OD<sub>600</sub> = 1. In addition, when stained with Phloxine B, a vital dye that stains dead yeast cells (Kucsera et al., 2000; Noda, 2008), about 20% of cells from *Scrad52-ΔΔ* cultures were positive, while cultures of its wild type parental strain hardly showed stained cells (Fig. 1, row a). Therefore, we sought to

determine the extent to which removal of HR proteins influenced cell viability in *C. albicans* using Phloxine B. Indeed, we observed an increase in Phloxine B positive cells in *rad51*, and, to a larger extent, in *rad52* mutants compared to wild type or *rad59-ΔΔ*. However, Phloxine B may not be a good vital dye to quantify viability in *C. albicans*, where colonies formed by viable opaque cells have been reported to take up Phloxine B becoming red (Lockhart et al., 2002). Therefore, it appears that penetration of the dye into the cell does not necessarily mean cell death. In order to rule out interferences of putative opaque cells in our cultures, we used another dye, FUN1, which form red dots in the vacuoles of metabolically active cells, whereas dead cells are green (Fig. 1, row b; see also Movie S1). Quantification of dead cells by confocal microscopy indicated that, as compared to wild type, *rad59-ΔΔ* cells showed little changes in viability (99%), which was significantly decreased in *rad51-ΔΔ* and *rad51-ΔΔ rad59-ΔΔ* (95–96%) and, to a larger extent, in *rad52-ΔΔ* single and double mutants (72–74%) (Table 2). Thus, based on the loss of cell viability *rad52* is shown to be epistatic to *rad51*.

Importantly, changes in viability do not account by themselves for the extreme low plating efficiency of *rad52* mutants. It is likely



**Fig. 1.** Cell and colony morphologies of single and double mutants involving *RAD51*, *RAD52* and *RAD59* genes. Strains CAF2-1 (WT), BNC23 (*rad59*), JGR5 (*rad51*), BYJ2.6 (*rad51 rad59*), TCR2.1 (*rad52*), TYB6.1 (*rad52 rad59*) and TYJ5.1.19 (*rad51 rad52*) were grown in liquid YPD medium overnight and samples observed using an Eclipse 600 microscope before (DIC images, row c) or after staining with Phloxine B (row a) and photographed. A sample was also stained with FUN1 and observed by confocal microscopy (row b). Cell suspensions were also spread on solid YPD medium. Following incubation for 24 (row d) or 72 h (row e) colonies were photographed. For staining procedures see Section 2.

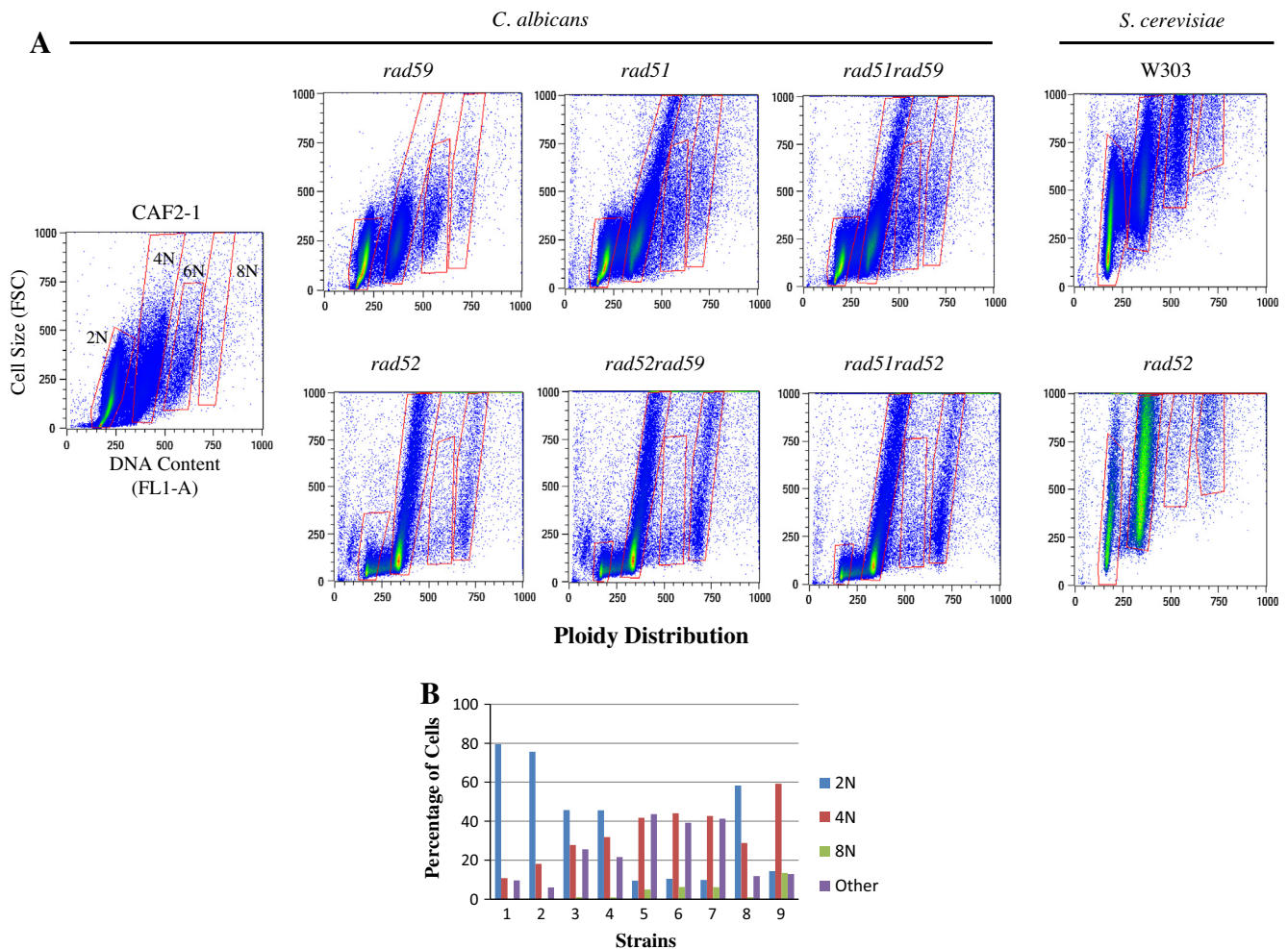


that additional features, as the presence of multicellular filaments, stickier cells, or cell duplets or triplets with one single nucleus contribute to artifactually lower the plating efficiency and enlarge the generation time of filamentous mutants. This could explain the apparent synergism observed between *rad51* and *rad52* mutations for both traits, in spite of the epistasis of *rad52* to *rad51* for cell viability. In fact, *rad52-ΔΔ* and *rad52-ΔΔ rad51-ΔΔ* strains exhibited a similar *g* when calculated directly from  $DO_{600}$  data (Table 2).

### 3.2. Distribution of cell size and DNA content in wild type and HR mutants

Microscopic inspection (DIC) of YPD log-phase cultures from single and double mutants carrying the *rad51* or *rad52* mutations revealed the presence of normal yeast as well as aberrant forms including both large rounded and filamentous cells of variable width (Fig. 1, row c). Alterations in cell morphology are usually taken as indicators of cell cycle defects which likely results in aneuploidy (Harrison et al., 2014). Therefore, we next measured the DNA content of log-phase growing cell populations of the several strains using flow cytometry. For both wild type and mutant strains, two major peaks were observed, as expected, corresponding to G1 (2N)- and G2 (4N)-phases of the cell cycle, but their relative percentages varied between the strains. Importantly, the percentage of cells in G2 (4N) directly correlated with the

generation time of each strain (Fig. 2A and Supplemental Fig. S4). For instance, the proportion of G2 cells was fourfold higher in populations of *rad52* single and double mutants (40–44%) than in wild type counterparts (11%), being intermediate in populations of *rad51* and *rad51 rad59* strains (27% and 31% respectively) (Fig. 2A and B; Supplemental Fig. S4). The contrary was true for cells in G1 (2N). Besides, we detected a significant percentage of 8N cells in cultures of strains carrying the *rad52* mutation, whereas this percentage was negligible in wild type and *rad59*, and significantly reduced (five to sixfold) in *rad51*, or *rad51 rad59* cultures (Fig. 2B). These results are consistent with the reported delay of *rad52* cells in the transition from G2 to G1 (Andaluz et al., 2006), and extend this phenotype, albeit weaker, to *rad51* cells as *rad52* is epistatic to *rad51*. Interestingly, a similar alteration in the ratio of G1/G2 cells in *rad52* mutants as compared to wild type was found in *S. cerevisiae* as well (Fig. 2A and B). Furthermore, cultures of *Scrad52-ΔΔ* contain a significant percentage of 8N cells not seen in wild type. Importantly, *rad51* and *rad52* mutants of *C. albicans* displayed a significant increase in the frequency of another unique category of cells, not seen in *S. cerevisiae rad52*, but recently described in *C. albicans* (Harrison et al., 2014). A microscopic analysis indicated that this unique cell population is heterogeneous as it has filamentous forms as well as giant aberrant yeast-like cells, and incipient filaments, as exemplified for the *rad52-ΔΔ rad59-ΔΔ* strain in Supplemental Fig. S5. Cells from the corresponding



**Fig. 2.** (A) Flow cytometry data from exponentially growing cultures of the indicated strains plotted as cell size (FSC) versus DNA content (FL1-A). (B) Bars represent percentages of cells with the indicated ploidy for each strain. Note that the percentage of 8N dropped from 5–6% in *rad52*, *rad52 rad59* and *rad51 rad52* mutants to 1% in *rad51* or *rad51 rad59* mutants, and to 0.1–0.2% in wild type and *rad59* strains. *C. albicans* strains are: 1, CAF2-1; 2, *rad59-ΔΔ*; 3, *rad51-ΔΔ*; 4, *rad51-ΔΔ rad59-ΔΔ*; 5, *rad52-ΔΔ*; 6, *rad52-ΔΔ rad59-ΔΔ*; 7, *rad51-ΔΔ rad52-ΔΔ*. *S. cerevisiae* strains are: 8, W303 diploid; 9, *rad52-ΔΔ* derivative.

regions of other filamentous HR mutants displayed similar morphologies (not shown).

As expected (Hickman et al., 2013), for each strain, cells with higher ploidy exhibited on average larger sizes (an example based on the results from the *rad52-ΔΔ* mutant is shown in Supplemental Fig. S6B). In addition, for 4 N and 8 N cells populations, cultures of mutants with increased generation times showed a relative enrichment in both rounded and elongated cells with larger sizes that maintain ploidy and, therefore, are deficient in DNA content. The abundance of these cells was as follows: *rad51 = rad51 rad59 < rad52 = rad52 rad59 = rad51 rad52* (Fig. 3A and B). In this analysis, we did not find any synergism between *rad51* and *rad52* mutations, *rad52* being again epistatic to *rad51*.

### 3.3. Distribution and shape of nuclei in single and double *rad51*, *rad52*, and *rad59* mutants

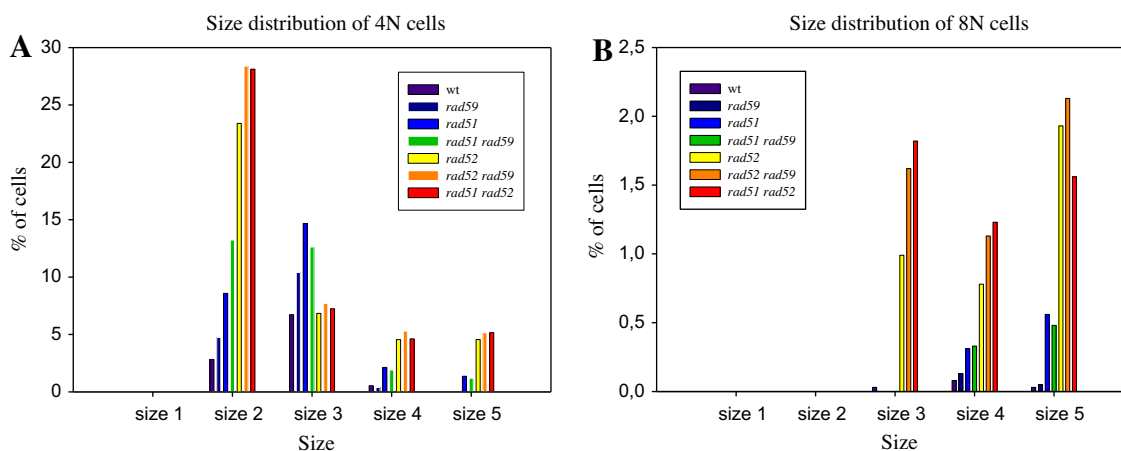
In contrast to the filamentation phenotypes induced by DNA-damaging agents (MMS, hydroxyurea), or to the trimeras induced or selected by azoles (Harrison et al., 2014) which are rather homogeneous, cells from HR mutants exhibit morphologies very diverse in both size and shape, forming a spectrum which makes them difficult to classify exclusively on the basis of microscopic observation. DAPI staining of filamentous single and double mutants grown in liquid YPD showed three frequent morphologies (Fig. 4A): (1) Yeast cells carrying large buds with a single nucleus located in either mother or in the daughter, or, quite frequently, as a thread between mother and daughter cells, an indication of defective nuclear segregation. (2) Filamentous cells containing one or more usually elongated nuclei connected to an anucleated yeast-like basal cell (note that some of these basal cells remain metabolically active, as deduced from FUN1 staining – Fig. 1, row b), and (3) filamentous forms and rounded yeast-like cells with significantly enlarged sizes exhibiting variable degrees of loosely compacted or decondensed chromatin. The two first morphologies were previously described for the *rad52* mutant (Andaluz et al., 2006), whereas the third one corresponds to the unique category detected by flow cytometry in the present study (see Supplemental Fig. S5). DAPI pictures from *rad59-ΔΔ* and wild type strains showed normal nuclei. Location of which is consistent with the reported nuclear dynamics exhibited by *C. albicans* yeast cells during cell cycle progression (Berman, 2006) (Fig. 4, top).

Septa were present between the elongated pseudohyphal cells forming filaments, as deduced from Calcofluor White staining

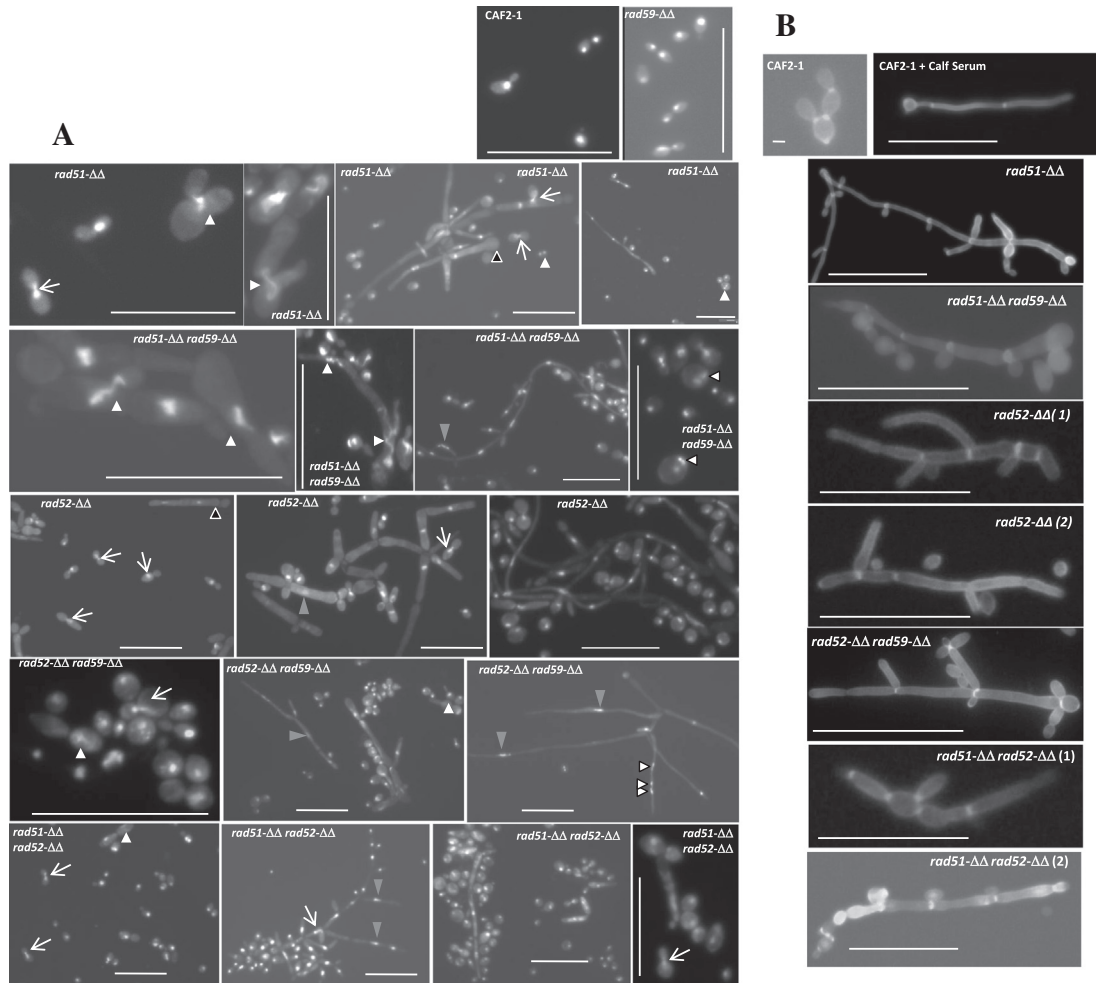
(Fig. 4B), but the frequency of the septa varied among the several filaments; in addition, bands of CFW positive material as well as large surface areas differing in fluorescence were not infrequent suggesting that aberrant morphology is accompanied by uncontrolled deposition of cell wall polysaccharides [see *rad52-ΔΔ(2)* and *rad51-ΔΔ rad52-ΔΔ(2)* pictures]. Wild type CAF2-1 cells used as controls exhibited the axial budding pattern and well marked septa at the constriction between mother and daughter cells when growing in the yeast form, or within the serum-induced germinative tube when growing in the hyphal form, as reported (Sudbery et al., 2004).

### 3.4. Effect of *rad51-ΔΔ* and *rad52-ΔΔ* mutations on the development of filaments and aberrant forms on agar plates

In an effort to uncover differences in patterns of cell division and filament development between *rad51-ΔΔ* and *rad52-ΔΔ* strains, we monitored the formation of colonies from single cells on solid YPD by lapse-time microscopy. As shown for *rad52-ΔΔ* (Fig. 5), filaments can originate from single cells in either G1 (column 1) or G2/M (column 2) or preexisting filaments (column 3) whose development can follow multiple patterns. When developing from single cells, at least two patterns were seen. In the first one (column 1), following budding the daughter cell polarizes growth to form a filament which buds at the tip at regular intervals and the bud polarizes growth again and forms a tube. The filaments may branch with time and the daughter cell may initiate a new filament but the mother basal cell remains inactive. This pattern corresponds to the typical picture seen in DAPI staining in which the basal cell lacks a nucleus (see Fig. 4). Of note, some of these basal cells remain metabolically active, as deduced from FUN1 staining (see Fig. 1, row e). In a second pattern (Fig. 5, column 2), following division mother and daughter cells conserve the ability to divide (probably because both carry a nucleus) and they or some of their descendants give rise to filaments. These filaments generate lateral buds at their tips that mimic pseudohyphal growth. For preexisting filaments (Fig. 5, column 3) many cells in each filament are able to form new filaments following budding. Some filaments mimic true hyphae, but upon elongation they may degenerate and eventually die (see arrow in Fig. 5, third and fourth columns). Collapsed filaments probably represent cells that do not receive a complete nucleus or are anucleated or have formed DNA replication intermediates whose resolution requires



**Fig. 3.** Size distribution of 4 N (A) and 8 N (B) cells in log-phase growing populations of the indicated mutants as determined by flow cytometry. For each strain and ploidy, cells from the indicated sizes were quantified and represented as percentage of the total cells. Sizes were defined as described in M&M. For further details, see Supplemental Fig. S6.



**Fig. 4.** DAPI (A) and Calcofluor White (B) staining from the indicated strains. (A) The most common morphologies observed are marked as follows. Regular arrows ( $\rightarrow$ ): nuclei as a thread between mother and daughter. White arrowheads ( $\blacktriangleright$ ): cells with loosely compacted chromatin. Gray arrowheads ( $\blacktriangleright$ ): elongated nuclei in filaments. Solid arrowheads with gray borders ( $\blacktriangleright$ ): anucleated cells in incipient or branched filaments. White arrows with gray borders ( $\Delta$ ): extremely large cells with two to multiple nuclei. Scale bar, 50  $\mu$ m, except for CAF2-1 (yeast) that represents 5  $\mu$ m (B). Detail of very elongated filaments and occasional yeast cells from the indicated strain stained to highlight the shape and the septa showing the typical pseudohyphal aberrant morphology. Two pictures of *rad52* and *rad51 rad52* has been included to denote the occasional irregular distribution of chitin among filamentous cells. Wild type CAF2-1 growing as yeast cells or as serum-induced germinative tubes has been included.

Rad52. Wild type CAF2-1 generated regular colonies formed by yeast cells (Fig. 5, left).

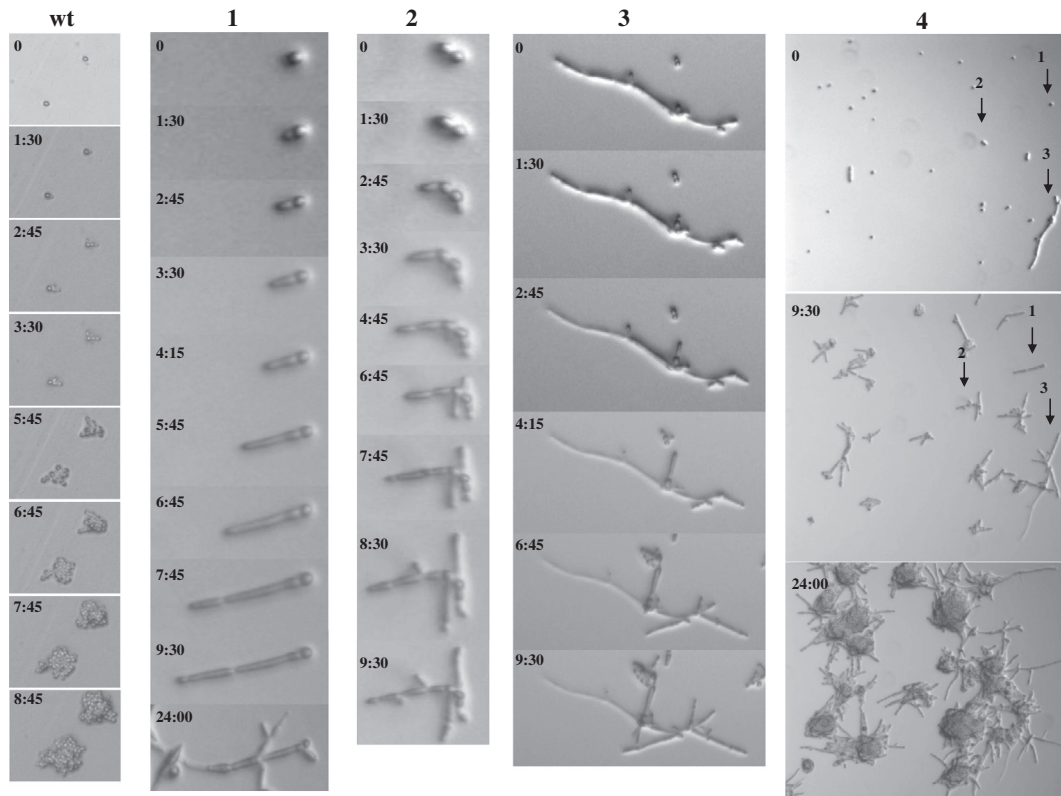
Development of filaments from single yeast cells of the rest of the filamentous mutants followed similar patterns. Regardless the mutant analyzed, a few plated cells did not divide, whereas more than 80% underwent mitosis within the first 1.5–2 h. For each mutant, the lack of synchrony in the first cell division as well as differences in the growth rate of the individual colonies contributed to the different sizes of the colonies, as previously described for *rad52* (Andaluz et al., 2011). Of note, in contrast to the prolonged filamentation in absence of cell division exhibited by *C. albicans* cells in response to induced cell cycle arrest (Berman, 2006), most filaments gave rise to lateral buds, regardless the mutant analyzed.

Seven hour-old microcolonies from the several filamentous mutants were rather similar each other with regard to the production of filaments (Supplemental Fig. S7). However, quantification of the number of filamentous cells generated from yeast cells from each mutant revealed that *rad52-ΔΔ* single and double mutants are more prone to develop filaments than *rad51-ΔΔ* counterparts, whereas the absence of *RAD59* did not cause any obvious alteration (Table 3). After 24 h, the fastest growing filamentous mutants (*rad51* and *rad51 rad59*) formed colonies with a dense central nucleus, whereas mutants with longer generation times formed

loose colonies which were significantly more filamentous (Fig. 1, row d). We conclude, that although both *rad51-ΔΔ* and *rad52-ΔΔ* mutants generated filamentous cells on agar plates, the absence of *RAD52* induced more cells to form filaments than the absence of *RAD51*. This result agrees with the higher proportion of unique class of filamentous cells detected by flow cytometry of log-phase *rad52-ΔΔ* growing populations compared to *rad51-ΔΔ* counterparts and confirms that *rad52* is epistatic to *rad51* for filamentation.

### 3.5. *RAD52* is epistatic to *RAD51* for colony morphology

When grown for 3 days at 30 °C on YPD agar plates, the *rad59-ΔΔ* mutant generated smooth rounded old colonies similar to those produced by wild type whereas the *rad51-ΔΔ* and *rad51-ΔΔ rad59-ΔΔ* strains generated slightly wrinkle colonies with ruffled periphery whose surface is frequently protruded by filamentous forms. Colonies from *rad52-ΔΔ* single and double mutants showed, in addition to ruffled projections, an increased central wrinkling and frequently acquired a cordiform or spiny appearance not seen in *rad51-ΔΔ* or *rad51-ΔΔ rad59-ΔΔ* strains (Fig. 1, row e). Two days later (5 day-old) colonies from wild type CAF2-1 and *rad59* strains had developed an abundant homogeneous peripheral rim formed

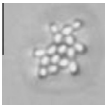




**Fig. 5.** The several patterns shown by the elongation of *rad52*- $\Delta\Delta$  cells. Time-lapse microscopy of *rad52*- $\Delta\Delta$  cells during their elongation at room temperature. DIC images were taken at the indicated times (hours). Numbers (1, 2, 3) in row 4 correspond to the selected colonies, shown in detail in rows 1, 2, and 3. In *rad52*- $\Delta\Delta$ , filaments can originate from single cells in either G1 (column 1) or G2/M (column 2) or preexisting filaments (column 3) whose development can follow multiple patterns. Left, development of a colony formed by wild type CAF2-1 cells.

**Table 3**

Cells of the indicated strains were spread on YPD plates at low density (5  $\mu$ l from a DO = 1 cell suspension on 5 cm diameter plates) to allow formation of colonies from individual cells. After 4 h at 30 °C, plates were photographed under the microscope ( $\times 10$ ) and microcolonies were classified as follows: Group 1: Yeast forming yeast; Group 2: Yeast forming filaments; Group 3: Branched filaments forming blastospores and new filaments. Pictures correspond to *rad51*- $\Delta\Delta$  cells. For each strain, a total of 340–500 microcolonies were counted.

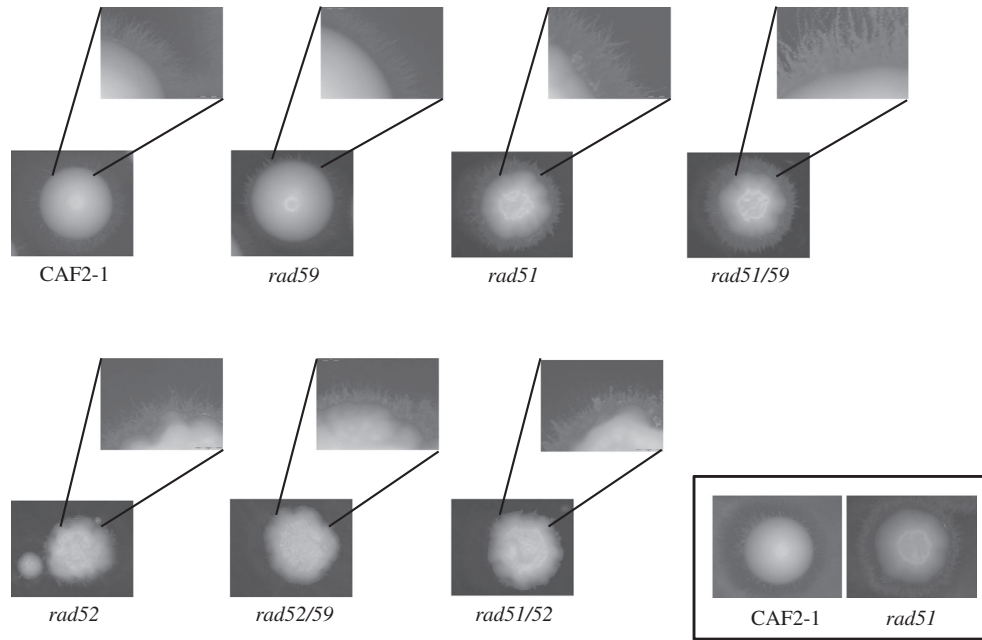
Strains	Group 1 (%)	Group 2 (%)	Group 3 (%)	Total microcolonies counted
CAF2-1	100	0	0	438
<i>rad59</i>	100	0	0	411
<i>rad51</i>	39.2	50.8	9.8	344
<i>rad51rad59</i>	44.8	47	8.1	370
<i>rad52</i>	26.4	56.2	17.28	457
<i>rad52rad59</i>	18.2	58.2	23.6	500
<i>rad51rad52</i>	26	58.4	15.6	423

by elongated hyphae covered by blastospores. This rim was thicker and more prominent in *rad51*- $\Delta\Delta$  colonies but visibly reduced in *rad52*- $\Delta\Delta$  counterparts, probably due to their decreased cell viability and/or the inability of aberrant cells to form true hyphae (Fig. 6). Importantly, for 7 day-old colonies the peripheral filamentous rim of CAF2-1 had surpassed that of *rad51* strains (see Fig. 6, inset), suggesting inability of the later in hyphal formation (see also Section 4). These defects were more clearly manifested by colonies formed on media that induce massive hyphal formation (Supplemental Fig. S8). On the nutrient limiting SPIDER medium, wild type and *rad59*- $\Delta\Delta$  colonies generated abundant peripheral filaments, which were reduced in *rad51*- $\Delta\Delta$  and *rad51*- $\Delta\Delta$  *rad59*- $\Delta\Delta$  mutants and drastically reduced in strains carrying the *rad52* mutation. Similar results were observed on medium M199, pH 7, an amino acid

enriched medium that mimics nutrient deprivation through use of amino acids (Liu et al., 1994). Finally, on Leés medium, 5 day old wild type and *rad59*- $\Delta\Delta$  colonies displayed abundant filamentation which was very much reduced in *rad51*- $\Delta\Delta$  and drastically reduced in *rad52*- $\Delta\Delta$  mutants.

Importantly, under all the conditions tested, colonies generated by double mutants *rad51*- $\Delta\Delta$  *rad59*- $\Delta\Delta$  or *rad52*- $\Delta\Delta$  *rad59*- $\Delta\Delta$  or *rad51*- $\Delta\Delta$  *rad52*- $\Delta\Delta$  were indistinguishable from those formed by *rad51*- $\Delta\Delta$  or *rad52*- $\Delta\Delta$  single mutants (Fig. 1, row e), confirming that *RAD59* plays a insignificant role on colony morphology. Besides, the double mutant *rad51*- $\Delta\Delta$  *rad52*- $\Delta\Delta$  formed colonies morphologically similar to those of *rad52*- $\Delta\Delta$  indicating epistasis of *rad52* to *rad51*. Finally, colonies from *rad50*- $\Delta\Delta$  and *mre11*- $\Delta\Delta$  strains closely resemble those formed by *rad51*- $\Delta\Delta$ , confirming



**Fig. 6.** Five day-old colonies of the indicated mutants on YPD, showing a magnification of the peripheral rim of filaments. Inset: Seven day old colonies from CAF2-1 and *rad51-ΔΔ* strains.

that impairment of an early step of HR may be sufficient for triggering filamentation.

As shown before for 3 day-old colonies of *rad52-ΔΔ* (Andaluz et al., 2006), mutant strains that spontaneously form elongated filamentous cells (i.e., *rad51-ΔΔ*, *rad51-ΔΔ rad59-ΔΔ*, *rad52-ΔΔ rad59-ΔΔ* and *rad51-ΔΔ rad52-ΔΔ*) invaded agar, whereas wild type and *rad59-ΔΔ* only invaded agar on media that induce hyphal growth (not shown).

#### 4. Discussion

This is the first report on interactions between mutations in HR genes that affect aberrant morphology in *C. albicans*. In this study, we show that Rad51 and Rad52 have partially overlapping functions that affect cell growth and morphology in *C. albicans* but Rad51 cannot substitute for most of these functions of Rad52 in a *RAD51 rad52-ΔΔ* strain. The lack of synergism between *rad51* and *rad52* mutations confirms that *rad52* is epistatic to *rad51* for all the morphological traits analyzed.

Our results establish a minor role, if any, for *RAD59* in growth rate and cell morphology in *C. albicans*. Regardless the growth conditions (liquid medium or agar plates), deletion of *CaRAD59* did not affect growth rate or cell morphology of wild type, *rad51-ΔΔ* or *rad52-ΔΔ* strains. Similarly, 24 h-old as well as 3- and 5 day-old colonies from *rad59*, *rad51 rad59*, and *rad52 rad59* were similar to those of wild type, *rad51* and *rad52* respectively. Furthermore, deletion of the *RAD59* gene did not appear to affect the nuclear cycle exhibited by parental CAF2-1.

##### 4.1. On the cellular and molecular bases of *rad51* and *rad52* filamentation

In a previous report, we attributed the slow growth and filamentation phenotypes of HR mutants to spontaneous DNA damage that requires Rad52 to repair. We also hypothesized that the subsequent cell cycle delay caused by unrepaired lesions likely triggers growth polarization giving rise to filamentous cells (Andaluz et al., 2006). Importantly, in addition to their tendency to filamentation, *rad51* and *rad52* cells have difficulties in the segregation of presumably

tetraploid nuclei between mother and daughter cells, which is frequently accompanied by decondensation of chromatin. This agrees well with the increase in 4 N shown by log-phase growing populations of these mutants. One possibility is that stuck nuclei contain unresolved replication intermediates. In *S. cerevisiae*, Rad51 and Rad52 are involved in the resolution of stalled replication forks that occur at DNA regions or structures that delay DNA replication (Mirkin and Mirkin, 2007). Candidates to fork stalling sites are direct tandem repeats which are abundant in *C. albicans* (Braun et al., 2005). In this scenario, we suggest that filamentation may be triggered by spontaneous DNA damage or accumulation of stalled DNA replication intermediates during S phase whose resolution requires the presence of Rad51 or Rad52. The fact that *rad51* strains filament strongly suggests that impairment of strand invasion during homologous recombination may trigger by itself filamentation. Filamentation of *rad52* cells might be due, at least in part, to deficiencies in loading of Rad51 into ssDNA invading nucleofilaments, which is catalyzed by Rad52. Impairment of other Rad51-independent DNA transactions that are Rad52-dependent may be responsible for the exacerbated cell (increased size and ploidy, accentuated aberrant morphology and decreased viability) and colony phenotypes of cells carrying the *rad52* mutation which was epistatic to *rad51*. It is important to note that spontaneous DNA damage is intrinsically stochastic. If the cell cycle stage at which damage occurs or is detected determines the final aberrant cell morphology, this would explain the wide spectrum of morphologies observed in liquid cultures of filamentous HR mutants.

An alternative, not mutually exclusive, intriguing possibility is that filamentation is caused by the presence of defective spindle apparatus which could also cause decondensed chromatin. Recently, Rad51 and Rad52 have been implied in the deposition of the centromeric chromatin Cse4 and kinetochore assembly in *C. albicans* (Mitra et al., 2014). In support of this possibility, DAPI pictures from filamentous HR mutants very much resemble those of wild type (CAF2-1) cells treated with nocodazole, a drug that causes disassembly of mitotic spindles (Bai et al., 2002).

Impairment in resolution of stalling forks or centromere dysfunction would result in a defective anaphase, which in turn could explain the increased frequency in chromosome loss/truncation

events shown by *rad52* (Andaluz et al., 2011) and *rad51* mutants (our unpublished results) of *C. albicans*. In this regard, nocodazole treated wild type *C. albicans* cells also showed an increased frequency of chromosome mis-segregation (Bai et al., 2002).

Of note, filamentation has not been reported in *S. cerevisiae* *rad51* or *rad52* mutants. One possibility is that *S. cerevisiae* simply lacks components of the polarization machinery responsible for the constitutive filamentation of *C. albicans* HR mutants. Alternatively, differences between both yeasts in DNA damage checkpoints (Harrison et al., 2014; Loli-Krippelber et al., 2014) or in the requirements for the activation of the spindle checkpoint could account for their differential ability to filament. *S. cerevisiae* carries DNA sequence dependent genetically determined point centromeres, whereas formation of *C. albicans* centromeres, and therefore in turn kinetochore-spindle microtubule interaction is sequence independent epigenetically regulated and centromeric chromatin deposition requires Rad51 and Rad52 (Mitra et al., 2014; Sanyal et al., 2004). It is unlikely that the increase in ploidy detected in filamentous HR mutants triggers filamentation, since fluconazole-treated *C. albicans* cells which also showed an increase in DNA content did not filament (Harrison et al., 2014). Increase in ploidy could be instead responsible for the enlarged cell size showed by subpopulations of HR mutants.

Colony phenotype is a complex trait that can be influenced by multiple factors. It is likely that the decreased ability of *rad52*- $\Delta\Delta$  and, to a lesser extent, *rad51* strains, to form filamentous colonies on hyphal-inducing media (Spider, M199 and Leés medium) is derived from their lower cell viability as well as by the lower ability of aberrant cells to form true hyphae compared to wild type and *rad59* strains. On the contrary, on rich YPD medium, the filamentous appearance shown by 24 h- and 3 day-old colonies from *rad51* and *rad52* mutants is due to formation of aberrant but not hyphal filaments, whereas wild type and *rad59* colonies, which do not form aberrant filaments, remained smooth. Upon prolonged incubation, nutrient depletion caused by colony growth induces hyphal formation. Unlike wild type and *rad59* strains, many aberrant cells from filamentous mutants die or are unable to form hyphae resulting in a relative decrease in the amount of peripheral filaments, as observed for *rad52* (5 day-old colonies) and later on (7 day-old colonies) for *rad51*.

A strong filamentation phenotype similar to that reported here for *rad51* and *rad52* single and double mutants has been observed in other HR (*rad54*, *rad50* and *mre11*) as well as in histone modifiers (*rtt109*, *hat1*) mutants of *C. albicans*. In *S. cerevisiae* RAD50 and MRE11 are involved in DNA resection to form ssDNA tails onto which Rad51 is loaded (Mimitou and Symington, 2009) as well as in Cse4 deposition (Mitra et al., 2014), whereas RAD54 is involved in diverse functions including stabilization of Rad51 nucleofilament and stimulation of strand invasion mediated by Rad51 (Heyer et al., 2006; Mazin et al., 2003; Petukhova et al., 1998; Wolner and Peterson, 2005). Therefore, it is not surprising that both *rad50* and *mre11* strains formed *rad51*-like colonies in several media (Supplemental Fig. S8). These observations agree with our suggestion that impairment of an early step on HR or Cse4 deposition/kinetochore assembly triggers growth polarization in *C. albicans* (Mitra et al., 2014). Filamentation of deletants in histone modifiers *hat1* and *rtt109* could also be explained by defects in DNA repair or impairment on putative Cse4 modifications which could be needed for its deposition at centromeres (Lopes da Rosa et al., 2010; Mitra et al., 2014; Tscherner et al., 2012). On the contrary, a *C. albicans* *mec1* null mutant, which is impaired in the detection of DNA damage that triggers the DNA-damage checkpoint, is only poorly filamentous (Legrand et al., 2011). One possibility is that Mec1 has a minor role in detecting the spontaneous damage that triggers filamentation or in Cse4

deposition. We are currently dissecting the signaling pathway that triggers growth polarization in response to HR impairment.

## Acknowledgments

This study was supported by grant SAF2010-18948 from Ministerio de Educación y Ciencia to GL and Ayuda a Grupos from Junta de Extremadura. We also thank Belén Naranjo for constructing the double mutants *rad51 rad59*, *rad52 rad59*, and *rad51 rad52* and Belén Hermosa for technical support. Fátima García-Prieto performed preliminary experiments concerning growth rate and colony morphology. JGR was supported by the recipient of a fellowship from the SAF2010-18948 grant. AB was supported by a fellowship from Junta de Extremadura. BH and BN were partially supported by Junta de Extremadura. We thank Dr. Kaustuv Sanyal for critical reading of the manuscript.

## Appendix A. Supplementary material

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at <http://dx.doi.org/10.1016/j.fgb.2014.10.016>.

## References

- Andaluz, E. et al., 2006. Rad52 depletion in *Candida albicans* triggers both the DNA-damage checkpoint and filamentation accompanied by but independent of expression of hypha-specific genes. *Mol. Microbiol.* 59, 1452–1472.
- Andaluz, E. et al., 2007. Loss and fragmentation of chromosome 5 are major events linked to the adaptation of *rad52*- $\Delta\Delta$  strains of *Candida albicans* to sorbose. *Fungal Genet. Biol.* 44, 789–798.
- Andaluz, E. et al., 2011. Rad52 function prevents chromosome loss and truncation in *Candida albicans*. *Mol. Microbiol.* 79, 1462–1482.
- Bai, Y., Symington, L.S., 1996. A Rad52 homolog is required for RAD51-independent mitotic recombination in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genes Dev.* 10, 2025–2037.
- Bai, C. et al., 2002. Spindle assembly checkpoint component CaMad2p is indispensable for *Candida albicans* survival and virulence in mice. *Mol. Microbiol.* 45, 31–44.
- Berman, J., 2006. Morphogenesis and cell cycle progression in *Candida albicans*. *Curr. Opin. Microbiol.* 9, 595–601.
- Braun, B.R. et al., 2005. A human-curated annotation of the *Candida albicans* genome. *PLoS Genet.* 1, 36–57.
- Ciudad, T. et al., 2004. Homologous recombination in *Candida albicans*: role of CaRad52p in DNA repair, integration of linear DNA fragments and telomere length. *Mol. Microbiol.* 53, 1177–1194.
- Coic, E. et al., 2008. Mechanisms of Rad52-independent spontaneous and UV-induced mitotic recombination in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 179, 199–211.
- Davis, A.P., Symington, L.S., 2004. RAD51-dependent break-induced replication in yeast. *Mol. Cell. Biol.* 24, 2344–2351.
- Fonzi, W.A., Irwin, M.Y., 1993. Isogenic strain construction and gene mapping in *Candida albicans*. *Genetics* 134, 717–728.
- García-Prieto, F. et al., 2010. Role of the homologous recombination genes RAD51 and RAD59 in the resistance of *Candida albicans* to UV light, radiomimetic and anti-tumor compounds and oxidizing agents. *Fungal Genet. Biol.* 47, 433–445.
- Gomez-Raja, J. et al., 2008. A single SNP, G929T (Gly310Val), determines the presence of a functional and a non-functional allele of HIS4 in *Candida albicans* SC5314: detection of the non-functional allele in laboratory strains. *Fungal Genet. Biol.* 45, 527–541.
- Harrison, B.D. et al., 2014. A tetraploid intermediate precedes aneuploid formation in yeasts exposed to fluconazole. *PLoS Biol.* 12, e1001815.
- Heyer, W.D. et al., 2006. Rad54: the Swiss Army knife of homologous recombination? *Nucl. Acids Res.* 34, 4115–4125.
- Hickman, M.A. et al., 2013. The 'obligate diploid' *Candida albicans* forms mating-competent haploids. *Nature* 494, 55–59.
- Hoot, S.J. et al., 2011. The role of *Candida albicans* homologous recombination factors Rad54 and Rdh54 in DNA damage sensitivity. *BMC Microbiol.* 11, 214.
- Ivanov, E.L. et al., 1996. Genetic requirements for the single-strand annealing pathway of double-strand break repair in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 142, 693–704.
- Kadosh, D., 2013. Shaping up for battle: morphological control mechanisms in human fungal pathogens. *PLoS Pathog.* 9, e1003795.
- Kang, L.E., Symington, L.S., 2000. Aberrant double-strand break repair in *rad51* mutants of *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* 20, 9162–9172.
- Krogh, B.O., Symington, L.S., 2004. Recombination proteins in yeast. *Annu. Rev. Genet.* 38, 233–271.
- Kucsera, J. et al., 2000. Simple detection method for distinguishing dead and living yeast colonies. *J. Microbiol. Methods* 41, 19–21.

- Lee, K.L. et al., 1975. Amino acid synthetic media for fungal pathogens based on aminopeptidase specificities: *histoplasma capsulatum*, *Blastomyces dermatitidis*, *Paracoccidioides brasiliensis* and *Cryptococcus neoformans*. *Sabouraudia* 13, 142–147.
- Legrand, M. et al., 2007. Role of DNA mismatch repair and double-strand break repair in genome stability and antifungal drug resistance in *Candida albicans*. *Eukaryot. Cell.* 6, 2194–2205.
- Legrand, M. et al., 2011. The contribution of the S-phase checkpoint genes MEC1 and SGS1 to genome stability maintenance in *Candida albicans*. *Fungal Genet. Biol.* 48, 823–830.
- Liu, H. et al., 1994. Suppression of hyphal formation in *Candida albicans* by mutation of a STE12 homolog. *Science* 266, 1723–1726.
- Lockhart, S.R. et al., 2002. In *Candida albicans*, white-opaque switchers are homozygous for mating type. *Genetics* 162, 737–745.
- Loll-Kripplleber, R. et al., 2014. A study of the DNA damage checkpoint in *Candida albicans*: uncoupling of the functions of Rad53 in DNA repair, cell cycle regulation and genotoxic stress-induced polarized growth. *Mol. Microbiol.* 91, 452–471.
- Lopes da Rosa, J. et al., 2010. Histone acetyltransferase Rtt109 is required for *Candida albicans* pathogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 107, 1594–1599.
- Malkova, A. et al., 1996. Double-strand break repair in the absence of RAD51 in yeast: a possible role for break-induced DNA replication. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93, 7131–7136.
- Mazin, A.V. et al., 2003. A novel function of Rad54 protein. Stabilization of the Rad51 nucleoprotein filament. *J. Biol. Chem.* 278, 14029–14036.
- Mimitou, E.P., Symington, L.S., 2009. Nucleases and helicases take center stage in homologous recombination. *Trends Biochem. Sci.* 34, 264–272.
- Mirkin, E.V., Mirkin, S.M., 2007. Replication fork stalling at natural impediments. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 71, 13–35.
- Mitra, S. et al., 2014. Rad51-Rad52 Mediated maintenance of centromeric chromatin in *Candida albicans*. *PLoS Genet.* 10, e1004344.
- Mortensen, U.H. et al., 1996. DNA strand annealing is promoted by the yeast Rad52 protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93, 10729–10734.
- Nimonkar, A.V. et al., 2009. Rad52 promotes second-end DNA capture in double-stranded break repair to form complement-stabilized joint molecules. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 106, 3077–3082.
- Noda, T., 2008. Viability assays to monitor yeast autophagy. *Methods Enzymol.* 451, 27–32.
- Paques, F., Haber, J.E., 1999. Multiple pathways of recombination induced by double-strand breaks in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 63, 349–404.
- Petukhova, G. et al., 1998. Catalysis of homologous DNA pairing by yeast Rad51 and Rad54 proteins. *Nature* 393, 91–94.
- Pohl, T.J., Nickoloff, J.A., 2008. Rad51-independent interchromosomal double-strand break repair by gene conversion requires Rad52 but not Rad55, Rad57, or Dmcl. *Mol. Cell. Biol.* 28, 897–906.
- Prado, F. et al., 2003. Mitotic recombination in *Saccharomyces cerevisiae*. *Curr. Genet.* 42, 185–198.
- Sanyal, K. et al., 2004. Centromeric DNA sequences in the pathogenic yeast *Candida albicans* are all different and unique. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101, 11374–11379.
- Shapiro, R.S. et al., 2011. Regulatory circuitry governing fungal development, drug resistance, and disease. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 75, 213–267.
- Shi, Q.M. et al., 2007. Critical role of DNA checkpoints in mediating genotoxic-stress-induced filamentous growth in *Candida albicans*. *Mol. Biol. Cell.* 18, 815–826.
- Sudbery, P.E., 2011. Growth of *Candida albicans* hyphae. *Nat. Rev. Microbiol.* 9, 737–748.
- Sudbery, P. et al., 2004. The distinct morphogenic states of *Candida albicans*. *Trends Microbiol.* 12, 317–324.
- Sugiyama, T. et al., 1998. DNA annealing by RAD52 protein is stimulated by specific interaction with the complex of replication protein A and single-stranded DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95, 6049–6054.
- Symington, L., 2002. Role of RAD52 epistasis group genes in homologous recombination and double-strand break repair. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 66, 630–670 (table of contents).
- Tscherner, M. et al., 2012. The histone acetyltransferase Hat1 facilitates DNA damage repair and morphogenesis in *Candida albicans*. *Mol. Microbiol.* 86, 1197–1214.
- Walther, A., Wendland, J., 2003. An improved transformation protocol for the human fungal pathogen *Candida albicans*. *Curr. Genet.* 42, 339–343.
- Watson, J.V., 1991. *Introduction to Flow Cytometry*. Cambridge University Press.
- Wolner, B., Peterson, C.L., 2005. ATP-dependent and ATP-independent roles for the Rad54 chromatin remodeling enzyme during recombinational repair of a DNA double strand break. *J. Biol. Chem.* 280, 10855–10860.







