

DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA Y ECOLOGÍA

CLONACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE UNA
HIDROFOBINA DE CLASE II (CaHPB) DE CANDIDA
ALBICA

BEATRIZ PEDRÓS MARÍ

UNIVERSITAT DE VALENCIA
Servei de Publicacions
2003

Aquesta Tesi Doctoral va ser presentada a València el dia 16 de Desembre de 2003 davant un tribunal format per:

- D. Rafael Sentandreu Ramón
- D^a. María Amelia Murgui Faubel
- D. Ángel Domínguez Olavarri
- D. Antonio Juárez Jiménez
- D. Miguel Gobernado Serrano

Va ser dirigida per:

D. José Pedro Martínez García

D. Manuel Casanova Monroig

©Copyright: Servei de Publicacions
Beatriz Pedrós Marí

Depòsit legal:

I.S.B.N.:84-370-5890-2

Edita: Universitat de València
Servei de Publicacions
C/ Artes Gráficas, 13 bajo
46010 València
Spain
Telèfon: 963864115



VNIVERSITAT Æ VALÈNCIA

FACULTAT DE FARMÀCIA

DEPARTAMENT DE MICROBIOLOGIA I ECOLOGIA

**“CLONACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE UNA
HIDROFOBINA DE CLASE II (CaHPB) DE
Candida albicans”**

TESIS DOCTORAL

Presentada por:

Beatriz Pedrós Marí

Valencia, 2003.



VNIVERSITATIS VALÈNCIAE

FACULTAT DE FARMÀCIA
DEPARTAMENT DE MICROBIOLOGIA I ECOLOGIA

**“CLONACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE UNA
HIDROFOBINA DE CLASE II (CaHPB) DE
Candida albicans”**

TESIS DOCTORAL
presentada por:

Beatriz Pedrós Marí
Valencia, Julio 2003



VNIVERSITAT D VALÈNCIA
FACULTAT DE FARMÀCIA
DEPARTAMENT DE MICROBIOLOGIA I ECOLOGIA

D. José Pedro Martínez García, Catedrático de la Universitat de València y D. Manuel Casanova Monroig, profesor titular de la Universitat de València,

CERTIFICAN:

Que el trabajo presentado por la Lda. **Beatriz Pedrós Marí**, titulado “Clonación y Caracterización de una hidrofobina de clase II (CaHPB) de *Candida albicans*”, ha sido realizado en la Unidad Docente de Microbiología del Departamento de Microbiología y Ecología de la Universitat de València, bajo nuestra dirección y asesoramiento.

Concluido el trabajo experimental y bibliográfico, autorizamos la presentación de esta Tesis Doctoral, para que sea juzgada por el tribunal correspondiente.

Valencia, Marzo de 2003

José Pedro Martínez García

Manuel Casanova Monroig

La presente Tesis Doctoral ha sido financiada por las siguientes ayudas:

PROYECTO PM97-0098 concedido por la Secretaría de Estado de Universidades, Investigación y Desarrollo (Subdirección de Formación y Promoción del Conocimiento), Ministerio de Ciencia y Tecnología, con título:

“Caracterización molecular de los receptores de la superficie celular de hongos patógenos oportunistas (*Candida albicans* y *Aspergillus fumigatus*) implicados en la interacción con ligandos del hospedador”.

PROYECTO BMC2001-2975 concedido por la Dirección General de Investigación, Ministerio de Ciencia y Tecnología, con título:

“Caracterización molecular y funcional de productos génicos relacionados y/o asociados con el fenómeno del dimorfismo en el hongo patógeno oportunista *Candida albicans*. Papel y utilidad potencial de los mismos en la virulencia y para el inmunodiagnóstico y la generación de vacunas”.

Deseo expresar mi agradecimiento a todas aquellas personas que han contribuido de alguna forma a la realización de este trabajo:

Al Dr. José Pedro Martínez y al Dr. Manuel Casanova, directores de este trabajo, por su apoyo y amistad, así como a la Dra. Amelia Murgui por su incondicional ayuda en todo momento.

Al Dr. Miguel Payá y a la Dra. Isabel Guillén del Departamento de Farmacología, por la ayuda prestada en los experimentos de radiactividad e inmunoprecipitación.

Al Dr. Carlos Monteagudo del Hospital Clínico Universitario de Valencia, por los ensayos de inmunohistoquímica.

Al Dr. Pemán, Dr. Córdoba y Dr. Molina del Hospital la Fe de Valencia, por prestarme sueros para realizar ensayos y ayudarme en los experimentos.

A todo el Departamento de Bioquímica, por dejarme utilizar algunos aparatos de su laboratorio especialmente el espectrofotómetro y al Departamento de Farmacología por la ayuda con el liofilizador.

A Pablo y a José Vicente, por haberme ayudado en la redacción de algunos capítulos de la tesis y a Ana de cultivos celulares, por ayudarme con las fotos de microscopía.

Me gustaría agradecer a todos los miembros de la Sección de Farmacia del Departamento de Microbiología la ayuda prestada en todo momento. A mis compañeras de laboratorio Verónica, Ana, Amparo, Luisa, Chelo, Patricia y Eva, por todo el tiempo que hemos pasado juntas. A Rosa, Lucrecia, Ana M., Ana G., Hassan, Claudia P., Claudia B., Sergi, Almudena, Isa, José, Geno, Asun, Yolanda, Isabel, Fátima, Rocío, Toni y Jakie, Dolores, Conchi, Inma, Helena, Guillermo, Santi y María, por su constante optimismo.

Me gustaría también mencionar a José María, Adelais, Marga y Teresa, del Departamento de Tecnología Farmacéutica, porque me animaron desde el principio a embarcarme en el mundo de la ciencia.

Quiero dar las gracias de forma especial a las personas que siempre han estado a mi lado, me han ayudado económicamente y me han apoyado en los momentos más difíciles y sobre todo expresarles mi más sincero cariño por haber confiado en mí. Gracias a mi familia, en especial a mis padres, por saber valorar el esfuerzo y darme la oportunidad de poder crecer humanamente e intelectualmente. Gracias a Paco, Paloma y Amparo por ser mi familia. Gracias también a José, la persona que siempre ha estado a mi lado animándome a superarme día a día y a sacar lo mejor de mí. Gracias a Pepe y a M^a Carmen por aceptarme con tanto cariño.

Finalmente, quiero agradecer a esas personas que aunque muy lejanas a la investigación, durante estos años de trabajo también han aportado sus momentos agradables. A Martín y a Manolo, del Consejo Valenciano del Movimiento Europeo, por su fiel amistad y por los buenos ratos que hemos pasado juntos. A mis amigas Elsa, Rosa, Paula, Esther, Emilia, Susana, Inma y Luz, gracias por vuestro apoyo incondicional y por tantos años de alegrías.

*A mis padres y a José
con todo mi cariño*

ABREVIATURAS

BSA:	albúmina de suero bovino
ConA:	concanavalina A
HSC:	hidrofobicidad de la superficie celular
CWP:	proteínas de pared celular
EDTA:	ácido etilendiamintetraacético
FITC:	isotiocionato de fluoresceína
IFI:	inmunofluorescencia indirecta
IPTG:	isopropil β -D-tiogalactopiranosido
kb:	kilobase
kDa:	kilodalton
M:	molar
mM:	milimolar
nm:	nanómetros
DO:	densidad óptica
SDS:	dodecil sulfato sódico
Tris:	tris (hidroximetil) amino metano
ORF:	“open reading frame” → marco abierto de lectura
dNTPs:	deoxinucleótidos trifosfato
PAb:	anticuerpo policlonal
PEG:	polietilenglicol
pfu:	unidades formadoras de calvas
PMSF:	fluoruro de fenilsulfonilmetilo
rpm:	revoluciones por minuto
X-Gal:	5-bromo-4-cloro-3-indolil β -D-galactopiranosido

ÍNDICE

I. INTRODUCCIÓN	1
1. Aspectos generales de <i>Candida albicans</i> .	2
2. Importancia de <i>C. albicans</i> como agente patógeno.	3
2.1. Tipos de candidiasis.	3
2.1.1. Candidiasis superficiales.	4
2.1.2. Candidiasis sistémicas.	5
2.2. Diagnóstico.	6
2.3. Tratamiento.	7
2.4. Otras especies de <i>Candida</i> con interés patógeno.	10
3. Pared celular de <i>C. albicans</i> .	11
3.1. Componentes estructurales.	15
3.1.1. β -Glucano.	15
3.1.2. Quitina.	17
3.2. Componentes de la matriz.	17
3.2.1. Manano.	18
3.2.1.1. Enlaces N-glicosídicos.	18
3.2.1.2. Enlaces O-glicosídicos.	19
3.3. Lípidos y proteínas.	20
3.3.1. Glicolípidos.	20
3.3.2. Proteínas asociadas a la pared celular.	20
4. Factores de virulencia de <i>C. albicans</i> .	23
4.1. Dimorfismo.	25

4.2. Cambio fenotípico o “switching”.	29
4.3. Secreción de enzimas hidrolíticas.	31
4.3.1. Aspartil proteasas (Saps).	31
4.3.2. Fosfolipasas.	31
4.4. Proteína inmunosupresora y mitogénica de células B (ISM).	32
4.5. Adhesión.	32
4.5.1. Adhesión a proteínas séricas.	34
4.5.2. Adhesión a proteínas de la matriz extracelular.	34
4.5.3. Otros factores de adhesión.	34
4.5.3.1. Mananos.	34
4.5.3.2. Fimbrias.	35
4.5.3.3. Lectinas.	35
4.5.3.4. Aglutininas.	36
4.5.3.5. Hidrofobicidad de la superficie celular (CSH).	36
4.5.3.6. Proteínas de unión a material plástico. Biofilms.	38
5. Hidrofobinas.	40
5.1. Características generales y tipos de hidrofobinas.	40
5.2. Autoensamblaje de las hidrofobinas.	47
5.3. Propiedades Bioquímicas y Biofísicas de las hidrofobinas.	49
5.4. Funciones de las hidrofobinas.	54
5.4.1. Papel de las hidrofobinas en el escape de la hifa del ambiente acuoso.	54
5.4.2. Papel de las hidrofobinas en la patogenicidad.	58
5.4.2.1. Mecanismo de defensa.	58
5.4.2.2. Adhesión.	59

5.4.2.3. Toxinas.	61
5.5. Implicación de las hidrofobinas en la composición de la pared celular de las hifas.	63
5.6. Posibles aplicaciones y propuestas.	65
5.6.1. Ingeniería genética de hidrofobinas.	65
5.6.2. Hidrofobinas en aplicaciones médicas y técnicas.	67
6. Objeto y justificación del trabajo.	69
II. MATERIALES Y MÉTODOS	71
1. Cepas utilizadas.	72
1.1. Cepas bacterianas.	72
1.2. Cepas fúngicas.	72
2. Plásmidos.	73
3. Cebadores.	78
4. Medios de cultivo.	79
4.1. Bacterias.	79
4.2. Levaduras.	81
5. Condiciones de cultivo.	81
6. Amplificación de DNA mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR).	82
7. Electroforesis de DNA.	83
8. Purificación de fragmentos de DNA a partir de geles de agarosa.	84
9. Cuantificación de DNA.	85
10. Digestión de DNA con enzimas de restricción.	86
11. Ligamiento de fragmentos de DNA.	86

12. Transformación de <i>E. coli</i> .	87
12.1. Obtención de células competentes.	87
12.2. Transformación.	88
12.3. Selección de transformantes.	88
12.4. Análisis de los transformantes.	88
13. Purificación de DNA.	89
13.1. Purificación de DNA plasmídico de <i>E. coli</i> .	89
13.1.1. Purificación a pequeña escala (minilisis alcalina).	89
13.1.2. Purificación a gran escala.	90
13.1.3. Purificación para secuenciación.	91
13.2. Purificación de DNA cromosomal de levaduras.	91
14. Marcaje no radiactivo de sondas de DNA.	92
15. Detección de secuencias de DNA mediante hibridación (Southern blot).	93
16. Fijación de DNA a filtros de nylon.	94
17. Hibridación DNA/DNA y revelado.	94
17.1. Prehibridación.	95
17.2. Hibridación.	95
17.3. Lavados.	95
17.4. Revelado inmunológico.	96
18. Secuenciación de DNA.	97
19. Análisis de secuencias de DNA.	97
20. Inmunorrastreo de una genoteca de cDNA con un anticuerpo policlonal específico de micelio.	99
20.1. Amplificación de los bacteriófagos recombinantes inmunopositivos.	100

20.2. Determinación del título del lisado de fagos.	101
21. Rastreo de una librería genómica.	101
22. Obtención de anticuerpos específicos en conejos. Pautas de inmunización.	103
23. Inmunofluorescencia indirecta (IFI).	103
24. Estudio inmunohistoquímico con el anticuerpo policlonal sobre muestras tisulares humanas de Candidiasis sistémicas.	104
25. Solubilización de componentes de la pared celular de ambas fases morfológicas (levadura y micelio) de <i>Candida albicans</i> .	105
26. Solubilización de hidrofobinas de la pared celular de ambas fases morfológicas (levadura y micelio) de <i>Candida albicans</i> .	108
27. Adhesión a perlas de vidrio.	109
28. Electroforesis en geles de dodecil sulfato sódico (SDS)-poliacrilamida.	109
29. Tinción de proteínas en geles de poliacrilamida y fluorografía.	110
30. Transferencia de polipéptidos (Western blotting).	111
31. Inmunodetección de polipéptidos transferidos a membranas de PVDF.	111
32. Marcaje radiactivo de péptidos con [S^{35}] cisteína.	112
33. Determinación de la concentración proteica.	113
34. Determinación de la concentración de azúcares.	113
35. Inducción a la expresión de la proteína. Determinación de la solubilidad.	114
36. Cuantificación de la síntesis de proteínas específicas por inmunoprecipitación.	115
III. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	117
1. Aislamiento, clonación y caracterización de un clon de cDNA de <i>C. albicans</i> que codifica para un péptido inmunorreactivo con el anticuerpo mPAb.	118

1.1. Inmunorrastreo de una genoteca de cDNA con el anticuerpo policlonal mPAb.	118
1.2. Análisis de los clones recombinantes.	120
1.3. Clonación del gen completo contenido en el contig 4-2948.	125
1.4. Análisis Southern del DNA de <i>C. albicans</i> .	131
2. Análisis informático de la secuencia nucleotídica clonada.	132
2.1. Análisis de la región promotora.	132
2.2. Composición aminoacídica, peso molecular y secuencias repetidas.	133
2.3. Características Físico-Químicas.	135
2.4. Localización subcelular.	138
2.5. Dominios conservados.	141
2.6. Estructura Secundaria.	141
2.7. Posibles glicosilaciones.	143
2.8. Posibilidad de formación de puentes disulfuro.	144
3. Análisis funcional de la secuencia: búsqueda de homólogos.	145
4. Caracterización molecular y funcional de la hidrofobina.	153
4.1. Inmunofluorescencia indirecta.	154
4.2. Inmunotransferencia (Western immunoblotting).	155
4.3. Estudio de la especie CaHpbp mediante marcaje con L-[³⁵ S] cisteína.	164
4.4. Interacciones en una interfase agua/aceite.	169
4.5. Subclonaje de la región codificante del gen <i>CaHPB</i> de <i>C. albicans</i> en el vector de expresión pGEX-4T-3.	171
4.6. Inducción de la expresión de la CaHpbp.	174
4.7. Expresión de la especie CaHpbp <i>in vivo</i> .	177

IV. CONCLUSIONES

179

V. REFERENCIAS

183

I. INTRODUCCIÓN

*“Dejamos de temer aquello que se ha aprendido a entender”
Marie Curie*

1. Aspectos generales de *Candida albicans*.

Candida albicans fue descrita por primera vez con el nombre de *Oidium albicans* en el año 1853 por Robin y en 1890 Zopf la denominó *Monilia albicans*, siendo Berkhout, en 1923, quien propuso su actual denominación (**Pereiro, 1996**). Es la especie de *Candida* aislada con mayor frecuencia, aunque en la actualidad ha aumentado la proporción de infecciones producidas por otras especies de *Candida*. Este microorganismo, eucariota patógeno oportunista, se encuentra ampliamente difundido en la naturaleza, hallándose frecuentemente presente como comensal inocuo en la piel, mucosa bucal, faríngea y vaginal, así como en el intestino de los hombres y otros animales de sangre caliente, pudiendo manifestar carácter patógeno bajo determinadas condiciones. Las infecciones que produce se denominan genéricamente candidiasis, incluyendo desde infecciones de la mucosa oral y vaginal, que en ocasiones presentan un carácter crónico, hasta manifestaciones mucho más graves como la miocarditis candidiásica y las septicemias agudas, que pueden llegar a provocar la muerte del paciente.

C. albicans se encuentra presente en la microbiota normal del tracto gastrointestinal. Algunos autores han atribuido las infecciones por *C. albicans*, exclusivamente a fuentes endógenas de infección (desde el mismo paciente), considerándose su paso a sangre principalmente desde el tubo digestivo y con una menor frecuencia desde la piel. Esta hipótesis ha sido confirmada mediante métodos de tipificación molecular (**Reagan et al., 1990; Van Belkum et al., 1994; Voss et al., 1994; Úbeda et al., 1999**). Otros autores, sin embargo, han atribuido a fuentes exógenas la aparición de brotes epidémicos (**Voss et al., 1995; Robert et al., 1995**). *C. albicans* no soporta la desecación, pero por el contrario sobrevive largo tiempo en ambientes húmedos tales como cepillos dentales, ropa, cremas y productos cosméticos.

Se trata de un hongo diploide que ha sido clasificado desde el punto de vista taxonómico dentro del orden *Cryptococcales* perteneciente al grupo de los *Deuteromycetes* u hongos imperfectos. Esta categoría comprende un importante conjunto de hongos en los que no ha sido descrita fase sexual, y sí la reproducción

asexual mediante la formación de conidios (Carile and Watkinson, 1994). No obstante, una vez secuenciado el genoma de *Candida albicans* en su totalidad, ha sido realizado un análisis genómico comparativo entre *C. albicans* y *Saccharomyces cerevisiae* con el objeto de evaluar si *Candida* posee un repertorio genético que pudiera soportar un ciclo sexual completo. De este modo, han sido encontradas muchas homologías de genes implicados en la iniciación de la meiosis, recombinación cromosómica y formación de complejos sinaptonémicos, cuya existencia se cree necesaria para que se produzca el entrecruzamiento (Tzung *et al.*, 2001).

En la actualidad existe un amplio número de grupos de investigación centrados en el estudio de *C. albicans* publicándose alrededor de mil artículos anuales sobre el mismo, lo cual conlleva a que sea el tercer organismo más citado y a que haya sido posible la completa secuenciación del genoma de *C. albicans* permitiendo un rápido desarrollo en su conocimiento.

2. Importancia de *C. albicans* como agente patógeno.

2.1. Tipos de candidiasis.

Candida albicans puede producir distintos tipos de infecciones conocidas genéricamente con el nombre de candidiasis. En realidad este término se refiere a cualquier infección causada por especies del género *Candida*.

Candida spp. forma parte de la flora saprófita mucocutánea, existiendo un equilibrio perfecto entre su virulencia y los mecanismos de defensa del huésped. *C. albicans* se encuentra habitualmente formando parte de la flora gastrointestinal y bucal (donde se halla en escaso número aunque su presencia sea constante), de la flora vulvovaginal (encontrándose en un 5% de las mujeres sanas y hasta en un 30% de las gestantes), y rara vez se encuentra como saprofito en la piel sana. Esta situación se modifica radicalmente cuando concurren factores microambientales predisponentes

(cambios en el pH, defectos en linfocitos T y B, disminución de la microbiota bacteriana por antibióticos...etc).

Las candidiasis pueden clasificarse en dos tipos fundamentales, superficiales y sistémicas, las cuales se detallan a continuación.

2.1.1. Candidiasis superficiales.

C. albicans es probablemente la causa mejor conocida del afta (pequeña úlcera blanquecina formada en la mucosa de la boca, del tubo digestivo o del aparato genital, esencialmente benigna y superficial) que puede afectar a una o a varias de las localizaciones anteriormente descritas (**Schwebke and Hillier, 1996**).

C. albicans forma parte de la flora normal gastrointestinal y es un patógeno oportunista que puede establecer una infección cuando las defensas inmunológicas y mecánicas del hospedador se ven inmunocomprometidas. Así, existen factores predisponentes para cada uno de los tipos de candidiasis, por ejemplo, para la candidiasis oral (de la boca) existen factores fisiológicos (embarazo, infancia, senectud,...etc), alteraciones endocrinas (diabetes, hipotiroidismo, deficiencias nutricionales,...etc), defectos inmunológicos, factores locales (dentaduras postizas, cambios en la composición de la saliva, flora comensal presente,...etc), que la favorecen (**Budzt-Jorgensen and Lombardi, 2000**).

Sobre todo en pacientes con VIH a nivel del esófago, *C.albicans* produce esofagitis (**Ruhnke, 2002**). La candidiasis genital puede afectar a la vulva y al área vaginal, así como a los pliegues perianales y crurales causando intérrigo candidiásico. Se estima que el 75% de todas las mujeres experimentarán al menos un episodio de vulvovaginitis en su vida (son subgrupos de mayor riesgo las mujeres embarazadas y las infectadas por VIH con un 40 a 60% de prevalencia de vaginitis).

C. albicans tiene una especial predilección por áreas calientes y húmedas (áreas intertriginosas) y puede causar también infecciones en membranas mucosas, piel y uñas que si se convierten en crónicas, pueden dar origen a la candidiasis crónica mucocutánea (**Ruhnke, 2002**).

2.1.2. Candidiasis sistémicas.

Existen otras infecciones candidiásicas que se conocen con el nombre de candidiasis invasivas o sistémicas. Se trata de una enfermedad muy debilitante con una mortalidad de hasta el 35% (**Wenzel, 1995**) y que causa el 85% de las infecciones nosocomiales en EE.UU. (**Beck-Sagué and Jarvis, 1993**).

La candidiasis invasiva incluye la candidemia (definida como el aislamiento de *Candida* spp. de al menos un cultivo sanguíneo), la candidiasis diseminada por vía sanguínea y la infección de un órgano interno (**Filler and Kullberg, 2002**).

En EE.UU. la candidemia es la cuarta causa más común de infecciones en el torrente sanguíneo (**Beck-Sagué and Jarvis, 1993**), y la incidencia en Europa está aumentando asociada a infecciones nosocomiales y al aumento de pacientes inmunocomprometidos y pacientes que precisan cuidados intensivos. Los factores de riesgo más importantes para la candidemia son el uso de antibióticos de amplio espectro y de catéteres intravenosos, así como el cáncer, la cirugía abdominal, la diabetes y el VIH (**Kao et al., 1999; Prasad et al., 1987**).

La mayor parte de las candidiasis sistémicas están causadas por *C. albicans* y engloba patologías tan severas como: candiduria, peritonitis, candidiasis hepatoesplénica, endocarditis, pericarditis y miocarditis, tromboflebitis, endoftalmitis, meningitis, neumonía, osteomielitis y artritis (**Filler and Kullberg, 2002**).

2.2. Diagnóstico.

Las manifestaciones clínicas de las infecciones por *Candida* no son específicas para *Candida* spp., ya que pueden ser causadas por otros organismos. El diagnóstico estándar de candidiasis en el laboratorio (**Barnet *et al.*, 2000; Walsh and Pizzo, 1993**) suele ser:

- a) microscopía directa de las muestras clínicas.
- b) aislamiento de *Candida* spp. de sangre, líquidos corporales, tejidos...etc.
- c) identificación del microorganismo en unos niveles altamente significativos.
- d) identificación de la morfología de *Candida* spp. en tejidos.

Normalmente, los métodos para identificar las especies de *Candida* están basados en la combinación de una serie de características morfológicas y bioquímicas (**Barnet *et al.*, 2000; Buckley, 1989**) tales como aspecto morfológico y color de las colonias en un primer aislamiento en medios como Sabouraud, capacidad de producir clamidosporas, producción de pseudohifas o hifas, tamaño de las células, asimilación de carbohidratos, fermentación de azúcares y asimilación de nitratos.

El diagnóstico de las candidiasis superficiales es bastante efectivo y rápido, pero la sensibilidad con la que se detecta *Candida* spp. en cultivos de sangre y biopsias de tejidos todavía es bastante baja. En numerosas ocasiones, en las candidiasis sistémicas, el número de microorganismos en las muestras es muy bajo y a menudo se diagnostica excesivamente tarde para poder salvar la vida del paciente; en estos casos ha sido descrito un diagnóstico bastante eficaz basado en la detección de anticuerpos, antígenos y componentes no antigénicos (**Pontón *et al.*, 2002**), aunque no han podido ser generalizados los tests debido a que los diagnósticos serológicos no son excesivamente fiables en todos los pacientes con candidiasis invasivas.

Otro tipo de diagnóstico se basa en la tecnología molecular. La PCR presenta un gran potencial para revolucionar el diagnóstico clínico de las enfermedades infecciosas. Esta técnica puede detectar cantidades muy pequeñas de los ácidos nucleicos de los

microorganismos en sangre y tejidos, como muestran los ensayos realizados para *C. albicans* en los que se consigue una amplificación a partir de muestras que contienen de 1 a 5 células del microorganismo (Flahaut *et al.*, 1998; Löffler *et al.*, 1997). La ventaja principal de la PCR sobre los métodos convencionales es la rapidez con la que se obtienen los resultados (unas 8 horas frente a los 2-5 días de los métodos convencionales). La desventaja que tiene es que precisa de un equipo caro y de personal especializado, por lo que actualmente todavía muchos laboratorios continúan utilizando los métodos clásicos en lugar de las técnicas moleculares.

2.3. Tratamiento.

La creciente incidencia de infecciones de *Candida* ha ido paralela al aumento del número de pacientes inmunocomprometidos. Los tratamientos antifúngicos contra las infecciones por *Candida* se han visto obstaculizados por varios factores: número limitado de agentes antifúngicos, especies resistentes,...etc.

Los agentes antifúngicos más destacables se muestran en la Tabla I.1., en función del tipo de candidiasis a tratar.

Género: *Candida*.

Especies: *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. [torulopsis] glabrata*, *C. guilliermondii*, *C. krusei*, *C. parapsilosis*, *C. lusitaniae*, *C. zeylanoides*, *C. ciferrii*, *C. catenulata*, *C. haemulonii*, *C. kefyr*, *C. norvegensis*, *C. rugosa*, *C. viswanathii*, *C. famata*, *C. dublinensis*, *C. pelliculosa*, *C. inconspicua*.

Características: Levadura. Pseudohifas.

Infección: Candidiasis. Muguet oral (neonatos, antibióticos, corticoides, SIDA), queilitis angular, estomatitis por dentadura postiza. Esofagitis (SIDA, diabetes, hipotiroidismo, hipoparatiroidismo, enfermedad de Cushing). Vulvovaginitis (embarazo, diabetes, anovulatorios, antibióticos, VIH, muy frecuente en población normal). Intertrigo, paroniquia, onicomicosis, dermatitis del pañal (humedad excesiva de la piel, diabetes). Candiduria sin evidencia de una infección pielorrenal (sonda permanente,

diabetes). Candidiasis mucocutánea crónica (Síndrome de Di George, endocrinopatías, timoma). Peritonitis en diálisis peritoneal (rara). Candidiasis diseminada (prematuridad, neutropenia, trasplante de órganos, grandes quemados, catéteres iv centrales, cirugía complicada, ADVP). Fiebre persistente (más de 5 a 7 días) a pesar del tratamiento antibacteriano en el paciente neutropénico. Abscesos hepatoesplénicos en pacientes con hemopatías malignas que se recuperan de la neutropenia. Pielonefritis y formación de bolas fúngicas (trasplante renal, malformación urológica, diabetes). Endocarditis (cirugía valvular, ADVP, catéter central). Síndrome cutáneo (nódulos, foliculitis)-óculo (coriorretinitis)-musculo-esquelético (cóndor y osteoartritis) en ADVP. Infección de prótesis articulares.

Diagnóstico: Observación del hongo en tejidos o exudados y aislamiento en cultivo.

Tratamiento:

Candidiasis hematogena diseminada: Anfotericina B-desoxicolato 0.7-1 mg/kg/día iv, caspofungina¹ 70 mg (el primer día), 50 mg/día (posteriormente), o una formulación lipídica de anfotericina B¹ 3.5 mg/kg/día (tras la mejoría, puede completarse el tratamiento por vía oral con fluconazol). Si la infección es de gravedad leve o moderada, no existe afección de un órgano (primaria o metastásica) y el paciente no ha recibido previamente un azol, el tratamiento puede iniciarse con un azol. El tratamiento puede iniciarse con fluconazol 6 mg/kg/día oral (400 mg/día). En caso de meningitis, endoftalmitis o de infección grave, puede considerarse la adición de flucitosina (150 mg/kg/día)². El tratamiento antifúngico se mantiene hasta 15 días después del último hemocultivo positivo y de la resolución de la clínica³. Retirar el catéter venoso central⁴. En el paciente neutropénico considerar la prescripción de G-CSF (Factor estimulador de granulocitos) o de GM-CSF (Factor estimulador de granulocitos y monocitos). La infección diseminada producida por *C. albicans*, *C. tropicalis* y *C. parapsilosis* puede tratarse con dosis de 0.6 mg/kg/día de anfotericina B-desoxicolato o 6mg/kg/día (400mg/día) de fluconazol. *C. glabrata* requiere dosis de 0.7-1 mg/kg/día de anfotericina B-desoxicolato, caspofungina, 5mg/kg/día de una formulación lipídica de anfotericina B o 12 mg/kg/día (800mg/día) de fluconazol. La infección por *C. krusei* debe tratarse con 1mg/kg/día de anfotericina B-desoxicolato, caspofungina o 5mg/kg/día de una formulación lipídica de anfotericina B. *C. lusitanae* puede ser resistente a la anfotericina B, es preferible iniciar el tratamiento con fluconazol 6-12 mg/kg/día o caspofungina.

Candidiasis diseminada crónica (o hepatoesplénica): fluconazol 6-12 mg/kg/día hasta la resolución o calcificación de las lesiones.

Candidiasis urinaria⁶: fluconazol 200 mg/día, 7-14 días. Retirar la sonda urinaria⁶.

Otras localizaciones: Además del tratamiento antifúngico⁷ recomendado para la infección diseminada, considerar el drenaje o el desbridamiento quirúrgico en la artritis, la osteomielitis, la pericarditis y la mediastinitis. Si existe material protésico, debe retirarse. En caso de endocarditis suele ser necesaria la sustitución valvular.

Candidiasis orofaríngea: Clotrimazol tópico 5 días o fluconazol 100 mg/día vía oral 7-14 días.

Candidiasis esofágica: fluconazol 100-200 mg/día vía oral o iv 14-21 días.

Intertrigo o paroniquias: un azol tópico (clotrimazol). Mantener el área seca. Drenaje de la paroniquia.

Onicomicosis: itraconazol 200mg/12 h, 7 días al mes durante 3-4 meses.

Alternativas:

Candidiasis hematógena diseminada: voriconazol

Candidiasis diseminada crónica: anfotericina B-desoxicolato 0.6-0.7 mg/kg/día o probablemente mefor, una formulación lipídica de anfotericina B.

Candidiasis urinaria: flucitosina⁸ 25 mg/kg/6h.

Candidiasis orofaríngea: itraconazol 200mg/día, nistatina 100.000U/ml, 4-6 ml cada 6 horas o anfotericina B 1ml de suspensión oral/6h de 7 a 14 días.

Candidiasis esofágica: itraconazol 200 mg de solución/día, anfotericina B-desoxicolato 0.3-0.7 mg/kg/día iv, 14-21 días, caspofungina 50 mg/día iv de 7 a 21 días o voriconazol 200-400 mg/día.

Intertrigo o paroniquias: nistatina.

Comentarios:

¹ De elección en caso de alteración de la función renal (creatinina sérica ≥ 2.5 mg/l).

² La dosis debe ajustarse para alcanzar una concentración sérica en torno a 50 mg/l.

³ En el paciente neutropénico sin infección documentada (tratamiento antifúngico empírico ante un episodio de fiebre si no responde a los antibióticos), el tratamiento debe mantenerse hasta la resolución de la neutropenia.

⁴ Especialmente indicado en pacientes sin neutropenia y en caso de infección por *C. parapsilosis*.

⁵ La candiduria asintomática no necesita tratamiento excepto en caso de trasplante renal, neutropenia o necesidad de manipulación urológica.

⁶ Si no es posible retirar el catéter es aconsejable cambiarlo.

⁷ La meningitis debe tratarse durante 4 semanas, la endocarditis durante al menos 6 semanas después de la sustitución de la válvula y la osteomielitis un tiempo mínimo de 6 meses.

⁸ Puede desarrollarse resistencia durante el tratamiento.

Tabla I.1. Agentes antifúngicos eficaces frente a *C. albicans* en función del tipo de candidiasis a tratar (Mensa, 2003).

2.4. Otras especies de *Candida* con interés patógeno.

Aunque han sido descritas unas 200 especies de *Candida*, tan solo unas cuantas tienen relevancia en medicina (Calderone, 2002). Con anterioridad a los años 90, aproximadamente entre el 70 y el 80% de todas las levaduras asociadas a las enfermedades en humanos eran *C. albicans* (Wenzel, 1995). Sin embargo, durante los 90 se ha incrementado la frecuencia con la cual otras especies distintas a *C. albicans* son aisladas de lugares de infección, y especies tales como *C. glabrata*, *C. krusei* y *C. lusitaniae* que en un principio eran consideradas como especies no patógenas, comenzaron a tener interés patógeno (Pfaller *et al.*, 1999). *C. glabrata* y *C. tropicalis*, son las especies aisladas más frecuentemente de la vagina, la cavidad oral y del tracto gastrointestinal, mientras que *C. guilliermondii* y *C. parapsilopsis* son más propensas a colonizar la piel (Hedderwick *et al.*, 2000).

Estas diferentes especies de *Candida* de la cavidad oral y de la mucosa vaginal, se aíslan comúnmente en cultivos mixtos, normalmente en combinación con *C. albicans* (Moran *et al.*, 2002). *C. glabrata*, la segunda más aislada de la candidiasis oral después de *C. albicans* (Luo and Samaranayake, 2002) y *C. krusei*, muestran una baja sensibilidad a los agentes normales utilizados para la infecciones por *C. albicans* (Nguyen *et al.*, 1996; Pfaller *et al.*, 1998, 1999), siendo necesario métodos diagnósticos concretos para estas especies.

C. dubliniensis se ha asociado en las candidiasis orales a pacientes infectados por el VIH, considerándose como la segunda especie más aislada de las especies de *Candida* en individuos infectados por este virus (Schoofs *et al.*, 1998). *C. dubliniensis* es la especie más comúnmente aislada de la cavidad oral en cultivos mixtos con otras especies de *Candida*, particularmente *C. albicans* (Moran *et al.*, 2002), mostrando una reducida sensibilidad al Fluconazol (Sullivan and Coleman, 1998).

Además de la cavidad oral, *C. dubliniensis* se ha aislado de vagina, esputos, heces, y cultivos sanguíneos (Moran *et al.*, 2002) y algunos estudios han indicado casos de fungemia por *C. dubliniensis* en Europa y en EE.UU. (Brandt *et al.*, 2000;

Meis et al., 1999). Aunque *C. albicans* y *C. dubliniensis* comparten características fenotípicas y de diagnóstico, se diferencian en el perfil de asimilación de carbohidratos, modelos de crecimiento a temperaturas elevadas, y en las actividades de las β -glucosidasas intracelulares (**Coleman et al., 1997; Pinjon et al., 1998; Salkin et al., 1998**).

Estudios moleculares han demostrado que *C. dubliniensis* posee una organización genómica muy distinta y única al resto de especies de *Candida* (**Gilfillan et al., 1998; Sullivan and Coleman, 1998**) lo que permite su identificación a nivel molecular.

3. Pared celular de *C. albicans*.

La pared celular puede definirse como un tipo de matriz extracelular que encierra a la célula fúngica, siendo más gruesa y resistente que la matriz extracelular de las células de mamífero y en consecuencia confiere rigidez, protege frente a daños físicos y osmóticos y actúa como una barrera permeable al paso de sustancias. Es además la encargada de determinar la forma celular, así como la responsable de los fenómenos de agregación y floculación. Su constitución y composición puede variar en función de la morfología de la célula y las condiciones ambientales, por lo que se cree juega un papel importante en la transición dimórfica. Además, la pared interviene en las relaciones con el hospedador por ser la primera estructura que entra en contacto con el mismo. En definitiva, la pared celular en *C. albicans* es una estructura esencial para la viabilidad celular que la diferencia de las células eucariotas humanas, por lo que puede convertirse en una excelente diana para el ataque quimioterápico.

La pared celular es una estructura dinámica y estratificada que se encuentra en un constante proceso de biosíntesis e hidrólisis controladas por una estricta regulación. Las variaciones en las condiciones de cultivo, los diferentes estadios celulares y la transición dimórfica pueden influir en ella (**Diaz et al., 1992; Sentandreu et al., 1994**).

Los elementos constituyentes de la pared celular (representados en la Fig. I.1.) son:

1. componentes estructurales:
 - **β -1,3 y β -1,6 glucanos** (polímeros de D-glucosa)
 - **quitina** (polímero de N-acetilglucosamina)

2. componentes de la matriz:
 - **α -glucanos**
 - **glicoproteínas o manoproteínas** (polímeros de manosa enlazados a proteínas)

3. Lípidos y proteínas

La pared celular está formada en un 80 a 90% por carbohidratos. Las proteínas (del 6 al 25%) y los lípidos (del 1 al 7%) están presentes como constituyentes minoritarios (Martínez *et al.*, 1998).

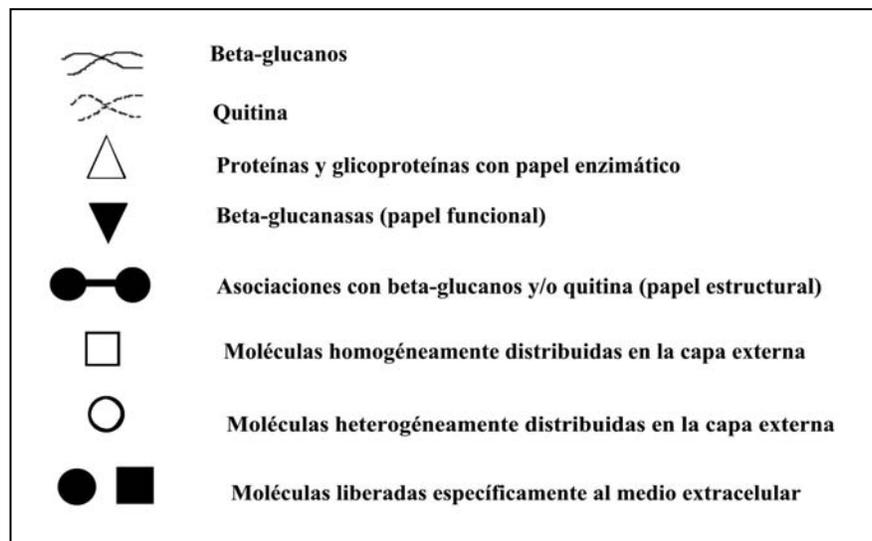
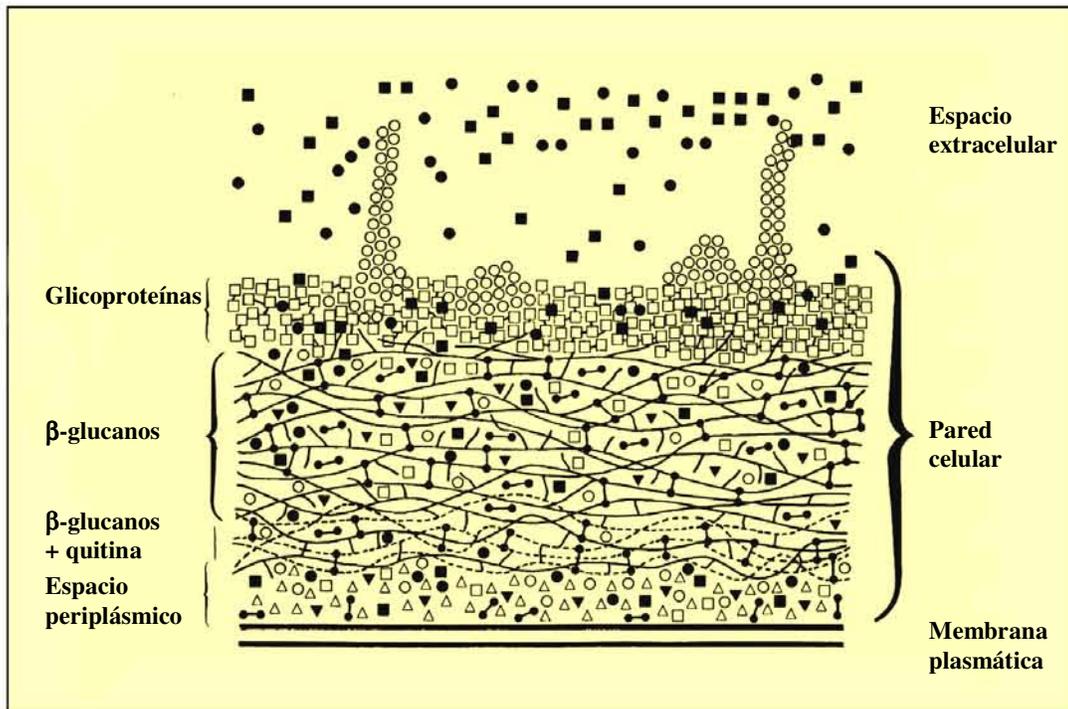


Fig. I.1. Representación esquemática de la estructura de la pared celular de *C. albicans*, en la que se muestra la distribución de los distintos constituyentes, así como las interacciones entre los mismos (Chaffin *et al.*, 1998).

Existen evidencias que revelan que la pared celular de *C. albicans* está organizada en una estructura estratificada (**Chaffin *et al.*, 1998; Cassone, 1989; Calderone and Braun, 1991**). Como se muestra en la Fig. I.1., los polímeros microfibrilares de β -glucanos y quitina, parecen estar más concentrados en la capa más interna de la pared celular. Los complejos β -glucano-quitina, formados por enlaces glicosídicos entre ambos polímeros, están localizados adyacentes a la membrana plasmática y al espacio periplásmico. Esta capa proporciona rigidez a la estructura que protege a la célula contra los daños osmóticos y otros factores ambientales.

Proteínas y glicoproteínas (manoproteínas en su mayoría) parecen ser dominantes en la parte más externa de la pared celular, aunque también están distribuidas a lo largo de toda su estructura; forman la capa exterior que es amorfa y los complejos de manoproteínas y fosfomanoproteínas son los responsables de conferir hidrofobicidad (**Cutler, 2001; Martínez *et al.*, 1998**). Una vez secretadas a través de la membrana plasmática, algunas especies de proteínas y glicoproteínas permanecerán en el espacio periplásmico posiblemente jugando papeles enzimáticos; algunas otras establecerán asociaciones covalentes funcionales (como por ejemplo las β -glucanasas) o estructurales con los β -glucanos y posiblemente también con la quitina adyacente a la membrana plasmática; y, finalmente, otras especies constituirán la capa más externa donde las diferentes entidades moleculares pueden estar homogéneamente o heterogéneamente (fimbrias, grupos de moléculas receptoras,... etc) distribuidas o específicamente liberadas (ej: enzimas extracelulares) al medio extracelular.

Las especies de proteínas y glicoproteínas en la capa más externa de la pared pueden establecer diferentes tipos de interacciones covalentes, como los puentes disulfuro o los enlaces mediante residuos glicosilfosfatidilinositol GPI (que serán discutidos con detalle posteriormente), y no covalentes como los enlaces hidrofóbicos o los puentes de hidrógeno. Durante su paso a través de la pared, desde la membrana plasmática y el espacio periplásmico a la parte más externa de las capas de la pared y posiblemente al medio extracelular, las proteínas y glicoproteínas, con mayor probabilidad, estarán en equilibrio con otros constituyentes proteínicos, que asimismo

contribuyen, al menos desde un punto de vista funcional, a la estratificación de la pared celular. En cualquier caso, otras especies de proteínas y glicoproteínas diferentes a éstas secretadas específicamente al medio extracelular, pueden ser liberadas también a otras localizaciones por células muertas tras la lisis y degradación de la estructura de la pared celular (requeridas para la expansión de la propia pared durante el crecimiento celular). Para simplificar el esquema, algunos aspectos como posibles interacciones de los componentes de la pared celular con la membrana plasmática y las proteínas retenidas en la pared celular, aparentemente por enlaces covalentes o no, no se encuentran representados en la Fig. I.1.

En los últimos años ha ido progresando el entendimiento de la arquitectura molecular de la pared celular de *C. albicans*, basada en datos experimentales de *S. cerevisiae* y ratificándolo con el trabajo en *C. albicans*. Los estudios de la estructura estratificada de la pared están basados en gran parte en el aspecto que muestra la misma a través de la micrografía electrónica, sin embargo, la amplitud real que tiene en la célula viva no puede llegar a detallarse.

3.1. Componentes estructurales.

Los componentes estructurales básicos de la pared celular forman un esqueleto rígido que confiere a la célula las propiedades físicas y morfológicas, siendo por ello, polímeros cristalinos insolubles en agua.

3.1.1. β -Glucano.

El glucano se halla distribuido de manera uniforme a lo largo de la superficie externa de la célula formando la matriz esencial de la pared celular, de la cual es el principal componente (60 % en peso seco). Está formado por la unión de moléculas de

β -D-glucosa pudiéndose distinguir entre β -1,3-glucano y β -1,6-glucano en función del tipo de enlace predominante.

El **β -1,3-glucano** es el polímero mayoritario y está formado por moléculas de D-glucosa enlazadas linealmente mediante enlaces β -1,3 y ramificadas ocasionalmente mediante enlaces β -1,6 (**Manners *et al.*, 1973**). Las moléculas están formadas aproximadamente por 1500 residuos de glucosa (**Boone *et al.*, 1990**). Junto con la quitina, es el responsable de la rigidez de la pared celular. Tiene múltiples extremos reductores, los cuales le permiten que funcione como un aceptor de β -1,6-glucano y quitina, facilitando así la adhesión de los mismos a la pared celular (**Lipke and Ovalle, 1998; Chauhan *et al.*, 2002**).

La síntesis de β -1,3 glucano tiene lugar en la membrana plasmática. Las células de levadura presentan la capacidad de compensar los defectos en la síntesis del β -1,3 glucano alterando la organización de la pared celular, esta compensación se traduce en un notable incremento en el contenido de quitina de la pared (**Popolo *et al.*, 1997**).

El **β -1,6 glucano** es un polímero altamente ramificado y formado por uniones de tipo β -1,6 principalmente y uniones del tipo β -1,3 ocasionales. Presenta cadenas de aproximadamente 60 a 600 residuos de glucosa (**Kollar *et al.*, 1997**). Su papel en la estructura de la pared es sumamente importante ya que actúa tanto como interconector entre las cadenas tridimensionales de β -1,3-glucano y GPI (glicosilfosfatidilinositol) unidas a la pared celular, como en la adhesión directa de una pequeña cantidad de quitina al β -1,6 glucano.

Según los últimos hallazgos, la síntesis de β -1,6 glucano tiene lugar en la membrana plasmática de forma similar a la síntesis de β -1,3 glucano (**Chauhan *et al.*, 2002**). Ambos tipos de glucano se encuentran unidos covalentemente a la quitina mediante un enlace glicosídico entre una molécula de glucosa del β -glucano y un residuo N-acetil glucosamina de la cadena de quitina (**Surarit *et al.*, 1988**). Esta unión les hace insolubles al álcali (**Kollar *et al.*, 1995, 1997**).

3.1.2. Quitina.

La quitina es uno de los componentes más característicos de la pared de los hongos dado que no existe en las paredes de bacterias ni plantas. En las células de *C. albicans* constituye entre el 1 y el 10% de la pared celular y puede llegar a ser hasta cuatro veces más abundante en la forma micelial que en la de levadura (**Chattaway et al., 1968**). Se trata de un polímero lineal formado por moléculas de N-acetil-D-glucosamina unidas por enlaces β -1,4. Las cadenas de quitina se disponen de forma antiparalela y se asocian *in vivo* mediante puentes de hidrógeno formando una estructura fibrilar insoluble que confiere a la pared celular una gran resistencia (**Bulawa, 1993; Ruiz- Herrera, 1992**).

Se ha descrito que la síntesis de quitina de las paredes celulares es regulada por el ciclo celular (**Cabib et al., 1997; Orlean, 1997**). Se han descrito cuatro genes relacionados con la síntesis de quitina en *C. albicans* llamados *CHS1*, *CHS2*, *CHS3* y *CHS8* (**Munro and Gow, 2001**). Según los datos, *CHS1* es el único gen esencial (**Munro et al., 2001**). Este gen está implicado en la síntesis de quitina durante la gemación, la septación de la hifa y el crecimiento de la pared celular. Los otros genes implicados en la síntesis de la quitina, se piensa que están involucrados en los procesos dinámicos de la pared celular durante la división y la septación de la hifa en *C. albicans* (**Munro and Gow, 2001**).

3.2. Componentes de la matriz.

Los polisacáridos que forman la matriz de *C. albicans* son amorfos, no cristalinos y la mayoría insolubles en agua. Las glicoproteínas que la constituyen, están formadas por una parte proteica enlazada covalentemente con una cadena de hidrato de carbono, que en el caso de los hongos es mayoritariamente manosa, de ahí que genéricamente se les denomine manoproteínas. Las manoproteínas representan entre el 45 y el 50% en peso seco de la pared celular, encontrándose distribuidas por toda ella y acumulándose particularmente en su superficie y en las proximidades de la membrana

plasmática (Shepherd, 1990; Chaffin *et al.*, 1998). Así mismo, las manoproteínas juegan un importante papel en la adhesión de las levaduras a células epiteliales (Douglas, 1985).

3.2.1. Manano.

El término manano, se refiere solo al componente manooligosacárido de las manoproteínas (Chaffin *et al.*, 1998; Chauhan *et al.*, 2002), sin embargo, también ha sido utilizado para referirse al principal componente soluble inmunodominante presente en la parte externa de la pared celular de *C. albicans*. El manano de la pared celular es el principal antígeno candidiásico responsable de la especificidad de las diferentes reacciones serológicas (Martínez *et al.*, 1998; Summers *et al.*, 1964). Este componente también llamado fosfomanoproteína o complejo fosfopeptidomanano contiene homopolímeros de manosa (como componente principal), de 3 a 5% de proteínas y de 1 a 2% de fosfato (Reiss and Morrison, 1993) y es también responsable de conferir hidrofobicidad a la superficie celular (Martínez *et al.*, 1998).

Los mananos no existen como entidades libres, los polímeros de manosa se unen a las proteínas para formar manoproteínas mediante enlaces N-glicosídicos a residuos de asparagina (a través de unidades de 2-N-acetilquitobiosa) y por enlaces O-glicosídicos a residuos de serina o de treonina.

3.2.1.1. Enlaces N-glicosídicos.

Los enlaces N-glicosídicos unen polímeros de manosa altamente ramificados y de alto peso molecular al aminoácido asparagina del péptido, con un núcleo altamente conservado tanto en hongos como en células animales (Tanner and Lehle, 1987). Son los responsables de la inmunodeficiencia observada en el hospedador durante la candidiasis, dado que los N-glicanos de *C. albicans* inhiben la respuesta antígeno específica de las células T al poseer dominios de unión con la IL-2 (Zanetta *et al.*,

1998). Algunos residuos de manosa pueden encontrarse fosforilados a través de enlaces manosilfosfodiester (Ballou, 1990). La importancia de este tipo de glicosilación para la viabilidad de las levaduras ha sido puesta de manifiesto en los mutantes *och*, (Nagasu *et al.*, 1992) y en los mutantes *mnn* (Ballou, 1990) que carecen de las cadenas externas de manano.

La biosíntesis del enlace N-glicosídico en *Candida* spp. No se encuentra bien caracterizada, mientras que en *S. cerevisiae* si se han obtenido conclusiones mediante análisis bioquímicos y genéticos (Dean, 1999; Jigami and Odani, 1999).

3.2.1.2. Enlaces O-glicosídicos.

Los enlaces O-glicosídicos unen los oligomanósidos a residuos de serina y/o treonina de la proteína por los grupos hidroxilo (Ballou, 1982) y forman cadenas lineales cortas que contienen de una a cinco unidades de α -manosa con la composición: Man- α -1,3-Man- α -1,3-Man- α 1,2-Man- α 1,2-Man- α -O-Treonina/Serina (Hard *et al.*, 1989; Zueco *et al.*, 1986). Este tipo de enlace se caracteriza por ser sensible al tratamiento con un álcali débil (β -eliminación) (Lehle *et al.*, 1991). En proteínas altamente O-glicosiladas, la presencia de estos oligomanósidos podría contribuir a que la proteína adopte una configuración extendida (Jentoft, 1990).

El enlace O-glicosídico se inicia con la transferencia a un residuo de serina o treonina usando, como donante, dolicilfosfatomanosa (Chauhan *et al.*, 2002). Este proceso ha sido completamente estudiado en *S. cerevisiae* pero hasta el momento solo la proteína Mnt1p ha sido completamente caracterizada en *C. albicans*, actuando como una manosiltransferasa (Buurman *et al.*, 1998; Thomson *et al.*, 2000).

3.3. Lípidos y proteínas.

3.3.1. Glicolípidos.

Los glicolípidos representan entre el 1 y 7 % del peso seco de la pared celular de *Candida* spp. (Calderone and Braun, 1991) pero tienen funciones importantes. Su parte carbohidrato sobresale de la superficie exterior de la membrana celular, al igual que las glicoproteínas y frecuentemente funcionan como receptores o antígenos en las células. Las cadenas lineales de β -1,2-oligomanosa son el componente principal y este enlace inusual también se encuentra en otro componente inmunogénico de la pared celular, el fosfopeptidomano de *C. albicans*. No obstante, se ha demostrado que no solo son importantes como receptores o antígenos, sino que también juegan un papel importante en la transducción de la señal en la síntesis de la pared celular y en el procesamiento de los antígenos por los macrófagos o las células T (Chauhan *et al.*, 2002).

3.3.2. Proteínas asociadas a la pared celular.

Se han descrito varias clases de proteínas asociadas a la pared celular:

1) **Proteínas de la pared celular CWPs** (Cell Wall Proteins), extraídas con agentes reductores a partir de células intactas (Kapteyn *et al.*, 2000). Estas incluirían, CWPs solubles que se encuentran unidas a otras CWPs a través de puentes disulfuro (Casanova *et al.*, 1992) y enzimas periplásmicas que son liberadas debido al aumento de la permeabilidad de la pared celular a causa de la ruptura de los puentes disulfuro (De Nobel *et al.*, 1990), como la proteína secretora Pra1 (Sentandreu *et al.*, 1998) o enzimas glicolíticas localizadas en la superficie celular de *C. albicans* (Chaffin *et al.*, 1998; Eroles *et al.*, 1997; Gil-Navarro *et al.*, 1997).

2) **Proteínas GPI**, denominadas así por ser CWPs que están unidas (por su extremo C-terminal que debe ser hidrofóbico) a través de un residuo GPI al

β -1,6 glucano. El β -1,6 glucano podría volver a unirse al β -1,3 glucano o a la quitina (ver Fig. I.2.). Actualmente se han identificado potenciales proteínas de este tipo en *C. albicans*, como son: Als1p-Als9p (Hoyer, 2001), Hwp1p (Staab *et al.*, 1999), Hyr1p (Bailey *et al.*, 1996), Rbt1p, Rbt5p y Wap1p (Braun *et al.*, 2000). Estas proteínas, que representan el 88% de todas las proteínas de la pared celular (Kapteyn *et al.*, 2000), pueden ser dirigidas al β -1,6-glucano o bien permanecer unidas al lípido de la membrana plasmática a través del anclaje GPI. El destino de la proteína GPI es determinado aparentemente por un motivo dibásico que se encuentra justo al lado del lugar de acoplamiento de la GPI. Las proteínas GPI a las que les falta ese motivo se dirigen directamente a la pared celular. Según esta teoría se ha propuesto que existen dos tipos de proteínas GPI: proteínas residentes en la membrana plasmática tales como Gas1p o Yap3p, y proteínas de pared celular tales como Tir1p o α -aglutinina (Chauhan *et al.*, 2002). Sin embargo, se ha sugerido que la señal GPI tiene un papel constitutivo en las levaduras: dirigir las proteínas a la pared celular (De Sampaio *et al.*, 1999).

3) Las **proteínas Pir** son CWPs que están unidas directamente al beta-1,3 glucano a través de un enlace álcali sensible (no tiene un β -1,6 glucano que las conecte) (Kandasamy *et al.*, 2000; Kapteyn *et al.*, 2000). Son proteínas secretoras que poseen un péptido señal en el extremo N-terminal, una región interna repetida y una región altamente conservada en el extremo C-terminal, pero que carecen de una señal de adición GPI en el extremo C-terminal.

4) La **proteína de la pared celular GPI dependiente en *S. cerevisiae***, CWP1, es un caso especial de proteína la cual puede unirse tanto al β -1,3-glucano como a una proteína GPI, como a una Proteína Pir. En *C. albicans* existe una proteína de la pared celular, similar a la de *S. cerevisiae*, detectada por el antisuero Als1 (Klis *et al.*, 2001).

Las funciones específicas de las proteínas de la pared celular pueden variar, pero en la mayoría de los casos son desconocidas. En conjunto, limitan la permeabilidad de

la membrana, protegen el esqueleto estratificado de la pared contra las enzimas degradativas externas y la membrana plasmática de los componentes tóxicos (De Nobel *et al.*, 1990), y también pueden determinar la hidrofobicidad (Masuoka and Hazen, 1999) y la antigenicidad de la pared (Chaffin *et al.*, 1998). Otras proteínas de la pared celular, podrían estar implicadas en el remodelado de la misma y más aún, alguna de ellas podría tener un papel importante en la adhesión celular, como las proteínas GPI codificadas por la familia *ALS* que son todas adhesinas. Ninguna de las proteínas GPI conocidas actualmente es esencial, aunque la pérdida del gen que las codifica en alguna de ellas como *HWPI* o *RBT1* puede dar como resultado una disminución de la virulencia en modelos animales (Braun *et al.*, 2000; Staab *et al.*, 1999). La función de las proteínas Pir es actualmente desconocida aunque existe alguna evidencia de que están implicadas en el mantenimiento de la integridad de la pared celular (Kapteyn *et al.*, 2000).

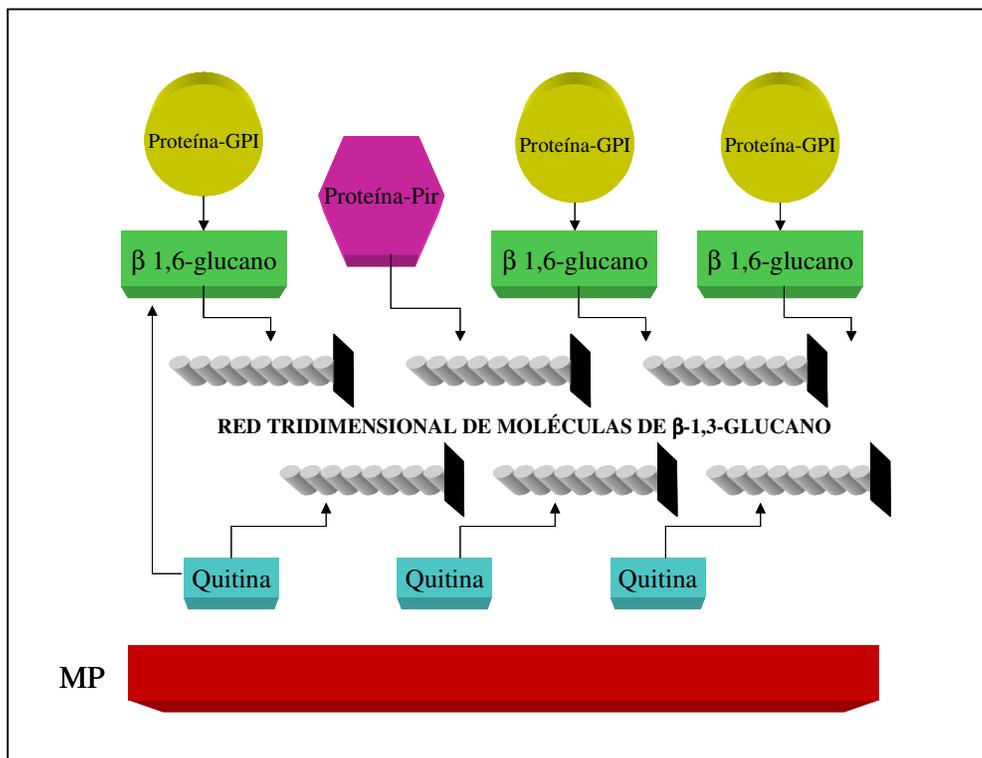


Fig. I.2. Ensamblaje de los componentes de la pared celular en *C. albicans*. Las flechas indican la orientación de los polisacáridos desde el extremo no reductor al extremo reductor. Las proteínas GPI maduras pierden su motivo lipídico una vez incorporadas a la pared celular (Lu

et al., 1995; Kollar *et al.*, 1997; Fuji *et al.*, 1999). Se observa un pequeño número de cadenas de quitina que están unidas a moléculas de β -1,6-glucano. El modelo está basado en datos de Kollar *et al.*, (1995, 1997), Kapteyn *et al.*, (1997, 1999) y Smits *et al.*, (1999) y ha sido adaptado posteriormente por Chauhan *et al.*, (2002) y Klis *et al.*, (2001).

4. Factores de virulencia de *C. albicans*.

La virulencia de *C. albicans* se encuentra determinada por la combinación de múltiples factores involucrados en el equilibrio hospedador-hongo, (Cutler, 1991; Hostetter, 1994; Odds, 1994 b). Cuando se altera alguno de los parámetros implicados en este equilibrio, se inicia la invasión de tejidos y el desarrollo de la enfermedad, llegando en los casos más graves a diseminarse y a afectar zonas profundas. Los factores desencadenantes de estos procesos son múltiples, complejos e interrelacionados, por lo que es difícil determinar donde empieza y donde termina la actuación de cada uno de ellos. La penetración del hongo en los tejidos del hospedador marca, en muchos casos, el límite del proceso infeccioso, ya que *C. albicans* generalmente no continúa la invasión en hospedadores inmunológicamente sanos. No obstante, ante las situaciones en las que el hongo es capaz de llegar a sangre, debe necesariamente expresar factores que lo protejan contra las defensas celulares del hospedador y contra los inhibidores fúngicos del plasma, para así poder atravesar los endotelios e invadir los tejidos, y más aún, causar una infección diseminada (Agabian *et al.*, 1994).

Existen múltiples factores de virulencia (Fig. I.3.) que se expresan en los diversos estadios de la infección, ya sea la etapa de colonización o la de invasión. Los factores de virulencia se pueden agrupar en aquellos encaminados a contrarrestar o evadir las defensas del hospedador (como son las modificaciones en la superficie celular del microorganismo, la inhibición de la fagocitosis y las sustancias inmunomoduladoras de la respuesta del hospedador), y los encargados de actuar activamente sobre los tejidos (capacidad de adhesión y la secreción de enzimas hidrolíticas).

Finalmente cabe destacar que el fenómeno de virulencia es muy complejo dado que los múltiples factores que lo desencadenan están interrelacionados. Por ejemplo, modificaciones en la composición del manano de la superficie de *C. albicans* afectan no sólo a la inmunotolerancia, sino también a la adhesividad y producen cambios en el patrón antigénico. De igual manera, la formación de células miceliales puede contribuir a evadir la fagocitosis, favorecer la adhesión por sus características hidrofóbicas y variar la expresión de receptores. De estos datos se desprende que el papel que juega la pared celular en la interacción con el hospedador es esencial. Características de la pared como su composición antigénica, la presencia de manano o receptores específicos, su hidrofobicidad y la transición dimórfica tienen así mismo un papel muy importante en la virulencia. A continuación se detallarán algunos de los más importantes: el dimorfismo, el cambio fenotípico o “switching”, la secreción de enzimas hidrolíticas, la proteína inmunosupresora y mitogénica de células B (ISM) y la adhesión.

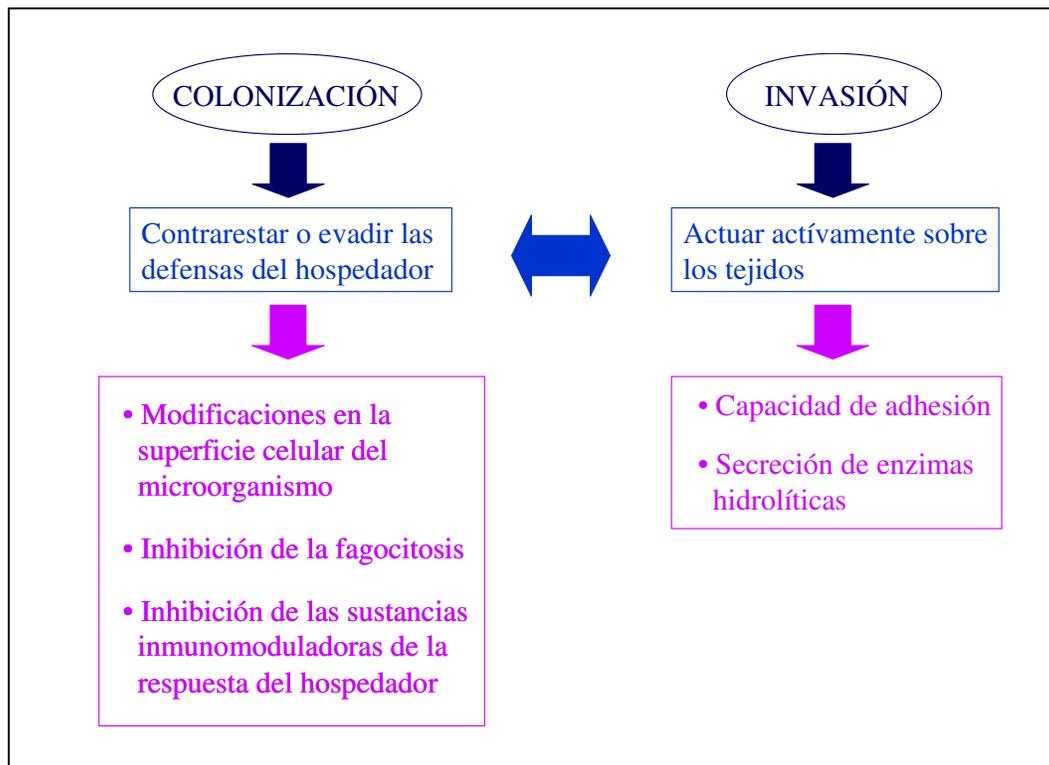


Fig. I.3. Esquema de algunos de los factores de virulencia de *C. albicans*.

4.1. Dimorfismo.

El dimorfismo es la capacidad para producir células en forma de levadura (blastosporas) o formas miceliales (hifas y pseudohifas) (**Mitchell, 1998**). *C. albicans* presenta diferente morfología (plurimorfismo) según las condiciones ambientales, aunque tradicionalmente está considerado como un hongo dimórfico ya que las formas de levadura y micelio son las más habituales (**Odds, 1994 a**), aunque no hay que olvidar la gran frecuencia con que aparece como pseudomicelio. Puede reproducirse por gemación o mediante la emisión de tubos germinales y su clasificación se concreta en la aparición de al menos cuatro morfologías definidas (levadura, pseudohifa, hifa y clamidospora) que fueron descritas con detalle por **Winner and Hurley (1964)**.

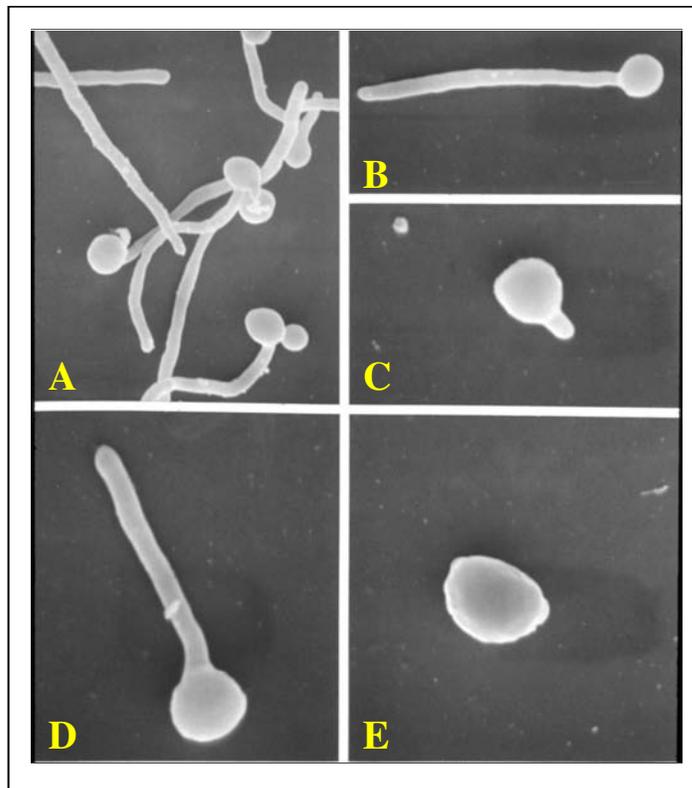


Fig. I.4. Morfologías básicas de *Candida albicans* visualizadas mediante microscopía electrónica de barrido. Los paneles A, B y D, representan la forma micelial del hongo y los paneles C y E representan la forma levaduriforme (blastosporas).

Debido a la localización de los componentes externos de la célula fúngica, que son los que entran en contacto con el hospedador, la modificación de su superficie celular es una de las estrategias que utiliza habitualmente el hongo para evitar las defensas del hospedador generando así la respuesta inmune. Este mecanismo es utilizado por procariotas como *Salmonella typhimurium*, *Borrelia hermsii* y *Neisseria gonorrhoeae* y eucariotas como *Trypanosoma brucei* (Soll, 1992 a).

C. albicans es capaz de variar la composición antigénica de su superficie celular mediante varios procesos entre los que se encuentran la transición dimórfica y la variación fenotípica o “switching”. Ha sido propuesto que la transición morfológica levadura-micelio contribuye a la virulencia de este organismo, puesto que la forma micelial podría estar mejor adaptada que las levaduras para la adhesión y penetración de las capas epiteliales (Calderone, 1993; Gow *et al.*, 1994; Kretschmar *et al.*, 1999), aunque no existe una demostración inequívoca. En cualquier caso, las modificaciones que se producen en la pared celular durante la transición morfológica, confieren características particulares (adhesión, hidrofobicidad, etc.) a las hifas que pueden ser responsables de una mayor virulencia (Cannon *et al.*, 1994; Chaffin *et al.*, 1998; Soll, 1990). Así pues, el fenómeno de transición dimórfica juega un papel inmunológico importante debido a la existencia de diferencias en las paredes celulares entre las células levaduriformes y miceliales.

La mayoría de los miembros del género tienen la capacidad de formar pseudomicelios, pero sólo la especie *C. albicans* puede formar verdaderos micelios y además adoptar la morfología de clamidospora (Cutler, 1991; Hurley *et al.*, 1987; Kerridge, 1993; Odds, 1988). La conversión de levadura en hifa se realiza por medio de una estructura denominada tubo germinal, se denomina transición dimórfica y es un proceso reversible. La transición morfológica levadura-micelio es un proceso multifactorial cuya regulación no está todavía claramente determinada. Depende de factores ambientales como pH, temperatura, fuente de carbono, y hemina entre otros (Buffo *et al.*, 1984; Casanova *et al.*, 1997; Odds, 1988; Simoneti *et al.*, 1974; Soll, 1990).

El suero es un inductor de la transición, utilizándose como prueba diagnóstica. La capacidad de formar micelios como factor de virulencia, es todavía motivo de controversia, ya que tanto la forma de levadura como la de hifa se encuentran en tejidos infectados (Odds, 1994 b), y se ha observado que mutantes monomórficos son virulentos, no obstante, se ha dado más importancia a la transición de la fase de levadura a la de micelio, puesto que se ha relacionado clásicamente con la virulencia del hongo (Calderone, 1993; Gow *et al.*, 1994; Kretschmar *et al.*, 1999). En la transición de comensal a patógeno están implicadas también las condiciones ambientales y la variabilidad entre hospedadores humanos.

El desarrollo de las hifas a partir de las levaduras depende de dos factores:

(a) la naturaleza, número e intensidad de estas señales ambientales.

(b) la actividad de las rutas de transducción de señal, que incluyen factores de transcripción específicos (maquinaria de respuesta celular). De acuerdo con los modelos actuales (Fig. I.5.), los factores ambientales activan a través de proteínas sensores diferentes rutas de transducción de señal. Estos sistemas de transducción de señal pueden converger en factores de transcripción distintos o idénticos que regulan la expresión de genes diana responsables de la transición morfológica (Ernst, 2000).

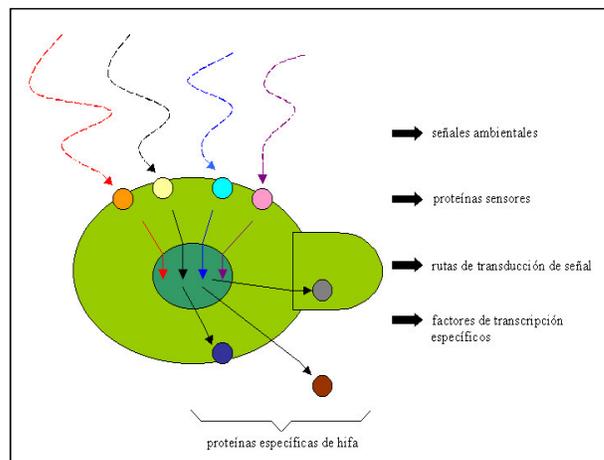


Fig. I. 5. Esquema de la inducción de la formación de hifas. Diversos factores ambientales activan, a través de proteínas sensoras, diferentes rutas de transducción de señal que pueden converger en factores de transcripción que regulan la expresión de genes diana responsables de la expresión de proteínas específicas implicadas en la formación de la hifa (Ernst, 2000).

La expresión diferencial de genes inducida por los sistemas de transducción de señal que activan la formación de hifas, es responsable de cambios tanto en el ciclo de división celular como en la composición y organización de la pared fúngica, que originan el cambio morfogénico. No obstante, muchos de los cambios en la expresión génica que acompañan al proceso de transición morfológica no se encuentran relacionados con el control de dicho proceso, sino con la respuesta o adaptación de la célula a los cambios ambientales que lo inducen (**Gow *et al.*, 1995**). En cualquier caso, las modificaciones que se producen en la pared celular durante la transición morfológica, confieren a las hifas características particulares (adhesión, hidrofobicidad, etc.) que pueden ser responsables de una mayor virulencia (**Cannon *et al.*, 1994**; **Chaffin *et al.*, 1998**; **Soll, 1990**).

Ha sido descrito que las hifas de *Candida albicans* tienen características que las diferencian de las levaduras, tales como la hidrofobicidad de su superficie y la adherencia, que constituyen por sí mismos factores de virulencia. Además, la forma de micelio estaría mejor adaptada para penetrar a través de discontinuidades en el epitelio. En este contexto, la forma micelial parece tener un mayor carácter invasivo por varias causas como:

a) su mayor facilidad para penetrar en los tejidos. Las hifas de *C. albicans* son tigmotrópicas, teniendo facilidad para penetrar en las fisuras de las capas epiteliales, lo que sugiere que el dimorfismo aumenta la virulencia al favorecer ciertas etapas del proceso infeccioso (**Gow *et al.*, 1994**; **Sherwood *et al.*, 1992**). La capacidad del micelio de penetrar a través de discontinuidades en piel y mucosas puede ser muy importante en la diseminación de la enfermedad.

b) una mayor resistencia de los filamentos miceliales a la fagocitosis, principalmente por impedimentos de tipo estérico

c) cambios en las propiedades superficiales en las células miceliales, que aumentan el grado de adherencia entre las células de *C. albicans* y las del huésped (**Chaffin *et al.*, 1998**; **Kimura and Pearsall, 1980**). La ultraestructura, composición, y

propiedades biológicas de la pared celular se ven afectadas por estos cambios morfológicos en las hifas (Cannon *et al.*, 1994; Soll, 1990).

4.2. Cambio fenotípico o “switching”.

La variación fenotípica o “switching” se produce en *Candida albicans* y especies relacionadas, principalmente en las cepas patógenas, (Hellstein *et al.*, 1993), espontáneamente, reversiblemente y a elevada frecuencia (10^{-4} a 10^{-2}) entre dos o más fenotipos genéricos distinguibles por diferencias en la morfología colonial (Lachke *et al.*, 2000; Pomes *et al.*, 1985; Slutsky *et al.*, 1985; Slutsky *et al.*, 1987; Soll, 1992 a). El “switching” puede afectar a una gran variedad de características en diferentes factores de virulencia (Soll, 1992 b; Soll, 2001 a), produciéndose cambios morfológicos a nivel celular y variaciones en las características fisiológicas como adhesión, secreción de proteasas, contenido lipídico, sensibilidad a antifúngicos, etc, (Anderson *et al.*, 1989; Hube *et al.*, 1994; Kennedy *et al.*, 1988; Morrow *et al.*, 1992; Vargas *et al.*, 1994; White *et al.*, 1993). También se ha sugerido que puede jugar un papel importante generando variabilidad en las poblaciones coloniales para lograr una rápida adaptación a los cambios ambientales (Odds, 1997; Soll, 1992 b), pudiéndose distinguir un elevado número de fenotipos con colonias de diferente morfología (Fig. I.6.). La heterogeneidad resultante de la población es adecuada para cambios ambientales bruscos: si unas pocas células de la población presentan el fenotipo necesario para la supervivencia, pueden proliferar y a la vez generar de nuevo una población diversa. *C. albicans* tiene la capacidad de invadir todo tipo de tejidos, y se postula que la gran variabilidad que presenta como patógeno es debido a un mecanismo de plasticidad fenotípica desarrollado para adaptarse rápidamente a las diferentes condiciones ambientales, tanto en su estado de comensal como de patógeno.

Para aclarar los mecanismos implicados en el “switching”, la transición reversible “white-opaque” en la cepa WO-1 (Slutsky *et al.*, 1987) ha servido como modelo de sistema experimental, ello implica sólo dos fases dominantes, las cuales tienen un drástico impacto en la morfología celular que permite distinguirlas en todos

los tests de agar, lo que hace necesaria la precisa regulación de un número de genes específicos de fase a nivel de la transcripción (Morrow *et al.*, 1994; Rikkerink *et al.*, 1988; Soll, 1992 a; Soll, 1997; Soll, 2001 b; Soll *et al.*, 1991).

La variabilidad antigénica presentada por los diferentes fenotipos es considerada como un mecanismo del hongo patógeno para evadir las defensas del hospedador; los anticuerpos desarrollados frente a un primer antígeno no son eficaces frente a la población de células con variaciones en la composición antigénica, y estas células se desarrollarán selectivamente respecto a las que no han experimentado modificaciones. El mecanismo celular de este proceso no se conoce, pero se ha observado una expresión diferencial de genes que parecen estar implicados en la regulación de la transcripción génica (Soll *et al.*, 1993).

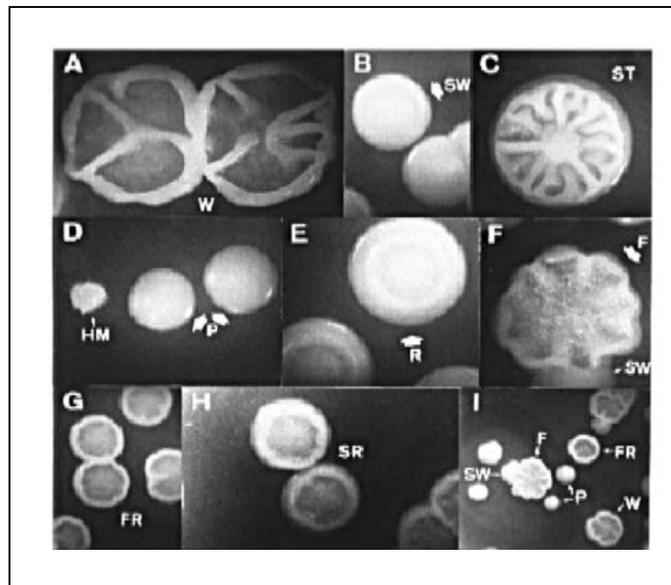


Fig. I. 6. Diferentes fenotipos coloniales presentados por la cepa *C. albicans* ATCC 26555. En la figura se representan los distintos tipos de morfologías en los paneles A-I. SW (smooth-white), W (wrinkled), HW (hyper-wrinkled), ISWW (intermediate smooth-white-wrinkled), ST (star), HM (heavy-myceliated), P (smooth-white-petite), R (ring) F (fuzzy), FR (flat-ring), SR (stippled-ring); (Martínez *et al.*, 1990).

4.3. Secreción de enzimas hidrolíticas.

La secreción de proteasas y otras enzimas hidrolíticas constituyen un factor de virulencia puesto que facilitan la progresión del hongo en los tejidos del hospedador (**Chaffin et al., 1998**). Las principales enzimas hidrolíticas secretadas son aspartilproteasas (Saps) y fosfolipasas.

4.3.1. Aspartil proteasas (Saps).

La familia de las aspartil proteasas (Saps) es la responsable de la actividad proteolítica en *C. albicans*. Estas enzimas tienen en común una actividad proteolítica óptima en un pH ácido, y son inhibidas por el hexapéptido pepstatina A (**Hube and Naglik, 2002**). Hasta el momento se conocen diez miembros de la familia de las aspartilproteasas (SAP1 a SAP10). Sólo la SAP4, SAP5 y SAP6 se expresan específicamente en la forma micelial (**Hube and Naglik, 2001, 2002**). La contribución de esta familia de enzimas a la virulencia de *C. albicans* implica la adherencia a las células epiteliales del hospedador y la degradación proteolítica (**Hube and Naglik, 2001; Munro and Hube, 2002**).

4.3.2. Fosfolipasas.

Son otro tipo de enzimas hidrolíticas extracelulares implicadas en la patogénesis de *C. albicans*. Ha sido demostrada una mayor actividad fosfolipasa en aislados clínicos de *C. albicans* que en los de levaduras comensales. Aislados con gran actividad de este enzima son invasivos en un modelo animal de candidiasis, mientras que los que presentan baja actividad de esta enzima no lo son, correlacionándose los niveles de actividad fosfolipasa con la mortalidad (**Chaffin et al., 1998; Ibrahim et al., 1995**).

4.4. Proteína inmunosupresora y mitogénica de células B (ISM).

A partir del sobrenadante de cultivos de *C. albicans* se ha purificado una proteína de unos 43 kDa, relacionada con la virulencia, ya que:

- el tratamiento de ratones con esta proteína, facilita el desarrollo de las candidiasis.
- la pérdida de la capacidad de producirla conlleva a la pérdida de la virulencia de la cepa.
- la inmunización con la misma, protege completamente a los ratones frente a la infección (Taveres *et al.*, 1993, 1995).

Proteínas ISM han sido descritas también en virus y bacterias siendo factores de virulencia por su efecto inmunosupresor como consecuencia de una sobreestimulación de las células B (Martínez *et al.*, 1998).

4.5. Adhesión.

La adhesión del hongo a los tejidos del huésped es un paso imprescindible para el inicio de la infección. *C. albicans* es capaz de adherirse a distintos tipos celulares, a la matriz extracelular y a materiales inertes como prótesis, catéteres, etc. (Calderone and Braun, 1991; Chaffin *et al.*, 1998; Fukazawa and Kagaya, 1997; Klotz, 1994). Puesto que la pared celular es su estructura más externa, las interacciones fisicoquímicas responsables de la adhesión al hospedador tienen lugar a través de moléculas de dicha pared.

Existen numerosas moléculas que actúan a modo de receptor frente a ligandos específicos del hospedador, como son proteínas de la matriz extracelular y moléculas superficiales de células epiteliales y endoteliales. Estos receptores fúngicos de proteínas humanas que se conocen comúnmente como adhesinas, parecen tener naturaleza

proteica o manoproteica y se expresan en la superficie del hongo. La variedad de adhesinas existentes en *C. albicans* reflejan la heterogeneidad de las zonas que puede invadir en el hospedador. (Calderone, 1993; Chaffin *et al.*, 1998; Hostetter, 1994). La expresión de dichas adhesinas depende de factores ambientales, y en algunos casos está asociada a la transición morfológica, por lo que su función en adhesión, virulencia y dimorfismo es difícil de discernir. No obstante, se ha descrito una adhesina en *C. albicans* implicada en virulencia, adhesión y transición morfológica, lo que indica una estrecha relación entre estos fenómenos (Gale *et al.*, 1998).

Las adhesinas se pueden unir:

- reconociendo una fucosa o N-acetilglucosamina en el hospedador.
- enlazándose con residuos RGD (Arg-Gly-Asp) actuando de forma similar a las integrinas de mamífero.
- utilizando en la unión su parte glucídica (complejo fosfomanoproteico PMPC) (Cutler, 1998) para enlazarse con algún componente del hospedador.

Los mecanismos utilizados por *C. albicans* para adherirse a las diversas superficies biológicas o inertes, son múltiples y todavía no están perfectamente definidos. La virulencia y adhesión varían en función de numerosos factores como son: la cepa estudiada, las condiciones ambientales, la vía de penetración del hongo en el hospedador, el estadio concreto del proceso infeccioso, la naturaleza de la respuesta inmune por parte del hospedador, etc. Así pues, las características biológicas necesarias para adherirse *C. albicans* a los endotelios, no son las mismas que las responsables de la penetración a través de los tejidos. Esto significa que no hay un único factor responsable de la virulencia sino que se debe al resultado de la combinación de diferentes factores (Cutler, 1991; Odds, 1994 b). A continuación se detallan los principales tipos de interacciones implicadas en la adhesión.

4.5.1. Adhesión a proteínas séricas.

C. albicans se une *in vitro* a distintas proteínas séricas, entre las que se encuentran la transferrina, albúmina, componentes del complemento y el fibrinógeno que juega un papel importante en la respuesta inflamatoria, coagulación y reparación de tejidos y es capaz de unirse a manoproteínas de la pared celular de *C. albicans* (**Chaffin et al., 1998; Page and Odds, 1988; Hostetter, 1994; Robert et al., 1991; Tronchin et al., 1987**).

4.5.2. Adhesión a proteínas de la matriz extracelular.

C. albicans puede unirse a componentes de la matriz extracelular como son laminina, vitronectina, entactina, colágeno de tipo I y IV y fibronectina para la cual se han identificado numerosos receptores en *C. albicans* (**Bouchara et al., 1990; Jakab et al., 1993; Klotz, 1990; Klotz and Smith, 1991; López-Ribot and Chaffin, 1994**) y a componentes del sistema complemento (C3b y C3d) (**Heidenreich and Dierich, 1985**). Los receptores pueden ser específicos de ligando, como en el caso de la laminina, o bien pueden enlazar varias proteínas (laminina, fibrinógeno y fibronectina) (**Yan et al., 1998**). Las uniones receptor-ligando en muchos casos están influenciadas por la composición del medio, la temperatura, el estado metabólico (**Hostetter et al., 1990; Klotz and Smith, 1991; Yan et al., 1998**), o por otras moléculas, como es el caso de la hemoglobina que modula el enlace entre fibronectina, fibrinógeno o laminina y las células de *C. albicans* (**Rodrigues et al., 1998; Yan et al., 1998**).

4.5.3. Otros factores de adhesión.

4.5.3.1. Mananos.

Los mananos como parte azucarada de las manoproteínas de la pared celular, también están implicados en la adhesión al hospedador. Se han descrito algunos

dominios oligosacáridicos responsables de la interacción con algunas células (epitelios, macrófagos, etc.) del hospedador (**Chaffin et al., 1993; Kanbe et al., 1993; Li and Cutler, 1993**). Es el caso de los oligosacáridos del receptor manoproteico de 58 kDa para el fibrinógeno, los cuales están implicados en la unión al ligando (**Casanova et al., 1992**).

El grado de manosilación de las proteínas de la pared determina la hidrofobicidad de las células, y cambios en la glicosilación pueden dejar expuestas en la superficie regiones hidrofóbicas de las proteínas (**Fukazawa and Kagaya, 1997**).

4.5.3.2. Fimbrias.

La superficie celular de *C. albicans* presenta unos largos apéndices filamentosos (fimbrias) formados por una glicoproteína de 66 kDa que presentan la capacidad de unirse a células epiteliales bucales del hospedador; dicha glicoproteína parece reconocer específicamente ligandos glicolipídicos del mismo (**Jiménez-Lucho et al., 1990; Yu et al., 1994 a, b**).

4.5.3.3. Lectinas.

Las lectinas son manoproteínas de la superficie celular de *C. albicans* que interaccionan con carbohidratos específicos (L-fucosa, N-acetilglucosamina) de las células epiteliales del hospedador (interacción proteína/carbohidrato). Son los responsables en gran medida de la adhesión a células del epitelio bucal y vaginal. La expresión de dichas lectinas parece depender también de ciertas condiciones ambientales como es la fuente de carbono. Se ha descrito que la unión de *C. albicans* a los eritrocitos mediada por lectinas fúngicas podría estar implicada en la adquisición de hierro (**Brassart et al., 1991; Cameron and Douglas, 1996; Tosh and Douglas, 1992**).

4.5.3.4. Aglutininas.

Se han identificado genes de *C. albicans* que presentan homología con genes de aglutininas fúngicas, cuyos productos génicos podrían estar implicados en la interacción hongo-hospedador (**Chaffin *et al.*, 1998; Hoyer *et al.*, 1995**).

4.5.3.5. Hidrofobicidad de la superficie celular (CSH).

La adhesión del microorganismo a los tejidos también depende de enlaces de tipo electrostático, en los que jugaría un papel importante la hidrofobicidad de la pared celular del hongo. Las células hidrofóbicas se adhieren más fácilmente a los tejidos, y además presentan una mayor resistencia a la fagocitosis que las células con superficie hidrofílica, favoreciendo incluso la captación de algunas sustancias del medio (**Klotz and Penn, 1987; Macura, 1987; Hazen and Hazen, 1988; Ener and Douglas, 1992; Braun, 1994; Hazen, 1989, 1990; Hazen *et al.*, 1991; Hazen and Le Melle, 1990; Vespa *et al.*, 1995; Chaffin *et al.*, 1998**).

Las interacciones hidrofóbicas entre la superficie celular de *C. albicans* y las superficies biológicas o inertes, contribuyen a la adherencia, favoreciendo el contacto adhesina-ligando entre el microorganismo y la superficie en contacto así como la entrada del hongo a regiones internas del hospedador.

Las interacciones de tipo electrostático y las fuerzas hidrofóbicas que dependen en último término de las características fisico-químicas de la superficie celular juegan un importante papel en los fenómenos de adhesión entre células y también en las interacciones entre las células y diversos sustratos inertes. En ambos casos las interacciones mediadas por carga eléctrica o hidrofobicidad se producen a largas distancias, por lo que desempeñan un papel fundamental en los estadios más iniciales de los fenómenos de adherencia. Por ser las mejor conocidas y jugar probablemente un papel más importante en los procesos de adhesión, seguidamente se describirán con detalle los aspectos relativos a las fuerzas hidrofóbicas.

Durante los últimos años, el interés por el estudio del papel de la hidrofobicidad de la superficie celular en los fenómenos de adherencia de los hongos tanto a tejidos animales como a materiales inertes ha sufrido un notable aumento, debido principalmente al desarrollo de métodos simples y económicos para determinar y/o cuantificar dicha propiedad en estos microorganismos, así como al hecho de las evidencias experimentales obtenidas en sistemas bacterianos en los cuales ha sido descrito que la hidrofobicidad de la superficie celular juega un papel muy importante en diversos procesos fisiológicos y patológicos. En concreto, el interés en el estudio de la hidrofobicidad de la superficie celular en *C. albicans* se debe al intento existente de llegar a comprender mejor fenómenos tan importantes como la adhesión a los tejidos infectados, las respuestas inmunológicas y la susceptibilidad a antifúngicos; en los que, se cree, la hidrofobicidad de la superficie celular jugaría, al menos aparentemente, un destacado papel (**Hazen, 1990**).

Es de destacar, que la hidrofobicidad de la superficie celular de *C. albicans* le permite al hongo adherirse a los materiales plásticos utilizados para fabricar diferentes catéteres, sondas y prótesis (**Jacques et al., 1986; Klotz et al., 1985; Minagi et al., 1985; Rotrosen et al., 1986**), motivo por el cual estos objetos pueden convertirse eventualmente en una vía importante a través de la cual el hongo puede invadir el organismo del hospedador, dando lugar a las formas más graves de la enfermedad (sin olvidar que son también las más costosas para el sistema sanitario) que son las candidiasis de tipo sistémico o diseminado.

Es también conocido, que la hidrofobicidad de la superficie celular contribuye de modo importante a incrementar la capacidad de las células fúngicas para adherirse a los tejidos del huésped, en este contexto, se ha sugerido que las interacciones hidrofóbicas contribuirían a crear un entorno adecuado para incrementar el número de uniones entre adhesinas existentes en la superficie de las células fúngicas y receptores presentes en las células de los tejidos del organismo infectado. (**Hazen, 1989**).

Por otro lado, la hidrofobicidad de la superficie celular permitiría a *C. albicans* crecer en compartimentos o localizaciones del huésped no colonizables en un principio,

al conferir a las células la capacidad de adaptarse a las condiciones nutricionales fuertemente restrictivas que existen en dichos compartimentos (**Ofek and Beachey, 1980; Zajic and Seffens, 1983**). Hay que destacar en este ámbito que la expresión de la hidrofobicidad de la superficie celular en *C. albicans* es un proceso dinámico y rápido, ya que las células pueden modificar el carácter de su superficie (de hidrofílico a hidrofóbico y viceversa) en períodos de tiempo no superiores a 30 minutos (**Hazen and Hazen, 1988**). En general, la superficie de las hifas es fuertemente hidrofóbica independientemente del estatus que posea la levadura a partir de la cual se ha originado dicha hifa (**Hazen and Hazen, 1987**), observación que es consubstancial con el mayor carácter invasivo que aparentemente se ha atribuido al micelio.

4.5.3.6. Proteínas de unión a material plástico. Biofilms.

La capacidad que presenta *C. albicans* para adherirse a materiales clínicos de plástico, como son las prótesis, los catéteres, etc., contribuye a la aparición de muchas infecciones nosocomiales. Tras la adhesión, el microorganismo puede formar biofilms que favorecen o inician la aparición de infecciones diseminadas. Los biofilms en *C. albicans* se forman *in vitro* en material clínico como los catéteres y consisten en una matriz de microcolonias cuya composición celular durante el desarrollo del biofilm incluye células de levadura distribuidas en una fina capa basal seguida de una capa de micelio más gruesa y más dispersa (**Calderone and Gow, 2002**). Los biofilms son resistentes a los rangos terapéuticos utilizados con los agentes antifúngicos de uso clínico, incluyendo la anfotericina B y el fluconazol, y parecen tener múltiples mecanismos de resistencia frente al sistema inmunitario del hospedador. Recientes estudios con biofilms mixtos, es decir, formados por *Candida* y especies bacterianas, sugieren que las interacciones que ocurren entre las células procarióticas y eucarióticas son extensas y sorprendentes (**Douglas, 2003**).

Se han descrito numerosas especies proteicas y manoproteicas implicadas en la adhesión a material plástico, cuya expresión depende de múltiples factores ambientales (**Chaffin et al., 1998**).

Los microorganismos son capaces de interactuar con una gran variedad de superficies que van desde materiales inorgánicos naturales y artificiales como rocas y plásticos, hasta los tejidos de las plantas y los animales. En la actualidad se acepta de modo general que la adhesión de los microorganismos patógenos a las células o tejidos que van a infectar es el primer paso del proceso de colonización e infección del huésped, proceso en el que intervienen múltiples mecanismos que fundamentalmente están basados en el reconocimiento de moléculas complementarias (receptores y/o ligandos) que se encuentran presentes en la superficie tanto de las células del agente patógeno como en las del organismo hospedador.

Aunque no existen muchos estudios sobre los mecanismos implicados en la adhesión de las células fúngicas en general, y de los hongos levaduriformes en particular, a substratos biológicos o inertes, en comparación con los abundantes trabajos que se han publicado sobre estos aspectos en relación con las bacterias, la importancia que sin duda tiene la capacidad de adherencia del agente patógeno a los tejidos y células del huésped como factor de virulencia, ha estimulado considerablemente el interés de los investigadores por estudiar dicho proceso en el caso de *C. albicans* (**Calderone and Braun, 1991; Douglas, 1987 a**).

La pared celular constituye el sitio inicial de interacción entre el hongo y el medio ambiente en el que se encuentra, por ser la estructura más externa de las células de *C. albicans*, y desempeña un significativo papel en los procesos de adherencia, migración, colonización e invasión de los tejidos animales, así como en la adhesión a superficies inertes. De manera paralela a lo que ocurría en el caso de las bacterias (**Beachey, 1981**), los estudios iniciales relacionados con este aspecto se encaminaron hacia la caracterización de los componentes presentes en la superficie de las células fúngicas (adhesinas) de las que depende la capacidad de *C. albicans* para adherirse a las células de las mucosas que recubren la boca y la vagina (**Sobel et al., 1981**), sugiriéndose que determinadas especies manoproteicas de la superficie (pared) celular del hongo, podrían desempeñar ese papel (**Douglas, 1985, 1987 b; Kennedy, 1987; Rotrosen et al., 1986**), así como que la parte proteica de dichas manoproteínas tendría

una mayor importancia que el componente carbohidrato de las mismas a la hora de mediar en la adherencia del hongo a las células del huésped.

Pero además de las manoproteínas, existen otras moléculas directa o indirectamente relacionadas con la estructura y/o composición de la pared celular que parecen desempeñar también una función importante en la interacción y posterior adherencia de *C. albicans* a los tejidos del hospedador, tal es el caso de compuestos de naturaleza lipídica, enzimas proteolíticas extracelulares, etc. También en este sentido, parece estar encaminada la nueva familia de proteínas descrita en otros hongos patógenos como son las hidrofobinas que se detallan a continuación en el presente trabajo como una nueva familia de proteínas en *C. albicans*.

5. Hidrofobinas.

5.1. Características generales y tipos de hidrofobinas.

Las hidrofobinas son proteínas de secreción, de pequeño tamaño molecular (menores de 30 kDa), exclusivas de los hongos filamentosos (Ascomicetos y Basidiomicetos), las cuales son capaces de autoensamblarse en una interfase hidrofílica-hidrofóbica formando películas anfipáticas (Tabla I.2.).

Todos los genes de hidrofobinas contienen secuencias de péptido señal y su secreción ha sido confirmada mediante inmunolocalización (**Wösten *et al.*, 1994 a; Lugones *et al.*, 1996**) y por análisis de la secuencia N-terminal de un buen número de ellas (**Templeton *et al.*, 1995; Bidochka *et al.*, 1995**).

En base a los modelos de hidropatía y solubilidad que caracterizan a estas proteínas se han identificado dos tipos distintos de hidrofobinas. Hidrofobinas denominadas de clase I y clase II, las cuales presentan características comunes y características claramente diferenciadoras lo que obliga a dividir las en dos grupos de proteínas dentro de una misma familia (**Wessels, 1994**) y cuyas propiedades se detallan

en la Tabla I.3. Las hidrofobinas de clase I han sido identificadas en Ascomicetos y Basidiomicetos, mientras que las hidrofobinas de clase II son exclusivas, por el momento, de hongos Ascomicetos.

Las hidrofobinas de clase I y clase II presentan modelos de hidropatía característicos y contienen ocho residuos de cisteína altamente conservados (Tabla I.4.) (Wessels, 1994; Wessels, 1997) que forman puentes disulfuro intramoleculares de una manera peculiar (De Vries *et al.*, 1993; Yaguchi *et al.*, 1993) (Fig. I.7.). Los espacios entre las cisteínas muestran variaciones considerables en las hidrofobinas de clase I pero son invariables en las hidrofobinas de clase II y todos los residuos de cisteínas parecen estar involucrados en la formación de puentes disulfuro. Este modelo predice una proteína con cuatro bucles, dos de los cuales están compuestos predominantemente por residuos hidrofóbicos. El orden característico de los ocho residuos de cisteína define las hidrofobinas fúngicas y las distingue de otras proteínas ricas en cisteínas tales como los péptidos estimuladores de respuesta inmune (Van den Ackervecken *et al.*, 1992; Templeton *et al.*, 1994; Rohe *et al.*, 1995), las proteínas ligadoras de quitina, proteínas ligadoras de lípidos (Sterk *et al.*, 1991; Désormeaux *et al.*, 1992; Castonguay *et al.*, 1994), y toxinas extracelulares.

HIDROFOBINA	CLASE	GRUPO TAXONÓMICO	ORGANISMO	FENOTIPO MUTANTE DETERMINADO	FUNCIÓN BIOLÓGICA	REFERENCIA BIBLIOGRÁFICA
SC1	I	Basidiomicetos	<i>Schizophyllum commune</i>	No	Desconocida. Expresada en fase dicariótica	Schuren and Wessels, 1990; Wessels <i>et al.</i> , 1991
SC3	I			Si	Involucrada en la formación de hifas aéreas y en la capacidad para unirse a superficies hidrofóbicas	Wösten <i>et al.</i> , 1994 b; Van Wetter <i>et al.</i> , 1996
SC4	I			No	Desconocida. Expresada en la fase dicariótica.	Schuren and Wessels, 1990; Wessels <i>et al.</i> , 1991 a
SC6	I			No	Desconocida. Expresada en la fase dicariótica	Wessels, 1997
CoH1	I		<i>Coprinus cinereus</i>	No	Desconocida	Ásgeirsdóttir <i>et al.</i> , 1997
HydPt-1	I		<i>Pisolithus tinctorius</i>	No	Desconocida. Expresada en micorrizas	Tagu <i>et al.</i> , 1996
HydPt-2	I			No	Desconocida. Expresada en micorrizas	Tagu <i>et al.</i> , 1996
ABH-1	I		<i>Agaricus bisporus</i>	No	Desconocida. Expresada en la fase dicariótica.	Lugones <i>et al.</i> , 1996; de Groot <i>et al.</i> , 1996
ABH-2	I			No	Desconocida. Expresada en la fase dicariótica.	Lugones <i>et al.</i> , 1996, de Groot <i>et al.</i> , 1996
SSGA	I	Ascomicetos	<i>Metarhizium anisopliae</i>	No	Desconocida. Expresada durante el desarrollo del apresorio	St. Leger <i>et al.</i> , 1992
MPG1	I		<i>Magnaporthe grisea</i>	Si	Proteína de la pared del conidio. Involucrada en la formación del conidio y el apresorio. Requerida para la completa patogenicidad	Talbot <i>et al.</i> , 1993; Talbot <i>et al.</i> , 1996
RodA	I		<i>Aspergillus nidulans</i>	Si	Proteína de la pared del conidio	Stringer <i>et al.</i> , 1991
DewA	I			Si	Proteína de la pared del conidio	Stringer and Timberlake, 1995
HYP1	I		<i>Aspergillus fumigatus</i>	Si	Proteína de la pared del conidio	Parta <i>et al.</i> , 1994; Thau <i>et al.</i> , 1994
Eas	I		<i>Neurospora crassa</i>	Si	Proteína de la pared del conidio	Bell-Pedersen <i>et al.</i> , 1992; Lauter <i>et al.</i> , 1992
CU	II		<i>Ophiostoma ulmi</i>	Si	Formación de la hifa aérea e hidrofobicidad. Expresión abundante en la planta infectada	Bowden <i>et al.</i> , 1996
CRYP	II		<i>Cryphonectria parasitica</i>	Si	Desconocida. Expresión abundante en la planta infectada. Proteína de pared celular	Zhang <i>et al.</i> , 1994
QID3	II		<i>Trichoderma harzianum</i>	No	Desconocida. Elevada expresión en medios que contienen quitina	Lora <i>et al.</i> , 1995
HFB1	II		<i>Trichoderma reesei</i>	No	Desconocida. Elevada expresión en medios que contienen glucosa	Nakari-Setälä <i>et al.</i> , 1996
HFB2	II			No	Desconocida	Nakari-Setälä <i>et al.</i> , 1996
Cpa3	II		<i>Claviceps purpurea</i>	No	Desconocida. Estructura tri-hidrofobina inusual.	Arntz and Tudzynski, 1997

Tabla I.2. Hidrofobinas fúngicas.

A pesar de una aparente similitud estructural, la homología de los aminoácidos entre las hidrofobinas es limitada. La similitud de los aminoácidos de 20 hidrofobinas fue comparado por **Wessels (1997)**, observándose tan solo un 4,3% de identidad y un 1,7% de similitud entre todas la hidrofobinas investigadas.

CARACTERÍSTICAS GENERALES DE LAS HIDROFOBINAS	
<ul style="list-style-type: none"> • Proteínas fúngicas hidrofóbicas de secreción • Pequeño tamaño molecular • Capacidad de autoensamblaje • Exclusivas de hongos miceliares • Hidropatía característica • Presentan ocho residuos de cisteína • Puentes disulfuro intramoleculares • Pueden glicosilarse • Implicadas en la formación de estructuras aéreas • Importantes en los pasos iniciales de la patogénesis fúngica • Inusuales propiedades bioquímicas. Escape a la detección • Uso en aplicaciones clínicas y tecnológicas 	
CARACTERÍSTICAS HIDROFOBINAS CLASE I	CARACTERÍSTICAS HIDROFOBINAS CLASE II
<ul style="list-style-type: none"> • Secuencia de aminoácidos con baja homología • Más conocidas • Más abundantes • Ascomicetos y Basidiomicetos • Disociadas por Ácido Fórmico y Ácido Trifluoroacético • Formación de “Rodlets” 	<ul style="list-style-type: none"> • Secuencia de aminoácidos conservada • Menos conocidas • Menos abundantes • Ascomicetos • Disociadas por SDS y Etanol • NO forman “Rodlets”

Tabla I.3. Esquema de las propiedades que presentan las hidrofobinas. En la parte superior del cuadro se detallan las propiedades comunes a todas las hidrofobinas. En la parte inferior se esquematizan las propiedades exclusivas de las hidrofobinas de clase I y clase II (izquierda y derecha respectivamente).

Nombre de la hidrofobina	Espacio entre cisteínas
CLASE I (modelo)	C-X ₅₋₇ -C-C-X ₁₉₋₃₉ -C-X ₈₋₂₃ -C-X ₅ -C-C-X ₆₋₁₈ -C-X ₂₋₁₃
MPG1	C-X ₇ -C-C-X ₂₂ -C-X ₁₉ -C-X ₅ -C-C-X ₁₁ -C-X ₅
RodA	C-X ₇ -C-C-X ₃₉ -C-X ₁₈ -C-X ₅ -C-C-X ₁₇ -C-X ₇
DewA	C-X ₆ -C-C-X ₃₀ -C-X ₂₃ -C-X ₅ -C-C-X ₆ -C-X ₁₃
SC3	C-X ₆ -C-C-X ₃₃ -C-X ₁₂ -C-X ₅ -C-C-X ₁₂ -C-X ₆
ssgA	C-X ₅ -C-C-X ₁₉ -C-X ₁₅ -C-X ₅ -C-C-X ₁₂ -C-X ₅
SC1	C-X ₆ -C-C-X ₃₃ -C-X ₁₂ -C-X ₅ -C-C-X ₁₂ -C-X ₇
SC4	C-X ₆ -C-C-X ₃₃ -C-X ₁₂ -C-X ₅ -C-C-X ₁₂ -C-X ₅
Eas	C-X ₈ -C-C-X ₂₅ -C-X ₈ -C-X ₅ -C-C-X ₁₈ -C-X ₂
HydPt-1	C-X ₆ -C-C-X ₃₂ -C-X ₁₃ -C-X ₅ -C-C-X ₁₂ -C-X ₇
HydPt-2	C-X ₆ -C-C-X ₃₂ -C-X ₁₃ -C-X ₅ -C-C-X ₁₂ -C-X ₇
CLASE II (modelo)	C-X ₉₋₁₀ -C-C-X ₁₁ -C-X ₁₆ -C-X ₈₋₉ -C-C-X ₁₀ -C-X ₆₋₇
Cerato-ulmina	C-X ₉ -C-C-X ₁₁ -C-X ₁₆ -C-X ₉ -C-C-X ₁₀ -C-X ₆
Criparina	C-X ₉ -C-C-X ₁₁ -C-X ₁₆ -C-X ₈ -C-C-X ₁₀ -C-X ₆
QID3	C-X ₉ -C-C-X ₁₁ -C-X ₁₆ -C-X ₉ -C-C-X ₁₀ -C-X ₇
HFB1	C-X ₉ -C-C-X ₁₁ -C-X ₁₆ -C-X ₈ -C-C-X ₁₀ -C-X ₆
Cpa3	C-X ₉₋₁₀ -C-C-X ₁₁ -C-X ₁₆ -C-X ₈ -C-C-X ₁₀ -C

Tabla I.4. Espacio entre las cisteínas en las hidrofobinas fúngicas (**Kershaw and Talbot, 1998**). En la tabla se representa con una C las cisteínas y con una X los aminoácidos. El número de aminoácidos que preceden a las cisteínas se representa con los subíndices, excepto los precedentes a la primera cisteína ya que en muchos casos todavía no se ha determinado exactamente el péptido señal.

Las películas formadas por las hidrofobinas de clase I son altamente insolubles (resistentes al dodecil sulfato sódico al 2% a 100°C) y sólo pueden disociarse con agentes como el ácido fórmico o el ácido trifluoroacético (**De Vries et al., 1993; Wessels et al., 1991 a; Wessels et al., 1991 b**). En contraste, las películas de las hidrofobinas de clase II son fácilmente disociadas con etanol al 60% y con dodecil sulfato sódico al 2% (**Carpenter et al., 1992; Russo et al., 1982**). También existen evidencias de la disociación aplicando presión o por refrigeración (**Russo et al., 1982**).

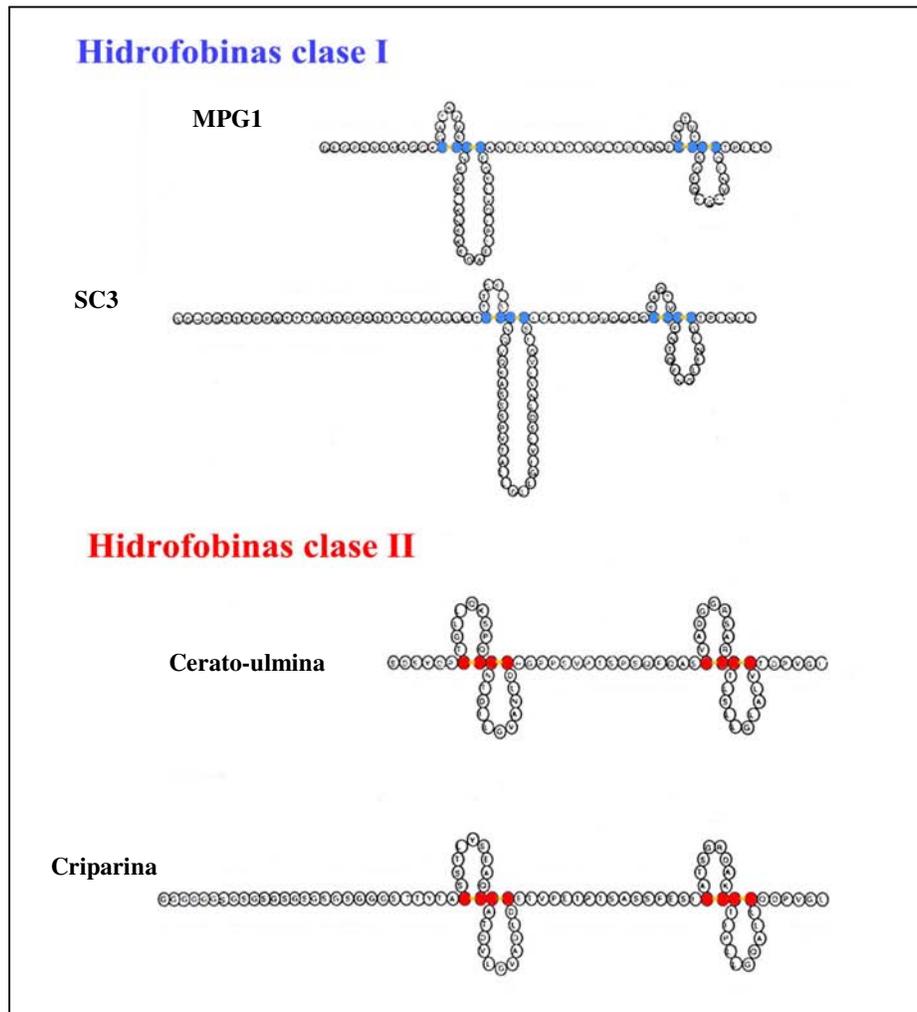


Fig. I.7. Representación esquemática de las posibles estructuras de las hidrofobinas (Kershaw and Talbot, 1998) basadas en uniones por puentes disulfuro intramoleculares (Yaguchi *et al.*, 1993). En este modelo, los ocho residuos de cisteína (en azul y en rojo) forman cuatro puentes disulfuro intramoleculares (en amarillo) dando lugar a dos regiones de la proteína que contienen un total de cuatro bucles. Los bucles 2 y 4 son predominantemente hidrofóbicos. Las hidrofobinas de clase I se muestran en las 2 figuras superiores (MPG1 y SC3 respectivamente) y las hidrofobinas de clase II, se muestran en las 2 inferiores (Cerato-ulmina y Criparina respectivamente). En cuanto al tamaño de los bucles se pueden apreciar diferencias notables entre ambos tipos de hidrofobinas, destacando la longitud del segundo bucle en las hidrofobinas de clase I. Las hidrofobinas de clase II muestran estructuras mucho más simétricas en todos los bucles.

Las hidrofobinas pueden ser glicosiladas, aunque esta propiedad se puede atribuir exclusivamente al tipo de aminoácidos que presente la secuencia (**Wösten and de Vocht, 2000**).

Las investigaciones bioquímicas muestran que las hidrofobinas de clase I y clase II son distintas, hecho que concuerda con las diferencias encontradas en su estructura. Experimentos con *Schizophyllum commune* muestran que las hidrofobinas de clase I podían ser purificadas de las paredes celulares del hongo como complejos de elevado peso molecular insolubles en SDS (**Wessels et al., 1991 a**). Estos complejos pueden ser disociados en sus constituyentes monoméricos por tratamiento con ácido fórmico o mediante agentes oxidantes como ácido per fórmico. Posteriormente, se encontró que el ácido trifluoroacético en frío (TFA) es más efectivo en la disociación de los ensamblajes de las hidrofobinas, dejando los monómeros intactos y biológicamente activos (**de Vries et al., 1993**). Utilizando este procedimiento Wessels y colaboradores mostraron la extensa distribución de las hidrofobinas entre los hongos (**de Vries et al., 1993**) y descubrieron el proceso de autoensamblaje interfacial de las hidrofobinas (**Wösten et al., 1993**).

El conocimiento de las hidrofobinas de clase II se debe en gran parte al trabajo pionero de Takai y colaboradores sobre la fitotoxina Cerato-ulmina de *Ophiostoma ulmi* (**Richards and Takai, 1993; Takai, 1974, 1980**). Sólo tras la deducción de la secuencia aminoacídica de la hidrofobina Cerato-ulmina (**Bowden et al., 1993**) se descubrió su homología con las hidrofobinas (**Stringer and Timberlake, 1993**); aunque ya se conocía que la Cerato-ulmina purificada presentaba un número de características que recordaban a las hidrofobinas de *S. commune*, como es la capacidad de ésta para polimerizar en fibras o varillas cuando contacta con el aire. Estos agregados, no obstante, son muy inestables comparados con los de la hidrofobina SC3 y podían ser fácilmente disociados con etanol al 60% o por aplicación de presión (**Takai and Richards, 1978**).

5.2. Autoensamblaje de las hidrofobinas.

El autoensamblaje confiere a las hidrofobinas la capacidad de interactuar con interfases como agua y aire o agua y superficies sólidas. La purificación y caracterización de la hidrofobina SC3 de *S. commune* conduce al descubrimiento del autoensamblaje el cual parece ser debido a la agregación espontánea de monómeros de hidrofobina mediada por interacciones hidrofóbicas (**Wösten et al., 1993**).

El autoensamblaje de las hidrofobinas fue examinado ultraestructuralmente y se encontró que estaba compuesto por agrupamientos de “rodlets” entrecruzados (Fig. I.8.). Los “rodlets” de SC3 son de 10 a 13 nm de diámetro y se encuentran en el lado hidrofóbico de la capa polimerizada de hidrofobinas (**Wösten et al., 1993, 1994 a**). Evidencias genéticas en *Aspergillus nidulans* (**Stringer et al., 1991**) y la inmunolocalización de la hidrofobina SC3 establecen firmemente que las capas de “rodlets” sobre las superficies fúngicas son los primeros productos del autoensamblaje de las hidrofobinas.

La disrupción del gen *RodA* de *A. nidulans* y del gen *Eas* de *Neurospora crassa* da lugar a mutantes con esporas “fácilmente mojables”, al perder la capa hidrofóbica de “rodlets” que recubren el conidio (**Stringer et al., 1991; Bell-Pedersen et al., 1992; Lauter et al., 1992**).

El papel de la capa de “rodlets” en los hongos no está, todavía, bien definido. Los fenotipos “fácilmente mojables” asociados a los mutantes de hidrofobinas, sugieren que las capas de “rodlets” son instrumentos para la generación de superficies hidrofóbicas, pero el significado de su patrón estructural es menos obvio. Los “rodlets”, individualmente, son demasiado pequeños para contribuir a la hidrofobicidad, porque por razones topológicas se requiere un tamaño superior a 100 nm y los “rodlets” raramente miden más de 15 nm de diámetro (**Wessels, 1997**).

No se sabe con certeza si la capa de “rodlets” se compone únicamente de hidrofobinas. Los “rodlets” formados a partir de soluciones de la hidrofobina SC3 purificada se asemejan a los “rodlets” producidos por la hifa de *S. commune*, pero son

cualitativamente diferentes, particularmente en lo que se refiere a la longitud de los “rodlets” individuales, aunque se encontró que la longitud era dependiente de la concentración de los monómeros de hidrofobina (**Wosten *et al.*, 1994 a**). Además, la presencia de más de una hidrofobina en las esporas de *A. nidulans* sugiere que las capas de “rodlets” pueden estar constituidas por agregados de más de una proteína, si bien la ausencia de la capa de “rodlets” en mutantes de *A. nidulans* *RodA*⁻ sugieren que la hidrofobina codificada por el gen *RodA* es el componente esencial del “rodlet”.

Por otra parte, la presencia de tres motivos potenciales de miristilación en la hidrofobina Eas de *N. crassa* y la homología a las proteínas ligadoras de lípidos en plantas también sugiere que interacciones lipídicas podrían estar implicadas en la producción de la capa de “rodlets” o en su unión a la pared celular subyacente (**Lora *et al.*, 1995**).

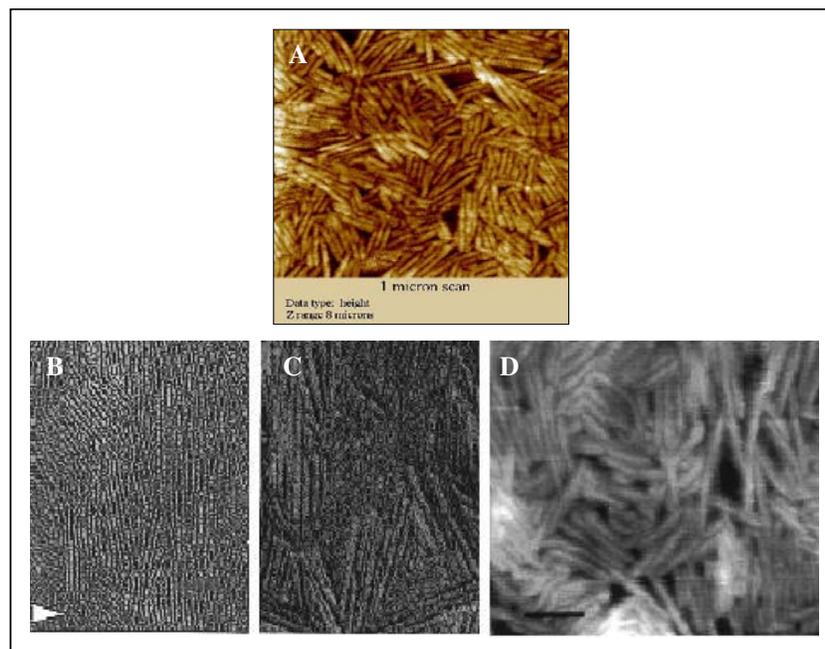


Fig. 1.8. Estructura tipo “rodlet” de la superficie hidrofóbica de una membrana de hidrofobinas formada en una interfase aire-agua mediante microscopía de fuerza atómica (paneles A-D).

5.3. Propiedades Bioquímicas y Biofísicas de las hidrofobinas.

Todas las hidrofobinas que han sido físicamente aisladas se autoensamblan en interfases hidrofílicas/hidrofóbicas formando películas anfipáticas (**Carpenter *et al.*, 1992; Lugones *et al.*, 1996, 1998, 1999; Richards, 1993; Richards and Takai, 1973; Russo *et al.*, 1982; Takai *et al.*, 1980; Takai and Richards, 1978; Wösten *et al.*, 1993, 1994 a, 1994 b, 1995**).

El autoensamblaje de las hidrofobinas necesario para la formación de la membrana anfipática está acompañado por una serie de cambios conformacionales. Las formas monoméricas de las hidrofobinas de clase I y clase II son ricas en estructura de tipo hoja- β (**De Vocht *et al.*, 1998; Yaguchi *et al.*, 1993**). En la interfase agua-aire, la hidrofobina de clase I consigue tener más estructura hoja- β (estado hoja- β), mientras que en la interfase entre el agua y un sólido hidrofóbico, se observa un incremento de la forma α -hélice (estado α -hélice) (**De Vocht *et al.*, 1998**). El estado α -hélice parece ser un estado intermedio del autoensamblaje, mientras que el estado hoja- β es la forma finalmente estable. En la interfase agua-aire, los monómeros de las hidrofobinas de clase I consiguen el estado de α -hélice en pocos segundos, pero la conversión al estado de hoja- β es mucho más lento y requiere desde minutos a horas (**De Vocht *et al.*, 2002**).

En la interfase agua-sólido, la proteína también alcanza fácilmente el estado de α -hélice pero se cree que se detiene en este estado. El estado final hoja- β solo puede ser alcanzado por aplicación de calor combinado con la dilución en un detergente (Fig. I.9.) (**Wösten and de Vocht, 2000**). Ambas formas de la hidrofobina ensamblada presentan un carácter y naturaleza anfipáticos y pueden disociarse con TFA. Si se elimina el solvente y se redisuelven en agua, las hidrofobinas de clase I se repliegan a la misma estructura monomérica que se había observado antes de la purificación o tratamiento con TFA (**De Vocht *et al.*, 1998**), y el proceso de autoensamblaje puede ser repetido (**Wösten *et al.*, 1993**).

Todavía no son conocidos los cambios estructurales que acompañan el autoensamblaje de las hidrofobinas de clase II. No obstante, el autoensamblaje y desensamblaje de las hidrofobinas de clase II puede ser repetido también después de cada disociación de la película con TFA. Esto muestra que ambas clases de hidrofobinas son altamente resistentes a este tipo de tratamientos.

La hidrofobina SC3 comparte una serie de características con las proteínas amiloides, como son la capacidad de autoensamblaje vía estados intermedios y únicamente por encima de una concentración crítica. Se ha sugerido que la formación de fibrillas amiloides es común, si no general, para todas las cadenas polipeptídicas. Sin embargo, ya que la formación de fibrillas amiloides va acompañada de pérdidas en las funciones o incluso en la aparición de patologías (enfermedad de Alzheimer), la evolución podría haber actuado en contra de esta propensión a formar tales fibrillas. En este sentido, las hidrofobinas son el primer ejemplo de amiloides funcionales, y además con diversidad de funciones. Recientemente, se ha descubierto que los cuatro puentes disulfuro de la hidrofobina SC3 son esenciales para prevenir la formación de estructuras amiloides en ausencia de una interfase hidrofílica-hidrofóbica (**De Vocht *et al.*, 2000**). Cuando los puentes disulfuro son reducidos y los grupos sulfhidrilo son bloqueados con yodoacetamida, la proteína espontáneamente se disuelve en el agua. Su estructura es entonces indistinguible de la proteína nativa ensamblada en la interfase agua-aire. Aparentemente, los puentes disulfuro de las hidrofobinas mantienen los monómeros solubles en el agua (por ejemplo en el interior de la célula o en el medio) y por lo tanto previenen el autoensamblaje precoz. Esto explicaría porqué todas las hidrofobinas presentan ocho residuos de cisteína altamente conservados.

Las hidrofobinas pertenecen al grupo de moléculas de superficie más activas con propiedades similares a los surfactantes. Con un descenso máximo de tensión superficial de 72 a 24 mJ·m⁻² a 50 µg·ml⁻¹, la hidrofobina SC3 es la proteína surfactante más activa conocida (**Wösten *et al.*, 1999**). Otras hidrofobinas también son surfactantes (**De Vries *et al.*, 1999**; **Lugones *et al.*, 1998, 1999**). Sus propiedades tensio-activas en superficie son similares al de los biosurfactantes tradicionales (**Jenny *et al.*, 1991**). En contraste con estos biosurfactantes, su capacidad surfactante no es dependiente de un

lípido conjugado sino que es causada exclusivamente por la secuencia de aminoácidos. Más aún, mientras el descenso máximo de la tensión superficial por los surfactantes tradicionales se obtiene en segundos, en el caso de las hidrofobinas de clase I lleva minutos o incluso horas. Esto se explica por el hecho de que las hidrofobinas disminuyen la tensión en superficie del agua sólo después del autoensamblaje, el cual es acompañado de cambios conformacionales en la molécula.

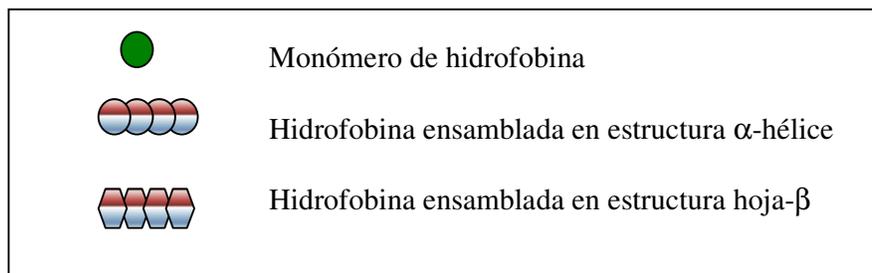
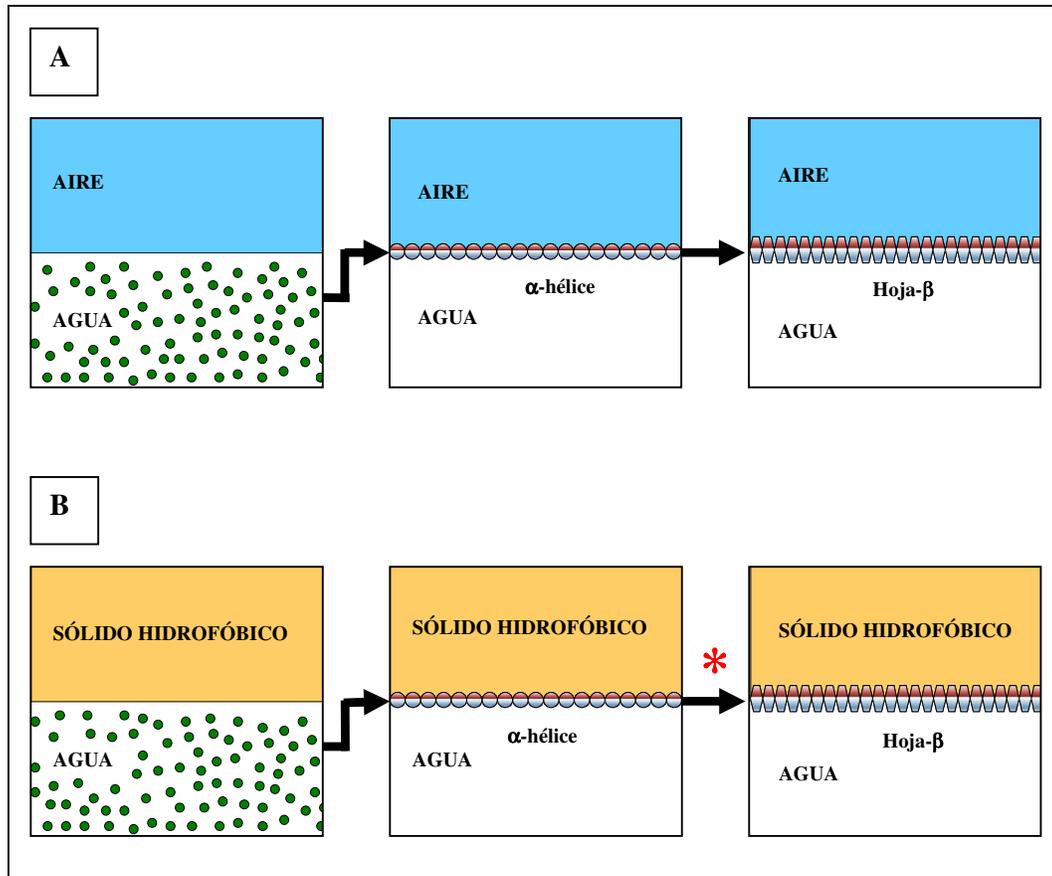


Fig. I.9. Modelo de ensamblaje de las hidrofobinas. Los monómeros secretados por las hifas difunden hacia la interfase hidrofílica/hidrofóbica donde inicialmente adoptan la estructura de α -hélice. En la interfase agua-aire la estructura de α -hélice cambia espontáneamente al estado de hoja- β . En el sólido hidrofóbico, la hidrofobina se detiene en la estructura de α -hélice a menos que la superficie cubierta sea calentada a 100°C con 2% de SDS (*).

El primer paso en la formación de estructuras fúngicas aéreas (micelios y cuerpos fructíferos) es el escape de cada hifa del ambiente húmedo hacia el aire. La interfase agua-aire, caracterizada por una elevada tensión superficial de $72 \text{ mJ}\cdot\text{m}^{-2}$, es en un principio una barrera para el crecimiento aéreo (Wösten *et al.*, 1999). Este hecho está basado en la observación de que la iniciación en la formación de hifas aéreas se correlaciona con un descenso en la tensión superficial del agua de 72 a $45 \text{ mJ}\cdot\text{m}^{-2}$ y que la mayoría de hifas se forman en un medio con una tensión superficial de $30 \text{ mJ}\cdot\text{m}^{-2}$. El curso de la caída de la tensión superficial se correlaciona con la producción de hidrofobina y puede ser explicada por la capacidad de la misma para reducir la tensión superficial a un valor que puede llegar a ser tan bajo como el de $24 \text{ mJ}\cdot\text{m}^{-2}$ en la interfase agua-aire. La tensión superficial crítica con la cual una hifa puede formar la primera hifa aérea es de $45 \text{ mJ}\cdot\text{m}^{-2}$.

La mayoría de los hongos secretan hidrofobinas de clase I en el medio de cultivo (Ásgeirsdóttir *et al.*, 1998; Lugones *et al.*, 1998; Wösten and de Vocht, 2000), sugiriendo que el descenso de la tensión superficial del agua por secreción de hidrofobinas es una condición general para iniciar el crecimiento aéreo. Las hidrofobinas de clase II también son altamente activas en cuanto a la tensión superficial se refiere, pero todavía no se ha establecido si son un medio que utiliza la hifa para escapar del agua. El hallazgo de que la formación de hifas aéreas en los hongos *Ophiostoma novo-ulmi* y *Ophiostoma ulmi* se correlaciona con la formación de hidrofobinas de clase II (Bowden *et al.*, 1996; Temple *et al.*, 1997) podría ir en esta dirección.

Si el descenso de la tensión superficial del agua es un medio para la formación de hifas aéreas, cabría esperar que cualquier surfactante podría producir la formación de hifas aéreas. Sin embargo, muchos surfactantes son tóxicos porque interaccionan con las membranas celulares. En contraste con la mayoría de surfactantes, la actividad de las hidrofobinas en superficie se consigue debido al cambio conformacional que ocurre cuando los monómeros de la misma se ensamblan. El gran complejo de hidrofobinas ensambladas no difunde a través de la pared celular para interaccionar con la membrana plasmática, esto explica en gran medida por qué estas moléculas no son tóxicas. En efecto, aparte de las hidrofobinas de clase I, sólo el pequeño octapéptido estreptofactina de la bacteria *Streptomyces tendae* (Richter *et al.*, 1998) induce el crecimiento aéreo en cepas de *Schizophyllum commune* con el gen *SC3* disrupcionado (Wösten *et al.*, 1999). Esta molécula está implicada en la escapada de los filamentos de *S. tendae* del ambiente acuoso (Richter *et al.*, 1998) y también es capaz de autoensamblarse. Este octapéptido es por lo tanto en esta bacteria el equivalente funcional a la hidrofobina en el hongo *S. commune*. Posiblemente, la hidrofobina fúngica de *S. commune* podría complementar una cepa de *S. tendae* defectiva en la producción de estreptofactina. Aparentemente, las bacterias y los hongos filamentosos desarrollan mecanismos similares para crecer en el aire y formar estructuras reproductivas, pero las moléculas implicadas presentan estructuras diferentes.

Las hidrofobinas como ya se ha comentado anteriormente se autoensamblan en interfases de naturaleza hidrofílica-hidrofóbica, por ejemplo entre agua y aire, agua y aceite, agua y un sólido hidrofóbico como es el teflón, formando membranas anfipáticas. El lado hidrofílico de una membrana de hidrofobinas tiene un ángulo de contacto (θ) con el agua entre 22° y 63° mientras que el lado hidrofóbico exhibe un ángulo de contacto (θ) con el agua de aproximadamente 110° (Wösten and de Vocht, 2000) (Fig. I.10.). Debido al autoensamblaje, las hidrofobinas pueden cambiar la naturaleza de una superficie. El cristal y el papel de filtro que son hidrofílicos se vuelven hidrofóbicos si se seca una solución de hidrofobinas sobre su superficie (Fig. I.10.B) (Wösten *et al.*, 1993; Lugones *et al.*, 1996, 1998, 1999). De la misma forma, los sólidos hidrofóbicos, por ejemplo el teflón o el aceite (Fig. I.10.A), pueden

convertirse en hidrofílicos sumergiendo estos materiales en una solución de hidrofobinas (Wösten *et al.*, 1994 c, 1995; Lugones *et al.*, 1996, 1998, 1999).

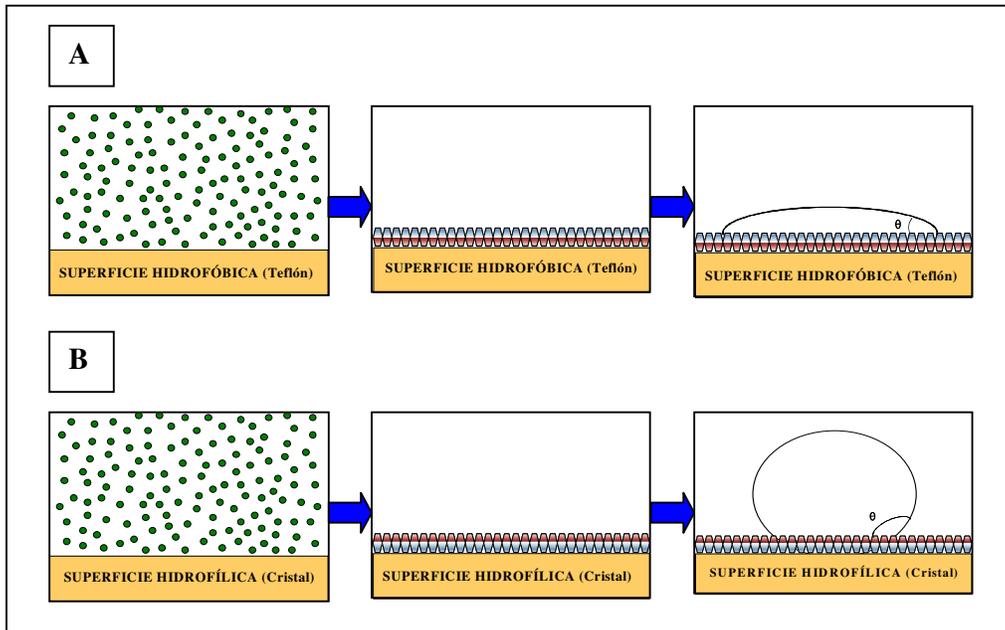


Fig. I.10. Cambio de la naturaleza de una superficie por autoensamblaje de hidrofobinas. **(A)** Película de hidrofobinas sobre una superficie hidrofóbica (teflón) inmersa en una solución acuosa, la cual se vuelve hidrofílica debido a las proteínas adheridas que muestran su lado hidrofílico en superficie formando ángulos de contacto (θ) con el agua entre 22 y 63°. **(B)** Película de hidrofobinas que sobre una superficie hidrofílica (cristal) inmersa en una solución acuosa la vuelven hidrofóbica al mostrar las proteínas en superficie su lado hidrofóbico formando ángulos de contacto θ con el agua de 110°.

5.4. Funciones de las hidrofobinas.

5.4.1. Papel de las hidrofobinas en el escape de la hifa del ambiente acuoso.

El descubrimiento del autoensamblaje de la SC3 y de sus características biofísicas y bioquímicas conducen a formular un modelo de morfogénesis aérea fúngica

el cual depende de la secreción de monómeros de hidrofobina por los ápices de las hifas (Wessels, 1994, 1996, 1997). Una representación de este modelo se muestra en la Fig. I.11. La secreción de hidrofobinas ocurre cuando las hifas crecen en un ambiente acuoso. Una vez producido el encuentro de la interfase con el aire se produce el autoensamblaje, lo cual provoca un descenso de la tensión superficial que permite que la hifa emerja en el aire. Al tiempo que la hifa se extiende, continúa la secreción y el autoensamblaje de hidrofobinas permitiendo el mantenimiento de la cubierta hidrofóbica y el crecimiento aéreo de la hifa.

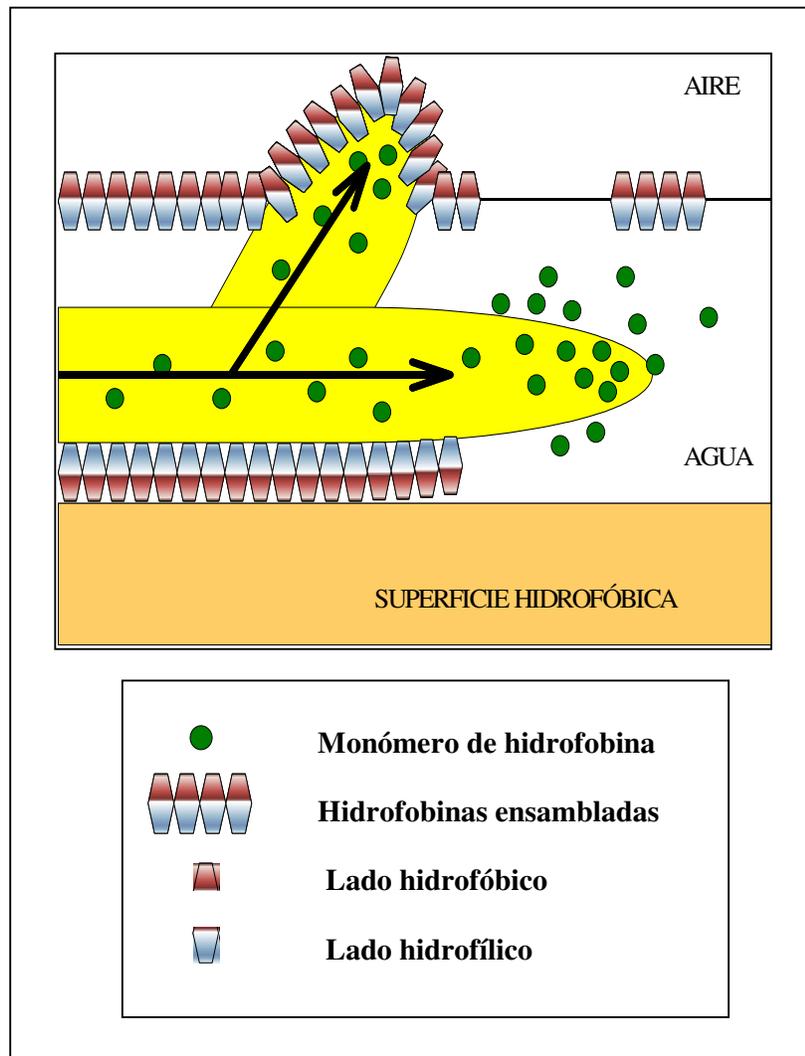


Fig. I.11. Modelo propuesto para la formación de estructuras fúngicas aéreas.

Todavía no se ha establecido con exactitud que ocurre cuando una hifa se aproxima a la interfase agua-aire y es confrontada con la película anfipática formada por las hidrofobinas. La fuerza generada por la presión turgente en la aproximación de la hifa, podría extender la película de hidrofobinas permitiendo la interacción de nuevos monómeros de hidrofobina secretados sin ruptura de la membrana. De esta forma, la hifa nunca dejaría el ambiente acuoso.

La disrupción del gen de la hidrofobina SC3 de *S. commune* sustenta este modelo, ya que los mutantes nulos *SC3*⁻ carecen de hifa aérea y pueden ser complementadas *in trans* utilizando la proteína SC3 purificada (Van Wetter *et al.*, 1996). Dichos experimentos de *trans*-complementación refuerzan la idea de que los ensamblajes de la SC3 en las interfases agua-aire actúan como foco primario en la formación de nuevas hifas aéreas.

Una gran variedad de hongos contienen más de un gen que codifica para hidrofobinas. Tres genes de hidrofobinas han sido identificados en *Pleurotus ostreatus* (Ásgeirsdóttir *et al.*, 1998), cuatro en *Schizophyllum commune* (Schuren and Wessels, 1990; Wessels *et al.*, 1995) y en *Agaricus bisporus* (De Groot *et al.*, 1996, 1999; Lugones *et al.*, 1996, 1998). En *Cladosporium fulvum* han sido identificados seis genes de hidrofobinas (Segers *et al.*, 1999; Spanu, 1997). El aislamiento de genes de hidrofobinas por hibridación cruzada es difícil debido a su baja homología a nivel de nucleótidos (Wessels, 1997). Por lo tanto, el número de estos genes podría incluso ser muy superior al esperado.

¿Por qué la mayoría de los hongos sintetizan más de una hidrofobina en lugar de sintetizar una hidrofobina genérica? Se ha sugerido que ello permitiría al hongo expresar hidrofobinas en diferentes estadios del desarrollo (Kershaw *et al.*, 1998), o bien que cada una de las hidrofobinas tenga una función diferente (Van Wetter *et al.*, 2000 a; Wösten *et al.*, 1994 b). Así pues, un gen específico de hidrofobinas puede ser expresado en diferentes estadios del desarrollo y la proteína codificada puede realizar varias funciones. Por ejemplo, la hidrofobina SC3 de clase I de *S. commune* está involucrada en la fuga de la hifa hacia el aire (Wösten *et al.*, 1999), en convertir a la

hifa en una superficie hidrofóbica (Van Wetter *et al.*, 1996; Wösten *et al.*, 1993), en adherir la hifa a las superficies hidrofóbicas (Wösten *et al.*, 1994 a), y en determinar la composición de la pared celular (Van Wetter *et al.*, 2000 a). La hidrofobina MPG1 de clase I de *Magnaporthe grisea* que forma las cubiertas de conidiosporas, está involucrada en la elaboración de una partícula infecciosa denominada apresorio, y es requerida para completar la patogenicidad (Talbot *et al.*, 1993, 1996). La hidrofobina CU de *Ophiostoma novo-ulmi* y *Ophiostoma ulmi* está implicada en la formación de hifas, lo cual es un factor determinante del buen estado del hongo (Temple *et al.*, 1997), y es una toxina para el olmo (Del Sorbo *et al.*, 2000; Takai, 1974). Sin embargo, esto no significa que cualquier hidrofobina pueda desempeñar igual de bien las funciones atribuidas a esta clase de proteínas. Para investigar este aspecto, en una cepa de *M. grisea* disrupta para *MPG1*, se expresaron siete genes de hidrofobinas de clase I (reguladas bajo el mismo promotor) de una variedad de hongos que juegan diferentes papeles en la conidiogénesis, en el desarrollo de cuerpos fructíferos, en la formación de hifas aéreas, y en la elaboración de la estructura infecciosa (Kershaw *et al.*, 1998). De los siete genes, sólo la hidrofobina de uno de ellos, concretamente la de *S. commune*, falló al menos parcialmente en la sustitución de la hidrofobina de *M. grisea* (Kershaw *et al.*, 1998).

La complementación funcional también se estudió en la expresión de genes de hidrofobinas de un mismo hongo (*S. commune*). Una cepa de *S. commune* con el gen *SC3* disruptado fue complementada con el gen *SC4* bajo control del promotor *SC3* (Van Wetter *et al.*, 2000 a). Aunque la hidrofobina *SC4* normalmente recubre los canales de aire en los cuerpos fructíferos, pudo substituir a la hidrofobina *SC3* en la formación de hifas aéreas hidrofóbicas. No obstante, sólo se consiguió restablecer parcialmente la adherencia de la hifa a las superficies hidrofóbicas. Esto se explica por el hecho de que la membrana que forman las hidrofobinas *SC4* tiene menos afinidad por la pared celular de la hifa que las hidrofobinas *SC3*. Esto es debido a la diferente especificidad en la unión de ambas con los polímeros de la pared celular de las hifas o a la matriz extracelular en el caso de los cuerpos fructíferos (Van Wetter *et al.*, 2000 a).

Estos estudios de complementación mostraron que aunque las hidrofobinas de clase I pueden sustituirse parcialmente, son un grupo cerrado en una misma familia de proteínas morfogenéticas (**Kershaw et al., 1998**) que han evolucionado para llevar a cabo funciones específicas. Esta hipótesis se corrobora por análisis filogenético. Las hidrofobinas de clase I, SC3 de *S. commune* (**Van Wetter et al., 1996**), ABH3 de *A. bisporus* (**Lugones et al., 1998**), COH1 de *Coprinus cinereus* (**Ásgeirsdóttir et al., 1997**), y POH1 de *Pleurotus Ostreatus* (**Ásgeirsdóttir et al., 1998**) están implicadas en la formación de hifas aéreas. Estas hidrofobinas presentan un mayor grado de similitud entre ellas que SC3 y ABH3 presentan con otras hidrofobinas de *S. commune* y *A. bisporus* respectivamente. Esto sugiere que la similitud funcional viene reflejada en la secuencia primaria de las hidrofobinas.

Como se ha mencionado anteriormente, no solo la clase I de hidrofobinas sino también la clase II están involucradas en la formación de hifas aéreas. No se sabe si la clase I y la clase II pueden funcionar reemplazándose mutuamente. *Cladosporium fulvum* contiene genes que pertenecen a ambas clases de hidrofobinas (**Segers et al., 1999**), lo mismo ocurre también en el caso de *M. grisea* (**Talbot et al., 1993**). Sería interesante establecer si las hifas coexpresan individualmente las hidrofobinas de clase I y clase II, si forman membranas mixtas (mezcladas), y que propiedades tendrían esas membranas. En el caso de hifas dicarióticas en *S. commune* la hifas individuales producen cada hidrofobina por separado (SC3 o SC4), pero no juntas (**Schuurs et al., 1998**).

5.4.2. Papel de las hidrofobinas en la patogenicidad.

5.4.2.1. Mecanismo de defensa.

La hidrofobina ABH1 que recubre los cuerpos fructíferos de *A. bisporus* (**Lugones et al., 1999**) se propuso como una estructura que actuaba como defensa del hongo contra la infección bacteriana (**De Groot et al., 1996**). Un papel similar fue propuesto para la hidrofobina HYPB de *A. bisporus*. Los “rodlets” de los conidios de

Coccidioides immitis (Cole *et al.*, 1983), agente causal de la fiebre del valle (coccidiomicosis), enmascaran múltiples moléculas antigénicas de la pared celular y de esta manera pueden actuar como un mecanismo de defensa del agente patógeno frente al ataque de la respuesta celular del sistema inmune del huésped (Cole and Kirkland, 1991; Wösten *et al.*, 1994 b). Como los animales, las plantas han desarrollado mecanismos para detectar y defenderse contra los hongos patógenos. Las hidrofobinas podrían enmascarar el β -glucano y la quitina (Templeton *et al.*, 1994) componentes principales de la pared celular de los hongos, alguno de cuyos derivados presentan una elevada capacidad de estimular la respuesta inmune (Roby *et al.*, 1987; Sharp *et al.*, 1984 a, 1984 b).

5.4.2.2. Adhesión.

Además de la función propuesta de proteger al hongo contra el sistema de defensa del hospedador, las hidrofobinas parecen estar implicadas en la patogénesis mediante dos mecanismos: pueden actuar como toxinas y/o mediar en la adhesión de estructuras fúngicas a la superficie del hospedador, generando a su vez señales morfogénicas o no.

En cuanto al posible papel que juegan las hidrofobinas en la adhesión al hospedador, el caso mejor estudiado es el de la hidrofobina MPG1 de *M. grisea*. Una vez el hongo patógeno se ha adherido, se produce la colonización del hospedador gracias a la formación de una estructura infecciosa denominada apresorio (Fig. I.12.). Para penetrar el hospedador por medio de fuerza mecánica, esta estructura tiene que adherirse firmemente. Las hidrofobinas de clase I del hongo *M. Grisea*, patógeno del arroz, (Talbot *et al.*, 1993) están implicadas en la formación y en la adherencia al hospedador del apresorio.

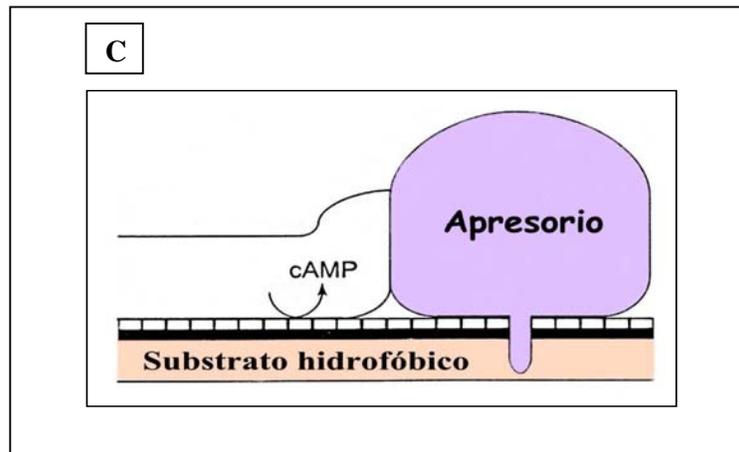


Fig. I.12. Modelo que explica el papel que desempeñan las hidrofobinas en la formación del apresorio (Ebbole, 1997). La formación del apresorio en *Magnaporthe grisea* se induce por un mecanismo de reconocimiento en superficie que implica a la hidrofobina MPG1. La interacción entre el crecimiento de la hifa con la capa de hidrofobinas en la superficie, puede incrementar la adhesión de la hifa al sustrato. Esta interacción puede conducir a un incremento en los niveles de cAMP e inducir de esta forma el desarrollo del apresorio, el cual aumenta la capacidad infectiva de la hifa que es tan necesaria para la penetración y diseminación de la enfermedad dentro del hospedador.

Este proceso está enormemente reducido en cepas disruptas para *MPG1* (Talbot *et al.*, 1993, 1996). El mecanismo por el cual el apresorio de *M. grisea* inicialmente se adhiere a la superficie hidrofóbica del hospedador es probablemente similar al de la hifa de *S. commune* al teflón de naturaleza hidrofóbica. Los monómeros secretados por el ápice de la hifa en crecimiento de *S. commune* se autoensamblan a la interfase pared celular-teflón. Como resultado, las hidrofobinas actúan de puente entre superficies tan incompatibles como son la hidrofílica pared celular del hongo y el sólido hidrofóbico, la naturaleza anfipática de la membrana permite una fuerte adherencia (Wösten *et al.*, 1994 a). Las interacciones hidrofóbicas probablemente median la fuerte interacción entre el lado hidrofóbico de la membrana de la hidrofobina y la superficie del sólido hidrofóbico, mientras una actividad tipo lectina puede mediar la interacción por el lado hidrofílico de la membrana con la pared celular (van Wetter *et al.*, 2000 a). En el caso de *M. grisea*, estas interacciones deben soportar la fuerza ejercida por la penetración de

la hifa infecciosa, la cual es conducida por una presión turgente elevada que es generada en el apresorio (**De Jong et al., 1997; Howard and Valent, 1996**). De no ser así, el apresorio sería despegado de la superficie.

Muchos hongos patógenos sólo germinan en ambientes húmedos, y el mucílago hidrofílico que se forma está implicado en la adherencia (**Hamer et al., 1988**). No obstante, las hidrofobinas pueden también estar implicadas en este proceso (**Wessels, 1994**). Las hidrofobinas secretadas en un ambiente acuoso podrían autoensamblarse en la superficie del hospedador haciéndola hidrofílica. Este cambio en las características de la superficie podría facilitar la interacción del mucílago hidrofílico con la superficie del hospedador. Esta hipótesis es apoyada por la observación de que la formación del apresorio sobre una superficie hidrofóbica por una cepa disrupta para *MPG1* era restablecida por la co-inoculación de una cepa salvaje en un ambiente acuoso (**Beckerman and Ebbole, 1996**). Hasta ahora, la hidrofobina MPG1 es la única que se ha demostrado que está implicada en la patogenicidad, participando en la adhesión del hongo a la superficie del hospedador; aunque es de suponer que se trate de un mecanismo general.

De manera interesante, la adherencia mediada por hidrofobinas parece generar señales que promueven el desarrollo fúngico. La adición de cAMP evita la necesidad en *M. grisea* de un substrato hidrofóbico inductivo (**Lee and Dean, 1993**) y restablece la formación del apresorio en cepas disruptas para *MPG1* (**Beckerman and Ebbole, 1996; Talbot et al., 1996**). La deformación de la hifa, resultante de la fuerte adherencia (**Wösten et al., 1994 a**), podría tensar la membrana plasmática, activando canales mecanico-sensitivos (**Wessels, 1994**). Esta señal podría ser transducida vía cAMP, induciendo, en última instancia, a la formación de apresorio (ver Fig. I.12.).

5.4.2.3. Toxinas.

La hidrofobina CU de clase II de *Ophiostoma novo-ulmi* y *Ophiostoma ulmi* fue descrita como toxina en 1974 (**Takai, 1974**). Este trabajo estaba basado en la

observación de que una inyección de esta hidrofobina purificada en el hospedador (el olmo blanco) causaba marchitamiento, disminución de la transpiración, incremento en la respiración foliar y pérdida de electrolitos. Sin embargo, no se observó efecto en la patogenicidad cuando el gen de esta hidrofobina fue disruptado en *O. novo-ulmi* (Bowden *et al.*, 1996; Temple *et al.*, 1997), ni la sobreexpresión del gen incrementó la patogenicidad (Temple *et al.*, 1997). Se sugirió que, en realidad, los síntomas fueron debidos al taponamiento de las vesículas respiratorias por la hidrofobina (Ipsen and Abul-Hajj, 1982; Russo *et al.*, 1982) y/o por un incremento en la permeabilidad de la membrana plasmática del hospedador (Stevenson *et al.*, 1979). Además, dos aislados salvajes de *O. novo-ulmi* que presentaban una morfología aplastada y eran deficientes en producción de hidrofobina, todavía eran patogénicos (Brasier *et al.*, 1995). Por otro lado, cuando el gen *CU* de *O. novo-ulmi* fue introducido en *Ophiostoma quercus*, este hongo no solo era patógeno para la encina sino también en el olmo (Del Sorbo *et al.*, 2000). Basándose en estos hechos, se propuso que esta hidrofobina es uno de los varios factores patogénicos de *O. novo-ulmi*, que aun siendo dispensable por separado, unido al resto conferiría patogenicidad (Bowden *et al.*, 1996). Por otra parte, muchos hongos producen más de una hidrofobina, y podría ser que *O. ulmi* y *O. novo-ulmi* expresasen *in planta* otras hidrofobinas también.

Potencialmente todas las hidrofobinas podrían ser toxinas, pero por el momento, no se ha identificado otra hidrofobina que actúe como toxina, aunque varias de ellas han sido aisladas de hongos patógenos. Esto y los efectos específicos de esta hidrofobina *CU* de clase II de *O. novo-ulmi* y *O. ulmi* en el hospedador, indican una toxicidad directa de las hidrofobinas (por ejemplo por interacción con la membrana plasmática) más que un daño indirecto, debido a las propiedades fisico-químicas de la molécula.

Además de actuar como toxinas, las hidrofobinas podrían actuar también induciendo el sistema de defensa de la planta (Templeton *et al.*, 1994; Wessels, 1994). Sin embargo, hasta ahora no hay evidencias experimentales que lo demuestren.

5.5. Implicación de las hidrofobinas en la composición de la pared celular de las hifas.

La pared celular de los filamentos de Ascomicetos y Basidiomicetos consiste principalmente en un complejo de β -1,3/ β -1,6 glucano, quitina, β -1,3 glucano, y glicoproteínas (ver Fig. I.1., apartado 3 de la Introducción). Durante el crecimiento de la hifa las moléculas individuales de la pared celular son desplazadas hacia el exterior de la misma (Wessels, 1986, 1994). Dentro de la pared los precursores del complejo glucano-quitina, β -1,3 glucano y quitina solubles en agua, entran en contacto, y el glucano es modificado por introducción de enlaces β -1,6. El complejo resultante proporciona rigidez a la pared celular. Además del complejo insoluble β -1,3/ β -1,6 glucano unido a la quitina, muchos filamentos fúngicos producen β -1,3 glucano soluble en agua con enlaces sencillos β -1,6 unidos a residuos de glucosa (llamado mucílago), similar en estructura al glucano unido a la quitina. El mucílago se forma en la pared y en el medio, y todavía no se sabe con certeza si es un precursor o un producto de degradación del complejo glucano-quitina (Sietsma *et al.*, 1977).

De forma inesperada, se ha demostrado que las hidrofobinas afectan a la composición de la pared celular (Van Wetter *et al.*, 2000 b). Un cultivo silvestre en el que todavía no se exprese el gen de la hidrofobina, produce más mucílago soluble en agua que un cultivo que exprese dicho gen, mientras que la gran cantidad de glucano unido a quitina descende. En los cultivos de cepas disruptas no se observan cambios en la composición de la pared celular y éstas se comportan de forma similar a los cultivos jóvenes silvestres. La cepa disrupta puede ser complementada por reintroducción del gen que expresa la hidrofobina. Este complemento puede ser obtenido utilizando genes de secuencias reguladoras y secuencias codificantes de los genes de hidrofobinas de *S. commune* o de *A. bisporus*.

Las estructuras aéreas son alimentadas mediante el transporte de agua y nutrientes desde el micelio sumergido (Wessels, 1997). Debido a la represión de la expresión de los genes de hidrofobinas en micelios jóvenes, se mantiene el máximo de

tensión superficial del agua en el ambiente y el hongo es forzado a colonizar primero el substrato acuoso. La expresión del gen que codifica las hidrofobinas, es pues, una señal reguladora del crecimiento aéreo. Todavía no se conoce exactamente cómo se sabe que el micelio está preparado y qué señal es finalmente transducida para comenzar la expresión.

La influencia de las hidrofobinas en la pared celular todavía no está clara, pero parece ser que funcionan desde el interior de la matriz de la propia pared celular, no involucrándose el autoensamblaje. Apenas se ha aislado alguna hidrofobina de *S. commune* de paredes celulares en micelios de cepas silvestres (**Van Wetter et al., 2000 b**), lo cual indica que las hidrofobinas no llevan a cabo un papel estructural en el ensamblaje de la pared celular. No obstante, para la función de biosíntesis en la pared celular las hidrofobinas no necesitan necesariamente ser retenidas en la misma. Una vez la hidrofobina ha alcanzado la superficie de la hifa, puede difundirse al medio. Se ha demostrado que monómeros de hidrofobina pueden interactuar con el mucílago (**Martin et al., 2000**), sugiriendo que podrían también interactuar con los precursores del complejo glucano-quitina, posiblemente mediante interacción con una lectina (**Van Wetter et al., 2000 a**).

No se conoce todavía exactamente que papel tiene en el ciclo de vida del hongo un cambio en la composición de la pared celular sobre la expresión de las hidrofobinas.

Por otro lado, como ya se ha comentado anteriormente, el gen de la hidrofobina no se expresa en cultivos jóvenes pero sí se activa en el momento en el que comienzan a formarse las hifas. Posiblemente, el cambio en la composición de la pared celular hace que ésta se vuelva más rígida, lo cual podría ser un medio o instrumento para mantener erguidas las hifas cuando la presión turgente es demasiado baja.

5.6. Posibles aplicaciones y propuestas.

5.6.1. Ingeniería genética de hidrofobinas.

El uso de las hidrofobinas en aplicaciones médicas y técnicas podría requerir de la ingeniería genética para optimizar sus propiedades. Desde hace relativamente pocos años, se ha comenzado a utilizar la ingeniería genética en hidrofobinas (**Scholtmeijer, 2000**). Las hidrofobinas de clase I SC4 de *S. commune*, ABH1 y ABH3 de *Agaricus bisporus* tienen propiedades similares a la hidrofobina SC3 también de clase I (**Lugones et al., 1996, 1998, 1999; Lugones, 1998**). Sin embargo, las formas maduras de SC4 y ABH1 tienen sólo de 8 a 12 aminoácidos precedentes al primer residuo de cisteína y no están glicosiladas, mientras que la región N-terminal en SC3 tiene una longitud de 31 aminoácidos precedentes a la primera cisteína y contiene de 16 a 32 residuos de manosa (**De Vocht et al., 1998**). Esto indica, que ésta parte precedente al primer residuo de cisteína, no determina las propiedades básicas de las hidrofobinas, pero dado que el extremo N-terminal es expuesto en la parte hidrofílica de la hidrofobina ensamblada si que podría modificar sus propiedades (**Wösten et al., 1994 c**). Derivados de SC3 han sido construidos modificando la región N-terminal. De los 31 aminoácidos, los 25 que preceden al primer residuo de cisteína de la hidrofobina madura de SC3 se han eliminado (TrSC3) y se ha introducido el dominio ligando-célula para la fibronectina humana (RGD) en el extremo N-terminal de SC3 y TrSC3 (RGD-SC3 y RGD-TrSC3, respectivamente). Estos derivados fueron producidos por una cepa de *S. commune* con un gen SC3 disrupto y la caracterización biofísica mostró que las propiedades básicas fueron similares a las de la hidrofobina SC3 (**Scholtmeijer, 2000**). El autoensamblaje, la permeabilidad en el lado hidrofóbico y su capacidad surfactante no fueron afectados y también formaron la estructura característica de “rodlets”. Sin embargo, la permeabilidad del lado hidrofílico de las formas modificadas sí se redujo. Los cambios en el lado hidrofílico de la membrana afectaron al crecimiento de los fibroblastos (en una línea celular tumoral). El crecimiento sobre teflón recubierto con hidrofobina SC3 fue similar al del teflón sin hidrofobinas pero fue incrementado considerablemente al cubrirlo con una capa de RDG-SC3 o TrSC3. Estos resultados indican que los péptidos

o posiblemente todas las proteínas pueden ser inmovilizadas en un sólido hidrofóbico y expuestas a la fase hidrofílica por fusión con la región N-terminal de una hidrofobina.

Como se ha descrito anteriormente, en el ensamblaje de la hidrofobina SC3 en una superficie sólida hidrofóbica se forma una estructura de α -hélice (De Vocht *et al.*, 1998). Los aminoácidos del 75 al 87 de SC3 pueden ser encajados en una rueda de hélice formando una α -hélice anfipática. Esta secuencia es parte de la región relativamente larga entre el tercer y el cuarto residuo de cisteínas que se encuentra ausente en las hidrofobinas de clase II (ver Fig. I.7.). Para investigar si los aminoácidos del 75 al 87 de SC3 son responsables de las propiedades típicas de las hidrofobinas de clase I (por ejemplo, la insolubilidad en el ensamblaje), fueron creados derivados de SC3 en los cuales la región entre el tercer y el cuarto residuo de cisteína, incluyendo los codones para los aminoácidos 75-87, se reemplazaron por la correspondiente secuencia de la hidrofobina de clase II CU de *Ophiostoma ulmi* (CU-SC3) o en los que los codones para los aminoácidos 76-86 fueron eliminados (HW-SC3). Las proteínas eran sintetizadas pero en ningún caso pudieron aislarse del medio de cultivo. Parece ser que los cambios en esta parte de la hidrofobina las hacen más vulnerables a la degradación proteolítica en el medio.

A pesar del hecho de que las hidrofobinas de clase I y clase II se han separado considerablemente, sus propiedades generales son similares. Esta flexibilidad es también ilustrada por el hecho de que al quitar 25 de los 31 aminoácidos que preceden al primer residuo de cisteína de la hidrofobina SC3 por ingeniería genética solo se ve afectada la afinidad del lado hidrofílico de la hidrofobina ensamblada (Scholtmeijer, 2000). Una hidrofobina muy interesante es la trihidrofobina CFTH1 de *C. fusiformis*. Está formada por tres subunidades de hidrofobina clase II (en lugar de tener una sola unidad como la mayoría de hidrofobinas), cada una de las cuales está precedida por una repetición rica en Gly-Asn (De Vries *et al.*, 1999) y aún así se comporta como las otras hidrofobinas de clase II.

5.6.2. Hidrofobinas en aplicaciones médicas y técnicas.

La propiedad característica de las hidrofobinas para formar membranas anfipáticas en contacto con una interfase hidrofílica-hidrofóbica les permite cambiar la naturaleza de una superficie (ver Fig. I.10.). Superficies hidrofóbicas de líquidos (por ejemplo gotas de aceite) o sólidos (teflón) pueden llegar a ser hidrofílicas suspendiéndolas o sumergiéndolas en una solución de hidrofobinas (**Wösten *et al.*, 1994 a, 1995; Lugones *et al.*, 1996**). A la inversa, permitiendo que tales soluciones se sequen en vidrio o en papel de filtro puede provocar que estos materiales lleguen a ser hidrofóbicos (**Wösten *et al.*, 1993; Lugones *et al.*, 1996**). Se ha comprobado que, el ensamblaje de las hidrofobinas de clase I a los soportes biológicos o inertes es mucho más potente que el de las hidrofobinas de clase II. Así, por ejemplo, las capas de hidrofobinas de clase I en papel o teflón resisten los lavados con agua o las extracciones con detergentes a 100°C (**Wösten *et al.*, 1993, 1994 a, 1994 b, 1994 c, 1995; Lugones *et al.*, 1996; Lugones, 1998**). Debido a las propiedades mencionadas a lo largo del trabajo y al hecho de que la mayoría de las hidrofobinas parecen no ser tóxicas (pues son ingeridas por los humanos con el consumo de setas y comidas fermentadas por hongos), ni citotóxicas, ni inmunogénicas, las hidrofobinas pueden ser empleadas en diversas aplicaciones médicas y técnicas (Tabla I.5.) (**Wessels, 1997**). De este modo, modificándolas o no, química o genéticamente, pueden cambiar las propiedades biofísicas de una superficie. De este modo, la unión de moléculas o células a las superficies podría ser controlada. Por ejemplo, la unión de bacterias patógenas a la superficie de los catéteres podría reducirse, mientras que la unión de fibroblastos a la superficie de implantes podría reforzarse.

Además del cambio en las propiedades biofísicas, las hidrofobinas podrían ser utilizadas para unir moléculas a superficies con las que normalmente no tienen una elevada afinidad. La adherencia podría conseguirse por “cross-linking” químico después de que las hidrofobinas hayan sido ensambladas en la superficie. Por ejemplo, las proteínas podrían unirse a residuos de manosa en el lado hidrofílico de la hidrofobina de clase I (SC3) autoensamblada por medio de una reacción base de Schiff (**Wessels,**

1997). Alternativamente, en el caso de proteínas o péptidos, las proteínas de fusión pueden ser preparadas y ensambladas en la superficie de interés.

Se ha demostrado que la presencia de un tripéptido RGD en la superficie de un implante de hueso consiguió una mayor y más rápida integración en el tejido receptor (Schaffner *et al.*, 1999). En estos experimentos el tripéptido RGD fue unido con albumina de suero bovino (BSA) por “cross-linking” que había sido adsorbida al implante. Alternativamente, una superficie de poli-metil-metacrilato (PMMA) fue activada funcionalmente por acoplamiento con ácido acrílico. El uso de hidrofobinas en el acoplamiento del tripéptido RGD a superficies hidrofóbicas puede ofrecer ventajas sobre los métodos anteriores. Las superficies hidrofóbicas pueden ser recubiertas uniformemente con hidrofobinas independientemente de los grupos reactivos existentes en la superficie en cuestión. A diferencia de la albúmina de suero bovino (BSA), por ejemplo, las hidrofobinas se unen fuertemente (no pudiendo ser reemplazadas por proteínas de la sangre) y en una orientación preferente a la superficie, y además, el uso de hidrofobinas diseñadas genéticamente elimina la necesidad de las reacciones de “cross-linking”.

Las hidrofobinas que han adquirido anfipaticidad mediante el ensamblaje pertenecen a las moléculas con más actividad superficial identificadas hasta la fecha (Wösten and de Vocht, 2000). Su actividad en superficie es al menos similar al de los tradicionales biosurfactantes, abarcando los glicolípidos, lipopéptidos/lipotroteínas, fosfolípidos, lípidos neutros, ácidos grasos sustituíbles, y lipopolisacáridos (Desai and Banat, 1997) y que poseen un amplio rango de aplicaciones en la industria (por ejemplo en emulsiones y dispersiones). En contraste a estos surfactantes, la actividad en superficie de las hidrofobinas no depende de una molécula de lípido sino que es exclusivamente causada por la secuencia de aminoácidos. Esta actividad surfactante se consigue gracias al cambio conformacional que ocurre cuando los monómeros de hidrofobina se autoensamblan en la interfase agua-aire (Van der Vegt *et al.*, 1996; De Vocht *et al.*, 1998). La información genética de las hidrofobinas se encuentra contenida en pequeños genes (sobre 400 pb), mientras que la información para los otros biosurfactantes está contenida en enormes genes o en grupos genéticos complejos

(Desai and Banat, 1997). Por consiguiente, la modificación de las hidrofobinas parece tener requerimientos seguramente mucho más simples.

En las aplicaciones mencionadas en la Tabla I.5., nos encontramos en unas escalas de trabajo entre micrómetros y milímetros. Ya que las películas de hidrofobinas autoensambladas tienen un tamaño aproximadamente de 10 nm de grosor y los monómeros miden aproximadamente 3 nm, estas proteínas son unos candidatos muy interesantes para su aplicación en la nanotecnología (Thomas, 1995).

Hidrofobinas fúngicas en aplicaciones médicas y técnicas (Wessels 1997)	
Aplicación	Ejemplo
Ingeniería en tejidos	Incremento de la biocompatibilidad en implantes médicos
Medio para pegar moléculas a superficies	Inmovilización de anticuerpos en un biosensor
Dispersiones y emulsiones	Liberación de fármacos utilizando vesículas aceitosas estabilizadas con una hidrofobina
Nanotecnología	Diseño de moléculas en una superficie con precisión nanométrica

Tabla. I.5. Uso de las hidrofobinas en diferentes aplicaciones médicas y técnicas (Wessels, 1997).

6. Objeto y justificación del trabajo.

La línea general de investigación de nuestro grupo de trabajo y proyectada en esta tesis, se centra en la identificación y caracterización de nuevos genes de *Candida albicans* que codifican para componentes de la pared celular que se hallan implicados

en la interacción parásito-hospedador y que por lo tanto puedan desempeñar un papel importante en la virulencia y patogénesis del hongo. Como ya se ha mencionado en el presente trabajo, proteínas y manoproteínas de la pared celular fúngica, son los principales mediadores de la adhesión. Esta a su vez, es un factor de virulencia importante y necesario para la colonización e infección del hospedador.

Como resultado del inmunorrastreo de una genoteca de expresión en el fago λ con un anticuerpo policlonal específico de la forma micelial, se aislaron una serie de clones inmunorreactivos con dicho anticuerpo. La búsqueda en las bases de datos de la secuencia aminoacídica de uno de los clones reveló una gran similitud con otras proteínas, previamente descritas en *C. albicans* y que presentaban como característica la posesión de ocho residuos de cisteína en posiciones altamente conservadas. Como se ha comentado en la introducción, ésta es una característica de las proteínas hidrofobinas.

En el presente trabajo se ha abordado la clonación del gen que codifica para dicha proteína y su posible caracterización como una hidrofobina. Sería, por lo tanto, la primera descripción de la existencia de este tipo de proteínas (o familia de proteínas) en *C. albicans*.

II. MATERIALES Y MÉTODOS

*“El trabajo agradable y útil resulta la mejor de las distracciones”
Santiago Ramón y Cajal*

1. Cepas utilizadas.

1.1. Cepas bacterianas.

Las cepas *Escherichia coli* utilizadas en el presente trabajo se describen en la tabla II.1.

CEPA	GENOTIPO RELEVANTE	UTILIZACIÓN EN ESTE TRABAJO	REFERENCIA
Y1090	SupF, hsdR, araD139, \cong lon, \cong lacU169, rpsL, trpc22 ::Tn10 (tet) ^p , MC9	Rastreo inmunológico de la genoteca de expresión y propagación de λ gt11	Young and Davis, 1983
JM109	endA1, recA1, syrA96, thi, hsdR17 (r_k^- , m_k^+), relA1 supE44 λ^- , Δ (lac-proAB), [F', traD36, proAB, lac1 ^q Z Δ M15]	Transformación y purificación de vectores plasmídicos	Yanisch-Perron et al., 1985.

Tabla II.1. Cepas de *E. coli* utilizadas en este trabajo.

1.2. Cepas fúngicas.

Las cepas de *Candida albicans* empleadas para la realización de este trabajo se detallan en la tabla II.2.

CEPA	GENOTIPO RELEVANTE	UTILIZACIÓN EN ESTE TRABAJO	REFERENCIA
ATCC26555	Cepa salvaje	Construcción de la genoteca de cDNA	ATCC
SC5314	Cepa salvaje	Caracterización de la proteína	Fonzi and Irwin, 1993
CAI-4	Δ ura3::imm434/ Δ ura3::imm434	ADN genómico	Fonzi and Irwin, 1993
WO-1		Librería genómica	Soll et al., 1987

Tabla II.2. Cepas de *C. albicans* utilizadas en este trabajo.

2. Plásmidos.

A continuación se detallan los plásmidos utilizados en este trabajo, su referencia, características y estructura.

❖ PUC18 (Messing, 1983):

Utilización: subclonaje de fragmentos de DNA.

Características: entre otras destacan:

- El gen que proporciona resistencia a la ampicilina.
- Un fragmento de DNA que comprende el promotor del gen *lacZ* y la secuencia que codifica para la β -galactosidasa (péptido α). Dentro de esta secuencia codificante contiene además un sitio de clonaje múltiple que no interrumpe el marco de lectura del gen. Cuando se transforma con este vector una cepa de *E. coli* que no tiene actividad β -galactosidasa porque tiene una delección en el gen *lacZ* del operón *lac* en la zona próxima al operador (región del péptido α), se complementa dicha deficiencia y se recupera la actividad (α -complementación). En un medio que contenga IPTG (isopropil- β -D-tiogalactopiranosido), inductor de la síntesis de la β -galactosidasa, y el substrato cromogénico 5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galacto-piranosido (X-gal), aparecerán colonias azules por la hidrólisis del X-gal. Si se incorpora DNA exógeno en el sitio de clonaje múltiple del vector, las colonias aparecerán blancas, puesto que el inserto interrumpe el gen *lacZ* plasmídico e impide la complementación. Por tanto, las bacterias que llevan los plásmidos recombinantes darán lugar a colonias blancas y las que no los lleven, colonias azules (selección azul-blanca).

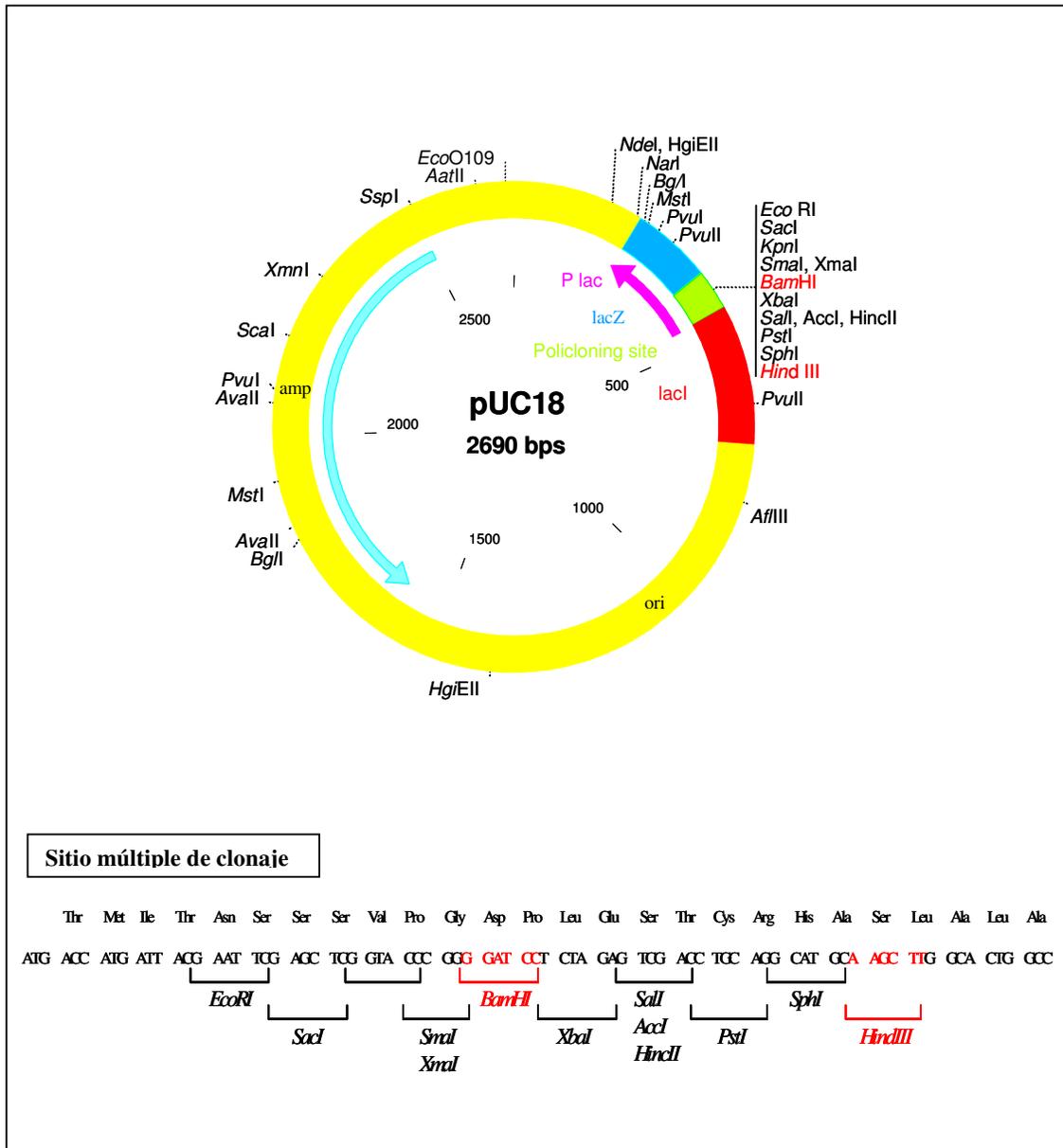


Fig. II.1. Plásmido pUC18. La secuencia nucleotídica detallada corresponde al sitio múltiple de clonaje donde se muestran las dianas de las enzimas de restricción utilizadas en este trabajo en color rojo.

❖ **pEMBL Ye23 (Baldari and Cesareni, 1985):**

Utilización: vector empleado para construir la librería genómica utilizada en este estudio. Es útil para transformar tanto bacterias como levaduras.

Características: entre otros elementos contiene:

- El gen que proporciona resistencia a la ampicilina.
- El fragmento de DNA del gen *lacZ* y su promotor que permite la selección de los transformantes por el color de las colonias.

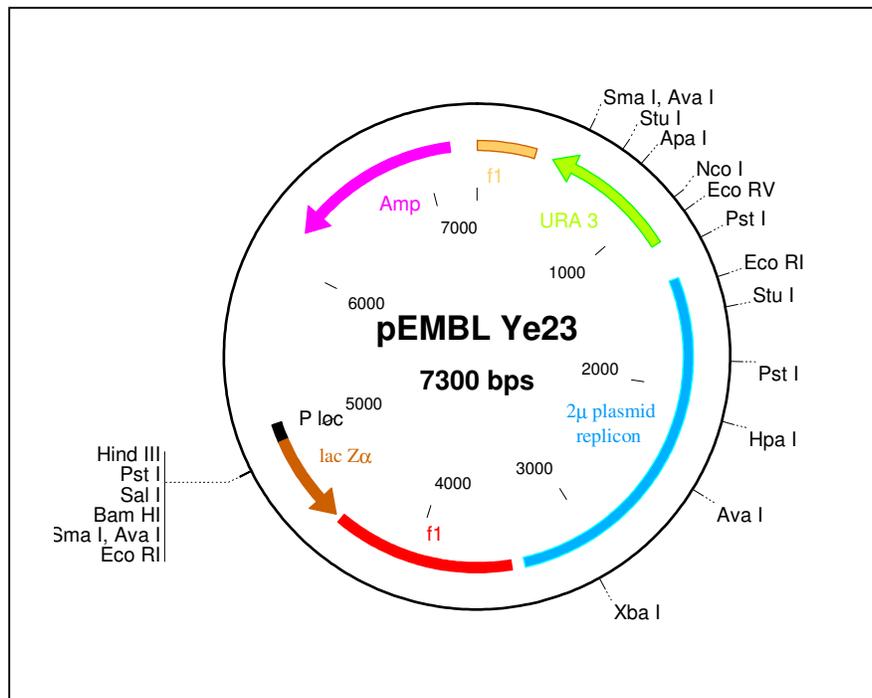


Fig. II.2. Plásmido pEMBL Ye23.

❖ **pGEX 4T-3 (Pharmacia):**

Utilización: subclonaje de la región codificante del gen de *C. albicans* que codifica para una hidrofobina.

Características: entre otras destacan:

- El gen que proporciona resistencia a la ampicilina que codifica para una β -lactamasa.
- La transformación de *E. coli* con plásmidos recombinantes conteniendo Amp^r permite su selección en medio LB suplementado con ese antibiótico.
- El vector presenta un promotor tac inducible por isopropil- β -D-tiogalactopiranosido (IPTG) y el gen represor lacI^q.
- El sitio múltiple de clonaje se encuentra junto al extremo 3' de la región codificante del gen de la glutation-S-transferasa (GST) inmediatamente después de los codones que codifican la secuencia de aminoácidos reconocida por una proteasa específica (trombina).
- Después del sitio múltiple de clonaje, en dirección 3', se encuentran los codones de terminación de la traducción en las tres posibles fases de lectura.
- El vector de expresión permite la síntesis de péptidos codificados por el fragmento de ADN subclonado en forma de proteína de fusión (GST-péptido).
- La producción de la proteína de fusión está controlada por el promotor tac y tras la inducción de la proteína de fusión, el péptido de interés se puede separar de la GST mediante digestión con trombina.

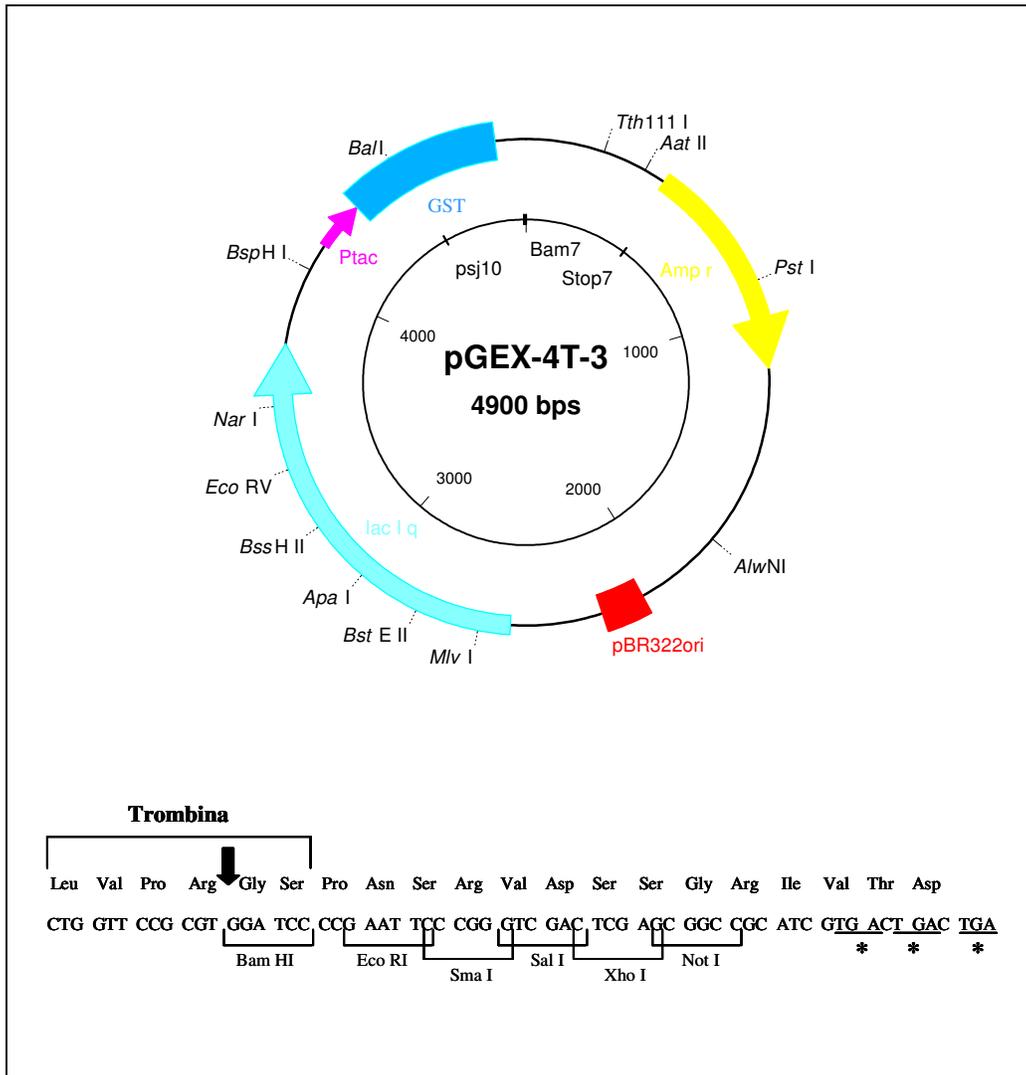


Fig. II.3. Plásmido pGEX-4T-3 (Pharmacia). La secuencia nucleotídica detallada corresponde al sitio múltiple de clonaje. Los codones de terminación se indican con un asterisco. El sitio de corte de la trombina se señala con una flecha. GST (glutation-S-transferasa).

Los plásmidos construidos en este trabajo se mencionan a continuación y se detallan en el apartado Resultados y Discusión.

- **pUBP**

Construcción: pUC18 en el que se ha insertado el fragmento de 2,2 Kb correspondiente al gen de *CaHPB* de *Candida albicans* en los sitios *Bam* HI y *Hind* III.

- **PXBP**

Construcción: pGEX 4T-3 en el que se ha insertado el fragmento de 787 pb correspondiente a la secuencia codificante de la proteína hidrofobina CaHPB (en el marco abierto de lectura) en los sitios *Bam* HI y *Eco* RI.

3. Cebadores.

Los cebadores fueron diseñados con la ayuda de programas informáticos y proporcionados por Amersham Pharmacia o Sigma-Genosys. Las secuencias de los cebadores utilizados en el presente trabajo se muestran en la tabla II.3.

Los **cebadores universales forward y reverse del fago λ gt11** se utilizaron para amplificar el inserto mediante técnicas estándar de PCR el DNA de los 11 clones recombinantes.

Los cebadores **F11-A y R11-A** se utilizaron para la clonación en el vector pUC18 y como sonda del Southern blot (para confirmar los resultados de la secuenciación, PCR y de restricción, y determinar el número de copias del gen). En rojo se muestran las dianas para las enzimas de restricción (*Bam* HI para el cebador forward y *Hind* III para el cebador reverse). Los cuatro primeros nucleótidos de cada cebador se añadieron para facilitar el reconocimiento de la secuencia por las endonucleasas.

Los cebadores **F11-COD** y **R11-COD** fueron diseñados para amplificar por PCR la región codificante del gen *CaHPB* e introducir la secuencia codificante en el vector de expresión pGEX 4T-3. En verde se muestran las dianas para las enzimas de restricción (*Eco* RI para el cebador forward y *Bam* HI para el cebador reverse). El codón de iniciación, así como los codones de terminación, están en rojo. Los cuatro primeros nucleótidos de cada cebador se añadieron para facilitar el reconocimiento de la secuencia por las endonucleasas.

Cebador	Secuencia nucleotídica (5' → 3')	Utilidad
Universal forward fago λ gt11	GGTGGCGACGACTCCTGGAGCCCG	PCR fago λ gt11
Universal reverse fago λ gt11	TTGACACCAGACCAACTGGTAATG	PCR fago λ gt11
F11-A	AGGTGGATCCCTCTAAAAATATACGACTG	pUBP y Southern
R11-A	GCGCAAGCTTCACGTGAACATCACGTGCCTA	pUBP y Southern
F11-COD	GCGCGAATTCCTATCATTCAACTTAGATTAAGGCAGC	Construcción pXBP
R11-COD	GCGCGGATCCATGATGTCTTTTTCCTTTATTATCA	Construcción pXBP

Tabla II.3. Cebadores utilizados en este trabajo.

4. Medios de cultivo.

4.1. Bacterias.

Medio LB (Luria-Bertani) (Miller, 1972):

Triptona (Pronadisa)	10 g
Extracto de levadura	5 g
NaCl	5 g

Agua destilada c.s.p. 1 litro

pH 7-7.4

Agar (para medio sólido) 15 g

Medio LB-ampicilina

Para la selección y cultivo de cepas transformadas con plásmidos, se suplementó el medio LB con ampicilina a una concentración final de 100µg/ml, a partir de una solución concentrada (0.1g/ml) previamente esterilizada por filtración.

Medio LB-ampicilina-IPTG-X-gal

Para diferenciar entre los transformantes sin actividad β-galactosidasa (con plásmidos recombinantes) de aquellos con actividad β-galactosidasa (con plásmido sin inserto). El medio de cultivo LB-ampicilina se suplementó con IPTG (a partir de una solución 100 mM en agua) a una concentración final de 0.5 mM y X-gal (a partir de una solución de 20 mg/ml en N, N-dimetil-formamida) a una concentración final de 0.05 mg/ml. Los clones con actividad β-galactosidasa originan colonias azules por hidrólisis enzimática del X-gal.

Medio TB (Terrific Broth):

Preparado según la composición del fabricante (Sigma). Este medio se utilizó adicionado de ampicilina (100 µg/ml) para el crecimiento de transformantes bacterianos y posterior purificación del DNA plasmídico.

4.2. Levaduras.

Medio sintético de Lee (Lee *et al.*, 1975):

(NH ₄) ₂ SO ₄	5.0 g
MgSO ₄ · 7H ₂ O	0.2 g
HK ₂ PO ₄ anhidro	2.5 g
NaCl	5.0 g
Glucosa	12.5 g
Prolina	0.5 g
Biotina	0.001 g
Agua destilada c.s.p.	1 litro

pH 6.8-7.0

Agar (para medio sólido) 15 g

Medio YPD

Extracto de Levadura	10 g
Triptona (Pronadisa)	20 g
Glucosa	20 g
Agua destilada c.s.p.	1 litro

pH 6-7

Agar (para medio sólido) 15 g

5. Condiciones de cultivo.

Las **bacterias** (*E. Coli*) se cultivaron rutinariamente a 37°C en estufa (medio sólido) o en incubador orbital a 200 rpm (medio líquido).

Las **levaduras** (*C. albicans*) se cultivaron a 28°C, también en estufa o incubador orbital a 200 rpm, según se tratara de un medio sólido o líquido, respectivamente.

La obtención de *C. albicans* en forma de micelio se realizó a partir de levaduras en ayuno metabólico, según el método descrito por **Casanova *et al.*, 1989**. Para ello, *C. albicans* se creció en medio de Lee, a 28°C, hasta fase exponencial tardía de crecimiento. Las células se recogieron por centrifugación a 3000 rpm durante 10 min., se lavaron con agua destilada estéril y se resuspendieron en un volumen de la misma. Esta suspensión se incubó a 28°C con agitación durante 3 h y seguidamente se mantuvo durante 48-72 horas a 4°C (ayuno metabólico o estrés nutricional). Posteriormente, estas células se recogieron por centrifugación y se diluyeron 1:5 en medio de Lee precalentado a 37°C. Esta suspensión se incubó a 37°C con agitación hasta la obtención de micelio (aproximadamente el 90% de las células forman tubo germinativo después de 3 h de inducción). De manera similar, se obtiene un cultivo de células levaduriformes incubando células en reposo metabólico en medio de Lee a 28°C.

El crecimiento celular se valoró midiendo la DO₆₀₀ en un espectrofotómetro Pharmacia-Biotech Ultrospec 2000 UV/Visible, y la cantidad de células se determinó, cuando fue necesario, utilizando una curva patrón en la que se relaciona la DO₆₀₀ con el peso seco y/o número de células por ml de cultivo.

Para **marcar radiactivamente** las células fúngicas, al medio de cultivo se adicionaron 0.3 µCi de L-[³⁵S] Cisteína (actividad específica, 500 µCi [18.5 MBq]) como se detallará más adelante.

6. Amplificación de DNA mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

En general, la amplificación se realizó en tubos de 0.2 ml con un volumen final de reacción de 50 µl que contenía 1ng-1µg del DNA a amplificar, 5 µl de tampón de reacción 10x (Promega), 7 µl de MgCl₂ 25 mM, 1 µl de solución concentrada de dNTPs (10 mM en cada nucleótido), 20-40 pmoles de cada oligonucleótido (2 µl de una solución a una concentración de 10-20 pmoles/µl), 0.5 µl de Taq DNA polimerasa (Promega) (5 unidades/µl) y agua destilada estéril (c.s.p. 50 µl). El enzima se adicionó después de la primera etapa de 1 min. a 95°C según el protocolo de amplificación. En

caso de amplificar DNA a partir de células enteras, éstas se tomaron con un palillo estéril a partir de la colonia de interés, y se resuspendieron directamente en la mezcla de reacción (**Jenowski *et al.*, 1995**). Antes de iniciar el protocolo de amplificación se adicionaron 30-40 μ l de aceite mineral estéril sobre cada reacción para evitar la evaporación.

La amplificación se llevó a cabo en un termociclador Gene-E (Techne) de acuerdo con el siguiente programa: en primer lugar se desnaturalizó el DNA manteniéndolo 1 min. a 95°C, y a continuación, después de añadir la *Taq* polimerasa se realizaron 29 ciclos de tres etapas. La primera de 40 seg. a 95°C, para desnaturalizar el DNA, la segunda de 30 seg. a 60°C, para la hibridación de los oligonucleótidos al DNA y por último, la tercera de 2 min. a 72°C, de elongación o extensión de las cadenas de DNA (el tiempo utilizado aquí depende del fragmento a amplificar, generalmente 1 min. para cada 1000 pb). A continuación, se realizó un último ciclo con esas tres etapas en el que la etapa de extensión fue de 15 min. en lugar de 2 min. a 72°C.

La temperatura de hibridación (si no venía especificada en la hoja de síntesis de los oligonucleótidos) se calculaba según la fórmula:

$$\text{Temperatura de fusión} = 2 \times (\text{A+T}) + 4 \times (\text{G+C}) \quad [\text{A,T,G,C: bases de la secuencia}]$$

$$\text{Temperatura de hibridación o anillamiento} = \text{Temperatura de fusión} - 5^{\circ}\text{C}$$

7. Electroforesis de DNA.

La separación electroforética de fragmentos de DNA se realizó en geles de agarosa a una concentración variable entre 0.7 y 1.5% según el tamaño de los fragmentos a separar (**Sambrook *et al.*, 1989**), utilizándose rutinariamente una concentración de 0.8% que se aumentó cuando se requería una separación de fragmentos de DNA de menor tamaño molecular.

Los geles se prepararon solubilizando en caliente la agarosa (Pronadisa) en el tampón de electroforesis (TAE). Antes de cargar las muestras a analizar en el gel, se les añadió 1/6 de su volumen de tampón de carga, para darles densidad y visualizar el frente de la electroforesis. En cada electroforesis se cargaba una muestra de fragmentos de DNA de tamaño conocido (1 µg de DNA del fago lambda digerido con *Eco RI/Hind III*, Boehringer-Mannheim) que se utilizó como patrón para determinar el tamaño de los fragmentos de DNA.

Las electroforesis se realizaron en una cubeta horizontal donde el gel se encontraba sumergido en el mismo tampón de su preparación y al que se le aplicó un voltaje constante (50-100 V) durante 2-3 horas. Finalizada la electroforesis, los geles se sumergieron en una solución acuosa de bromuro de etidio a una concentración de 10 µg/ml durante unos 20-30 min. Los fragmentos de DNA se visualizaron en un transiluminador de luz UV (360 nm) y se fotografiaron utilizando un equipo Polaroid MP-4 ó bien con un transiluminador que estaba acoplado a un procesador de datos TDI (Tecnología para Diagnóstico e Investigación).

- ✓ **TAE 10x:** 48.4 g Tris, 11.42 ml ácido acético glacial, 3.8 g EDTA-Na₄, pH 8.0, agua destilada c.s.p. 1 litro.
- ✓ **Tampón de carga:** azul de bromofenol 0.25% (p/v), glicerol 40% (v/v), en TAE.

8. Purificación de fragmentos de DNA a partir de geles de agarosa.

Después de la separación de los fragmentos de DNA mediante electroforesis en geles de agarosa de bajo punto de fusión (Pronadisa), las bandas de DNA de interés detectadas con ayuda del transiluminador de luz UV se cortaron del gel con un escalpelo estéril y se transfirieron a un tubo de microcentrífuga (300 µl de agarosa como máximo por tubo).

El DNA se purificó utilizando el kit Wizard PCR Preps DNA Purification System (Promega) siguiendo las instrucciones del fabricante. Para ello, los tubos de microcentrífuga que contenían las porciones de agarosa con el DNA de interés se introdujeron en un baño de agua a 65°C hasta la fusión de la agarosa, y a continuación se les añadió 1 ml de resina a cada tubo. La mezcla DNA/resina fue pipeteada al interior de una jeringuilla y pasada a través de una minicolumna donde queda retenida. Después de pasar 2 ml de isopropanol al 80% frío para lavar la mezcla DNA/resina y, tras secar ésta por centrifugación (20 seg. a 12.000 rpm) el DNA se eluyó introduciendo 50 µl de TE o agua estéril (cuando el DNA iba a utilizarse para ligamientos) y posterior centrifugación, durante 20 seg. a 12.000 rpm. El eluido se recogió en tubos de microcentrífuga estériles.

✓ **TE:** Tris-HCl 10 mM pH 8.0, EDTA 1mM.

9. Cuantificación de DNA.

La estimación aproximada de la cantidad de DNA de una muestra se realizó mediante separación electroforética de una alícuota de la misma y la posterior comparación de la intensidad de la banda obtenida con la intensidad de las bandas de los patrones de peso molecular, cuyo tamaño (y cantidad) son conocidos.

Cuando la concentración de DNA de una muestra era baja, el DNA se concentró por precipitación. Para ello, se añadió NaCl a la muestra (concentración final de 0.3 M), y 2.5 volúmenes de etanol absoluto frío, dejándola un mínimo de 2 h a -20°C. Después de centrifugar 15 min. a 15.000 rpm, lavar con etanol frío al 70% y secar en bomba de vacío, se disolvió en el volumen apropiado de agua destilada estéril o TE.

10. Digestión de DNA con enzimas de restricción.

Las reacciones de digestión se realizaron en un volumen final de 20-30 μ l conteniendo:

- DNA plasmídico (1-3 μ g), o DNA cromosomal (10 μ g).
- Enzima (5-10 unidades) (Boehringer-Mannheim o Promega).
- 2-3 μ l del tampón (10x).
- 1 μ l de RNasa A (10 μ g/ μ l).
- agua destilada estéril para completar el volumen.

La mezcla de reacción se incubó de 1 a 3 horas a 37°C en caso de digestión de DNA plasmídico, o toda la noche a 37°C en caso de digerir DNA cromosomal.

- ✓ **RNasa A:** RNasa pancreática (RNasa A) al 1% (p/v) en TE, NaCl 25 mM. La posible presencia de DNasas se eliminó por calentamiento (20 min. a 95°C). Tras enfriamiento a temperatura ambiente se dispensó en alícuotas y se guardó a -20°C.

11. Ligamiento de fragmentos de DNA.

La unión entre fragmentos de DNA con extremos cohesivos o romos se realizó con el enzima T4 DNA ligasa (Boehringer Mannheim o Promega). La relación molar vector/inserto utilizada habitualmente osciló entre 1:5 y 1:10. La reacción se realizó en un volumen final de 10 μ l en tubos estériles de 0.2 ml, conteniendo las cantidades apropiadas de DNA de vector e inserto (0.1-0.5 μ g) calculadas según la fórmula:

$$\frac{C_i \cdot V_i \cdot Kb_v}{C_v \cdot V_v \cdot Kb_i} = \frac{I}{V}$$

siendo:

C_i y C_v → concentración original de inserto y de vector

V_i y V_v → volumen de inserto y de vector en la reacción de ligamiento

Kb_v y Kb_i → tamaño del vector y del inserto

I/V → relación molar inserto/vector en la reacción de ligamiento

Además del DNA, la mezcla de reacción contenía 1 μ l del tampón de la ligasa (10x), 3 unidades de T4 DNA ligasa y agua destilada estéril hasta un volumen final de 10 μ l. La reacción se incubó a 14°C durante toda la noche, y al día siguiente se utilizó para transformar células competentes de *E. coli*.

En los casos en que el vector podía religar consigo mismo, la reacción se calentó a 50-55°C durante 5 min. antes de adicionar la ligasa y el tampón.

12. Transformación de *E. coli*.

12.1. Obtención de células competentes.

Se sembró la cepa adecuada de *E. coli* (JM109) en 5 ml de medio LB, y se cultivó toda la noche a 37°C hasta fase estacionaria. Seguidamente, se inoculó 0.5 ml en un matraz con 100 ml de cultivo LB precalentado a 37°C y se incubó durante unas 2-2.5 horas a 37°C hasta la fase exponencial de crecimiento ($DO_{600nm} = 0.6$). Las células se recogieron por centrifugación a 7.000 rpm durante 10 min. a 0-4°C, y el sedimento se resuspendió en 20 ml de $CaCl_2$ 50 mM frío. Tras mantenerlo a 0-4°C durante 5-6 horas, se recogieron las células por centrifugación durante 5 min. a 7.000 rpm a 0-4°C, y se resuspendieron en 2 ml de $CaCl_2$ 50 mM frío. Se transformaron alícuotas de 200 μ l de esta suspensión.

12.2. Transformación.

Para transformar células de *E. coli* con DNA exógeno (plásmido purificado o el producto de una reacción de ligamiento), se mezclaron 200 µl de células competentes con el DNA exógeno (10-20 µl, 0.1-1 µg) en tubo de microcentrífuga estéril, y esta mezcla se mantuvo a 0-4°C durante un mínimo de 30 min. A continuación se dio un choque térmico a 42°C durante 90 seg., y pasado este tiempo se enfrió el tubo en hielo durante 2 min.

12.3. Selección de transformantes.

Después de la transformación, se añadió 1 ml de LB a los tubos con las células transformadas y, tras mezclar por inversión, se incubó la suspensión a 37°C durante 1 hora para que las células transformadas expresaran la resistencia a la ampicilina. Alícuotas de 100 µl de esta suspensión se sembraron en placas de medio selectivo (LB-ampicilina), ya que los plásmidos utilizados confieren resistencia a este antibiótico, y se incubaron a 37°C durante 24 horas. Para poder diferenciar los transformantes que habían incorporado el plásmido con el inserto de aquellos que lo habían hecho sin el inserto, a las placas de LB-ampicilina se les añadieron 100 µl de IPTG 100 mM y 50 µl de X-Gal 20 mg/ml, con lo que los transformantes con el plásmido intacto aparecían de color azul, mientras que los que habían incorporado el plásmido recombinante aparecían de color blanco (véase apartado 2).

12.4. Análisis de los transformantes.

Habitualmente los transformantes se analizaron sembrando cada colonia en 5ml de LB-ampicilina, incubándose a 37°C durante toda la noche. Seguidamente se purificó el DNA plasmídico por un método rápido (minilisis alcalina) (véase apartado 13.1.1), se digirió con enzimas de restricción adecuados y los fragmentos de DNA resultantes se

separaron por electroforesis en un gel de agarosa. Analizando el tamaño de los fragmentos de DNA obtenidos se determinó si los transformantes contenían la construcción plasmídica deseada.

13. Purificación de DNA.

13.1. Purificación de DNA plasmídico de *E. coli*.

13.1.1. Purificación a pequeña escala (minilisis alcalina).

Se utilizó para analizar rápidamente el DNA plasmídico de los clones transformantes. Se inocularon 5 ml de LB-ampicilina con cada transformante seleccionado, y se incubó a 37°C durante toda la noche. Las células de 0.5-1 ml de cultivo se recogieron por centrifugación a 10.000 rpm durante 5 min. en tubos de microcentrífuga, y se resuspendieron en 200 µl de tampón STET, manteniéndose a 0°C (en hielo). A continuación se añadieron 40 µl de una solución de lisozima (10 mg/ml) a cada tubo, y tras mezclarse por inversión, se introdujeron rápidamente en agua hirviendo, donde se mantuvieron durante 50-60 seg., para provocar la lisis celular y liberación del DNA plasmídico de las células. A continuación los tubos se enfriaron en hielo (0°C), donde se mantuvieron durante 10 min. Pasado este tiempo, se centrifugaron 15 min. a 12.000 rpm, y se eliminó de cada tubo cuidadosamente, con ayuda de un palillo estéril, el sedimento (con los restos celulares y el DNA cromosómico). A cada sobrenadante se añadieron 400 µl de isopropanol 100% frío (-20°C) y se mantuvo 15 min. a -20°C para precipitar el DNA. El precipitado se recogió por centrifugación a 12.000 rpm 10 min. y se precipitó de nuevo el DNA plasmídico resuspendiendo el sedimento en 200 µl de TE/NaCl 0.3 M, añadiendo 200 µl de isopropanol 100% frío (-20°C) y manteniendo la mezcla un mínimo de 15 min. a -20°C. Después se recogió el precipitado por centrifugación durante 10 min. a 12.000 rpm, se lavó el sedimento con 500 µl de etanol al 80% frío (-20°C), y se secó a vacío durante 15 min. El DNA plasmídico así purificado se resuspendió en agua destilada estéril (20-50 µl).

- ✓ **Tampón STET:** Tris-HCl 50mM pH 8.0, Tritón 5% (v/v), sacarosa 8% (p/v), EDTA 50mM.

13.1.2. Purificación a gran escala.

Se utilizó el método de la lisis alcalina, originariamente descrito por **Birnboim and Doly (1979)**, con algunas modificaciones. Se inocularon 500 ml de medio LB-ampicilina con una colonia del transformante de *E. coli* cuyo plásmido se deseaba purificar y se incubó a 37°C durante 6-7 horas (hasta fase exponencial tardía). A continuación se añadieron 80 mg de cloramfenicol y se siguió incubando a la misma temperatura y agitación durante toda la noche. Este tratamiento inhibe la síntesis proteica y detiene el crecimiento celular sin impedir que el plásmido se replique. Las células se recogieron por centrifugación durante 10 min. a 5.000 rpm a 0°C. El sedimento se resuspendió en 10 ml de tampón GTE, seguidamente se añadieron 15 ml de NaOH 0.2 N/SDS 1% (p/v) recién preparado, se agitó suavemente (para no romper el DNA cromosomal durante la lisis celular) por inversión durante 10-15 min., hasta homogeneidad y transparencia y se mantuvo en hielo durante 15 min. A continuación, se neutralizó la solución alcalina añadiendo 15 ml de acetato potásico 3 M pH 4.8, se mezcló por inversión y se mantuvo en hielo durante 15 min. Se centrifugó a 10.000 rpm durante 15 min. a 0°C para eliminar los restos celulares y el DNA cromosomal precipitado. Al sobrenadante se le añadió RNasa A a una concentración final de 20 µg/ml y se incubó a 37°C durante 20 min., tras lo cual se realizaron dos extracciones con 20 ml de cloroformo. A la fase acuosa resultante se le añadió un volumen de isopropanol 100% frío (-20°C), y se mantuvo a -20°C durante 10 min. para precipitar el DNA. Se recogió el precipitado por centrifugación a 10.000 rpm durante 10 min. a 4°C, se lavó con etanol frío (-20°C) al 70%, y se secó a vacío. El precipitado se disolvió en 3.2 ml de agua destilada estéril y se precipitó de nuevo el DNA plasmídico añadiendo 0.8 ml de NaCl 4 M y 4 ml de PEG₈₀₀₀ al 13% (p/v) manteniéndose la mezcla en hielo durante 20 min. El DNA plasmídico precipitado se recogió por centrifugación a 10.000 rpm durante 15 min. a 4°C, y el sedimento se lavó con etanol frío (-20°C) al 70%, se secó a vacío y se resuspendió en 1.5 ml de TE o agua destilada estéril.

- ✓ **Tampón GTE:** Glucosa 50 mM, Tris-HCl 25 mM pH 8.0, EDTA 10 mM pH 8.0.
- ✓ **Acetato potásico 3 M, pH 4.8:** 29,4 g acetato potásico, 11.5 ml ácido acético, y agua c.s.p. 100 ml.

13.1.3. Purificación para secuenciación.

Se siguió el mismo método que el descrito en el apartado anterior, pero adaptado a un volumen inicial de 5 ml de cultivo del transformante. El medio de cultivo utilizado preferentemente fue Terrific Broth (Sigma), en el que se consigue un rendimiento superior puesto que se incrementa en 4-8 veces el número de bacterias/ml.

Las secuencias nucleotídicas se determinaron en el secuenciador automático Applied Biosystems modelo 373A, perteneciente a los servicios centrales de la Universitat de València, utilizando cebadores comerciales o sintetizados a partir de secuencias conocidas.

13.2. Purificación de DNA cromosomal de levaduras.

Se creció la cepa de levadura de *C. albicans* en 10 ml de medio líquido YPD a 28°C, durante toda la noche hasta fase estacionaria. Las células del cultivo se recogieron por centrifugación a 3.000 rpm durante 5 min. a temperatura ambiente. El sedimento celular se resuspendió en 0.5 ml de agua destilada estéril y se transfirió a un tubo de microcentrífuga. Tras centrifugar las células para eliminar el sobrenadante, se añadieron perlas de vidrio (0.5 g, diámetro 425-600 µm) y se agitó en “vortex” a alta velocidad, durante 5-10 periodos de 1 min. cada uno, intercalados con pausas de 1 min. en hielo, hasta comprobar mediante examen microscópico que se había conseguido una rotura del 80-90% de las células. A continuación se añadieron 200 µl de “breaking buffer”, 200 µl de fenol/cloroformo/alcohol isoamílico (25/24/1, v/v) y 200 µl de TE, y se agitó con

ayuda del “vortex” durante 15-30 seg. A continuación se centrifugó durante 5 min. a 12.000 rpm a temperatura ambiente, y se transfirió la fase acuosa a un tubo de microcentrífuga nuevo, al que se añadió 1 ml de etanol frío (-20°C), se mezcló bien por inversión y se mantuvo a -20°C durante 30 min. Después se centrifugó durante 5 min. a 12.000 rpm a 4°C, y el precipitado se resuspendió en 400 µl de TE, y se incubó con RNasa A (3 µl, 10 mg/ml) a 37°C durante 5 min. para degradar el RNA. A continuación se añadieron 30 µl de NaCl 4 M y 1 ml de etanol frío (-20°C), se mezcló bien por inversión y se mantuvo a -20°C durante 30 min. para precipitar el DNA cromosomal.

El precipitado de DNA cromosomal se recogió por centrifugación a 12.000 rpm a 4°C durante 5 min., se lavó dos veces con etanol al 70% frío (-20°C), y a continuación se secó a vacío. El sedimento de DNA cromosomal se disolvió suavemente en 100 µl de TE manteniéndolo durante una noche a 4°C y posterior homogeneización de la disolución mediante pipeteo suave, para evitar la fragmentación del mismo. El DNA cromosomal ya disuelto era mantenido a 4°C.

- ✓ **“breaking buffer”**: Triton X-100 2% (v/v), SDS 1% (p/v), NaCl 100 mM, Tris-HCl 10mM pH 8.0, EDTA 1mM pH 8.0.

14. Marcaje no radiactivo de sondas de DNA.

Los fragmentos de DNA utilizados como sondas en experimentos de hibridación fueron marcados de forma no radiactiva, mediante el “DIG DNA Labeling and Detection Kit” de Boehringer Mannheim que utiliza la digoxigenina, un hapteno esteroide, para marcar el DNA. Las sondas de DNA marcadas con digoxigenina se sintetizan enzimáticamente mediante el fragmento Klenow de la DNA Polimerasa I de *E. coli* y oligonucleótidos de secuencia corta y aleatoria que sirven como cebadores. Para ello, el DNA a marcar se desnaturaliza por calor y posteriormente el fragmento Klenow sintetiza las cadenas complementarias al molde a partir de los cebadores, en presencia de una mezcla de dNTPs. Uno de estos nucleótidos (el dUTP) está marcado

con digoxigenina (DIG-dUTP), por lo que las cadenas de DNA de nueva síntesis incorporan la digoxigenina a su estructura.

El DNA para ser utilizado como sonda, se purificó a partir de gel de agarosa (véase apartado 8) y fue marcado de acuerdo con las instrucciones del fabricante del kit. El DNA (0.5-3 µg), diluido en agua destilada estéril hasta un volumen de 15 µl, se desnaturizó durante 10 min. a 100°C, tras lo que se enfrió rápidamente en hielo-etanol. A continuación se añadieron 2 µl de una mezcla de hexanucleótidos concentrada (10x), 2 µl de una mezcla de dNTPs concentrada (10x) en la que el dUTP estaba marcado con DIG, y 1 µl del enzima de Klenow (2 U/µl), todo ello suministrado con el kit. Tras incubar esta mezcla toda la noche a 37°C, se añadieron 2 µl de una solución de EDTA 0.2 M pH 8.0 para parar la reacción de marcaje.

15. Detección de secuencias de DNA mediante hibridación (Southern blot).

Se realizó según el método descrito por **Southern (1975)** y modificado por **Sambrook *et al.* (1989)**. El DNA que se deseaba analizar fue digerido con las enzimas de restricción adecuadas, partiendo de 12 µg en el caso de DNA genómico y de 100 ng para el DNA plasmídico. Los fragmentos resultantes fueron separados mediante electroforesis en gel de agarosa, y teñidos con bromuro de etidio para visualizarlos; se lavó el gel con agua destilada y se sumergió en una bandeja con HCl 0.25 M durante 30 min. (renovando la solución a los 15 min.), con agitación suave. Después de este tratamiento, el gel se lavó en agua destilada, y fue sumergido en una solución desnaturizante (NaOH 0.5 M y NaCl 1.5 M) durante 30 min. bajo agitación suave (renovando la solución a los 15 min.). A continuación se lavó el gel con agua destilada y se sumergió en una solución neutralizante de Tris-HCl 0.5 M pH 7.0, NaCl 1.5 M, manteniéndose bajo agitación durante 30 min. (renovando la solución a los 15 min.), para neutralizar el pH. Finalmente el gel se sumergió durante 15 min. en tampón SSC 20x, el mismo tampón que se utilizó para realizar la transferencia. Seguidamente el DNA se transfirió por capilaridad durante toda la noche a temperatura ambiente a una

membrana de Nylon cargada positivamente (Boehringer-Mannheim). El montaje utilizado se describe a continuación. Sobre una bandeja en la que se colocará el tampón de transferencia SSC 20x, se disponen los siguientes elementos de abajo hacia arriba: un soporte sobre el que se colocan 2 tiras de papel de filtro embebidas en el tampón de transferencia y en contacto con el fondo de la bandeja, 3 papeles de filtro Whatman 3MM impregnados de tampón de transferencia, el gel con el DNA a transferir, la membrana de Nylon, otros 3 papeles de filtro Whatman 3MM, papel absorbente y un peso de 0.5-1 Kg. El tampón de transferencia se coloca en la bandeja y por capilaridad asciende hasta el papel absorbente, transfiriendo el DNA desde el gel al filtro. Entre el gel y el filtro se sellaron los bordes con parafilm para que todo el flujo del tampón se realizara únicamente a través del sistema. El peso se colocó para asegurar un contacto adecuado entre todos los elementos de la transferencia. La transferencia se realizó durante toda la noche y al día siguiente la membrana de Nylon se lavó con SSC 20x, se secó a temperatura ambiente y posteriormente el DNA se fijó covalentemente a la misma.

✓ **SSC 20x** : NaCl 3M, citrato- Na_3 0.3 M, pH 7.0.

16. Fijación de DNA a filtros de nylon.

El DNA se fijó normalmente a los filtros de Nylon por calor, manteniéndolos durante 30 min. a 120°C en horno Pasteur, o bien durante 5 min. en microondas a máxima potencia.

17. Hibridación DNA/DNA y revelado.

Para la hibridación DNA/DNA y detección de la misma se utilizó el “DIG DNA Labeling and Detection Kit” (Boehringer-Mannheim), siguiendo las instrucciones del fabricante.

17.1. Prehibridación.

La prehibridación tiene por objeto bloquear los lugares del filtro donde no se han unido ácidos nucleicos para evitar que la sonda se una de forma inespecífica. Se realizó poniendo en un tubo de hibridación la membrana de Nylon junto con el tampón de hibridación (20 ml/100 cm² de membrana), incubándose a continuación a 68°C durante al menos 1 hora en el horno de hibridación, con movimiento constante de rotación.

- ✓ **Tampón de hibridación:** SSC 5x, agente bloqueante 1% (a partir de la solución de bloqueo concentrada al 10%, p/v), N-lauroylsarcosina 0.1% (a partir de una solución al 10%, p/v), SDS 0.02% (a partir de una solución al 10%, p/v).
- ✓ **Solución de bloqueo concentrada:** agente bloqueante (Boehringer-Mannheim) en tampón 1 a una concentración de 10% (p/v). La disolución se prepara en caliente o se guarda a 4°C.
- ✓ **Tampón 1:** ácido maleico 0.1 M, NaCl 0.15 M, pH 7.5 (ajustado con NaOH sólido).

17.2. Hibridación.

Una vez finalizada la prehibridación, el tampón de hibridación se substituyó por nuevo tampón de hibridación (5 ml/100 cm² de membrana) con la sonda marcada (0.25 µg/ml de tampón), previamente desnaturalizada por calentamiento a 100°C durante 10 min. Los filtros se incubaron a 68°C durante toda la noche en el horno de hibridación. Durante este proceso, la sonda de DNA marcada con digoxigenina, hibrida específicamente con las cadenas complementarias de DNA fijadas a la membrana de Nylon.

17.3. Lavados.

Tras la hibridación, los filtros se lavaron dos veces durante 5 min. a temperatura ambiente con SSC 2x, SDS 0.1% (p/v) (100 ml/100cm² de membrana). A continuación

se realizaron otros dos lavados de 15 min. a 68°C con SSC 0.1x, SDS 0.1% (p/v) (100 ml/100 cm² de membrana). Estos lavados se realizan para eliminar la sonda de aquellas zonas del filtro en que la hibridación no es completamente específica (homología parcial de las secuencias).

17.4. Revelado inmunológico.

El revelado se realizó siguiendo las instrucciones del fabricante (Boehringer-Mannheim). Los filtros se lavaron durante 1 min. con 100 ml de tampón 1 para equilibrar la membrana. A continuación se bloquearon manteniéndolos sumergidos en tampón 2 durante 30 min. Después cada filtro se incubó durante 30 min. con 20 ml de la solución de anticuerpo diluido, para que éste se uniese a la sonda marcada. El anticuerpo empleado era un anticuerpo policlonal anti-digoxigenina, obtenido en oveja y conjugado con fosfatasa alcalina; este anticuerpo se empleó diluido en tampón 2 (dilución 1:5000, 150 mU de fosfatasa alcalina/ml). El anticuerpo conjugado no unido se eliminó lavando dos veces durante 15 min. con 100 ml de tampón de lavado. A continuación los filtros se equilibraron durante 2 min. con 20 ml de tampón 3 y, por último, los filtros se incubaron a temperatura ambiente y en oscuridad con 10 ml de solución de revelado recién preparada. Las bandas de hibridación se detectaron debido al precipitado coloreado que se forma como consecuencia de la reacción catalizada por la fosfatasa alcalina. Para parar la reacción, las membranas se lavaron con 50 ml de TE o agua durante 5 min.

- ✓ **Tampón 2 (solución bloqueante):** solución concentrada de bloqueo diluida 1:10 en tampón 1 (concentración final 1% de agente bloqueante).
- ✓ **Tampón de lavado:** tween 20, 0.3% (v/v) en tampón 1.
- ✓ **Tampón 3 (tampón de revelado):** Tris-HCl 100 mM, NaCl 100 mM, MgCl₂ 50 mM, pH 9.5.

- ✓ **Solución de revelado** (Se utiliza recién preparada): 45 µl de solución NBT (nitrobluetetrazolium) (suministrada por el kit), 35 µl de solución X-fosfato (5-bromo-4-cloro-3-indolilfosfato) (suministrada por el kit), 10 ml de tampón 3.

18. Secuenciación de DNA.

Todas las reacciones de secuenciación se realizaron por el método de terminación de cadena descrito por **Sanger *et al.* (1977)**, empleando el kit “*Taq Dye Deoxy Terminator Cycle Sequencing*” (Applied Biosystems, Inc.), de acuerdo con sus instrucciones. Las secuencias se determinaron con el secuenciador automático modelo 370A de Applied Biosystems. Se secuenciaron las dos hebras complementarias de cada fragmento de DNA utilizando oligonucleótidos forward y reverse universales (Promega), así como oligonucleótidos sintéticos deducidos de la secuencia (suministrados por Pharmacia Biotech y GIBCO BRL).

Tanto las reacciones de secuenciación como la determinación de las secuencias se realizaron en el servicio de secuenciación de DNA del SCSIE (Universitat de València).

19. Análisis de secuencias de DNA.

Las herramientas informáticas más importantes utilizadas para realizar este estudio se detallan en las tablas II.4. y II.5.

Base de datos	Dirección
Secuencias de <i>Candida albicans</i>	Stanford School of Medicine, Stanford, CA, USA (http://www-sequence.stanford.edu/group/candida)
Genoma de <i>Candida albicans</i>	The galar fungail network (http://genolist.pasteur.fr/CandidaDB/)
EMBL	European Molecular Biology Information, Bethesda, MD, USA (NCBI) (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/)

MIPS	Washington University, Saint Louis, Missouri, USA (http://mips.gsf.de/cgi-bin/proj/yeast)
PDB (base de datos de proteínas)	Research Collaboratory for Structural Bioinformatics, USA (http://www.rcsb.org/pdb/)
PFAM	Washington University in St Louis, Montana, USA (http://pfam.wustl-edu/)
Prosite	Swiss Institute of Bioinformatics, Geneva, Switzerland (http://www.expasy.ch/)
Genoma de <i>S. cerevisiae</i>	Stanford School of Medicine, Stanford, CA, USA (http://genome-www.stanford.edu/Saccharomyces/)

Tabla II.4. Bases de datos utilizadas para el análisis informático.

Programa	Dirección
BLAST, BLASTN, BLASTP, ORF, TBLASTN	National Center for Biotechnology Information, Bethesda, MD, USA (NCBI) (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/)
ExPASY, DGPI	(http://us.expasy.org/tools/)
NPS@	(http://pbil.ibcp.fr/cgi-bin/primanal_pcprof.pl)
DAS	Stockolm University, Sweeden (http://sbc.su.se/)
MatInspector V2.2	National Research Center for Environment and Health, Germany (GSF) (http://www.gsf.de/cgi-bin)
Peptide Mass Calculator	Swiss Institute of Bioinformatics, Geneva, Switzerland (http://www.molbiol.net/)
SAPS, SOPMA	Network Protein Sequence@nalysis , Pôle BioInformatique Lyonnaise (http://pbil.ibcp.fr/)
PSORT	(http://psort.nibb.ac.jp/form2.html)
YinOYang 1.2	(File://B:\YingOYang_1_2predictionresults.htm).
CYSPRED	(http://prion.biocomp.unibo.it/cyspred.html)
MultAlin	Multiple Sequence Alignment, servidor INRA (http://prodes.toulouse.inra.fr/multalin/result/1000208212.gif)

Tabla II.5. Programas utilizados para el análisis informático.

20. Inmunorrastreo de una genoteca de cDNA con un anticuerpo policlonal específico de micelio.

La genoteca de cDNA fue cedida por la Dra. LaJean Chaffin (Texas Rech University, Health Science Center, Lubbock, Texas, USA). Esta genoteca se construyó con cDNA sintetizado de una población de mRNA de la cepa de *C. albicans* ATCC 26555 a la que se había inducido la formación de tubos germinativos durante 30 min. vía ayuno metabólico. La población de cDNA se clonó en el vector de expresión λ gt11 en el único sitio de restricción de *Eco* RI. Si el cDNA se inserta en la orientación y marco de lectura correcto, se produce una proteína de fusión que consiste en secuencias de β -galactosidasa unida a secuencias polipeptídicas codificadas por el inserto. De esta forma las placas de bacteriófagos se pueden rastrear por la presencia del material que reacciona con el antisuero específico para la proteína de interés.

Para el rastreo inmunológico, se analizaron varias placas de 150 mm de diámetro que contenían aproximadamente unos 30.000 recombinantes por placa (**Sambrook *et al.*, 1989**) de la siguiente forma: a 0.15 ml de un cultivo de la cepa de *E. coli* Y1090 previamente crecido durante 12-16 h en medio LB (suplementado con 0.2% de maltosa y 10 mM MgSO₄) se le adicionó 0.1 ml de tampón SM que contenía 10⁵ unidades formadoras de calvas (pfu) de la genoteca de expresión del bacteriófago λ . La suspensión se incubó durante 20 min. a 37°C para permitir que el fago se adsorbiera a la bacteria. Posteriormente, se añadió a la suspensión celular 10 ml de LB top agar y la mezcla se vertió inmediatamente en placas de LB sólido. Estas placas se incubaron durante 3 horas a 42°C hasta que las placas líticas fueron visibles y después se cubrieron con filtros de nitrocelulosa impregnados con IPTG 100 mM. Las placas se incubaron de nuevo, pero esta vez durante toda la noche a 37°C. Después de esta incubación, las placas se enfriaron a temperatura ambiente, los filtros se marcaron previamente para distinguirlos, se separaron de las placas y se sumergieron en tampón TTBS durante 30 min. a temperatura ambiente. A continuación, los filtros se sumergieron en tampón de bloqueo durante 30 min., se lavó 4 veces con TTBS y se incubó con el primer anticuerpo mPAb a una dilución 1:1000 en tampón TTBS + 1% BSA (albúmina de

suero bovino) durante al menos tres horas. Después de esta incubación, los filtros se lavaron otra vez 4 veces en TTBS, y el complejo antígeno-anticuerpo se detectó utilizando un segundo anticuerpo de conejo policlonal unido a una peroxidasa (HRP) diluido 1:2000 en TTBS + 1% BSA con incubación de 1 hora a temperatura ambiente. Después de lavar los filtros 4 veces con TTBS, el complejo antígeno-anticuerpo-HRP-anticuerpo se detectó utilizando el sustrato cromogénico 4-cloro- α -naftol en la solución reveladora. Los filtros se incubaron en esta solución hasta que apareció el color púrpura en los sitios de formación de los complejos antígeno-anticuerpo. La reacción se paró lavando los filtros con agua destilada. Las calvas positivas se identificaron en las placas y se tomó el área que contenía el clon positivo utilizando una pipeta Pasteur estéril y se transfirió a 1 ml de tampón SM que contenía un par de gotas de cloroformo. Las partículas del bacteriófago se eluyeron del agar durante varias horas a 4°C. Después se realizó un segundo rastreo a menor título (30-50 ufp/por placa de 90 mm), para garantizar la clonalidad de los bacteriófagos recombinantes inmunopositivos.

- ✓ **Tampón SM:** 100 mM NaCl, 1 mM MgSO₄, 20 mM Tris-HCl pH 7.5, 0.01% gelatina.
- ✓ **LB top agar:** medio LB con 0.6% agar.
- ✓ **TTBS:** 10 mM Tris-HCl pH 8, 150 mM NaCl, 0.05% Tween 20.
- ✓ **Tampón de bloqueo:** tampón TTBS + 3% BSA.
- ✓ **TBS:** TTBS sin Tween 20.
- ✓ **Solución reveladora:** 60 mg de sustrato cromogénico 4-cloro- α -naftol disueltos en 20 ml de metanol frío + 60 μ l de H₂O₂ al 30% disueltos en 100 ml de TBS.

20.1. Amplificación de los bacteriófagos recombinantes inmunopositivos.

La cepa bacteriana se infectó y 0.25 ml de la suspensión células/fago se creció en 5 ml de medio LB, suplementado con maltosa y magnesio durante unas 6 horas hasta que la lisis fue visible. Una vez que se observó la lisis, se añadieron 250 μ l de cloroformo al cultivo y se continuó la incubación durante 10 min. más. La suspensión se

centrifugó para eliminar los restos celulares y se añadió dimetilsulfóxido (DMSO) al lisado del sobrenadante a una concentración final del 7% (v/v). Estos lisados se guardaron a -20 °C.

20.2. Determinación del título del lisado de fagos.

Para determinar el título del lisado de fagos se prepararon varias diluciones en tampón SM. Se incubó un volumen de 0.1 ml de cada dilución con 0.15 ml de un cultivo de la cepa de *E. coli* Y1090 y la suspensión se plaqueó en agar de LB. Después de incubar durante toda la noche a 37 °C se contó aquella placa que contenía entre 30 y 300 calvas.

21. Rastreo de una librería genómica.

A partir de una librería genómica de *C. albicans* (cepa WO-1) se realizó una dilución 1:10.000 de la cual se sembraron diferentes cantidades de células (200, 100 y 50 μ l) en placas de LB-ampicilina incubándose a 37°C. Se eligieron las cuatro placas que contenían el mayor número de colonias con una separación suficiente para el posterior análisis (aproximadamente 2.000-4.000 colonias por placa Petri de diámetro 15 cm). Estas cuatro placas fueron empleadas para el rastreo siguiendo básicamente los métodos de **Grunstein and Hogness (1975)** y **Hanahan and Meselson (1983)**. Se colocó una membrana de Nylon (Boehringer-Mannheim) sobre la superficie de cada placa marcando bien la posición y orientación de cada filtro en cada placa, y se mantuvo durante 5 min. a temperatura ambiente, tras lo cual se retiraron cuidadosamente los filtros de las placas y se dejaron secar al aire. Las placas, una vez retirados los filtros, se incubaron a 37°C durante 4-16 horas, para permitir que siguieran creciendo las colonias y poder identificar y recuperar mejor las que se detecten positivas tras el rastreo. Las membranas se colocaron boca arriba sobre un papel Whatman 3MM y 8 papeles de filtro, empapados con una solución desnaturalizante y se mantuvieron durante 5 min. para lisar las bacterias. A continuación los filtros se trataron de manera similar, durante

otros 5 min., con una solución neutralizante. Finalmente, los filtros se saturaron de manera similar con tampón SSC 6x, tras lo cual se dejaron secar al aire. El DNA se fijó a los filtros de Nylon mediante calor (30 min. a 120°C en horno Pasteur, o bien durante 5 min. en microondas a máxima potencia). A continuación los filtros se prehibridaron a 68°C tal y como se ha descrito en el apartado 17.1. Antes de hibridar con la sonda se eliminaron los restos de células no fijadas sobre el filtro. A continuación se hibridaron a 68°C con la sonda, siguiendo el protocolo descrito en el apartado 17.2. Como sonda se utilizó el fragmento de 2,2 Kb de cDNA que contiene el inserto que codifica para la hidrofobina CaHPB en *C. albicans* utilizada en este estudio. Los lavados de los filtros se realizaron tal y como se explica en el apartado 17.3., realizándose los dos últimos lavados bien a 68°C (dos filtros) o a temperatura ambiente (los otros dos filtros), y la detección inmunológica se realizó según el apartado 17.4. A continuación se localizaron en las placas originales las colonias que dieron una reacción positiva en la hibridación, se tomaron con un palillo estéril, se sembraron en 5 ml de medio LB-ampicilina y se incubaron a 37°C durante toda la noche. En aquellos casos en que la presencia de colonias muy próximas no garantizaba haber realizado la siembra sólo con el clon positivo, se realizó un segundo rastreo a partir de estos cultivos para aislar definitivamente los clones positivos. Para ello, se aislaron colonias a partir de los mismos en placas de LB-ampicilina y seguidamente se realizó un segundo rastreo siguiendo el mismo método que el utilizado para realizar el primero. De igual modo, una vez identificados los clones positivos, se sembraron en 5 ml de medio LB-ampicilina incubándose a 37°C. A partir de estos cultivos se purificaron los plásmidos de cada uno de los clones positivos obtenidos tras el rastreo de la genoteca.

- ✓ **Librería genómica de *C. albicans* (cepa WO-1):** los fragmentos de DNA (5-10 Kb) fueron clonados entre los sitios *Hind* III y *Bam* HI del vector plasmídico pEMBLYe23 (librería cedida por la Dra. B. B. Magee, Universidad de Minnesota, EEUU)
- ✓ **Solución desnaturalizante:** NaCl 1.5 M, NaOH 0.5 M
- ✓ **Solución neutralizante:** Tris-HCl 0.5 M pH 7.0, NaCl 1.5 M

22. Obtención de anticuerpos específicos en conejos. Pautas de inmunización.

El oligopéptido de 14 aminoácidos correspondiente a una región fuertemente inmunogénica del clon 11 y acoplado a KLH (keyhole limpet hemocyanin) fue sintetizado por MedProbe (Oslo, Norway) presentando una pureza mayor al 70%. Así pues, 1 ml de solución que contenía 1.1 mg de péptido acoplado a 2 mg de carrier fue mezclada con un volumen equivalente de adyuvante completo de Freund. La suspensión resultante se inyectó subcutáneamente en varios puntos de la espalda de un conejo hembra virgen de la raza New Zealand White. A las dos semanas se administró una segunda dosis, y seguidamente otras dos inmunizaciones más, espaciadas 10 días una de la otra (para cada una de las tres inmunizaciones efectuadas tras la primera sensibilización se utilizó el mismo tipo de preparación antigénica descrito anteriormente pero emulsionada con adyuvante incompleto de Freund en este caso). El animal se sangró por la vena marginal de la oreja siete días después de la última inyección. De la sangre obtenida se obtuvo el suero que contenía las inmunoglobulinas y se almacenó seguidamente a 4°C hasta su uso.

23. Inmunofluorescencia indirecta (IFI).

Los ensayos de inmunofluorescencia se llevaron a cabo siguiendo básicamente la técnica descrita por **Sundstrom and Kenny (1984)**. Alícuotas de 1ml de células recogidas del medio de cultivo a distintos tiempos (obteniendo así células en distintos estados de crecimiento), se lavaron 2 veces con tampón PBS. A continuación se centrifugaron y se resuspendieron en 150 µl de PBSB, que contenía el anticuerpo a una dilución final de 1:10. Estas suspensiones celulares se incubaron a 37°C durante 1 hora, lavándose a continuación 4 veces con PBS. Posteriormente se añadió a cada tubo 150 µl de inmunoglobulinas anti-conejo acopladas a isotiocianato de fluoresceína (FITC) a una dilución 1:10 en PBSB incubándose de nuevo durante 1 hora a 37°C. Por último se realizaron 3 lavados más con PBS y se observaron en un Fotomicroscopio III de Zeiss, equipado con sistema de contraste de fases y epifluorescencia.

- ✓ **Tampón PBS:** tampón fosfato 100mM pH 7.4, NaCl 1%
- ✓ **Tampón PBSB:** PBS + 1% de BSA

24. Estudio inmunohistoquímico con el anticuerpo policlonal sobre muestras tisulares humanas de Candidiasis sistémicas.

El estudio se realizó sobre muestras tisulares renales procedentes de necropsias de pacientes con candidiasis sistémicas. Brevemente, las muestras fueron fijadas en formol neutro al 4% e incluidas en parafina. Se realizaron secciones de 4 micrómetros que fueron teñidas con hematoxilina-eosina y P.A.S (ácido peryódico de Schiff). El estudio inmunohistoquímico se realizó mediante la técnica de avidina-biotina-peroxidasa (**Hsu *et al.*, 1981**) sobre cortes desparafinados. La peroxidasa endógena fue abolida mediante la incubación en H₂O₂ al 0.3 % en metanol absoluto durante 30 min. La dilución empleada del anticuerpo primario (PAb anti-Hpbbp) fue 1:200, y se incubó durante 45 min. a temperatura ambiente. Las diluciones y lavados fueron realizados con tampón Tris 10 mM, pH 7.2. La peroxidasa fue revelada con una solución de diaminobenzidina (0.5 mg/ml) y H₂O₂ (3 µl/ml). Se realizó un contraste con hematoxilina, y se deshidrataron las secciones mediante una serie decreciente de alcoholes, seguidos de xilol, y montaje con Permount. Como control se empleó en secciones adyacentes un anticuerpo monoclonal anti-sialyl-I (cedido por el Dr. Hakomori) a la misma dilución y seguido del mismo procesado. El producto del revelado, de color marrón, fue fotografiado en un fotomicroscopio Leitz Laborlux 11.

- ✓ **Muestras tisulares:** cedidas por el Dr. Monteagudo del Hospital Clínico Universitario de Valencia

25. Solubilización de componentes de la pared celular de ambas fases morfológicas (levadura y micelio) de *Candida albicans*.

Las células crecidas en forma de levadura o micelio obtenidas según la metodología descrita previamente (Casanova *et al.*, 1989) con ligeras modificaciones, se recogieron por centrifugación a 5.000 rpm durante 10 min. a 4°C en una centrífuga JA10 de Beckman siguiendo el procedimiento que se esquematiza en la Fig. II.4. Se lavaron con tampón A, resuspendiéndose seguidamente en un volumen de tampón A conteniendo β -mercaptoetanol (1% v/v) equivalente a 1/10 del volumen de los cultivos en medio líquido a partir de los cuales se habían cosechado las células. La suspensión celular resultante se incubó a una temperatura de 37°C durante 30 min. con agitación. Seguidamente, las células fueron sedimentadas por centrifugación a 5.000 rpm durante 10 min. a 4°C. El sobrenadante que constituye el **extracto de β -mercaptoetanol** se dializó frente a agua destilada (5 litros con 4 cambios durante 48 horas) y se concentró por liofilización.

Las células tratadas con el agente reductor se lavaron 2 veces con tampón A. Tras los lavados se añadió un volumen equivalente a 1/3 de perlas de vidrio Ballotini (0.5 mm de diámetro), y se rompieron las células en un homogeneizador de células MSK de Braun Biotech, 4 veces durante periodos de 30 seg. La rotura celular fue comprobada por observación bajo microscopía de contraste de fases. Tras eliminar las perlas de vidrio, se separaron las paredes celulares y el lisado celular por centrifugación (5.000 rpm durante 5 min. a 4°C). Las paredes presentes en el sedimento se lavaron 5 veces con tampón A y se resuspendieron en Tris-HCl 10 mM pH 7.4 adicionado de 2% de SDS a 100°C durante 5 min. Posteriormente se centrifugó durante 5 min. a 10.000 rpm. Al sobrenadante resultante se le añadieron 3 volúmenes de etanol a -20°C y se mantuvo a 4°C de temperatura durante 12 horas. Tras este periodo de tiempo se centrifugó a 10.000 rpm durante 10 min. y se recuperó el sedimento constituyendo así el **extracto SDS**.

Las paredes resultantes tras el tratamiento a 100 °C se lavaron 5 veces con tampón A, resuspendiéndose seguidamente en dos alícuotas:

1) En esa misma solución de tampón A conteniendo Zimoliasa (Zymoliase 20T 0,5 mg/ml), que es una preparación enzimática comercial con actividad β -glucanásica (**Kitamura *et al.*, 1974; Kitamura and Yamamoto, 1972**). Incubándose durante 12 horas la suspensión a 30°C con agitación. Tras este periodo de tiempo se centrifugó durante 15 min. a 15.000 rpm y se recuperó el sobrenadante que constituía el **extracto de Zimoliasa** el cual fue concentrado por liofilización.

2) Por otro lado, una alícuota similar se resuspendió en un tampón B suplementado con 0,1g de Glucanex[®] (**De Sampaio *et al.*, 1999**) por cada ml de tampón, incubándose durante 2 horas a 30°C bajo agitación constante. Tras este periodo de tiempo se recogió el sobrenadante que formaba el **extracto de Glucanex[®]** y se concentró por liofilización.

- ✓ **Tampón A:** 10mM Tris-HCl pH 7.4, 1mM de fluoruro de fenil-metil-sulfonilo (PMSF).
- ✓ **Tampón B:** fosfato sódico 10 mM pH 7.5, NaCl 150 mM, EDTA 5 mM y PMSF 2mM.

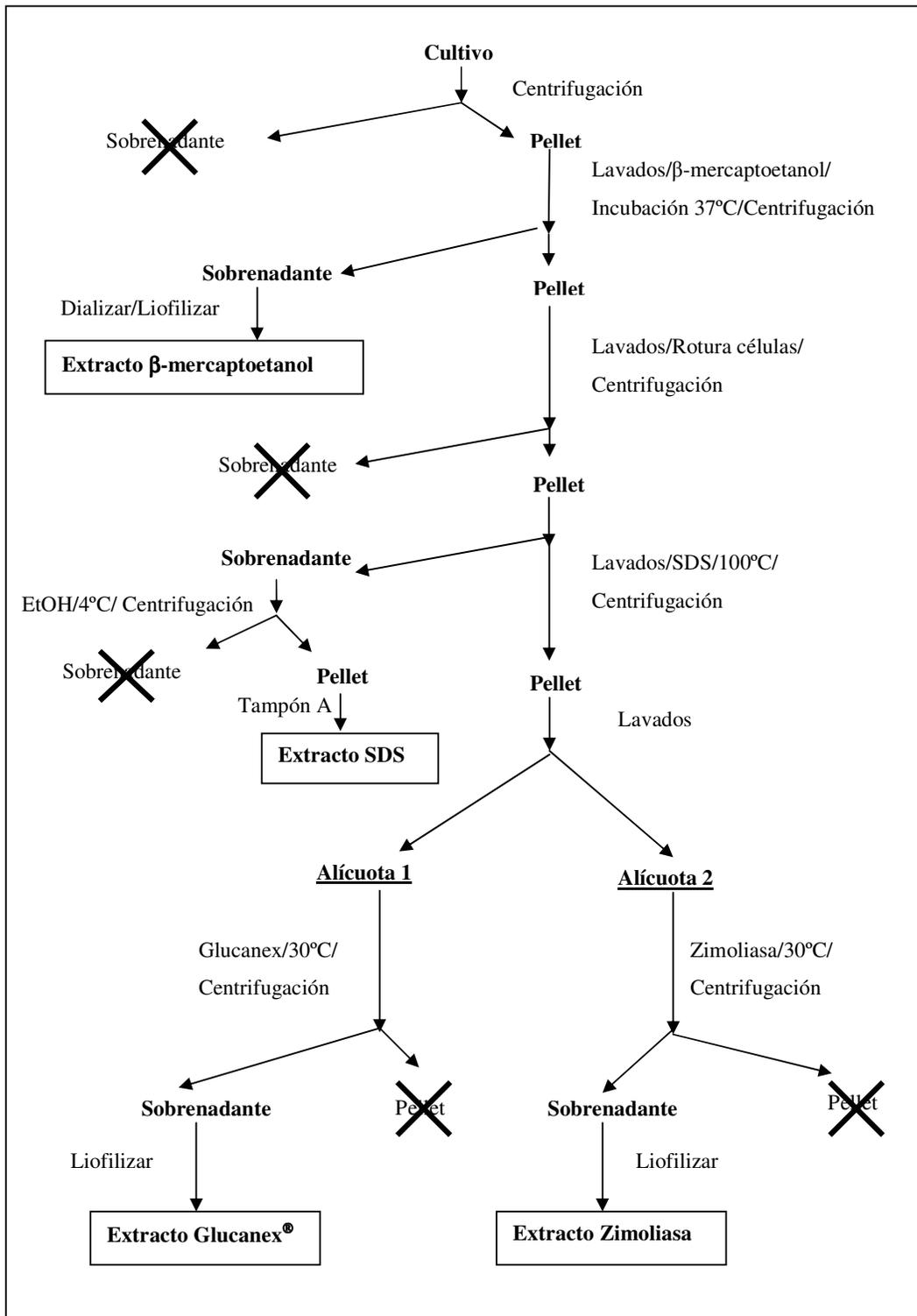


Fig. II.4. Esquema de los extractos celulares realizados en *C. albicans*.

26. Solubilización de hidrofobinas de la pared celular de ambas fases morfológicas (levadura y micelio) de *Candida albicans*.

Se obtuvieron cultivos de blastosporas (levaduras) y blastosporas germinadas (micelio) según la metodología descrita previamente (Casanova *et al.*, 1989) con ligeras modificaciones. Levaduras de *C.albicans* SC5314 se cultivaron en 100 ml de medio líquido YPD a 28°C durante toda la noche hasta fase estacionaria. Las células resultantes se resembraron en 500 ml de medio de cultivo Lee fresco (Lee *et al.*, 1975) para la obtención del micelio a 37°C a una DO₆₀₀ de 0,2, y en medio YPD (descrito anteriormente) a 37°C y a 28°C, para la obtención de las levaduras con una DO₆₀₀ de 0,8. Las suspensiones celulares resultantes se incubaron a las diferentes temperaturas en un incubador orbital con agitación vigorosa (220 rpm) durante 6 horas. A continuación las células se recogieron por centrifugación a 5.000 rpm durante 10 min. en una centrífuga JA10 de Beckman y se procedió a la extracción de las proteínas (Askolin *et al.*, 2001) con diferentes soluciones:

- 50 mM de Tris/HCl a pH 7.4 y pH 9.0 conteniendo 1% de SDS.
- Urea 8 M.
- 1% β-mercaptoetanol en 50 mM de Tris/HCl a pH 7.4.
- 100 mM de EDTA en 50 mM de Tris/HCl a pH 7.4.
- Etanol 60%.
- 50 mM de Tris/HCl a pH 7.4 y 9.0 conteniendo 2% de SDS.
- TTBS (10mM Tris-HCl pH 8, 150mM NaCl, 0.05% Tween 20).
- PBS (tampón fosfato 100mM pH 7.4, NaCl 1%) conteniendo azida 1mM.

La extracción se llevó a cabo a temperatura ambiente durante una hora con agitaciones ocasionales, conteniendo la mezcla un cóctel inhibitor de proteasas (Sigma). Seguidamente se procedió a la centrifugación a 5.000 g y 4°C durante 10 min. para la recogida de los respectivos sobrenadantes en los que presuntamente se encontraba la proteína hidrofobina. Posteriormente se procedió a la concentración de los mismos por liofilización.

27. Adhesión a perlas de vidrio.

Las células miceliales se cultivaron según la metodología descrita previamente (Casanova *et al.*, 1989) con ligeras modificaciones. Levaduras de *C. albicans* SC5314 se cultivaron en 500ml de medio líquido YPD a 28°C durante toda la noche hasta la fase estacionaria de crecimiento. Las células resultantes se resembraron, en presencia de perlas de vidrio, en 500 ml de medio de cultivo Lee fresco (Lee *et al.*, 1975) para la obtención del micelio a 37°C a una DO₆₀₀ de 0.2. A continuación el cultivo se incubó con agitación vigorosa (220 rpm) durante 6-8 horas. Posteriormente se recogieron las perlas de vidrio por decantación y se lavaron con tampón A. Finalmente se realizó la extracción de las proteínas tratando las perlas de vidrio con una solución de SDS conteniendo un cóctel inhibidor de proteasas (Sigma), a temperatura ambiente durante una hora con agitaciones ocasionales. Por último se centrifugó a 5.000 g y 4°C durante 10 min. para recoger el sobrenadante, en el que se encontraba las moléculas adsorbidas a la superficie de las perlas de vidrio entre ellas la presunta hidrofobina, el cual se liofilizó y se almacenó hasta su posterior análisis mediante western blotting.

- ✓ **Tampón A:** 10mM Tris-HCl pH 7.4, 1 mM de fluoruro de fenil-metil-sulfonilo (PMSF).
- ✓ **Solución de SDS:** 50 mM de Tris/HCl a pH 9.0 conteniendo 2% de SDS.

28. Electroforesis en geles de dodecil sulfato sódico (SDS)-poliacrilamida.

Se utilizó el método de electroforesis vertical en placa de vidrio (Laemmli, 1970), con ligeras modificaciones (Casanova *et al.*, 1989). Las electroforesis se llevaron a cabo empleando una cubeta vertical SE250 de Hoefer, y una fuente de alimentación Power Pac300 de Bio-Rad. Se utilizaron geles separadores al 12% de acrilamida. El gel empaquetador tenía una concentración de acrilamida del 6%. La solución solubilizadora se añadió de modo que la relación muestra:solución solubilizadora fuese de 2:1 (v/v). A continuación, se calentaron a 100°C las mezclas de muestra problema:solución solubilizadora durante 5 min. y seguidamente se aplicaron

en los pocillos formados en el gel empaquetador. Los estándares de proteínas de pesos moleculares conocidos comprendidos entre 280 y 7 kDa (Sigma), 198 y 6.4 kDa (Bio-Rad) se corrieron en paralelo. La carrera se realizó en tampón R a voltaje constante de 80 voltios a través del gel empaquetador y 100 voltios a través del gel separador, interrumpiéndose la misma cuando el frente de azul de bromofenol llegó a 0.5 cm del borde inferior del gel.

- ✓ **Gel separador al 12% de acrilamida:** relación acrilamida:bisacrilamida de 30:0.2, preparados en tampón Tris/HCl 0.37 M pH 8.8 conteniendo SDS (dodecilsulfato sódico) al 0.15% (p/v).
- ✓ **Gel empaquetador:** relación acrilamida:bisacrilamida de 30:0.2, preparado en tampón Tris/HCl 0.25 M pH 6.8 conteniendo SDS al 0.2% (p/v).
- ✓ **Solución solubilizadora:** 35 % (v/v) de glicerol, 7% (p/v) de SDS, 0.035% (p/v) de azul de bromofenol y 14% (v/v) de β -mercaptoetanol en tampón Tris/HCl 0.5 M pH 6.8.
- ✓ **Tampón R:** Tris-HCl 25 mM a pH 8.3 conteniendo SDS al 0.1% (p/v) y glicina 0.2 M.

29. Tinción de proteínas en geles de poliacrilamida y fluorografía.

Los geles de poliacrilamida fueron teñidos durante 45 min. con una solución de azul de Coomassie G-250 al 0.2% en una mezcla de alcohol isopropílico:ácido acético:agua destilada (25:10:65 en volumen), a temperatura ambiente y con agitación suave y continua. La eliminación del colorante de las áreas del gel no correspondientes a bandas proteicas, se realizó mediante lavados en una mezcla de metanol:ácido acético:agua destilada (en la proporción 10:10:80 en volumen).

Los geles que iban a ser analizados por fluorografía fueron sumergidos en una solución de Amplify (Amersham) durante 30 min. con agitación suave y constante, y a continuación fueron plastificados y secados. Una vez secos los geles se expusieron

frente a una película X-Omat UV (Kodak), manteniéndose a -70°C durante distintos tiempos según la radiactividad presente en las muestras.

30. Transferencia de polipéptidos (Western blotting).

Una vez completada la separación electroforética de los polipéptidos presentes en las diferentes muestras, los geles de poliacrilamida se equilibraron por inmersión en tampón de transferencia.

La membrana utilizada fue de fluoruro de polivinilideno HybondTM-P de Amersham, la cual fue pretratada de acuerdo con las condiciones del fabricante, antes de la transferencia. Finalizado el tiempo de equilibrado, el gel y la membrana se pusieron en contacto en un sistema electroforético (mini trans blot de Bio-Rad), en presencia del tampón de transferencia como electrolito, aplicando un amperaje de 0.8 mA/cm^2 (superficie del gel y de la membrana) durante 2 horas a temperatura ambiente o a 4°C , para producir la transferencia de los polipéptidos desde el gel hacia la membrana.

- ✓ **Tampón de transferencia:** Tris 25 mM y glicina 192 mM pH 8.3, conteniendo metanol al 20% v/v.

31. Inmunodetección de polipéptidos transferidos a membranas de PVDF.

Se ha seguido la técnica descrita en el manual de la firma Bio-Rad (Bio-Rad GAR-HRP Inmun-Blot Assay Kit), con ligeras modificaciones (**Casanova *et al.*, 1989; Towbin *et al.*, 1979; Burnette, 1981**). La membrana con los polipéptidos transferidos se incubó durante 1 hora a temperatura ambiente en una solución de bloqueo. A continuación la membrana se incubó durante toda la noche con el anticuerpo anti-HPB a una dilución 1:500, en tampón TBS conteniendo 0.05% de Tween-20 y BSA al 1%. Posteriormente, se procedió a efectuar 4 lavados de 10 min. cada uno con tampón TTBS. Seguidamente, se incubó en una solución de anti-inmunoglobulinas de conejo

acopladas a peroxidasa (Bio-Rad), a una dilución 1:2000 en el tampón TTBSB. Tras eliminar el exceso del segundo reactivo mediante cuatro lavados sucesivos con TTBS, la unión de los anticuerpos a sus correspondientes antígenos se reveló mediante la incubación con una mezcla de 60 mg de 4-cloro-1-naftol y 60 µl de peróxido de hidrógeno (30 volúmenes) en 100 ml de TBS. El 4-cloro-1-naftol es totalmente insoluble en agua, por lo que previamente a su incorporación a la mezcla de revelado se solubilizó con 20 ml de metanol frío (mantenido a 4°C). El desarrollo de la reacción coloreada que tiene lugar, se detuvo al alcanzarse la intensidad adecuada mediante lavados con agua destilada.

- ✓ **Solución de bloqueo:** BSA al 3% en tampón Tris/HCl 10 mM pH 7.2 con NaCl al 0.9% (tampón TBS).
- ✓ **TTBSB:** TTBS+1% BSA (albúmina de suero bovino).

32. Marcaje radiactivo de péptidos con [S^{35}] cisteína.

Para el marcaje radiactivo de péptidos se llevó a cabo un protocolo similar al descrito por **McCabe and Van Alfen (1999)** con ligeras modificaciones. Se partió de un cultivo de *C. albicans* SC5314 en medio líquido de Lee (**Lee et al., 1975**) crecido durante 16 horas a 28°C y con agitación constante. Posteriormente se procedió a la inoculación de un número controlado de células levaduriformes en un medio fresco de Lee suplementado con 0.3 µCi de L- $[^{35}S]$ Cisteína (actividad específica, 500 µCi [18.5 MBq]) a una D.O.₆₀₀ 0.8 y se dejó crecer durante 6 horas a 28 y 37 °C hasta alcanzar la fase estacionaria de crecimiento de las levaduras (D.O.₆₀₀ 2). Se procedió del mismo modo para la obtención de micelio a 37°C partiendo de una D.O.₆₀₀ 0.2. A continuación las células fueron recogidas por centrifugación en alícuotas de 1ml y lavadas dos veces con 1 ml de PBS adicionado de azida 1 mM. Seguidamente se realizaron los tratamientos químicos y enzimáticos descritos anteriormente sobre las células para la solubilización de hidrofobinas (ver apartado 26 de Materiales y Métodos). Finalmente se centrifugó y se recogieron los distintos extractos.

Alícuotas de 10-100 μ l de las muestras líquidas fueron adsorbidas sobre filtros de fibra de vidrio (Schleicher & Schüell, No 8). Los filtros se secaron en estufa y posteriormente se colocaron en viales a los que se adicionó 3 ml de líquido de centelleo (Econofluor 2, Du Pont). En otros experimentos, las muestras fueron previamente tratadas con un volumen igual de ácido tricloroacético (TCA) al 10% durante 10-12 horas a 0-4°C. Seguidamente, el material precipitado en cada caso por la acción de TCA se recogió sobre filtros de fibra de vidrio, que se lavaron a continuación con unos 20 ml de TCA al 5% a 0-4°C. Por último, los filtros se secaron en estufa y se colocaron en viales tal y como se comentó anteriormente. La radiactividad se determinó en un contador de centelleo líquido Wallac 1410 de Pharmacia.

33. Determinación de la concentración proteica.

Las distintas muestras fueron tratadas con NaOH 1M a temperatura ambiente durante 12-24 h antes de proceder a efectuar la valoración, siguiendo el método descrito por **Lowry *et al.* (1951)**. A 1 ml de muestra problema se le añadieron 3 ml de solución alcalina de cobre (98 ml de Na₂CO₃ al 2% en NaOH 0.1M y 1 ml de CuSO₄ al 1% en agua destilada más 1 ml de tartrato sódico-potásico al 2% en agua). La mezcla se agitó y se dejó reposar 10 min. a temperatura ambiente y se adicionaron 0.5 ml del reactivo de Folin-Ciocalteu diluido 1:1 en agua destilada durante 20 min. y el color desarrollado fue leído a 750 nm en un espectrofotómetro Shimatzu, comparándolo con una escala patrón obtenida con distintas concentraciones de albúmina de suero bovino (desde 10 a 100 μ g).

34. Determinación de la concentración de azúcares.

Se utilizó la técnica descrita por **Dubois *et al.* (1956)**. A 2 ml de la solución problema conteniendo entre 10 y 80 μ g de aldosa, se le añadieron 50 μ l de una solución de fenol al 80% y a continuación, se adicionaron 5 ml de ácido sulfúrico concentrado

(95.5%). La mezcla se agitó y luego se dejó reposar 10 min. a temperatura ambiente, pasándose a un baño de agua a 25°C durante 20 min. El color desarrollado fue determinado a 490 nm en un colorímetro Spectronic, y se comparó con una curva patrón hecha con distintas concentraciones de glucosa (desde 10 a 20 µg).

35. Inducción a la expresión de la proteína. Determinación de la solubilidad.

La cepa *E. coli* JM109 transformada en el plásmido pXBP se incubó en LB ampicilina durante 16 horas, a 37°C bajo agitación constante siguiendo el protocolo descrito por **Glover and Hames (1995)** con ligeras modificaciones. Tras este tiempo se diluyó el cultivo 1:10 en LB ampicilina precalentada a 37°C y se creció a esa temperatura, hasta que la densidad óptica a 600 nm se situó entre 0.4 y 0.6. En ese momento se recogió una muestra a tiempo cero que sirvió como control negativo. Posteriormente se indujo la expresión de la proteína de fusión con IPTG a concentraciones distintas (de 1 a 4 mM) y se continuó la incubación por un período máximo de 48 horas, recogiendo alícuotas a diferentes tiempos (entre 15 min. y 48 horas).

Las células se lisaron mediante dos mecanismos distintos para poder determinar la solubilidad de la proteína expresada en el vector pXBP:

- En primer lugar, células de alícuotas de 1ml, recogidas en tubo Eppendorf por centrifugación (15.000 rpm, 20 seg.) se lisaron mediante la adición de 150 µl de tampón de electroforesis.

- En segundo lugar, células de alícuotas de 1 ml, recogidas de la misma forma, se lisaron mediante la adición de 150 µl de tampón de lisis. Posteriormente se incubó durante 15 min. a 30°C y se procedió a sonicar 4 veces en un ultrasonic processor de Sonics Vibracell™ modelo VC130 PB con una potencia de 130 W y una frecuencia de 20 KHZ, durante 10 seg. cada vez a 4 °C con intervalos de descanso de varios segundos

entre muestra y muestra. Para cerciorar la rotura de las células, éstas fueron observadas varias veces microscópicamente. Posteriormente las muestras se centrifugaron durante 2 min. a 15.000 rpm y se recogió el sobrenadante en tubos nuevos conteniendo un volumen igual a 150 µl de tampón de electroforesis, considerando estas muestras como el **extracto soluble**. El pellet de cada una de estas muestras sonicadas también se resuspendió en 150 µl de tampón de electroforesis, considerándolas como el **extracto insoluble** de la proteína.

Finalmente todas las muestras se calentaron a 100°C durante 5 min. y se analizaron en alícuotas de 10 µl mediante electroforesis en geles SDS-PAGE.

La ausencia de proteína inducida en la fracción soluble es un indicador fiable de insolubilidad.

- ✓ **Tampón de electroforesis:** 35 % (v/v) de glicerol, 7% (p/v) de SDS, 0.035% (p/v) de azul de bromofenol y 14% (v/v) de β-mercaptoetanol en tampón Tris/HCl 0.5 M, pH 6.8.
- ✓ **Tampón de lisis:** 50 mM Tris-HCl pH 8.0, 2 mM EDTA y 100 µ/ml de lisozima añadida en el momento del uso.

36. Cuantificación de la síntesis de proteínas específicas por inmunoprecipitación.

De cada muestra procedente de los extractos radiactivos de levadura a 28 y 37°C, y micelio a 37°C se inmunoprecipitó un volumen que contenía aproximadamente entre 200.000 y 600.000 cpm (ver tabla II.6.). Para ello, en cada tubo se depositó secuencialmente el volumen de muestra radiactiva determinado previamente, 10 µl de solución de inhibidores de proteasas (Sigma), 800 µl de tampón TNET y 30 µl del PAb anti-CaHpbp incubando la mezcla resultante con agitación suave durante 4 horas a temperatura ambiente en un agitador rotatorio Heidolph Reax2.

Tras una breve centrifugación para recoger cualquier pequeño volumen de la mezcla que estuviese adherido a las paredes del tubo, se añadieron 70 μ l de la suspensión de Sepharosa-Proteína A (Sigma), incubando seguidamente a temperatura ambiente durante 1 hora con una agitación suave. Posteriormente se centrifugaron los viales durante 5 min. a 10.000 rpm a 4°C. Con una pipeta automática se recuperó el sobrenadante el cual se desechó.

Con el propósito de eliminar las proteínas no inmunoprecipitadas, a cada vial se le añadió 1 ml de tampón TNET, agitando seguidamente de forma vigorosa en un vórtex y centrifugando a continuación durante 5 min. a 10.000 rpm a 4°C. Tras descartar el sobrenadante resultante, se repitió éste último paso. Posteriormente se realizaron dos lavados más con tampón fosfato, descartándose los sobrenadantes resultantes.

Para disociar la proteína hidrofobina inducible (CaHpbp) del complejo antígeno-anticuerpo, los viales se centrifugaron brevemente, se añadió a cada uno de ellos 40 μ l de tampón de muestra para SDS-PAGE y se hirvieron durante 5 min. Tras centrifugar, el sobrenadante que contenía el complejo entre la proteína específica radiactiva y el anticuerpo, se analizó mediante SDS-PAGE y posterior fluorografía.

- ✓ **Tampón TNET:** 140 mM NaCl, 20 mM Tris, 5mM Na₂EDTA, 2 mM Cisteína, 1% Tritón X-100, 0.02% NaN₃.
- ✓ **Tampón Fosfato:** 50 mM NaH₂PO₄.H₂O, ajustar a pH 7.5 con NaOH.

Cantidad de muestra (μ l)	200.000 cpm	400.000 cpm	600.000 cpm
Micelio a 37°C	17	34	50
Levadura a 37°C	15	30	44
Levadura a 28°C	16	32	47

Tabla II.6. Cantidad de muestra radiactiva utilizada para la inmunoprecipitación.

III. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

“El genio consiste en un uno por ciento de inspiración y en un noventa y nueve por ciento de sudor”

Thomas Edison

1. Aislamiento, clonación y caracterización de un clon de cDNA de *C. albicans* que codifica para un péptido inmunorreactivo con el anticuerpo mPAb.

La identificación y caracterización de nuevos genes en *C. albicans* se ha conseguido mayoritariamente por complementación con el hongo modelo *S. cerevisiae*, y más recientemente, gracias a la disponibilidad de las bases de datos, a través de la búsqueda de genes homólogos o conocidos en este organismo. Sin embargo, a la hora de identificar nuevos genes implicados en procesos morfogénicos y factores de virulencia en *C. albicans*, es necesario utilizar técnicas diferentes a la complementación. La aplicación de técnicas de expresión diferencial ha permitido la identificación de genes específicos de la forma micelial de *C. albicans*, que codifican para proteínas de pared celular o proteínas secretadas como *ECE1*, *HYR1* o la familia *ALS1-ALS8* (Brown, 2002 b). El uso de librerías de expresión obtenidas a partir de la inducción de la expresión de genes de *C. albicans* en determinadas condiciones, permite la identificación de nuevos genes mediante el uso de anticuerpos específicos, sueros o sondas (Cervera *et al.*, 1998; Maneu *et al.*, 1996; Sentandreu *et al.*, 1995). Sin embargo, el inmunorrastreo de genotecas de expresión no siempre lleva a la identificación de genes específicos relacionados con los procedimientos de identificación. En algunos inmunorrastreros realizados con anticuerpos específicos de la forma micelial se han aislado genes expresados en blastosporas y micelios (Swoboda *et al.*, 1993), y en otros casos el uso de anticuerpos obtenidos frente a paredes celulares ha dado lugar al aislamiento de proteínas citosólicas (Eroles *et al.*, 1995, 1997).

1.1. Inmunorrastreo de una genoteca de cDNA con el anticuerpo policlonal mPAb.

La genoteca de cDNA empleada en este trabajo se preparó a partir de mRNA obtenido de células de *C. albicans* ATCC26555 después de inducir durante 30 minutos la formación de tubos germinativos por choque térmico de células sometidas a ayuno metabólico según el método descrito por Casanova *et al.* (1989).

En el inmunorrastreo se analizaron unos 100.000 clones de cDNA según el método descrito en el apartado 20 de Materiales y Métodos, identificándose 11 clones que reaccionaron con el anticuerpo policlonal específico de micelio. Dicho anticuerpo fue obtenido inoculando a conejos paredes purificadas de la forma micelial. El suero obtenido fue adsorbido a blastosporas enteras muertas para eliminar anticuerpos que fueran comunes a la forma levaduriforme (Casanova *et al.*, 1989). Como se puede observar en la Fig. III.1, mediante inmunofluorescencia y western blot el anticuerpo policlonal mPAb reconoce preferentemente especies moleculares que se localizan en la superficie de los micelios.

En una segunda vuelta se confirmó la reactividad de los clones aislados utilizando títulos más bajos (30-50 ufc/placa). El DNA de los 11 clones recombinantes inmunorreactivos se amplificó con los cebadores universales forward y reverse del fago λ gt11, los cuales se detallan en la tabla II.3 de Materiales y Métodos, por técnicas estándar de PCR (apartado 3 de Materiales y Métodos). Los fragmentos amplificados se separaron electroforéticamente en un gel de agarosa al 0.8%. Los resultados obtenidos se muestran en la Fig. III.2. De todos los aislados sólo el clon 7 presentó dos productos de amplificación, uno de 800 pb y otro de 200 pb, escogiéndose el fragmento de 800 pb por ser el de mayor tamaño.

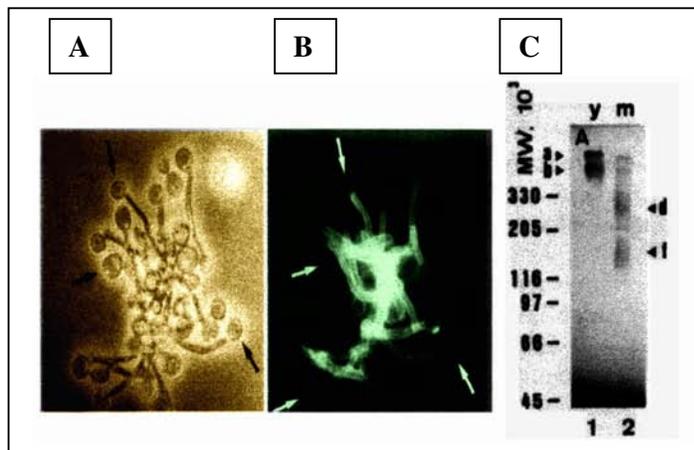


Fig. III.1. Observación bajo contraste de fases (A) y microscopía de fluorescencia (B) de células de *Candida albicans* teñidas con el anticuerpo policlonal específico mPab y detección mediante inmunotransferencia (C) de especies moleculares extraídas de la pared celular de la

forma levaduriforme (y) y micelial (m) con el anticuerpo policlonal. En la calle 2 destacan con las letras d y f, las especies reconocidas por el anticuerpo que son específicas de micelio. A la izquierda se detallan los pesos moleculares (10^3) de las proteínas estándar.

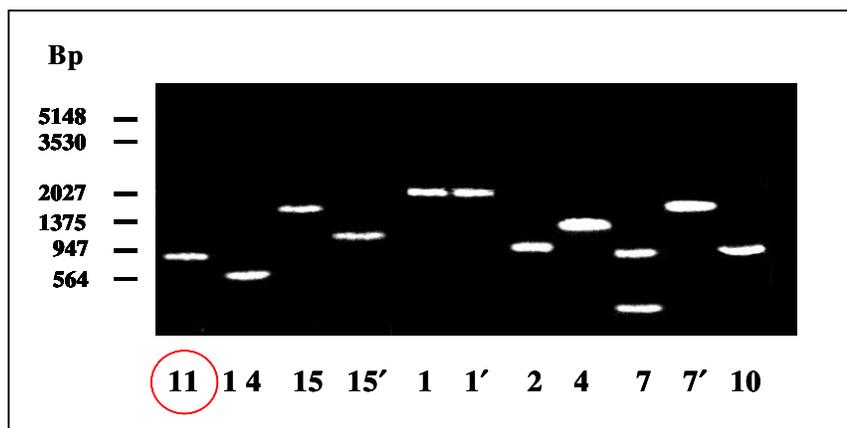


Fig. III.2. Amplificación por PCR de los insertos de los clones recombinantes inmunorreactivos frente al anticuerpo mPab. En la parte inferior se muestra el número de identificación dado a cada clon aislado y con un círculo rojo se señala el clon 11 elegido para realizar el presente trabajo. En la parte izquierda se muestran los marcadores de peso molecular que corresponden al fago λ digerido con los enzimas de restricción *Eco* RI y *Hind* III.

1.2. Análisis de los clones recombinantes.

Los amplificados de los cDNAs de los 11 clones aislados se secuenciaron utilizando los cebadores universales forward y reverse del fago λ gt11. Las secuencias resultantes fueron analizadas en las bases de datos del proyecto de secuenciación del genoma de *C. albicans* utilizando los programas BLASTN y TBLAST, enfrentando las secuencias resultantes de los cDNAs amplificados con las de las bases de datos utilizando para las homologías <http://alces.med.umn.edu/gbsearch/ybc.html>, y para los contigs <http://candida.stanford.edu/bncontigs.html>. En la tabla III.1. se reflejan los resultados de dichas búsquedas.

Los clones 1 y 1', 10 y 14, y 7' y 15 resultaron ser idénticos entre sí. De los ocho clones inmunorreactivos seleccionados, la búsqueda dió como resultado 5 genes caracterizados previamente y 3 nuevos genes no caracterizados. El fragmento analizado del clon 11 contenía una pauta abierta de lectura incompleta que presentaba una identidad del 99% con el contig 4-2948 (posteriormente contig 6-2476). El resultado de la secuenciación de dicho clon se muestra en la Fig. III.3. Este clon fue seleccionado para su posterior estudio por presentar las siguientes características:

1) El clon 11 (que contenía un inserto de 723 pb), mostró una similitud con una secuencia de la base de datos del servidor <http://alces.med.umn.edu/gbsearch/ybc.html>, (la secuencia 385081H10.X1) de la cual se desconoce su función en *C. albicans* pero que a su vez presenta homología con el antígeno 2 de la superficie celular de *Coccidioides immitis* (Dugger *et al.*, 1996; Jiang *et al.*, 1999). Dicho antígeno induce la respuesta inmune celular dependiente de linfocitos T y está siendo estudiado para su posible utilización en el diseño de métodos para el inmunodiagnóstico de la coccidioidiomycosis y para la obtención de vacunas contra el hongo causante de la misma (Yang *et al.*, 1997; Zhu *et al.*, 1996). Por lo tanto, dicho antígeno podría tener un interés y uso similar en *C. albicans* al que se le está dando en *C. immitis*.

2) Por otra parte, la búsqueda de similitudes del clon 11 en la base de datos del proyecto de secuenciación de *C. albicans* de la Universidad de Stanford, reveló que dicha secuencia presentaba un ORF (Open Reading Frame o Marco abierto de lectura) contenido en el contig 4-2948 que codificaba para una proteína de 250 aminoácidos.

El contig 4-2948 (ahora 6-2476) está constituido por 18.650 pb de las que tomamos 750 pb que contenían el ORF y aproximadamente unas 725 pb más de los flancos 5' y 3' (Fig. III.4).

CLON	TAMAÑO INSERTO	SECUENCIA HOMÓLOGA	POSIBLE ASIGNACIÓN	CONTIG
Clon1	1.8 Kb	384037G10.S1.Seq	Ninguna	4-3030
Clon 1'	1.8 Kb	384037G10.S.1.Seq	Ninguna	4-3030
Clon 2	950 pb	385020H07.x1.Seq	<i>NAG 1 (G6PDH)</i>	4-2984
Clon 4	1.2 Kb	396005H10.S1.Seq	Ninguna	4-3095
Clon 7	800 pb	396058C08.S1.Seq	<i>PFK1</i>	5-3141
Clon 7'	1.5 Kb	YSAENO1A	<i>ENO1</i>	5-2440
Clon 10	900 pb	AF149421	<i>TSA1</i>	5-3237
Clon 11	723 pb	38501H10.X1.Seq	<i>Ag2 Coccidioides immitis</i>	4-2948
Clon 14	550 pb		Idéntico clon 10	
Clon 15	1.5 Kb		Idéntico clon 7'	
Clon 15'	1 Kb	384024A12.S1.Seq	<i>THI5</i>	5-3546

Tabla III.1. Características de los clones aislados tras su secuenciación y consulta en las bases de datos.

Reverse λ gt11:

5' GTTTCCATTGCTTTAGCTGCTACGAGTGCCACTTCAGACGGTACAAACGCATATACTGCTTACC
 CCAAGTGTTGCTAAAACATGCATCCATAAACGGTTTCGCTGACAAAATCTACGACCAATTGCCA
 GAATGTGCCAAAGAATGTGTCAAGCAAAGTACTAGTAACACCCCATGTCCATACTGGGATACTG
 GTTGTGTTGTGTGTCATGCCTCAATTTGGTGGTGCTATTGGTGACTGTGTTGCTAAAACTGTAA
 GGGAAAAGAAGTTGATTCTGTTGAATCTTTGGCCACTTCCATTTGTTTCATCTGCCGGTGTCCGG
 GAACCATACTGGATGATCCCATCAAGTGTCTGATGCTTTGGCTAAGGCTGCAAATGCTGCAT
 CTGCAACAACCTTCAGTTGAAACAGCCACCAAATCTGCGGCTGCTGAGCTTGCCACTACCTCCGA
 CACCATTATTGTTGCATCTACTTCCCATGAAAGCAAAGTAGCTGAAACATCTGTTGCACAACAA
 CTGCTTCAACTGAGAAGTCCCTCCGCAGCAGAACTTCCAGAGCTAAAGAGACGTCAAAGGCTGA
 AGAATCCTCTAAAGCTGAAGAACTTCTGTTGCTCAATCTTCTTCTTCTGCTAATGTTGCTTCC
 GTGTCTGCTGAAACAGCCAACGCTGGTAACATGCCAGTTATTGCTATTGGTGGTGTATTGCCG
 CATTTGCTGCCTTAATCTAA 3'

Fig. III.3. Resultado de la secuenciación del clon 11 que contenía nuestro inserto de 723 pb utilizando los cebadores universales del fago λ gt11.

5'

1 AAGTGTA AAAA TAGTAGTGGTGT CAGTTTTGTTAAT **CACGTGAACATCA**
51 **CGTGCCTA**GTTTTAAGACTGGCCAGTTTTATAGATTATTAATAAATGTTT
101 ATACGGAATAAGACTGTGCAATCTTGGTTTGGTGAGTGGAATGACCATA
151 ATTATGCAATTGTGTTTTTGGCTTTCGGTATGTATGGTTGTATT CAGTTTA
201 GGATTGAATGATTCAAAGTTGTTAAAGAATTTTACCCAAAATTTAACA
251 AAATATTTAATCTTTAGACACACATTGTTTCGTTAAGATAACCTTGGTCTT
301 GTTTCCCTACCAA AACTACTCTCCATTGCCAATAAATATGATACAACTT
351 ATTCTCGCAATCTCGCTTAAAATCCGAACATTAATTACTATTGGATT CGC
401 GGGTACGAGAACTACAGATTTCTTAATAAAGTGGTACGATTTATGCTAT
451 CCATCTCGAATAAATGCTTGTTCATCTTTATGTTTGTGCTGCACAAA
501 TGTGTTTTATTTTTCCATCTATTAAAGTCAAATCTGCATCTGCATTATTA
551 TACACACTGTTCGAATTGAACAACAGTCATTTTATTTCA TTTTCTTCTCG
601 TATTCTCTATCCGAGAATCAACATCTGATGTCAAATACCTTTTATTTAGA
651 GATTATAAATATGTCACATTTGGATTGCCTTTTTTGGTTCAAATGATTTT
701 CTTCAAGTCAAATCCGCTAAAAG**ATGATGTCTTTTTCTTTATTATCAATA**
751 GTTTCCATTGCTTTAGCTGCTACCGTGAGTGCCACTTCAGACGGTACAAA
801 CGCATATACTGCTTACCAAGTGTGCTAAAAC TGCATCCATAAACGGTT
851 TCGCTGACAAAATCTACGACCAATGCCAGAATGTGCCAAAGAATGTGTC
901 AAGCAAAGTACTAGTAACACCCCATGTCCATACTGGGATACTGGTTGTTT
951 GTGTGTCATGCCTCAATTTGGTGGT GCTATTGGTGACTGTGTTGCTAAAA
1001 ACTGTAAGGAAAAGAAGTTGATTCTGTTGAATCTTTGGCCACTTCCATT
1051 TGTTCACTGCCGGTGTGCGGGAACCATACTGGATGATCCCATCAAGTGT
1101 TTCTGATGCTTTGGCTAAGGCTGCAAATGCTGCATCTGCAACAACTTCAG
1151 TTGAAACAGCCACCAAATCTGCGGCTGCTGAGCTTGCCACTACCTCCGAC
1201 ACCACTATTGTTGCATCTACTTCCCATGAAAGCAAAGTAGCTGAAACATC
1251 TGTTGCACAACA ACTGTTCAACTGAGAAGTCCTCCGCAGCAGAACTTC
1301 CAGAGCTAAAGAGACGTCAAAGGCTGAAGAATCCTCTAAAGCTGAAGAAA
1351 CTTCTGTTGCTCAATCTTCTTCTTCTGCTAATGTTGCTTCCGTGTCTGCT
1401 GAAACAGCCAACGCTGGTAACATGCCAGTTATTGCTATTGGTGGTGTAT
1451 TGCCGCATTTGCTGCCTTAATC**TA**GTTGAA TTATAATATGTA CTATTGC

```

1501 TAATGTATAATTAATATATGTTCTACTGTTAATAGGTGATACCAATAGTA
1551 AGGGTTCAAAGTATATATCCCTAATAAGAATGGAGAGCAACGTGCAGGA
1601 GTTCCCAAACATTTAAAGAGTTGGCGCCATTTGGTCTCGTCACATTAGCA
1651 TGC GTTTACTACTGGTTGACTGTGAGACTATAATGGTCATGGGCTGTTTT
1701 TAAAGTGGCTATACTCTAAGCTATTATAGTATTCCTTATGCCTTTTACTG
1751 AATAGATTATTTCTTATAAGTTTGTCCCTTTTACTATCAATTACAGCAACA
1801 GTTGTGTTATCCAATGTTTTTCATATTTGGTTTTTCATTAAATGATGAGAT
1851 TTTTCTTTTTTTATTTTTTTGCCGCTGATGTATTGCTAAGCCCAACTGTG
1901 GCGTATTAGCGATGACAGGAAAACGCATTGACAAGATTGACTTTTTTCTT
1951 GCCGTGTGATCTGCAACCATTGTTTTAATAATTAATTAATTTTCATACAC
2001 ATTCCATTCTCATCGAGGGTTTGTACCAATATTGACATGTTGTACTGTAT
2051 CCATGTAAGAATTCTGTTGAGTTGAATATATGGAATTACATTAGAGTATC
2101 TGCCATATCCAAAAGCCCCTACTTCCTTTGTTTCTTGGCGAATATTATTT
2151 TATGTCAATTTTGTCTTGGCAGTCGTATATTTT TAGAGGATCCACCTTG

```

3'

Fig. III.4. Contig 4-2948. Detalle de la secuencia nucleotídica a clonar proveniente del contig 4-2948 (ahora 6-2476). La secuencia se muestra en la forma reverse complementaria, puesto que es la forma que contiene el Marco Abierto de Lectura u ORF (Open Reading Frame). La Metionina o codón de inicio, ATG, se encuentra en la posición 724 (marcado en rojo), el codón de parada (STOP), TAA se sitúa en la posición 1473 (marcado en verde) del contig, por lo que el gen codifica para una proteína de 250 aminoácidos. Además, se eligieron 665 pb por encima del codón de inicio, que constituyen la región promotora del gen, y 695 pb por debajo del codón de terminación. También se indica la posición en el contig de la secuencia reverse contenida en el inserto del fago λ en color azul. Además, se ha marcado la posición de los cebadores (cada pareja con el mismo color) utilizados; El cebador F11-A (posición 2171-2198) específico de la secuencia, en color rosa y el cebador R11-A (posición 38-58), ambos se utilizaron para facilitar la clonación en un vector pUC18. En la posición 1461-1481, se diseñó un cebador forward 11-cod (en color amarillo) y en la posición 727-747 un cebador reverse 11-cod, los cuales fueron utilizados para la clonación de la secuencia codificante en un vector de expresión pGEX 4T-3, subrayada y en formato negrita.

1.3. Clonación del gen completo contenido en el contig 4-2948.

Con objeto de clonar el gen identificado y valiéndonos de la secuencia contenida en el contig 4-2948 se diseñaron dos cebadores que permitieran amplificar el Marco Abierto de Lectura (ORF) flanqueado por 665 pb de la región promotora y 695 pb de la región terminadora. Los cebadores F11-A y R11-A (tabla II.3 de Materiales y Métodos) fueron diseñados incluyendo las dianas de restricción adecuadas (*Bam* HI y *Hind* III) para el posterior subclonaje en pUC18. La estrategia de clonación viene representada en la Fig. III.5.

Los cebadores, que aparecen en color fucsia en la secuencia del contig 4-2948, se utilizaron para amplificar DNA genómico de la cepa de *Candida albicans* CAI-4 por reacción en cadena de la polimerasa (PCR) descrita en el apartado 6 de Materiales y Métodos. Los amplificados resultantes fueron eluidos de un gel de agarosa (apartado 8 de Materiales y Métodos) y tratados, al igual que el vector pUC18, con las enzimas de restricción *Bam* HI y *Hind* III.

Las reacciones de ligación (apartado 11 de Materiales y Métodos) se realizaron en las proporciones vector inserto 1/5 a 14 °C durante toda la noche y se transformaron en células competentes de *E. coli* JM109 (apartado 12 de Materiales y Métodos). Los transformantes fueron purificados y posteriormente se trataron con las enzimas de restricción adecuadas. El resultado se muestra en la Fig. III.6.

De entre los transformantes positivos, se escogió uno al que se le denominó pUBP. La nueva construcción (Fig. III.6) se analizó por PCR con cebadores contenidos en la secuencia, se realizó un mapa de restricción con diferentes enzimas y se secuenció, comprobándose que la secuencia contenida en pUBP correspondía con la del contig 4-2948 (Fig. III.7).

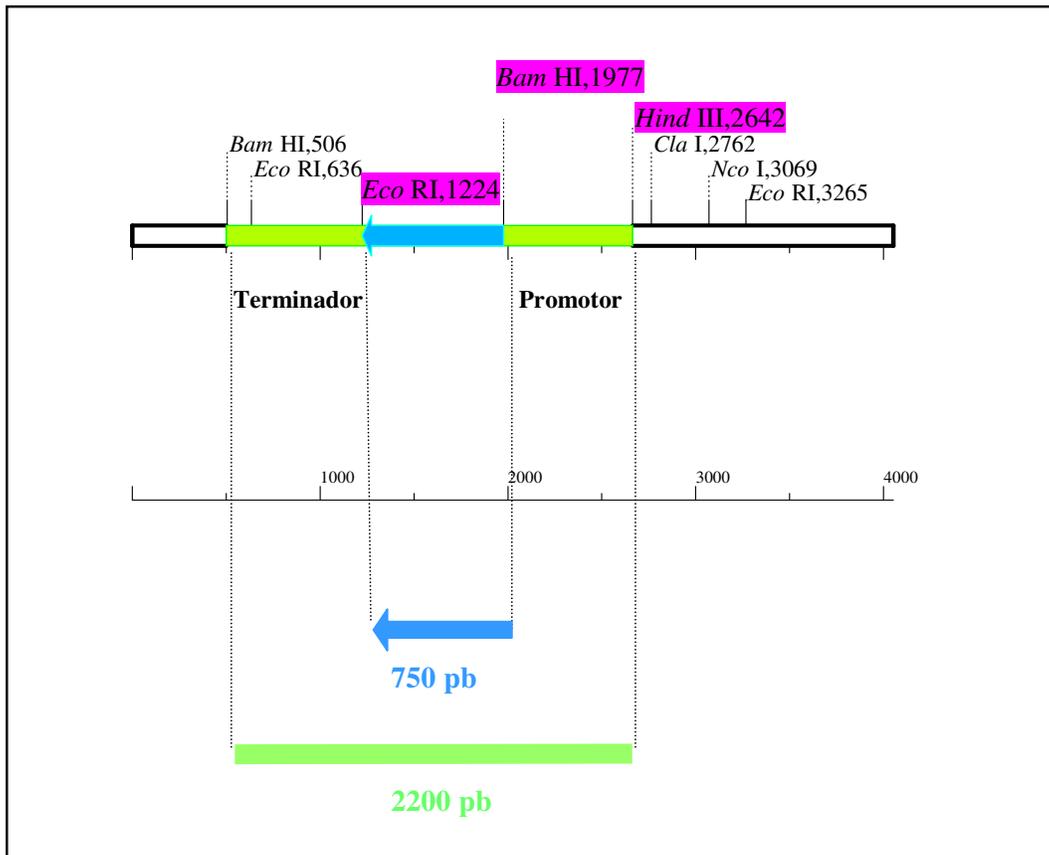


Fig. III.5. Diagrama del contig 4-2948 que muestra la localización y orientación del gen, la zona promotora y la terminadora. En verde se ha marcado la región de 2,2 Kb clonada en el pUC18 para obtener el pUBP, y en azul se ha marcado la secuencia que codifica la proteína en estudio de 750 pb. Las enzimas de restricción marcadas en color negro corresponden con las enzimas propias del contig 4-2948; las enzimas en color fucsia son las diseñadas en el trabajo para subclonar el gen, en pUC18 y en pGEX 4T-3.

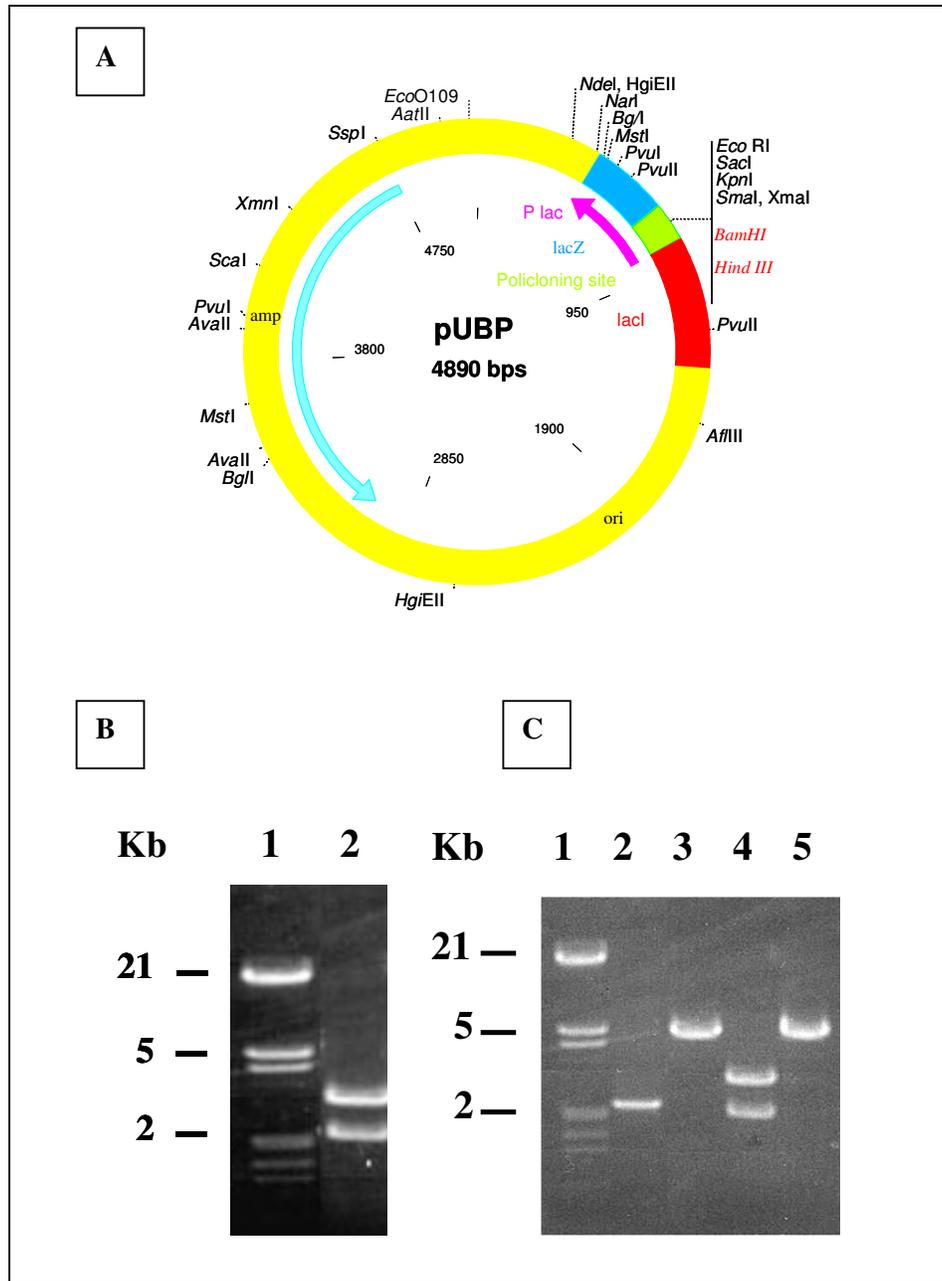


Fig. III.6. Construcción del plásmido pUBP. (A) Representación esquemática del vector pUBP resultante de la clonación del fragmento de 2,2 Kb. En el sitio de clonaje múltiple se encuentran los sitios de restricción *Bam* HI y *Hind* III (en color rojo) en los que se ha introducido el clon 11. (B) Comprobación del transformante escogido para el presente trabajo, pUBP. Se realizó la purificación del transformante por el método de minilisis alcalina y se digirió con *Bam* HI y *Hind* III, posteriormente se separó en un gel de agarosa al 0,8%. La calle 1 muestra

los estándares de peso molecular y en la calle 2 aparecen dos bandas, una de 2,69 Kb que corresponde al vector pUC18 y otra de 2,2 Kb que corresponde al amplificado. (C) Comprobación del pUBP mediante digestiones con diferentes enzimas. La calle 1 muestra los estándares de pesos moleculares y en la calle 2 se puso un amplificado de 2,2 Kb de DNA genómico correspondiente al gen que sirvió como control positivo. El pUBP fue digerido con *Bam* HI, *Bam* HI-*Hind* III y *Hind* III (calles 3, 4 y 5 respectivamente).

```

38  Hind III GCGC AAGCTT CACGTGAACATCA
51  CGTGCCTAGTTTTAAGACTGGCCAGTTTTATAGATTATTAATAAATGTTT
101 ATACGGAATAAGACTGTGCAATCTTGGTTTGGTGAGTGAAATGACCATA
151 ATTATGCAATTGTGTTTTTGGCTTTCGGTATGTATGGTTGTATTCAGTTTA
201 GGATTGAATGATTCAAAAGTTGTTAAAGAATTTTACCCAAAATTTAACAA
251 AAATATTTAATCTTTAGACACACATTGTTTCGTTAAGATAACCTTGGTCTT
301 GTTTCCCTACCAAACTACTCTCCATTGCCAATAAATATGATACAACTT
351 ATTCTCGCAATCTCGCTTAAAATCCGAACATTAATTACTATTGGATTTCGC
401 GGGTACGAGAACTACAGATTTCTTAATAAAGTGGTACGATTTATGCTAT
451 CCATCTCGAATAAATGCTTGTTCATCTTTATGTTTGTGCTGCACAAA
501 TGTGTTTTATTTTTCCATCTATTAAAGTCAAATCTGCATCTGCATTATTA
551 TACACACTGTTCGAATTGAACAACAGTCATTTTATTTTCAATTTCTTCTCG
601 TATTCTCTATCCGAGAATCAACATCTGATGTCAAATACCTTTTATTTAGA
651 GATTATAAATATGTCACATTTGGATTGCCTTTTTTGGTTCAAATGATTTT
701 CTTCAAGTCAAATCCGCTAAAAG

```

⇒

```

724 ATG ATG TCT TTT TCT TTA TTA TCA ATA GTT TCC ATT GCT
  1  M M S F S L L S I V S I A
763 TTA GCT GCT ACC GTG AGT GCC ACT TCA GAC GGT ACA AAC
 14  L A A T V S A T S D G T N
802 GCA TAT ACT GCT TAC CCA AGT GTT GCT AAA ACT GCA TCC
 27  A Y T A Y P S V A K T A S
841 ATA AAC GGT TTC GCT GAC AAA ATC TAC GAC CAA TTG CCA
 40  I N G F A D K I Y D Q L P

```

880 GAA TGT GCC AAA GAA TGT GTC AAG CAA AGT ACT AGT AAC
53 E C A K E C V K Q S T S N
 919 ACC CCA TGT CCA TAC TGG GAT ACT GGT TGT TTG TGT GTC
66 T P C P Y W D T G C L C V
 958 ATG CCT CAA TTT GGT GGT GCT ATT GGT GAC TGT GTT GCT
79 M P Q F G G A I G D C V A
 997 AAA AAC TGT AAG GGA AAA GAA GTT GAT TCT GTT GAA TCT
92 K N C K G K E V D S V E S
 1036 TTG GCC ACT TCC ATT TGT TCA TCT GCC GGT GTC GGG GAA
105 L A T S I C S S A G V G E
 1075 CCA TAC TGG ATG ATC CCA TCA AGT GTT TCT GAT GCT TTG
118 P Y W M I P S S V S D A L
 1114 GCT AAG GCT GCA AAT GCT GCA TCT GCA ACA ACT TCA GTT
131 A K A A N A A S A T T S V
 1153 GAA ACA GCC ACC AAA TCT GCG GCT GCT GAG CTT GCC ACT
144 E T A T K S A A A E L A T
 1192 ACC TCC GAC ACC ACT ATT GTT GCA TCT ACT TCC CAT GAA
157 T S D T T I V A S T S H E
 1231 AGC AAA GTA GCT GAA ACA TCT GTT GCA CAA CAA ACT GCT
170 S K V A E T S V A Q Q T A
 1270 TCA ACT GAG AAG TCC TCC GCA GCA GAA ACT TCC AGA GCT
183 S T E K S S A A E T S R A
 1309 AAA GAG ACG TCA AAG GCT GAA GAA TCC TCT AAA GCT GAA
196 K E T S K A E E S S K A E
 1348 GAA ACT TCT GTT GCT CAA TCT TCT TCT TCT GCT AAT GTT
209 E T S V A Q S S S S A N V
 1387 GCT TCC GTG TCT GCT GAA ACA GCC AAC GCT GGT AAC ATG
222 A S V S A E T A N A G N M
 1426 CCA GTT ATT GCT ATT GGT GGT GTT ATT GCC GCA TTT GCT
235 P V I A I G G V I A A F A
 1465 GCC TTA ATC **TAA** GTTGAATTATAATATGACTATTG
248 A L I *

```

1551   CTAATGTATAATTAATATATGTTCTACTGTTAATAGGTGATACCAATAGT
1601   AAGGGTTCAAAGTATATATCCCTAATAAGAATGGAGAGCAACGTGCAGG
1651   AGTTCCCAAACATTTAAAGAGTTGGCGCCATTTGGTCTCGTCACATTAGC
1701   ATGCGTTTACTACTGGTTGACTGTGAGACTATAATGGTCATGGGCTGTTT
1751   TTAAAGTGGCTATACTCTAAGCTATTATAGTATTCCTTATGCCTTTTACT
1801   GAATAGATTATTTCTTATAAGTTTGTCCCTTTACTATCAATTACAGCAAC
1851   AGTTGTGTTATCCAATGTTTTTCATATTTGGTTTTTCATTAAATGATGAGA
1901   TTTTTCTTTTTTTATTTTTTTGCCGCTGATGTATTGCTAAGCCCAACTGT
1951   GGCATATTAGCGATGACAGGAAAACGCATTGACAAGATTGACTTTTTTCT
2001   TGCCGTGTGATCTGCAACCATTGTTTTAATAATTAATTAATTTTCATACA
2051   CATTCCATTCTCATCGAGGGTTGTACCAATATTGACATGTTGTACTGTA
2101   TCCATGTAAGAATTCTGTTGAGTTGAATATATGGAATTACATTAGAGTAT
2151   CTGCCATATCCAAAAGCCCCTACTTCCTTTGTTTCTTGCGAATATTATT
2201   TTATGTCAATTTTGTCTTGGCAGTCGTATATTTTTAGAGGATCCACCTG
2251   TCAGCCATATAAAAATCT CCTAGG TGGA Bam HI

```

Fig. III.7. Clonación en pUC18. Secuencia nucleotídica del gen que codifica la proteína en estudio de *C. albicans* y regiones adyacentes. La secuencia está numerada según el contig 4-2948. En la zona promotora se muestra una posible caja TATA (en color gris y subrayada). En color fucsia se marcan los cebadores utilizados para la clonación del gen en el pUC18 para formar el pUBP y en amarillo se marcan las dianas de restricción utilizadas *Hind* III (diseñada para facilitar la clonación) y *Bam* HI (propia de la secuencia). La secuencia de aminoácidos de la proteína codificada se indica con el código de una sola letra (en negrita y bajo cada codón), numerándose desde el codón de inicio de la traducción. En rojo se marcan los codones de iniciación y terminación de la traducción, ATG y TAA respectivamente. Con una flecha se señala el sentido de la traducción de la proteína por su extremo N-terminal. En verde y subrayado se muestra la región fuertemente antigénica utilizada para obtener anticuerpos. En color azul celeste se marcan las ocho cisteínas características de la proteína de *C. albicans*. Subrayados y en color naranja se marcan las secuencias aminoacídicas repetidas según el estudio informático realizado posteriormente (ver apartado 2 del presente capítulo).

Los datos de la secuencia nucleotídica han sido depositados en DBBJ/EMB/GenBank con el número de acceso AF307520.

1.4. Análisis Southern del DNA de *C. albicans*.

Para confirmar los resultados de la secuenciación, PCR y de restricción, y determinar el número de copias del gen en el genoma de la cepa con la que se trabajaría posteriormente, se realizó un análisis del DNA cromosomal de *C. albicans* CAI-4 mediante Southern blot empleando como sonda, el fragmento amplificado por los cebadores utilizados para subclonar en pUC18 (F11-A y R11-A) en condiciones de hibridación estrictas. En todas las digestiones realizadas y transferidas se obtuvo una señal única correspondiente con el tamaño esperado deducido del análisis de la secuencia. Estos resultados indican la presencia de una sola copia del gen contenido en el contig 4-2948 en el genoma de *C. albicans* y se muestran en la Fig. III.8.

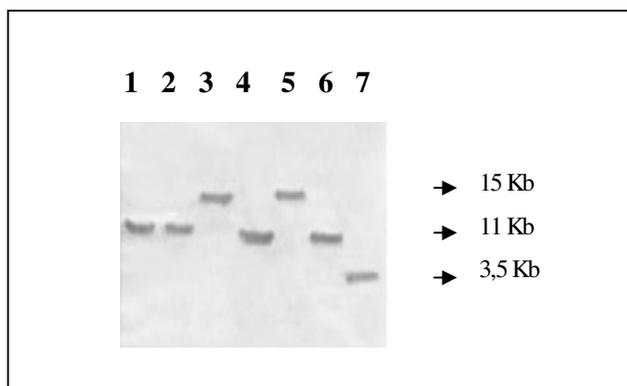


Fig. III.8. Análisis por Southern blot. 12 µg de DNA genómico de la cepa CAI-4 se digirió con las enzimas *Eco* RV (calle 1), *Bam* HI-*Eco* RI (calle 2), *Bam* HI (calle 3), *Bam* HI-*Hind* III (calle 4), *Hind* III (calle 5), *Hind* III-*Eco* RI (calle 6), *Eco* RI (calle 7) e hibridado en condiciones de alta astringencia utilizando como sonda el fragmento amplificado por los cebadores F11-A y R11-A.

2. Análisis informático de la secuencia nucleotídica clonada.

La identificación y caracterización de nuevos genes en *C. albicans* implica en primer lugar el aislamiento del gen de interés, la obtención de la secuencia nucleotídica en la que está contenido y por último la búsqueda de homologías con otras secuencias que permitan la caracterización de dicho gen.

En este sentido, las bases de datos y el uso de programas informáticos son de gran utilidad. Para la caracterización de la secuencia nucleotídica clonada y contenida en el contig 4-2948 se utilizaron las bases de datos y programas disponibles en la actualidad que vienen detallados en las tablas II.4 y II.5 del apartado 19 de Materiales y Métodos.

2.1. Análisis de la región promotora.

La región promotora se analizó utilizando la base de datos del GSF (National Research Center for Environment and Health, Germany) mediante el programa MatInspector V2.2 (Quandt *et al.*, 1995) que utiliza una librería compuesta por un gran número de sitios de unión ya conocidos y probados. Dicho software utiliza esta librería de matriz de descripciones para localizar emparejamientos en secuencias de longitud ilimitada. De las 670 pbs analizadas de la región promotora se encontraron los siguientes emparejamientos:

- 1 emparejamiento con la secuencia **TATA** (654-659) que corresponde con el factor de transcripción IID, éste se encuentra muy vinculado al factor de la caja TATA. Juega un papel importante en la regulación del inicio de la transcripción eucariótica (Kambadur *et al.*, 1990).

- 4 emparejamientos distintos para el factor de transcripción de levaduras GCN4 con las secuencias **TGATTC** (209-214), **AAGTCA** (705-710; 525-530), **TGAGTG** (133-138) y **CAGTCA** (574-579), (Arndt and Fink, 1986).

- 1 emparejamiento con la secuencia **GATAA** (286-290) que corresponde con el factor de transcripción de levaduras GAL4 (**Selleck and Majors, 1987**).
- 2 emparejamientos con la secuencia **CCGA** (611-614; 374-377) que corresponde con el factor de transcripción de levaduras HAP1 (**Pfeifer et al., 1987**).
- 2 emparejamientos con la secuencia **TCTCC** (320-324) que corresponde con el factor de transcripción de levaduras ADH2 (**Beier et al., 1985; Eisen et al., 1988**).

2.2. Composición aminoacídica, peso molecular y secuencias repetidas.

La composición aminoacídica de este polipéptido se caracteriza por presentar un porcentaje elevado en residuos de alanina (18.40%), serina (16.00%) y treonina (10.00%) (Fig. III.9.). El peso molecular teórico resultante de dicha composición es de 25.173, 07 Da y un punto isoelectrico teórico de 4, 66. Dichos resultados se obtuvieron a través del servidor ExPASy, en su apartado de “Proteomics tools” (<http://us.expasy.org/tools/>).

Mediante el programa SAPS (Statistical Analysis of Protein Sequences), el cual evalúa por criterios estadísticos una amplia variedad de propiedades de una secuencia proteica (**Brendel et al., 1992**), se realizó un estudio de las estructuras repetitivas de la secuencia de la proteína de 250 aminoácidos. Las estructuras repetitivas encontradas en la secuencia aminoacídica se detallan en la tabla III.2. y se señalan en la secuencia de la Fig. III.7.

Residue	Number	Percentage	Residue mass	Specific volume
A Ala	46	18.40	90.1018	0.74
B Asx	0	0.00	133.6193	0.61
C Cys	8	3.20	122.1681	0.63
D Asp	8	3.20	134.1116	0.60
E Glu	17	6.80	148.1387	0.66
F Phe	4	1.60	166.2003	0.77
G Gly	12	4.80	76.0748	0.64
H His	2	0.80	156.1645	0.67
I Ile	12	4.80	132.1829	0.90
K Lys	14	5.60	147.1976	0.82
L Leu	9	3.60	132.1829	0.90
M Met	5	2.00	150.2225	0.75
N Asn	8	3.20	133.1270	0.62
P Pro	8	3.20	116.1399	0.76
Q Gln	5	2.00	147.1540	0.67
R Arg	1	0.40	175.2111	0.70
S Ser	40	16.00	106.1011	0.63
T Thr	25	10.00	120.1282	0.70
V Val	19	7.60	118.1559	0.86
W Trp	2	0.80	205.2372	0.74
X Unk	0	0.00	138.1570	0.72
Y Tyr	5	2.00	182.1997	0.71
Z Glx	0	0.00	147.6464	0.67
TOTAL	250	100.00	25173.07 Da	
MEAN			100.69 Da	0.72 cm ³ .g ⁻¹
Theoretical molecular epsilon at 280 nm (1cm): 18880				

Fig. III.9. Cuadro en el que se muestra la composición porcentual en aminoácidos de la hidrofobina CaHPB. En la primera columna se detallan los residuos aminoacídicos que conforman la proteína, en la segunda columna el número, en la tercera el porcentaje, en la cuarta la masa y en la última columna el volumen específico de cada aminoácido.

Secuencias repetidas: alineación por bloques coincidentes	
Posición aminoácidos	Secuencia repetida
136-142	AA_SATTS
151-158	AAELATTS
173-176	AETS
190-193	AETS
170-179	SKVAETSVAQ
205-214	SKAEETSVAQ
199-203	SKAEE
205-209	SKAEE

Tabla III.2. Secuencias repetidas. La tabla muestra las repeticiones que aparecen a lo largo de la secuencia proteica.

A través del mismo programa se pudo realizar un estudio de la distribución de las ocho cisteínas características de la secuencia polipeptídica (Fig. III.10.). Por el importante papel que las cisteínas desempeñan en la estructura de la proteína, los espacios entre las mismas son expuestos separadamente enfatizando de manera especial el par situado en la posición 75 (dos cisteínas separadas por un solo aminoácido).

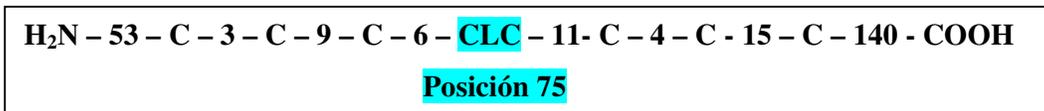


Fig. III.10. Distribución de las cisteínas a lo largo de la secuencia aminoacídica.

2.3. Características Físico-Químicas.

A través del servidor NPS@ (http://pbil.ibcp.fr/cgi-bin/primanal_pcprof.pl) se realizó un estudio de las características físico-químicas de la proteína. Las propiedades estudiadas fueron:

1. Antigenicidad. Para la predicción de determinantes antigénicos contenidos en la secuencia se utilizó el programa desarrollado por **Hopp and Woods (1981)**. El estudio realizado reveló la existencia de un dominio antigénico en la región comprendida entre los aminoácidos 60-70 y que comprende uno de los tramos de elevada similitud aminoacídica con otras proteínas de *C. albicans* (Fig. III.11.) como son Rbt5p, Csa1p y Wap1p (**Burkhard et al., 2000; Lamarre et al., 2000**). Dicho dominio antigénico compuesto por 14 aminoácidos fue sintetizado químicamente y unido a KLH (Keyhole Limpet Hemocyanin) para proceder a la obtención de anticuerpos frente a dicha proteína tras su inoculación a conejos, siguiendo la metodología experimental descrita en el apartado 22 de Materiales y Métodos.

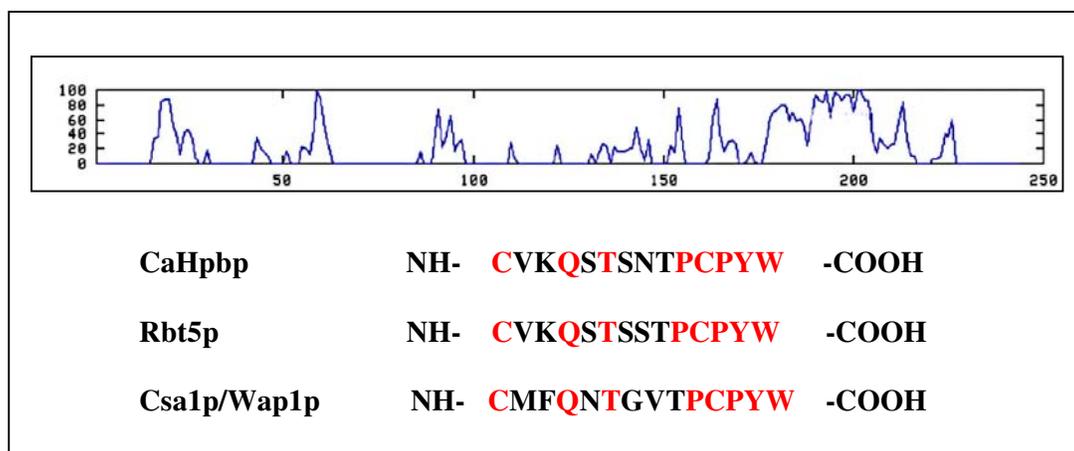


Fig. III.11. Representación esquemática del dominio antigénico de la proteína CaHpbp. En la parte superior se representa de forma gráfica la región fuertemente antigénica propuesta para obtener el anticuerpo. En la parte inferior se encuentra el péptido de 14 aminoácidos sintetizado para la obtención de anticuerpos frente a CaHpbp y debajo de la misma, la comparación de secuencias con Rbt5p, Csa1p/Wap1p, en las que se puede comprobar la elevada conservación de la región antigénica (en rojo).

2. Hidropatía. Para el estudio del perfil hidropático se utilizó el programa desarrollado por **Kyte and Doolittle (1982)**. Como se muestra en la Fig. III.12., en la secuencia aparecen dos regiones hidrofílicas, una en el extremo amino terminal (aminoácidos 40-70) y otra en el extremo carboxi terminal (aminoácidos 160-210); y dos regiones hidrofóbicas igualmente situadas en los extremos amino terminal (aminoácidos 71-90) y otra en el extremo carboxi terminal (aminoácidos 220-250). Dada la importancia del perfil hidropático para este tipo de proteínas, se realizó una comparación con la hidrofobina de clase II Criparina. Como se muestra en la Fig. III.12.B, nuestra proteína clonada y la Criparina presentan perfiles hidropáticos similares, al menos, en lo que respecta a los primeros 120 aminoácidos.

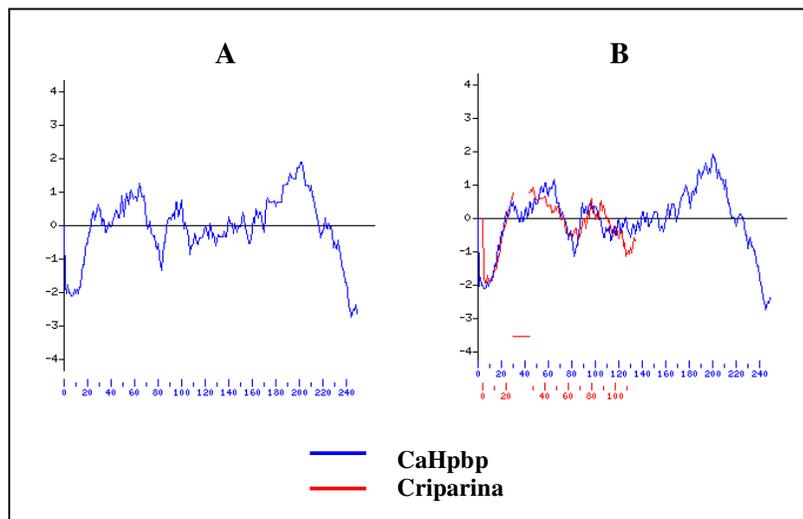


Fig. III.12. Estudio hidropático de las proteínas CaHpbp y Criparina. La figura A muestra la hidropatía para la CaHpbp y la figura B muestra el perfil hidropático de ambas proteínas. Nótese que los primeros 20 aminoácidos corresponden al péptido señal y no se encuentran presentes en la proteína secretada.

3. Regiones transmembranales. Para el estudio de las regiones transmembranales se utilizó el programa desarrollado por **Hofmann and Stoffel (1993)**. Como se puede observar en la Fig. III.13. dicho modelo, predice dos posibles dominios transmembranales, uno situado en el extremo amino terminal (aminoácidos 1-18) y otro en el extremo carboxi terminal (aminoácidos 231-250).

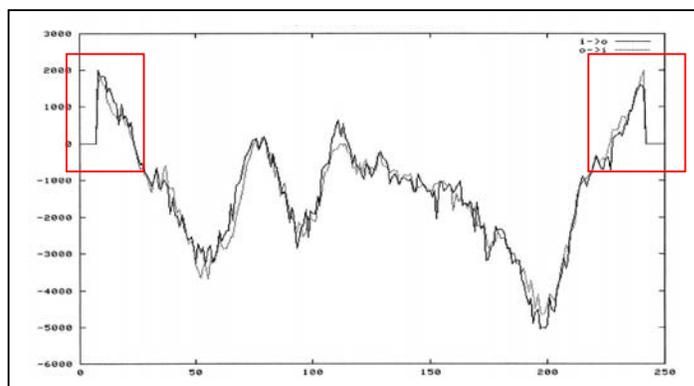


Fig. III.13. Posibles dominios transmembranales presentes en la proteína clonada.

2.4. Localización subcelular.

A través del servidor PSORT (<http://psort.nibb.ac.jp/form2.html>) se realizó un estudio de la posible localización subcelular de la proteína clonada utilizando el programa PSORT II desarrollado por **Nakai and Kanehisa (1992)**. Los resultados generados por el programa se muestran a continuación:

- [GvH: von Heijne's method for signal seq. recognition](#)

Posible sitio de corte: entre los aminoácidos 15 y 16.
Parece tener un péptido señal (aminoácidos 1 a 15)

- [ALOM: Klein method for TM region allocation](#)

Posición inicial para el cálculo: aminoácido 16
Dominio transmembranal: aminoácidos 234-250

- [MTOPI: Prediction of membrane topology](#)

Topología membrana: tipo 1a
Parece estar anclada a través de GPI

- [Gavel: prediction of cleavage sites for mitochondrial preseq](#)

Señal de corte no encontrada.

- [NUCDISC: discrimination of nuclear localization signals](#)

Ninguna

- [KDEL](#): Señal de retención RE en el extremo C-terminal: ninguna

- [ER Membrane Retention Signals](#): ninguna

- [SKL](#): señal de peroxisomas en el extremo C-terminal: ninguna

- [SKL2](#): segunda señal de peroxisomas: ninguna

- [VAC](#): posible señal vacuolar: ninguna

- [RNA-binding motif](#): ninguno

- [Actinin-type actin-binding motif](#):

tipo 1: ninguna
tipo 2: ninguna

- [NMYR](#): patrón de N-miristilación: ninguno

- [Prenylation motif](#): ninguno

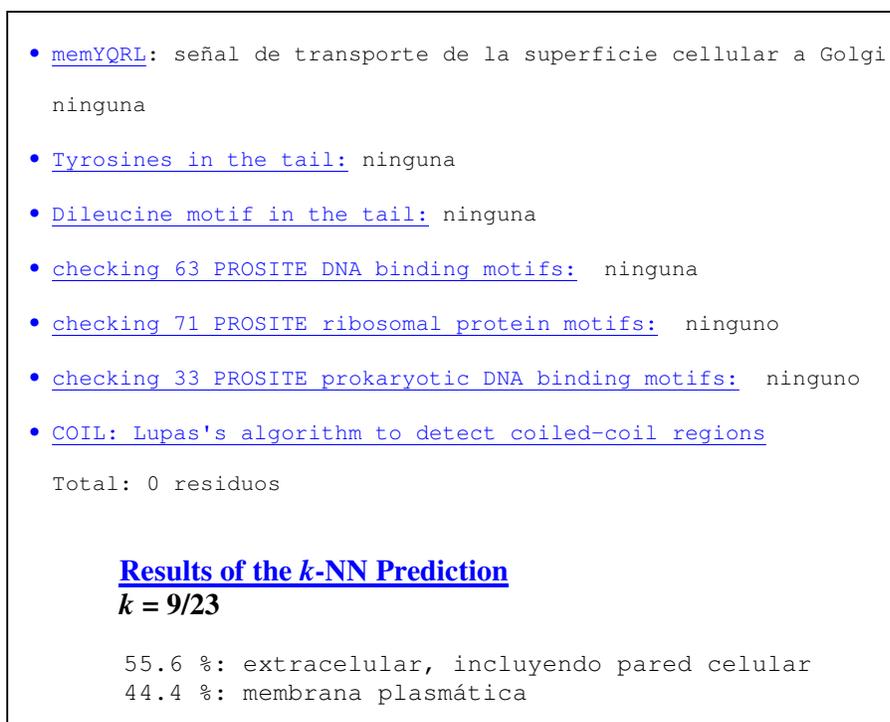


Fig. III.14. Estudio de la posible localización de la proteína.

De los análisis informáticos efectuados podríamos deducir que nuestra proteína clonada se trata de una proteína de secreción que contiene dos dominios transmembranales, el situado en el extremo amino terminal, el cual posiblemente corresponda al péptido señal, y el situado en el extremo carboxi terminal que probablemente podría actuar como señal de anclaje tipo GPI.

Para tratar de comprobar esta segunda posibilidad utilizamos el programa DGPI a través del servidor ExPASy, en su apartado de “Proteomics tools” (<http://us.expasy.org/tools/>). Los resultados obtenidos nos indican que aunque nuestra secuencia contiene una posible señal tipo GPI, con un punto de corte situado en el aminoácido 217, no se trata de una proteína anclada a la membrana plasmática a través de una unión tipo GPI debido a que el área hidrofílica contenida en el extremo carboxi terminal hidrofóbico es demasiado corta, por lo que muy probablemente se trate de una proteína secretada.

DGPI Result

Protein	CaHPB
Sequence	MMSFSLLSIVSIALAATVSATSDGTNAYTAYPSVAKTASINGFADKIYDQLPECAKECVKQSTSNTPCPYWDTGCLCVMPQFGGAIIGDCVAKNCKGKEVDSVESLATSICSSAGVGEPYWMIPSSVSDALAKAANAASATTSVETATKSAAAELATTSDTTIVASTSHESKVAETSVAQHTASTEKSSAAETSRAKETSKAEESSKAEETSVAQSSSSANVASVSAETANAGNMPVIAIGGVIAAFALI
Length	250
Data from DGPI	<p>N-term Signal : there is a N-term signal (1.14 in violet) maximal score=6.22</p> <p>C-term Hydrophobicity profile : hydrophobe length (low-pass filter)=29 hydrophile length (low-pass filter)=1 hydrophobe length (median filter)=16 hydrophile length (median filter)=1 average hydrophobe length = 22.5 (in blue) average hydrophile length = 1.0</p> <p>Cleavage site (ω) : There's a GPI-anchor near 220 (7 aa after hydrophobic tail) There's a potential cleavage site at 230 (score=0.5814) detected by $\omega, \omega+2$ rule. There's a potential cleavage site at 223 (score=0.344) detected by $\omega, \omega+2$ rule. There's a potential cleavage site at 220 (score=0.22799999) detected by $\omega, \omega+2$ rule. There's a potential cleavage site at 217 (score=3.7410002) detected by $\omega, \omega+2$ rule. There's a potential cleavage site at 216 (score=2.4940002) detected by $\omega, \omega+2$ rule. There's a potential cleavage site at 215 (score=2.4940002) detected by $\omega, \omega+2$ rule. There's a potential cleavage site at 211 (score=0.51600003) detected by $\omega, \omega+2$ rule. The best cleavage site is 217</p> <p>Conclusion : This protein is not GPI-anchored (C-terminal hydrophobic area but C-terminal hydrophilic area is too short). There is a potential cleavage site at 217 ($\omega, \omega+1, \omega+2$ in red)</p>
Sequence annotated by DGPI	MMSFSLLSIVSIALAATVSATSDGTNAYTAYPSVAKTASINGFADKIYDQLPECAKECVKQSTSNTPCPYWDTGCLCVMPQFGGAIIGDCVAKNCKGKEVDSVESLATSICSSAGVGEPYWMIPSSVSDALAKAANAASATTSVETATKSAAAELATTSDTTIVASTSHESKVAETSVAQHTASTEKSSAAETSRAKETSKAEESSKAEETSVAQSSSSANVASVSAETANAGNMPVIAIGGVIAAFALI

Fig. III.15. Predicción de anclaje y corte para proteínas GPI. El extremo amino-terminal de 15 aminoácidos (en rosa) y el extremo carboxi-terminal (en azul) contienen dominios hidrofóbicos y una pequeña área hidrofílica de 3 aminoácidos (en rojo) pudiendo ser ésta última el posible punto de anclaje de las GPI, pero excesivamente corto, por lo que es sólo un potencial o posible punto de anclaje localizado en el aminoácido 217 de la secuencia.

2.5. Dominios conservados.

Para determinar la presencia de dominios conservados de proteínas, se utilizaron las bases de datos Prosite (**Falquet *et al.*, 2002**) y PFAM (**Bateman *et al.*, 2002**). El estudio concluyó sin la obtención de resultados relevantes, ya que no se reconocieron motivos proteicos ni dominios conservados significativos en el ORF contenido en la secuencia de la CaHPB.

2.6. Estructura Secundaria.

Mediante el programa SOPMA del servidor NPS@ (<http://pbil.ibcp.fr/>), se obtuvo una predicción sobre la estructura secundaria de la proteína por consenso predictivo de alineaciones múltiples (**Geourjon and Deléage, 1995**).

El alineamiento muestra la posibilidad de 4 estados de la proteína detallados con distintas letras y colores bajo cada aminoácido y representados en la gráfica de la Fig. III.17. Se distinguiría:

- un estado α hélice (h) en un porcentaje del 60,80%
- un estado de hebra extendida (e) en un 8,00%
- giro β (t) en un 6,00%
- enrollamiento o espiral aleatoria (c) en un 25,20%

Los resultados informáticos se muestran detallados en las figuras III.16. y III.17.

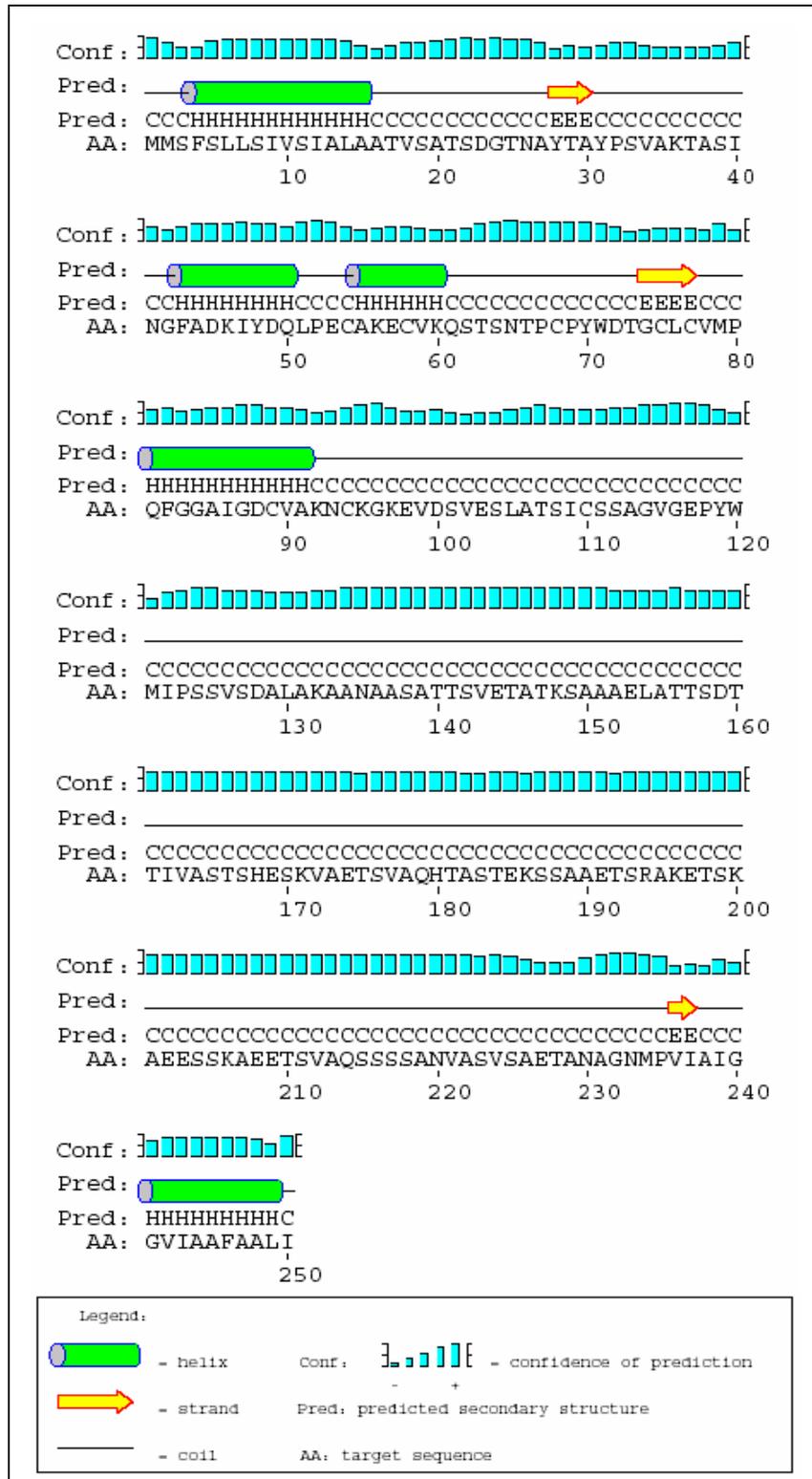


Fig. III.16. Predicción de la estructura secundaria de la proteína.

Con el programa YinOYang 1.2, se realizó un estudio de los posibles puntos de O-beta-glicosilación (Fig. III.18.) que podría presentar la CaHpbp a lo largo de toda su secuencia (File://B:\YingOYang 1_2predictionresults.htm).

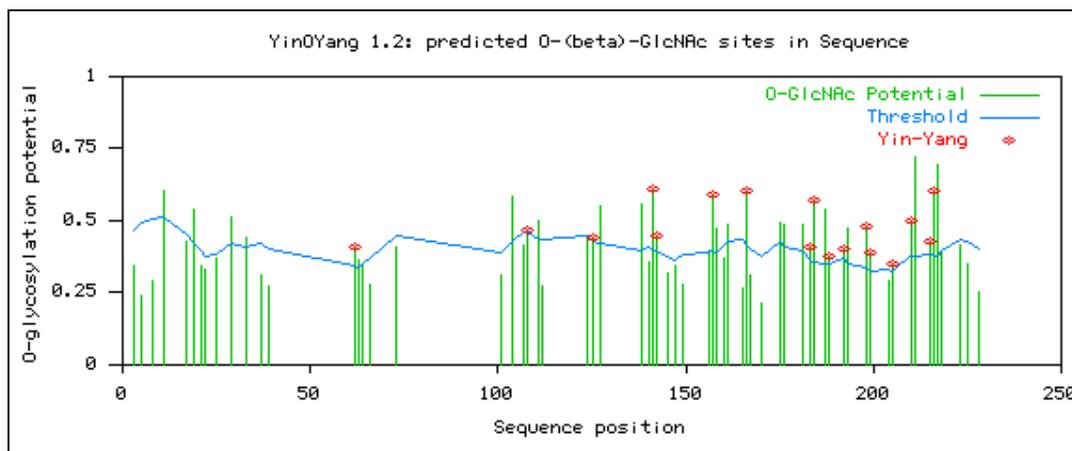


Fig. III.18. Residuos de serina y treonina que pueden potencialmente glicosilarse en la CaHpbp (mostrados en rojo en la gráfica).

Los resultados muestran la capacidad que presentan 17 de los 65 residuos de serina y treonina de la proteína en estudio de poder glicosilarse a través de O-glicosilación, lo que representa aproximadamente un 26% de O-glicosilación de la misma.

2.8. Posibilidad de formación de puentes disulfuro.

Mediante el programa CYSURED (<http://prion.biocomp.unibo.it/cysured.html>) se realizó un análisis de los residuos de cisteína presentes en la secuencia con la finalidad de averiguar su intervención en la posible formación de puentes disulfuro en la proteína clonada (Fariselli *et al.*, 1999). Los resultados obtenidos se muestran en la Fig. III.19.

Result of CYPRED prediction (Piero Farisell): PREDICTION OF BONDING STATE OF CYSTEINES

1. Conservation+ Entropy			4. Conservation+ Entropy+Hydrophobicity		
<u>N.cys</u>	<u>Prob.SS</u>	<u>Prob.SH</u>	<u>N.cys</u>	<u>Prob.SS</u>	<u>Prob.SH</u>
54	0.828234	0.171764	54	0.791647	0.208349
58	0.754373	0.245629	58	0.749983	0.250018
68	0.964426	0.035574	68	0.969094	0.030906
75	0.972273	0.027727	75	0.962443	0.037556
77	0.932227	0.067771	77	0.940923	0.059079
89	0.881178	0.118821	89	0.886813	0.113185
94	0.762916	0.237083	94	0.840112	0.159885
110	0.892904	0.107095	110	0.914793	0.085207

2. Conservation+ Entropy + Charges			5. Conservation+ Entropy + Charges + Hydrophobicity		
<u>N.cys</u>	<u>Prob.SS</u>	<u>Prob.SH</u>	<u>N.cys</u>	<u>Prob.SS</u>	<u>Prob.SH</u>
54	0.789387	0.077208	54	0.805702	0.194303
58	0.743052	0.118152	58	0.739785	0.260221
68	0.965542	0.015912	68	0.962769	0.037230
75	0.951865	0.017488	75	0.949121	0.050881
77	0.936322	0.019125	77	0.938226	0.061774
89	0.874152	0.046823	89	0.876713	0.123290
94	0.849144	0.055494	94	0.870455	0.129544
110	0.914366	0.021901	110	0.916851	0.083150

3. Charge			6. JURY AMONG THE DIFFERENT NETWORKS			
<u>N.cys</u>	<u>Prob.SS</u>	<u>Prob.SH</u>	<u>N.cys</u>	<u>Prob.SS</u>	<u>Prob.SH</u>	
54	0.120197	0.879793	54	BONDED	NON-BONDED	DISULFIDE
58	0.026191	0.973814	54	0.667	0.306	YES
68	0.039664	0.960334	58	0.603	0.370	YES
75	0.033209	0.966785	68	0.780	0.216	YES
77	0.284576	0.715420	75	0.774	0.220	YES
89	0.195422	0.804585	77	0.806	0.185	YES
94	0.034829	0.965170	89	0.743	0.241	YES
			94	0.671	0.309	YES
			110	0.728	0.059	YES

Fig. III.19. Predicción de la formación de puentes disulfuro entre cisteínas. Como se puede observar, las ocho cisteínas presentan una elevada probabilidad de intervenir en la formación de puentes disulfuro (punto 6 del cuadro).

3. Análisis funcional de la secuencia: búsqueda de homólogos.

BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) y FASTA son un conjunto de programas diseñados para explorar las secuencias depositadas en las bases de datos.

Dado que la búsqueda en las bases de datos de proteínas es del orden de 5 veces más sensible que la de las bases de datos de DNA, se utilizaron los programas BLASTP y TFASTA. Utilizando dichos programas, se realizaron búsquedas de la secuencia de aminoácidos de la proteína CaHpbp para compararla con secuencias de las bases de datos de GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), revelando cierta similitud con varias proteínas conocidas (detalladas en la Fig. III.20.). Las mayores similitudes encontradas fueron con proteínas de *Candida albicans* como son Rbt5p, Csa1p y Wap1p.

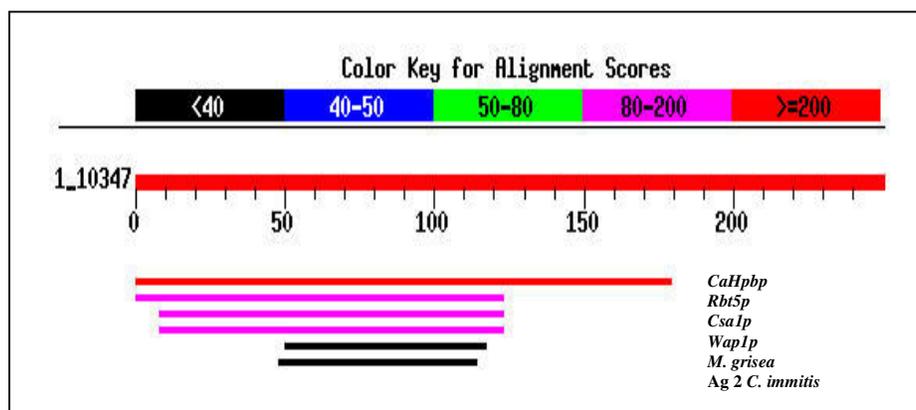


Fig. III.20. Búsqueda de homólogos. La línea superior (en rojo) representa la proteína banqueada. Las tres líneas que le siguen (en color rosa) corresponden a las proteínas que presentan mayores similitudes y son la Rbt5p, Csa1p y Wap1p, en orden decreciente de homología y las tres son proteínas de *Candida albicans*. Por último, las dos líneas (en color negro) representan proteínas con similitudes algo inferiores y corresponden en orden decreciente a *Magnaporthe grisea* y a la proteína inmunorreactiva precursora del antígeno 2 de *Coccidioides immitis*.

El gen *CSAI* (*cell surface antigen one*) fue el primero en ser descrito (**Lamarre et al., 2000**). *CSAI* codifica para una proteína de 1.203 aminoácidos que se expresa preferentemente durante la fase de crecimiento micelial. La secuencia aminoacídica de dicha proteína revela algunas características importantes. En primer lugar, los extremos N-terminal y C-terminal contienen un núcleo de residuos hidrofóbicos, los cuales pueden funcionar como una secuencia señal y un anclaje GPI respectivamente. El

anclaje a las membranas a través de un motivo GPI es una característica común de muchas proteínas asociadas a la pared celular en hongos, incluyendo *C. albicans* y *S. cerevisiae* (Kapteyn *et al.*, 1994; Bailey *et al.*, 1996; Caro *et al.*, 1997). La característica más remarcable de Csa1p es la de contener una región de unos 115 aminoácidos en la que se encuentran ocho cisteínas y que se repite cinco veces en la secuencia. La identidad entre cada dominio supera el 95%, excepto para el segmento central (aminoácidos 403-504), el cual difiere ligeramente de las otras repeticiones (véase Fig. III.21.). Por otra parte, los mutantes nulos para *CSAI* no presentaron alteraciones fenotípicas remarcables (Lamarre *et al.*, 2000).

El gen *RBT5* (*repressed by TUP1*) descrito por Braun *et al.* (2000), codifica para una proteína de 241 aminoácidos.

El gen *WAPI* (*wall protein one*), fue descubierto durante el curso del aislamiento del *RBT5* debido a su similitud. Ambos están regulados por el gen *TUP1* que codifica para un represor transcripcional que controla negativamente el crecimiento micelial en *C. albicans*. La delección de *TUP1* produce el crecimiento micelial de *C. albicans* de manera constitutiva en ausencia de cualquier tipo de señal inductora. Mediante hibridación substractiva se aislaron seis genes, denominados *repressed by TUP1* (*RBT*), cuya expresión está regulada por *TUP1*. *RBT5* y *WAPI* fueron dos de los seis genes que se aislaron por dicho procedimiento. Estos genes codifican para proteínas que comparten una secuencia de 115 aminoácidos con elevada similitud, que contiene ocho residuos de cisteína, la cual está presente una vez en *RBT5* y cuatro veces en *WAPI* (véase Fig. III.21). *RBT5* y *WAPI* presentan los atributos característicos de las proteínas de pared celular de los hongos, una secuencia señal, una señal de anclaje GPI que no presenta una señal de retención en la membrana plasmática, y una o más regiones cortas ricas en serina/treonina repetidas cerca del extremo COOH terminal. La obtención de mutantes nulos para los dos genes tampoco reveló alteraciones fenotípicas significativas (Braun *et al.*, 2000).

Por otro lado, la única diferencia del *CSAI* con el *WAPI* es que presenta cinco repeticiones de la secuencia de 115 aminoácidos de elevada similitud en lugar de cuatro.

Si se trata del mismo gen o de otro diferente es una cuestión que desconocemos. Por esta razón en el presente trabajo nos referiremos a ellos como *CSAI/WAPI*.

Además de la similitud en la secuencia primaria de aminoácidos, el contenido de residuos hidrofóbicos dentro de este motivo es similar (aproximadamente 26%) en todas ellas (**Lamarre et al., 2000; Braun et al., 2000**). Este dominio de 115 aminoácidos que contiene las ocho cisteínas presenta alguna similitud con unas pequeñas proteínas fúngicas de secreción (96 a 125 aminoácidos) llamadas hidrofobinas (**Kershaw and Talbot, 1998**).

Mediante el programa MultAlin (Multiple Sequence Alignment), del servidor INRA, (<http://prodes.toulouse.inra.fr/multalin/result/1000208212.gif>) se realizó un alineamiento de las tres secuencias aminoacídicas para obtener más información acerca de su homología, (**Corpet, 1988**). Los resultados se muestran en la Fig. III.21.

Otras similitudes significativas fueron las detectadas con el antígeno inmunorreactivo 2 de *Coccidioides immitis* (Ag2), y la proteína Pth11p de *Magnaporthe grisea*, dos hongos patógenos. De manera significativa, los ocho residuos de cisteína están altamente conservados en todas estas proteínas (Fig. III.22.).

La búsqueda de secuencias similares a CaHpbp en las bases de datos de *S. cerevisiae* no reveló la presencia de homólogos para esta proteína en dicho organismo.

CaHpbp	MMSFSLLSIVSIALAATVSATSDG-----TNAYTAYPSVAKTASINGFADKIYDQLPEC	54
Rbt5p	MLALSLLSIVSIASAAGVTAIPEG-----DNPYTIFFPSVAKTASINGFADRIYDQLPEC	54
Csa1p/Wap1p	MLPSIVISIVLASFVSAESSITEAPTITTAEDNPNYTIYPSVAKTASINGFADRIYDQLPEC	60
CaHpbp	AKEC V KQSTSNTP C PYWDTG C LCVMPQFGGAI G DC V AKN C KGKEVDSVESLATS I CS S SAG	114
Rbt5p	AKEC V KQSTSNTP C PYWDTG C LCVMPQFAGAV G NC V AKN C KGKEVGSVESLATS I CS S SAG	114
Csa1p/Wap1p	AK P CMFQNTGVT P CPYWDTG C LCIMP T FAGA I GS C IAEK C KGQDVVSATSLGTS I CS V AG	120
CaHpbp	VGE P YWMIPSSVSDALAKAANAASAT-----TSVETATKS	149
Rbt5p	VWE P YWMIPSSVSDALAKAADAASAE-----TAESTTAE	149
Csa1p/Wap1p	VWD P YWMVPANVQSSLSAAATAVASSSEQPVETSSEPAGSSQSVESQPAETSSEPAET	180
CaHpbp	AAAE L ATTSDTTI-----VAST S HE S -----	170
Rbt5p	TAA E TT-----KA E ET-----	160
Csa1p/Wap1p	SS S EP A ETSSETSSEQPASSEPAETSSE S ESSTITSAPSTPEDNPYTIYPSVAKTASINGF	240
CaHpbp	-----	
Rbt5p	-----	
Csa1p/Wap1p	ADRIYDQLPE C AK P CMFQNTGVT P CPYWDTG C LCIMP T FAGA I GS C IAEK C KGQDVVAAT	300
CaHpbp	-----KVAETSVAQHTASTEKSSAAETSRA	195
Rbt5p	-----SAKETTAETSAAAESSAPAE T SKA	185
Csa1p/Wap1p	SLG T SI C SVAGVWDPYWMVPANVQSSLSAAATAVPSSEQSVETSSESAESSQSVES S QP	360
CaHpbp	KETSKAEESSKAETSVAQSSS---SANVASVSAETANAGNMPVIAIGG-----	241
Rbt5p	EETSKAAETTKAESSVAQSSS---AADVASVVEAANAGNMPVAIGG-----	232
Csa1p/Wap1p	AETSSEQPSETSETSSQQLSSIT S APDSSATSSSST T ST F IR T ASINGFADKLYDQLPE	420
CaHpbp	-----VIAAFAALI-----	250
Rbt5p	-----VIAAVAALF-----	241
Csa1p/Wap1p	C AK P CMFQNTG I TP C PYWDAG C LCVMPQFAGAI G SC V AD S C K GGQDIVSVTSLGTS V CS V A	480
Csa1p/Wap1p	GVNAPYWMPLPASVKSSLSVAATAVPTSDSASETASQEPSETSSSEQPSETASQPPAETSSE	540
Csa1p/Wap1p	ESSTITSAPSTPEDNPYTIYPSVAKTASINGFADRIYDQLPE C AK P CMFQNTGVT P CPY W	600
Csa1p/Wap1p	DTG C LCIMP T FAGA I GS C IAEK C KGQDVVSATSLGTS I CSVAGVWDPYWMIPANAQSSLN	660
Csa1p/Wap1p	AAATAVASSSEQPVETSSEAAESSQNPAESSQPPSETASQEPSETSSQEPSESSSEQPA	720
Csa1p/Wap1p	ETSSEESSTITSAPSTPEDNPYTIYPSVAKTASINGFADRIYDQLPE C AK P CMFQNTGVT	780
Csa1p/Wap1p	P CPYWDTG C LCIMP T FAGA I GS C IAEK C KGQEVVSVTSLGSS I CSVAGVWDPYWMPLPANV	840
Csa1p/Wap1p	QSSLNAAATAVATSDSASEVASASESASQVPQETSAASSQSANN S VASAAPSNSSVSAAP	900
Csa1p/Wap1p	SSNSSGVPAAPSNSSSGASVVP S QSANNSSASAAPSNSSSAISGSVAPSSYGNSTIAQP	960
Csa1p/Wap1p	STSTKSDAASITGPITTDK V ITNESGIVFTSTV I I T HVSEYCDQTSAAAVQSSACEEQSS	1020
Csa1p/Wap1p	AKSEQASASSEQVKVITSVVWCESSIQ S IESVK T SAEA A HKTEVIASCASELSSLSAKS	1080
Csa1p/Wap1p	EAMKTVSSLVEVQKSAVAKQ T SLAAVQSSAASVQLSAAHAQKSSEAVEVAQTAVAEASKA	1140
Csa1p/Wap1p	GDEISTEIVNITKT V SSGKETGVSQATVAANTHSVAIANMANTK F ASTMSLLVASFV F VG	1200
Csa1p/Wap1p	LF I	1203

Fig. III.21. Alineación de las tres proteínas de *C. albicans*. Alineación de las tres secuencias aminoacídicas de *C. albicans* CaHpbp, Rbt5p y Csa1p/Wap1p. En rojo, las regiones idénticas en las tres proteínas que comprenden un tramo de unos 150 aminoácidos y en azul las ocho cisteínas en la misma posición.

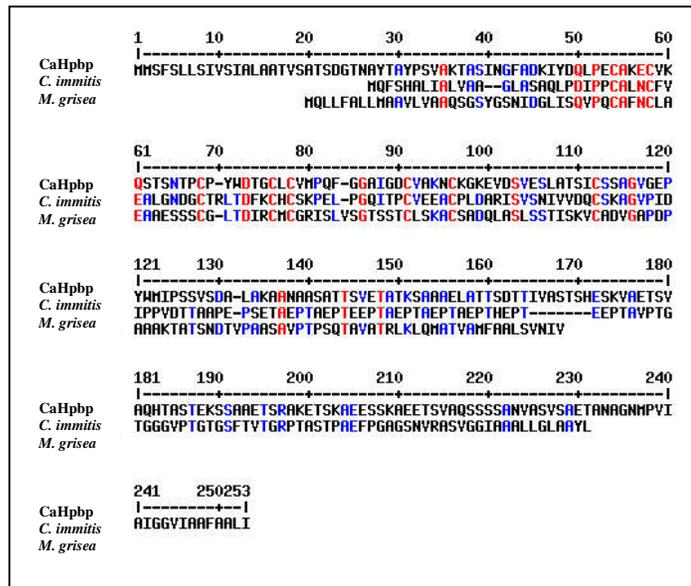


Fig. III.22. Alineamiento de CaHpbp con las secuencias peptídicas que contienen los ocho residuos de cisteína derivadas del Ag2 de *C. immitis* y Pth11 de *M. grisea*.

Como se ha comentado anteriormente, la proteína CaHpbp presentaba en una región de unos 115 aminoácidos una elevada homología con otras dos secuencias proteicas de *C. albicans* Rbt5p y Csa1p/Wap1p, cuya caracterización no está todavía perfectamente definida. Las tres proteínas son de pared celular y presentan potenciales puntos de anclaje GPI, además en su secuencia aminoacídica presentan ocho cisteínas perfectamente conservadas en idénticas posiciones, lo que hace sospechar que pueden ser proteínas de una misma familia en *C. albicans*.

Recientemente, se ha descrito un dominio denominado CFEM (Common in several Fungal Extracellular Membrane proteins), presente exclusivamente en un grupo de proteínas fúngicas de membrana, que se caracteriza por la presencia de ocho residuos de cisteína altamente conservados (Kulkarni *et al.*, 2003). Los autores, a través de búsquedas con diferentes programas informáticos, encontraron dicho dominio en 25 especies fúngicas (Fig. III.23.). Algunos rasgos del CFEM, que comprende unos 60

aminoácidos, sugieren que es un dominio novedoso con características distintas a los dominios ricos en cisteína conocidos hasta ahora.

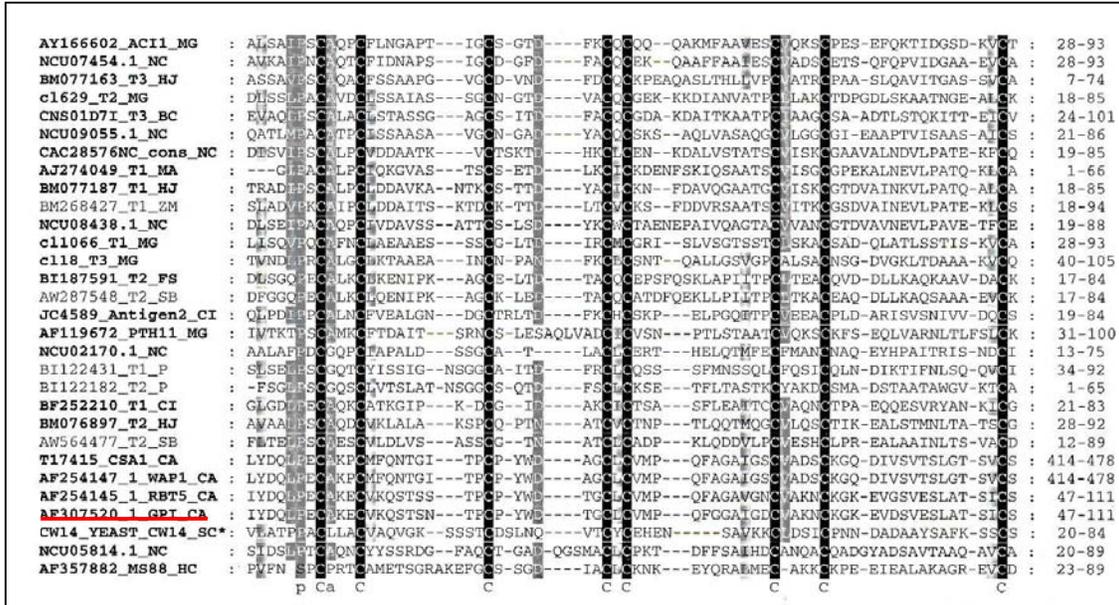


Fig. III.23. Alineamiento múltiple de las proteínas de hongos y plantas que contienen el dominio de ocho cisteínas (CFEM) (la búsqueda no encontró secuencias de animales o procariotas que contuviesen dicho dominio). Las secuencias en la tabla vienen marcadas con las abreviaturas “número de acceso_nombreorganismo”. Abreviaturas: BC, *Botrytis cinerea*; CA, *Candida albicans*; CI, *Coccidioides immitis*; FS, *Fusarium sporotrichioides*; HC, *Histoplasma capsulatum*; HJ, *Hypocrea jecorina*; MA, *Mertarhizium anisopliae*; MG, *Magnaporthe grisea*; NC, *Neurospora crassa*; P, *Populus* spp; SC, *Saccharomyces cerevisiae*; SB, *Sorghum bicolor*, ZM, *Zea mays*. La secuencia subrayada con una línea roja corresponde a nuestra proteína clonada.

El dominio CFEM se encuentra presente con una o más copias en dichas proteínas, normalmente con una copia en el extremo N-terminal. El péptido señal está presente en todas ellas, las cuales también poseen un dominio transmembranal con una posible señal GPI de anclaje (Fig. III.24.).

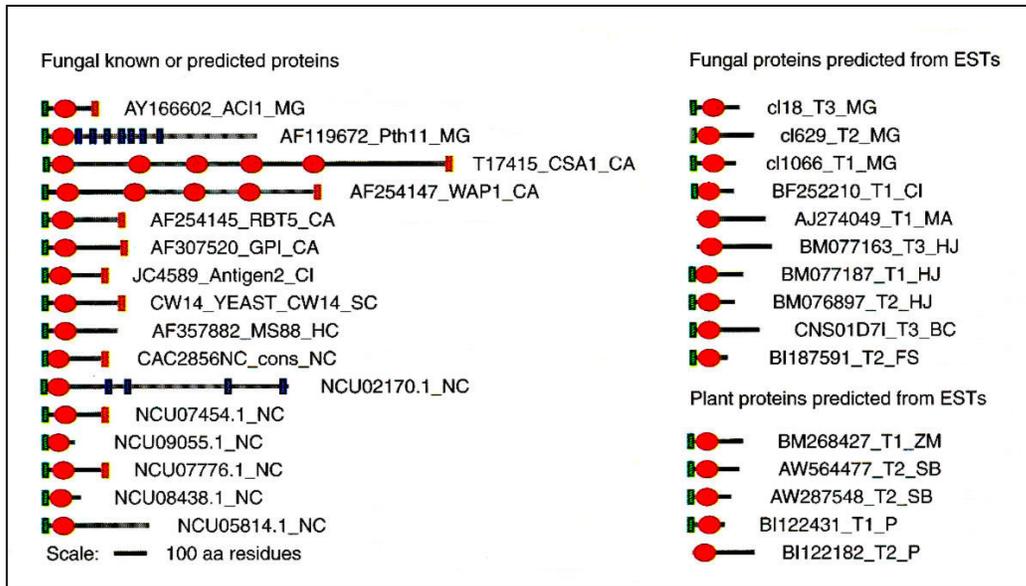


Fig. III.24. Localización del dominio CFEM en proteínas de hongos y plantas. Código de colores: rojo, dominio CFEM; verde, péptido señal; azul, dominios transmembranales; naranja, regiones de corte para anclaje a GPI. La etiqueta después de cada secuencia indica “número de acceso_nombre_organismo”. Las abreviaturas son las mismas que se indican en la figura anterior.

La hidrofobinas que están presentes en varios hongos contienen ocho residuos de cisteína y se encuentran involucrados en la adhesión celular (**Kershaw and Talbot, 1998**). El tamaño del dominio, el espaciado y patrón de los residuos de cisteínas son, sin embargo, completamente distintos cuando se comparan con los CFEM; en las hidrofobinas el dominio que contiene las cisteínas es más largo y presenta dos pares de residuos de cisteínas juntas. Así pues, el CFEM y los dominios ricos en cisteínas de las hidrofobinas podrían tener diferente propensión a formar puentes disulfuro.

Otras moléculas bien caracterizadas que contienen dominios ricos en cisteínas son los dominios “EGF-like” de los factores de crecimiento epidérmico que actúan como sensores extracelulares, receptores o que también se encuentran involucrados en la adhesión celular (**Apella, 1988**). Como característica, estos dominios comprenden 40 aminoácidos, conteniendo seis residuos de cisteína y localizándose en membranas

animales o proteínas extracelulares (Doolittle *et al.*, 1984). Los puentes disulfuro entre el primer y tercer, y entre el segundo y el cuarto residuos de cisteínas forman dos hebras tipo β -helices; el último par de cisteínas forman un bucle.

Algunas proteínas fúngicas que contienen el dominio CFEM son candidatas a jugar un papel importante en la patogénesis. La proteína Pth11 de *M. grisea* se requiere para el desarrollo del apresorio, el cual es un estado necesario para la infección en la planta del arroz (DeZwaan *et al.*, 1999). Por otra parte, como ya se ha comentado las proteínas Rbt5p y Wap1p/Csa1p de *C. albicans* y el antígeno 2 de *C. immitis* se expresan de manera preferente durante la fase micelial y en la esférula respectivamente (Lamarre *et al.*, 2000; Peng *et al.*, 1999). Ambos estados de desarrollo se encuentran involucrados en la patogénesis. Este dominio CFEM podría servir como una señal característica de un conjunto de proteínas que funcionan en el ambiente extracelular. Así, las proteínas que contienen dichos dominios podrían funcionar como receptores de la superficie celular o como señales transductoras o como moléculas de adhesión en las interacciones patógeno-hospedador.

4. Caracterización molecular y funcional de la hidrofobina.

Diferentes grupos de investigación han centrado su interés en la caracterización de moléculas antigénicas asociadas a la pared (superficie) celular de ambas fases morfológicas de *C. albicans*. Estos estudios han implicado, generalmente, la obtención de anticuerpos tanto policlonales como monoclonales frente a preparaciones antigénicas de naturaleza muy diversa, como células intactas previamente inactivadas, paredes celulares aisladas, materiales solubilizados de la pared celular mediante diferentes tratamientos, componentes de la pared celular purificados, material citosólico, etc. (Chaffin *et al.*, 1998; Pontón *et al.*, 1990). La posterior caracterización cualitativa y cuantitativa de la reactividad inmunológica de los antiseros así generados se ha llevado a cabo mediante diferentes técnicas analíticas (inmunotransferencia [Western blotting], inmunofluorescencia, ELISA, etc.), con objeto de determinar la identidad, la localización a nivel subcelular, la asociación específica con una determinada morfología

del hongo, y otras características de los diferentes antígenos reconocidos por dichos antisueros. En este trabajo se ha empleado una aproximación equivalente para llevar a cabo la identificación bioquímica y funcional del producto del gen *CaHPB*.

4.1. Inmunofluorescencia indirecta.

La reactividad del anticuerpo policlonal monoespecífico (PAb anti-CaHpbp) generado frente a un dominio antigénico deducido de la secuencia de aminoácidos del producto del gen *CaHPB* (la hidrofobina CaHpbp), según se describe en el apartado 23 del capítulo de Materiales y Métodos, se ensayó inicialmente frente a células intactas de *C. albicans* en distintas condiciones de crecimiento mediante inmunofluorescencia indirecta. Los resultados de este análisis se muestran en la Fig. III.25.

Como se puede observar, el epítopo reconocido por el PAb anti-CaHpbp se expresa también *in vivo*, preferencialmente en los filamentos miceliales (ver Fig. III.25.D) como se deduce de la intensidad de la fluorescencia observada, mientras que la marca detectada en las células levaduriformes de la cepa SC5314 de *C. albicans* fue considerablemente menor (Fig. III.25.B). La interacción del anticuerpo con las células fue específica, ya que no se observó fluorescencia en las células control que habían sido incubadas solamente en presencia del segundo anticuerpo anti-IgG de conejo acoplado a fluoresceína.

El hecho de que las células levaduriformes crecidas a 28°C exhibiesen una intensidad de fluorescencia menor tras reaccionar con el PAb anti-CaHpbp (resultados no mostrados) que las levaduras incubadas a 37°C, pero en condiciones que no inducían la formación de micelio, que son las que se muestran en los paneles A y B de la Fig. III.25., sugiere que la expresión del antígeno inmunorreactivo frente al PAb anti-CaHpbp depende de las condiciones de incubación a las que se someta el hongo, que a su vez determinan la morfología con la que éste crece, al inducir en algunos casos la transición morfológica levadura-micelio.

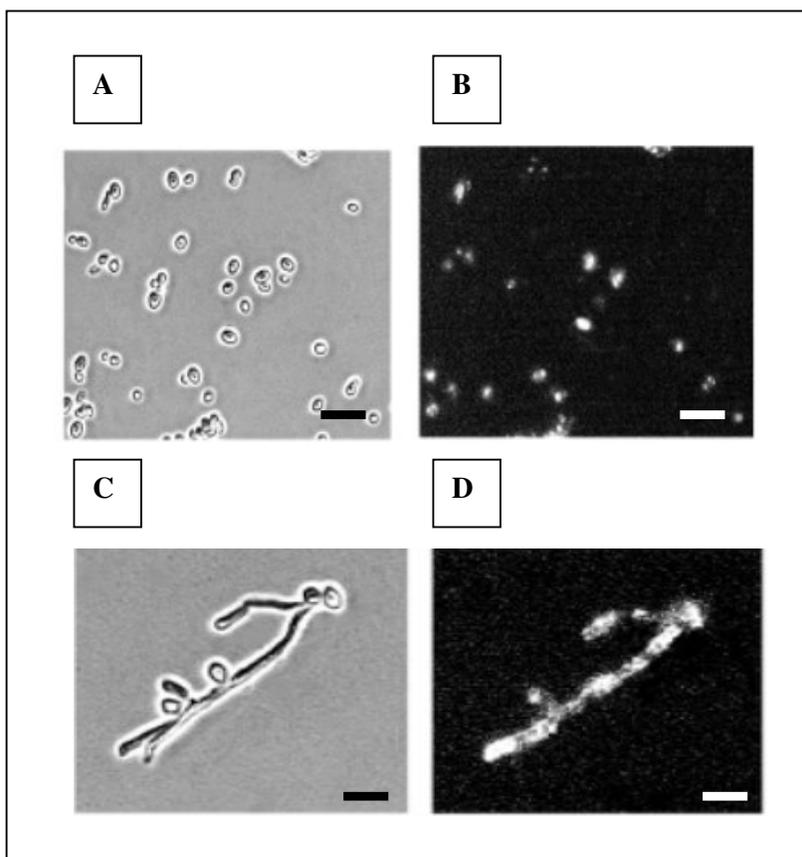


Fig. III.25. Inmunofluorescencia indirecta con el Pab anti-CaHpbp (dilución 1:10). Células levaduriformes (paneles A y B) y filamentos miceliales (paneles C y D) observadas bajo contraste de fases (paneles A y C) y con microscopía de fluorescencia (paneles B y D). Los cultivos de *C. albicans* utilizados en este experimento se obtuvieron en las condiciones de incubación descritas en el apartado 5 de Materiales y Métodos. Barra: 10 μm .

4.2. Inmunotransferencia (Western immunoblotting).

Como se ha descrito anteriormente, el estudio informático de la secuencia del producto del gen *CaHPB*, sugirió que la especie CaHpbp podía tratarse de una proteína de secreción tipo hidrofobina, familia de moléculas no identificadas hasta el momento en *C. albicans*, o bien de una proteína anclada a la pared celular a través de un motivo GPI. Con objeto de dilucidar esta disyuntiva así como para caracterizar la/s especie/s

molecular/es responsable/s de la reactividad observada frente al PAb anti-CaHpbp mediante inmunofluorescencia, se procedió a ensayar la reactividad de dicho anticuerpo frente a extractos de paredes celulares aisladas, obtenidos mediante tratamiento con diversos agentes (ver apartado 25 de Materiales y Métodos). Las muestras obtenidas fueron sometidas a SDS-PAGE, tras lo que los polipéptidos separados electroforéticamente fueron transferidos a soportes de PVDF y finalmente inmunodetectados con el PAb anti-CaHpbp (utilizado a una dilución 1:500).

Como se muestra en la Fig. III.26., no se detectaron bandas reactivas frente al PAb anti-CaHpbp en los extractos obtenidos mediante tratamiento con Zimoliasa (calles 5 y 6), Glucanex[®] (calles 7 y 8). Sin embargo, tanto en los lisados celulares totales (calles 1 y 2) como en los extractos que contenían los componentes solubilizados con SDS (calles 3 y 4), se detectó la presencia de un polipéptido con una movilidad electroforética que correspondía a un peso molecular aparente de 25 kDa, y que era reconocido específicamente por el PAb anti-CaHpbp (Fig. III.26., flecha). Aunque la especie inmunorreactiva se detectó tanto en los extractos obtenidos de células levaduriformes como miceliales, la intensidad de la señal fue mayor en este último caso, lo que indica que en las células crecidas en condiciones adecuadas para inducir la formación de tubos germinativos, existe una mayor expresión del producto del gen *CaHPB*, ya que las muestras sometidas a electroforesis contenían, en todos los casos, la misma cantidad de proteína total. El peso molecular calculado para la especie inmunorreactiva frente al PAb anti-CaHpbp, se corresponde con el calculado a partir de la secuencia de aminoácidos deducida de la secuencia nucleotídica del gen *CaHPB* previamente aislado y caracterizado. La presencia de una banda con un peso molecular aparente de 51 kDa que también fue reconocida por el PAb anti-CaHpbp en el lisado celular total (Fig. III.26., calle 2), podría corresponder a un dímero de la especie de 25 kDa formado como consecuencia de las condiciones experimentales utilizadas, aunque también podría representar otra forma citosólica nativa del producto del gen *CaHPB*, que posteriormente sería escindida para dar la forma madura que se encontraría asociada a la superficie de las células de *C. albicans*.

Estos resultados estaban en concordancia con la predicción del estudio informático, que sugería que el producto del gen *CaHPB* no se trataba de una proteína anclada a la superficie celular a través de un motivo GPI, sino que probablemente fuese excretada al medio.

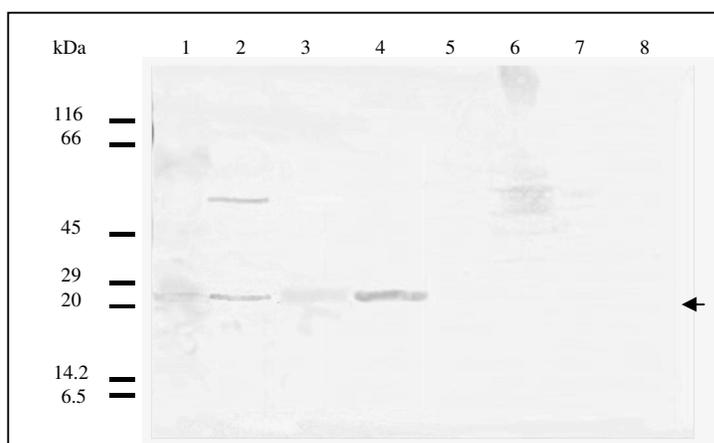


Fig. III.26. Inmunodetección (Western immunoblotting) sobre papel PVDF de especies reactivas frente al PAb anti-CaHpbp (dilución 1:500) presentes en los diferentes extractos obtenidos a partir de células levaduriformes (calles 1, 3, 5, 7) y miceliales (calles 2, 4, 6, 8) de la cepa SC5314 de *C. albicans*. Lisados celulares totales (calles 1 y 2), y extractos obtenidos mediante tratamiento secuencial de las paredes celulares aisladas con SDS (calles 3 y 4), y posteriormente con Zimoliasa (calles 5 y 6) o Glucanex[®] (calles 7 y 8). La flecha indica un polipéptido de 25 kDa que exhibe reactividad frente al PAb anti-CaHpbp. A la izquierda se muestra la movilidad electroforética de estándares preteñidos de peso molecular conocido, corridos en paralelo. La electroforesis se llevó a cabo en geles de poliacrilamida del 12%.

El análisis mediante inmunotransferencia de los extractos obtenidos mediante solubilización con SDS al 2% a partir de células miceliales de *C. albicans*, cosechadas a distintos tiempos de incubación mostró, en todos los casos, la presencia de una banda con un peso molecular aparente de 25 kDa, que fue el único componente presente en los diferentes extractos que exhibió reactividad frente al PAb anti-CaHpbp (Fig. III.27.). Teniendo en cuenta que las muestras sometidas a electroforesis contenían la misma

cantidad de proteína total, estos resultados sugieren que la presunta hidrofobina de *C. albicans* se expresa prontamente, y además su concentración relativa parece aumentar a medida que progresa el crecimiento de las células en el cultivo. De todas formas, es difícil establecer una correlación entre la intensidad de la reacción coloreada que se obtiene mediante la peroxidasa acoplada al segundo anticuerpo utilizado en la reacción de inmunotransferencia y la concentración del polipéptido inmunodetectado.

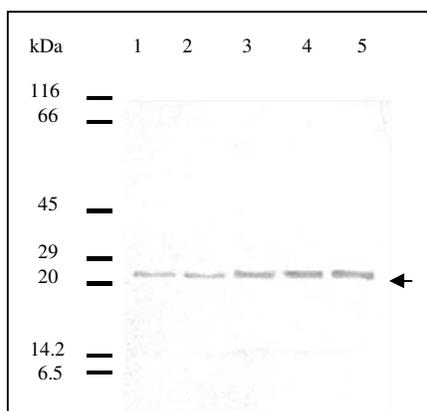


Fig. III.27. Detección de la especie inmunorreactiva frente al Pab anti-CaHpbp presente en los extractos obtenidos mediante tratamiento con SDS al 2% a partir de células miceliales de *C. albicans* SC5314, cosechadas a distintos tiempos de incubación. Las muestras corresponden a células cosechadas a las 3 (calle 1), 4 (calle 2), 5 (calle 3), 6 (calle 4), y 7 (calle 5) horas de incubación en condiciones adecuadas para inducir la formación de micelio. A la izquierda del panel se indica la movilidad electroforética de estándares de peso molecular conocido, corridos en paralelo. La electroforesis se llevó a cabo en geles de poliacrilamida al 12%.

Con objeto de determinar el efecto combinado de diferentes condiciones de crecimiento y de extracción/solubilización, para establecer el protocolo más adecuado para la eventual purificación de la hidrofobina, se procedió a analizar mediante inmunotransferencia, utilizando el PAb anti-CaHpbp como sonda, los extractos obtenidos mediante diferentes tratamientos a partir de células crecidas a distintas temperaturas. Los resultados más significativos, así como las condiciones experimentales básicas, se muestran en la Fig. III.28. En todos los casos se detectó la

presencia de la banda de 25 kDa (Fig. III.28., flecha). La intensidad de las bandas inmunodetectadas con el PAb anti-CaHpbp fue similar en todos los casos. La banda con un peso molecular aparente de 50 kDa en los extractos obtenidos en condiciones alcalinas (pH 9) (Fig. III.28., calles 4-6), podría representar un dímero de la especie nativa de 25 kDa que se formaría como consecuencia de las condiciones experimentales utilizadas en este caso. La especificidad de la reacción con el PAb anti-CaHpbp fue muy elevada, ya que la tinción con azul de Coomassie de geles en los que se habían sometido en paralelo a electroforesis muestras de los diferentes extractos mostrados en la Fig. III.28., reveló la existencia de un gran número de polipéptidos (entre 20 y 30 según los casos) que no exhibieron reactividad frente al anticuerpo (resultados no mostrados).

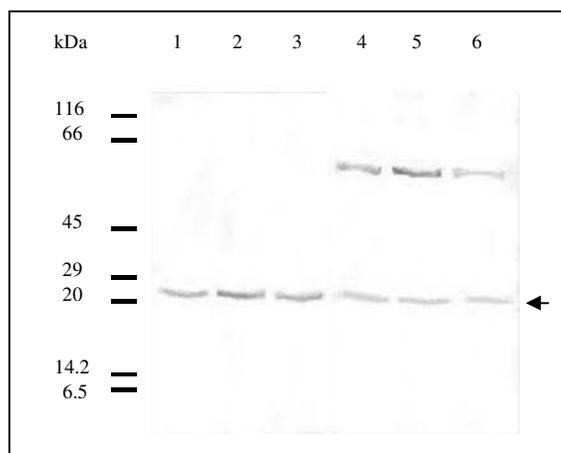


Fig. III.28. Detección de la especie inmunorreactiva frente al Pab anti-CaHpbp, presente en los extractos obtenidos mediante tratamiento con SDS al 2% en Tris-HCl 10 mM a pH de 7,4 (calles 1-3) y con SDS al 1% en Tris-HCl 25 mM a pH de 9,0 (calles 4-6) de células levaduriformes procedentes de cultivos incubados durante 4 h a 37°C (calles 2 y 5), y durante 4 h a 28°C (calles 3 y 6), así como de células incubadas en condiciones adecuadas para inducir la miceliación a 37°C durante 4 horas (calles 1 y 4). A la izquierda del panel se indica la movilidad electroforética de estándares de peso molecular conocido, corridos en paralelo. La electroforesis se llevó a cabo en geles de poliacrilamida al 12%.

El tratamiento de las células con etanol al 60% (v/v) también provocó la solubilización de la especie de 25 kDa inmunorreactiva frente al PAb anti-CaHpbp, aunque en este caso los extractos contenían un menor número de especies polipeptídicas

que los obtenidos mediante otros tratamientos, según se desprende de la tinción de los geles con azul de Coomassie (comparar calles A y B en la Fig. III.29.), que reveló tan sólo unas 5 bandas mayoritarias (Fig. III.29., calle B), de las que una de ellas correspondió a la potencial hidrofobina de 25 kDa de *C. albicans* (Fig. III.29., calle C), lo que indica que el tratamiento con etanol solubilizaba mucho más selectivamente esta especie que el SDS. Por otro lado, aunque el análisis informático de la secuencia de aminoácidos codificada por el gen *CaHPB* (ver apartados 2.7 de este mismo capítulo de Resultados y Discusión) no detectó la existencia de sitios de *N*-glicosilación en la misma, se observó que la especie de 25 kDa mostraba reactividad, frente a la Concanavalina A (Con A) (Fig. III.29., calle D), una lectina que reconoce específicamente los restos no reductores de α -D-glucosa y α -D-manosa presentes en las glico(mano)proteínas. Así mismo, el análisis de la secuencia aminoacídica puso de manifiesto la existencia de una región con características de péptido señal, consustancial con el carácter de proteína de secreción. Esa región formada por una secuencia de 20 aminoácidos no se encuentra en la proteína madura que, sin embargo exhibe una movilidad electroforética que corresponde a un peso molecular de 25 kDa. La diferencia (unos 2 kDa) entre el peso molecular calculado a partir de la secuencia aminoacídica deducida, descontando el péptido señal (alrededor de 23 kDa), y el de la proteína detectada en los geles de poliacrilamida (25 kDa), podría deberse a la existencia de un pequeño número restos de manosa y/o glucosa unidos por enlaces *O*-glicosídicos, que serían los responsables de la reactividad observada frente a la Con A. Aunque sean, en general, moléculas de pequeño tamaño, la observación realizada en la presente memoria sobre la existencia de un cierto grado de glicosilación en la presunta hidrofobina de *C. albicans* no es excepcional. Concretamente, la criparina, una hidrofobina de clase II de 36 kDa presente en la superficie celular del hongo *Cryphonectria parasitica*, y que también es excretada al medio, está glicosilada (McCabe and Van Alfen, 1999).

Con objeto de establecer si la especie CaHpbp se excretaba también al medio como sucede en el caso de otras hidrofobinas fúngicas previamente caracterizadas (McCabe and Van Alfen, 1999; Scholtmeijer *et al.*, 2001; Wösten, 2001) se procedió a realizar el experimento de adhesión a perlas de vidrio descrito en el apartado 27 del capítulo de Materiales y Métodos, consistente en incubar las células en presencia de

perlas de vidrio (ballotini) en el medio de cultivo durante 6 h a 37°C y 6 h a 28°C (cultivos de células levaduriformes), y durante 6 h a 37°C en condiciones adecuadas para inducir la germinación. De esta forma se intentaba ver si la presunta hidrofobina de *C. albicans* que pudiera excretarse al medio, era capaz de adsorberse a la superficie de las perlas de vidrio, debido a su probable naturaleza antipática (Wösten, 2001). Finalizadas las respectivas incubaciones, las perlas de vidrio fueron separadas del medio y de las células, lavadas y sometidas a extracción con SDS al 2% en condiciones alcalinas. Los extractos obtenidos fueron analizados mediante inmunotransferencia, utilizando el PAb anti-CaHpbp como sonda. En todos los casos se apreció la presencia de una banda de 25 kDa que exhibía inmunorreactividad frente al anticuerpo, lo que indicaba que la especie CaHpbp era liberada también al medio extracelular y que tenía el comportamiento esperado de presunta hidrofobina, al ser capaz de adherirse a la superficie de las perlas de vidrio. Nuevamente, se detectó una banda con un peso molecular aproximado de 50 kDa que, como anteriormente se comentó, podría representar un dímero de la especie nativa de 25 kDa que se formaría como consecuencia del pH alcalino de las condiciones experimentales utilizadas en este caso para llevar a cabo la solubilización de la hidrofobina (Fig. III.30.).

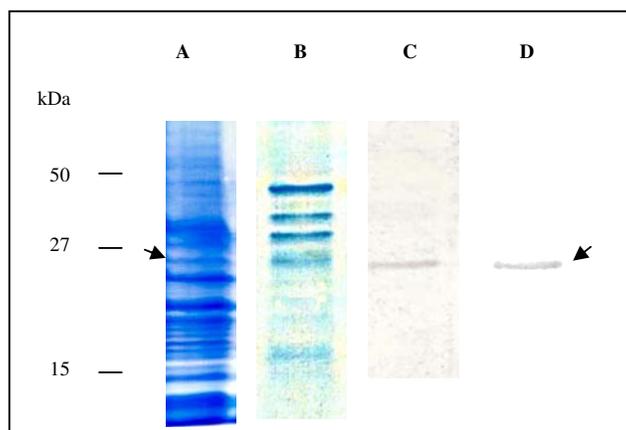


Fig. III.29. Tinción con azul de Coomassie (calles A y B), inmunodetección con el PAb anti-CaHpbp (calle C), y tinción con Concanavalina A (calle D) de los polipéptidos solubilizados con SDS al 2% (calle A) y con etanol al 60% (v/v) (calles B, C, y D) a partir de células intactas de *C. albicans* crecidas en condiciones adecuadas para inducir el crecimiento en

forma de micelio. Los extractos fueron sometidos a electroforesis en geles de poliacrilamida del 12%.

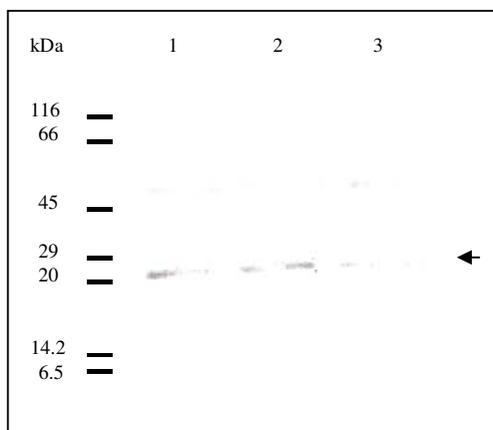


Fig. III.30. Detección de la especie inmunorreactiva frente al Pab anti-CaHpbp, presente en los extractos obtenidos mediante tratamiento con SDS al 2% a pH de 9.0 a partir de perlas de vidrio presentes en cultivos de células levaduriformes incubadas 6 h a 37°C (calle 1), y 6 h a 28°C (calle 2), y durante 6 h a 37°C en condiciones adecuadas para inducir la germinación (calle 3). A la izquierda del panel se indica la movilidad electroforética de estándares de peso molecular conocido, corridos en paralelo. La electroforesis se llevó a cabo en geles de poliacrilamida al 12%.

Todos los resultados mostrados hasta el momento, indicaban que la proteína reconocida por el PAb anti-CaHpbp está asociada a la superficie de las células de *C. albicans* a través de interacciones débiles, susceptibles al efecto solubilizador del SDS o del etanol, expresándose principalmente en los tubos germinativos (micelio) así como en las células levaduriformes incubadas a 37°C, lo que sugiere que la síntesis de esta molécula depende, entre otros posibles factores como podría ser la transición morfológica levadura-micelio, de la temperatura de crecimiento. De todas formas, las evidencias experimentales obtenidas también indican que la especie CaHpbp podría ser excretada de forma activa al medio extracelular, lo que sería coherente con la detección de una secuencia típica de péptido señal en la secuencia aminoacídica deducida de la

misma, característica de una proteína de secreción, tal como se comentó con anterioridad.

El conjunto de evidencias obtenidas inducen a pensar que en *C. albicans* existiría una proteína que por sus características moleculares y funcionales (homología de secuencias de nucleótidos y aminoácidos con la presencia de 8 restos de cisteína en posiciones altamente conservadas, peso molecular, sensibilidad a la solubilización con SDS y etanol, asociación con la superficie celular, y liberación al medio extracelular), podría corresponder a una hidrofobina de clase II, cuya existencia no ha sido demostrada hasta ahora en el hongo *C. albicans*, aunque si han sido caracterizadas en otras especies fúngicas (**Kershaw and Talbot, 1998; Scholtmeijer et al., 2001; Wösten, 2001**). El hecho de que la presunta hidrofobina se exprese principalmente en la fase micelial de *C. albicans* podría tener relación con la observación realizada previamente por otros autores, que han encontrado que los tubos germinativos exhiben una hidrofobicidad de la superficie celular (HSC) superior a la de las células levaduriformes, y que la pared celular de aquellos contiene una mayor variedad de proteínas y glico(mano)proteínas hidrofóbicas que la de las levaduras (**Hazen et al., 1988; Hazen, 1990; López-Ribot et al., 1991**). La HSC parece jugar un papel importante como factor de virulencia en la interacción hospedador-parásito en microorganismos patógenos, incluyendo *C. albicans* (**Chaffin et al., 1998; Hazen, 1990**). En general, las blastosporas germinadas exhiben una capacidad de adherencia a los substratos superior a la que poseen las células levaduriformes. Puesto que la transición morfológica de levadura a micelio parece estar relacionada con el cambio del carácter comensal a patógeno en *C. albicans*, la presencia de una hidrofobina en la superficie celular de este hongo, podría tener un importante papel como factor de virulencia, contribuyendo a incrementar la capacidad del hongo para interactuar de una forma mucho más eficiente con la superficie de los tejidos animales o de materiales sintéticos empleados para la fabricación de prótesis quirúrgicas y objetos de uso clínico, debido a las especiales características que poseen las hidrofobinas (**Scholtmeijer et al., 2001; Wösten, 2001**).

4.3. Estudio de la especie CaHpbp mediante marcaje con L-[³⁵S] cisteína.

Teniendo en cuenta la presencia de los 8 restos de cisteínas en la secuencia aminoacídica de la presunta hidrofobina de *C. albicans* (ver Fig. III.7. del apartado 1.3 de este capítulo de Resultados y Discusión), se procedió a intentar llevar a cabo el marcaje específico *in vivo* de esta molécula mediante la incubación de las células en un medio de cultivo que contenía un precursor metabólico radioactivo, la L-[³⁵S] cisteína, cuya incorporación en la especie CaHpbp de 25 kDa debería producirse, por razones obvias, con una elevada actividad específica. El objetivo de esta experiencia era poner a punto un método que permitiera, eventualmente, un estudio detallado de la biosíntesis, secreción y función de esta molécula a nivel celular, así como facilitar la caracterización y purificación *in vitro* de la misma, tanto desde el punto de vista cualitativo como cuantitativo.

Siguiendo el protocolo descrito en el apartado 32 del capítulo de Materiales y Métodos, similar al descrito por **McCabe and Neal (1999)** con ligeras modificaciones, las células fueron marcadas metabólicamente con L-[³⁵S] cisteína, cosechadas, y sometidas básicamente a los mismos tratamientos indicados en el apartado anterior (4.2) de este mismo capítulo, con objeto de conseguir la solubilización de la hidrofobina. Seguidamente, se procedió a llevar a cabo un análisis cuantitativo y cualitativo de la radioactividad debida a la L-[³⁵S] cisteína presente en los diferentes extractos. Los ensayos se realizaron por triplicado y los resultados obtenidos, que se muestran en la Fig. III.31., confirman las observaciones previas en el sentido de que los tratamientos con SDS y con etanol eran los que mostraban una mayor eficiencia solubilizadora, detectándose diferencias cuantitativas significativas en la cantidad de radioactividad solubilizada a partir de las células de *C. albicans* crecidas en forma de micelio o de levadura, y también en función de la temperatura de incubación (37°C frente a 28°C). Por otro lado, la cantidad de radiactividad liberada al medio fue mínima comparada con la que se detectó asociada a las células, lo que indica que la L-[³⁵S] cisteína se incorpora mayoritariamente en proteínas ligadas a estructuras celulares. De todos modos, aunque una cantidad significativa de la hidrofobina puede encontrarse asociada a la superficie

de las células de *C. albicans* para participar, muy probablemente, en la interacción del hongo con el medio ambiente extracelular, la especie de 25 kDa también es excretada al medio de cultivo.

Con el fin de identificar la/s especie/s molecular/es responsable/s presente/s en los distintos extractos, que habían incorporado la L-[³⁵S] cisteína, entre las que debía encontrarse, presuntamente, la molécula CaHpbp de 25 kDa, se procedió a realizar un análisis mediante SDS-PAGE y fluorografía de los extractos obtenidos mediante tratamiento con SDS al 1% (a pH 7,4 y 9) y con etanol al 60%, por ser éstos en los que se habían detectado los valores más elevados de radiactividad solubilizada a partir de las células marcadas (Fig. III.31.). La fluorografía (Fig. III.32.) reveló la existencia de un número relativamente bajo de especies proteicas, distribuidas en un rango de pesos moleculares que iba desde 10 hasta 250 kDa, y puso de manifiesto diferencias significativas entre los patrones polipeptídicos tanto en función del tipo de células (levaduras y de tubos germinativos) a partir de las que se obtuvieron las muestras, como del agente solubilizante empleado. Nuevamente, los extractos obtenidos con etanol al 60% contuvieron un menor número de especies polipéptidicas (Fig. III.32., calles 1-3), lo que indica que el tratamiento con etanol tiene un efecto solubilizador más selectivo que el SDS.

Alícuotas de los diferentes extractos etanólicos radiactivos obtenidos a partir de células incubadas a 37°C en condiciones adecuadas para inducir la formación de tubos germinativos, así como de células levaduriformes crecidas tanto a 28°C como a 37°C, se sometieron a inmunoprecipitación con el PAb anti-CaHpbp siguiendo el protocolo que se describe en el apartado 36 del capítulo de Materiales y Métodos. Seguidamente, los inmunoprecipitados obtenidos fueron analizados mediante SDS-PAGE y fluorografía, mostrándose los resultados conseguidos en la Fig. III.33. Como se puede apreciar en la misma, el PAb anti-CaHpbp precipitó con una elevada especificidad a la especie CaHpbp presente en los distintos extractos, ya que en todos los casos se apreciaron, tanto mediante tinción de Coomassie (Fig. III.33., panel A) como por fluorografía (Fig. III.33., panel B), dos bandas mayoritarias, una con una movilidad electroforética que corresponde a un peso molecular de unos 55 kDa

aproximadamente y que representa el complejo formado por la mitad de la molécula de IgG y el antígeno (la especie CaHpbp), y otra de 25 kDa que corresponde a la hidrofobina CaHpbp. En todos los casos se puso de manifiesto la gran especificidad del PAb anti-CaHpbp.

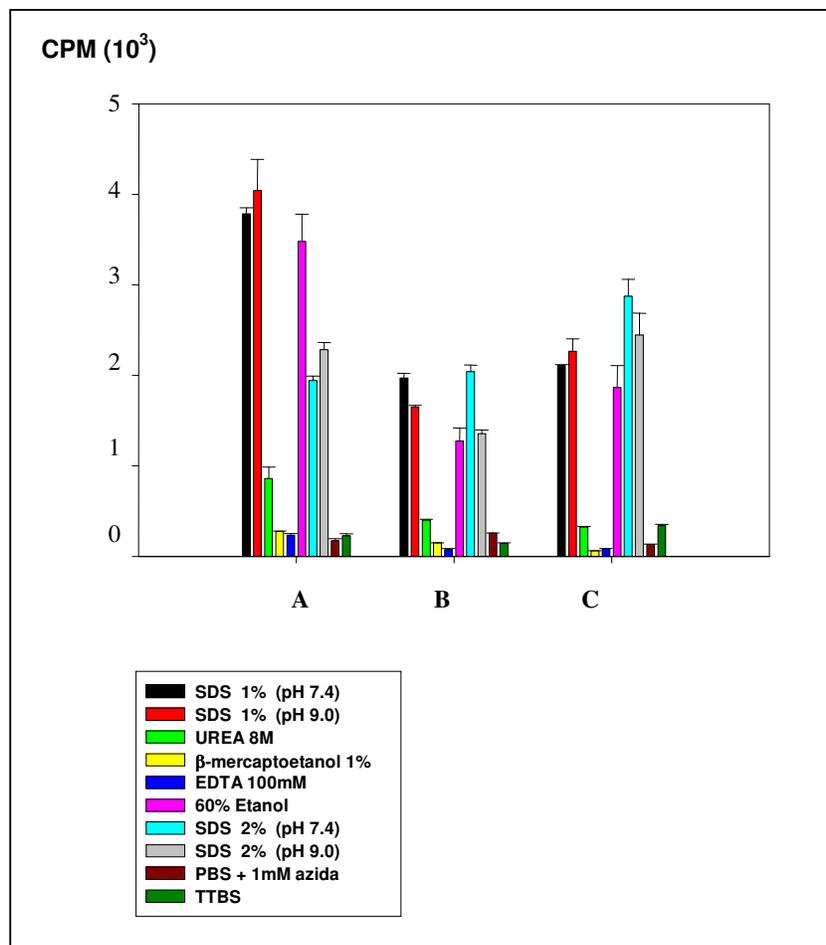


Fig. III.31. Solubilización de especies proteicas a partir de células marcadas metabólicamente con L-[³⁵S] cisteína, mediante diferentes tratamientos (para más información sobre los detalles técnicos de cada método de solubilización, consultar el apartado 26 del capítulo de Materiales y Métodos). Los extractos se obtuvieron a partir de células crecidas a 37°C en condiciones adecuadas para inducir la formación de tubos germinativos (A), de levaduras incubadas a 28°C (B), y de levaduras incubadas a 37°C en condiciones no inductoras de la germinación (C).

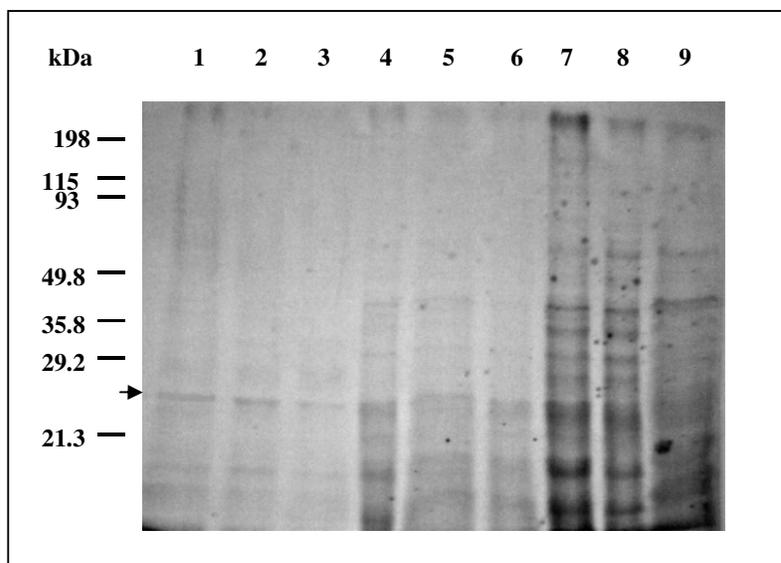


Fig. III.32. Análisis mediante SDS-PAGE y fluorografía de los extractos obtenidos por tratamiento con etanol al 60% (calles 1-3), SDS al 1% a pH 7,4 (calles 4-6), y SDS al 1% a pH 9 (calles 7-9), a partir de células incubadas a 37°C en condiciones adecuadas para inducir la formación de tubos germinativos (calles 1, 4, y 7), y de células levaduriformes crecidas a 28°C (calles 2, 5 y 8) y a 37°C (calles 3, 6 y 9), en presencia de L-[³⁵S] cisteína en todos los casos. Las muestras aplicadas en cada calle contenían 3×10^5 cpm totales. La posición de la especie CaHpbp de 25 kDa se indica con una flecha. A la izquierda de la figura se muestra la movilidad electroforética de estándares de peso molecular conocido, corridos en paralelo. La electroforesis se llevó a cabo en geles de poliacrilamida al 12%.

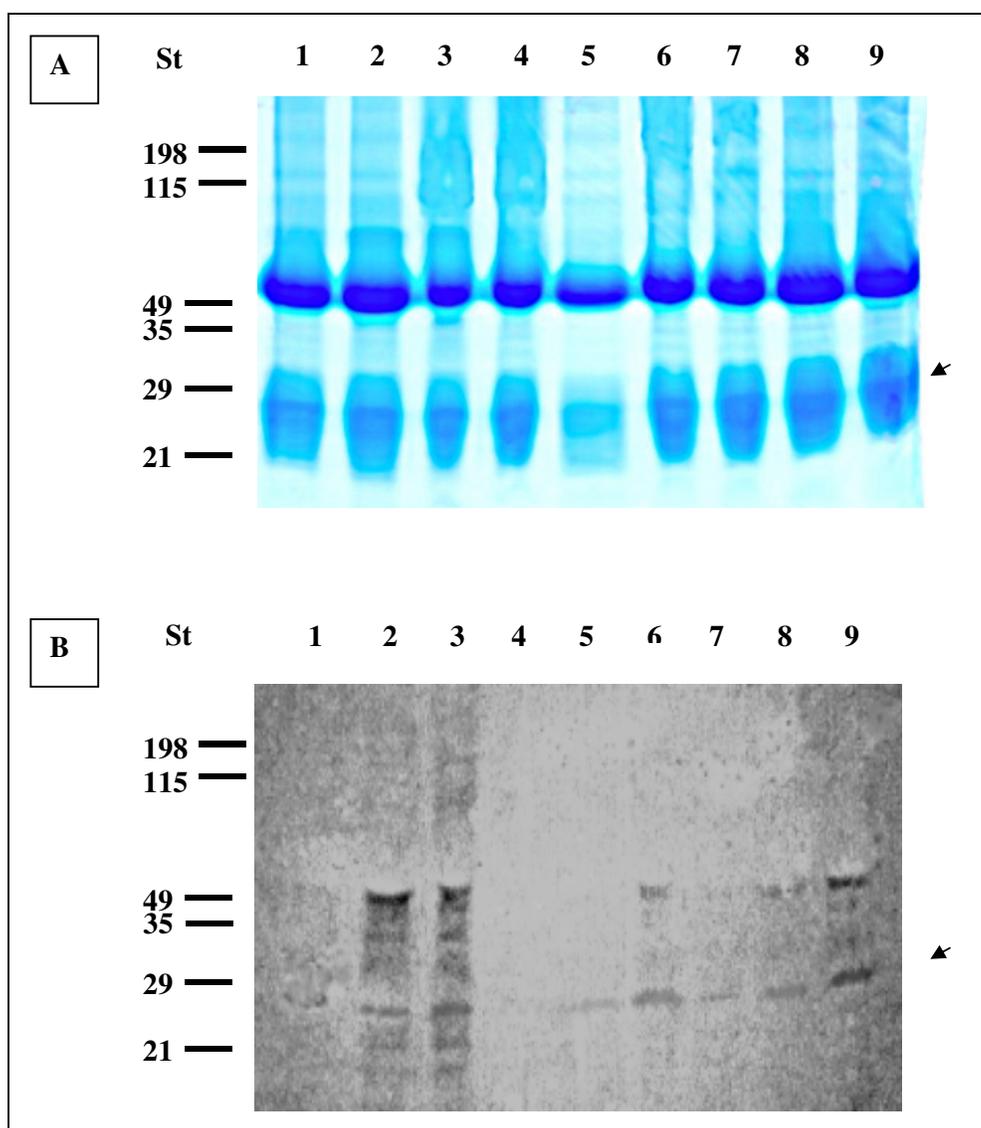


Fig. III.33. Análisis mediante SDS-PAGE del material obtenido por inmunoprecipitación con el PAb anti-CaHpbp a partir de extractos etanólicos de células de *C. albicans* incubadas a 37°C en condiciones adecuadas para inducir la formación de tubos germinativos (calles 1, 2, y 3), y de células levaduriformes crecidas a 28°C (calles 4, 5 y 6) y a 37°C (calles 7, 8 y 9), en presencia de L-[³⁵S] cisteína en todos los casos. Tras la electroforesis, los geles de poliacrilamida fueron teñidos con azul de Coomasie (panel A) y procesados posteriormente para fluorografía (panel B). Las muestras sometidas a electroforesis contenían 2×10^5 (calles 1, 4, y 7), 4×10^5 (calles 2, 5, y 8), y 6×10^5 (calles 3, 6, y 9) cpm totales. A la izquierda de cada panel se indica la movilidad electroforética de estándares de peso molecular conocido, corridos en paralelo. La electroforesis se llevó a cabo en geles de poliacrilamida al 12%.

4.4. Interacciones en una interfase agua/aceite.

Con el fin de poner de manifiesto posibles interacciones entre las células de *C. albicans* y el medio ambiente extracelular, en el que éstas se encuentran, que pudieran estar mediadas por la especie CaHpbp, teniendo en cuenta las peculiares propiedades biológicas y físico-químicas de las hidrofobinas, se procedió a realizar un experimento en el que se inocularon células levaduriformes (a una DO_{600} de 0.2) de *C. albicans* SC5314 en tubos conteniendo 10 ml de medio de Lee y 5 ml de aceite de oliva estéril, llevándose a cabo la incubación en condiciones adecuadas para inducir la formación de tubos germinativos (las células inoculadas se sometieron a choque térmico y la incubación se llevó a cabo a 37°C, con agitación suave). Los resultados de este experimento se muestran en la Fig. III.34.

Como se puede observar, entre 14 y 24 horas de incubación las células, que en su mayoría eran blastosporas que habían formado tubos germinativos, aparecían localizadas en las proximidades de la interfase agua/aceite, quedando en gran medida adheridas a la misma (Fig. III.34., paneles A y B). La incubación se prolongó durante varios días (entre 2 y 7, según los casos), al cabo de los cuales se procedió a vaciar por decantación el contenido de los tubos, observándose la presencia de una masa de células pegadas a la superficie del vidrio en aquellas zonas en donde había existido contacto con la fase hidrofóbica (Fig. III.34., paneles C y D).

El análisis mediante inmunofluorescencia indirecta de muestras tomadas de la interfase agua/aceite puso de manifiesto la existencia de fluorescencia alrededor de las micelas o microgotas de aceite (Fig. III.34., paneles H, I, y J), debida aparentemente a la deposición sobre las mismas de una película de hidrofobinas. Una observación semejante ha sido descrita por otros autores, aunque utilizando una aproximación experimental diferente (**Wösten *et al.*, 1994 a**). La reacción de inmunofluorescencia observada fue específica ya que en ausencia del primer anticuerpo específico (PAb anti-CaHpbp), no se apreció la presencia de la película fluorescente sobre la superficie de las gotículas de aceite. Los resultados mostrados indican que la especie CaHpbp excretada al medio por las células miceliales era capaz de formar una película anfipática

alrededor de una superficie hidrofóbica, como consecuencia de las propiedades anfipáticas de estas moléculas (Scholtmeijer *et al.*, 2001; Wösten, 2001; Wösten *et al.*, 1994 a), permitiendo al mismo tiempo la interacción de las células del hongo con un entorno hidrofóbico como la superficie de vidrio de los tubos en contacto con el aceite.

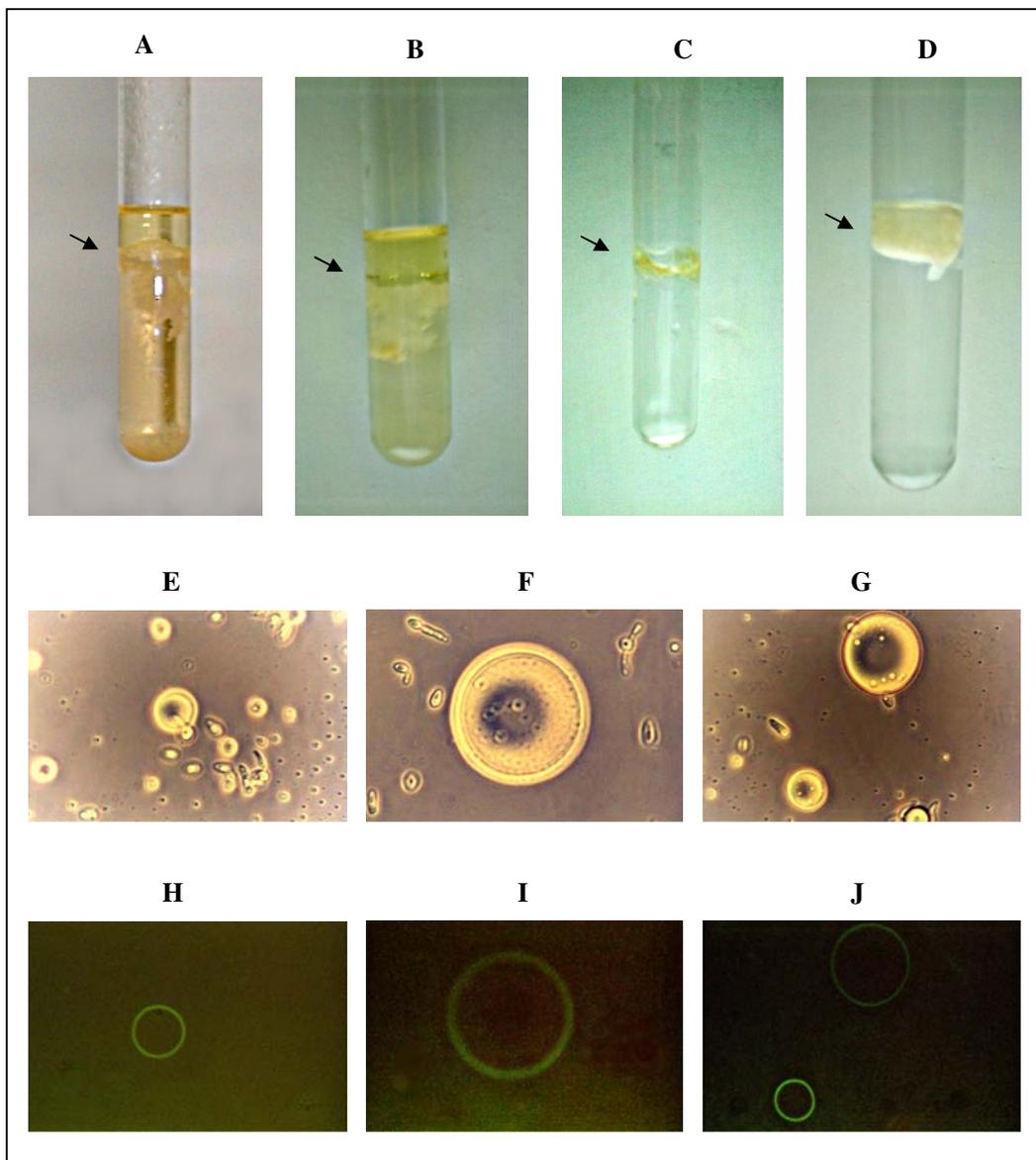


Fig. III.34. Cultivos de células de *C. albicans* incubadas en condiciones adecuadas para inducir la formación de tubos germinativos durante 14 (panel A) y 24 (panel B) horas en tubos que contienen medio de Lee y aceite de oliva estéril. En ambos paneles, las flechas indican la

localización del micelio de *C. albicans* adherido a la interfase agua/aceite. Los paneles C y D muestran acúmulos de células en las zonas de la interfase hidrofílica/hidrofóbica (flechas), que permanecen adheridas a la superficie de vidrio de los tubos tras decantar el líquido de los cultivos incubados durante 2 (panel C) y 7 (panel D) días respectivamente. Observación bajo microscopía óptica de contraste de fases (paneles E, F, y G) y de fluorescencia (paneles H, I, y J) de micelas de aceite procedentes de la zona de la interfase hidrofílica/hidrofóbica de los cultivos, que se hicieron reaccionar previamente con el PAb anti-CaHpbp y el segundo anticuerpo anti-IgG de conejo acoplado a FITC.

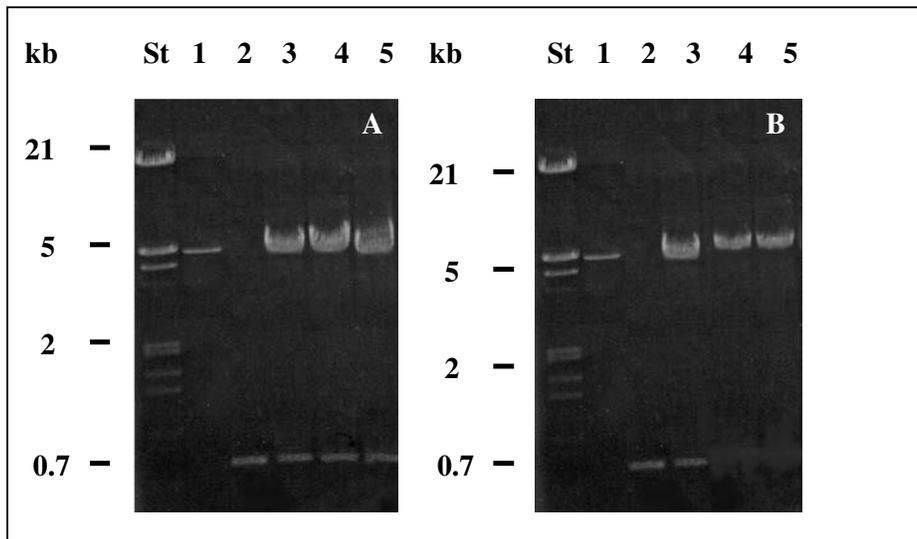
4.5. Subclonaje de la región codificante del gen *CaHPB* de *C. albicans* en el vector de expresión pGEX-4T-3.

Tras la caracterización molecular y funcional de la especie CaHpbp de *C. albicans*, el siguiente objetivo que se planteó fue la obtención de dicha proteína en forma recombinante. Para ello, tras la clonación del gen que codifica para la CaHpbp en el vector pUC18, que se ha descrito en un apartado anterior, se procedió a subclonar la región codificante del gen *CaHPB* en el vector de expresión pGEX-4T-3. En primer lugar, se amplificó por PCR la región codificante del gen *CaHPB*, a partir del plásmido que lo contenía, utilizando dos oligonucleótidos (ver tabla II.3. de Materiales y Métodos) diseñados a partir de la secuencia nucleotídica de dicho gen. Para facilitar el subclonaje en el vector pGEX-4T-3, se introdujo un sitio *Bam* HI en el extremo 5' del cebador reverse y un sitio *Eco* RI en el extremo 5' del cebador forward y a éste último se le añadieron dos codones de terminación en fase con respecto al que ya contenía el gen *CaHPB*. El producto de PCR se analizó por electroforesis en gel de agarosa, comprobándose que se había obtenido un fragmento de 787 pb. La banda correspondiente se eluyó a partir del gel y se sometió a digestión con las enzimas de restricción *Eco* RI y *Bam* HI. Por último, el material digerido, se volvió a someter a una electroforesis en gel de agarosa y se eluyó a partir del gel, conservándose seguidamente a -20°C.

Paralelamente, se purificó el ADN plasmídico de la cepa *E. coli* JM109 que contenía el vector de expresión pGEX-4T-3. El plásmido se sometió a una digestión doble con *Eco* RI y *Bam* HI, seguida del análisis por electroforesis en gel de agarosa, que reveló la presencia de un fragmento de 4,9 Kb, que se recuperó del gel y se conservó a -20°C.

Por último el producto de PCR se mezcló con el ADN correspondiente al vector en las condiciones adecuadas para llevar a cabo el ligamiento y posterior transformación de *E. coli* (ver apartados 11 y 12 del capítulo de Materiales y métodos), obteniéndose un nuevo plásmido que se denominó pXBP (Fig. III.35.). En dicho plásmido, el promotor *tac* controla la producción de una proteína de fusión formada por la GST (ver apartado 2 de Materiales y Métodos) y la proteína CaHpbp, ya que las dos secuencias codificantes se hallan unidas en la fase adecuada y ambos péptidos están separados por la secuencia reconocida por la trombina. En el extremo 3', además del codón de terminación de la traducción presente en la secuencia del gen *CaHPB*, hay dos codones de terminación introducidos en el cebador forward empleado para amplificar el gen.

Los resultados mostraron la obtención de una construcción correcta del plásmido pXBP, por lo que era de esperar que la transformación de una cepa de *E. coli* JM109 con dicho plásmido, pudiera permitir, en principio, la expresión de la proteína a gran escala.



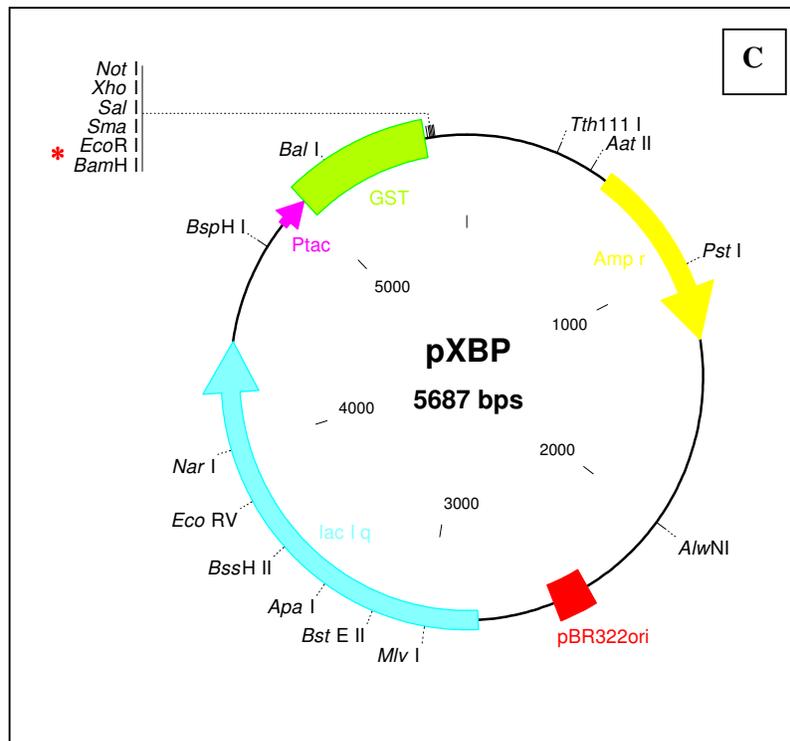


Fig. III.35. Subclonaje de la región codificante del gen *CaHPB* en el vector de expresión pGEX-4T-3. **(A)** Análisis de transformantes mediante purificación por minilisis alcalina y digestión con *Bam* HI y *Eco* RI, en geles de azarosa al 0,8%. El fragmento de 0,787 kb corresponde a la región codificante de la proteína CaHpbp y el de 4,9 kb al vector pGEX-4T-3. De todos los transformantes analizados se escogió el que se muestra en la calle 3, al que se denominó pXBP. Las calles 1 y 2 se utilizaron como controles positivos del vector y del inserto respectivamente (obtenidos por PCR), mientras que en las calles 3, 4 y 5 aparecen las dos bandas correspondientes al vector y al inserto. **(B)** Digestión del pXBP con diferentes enzimas para verificar la existencia del transformante. En las calles 1 y 2 se cargaron los controles positivos del vector y del inserto respectivamente. El pXBP fue digerido con *Bam* HI y *Eco* RI obteniéndose dos fragmentos de 4,9 kb y de 0,7 kb, correspondientes al vector e inserto respectivamente (calle3). Las calles 4 y 5 corresponden al vector linealizado mediante digestión con *Bam* HI y *Eco* RI respectivamente, con un peso aproximado de unas 5,7 kb. En los paneles A y B, la calle marcada como St muestra los estándares de peso molecular conocidos corridos en paralelo. **(C)** Mapa del plásmido pXBP. Inmediatamente después de la GST se encuentra introducida la secuencia codificante del gen *CaHPB* entre las dianas de restricción para *Bam* HI y *Eco* RI (indicadas con un asterisco).

4.6. Inducción de la expresión de la CaHpbp.

Una vez realizada la subclonación de la región codificante del gen *CaHPB* de *C. albicans* en el vector de expresión, se procedió a la inducción de la expresión de la especie CaHpbp, con el fin de poner a punto un método que permitiese obtener eventualmente dicha proteína en grandes cantidades (**Glover and Hames, 1995**).

Como se ha descrito en el apartado anterior, la región codificante del gen *CaHPB* quedaba en fase con la secuencia GST y bajo el control del promotor *tac*, de forma que al inducir su expresión con IPTG, se expresaría una proteína de fusión formada por la GST unida por un pequeño puente de seis aminoácidos a la especie CaHpbp, que constituyen el punto de corte de la trombina, de forma que al actuar la proteasa se liberaría la CaHpbp recombinante con dos aminoácidos adicionales, glicina y serina, justo delante de la primera metionina (ver apartado 2 del capítulo de Materiales y Métodos).

Para determinar si los transformantes obtenidos eran capaces de expresar la proteína de fusión y en que condiciones se obtenía una mayor expresión de la misma, se realizó un primer experimento en el que los cultivos, en fase exponencial de crecimiento, se indujeron con cuatro concentraciones de IPTG (1, 2, 3 y 4 mM), y durante distintos periodos de tiempo (de 0 a 48 h). A una muestra del mismo cultivo no se le añadió IPTG y se mantuvo el mismo número de horas sirviendo de control negativo (proteína no inducida). Tras los diferentes tiempos, las células fueron lavadas y resuspendidas directamente en solución solubilizadora para analizar por SDS-PAGE las proteínas celulares. Las muestras se sometieron a electroforesis por duplicado. Uno de los geles se utilizó para visualizar los polipéptidos separados electroforéticamente mediante tinción con azul de Coomasie, mientras que las especies polipeptídicas del otro gel fueron transferidas a filtros de PVDF e inmunodetectadas con el PAb anti-CaHpbp (utilizado a una dilución 1:500).

Utilizando estas condiciones experimentales no se observó indicio alguno de expresión de la proteína CaHpbp. Ante la sospecha de que se pudieran estar formando

cuerpos de inclusión insolubles constituidos por la proteína de fusión GST-CaHpbp, se procedió a lisar por sonicación (ver apartado 35 del capítulo de Materiales y Métodos) las células en las que se había procedido a inducir la expresión en las mismas condiciones anteriormente citadas. El análisis de los lisados obtenidos mediante SDS-PAGE e inmunotransferencia con el PAb anti-CaHpbp como sonda, puso de manifiesto la existencia de una banda con un peso molecular aparente de 51 kDa cuya intensidad aumentó de forma considerable y progresiva en función del tiempo de inducción en presencia de IPTG (Fig. III.36.A). El peso molecular de este polipéptido se correspondía con el peso molecular predicho para la proteína de fusión (26 kDa de la GST y 25 kDa de la CaHpbp). La intensidad de la banda aumentaba a partir de las 16 horas, hasta llegar a alcanzar un máximo a las 48 horas (Fig. III.36.A, calles 6 y 7 respectivamente), no aumentando ya significativamente la expresión a partir de este momento. La intensidad de la banda fue mayor cuando se indujeron los transformantes con IPTG a una concentración de 2 mM que cuando se utilizaron el resto de concentraciones. La banda de 51 kDa fue reconocida por el anticuerpo PAb anti-CaHpbp junto con otros componentes que podrían representar especies constitutivas presentes en los lisados reactivos frente a la peroxidasa utilizada para el revelado en la técnica de inmunotransferencia, ya que la intensidad de las bandas fue semejante en todas las muestras analizadas a lo largo del tiempo (Fig. III.36.B). Los resultados que se obtuvieron mostraron la expresión de la proteína CaHpbp en las condiciones experimentales utilizadas, aunque debido posiblemente a las peculiares características de las hidrofobinas de clase II (Scholtmeijer *et al.*, 2001; Wösten, 2001; Wösten *et al.*, 1994 a), a la que presuntamente pertenece la especie CaHpbp, la proteína de fusión formaría agregados intracelulares de naturaleza insoluble cuya detección requiere la lisis previa de las células en cuyo interior se han formado.

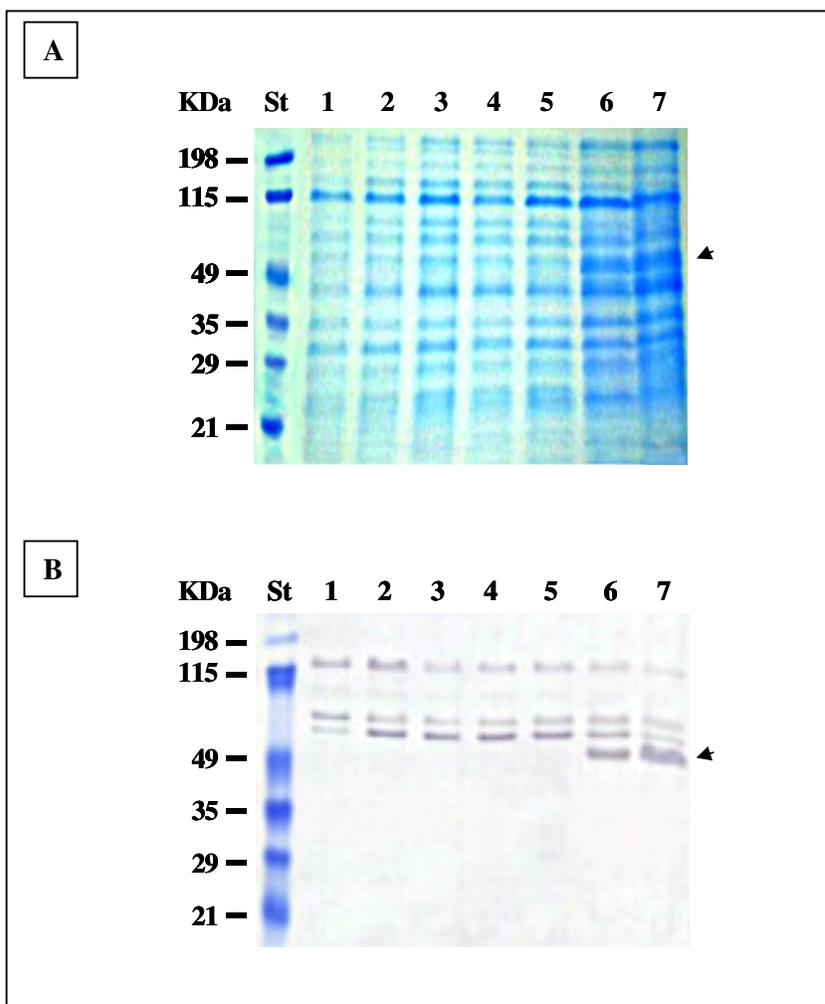


Fig. III.36. Análisis de la expresión de la especie CaHpbp en *E. coli* inducida por una concentración 2 mM de IPTG, mediante SDS-PAGE e inmunotransferencia. En las calles 1, 2, 3, 4, 5, 6 y 7 se aplicaron los lisados obtenidos por sonicación a partir de células recogidas a tiempo 0, a los 30 min, y a las 1, 2, 6, 16, y 48 h de inducción respectivamente. Tras la electroforesis en geles de poliacrilamida al 12%, los polipéptidos fueron visualizados mediante tinción con azul de Coomasie (panel A) o transferidos a filtros de PVDF e inmunodetectados con el PAb anti-CaHpbp (panel B). A la izquierda de cada panel se indica la movilidad electroforética de estándares de peso molecular conocido, corridos en paralelo. La flecha señala la posición de una banda de 51 kDa, cuyo peso molecular corresponde con el predicho para la proteína de fusión (26 kDa de la GST y 25 kDa de la CaHpbp), que comienza a detectarse a partir de las 16 horas de incubación en presencia del inductor.

4.7. Expresión de la especie CaHpbp *in vivo*.

El estudio inmunohistoquímico, realizado sobre muestras de tejido renal procedentes de necropsias de pacientes con candidiasis sistémicas utilizando como sonda el PAb anti-CaHpbp, reveló la existencia de un marcaje superficial heterogéneo e intenso en un 60% aproximadamente de las formas levaduriformes (blastosporas) de *C. albicans* presentes en los cortes de tejidos y con menor intensidad, aunque en un porcentaje semejante, en las formas pseudomiceliales situadas en las mismas áreas. No existió marcaje reseñable de los componentes tisulares humanos presentes en las secciones analizadas, lo que indica el carácter específico del anticuerpo utilizado (Fig. III.37.). El hecho de que la especie CaHpbp se exprese también *in vivo* en la superficie de las células de *C. albicans* que se encuentran infectando tejidos humanos sugiere, en principio, que esta molécula podría jugar un papel en la patogénesis. Teniendo en cuenta sus peculiaridades bioquímicas, la hidrofobina de *C. albicans* puede conferirle al hongo una capacidad adicional para colonizar una gran diversidad de tejidos y órganos, independientemente de las condiciones de hidrofilia/hidrofobia presentes en los mismos. Además, el hecho de que esta molécula sea reconocida específicamente por un anticuerpo policlonal que exhibe una mínima reactividad cruzada con otros componentes macromoleculares presentes en las muestras analizadas, le confiere una utilidad potencial como antígeno marcador para el diseño de un método para el diagnóstico de la candidiasis en su forma sistémica o diseminada.

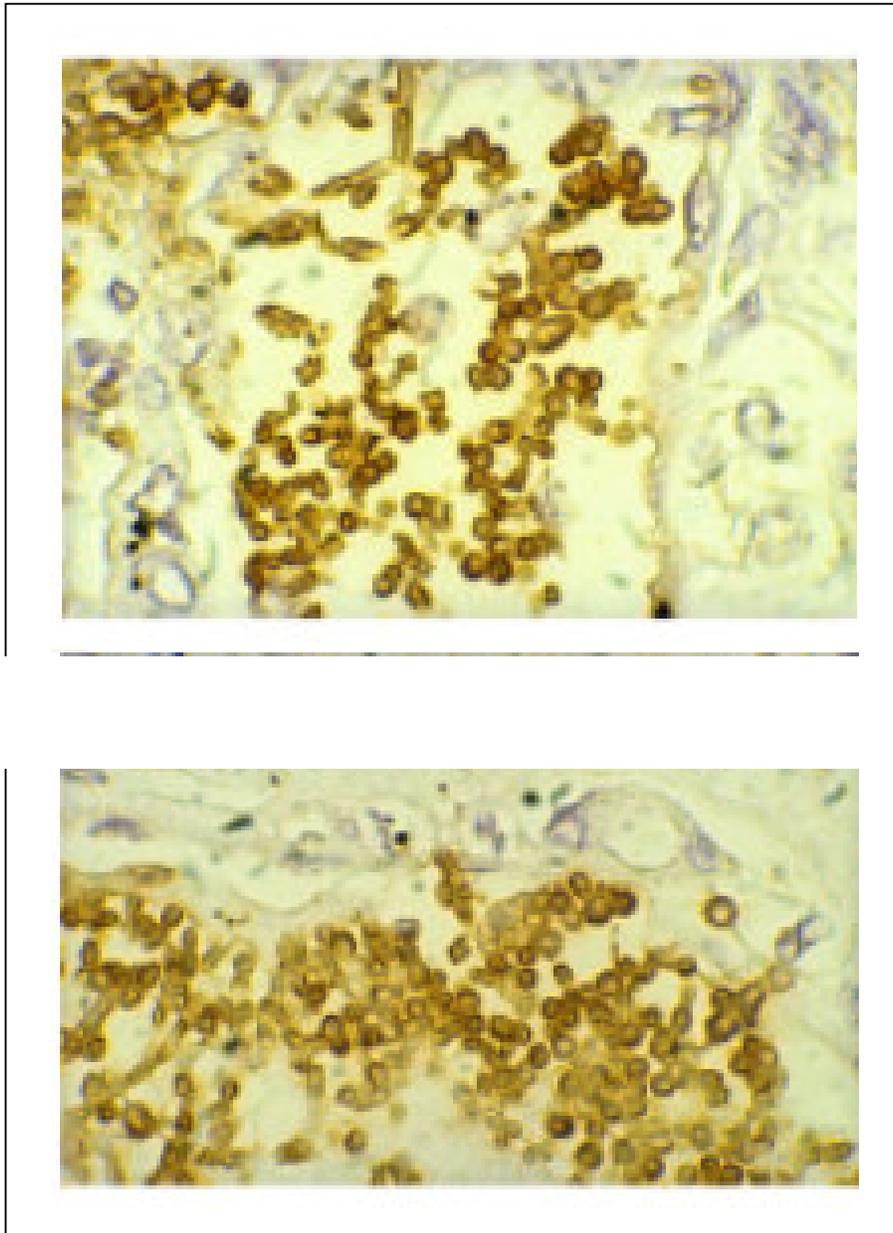


Fig. III.37. Detección de células de *C. albicans* mediante tinción inmunohistoquímica con el PAb anti-CaHpbp sobre muestras de tejido renal obtenidas por necropsia a partir de pacientes con candidiasis sistémica.

IV. CONCLUSIONES

*“La duda es el principio de la sabiduría”
Aristóteles de Estagira*

1. Mediante el inmunorrastreo de una genoteca de expresión con un anticuerpo policlonal específico de la forma micelial de *C. albicans* (mPAb), se ha aislado, clonado y caracterizado un nuevo gen de este hongo, al que se ha denominado *CaHPB*. Dicho gen está contenido en el contig 4-2948 (ahora contig 6-2476) del proyecto de secuenciación de *C. albicans*, y contiene un posible marco abierto de lectura que codifica para una proteína de 250 aminoácidos (CaHpbp) con un peso molecular de 25.173 Da.

2. La secuencia proteica codificada por el gen *CaHPB*, presenta una elevada similitud con otras proteínas parcialmente caracterizadas, presentes en la pared celular de *C. albicans*, como son Rbt5p y Csa1p/Wap1p. El análisis informático de la secuencia reveló la existencia de una región de unos 115 aminoácidos que contiene ocho restos de cisteína localizados en posiciones altamente conservadas, así como de un péptido señal de secreción y de un posible motivo tipo GPI, características compartidas con las proteínas de *C. albicans* anteriormente mencionadas.

3. Los ensayos de inmunofluorescencia con un anticuerpo policlonal monoespecífico generado frente a un dominio inmunogénico de la proteína CaHpbp (PAb anti-CaHpbp) reveló que esta molécula se encontraba presente en la superficie celular de *C. albicans*, mayoritariamente en la forma micelial del hongo.

4. El análisis mediante inmunotransferencia de diferentes extractos obtenidos tanto de paredes celulares aisladas como de células intactas, utilizando el PAb anti-CaHpbp como sonda, indicó que la proteína CaHpbp no queda retenida o anclada a través de un enlace GPI a la estructura de la pared celular, sino que es secretada al medio extracelular, encontrándose asociada a la superficie de las células del hongo mediante interacciones de tipo no covalente.

5. El marcaje con cisteína radiactiva permitió cuantificar la eficacia de diferentes agentes para solubilizar la especie CaHpbp, encontrándose que el SDS al 1% a pH 9 y el etanol al 60% eran los tratamientos que tenían mayor capacidad de extracción. Así mismo se pusieron de manifiesto diferencias cuantitativas y cualitativas en lo que

respecta a la extracción de la molécula CaHpbp en función de la morfología considerada. En general, la mayor cantidad de radiactividad solubilizada por los tratamientos anteriormente indicados, se obtuvo en los experimentos en los que se utilizaron cultivos de células crecidas en forma micelial. De igual forma, se puso de manifiesto que la expresión de la especie CaHpbp es mayor en los cultivos de células crecidas en condiciones que inducen la formación de tubos germinativos (micelio) así como en las células levaduriformes incubadas a 37°C, lo que sugiere que la síntesis de esta molécula depende, entre otros posibles factores como podría ser la transición morfológica levadura-micelio, de la temperatura de crecimiento. Finalmente, los experimentos de inmunoprecipitación con los extractos radiactivos confirmaron la especificidad del PAb anti-CaHpbp.

6. La especie CaHpbp mostró capacidad para interactuar con micelas de aceite en una interfase hidrofílica/hidrofóbica de agua y aceite, formando en la superficie de las mismas una capa detectable mediante inmunofluorescencia con el PAb anti-CaHpbp, que podría representar una membrana anfipática. La molécula CaHpbp presente en el medio de cultivo también exhibió la propiedad de adsorberse a la superficie de microesferas de vidrio.

7. Los resultados obtenidos en este estudio permiten concluir que la especie CaHpbp se trata de una hidrofobina de clase II, moléculas de secreción que hasta el momento no se han identificado en *C. albicans*, aunque sí en otras especies de hongos patógenos. El hecho de que esta molécula presente una gran similitud con otras dos proteínas previamente descritas por otros autores (Rbt5p y Csa1p/Wap1p), sugiere la existencia de una familia de hidrofobinas de clase II en *C. albicans*.

8. CaHpbp se expresa *in vivo*, como se deduce de los resultados de los experimentos de detección inmunohistoquímica realizados con el PAb anti-CaHpbp. En dichos experimentos, se detectó la expresión de esta molécula en células de *C. albicans* presentes en muestras de tejidos obtenidas por necropsia y biopsia de pacientes con candidiasis sistémica y/o superficial. Estas observaciones sugieren que la especie CaHpbp podría tener un papel como factor de virulencia en este hongo.

9. Los experimentos encaminados a obtener la proteína CaHpbp en un sistema de expresión heterólogo, con objeto de diseñar un método que permitiese obtener cantidades significativas de dicha molécula, pusieron de manifiesto que la inducción de la expresión de la proteína de fusión (GST-CaHpbp) requiere de un tiempo muy largo (16 h) y que el producto resultante no es excretado al medio sino que se acumula en el interior de las células, formando cuerpos de inclusión, circunstancia que complica considerablemente el proceso de aislamiento y purificación de la hidrofobina CaHpbp.

V. REFERENCIAS

“Si no puedes explicar a todo el mundo lo que has hecho, tu trabajo ha sido en vano”
Erwin Schrödinger

- **Agabian, N., F. C. Odds, D. Poulain, D. R. Soll, and T. C. White.** 1994. Pathogenesis of invasive candidiasis. *J. Med. Vet. Mycol.* **32**:229-237.
- **Anderson, J., L. Cundiff, B. Schnars, M. X. Gao, I. Mackenzie, and D. R. Soll.** 1989. Hypha formation in the white-opaque transition of *Candida albicans*. *Infect. Immun.* **57**:458-467.
- **Apella, E.** 1988. Structure and function of epidermal growth factor-like regions in proteins. *FEBS. Lett.* **231**:1-4.
- **Arntz, C., and P. Tudzynski.** 1997. Identification of genes induced in alkaloid-producing cultures of *Claviceps* sp. *Curr. Genet.* **31**:357-360.
- **Arndt, K., and G. R. Fink.** 1986. GCN4 protein, a positive transcription factor in yeast, binds general control promoters at all 5' TGACTC 3' sequences. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **83**:8516-8520.
- **Ásgeirsdóttir, S. A., O. M. de Vries, and J. G. Wessels.** 1998. Identification of three differentially expressed hydrophobins in *Pleurotus ostreatus* (oyster mushroom). *Microbiology* **144**:2961-2969.
- **Ásgeirsdóttir, S. A., J. R. Halsall, and L. A. Casselton.** 1997. Expression of two closely linked hydrophobin genes of *Coprinus cinereus* is monokaryon-specific and down-regulated by the *oid-1* mutation. *Fungal Genet. Biol.* **22**:54-63.
- **Askolin, S., T. Nakari-Setälä, and M. Tenkanen.** 2001. Overproduction, purification, and characterization of the *Trichoderma reesei* hydrophobin HFBI. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **57**:124-130.
- **Bailey, D. A., P. J. Feldmann, M. Bovey, N. A. Gow, and A. J. Brown.** 1996. The *Candida albicans* *HYR1* gene, which is activated in response to hyphal development, belongs to a gene family encoding yeast cell wall proteins. *J. Bacteriol.* **178**:5353-5360.
- **Baldari, C., and G. Cesareni.** 1985. Plasmids pEMBL Y: a new single stranded shuttle vectors for the recovery and analysis of yeast DNA sequences. *Gene* **35**:27-32.
- **Ballou, C. E.** 1990. Isolation characterization, and properties of *Saccharomyces cerevisiae* *mn* mutants with non-conditional protein glycosilation defects. *Methods Enzymol.* **185**:440-470.
- **Ballou, C. E.** 1982. Yeast cell wall and cell surface. In *The molecular biology of the yeast Saccharomyces*. Metabolism and gene expression, p. 335-343.

Strathern, J. N., Jones E. W., Broach, J. R., (Eds). Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York.

- **Barnett, J. A., R. W. Payne, and D. Yarrow.** 2000. *Yeast: Characteristics and Identification*, 3rd ed. Cambridge University Press, Cambridge, United Kingdom.
- **Bateman, A., E. Birney, L. Cerruti, R. Durbin, L. Ewinger, S. R. Eddy, S. Griffiths-Jones, K. L. Howe, M. Marshall, and E. L. Sonnhammer.** 2002. The Pfam protein families database. *Nucl. Acids Res.* **30**:276-280.
- **Beachey, E. H.** 1981. Bacterial adherence: adhesin-receptor interactions mediating the attachment of bacteria to mucosal surfaces. *J. Infect. Dis.* **143**:325-345.
- **Beckerman, J. L., and D. J. Ebbole.** 1996. MPG1, a gene encoding a fungal hydrophobin of *Magnaporthe grisea*, is involved in surface recognition. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **9**:450-456.
- **Beck-Sagué, C., and W. R. Jarvis.** 1993. Secular trends in the epidemiology of nosocomial fungal infections in the United States, 1980-1990. National Nosocomial Infections Surveillance System. *J. Infect. Dis.* **167**:1247-1251.
- **Beier, D. R., A. Sledziewski, and E. T. Young.** 1985. Deletion analysis identifies a region, upstream of the *ADH2* gene of *Saccharomyces cerevisiae*, which is required for ADR1-mediated derepression. *Mol. Cell. Biol.* **5**:1743-1749.
- **Bell-Pedersen, D., J. C. Dunlap, and J. J. Loros.** 1992. The *Neurospora circadian* clock-controlled gene, *cgc-2*, is allelic to *eas* and encodes a fungal hydrophobin required for formation of the conidial rodlet layer. *Genes Dev.* **6**:2382-2394.
- **Bidochka, M. J., R. J. St Leger, L. Joshi, and D. W. Roberts.** 1995. An inner cell wall protein (*cwp1*) from conidia of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*. *Microbiology.* **141**:1075-1080.
- **Birnboim, H. C., and J. Doly.** 1979. A rapid alkaline extraction method for screening recombinant plasmid DNA. *Nucl. Acids Res.* **7**:1513-1523.
- **Boone, C., S. S. Sommer, A. Hensel, and H. Bussey.** 1990. Yeast *KRE* genes provide evidence for a pathway of cell wall beta-glucan assembly. *J. Cell Biol.* **110**:1833-1843.
- **Bouchara, J. P., G. Tronchin, V. Annaix, R. Robert, and J. M. Senet.** 1990. Laminin receptors on *Candida albicans* germ tubes. *Infect. Immun.* **58**:48-54.

- **Bowden, C. G., W. E. Hintz, R. Jeng, M. Hubber, and P. Horgen.** 1993. Isolation and characterization of the cerato-ulmin toxin gene of the Dutch elm disease pathogen *Ophiostoma ulmi*. *Curr. Genet.* **25**:223-229.
- **Bowden, C. G., E. Smalley, R. P. Guries, M. Hubbes, B. Temple, and P. A. Horgen.** 1996. Lack of association between cerato-ulmin production and virulence in *Ophiostoma novo-ulmi*. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **9**:556-564.
- **Brandt, M. E., L. H. Harrison, M. Pass, A. N. Sofair, S. Huie, R. K. Li, C. J. Morrison, D. W. Warnock, and R. A. Hajjeh.** 2000. *Candida dubliniensis* fungemia: the first four cases in North America. *Emerg. Infect. Dis.* **6**:46-49.
- **Brasier, C. M., S. A. Kirk, and S. Tegli.** 1995. Naturally occurring non cerato-ulmin producing mutants of *Ophiostoma novo-ulmi* are pathogenic but lack aerial mycelium. *Mycol. Res.* **99**:436-440.
- **Brassart, D., A. Woltz, M. Golliard, and J. R. Neeser.** 1991. *In vitro* inhibition of adhesion of *Candida albicans* clinical isolates to human buccal epithelial cells by Fuc α 1-2Gal β -bearing complex carbohydrates. *Infect. Immun.* **59**:1605-1613.
- **Braun, P. C.** 1994. Surface hydrophobicity enhances corticosterone incorporation in *Candida albicans*. *Infect. Immun.* **62**:4087-4090.
- **Braun, B. R., W. S. Head, M. X. Head, and A. D. Johnson.** 2000. Identification and characterization of *TUP1*-regulated genes in *Candida albicans*. *Genetics* **156**:31-44.
- **Brendel, V., P. Bucher, I. Nourbakhsh, B. E. Blaisdell, and S. Karlin.** 1992. Methods and algorithms for statistical analysis of protein sequences. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **89**:2002-2006.
- **Brown, A. J.** 2002 b. Morphogenetic signaling pathways in *Candida albicans*, p. 95-106. In R. A. Calderone (ed.), *Candida and Candidiasis*, 1st ed. ASM Press, Washington, D.C.
- **Buckley, H. R.** 1989. Identification of yeasts, p. 97-109. In E. G. V. Evans and M. D. Richardson (ed.), *Medical Mycology-A Practical approach*. IRL Press at Oxford University Press, Oxford, United Kingdom.
- **Budtz-Jorgensen, E., and T. Lombardi.** 2000. Antifungal therapy in the oral cavity. *Periodontol.* **10**:89-106.
- **Buffo, J., M. A. Herman, and D. R. Soll.** 1984. A characterization of pH-regulated dimorphism in *Candida albicans*. *Mycopathologia* **85**:21-30.

- **Bulawa, C. E.** 1993. Genetics and molecular biology of chitin synthesis in fungi. *Ann. Rev. Microbiol.* **47**:505-534.
- **Burnette, W. N.** 1981. Western blotting: electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecylsulfate-polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A. *Anal. Biochem.* **112**:195-203.
- **Buurman, E. T., C. Westwater, B. Hube, A. J. Brown, F. C. Odds, and N. A. Gow.** 1998. Molecular analysis of CaMnt1p, a mannosyl transferase important for adhesion and virulence of *Candida albicans*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **95**:7670-7675.
- **Cabib, E., T. Drgon, J. R. Drgonova, R. A. Ford, and R. Kollar.** 1997. The yeast cell wall, a dynamic structure engaged in growth and morphogenesis. *Biochem. Soc. Trans.* **25**:200-204.
- **Calderone, R. A.** 1993. Recognition between *Candida albicans* and host cells. *Trends Microbiol.* **1**:55-58.
- **Calderone, R. A.** 2002. *Candida* and Candidiasis, 1st ed. ASM Press, Washington, D. C.
- **Calderone, R. A., and P. C. Braun.** 1991. Adherence and receptor relationships of *Candida albicans*. *Microbiol. Rev.* **55**:1-20.
- **Calderone, R. A., and N. A. R. Gow.** 2002. Host recognition by *Candida* species, p. 67-86. In R. A. Calderone (ed.), *Candida* and Candidiasis, 1st ed. ASM Press, Washington, D.C.
- **Cameron, B. J., and L. J. Douglas.** 1996. Blood group glycolipids as epithelial cell receptors for *Candida albicans*. *Infect. Immun.* **64**:891-896.
- **Cannon, R. D., W. E. Timberlake, N. A. Gow, D. Bailey, A. Brown, G. W. Gooday, B. Hube, M. Monod, C. Nombela, F. Navarro, R. Pérez, M. Sánchez, and J. Plá.** 1994. Molecular, biological and biochemical aspects of fungal dimorphism. *J. Med. Vet. Mycol.* **32**:53-64.
- **Carile, M. J., and Watkinson.** 1994. *The Fungi*. Academic Press, San Diego, CA.
- **Caro, L., H. Tettelin, J. Vossen, A. Ram, H. Van den Ende, and F. Klis.** 1997. In silico identification of glycosyl-fosfatidylinositol-anchored plasma membrane and cell wall proteins of *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* **13**:1477-1489.

- **Carpenter, C. E., R. J. Mueller, P. Kazmierczak, L. Zhang, D. K. Villalon, and N. K. Van Alfen.** 1992. Effect of a virus on accumulation of a tissue-specific cell surface protein of the fungus *Cryphonectria (Endothia) parasitica*. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **4**:55-61.
- **Casanova, M., A. M. Cervera, D. Gozalbo, and J. P. Martínez.** 1997. Hemin induces germ-tube formation in *Candida albicans*. *Infect. Immun.* **65**:4360-4364.
- **Casanova, M., M. L. Gil, L. Cardenoso, J. P. Martínez, and R. Sentandreu.** 1989. Identification of wall-specific antigens synthesized during germ tube formation by *Candida albicans*. *Infect. Immun.* **57**:262-271.
- **Casanova, M., J. L. López-Ribot, J. P. Martínez, and R. Sentandreu.** 1992. Characterization of cell wall proteins from yeast and mycelial cells of *Candida albicans* by labelling with biotin: comparison with other techniques. *Infect. Immun.* **60**:4898-4906.
- **Cassone, A.** 1989. Cell wall of *Candida albicans*: its functions and its impact on the host. *Curr. Top. Med. Mycol.* **3**:248-314.
- **Castonguay, Y., S. Laberge, P. Nadeau, and L. P. Vézina.** 1994. A cold-induced gene from *Medicago sativa* encodes a bimodular protein similar to developmentally regulated proteins. *Plant Mol. Biol.* **24**:799-804.
- **Cervera, A. M., D. Gozalbo, K. J. McCreath, N. A. Gow, J. P. Martínez, and M. Casanova.** 1998. Molecular cloning and characterization of a *Candida albicans* gene coding for a cytochrome *c* haem lyase and a cell-wall related protein. *Mol. Microbiol.* **30**:67-81.
- **Chaffin, W. L., B. Collins, J. N. Marx, G. T. Cole, and K. J. Morrow Jr.** 1993. Characterization of mutant strains of *Candida albicans* deficient in expression of a surface determinant. *Infect. Immun.* **61**:3449-3458.
- **Chaffin, W. L., J. L. López-Ribot, M. Casanova, D. Gozalbo, and J. P. Martínez.** 1998. Cell wall and secreted proteins of *Candida albicans*: identification, function, and expression. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **62**:130-180.
- **Chattaway, F. W., M. R. Holmes, and A. J. Barlow.** 1968. Cell wall composition of the mycelial and blastospore forms of *Candida albicans*. *J. Gen. Microbiol.* **51**:367-376.
- **Chauhan, N., D. Li, P. Singh, R. Calderone, and M. Kruppa.** 2002. The cell wall of *Candida* spp., p. 159-175. In R. A. Calderone (ed.), *Candida and Candidiasis*, 1st ed. ASM Press, Washington, D.C.

- **Cole, G.T., and T. N. Kirkland.** 1991. Conidia of *Coccidioides immitis*. In *The Fungal Spore and Disease Initiation in Plants and Animals*, ed. G. Cole, H Hoch, p. 403-43. New York.
- **Cole, G. T., L. M. Pope, M. Huppert, S. H. Sun, and P. Starr.** 1983. Ultrastructure and composition of conidial wall fractions of *Coccidioides immitis*. *Exp. Mycol.* **7**:297-318.
- **Coleman, D. C., D. J. Sullivan, D. E. Bennett, G. P. Moran, H. J. Barry, and D. B. Shanley.** 1997. Candidiasis: the emergence of a novel species, *Candida dubliniensis*. *AIDS* **11**:557-567.
- **Corpet F.** 1988. Multiple sequence alignment with hierarchical clustering. *Nucl. Acids Res.* **16**:10881-10890.
- **Cutler, J. E.** 2001. *N*-glycosylation of yeast, with emphasis on *Candida albicans*. *Med. Mycol.* **39**:75-86.
- **Cutler, J. E.** 1991. Putative virulence factors of *Candida albicans*. *Annu. Rev. Microbiol.* **45**:187-218.
- **Cutler, J. E.** 1998. The *Candida albicans* phosphomannan complex in *Candida*-host interactions. *Res. Immunol.* **149**:299-308.
- **Dean, N.** 1999. Asparagine-linked glycosilation in the yeast Golgi. *Biochim. Biophys. Acta* **1426**:309-322.
- **De Groot, P. W., R. T. Roeven, L. J. Van Griensven, J. Visser, and P. J. Schaap.** 1999. Different temporal and spatial expression of two hydrophobin-encoding genes of the edible mushroom *Agaricus bisporus*. *Microbiology.* **145**:11-13.
- **De Groot, P. W., P. J. Schaap, A. S. Sonnenberg, J. Visser, and L. J. Van Griensven.** 1996. The *Agaricus bisporus* *hyphA* gene encodes a hydrophobin and specifically accumulates in peel tissue of mushroom caps during fruit body development. *J. Mol. Biol.* **257**:1008-1018.
- **De Jong, J. C., B. J. McCormack, N. Smirnoff, and N. J. Talbot.** 1997. Glycerol generates turgor in rice blast. *Nature* **389**:244-245.
- **Del Sorbo, G., F. Scala, G. Parrella, M. Lorito, C. Comparini, and M. Ruocco, A. Scala.** 2000. Functional expression of the gene *cu*, encoding the phytotoxic hydrophobin cerato-ulmin, enables *Ophiostoma quercus*, a nonpathogen on elm, to cause symptoms of Dutch Elm Disease. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **13**:43-53.

- **De Nobel, J. G., F. M. Klis, J. Priem, T. Munnik, and H. Van den Ende.** 1990. The glucanase-soluble mannoproteins limit cell wall porosity in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* **6**:491-499.
- **Desai, J. D., and I. M. Banat.** 1997. Microbial production of surfactants and their commercial potential. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **61**:47-64.
- **De Sampaio, G., J. P. Bourdineaud, and G. J. M. Lauquin.** 1999. A constitutive role for GPI anchors in *Saccharomyces cerevisiae*: a cell wall targeting. *Molecular Microbiology* **34**:247-256.
- **Désormeaux, A., J. E. Blochet, M. Pézolet, and D. Marion.** 1992. Aminoacid sequence of a non-specific wheat phospholipid transfer protein and its conformation as revealed by infrared and Raman spectroscopy. Role of disulfide bridges in the stabilization of the α -helix structure. *Biochim. Biophys. Acta* **1121**:137-152.
- **De Vocht, M. L., Reviakine, I., Ulrich, W. P., Bergsma-Schutter, W., Wösten, H. A., Vogel, H., Brisson, A., Wessels, J. G., Robillard, G. T.** 2002. Self-assembly of the hydrophobin SC3 proceeds via two structural intermediates. *Protein Sci.* **11**(5):1199-205.
- **De Vocht, M. L., I. Reviakine, H. A. Wösten, A. D. Brisson, J. G. Wessels, and G. T. Robillard.** 2000. Structural and functional role of the disulfide bridges in the hydrophobin SC3. *J. Biol. Chem.* **275**:28428-32.
- **De Vocht, M. L., K. Scholtmeijer, E. W. Van der Vegte, O. M. de Vries, N. Sonveaux, H. A. Wösten, J. M. Ruyschaert, G. Hadziioannou, J. G. Wessels, and G. T. Robillard.** 1998. Structural characterization of the hydrophobin SC3, as a monomer and after self-assembly at hydrophobic/hydrophilic interfaces. *Biophys. J.* **74**:1-10.
- **De Vries O. M., M. P. Fekkes, H. A. Wösten, and J. G. Wessels.** 1993. Insoluble hydrophobin complexes in the walls of *Schizophyllum commune* and other filamentous fungi. *Arch. Microbiol.* **159**:330-335.
- **De Vries, O. M., S. Moore, C. Arntz, J. G. Wessels, and P. Tudzynski.** 1999. Identification and characterization of a tri-partite hydrophobin from *Caviceps fusiformis*. A novel type of class II hydrophobin. *Eur. J. Biochem.* **262**:377-85.
- **DeZwaan, T. M., A. M. Carroll, B. Valent, and J. A. Sweigard.** 1999. *Magnaporthe grisea* Pth11p is a novel plasma membrane protein that mediates appressorium differentiation in response to inductive substrate cues. *Plant Cell* **11**:2013-2030.

- **Diaz, M., R. Negroni, F. Montero-Gei, L. G. Castro, S. A. Sampayo, D. Borrelli, A. Restrepo, L. Franco, J. L. Bran and E. G. Arathoon.** 1992. A Pan-American 5-year study of fluconazole therapy for deep mycoses in the immunocompetent host. Pan-American Study Group. *Clin. Infect. Dis.* **14**:68-76.
- **Doolittle, R. F., D. F. Feng, and M. S. Johnson.** 1984. Computer-based characterization of epidermal growth factor precursor. *Nature* **307**:558-560.
- **Douglas, L. J.** 1987 a. Adhesion of *Candida* species to epithelial surfaces. *CRC crit. Rev. Microbiol.* **15**:27-43.
- **Douglas, L. J.** 1987 b. Adhesion to surfaces. In *The yeast*, vol 2, 2nd ed. (A. H. Rose and J. S. Harrison, eds.). Academic Press Inc., New York.
- **Douglas, L. J.** 1985. Adhesion of pathogenic *Candida* species to host surfaces. *Microbiol. Sciences* **2**:243-247.
- **Douglas, L. J.** 2003. *Candida* biofilms and their role in infection. *Trends. Microbiol.* **11**:30-36.
- **Dubois, M., K. A. Giles, J. K. Hamilton, P. A. Rebes, and F. Smith.** 1956. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Anal. Chem.* **28**:350-356.
- **Dugger, K. O., K. M. Villareal, A. Nygyuen, C. R. Zimmermann, J. H. Law, and J. N. Galgiani.** 1996. Cloning and sequence analysis of the cDNA for a protein from *Coccidioides immitis* with immunogenic potential. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **218**:485-489.
- **Ebbole D. J.** 1997. Hydrophobins and fungal infection of plants and animals. *Trends in Microbiology* **5**:405-408.
- **Eisen, A., W. E. Taylor, H. Blumberg, and E. T. Young.** 1988. The yeast regulatory protein *ADRI* binds in a zinc-dependent manner to the upstream activating sequence of *ADH2*. *Mol. Cell Biol.* **8**:4552-4556.
- **Ener, B., and L. J. Douglas.** 1992. Correlation between cell-surface hydrophobicity of *Candida albicans* and adhesion to buccal epithelial cells. *FEMS Microbiol. Lett.* **78**:37-42.
- **Ernst, J. F.** 2000. Transcription factors in *Candida albicans*-environmental control of morphogenesis. *Microbiology* **146**:1763-1774.

- **Eroles, P., M. Sentandreu, M. V. Elorza, and R. Sentandreu.** 1997. The highly immunogenic enolase and Hsp70 are adventitious *Candida albicans* cell wall proteins. *Microbiology* **143**:313-320.
- **Eroles, P., M. Sentandreu, M. V. Elorza, and R. Sentandreu.** 1995. Cloning of a DNA fragment encoding part of a 70-kDa heat shock protein of *Candida albicans*. *FEMS Microbiol. Lett.* **128**:95-100.
- **Falquet, L., M. Pagni, P. Bucher, N. Hulo, C. J. A. Sigrist, K. Hofmann, and A. Bairoch.** 2002. The PROSITE database, its status in 2002. *Nucl. Acids Res.* **30**:235-238.
- **Fariselli, P., P. Riccobelli, and R. Casadio.** 1999. *PROTEINS* **36**:340-346.
- **Filler, S. G., and B. J. Kullberg.** 2002. Deep-seated candidal infections, p. 341-349. In R. A. Calderone (ed.), *Candida and Candidiasis*, 1st ed. ASM Press, Washington, D.C.
- **Flahaut, M., D. Sanglard, M. Monod, J. Bille, and M. Rossier.** 1998. Rapid detection of *Candida albicans* in clinical samples by DNA amplification of common regions from *C. albicans*-Secreted Aspartic Proteinase Genes. *J. Clin. Microbiol.* **36**:395-401.
- **Fonzi, W. A., and M. Y. Irwin.** 1993. Isogenic strain construction and gene mapping in *Candida albicans*. *Genetics* **134**:717-728.
- **Fuji, T., H. Shimoi, and Y. Limura.** 1999. Structure of the glucan-binding sugar chain of Tip1p, a cell wall protein of *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochim. Biophys. Acta* **1427**:133-144.
- **Fukazawa, Y., and K. Kagaya.** 1997. Molecular bases of adhesion of *Candida albicans*. *J. Med. Vet. Mycol.* **35**:87-99.
- **Gale, C. A., C. M. Benbel, M. McClellan, M. Hauser, J. M. Becker, J. Berman, and M. K. Hostetter.** 1998. Linkage of adhesion, filamentous growth, and virulence of *Candida albicans* to a single gene, *INT1*. *Science* **279**:1355-1358.
- **Geourjeon, C., and G. Deléage.** 1995. SOPMA: significant improvements in protein secondary structure prediction by consensus prediction from multiple alignments. *Comput. Appl. Biosci.* **11**:681-684.
- **Gilfillan, G. D., D. J. Sullivan, K. Haynes, T. Parkinson, D. C. Coleman, and N. A. Gow.** 1998. *Candida dubliniensis*: phylogeny and putative virulence factors. *Microbiology* **144**:829-838.

- **Gil-Navarro, I., M. L. Gil, M. Casanova, J. E. O'Connor, J. P. Martínez, and D. Gozalbo.** 1997. The glycolytic enzyme glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase of *Candida albicans* is a surface antigen. *J. Bacteriol.* **179**:4992-4999.
- **Glover, D. M., and B. D. Hames.** 1995. DNA cloning 2. Expression systems. A practical approach (second edition). Oxford University Press. p. 32-34.
- **Gow, N. A., B. Hube, D. A. Bailey, D. A. Schofield, C. Munro, R. K. Swoboda, G. Bertram, C. Westwater, Y. Broadbent, R. J. Smith, G. W. Gooday, and A. J. Brown.** 1995. Genes associated with dimorphism and virulence of *Candida albicans*. *Can. J. Bot.* **73**:335-342.
- **Gow, N. A., T. H. Perera, J. Sherwood-Higham, G. W. Gooday, D. W. Gregory, and D. Marshall.** 1994. Investigation of touch-sensitive responses by hyphae of the human pathogenic fungus *Candida albicans*. *Scan. Microscop.* **8**:705-710.
- **Grunstein, M., and D. S. Hogness.** 1975. Colony hybridization: a method for the isolation of cloned DNAs that contain a specific gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **72**:3961-3965.
- **Hamer, J. E., R. J. Howard, F. G. Chumleym, and B. Valent.** 1988. A mechanism for surface attachment in spores of a plant pathogenic fungus. *Science* **239**:288-290.
- **Hanahan, D., and M. Meselson.** 1983. Plasmid screening at high colony density. *Methods Enzymol.* **100**:333-42.
- **Hard, K., W. Bitter, J. P. Kamerling, and J. F. G. Vliegthart.** 1989. O-mannosylation of recombinant human insulin-like growth factor I (IGFI) produced in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett.* **248**:111-114.
- **Hazen, K. C.** 1990. Cell surface hydrophobicity of medically important fungi, specially *Candida* species. In Doyle, R. J. and Rosenberg, M. (eds.), *Microbial cell surface hydrophobicity*, p. 249-295. American Society for Microbiology, Washington, D. C.
- **Hazen, K. C.** 1989. Participation of yeast cell surface hydrophobicity in adherence of *Candida albicans* to human epithelial cells. *Infect. Immun.* **57**:1894-1900.
- **Hazen, K. C., D. L. Brawner, M. H. Riesselman, J. E. Cutler, and M. A. Jutila.** 1991. Differential adherence of hydrophobic and hydrophilic *Candida albicans* yeast cells to mouse tissues. *Infect. Immun.* **59**:907-912.

- **Hazen, B. W., and K. C. Hazen.** 1988. Dynamic expression of cell surface hydrophobicity during initial yeast cell growth and before germ tube formation of *Candida albicans*. *Infect. Immun.* **56**: 2521-2525.
- **Hazen, K. C., and B. W. Hazen.** 1987. A polystyrene microsphere assay for detecting cell surface hydrophobicity within *Candida albicans* populations. *J. Microbiol. Methods* **6**:289-299.
- **Hazen, K. C., and W. G. LeMelle.** 1990. Improved assay for surface hydrophobic avidity of *Candida albicans* cells. *Appl. Environ. Microbiol.* **56**:1974-1976.
- **Hazen, B. W., R. E. Liebert, and K. C. Hazen.** 1988. Relationship of cell surface hydrophobicity to morphology of monomorphic and dimorphic fungi. *Mycologia* **80**:348-355.
- **Hedderwick, S. A., M. J. Lyons, M. Liu, J. A. Vazquez, and C. A. Kauffman.** 2000. Epidemiology of yeast colonization in the intensive care unit. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **19**:663-670.
- **Heidenreich, F., and M. P. Dierich.** 1985. *Candida albicans* and *Candida stellatoidea*, in contrast to other *Candida* species, bind iC3b and C3d but not C3b. *Infect. Immun.* **50**:598-600.
- **Hellstein, J., H. Vawter-Hugart, P. Fotos, J. Schmid, and D. R. Soll.** 1993. Genetic similarity and phenotypic diversity of commensal and pathogenic strains of *Candida albicans* isolated from the oral cavity. *J. Clin. Microbiol.* **31**:3190-3199.
- **Hofmann, K., and W. Stoffel.** 1993. Tmbase, a database of membrane spanning proteins segments *Biol. Chem. Hoppe-Seyler* **374**:166-167.
- **Hopp, T. P., and K. R. Woods.** 1981. Prediction of protein antigenic determinants from amino acid sequences. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **78**:3824-3828.
- **Hostetter, M. K.** 1994. Adhesins and ligands involved in the interaction of *Candida albicans* with epithelial and endothelial surfaces. *Clin. Microbiol. Rev.* **7**:29-42.
- **Hostetter, M. K., J. S. Lorenz, L. Preus, and K. E. Kendrick.** 1990. The iC3b receptor on *Candida albicans*: subcellular localization and modulation of receptor expression by glucose. *J. Infect. Dis.* **161**:761-768.

-
- **Howard, R. J., and B. Valent.** 1996. Breaking and entering: host penetration by the fungal rice blast pathogen *Magnaporthe grisea*. *Annu. Rev. Microbiol.* **50**:491-512.
 - **Hoyer, L. L.** 2001. The *ALS* gene family of *Candida albicans*. *Trends Microbiol.* **9**:176-180.
 - **Hoyer, L. L., S. Scherer, A. R. Shatzman, and G. P. Livi.** 1995. *Candida albicans ALS1*: domains related to a *Saccharomyces cerevisiae* sexual agglutinin separated by a repeating motif. *Mol. Microbiol.* **15**:39-54.
 - **Hsu, S. M., L. Raine, and H. Fanger.** 1981. Use of avidin-biotin- peroxidase complex (ABC) in immunoperoxidase techniques: a comparison between AB unlabeled antibody (PAP) procedures. *J. Histochem. Cytochem.* **29**:577-580.
 - **Hube, B., M. Monod, D. A. Schofield, A. J. Brown, and N. A. Gow.** 1994. Expression of seven members of the gene family encoding secretory aspartyl proteinases in *Candida albicans*. *Mol. Microbiol.* **14**:87-99.
 - **Hube, B., and J. Naglik.** 2002. Extracellular hydrolases, p. 107-122. In R. A. Calderone (ed.), *Candida and Candidiasis*, 1st ed. ASM Press, Washington, D.C.
 - **Hube, B., and J. Naglik.** 2001. *Candida albicans* proteinases: resolving the mystery of a gene family. *Microbiology* **147**:1997-2005.
 - **Hurley, R., J. de Louvois, and A. Mulhall.** 1987. Yeast as human and animal pathogens. In *The Yeast*. Rose, A. H., Harrison, J. S, (Eds.). Academic Press. London. P. 207-281.
 - **Ibrahim, A. S., F. Mirbod, S. G. Filler, Y. Banno, G. T. cole, Y. Kitajima, J. Eduards Jr., Y. Nozawa, and M. A. Ghannoum.** 1995. Evidence implicating phospholipase as a virulence factor of *Candida albicans*. *Infect Immun.* **63**:1993-1998.
 - **Ipsen, J. D., and Y. J. Abul-Hajj.** 1982. Fluorescent antibody technique as a means of localizing *Ceratocystis ulmi* toxins in elm. *Can. J. Bot.* **60**:724-729.
 - **Jacques, M., T. J. Marrie, and J. W. Costerton.** 1986. *In vitro* quantitative adherence of microorganisms to intrauterine contraceptive devices. *Curr. Microbiol.* **13**:133-137.
 - **Jakab, E., M. Paulsson, F. Ascencio, and A. Ljungh.** 1993. Expression of vitronectin and fibronectin binding by *Candida albicans* yeast cells. *APMIS* **101**:187-193.

- **Jenny, K., O. Käppeli, and A. Fiechter.** 1991. Biosurfactants from *Bacillus licheniformis*: structural analysis and characterization. *Appl. Environ. Microbiol.* **36**:5-13.
- **Jenowski, R., J. Naehring, and K. Wolf.** 1995. A rapid and reliable method for PCR-based amplification of chromosomal and mitochondrial DNA from intact yeast cells. *Curr. Genet.* **27**:318-319.
- **Jentoft, N.** 1990. Why are proteins O-glycosylated?. *Trends Biochem. Sci.* **15**:291-294.
- **Jiang, C., D. M. Magee, T. N. Quitugua, and R. A. Cox.** 1999. Genetic vaccination against *Coccidioides immitis*: comparison of vaccine efficacy of recombinant antigen 2 and antigen 2 cDNA. *Infection and Immunity* **67**:630-635.
- **Jigami, Y., and T. Odani.** 1999. Mannosylphosphate transfer to yeast mannan. *Biochim. Biophys. Acta* **1426**:335-345.
- **Jiménez-Lucho, V., V. Ginsburg, and H. C. Krivan.** 1990. *Cryptococcus neoformans*, *Candida albicans*, and other fungi bind specifically to the glycosphingolipid lactosylceramide (Gal β 1-4Glc β 1-1Cer), a possible adhesion receptor for yeast. *Infect. Immun.* **58**:2085-2090.
- **Kambadur, R., V. Culotta, and D. Hamer.** 1990. Cloned yeast and mammalian transcription factor TFIID gene products support basal but not activated metallothionein gene transcription. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **87**:9168-72.
- **Kanbe, T., Y. Han, B. Redgrave, H. Riesselman, and J. E. Cutler.** 1993. Evidence that mannans of *Candida albicans* are responsible for adherence of yeast forms to spleen and lymph node tissue. *Infect. Immun.* **61**:2578-2584.
- **Kandasamy, R., G. Vedyappan, and W. L. Chaffin.** 2000. Evidence for the presence of Pir-like proteins in *Candida albicans*. *FEMS Microbiol. Lett.* **186**:239-243.
- **Kao, A. S., M. E. Brandt, W. R. Pruitt, L. A. Conn, B. A. Perkins, D. S. Stephens, W. S. Baughman, A. L. Reingold, G. A. Rothrock, M. A. Pfaller, R. W. Pinner, and R. A. Hajjeh.** 1999. The epidemiology of candidemia in two United States cities: results of a population-based active surveillance. *Clin. Infect. Dis.* **29**:1164-1170.
- **Kapteyn, J. C., L. L. Hoyer, J. E. Hecht, W. H. Muller, A. Andel, A. J. Verkleij, M. Makarow, E. H. Van Den, and F. M. Klis.** 2000. The cell wall architecture of *Candida albicans* wild-type cells and cell wall-defective mutants. *Mol. Microbiol.* **35**:601-611.

- **Kapteyn, J. C., R. C. Montijn, G. J. P. Dijkgraaf, and F. M. Klis.** 1994. Identification of β 1,6-glycosylated cell wall proteins in yeast and hyphal forms of *Candida albicans*. *Eur. J. Cell Biol.* **65**:402-407.
- **Kapteyn, J. C., A. F. Ram, E. M. Groos, R. Kollar, R. C. Montijn, H. Van Den Ende, A. Llobell, E. Cabib, and F. M. Klis.** 1997. Altered extent of cross-linking of β 1,6- glycosylated mannoproteins to chitin in *Saccharomyces cerevisiae* mutants with reduced cell wall β 1,3-glycan content. *J. Bacteriol.* **179**:6279-6284.
- **Kapteyn, J. C., H. Van Den Ende, and F. M. Klis.** 1999. The contribution of cell wall proteins to the organization of the yeast cell wall. *Biochim. Biophys. Acta* **1426**:373-383.
- **Kennedy, M. J.** 1987. Adhesion and association mechanisms of *Candida albicans*. In *Current Topics in Medical Mycology*, vol. 2, p. 73-169. (M. R. McGuinnis, ed.). Springer-Verlag, New York.
- **Kennedy, M. J., A. L. Rogers, L. R. Hanselman, D. R. Soll, and R. J. Yancey Jr.** 1988. Variation in adhesion and cell surface hydrophobicity in *Candida albicans* white and opaque phenotypes. *Mycopathologia* **102**:149-156.
- **Kerridge, D.** 1993. Fungal dimorphism: A sideways look. In *Dimorphic fungi in biology and medicine*. Vanden Bossche, H., Odds F., Kerridge, D., (Eds.). Plenum Press. New York. P. 3-10.
- **Kershaw, M. J., and N. J. Talbot.** 1998. Hydrophobins and repellents: proteins with fundamental roles in fungal morphogenesis. *Fungal Genet. Biol.* **23**:18-33.
- **Kershaw, M. J., G. Wakley, and N. J. Talbot.** 1998. Complementation of the *mpg1* mutant phenotype in *Magnaporthe grisea* reveals functional relationships between fungal hydrophobins. *EMBO J.* **17**:3838-3849.
- **Kitamura, K., T. Kaneko, and Yamamoto.** 1974. Lysis of viable yeast cells by enzymes of *Arthrobacter luteus*. *J. Gen. Appl. Microbiol.* **20**:327-344.
- **Kimura, L. H., and N. N. Pearsall.** 1980. Relationship between germination of *Candida albicans* and increased adherence to human buccal epithelial cells. *Infect. Immun.* **28**:464-468.
- **Kitamura, K., and Yamamoto.** 1972. Purification and properties of an enzyme, Zymoliase, which lyses viable yeast cells. *Arch. Biochem. Biophys.* **153**:403-406.

- **Klis, F. M., P. de Groot, and K. Hellingwerf.** 2001. Molecular organization of the cell wall of *Candida albicans*. *Med. Mycol.* **39**:1-8.
- **Klotz, S. A.** 1994. Plasma and extracellular matrix proteins mediate in the fate of *Candida albicans* in the human host. *Medical Hypotheses* **42**:328-334.
- **Klotz, S. A.** 1990. Adherence of *Candida albicans* to components of the subendothelial extracellular matrix. *FEMS Microbiol. Lett.* **68**:249-254.
- **Klotz, S. A., D. J. Drutz, and J. E. Zajic.** 1985. Factors governing adherence of *Candida* species to plastic surfaces. *Infect. Immun.* **50**:97-101.
- **Klotz, S. A., and R. L. Penn.** 1987. Multiple mechanisms may contribute to the adherence of *Candida* yeasts to living cells. *Curr. Microbiol.* **16**:119-122.
- **Klotz, S. A., and R. L. Smith.** 1991. A fibronectin receptor on *Candida albicans* mediates adherence of the fungus to extracellular matrix. *J. Infect. Dis.* **163**:604-610.
- **Kollar, R., E. Petráková, G. Ashwell, P. W. Robbins, and E. Cabib.** 1995. Architecture of the yeast cell wall: the linkage between chitin and $\beta(1-3)$ -glucan. *J. Biol. Chem.* **270**:1170-1178.
- **Kollar, R., B. B. Reinhol, E. Petrakova, H. J. Yeh, G. Ashwell, J. Drgonova, J. C. Kapteyn, F. M. Klis, and E. Cabib.** 1997. Architecture of the yeast cell wall. $\beta(1\rightarrow6)$ -glucan interconnects mannoprotein, $\beta(1\rightarrow3)$ -glucan, and chitin. *J. Biol. Chem.* **272**:17762-17775.
- **Krestchmar, M., H. Bernhard, T. Bertsch, D. Sanglard, R. Merker, M. Schröder, H. Hof, and T. Nichterlein.** 1999. Germ tubes and proteinase activity contribute to virulence of *Candida albicans* in murine peritonitis. *Infect. Immun.* **67**:6637-6642.
- **Kulkarni, R. D., H. S. Kelkar, and R. A. Dean.** 2003. An eight-cysteine-containing CFEM domain unique to a group of fungal membrane proteins. *Trends in Biochemical Sciences.* **28**:118-121.
- **Kyte, J., and R. F. Doolittle.** 1982. A simple method for displaying the hydrophobic character of a protein, *J. Mol. Biol.* **157**:195-132.
- **Lachke, S. A., T. Srikantha, L. K. Tsai, K. Daniels, and D. R. Soll.** 2000. Phenotypic switching in *Candida glabrata* involves phase-specific regulation of the metallothionein gene MT-II and the newly discovered hemolysin gene HLP. *Infect. Immun.* **68**:884-895.

- **Laemli, U.K.** 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T₄. *Nature* **227**:680-685.
- **Lamarre, C., N. Deslauriers, and Y. Bourbonnais.** 2000. Expression cloning of the *Candida albicans* CSA1 gene encoding a mycelial surface antigen by sorting of *Saccharomyces cerevisiae* transformants with monoclonal antibody-coated magnetic beads. *Molec. Microbiol.* **35**:444-453.
- **Lauter, F. R., V. E. Russo, and C. Yanofsky.** 1992. Developmental and light regulation of *eas* the structural gene for the rodlet protein of *Neurospora*. *Genes Dev.* **6**:2373-2381.
- **Lee, K. L., H. R. Buckley, and C. Campbell.** 1975. An amino acid liquid synthetic medium for development of mycelial and yeast forms of *Candida albicans*. *Sabouraudia* **13**:148-153.
- **Lee, Y. H., and R. A. Dean.** 1993. cAMP regulates infection structure formation in the plant pathogenic fungus *Magnaporthe grisea*. *Plant Cell* **5**:693-700.
- **Lehle, L., T. Roitsch, S. Strahl, and W. Tanner.** 1991. Synthesis of mannoproteins in *Saccharomyces cerevisiae*. In *Fungal cell wall and immune response*. Latgé, J.P., Buocias, D. (Eds.). Springer Verlag. Berlin.
- **Li, R. K., and J. E. Cutler.** 1993. Chemical definition of an epitope/adhesin molecule on *Candida albicans* *J. Biol. Chem.* **268**:18293-18299.
- **Lipke, P. N., and R. Ovalle.** 1998. Cell wall architecture in yeast: new structure and new challenges. *J. Bacteriol* **180**:3735-3740.
- **Löffler, J., H. Hebart, U. Schumacher, H. Reitze, and H. Einsele.** 1997. Comparison of Different methods for extraction of DNA of fungal pathogens from cultures and blood. *J. Clin. Microbiol.* **35**:3311-3312.
- **López-Ribot, J. L., M. Casanova, J. P. Martinez, and R. Sentandreu.** 1991. Characterization of cell wall proteins of yeast and hydrophobic mycelial cells of *Candida albicans*. *Infect. Immun.* **59**:2324-2332.
- **López-Ribot, J. L., and W. L. Chaffin.** 1994. Binding of the extracellular matrix component entactin to *Candida albicans*. *Infect. Immun.* **62**:4564-4571.
- **Lora, J. M., J. A. Pinto-Toro, T. Bentítez, and L. C. Romero.** 1995. Qid3 protein links plant bimodular proteins with fungal hydrophobins. *Mol. Microbiol.* **18**:380-382.

- **Lowry, O. H., N. J. Rosebrough, A. L. Farr, and R. J. Randall.** 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193**:265-275.
- **Lu, C. F., R. C. Montijn, J. L. Brown, F. M. Klis, J. Kurjan, H. Bussey, and P. N. Lipke.** 1995. Glycosylphosphatidylinositol-dependent cross-linking of α -agglutinin and β -1,6-glucan in the *Saccharomyces cerevisiae* cell wall. *J. Cell Biol.* **128**:333-340.
- **Lugones, L. G.** 1998. Function and expression of hydrophobins in the basidiomycetes *Schizophyllum commune* and *Agaricus bisporus*. PhD thesis, University of Groningen, The Netherlands.
- **Lugones, L. G., J. S. Bosscher, K. Scholtmeijer, O. M. de Vries, and J. G. Wessels.** 1996. An abundant hydrophobin (ABH1) forms hydrophobic rodlet layers in *Agaricus bisporus* fruiting bodies. *Microbiology* **142**:1321-1329.
- **Lugones, L. G., H. A. Wösten, K. U. Birkenkamp, K. A. Sjollema, J. Zagers, and J. G. Wessels.** 1999. Hydrophobins line air channels in fruiting bodies of *Schizophyllum commune* and *Agaricus bisporus*. *Mycol. Res.* **103**:635-640.
- **Lugones, L. G., H. A. Wösten, and J. G. Wessels.** 1998. A hydrophobin (ABH3) secreted by the substrate mycelium of *Agaricus bisporus* (common white button mushroom). *Microbiology* **144**:2345-53.
- **Luo, G., and L. P. Samaranayake.** 2002. *Candida glabrata*, an emerging fungal pathogen, exhibits superior relative cell surface hydrophobicity and adhesion to denture acrylic surfaces compared with *Candida albicans*. *APMIS* **110**:601-610.
- **Macura, A. B.** 1987. Hydrophobicity of *Candida albicans* related to their adherence to mucosal epithelial cells. *Zentralbl. Bacteriol. Microbiol. Hyg. Ser. A.* **266**:491-496.
- **Maneu, V. E., A. M. Cervera, J. P. Martínez, and D. Gozalbo.** 1996. Molecular cloning and characterization of a *Candida albicans* gene (*EFB1*) coding for the elongation factor EF-1 β . *FEMS Microbiol. Lett.* **145**:157-162.
- **Manners, D. J., A. J. Masson, and J. C. Patterson.** 1973. The structure of a β -1,3-glucan from yeast cell walls. *Biochem. J.* **135**:19-30.
- **Martin, G. G., G. C. Cannon, and C. L. McCormick.** 2000. Sc3p hydrophobin organization in aqueous media and assembly onto surfaces as mediated by the associated polysaccharide *schizophyllan*. *Biomacromolecules* **1**:49-60.

-
- **Martínez, J. P., M. L. Gil, M. Casanova, J. L. Lopez-Ribot, J. García, and R. Santandreu.** 1990. Wall mannoproteins in cells from colonial phenotypic variants of *Candida albicans*. *J. Gen. Microbiol.* **136**:2421-2432.
 - **Martínez, J. P., M. L. Gil, J. L. López-Ribot, and W. L. Chaffin.** 1998. Serologic response to cell wall mannoproteins and proteins of *Candida albicans*. *Clin. Microbiol. Rev.* **11**:121-141.
 - **Masuoka, J., and K. C. Hazen.** 1999. Differences in the acid-labile component of *Candida albicans* mannan from hydrophobic and hydrophilic yeast cells. *Glycobiology* **9**:1281-1286.
 - **McCabe, P. M., and N. K. Van Alfen.** 1999. Secretion of Cryparin, a fungal hydrophobin. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**:5431-5435.
 - **Meis, J. F., M. Ruhnke, B. E. De Pauw, F. C. Odds, W. Siegert, and P. E. Verweij.** 1999. *Candida dubliniensis* candidemia in patients with chemotherapy-induced neutropenia and bone marrow transplantation. *Emerg. Infect. Dis.* **5**:150-153.
 - **Mensa, J.** 2003. Guía terapéutica antimicrobiana 2003. Ed. Masson.
 - **Messing, J.** 1983. New M13 vectors for cloning. In Wu, R., Grossman, L. and Moldave, K. (eds.). *Methods in enzymology*, vol. 101, p. 20-78. Academic Press, New York.
 - **Miller, J.** 1972. *Experiments in molecular genetics*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
 - **Minagi, S., Y. Miyake, K. Inagaki, H. Tsuru, and H. Suginaka.** 1985. Hydrophobic interactions in *Candida albicans* and *Candida tropicalis* adherence to various denture base resin materials. *Infect. Immun.* **47**:11-14.
 - **Mitchell, A. P.** 1998. Dimorphism and virulence in *Candida albicans*. *Curr. Opin. Microbiol.* **1**:687-692.
 - **Moran, G. P., D. J. Sullivan, and D. C. Coleman.** 2002. Emergence of Non-*Candida albicans*, *Candida* species as pathogens, p. 37-53. In R. A. Calderone (ed.), *Candida and Candidiasis*, 1st ed. ASM Press, Washington, D.C.
 - **Morrow, B., H. Ramsey, and D. R. Soll.** 1994. Regulation of phase-specific genes in the more general switchig System of *Candida albicans* strain 3153A. *J. Med. Vet. Mycol.* **32**:287-394.

- **Morrow, B., T. Srikantha, and D. R. Soll.** 1992. Transcription of the gene for a pepsinogen, *PEP1*, is regulated by white-opaque switching in *Candida albicans*. *Mol. Cell. Biol.* **12**:2997-3005.
- **Munro, C. A., and N. A. Gow.** 2001. Chitin synthesis in human pathogenic fungi. *Med. Mycol.* **39**:41-53.
- **Munro, C. A., and B. Hube.** 2002. Anti-fungal therapy at the HAART of viral therapy. *Trends Microbiol.* **10**:173-177.
- **Munro, C. A., K. Winter, A. Buchan, K. Henry, J. M. Becker, A. J. Brown, C. E. Bulawa, and N. A. Gow.** 2001. Chs1 of *Candida albicans* is an essential chitin synthase required for synthesis of the septum and for cell integrity. *Mol. Microbiol.* **39**:1414-1426.
- **Nagasu, T., Y. L. Shimma, Y. Nakanishi, J. Kuramitsu, K. Iwama, K. I. Nakayama, K. Suzuki, and Y. Jigami.** 1992. Isolation of temperature-sensitive mutants of *Saccharomyces cerevisiae* deficient in mannose outer chain elongation. *Yeast* **8**:525-547.
- **Nakai, K., and Kanehisa, M.** 1992. A knowledge base for predicting protein localization sites in eukaryotic cells, *Genomics* **14**:897-911.
- **Nakari-Setälä, T., N. Aro, N. Kalkkinen, E. Alatalo, and M. Penttilä.** 1996. Genetic and biochemical characterization of the *Trichoderma reesei* hydrophobin HFB1. *Eur. J. Biochem.* **235**:248-255.
- **Nguyen, M. H., J. E. Peacock, A. J. Morris, D. C. Tanner, M. L. Nguyen, D. R. Snyderman, M. M. Wagener, M. G. Rinaldi, and L. Y. Yu.** 1996. The changing face of candidemia: emergence of non-*Candida albicans* species and antifungal resistance. *Am. J. Med.* **100**:617-623.
- **Odds, F. C.** 1988. *Candida* and candidosis: A review and bibliography. 2nd ed. Baillière Tincall, London.
- **Odds, F. C.** 1994 a. *Candida albicans*, the life and times of a pathogenic yeast. *J. Med. Vet. Mycol.* **32**:1-8.
- **Odds, F.C.** 1994 b. *Candida* species and virulence. *A. S. M. News* **60**:313-318.
- **Odds, F. C.** 1997. Switch of phenotype as an escape mechanism of the intruder. *Mycoses* **40**:9-12.
- **Ofek, I., and E. H. Beachey.** 1980. General concepts and principles of bacterial adherence in animals and man, p. 2-29. In *Bacterial adherence* (E. H. Beachey, ed.). Chapman and Hall, New York.

- **Orlean, P.** 1997. The molecular and cellular biology of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. In Cell cycle and cell biology. Pringle, J.R., Broach, J. R., Jones, E. W. (Eds.) p. 229-362. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.
- **Page, S., and Odds, F. C.** 1988. Binding of plasma membrane proteins to *Candida* species *in vitro*. J. Gen. Microbiol. **134**:2693-2702.
- **Parta, M., Y. Chang, S. Rulong, P. Pinto da Silva, and K. J. KwonChung.** 1994. *Hyp1*, a hydrophobin gene from *Aspegillus fumigatus* complements the rodletless phenotype in *Aspergyllus nidulans*. Infect. Immun. **62**:4389-4395.
- **Peng, T., K. I. Orsborn, M. J. Orbach, and J. N. Galgiani.** 1999. Proline-rich vaccine candidate antigen of *Coccidioides immitis*: conservation among isolates and differential expression with spherule maturation. J. Infect. Dis. **179**:518-521.
- **Pereiro, M.** 1996. Historia de la Micología. 1ª ed. Madrid: Drug Farma.
- **Pfaller, M. A., R. N. Jones, G. V. Doern, A. C. Fluit, J. Verhoef, H. S. Sader, S. A. Messer, A. Houston, S. Coffman, and R. J. Hollis.** 1999. International surveillance of bloodstream infections due to *Candida* species in the European SENTRY program: species distribution and antifungal susceptibility including the investigational triazol and echinocandin agents. Diagn. Microbiol. Infect. Dis. **35**:19-25.
- **Pfaller, M. A., R. N. Jones, G. V. Doern, H. S. Sader, R. J. Hollis, S. A. Messer, and the Sentry Participant Group.** 1998. International surveillance of bloodstream infections due to *Candida* species: frequency of occurrence and antifungal susceptibilities of isolates collected in 1997 in the United States, Canada, and South America for the SENTRY program. J. Clin. Microbiol. **36**:1886-1889.
- **Pfeifer, K., B. Arcangioli, and L. Guarente.** 1987. Yeast HAP1 activator competes with the factor RC2 for binding to the upstream activation site UAS1 of the *CYC1* gene. Cell **49**:9-18.
- **Pinjon, E., D. Sullivan, I. Salkin, D. Shanley, and D. Coleman.** 1998. Simple, inexpensive, reliable method for differentiation of *Candida dubliniensis* from *Candida albicans*. J. Clin. Microbiol. **36**:2093-2095.
- **Pomes, R., C. Gil, and C. Nombela.** 1985. Genetic analysis of *Candida albicans* morphological mutants. J. Gen. Microbiol. **131**:2107-2113.

- **Pontón, J., M. D. Moragues, and G. Quindós.** 2002. Non-culture-based diagnostics, p. 295-426. In R. A. Calderone (ed.), *Candida* and Candidiasis, 1st ed. ASM Press, Washington, D.C.
- **Pontón, J., P. Regulez, G. Quindós y R. Cisterna.** 1990. La composición antigénica de *Candida albicans* y su aplicación al diagnóstico de las candidiasis. *Rev. Iberoam. Micol.* **7**:122-132.
- **Popolo, L., D. Gilardielli, P. Bonfante, and M. Vai.** 1997. Increase in chitin as an essential response to defects in assembly of cell wall polymers in the *ggp1Δ* mutant of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Bacteriol.* **179**:463-469.
- **Prasad, J. K., I. Séller, and P. D. Thomson.** 1987. A ten year review of *Candida* sepsis and mortality in burn patients. *Surgery* **101**:213-216.
- **Quandt, K., K. Frech, H. Karas, E. Wingender, and T. Werner.** 1995. MatInd and Mat-Inspector. New fast and versatile tools for detection of consensus matches in nucleotide sequence data. *Nucl. Acids Res.* **23**:4878-4884.
- **Reagan, D. R., Pfaller M. A., Hollis R. J., and Wenzel R. P.** 1990. Characterization of the sequence of colonization and nosocomial candidemia using DNA fingerprinting and DNA probe. *J. Clin. Microbiol.* **28**:2733-2738.
- **Reiss, E., and C. J. Morrison.** 1993. Nonculture methods for diagnosis of disseminated candidiasis. *Clin. Microbiol. Rev.* **6**:311-323.
- **Richards, W. C.** 1993. Cerato-ulmin: a unique wilt toxin of instrumental significance in the development of Dutch elm disease. In *Dutch Elm Disease Research: Cellular and Molecular Approaches*, ed. M. B., Sticklen, J. L., Sherald, p. 89-151. New York: Springer-Verlag.
- **Richards, W. C., and S. Takai.** 1993. Amino acid sequence and spectroscopic studies of Dutch elm disease toxin, cerato-ulmin. In *Dutch Elm disease Research, Cellular and Molecular Approaches* (M. B. Sticklen and J. L. Sherald. Eds.), p. 152-170. Springer-Verlag. New York.
- **Richards, W. C., and S. Takai.** 1973. Novel technique for isolating microstructures present in shake cultures of the fungus *Ceratocystis ulmi*. *Appl. Microbiol.* **26**:443-44.
- **Richter, M., J. M. Willey, R. Süssmuth, G. Jung, and H. P. Fiedler.** 1998. Streptofactin, a novel biosurfactant with aerial mycelium inducing activity from *Streptomyces tendae* Tü901-8c. *FEMS Microbiol. Lett.* **163**:165-72.

- **Rikkerink, E. H., B. B. Magee, and P. T. Magee.** 1988. Opaque-white phenotype transition: a programmed morphological transition in *Candida albicans*. *J. Bacteriol.* **170**:895-899.
- **Robert, F., F. Lebreton, M. E. Bougnoux, A. Paugnam, D. Wassermann, M. Schlotterer, C. Tourte-Schaefer, and J. Dupouy-Camet.** 1995. Use of random amplified polymorphic DNA as a typing method for *Candida albicans* in epidemiological surveillance of a burn unit. *J. Clin. Microbiol.* **33**:2366-2371.
- **Robert, R., M. Mahazac, A. Leblond, G. Tronchin, and J. M. Senet.** 1991. Binding of mouse fibrinogen to *Candida albicans in vivo*. *FEMS Microbiol. Lett.* **62**:301-303.
- **Roby, D., A. Gadelle, and A. Toppan.** 1987. Chitin oligosaccharides as elicitors of chitinase activity in melon plants. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **143**:885-92.
- **Rodrigues, R. G., S. Yan, T. J. Walsh, and D. D. Roberts.** 1998. Hemoglobin differentially induces binding of *Candida*, *Trichoporon*, and *Saccharomyces* species to fibronectin. *J. Infect. Dis.* **178**:497-502.
- **Rohe, M., A. Gierlich, H. Hermann, M. Hahn, B. Schmidt, S. Rosahl, and W. Knogge.** 1995. The race-specific elicitor, NIP1, from the barley pathogen, *Rhynchosporium secalis*, determines avirulence on host plants of the Rrs1 resistance genotype. *EMBO. J.* **14**:4168-4177.
- **Rotrosen, D., R. A. Calderone, and J. E. Edwards Jr.** 1986. Adherence of *Candida* species to host tissues and plastic surfaces. *Rev Infect. Dis.* **8**:73-85.
- **Ruhnke, M.** 2002. Skin and mucous membrane infections, p. 307-325. In R. A. Calderone (ed.), *Candida and Candidiasis*, 1st ed. ASM Press, Washington, D.C.
- **Ruiz-Herrera, J.** 1992. Fungal cell wall: structure, synthesis and assembly. CRC Press, Boca Ratón.
- **Russo, P. S., F. D. Blum, J. D. Ipsen, W. G. Miller, and Y. J. Abul-Hajj.** 1982. The surface activity of the phytotoxin cerato-ulmin. *Can. J. Bot.* **60**:1414-1422.
- **Salkin, I. F., W. R. Pruit, A. A. Padhye, D. Sullivan, D. Coleman, and D. H. Pincus.** 1998. Distinctive carbohydrate assimilation profiles used to identify the first clinical isolates of *Candida dubliniensis* recovered in the United States. *J. Clin. Microbiol.* **36**:1467.

-
- **Sambrook, J., E. F. Fritsch, and T. Maniatis.** 1989. Molecular cloning. A laboratory manual, 2nd edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
 - **Sanger, F., S. Nicklen, and A. R. Coulson.** 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **74**:5463-5467.
 - **Schaffner, P., J. Meyer, M. Dard, R. Wenz, and B. Nies.** 1999. Induced tissue integration of bone implants by coating with bone selective RGD-peptides in vitro and in vivo studies. Mater. Med. **10**:837-839.
 - **Scholtmeijer, K.** 2000. Expression and Engineering of Hydrophobin Genes. Groningen: Univ. Groningen.
 - **Scholtmeijer, K., J. G. Wessels, and H. A. Wösten.** 2001. Fungal hydrophobins in medical and technical applications. App. Microbiol. And Biotechnol. **56**:1-8.
 - **Schoofs, A. G., F. C. Odds, R. Colebunders, M. Ieven, and H. Goossens.** 1998. Cross-sectional study of oral *Candida* carriage in a human immunodeficiency virus (HIV)-seropositive population: predisposing factors, epidemiology and antifungal susceptibility. Mycoses **41**:203-211.
 - **Schuren, F. H., and J. G. Wessels.** 1990. Two genes specifically expressed in fruiting dikaryons of *Schizophyllum commune*: homologies with a gene not regulated by mating type genes. Gene **90**:199-205.
 - **Schuurs, T. A., H. J. Dalstra, J. M. Scheer, and J. G. Wessels.** 1998. Positioning of nuclei in the secondary Mycelium of *Schizophyllum commune* in relation to differential gene expression. Fungal Genet. Biol. **23**:150-161.
 - **Schwebke, J., and S. L. Hillier.** 1996. Sexually-transmitted diseases and sexual health, p. 3343-3372. In D. J. Weatherall, J. G. G. Ledingham and D. A. Warrell (eds). Oxford Textbook of Medicine, 3rd ed. Oxford University Press.
 - **Segers, G. C., W. Hamada, R. P. Oliver, and P. D. Spanu.** 1999. Isolation and characterisation of five different hydrophobin-encoding cDNAs from the fungal tomato pathogen *Cladosporium fulvum*. Mol. Gen. Genet. **261**:644-652.
 - **Selleck, S. B., and J. Majors.** 1987. Photofootprinting in vivo detects transcription-dependent changes in yeast TATA boxes. Nature **325**:173-177.
 - **Sentandreu, M., M. V. Elorza, R. Sentandreu, and W. A. Fonzi.** 1998. Cloning and characterization of PRA1, a gene encoding a novel pH-regulated antigen of *Candida albicans*. J. Bacteriol. **180**:282-289.

- **Sentandreu, M., M. V. Elorza, R. Sentandreu, and D. Gozalbo.** 1995. Cloning of cDNAs coding for *Candida albicans* cell surface proteins. *J. Med. Vet. Mycol.* **33**:105-111.
- **Sentandreu, R., S. Mormeneo, and J. Ruiz-Herrera.** 1994. Biogenesis of the fungal cell wall, p. 111-124. In J.G.H. Wessels and F. Meinhardt (ed.). *The Mycota I: grow, differentiation and sexuality.* Springer-Verlag. KG, Berlin, Germany.
- **Sharp, J. A., M. McNeil, and P. Albersheim.** 1984 a. The primary structure of one elicitor active and seven elicitor-inactive hexa (β -D-glucopyranosyl)-D-glucitols isolated from the mycelial walls of *Phytophthora megasperma* f. sp. *glycinea*. *J. Biol. Chem.* **25**:11321-11329.
- **Sharp, J. A., B. Valent, and P. Albersheim.** 1984 b. Purification and partial characterization of a β -glucan fragment that elicits phytoalexin accumulation in soybean. *J. Biol. Chem.* **25**:11312-11320.
- **Shepherd, M.** 1990. Biology of *Candida* species, p. 10-20. In L. Samaranayake, and T. McFarlane (ed.), *Oral Candidiasis.* Wright, London.
- **Sherwood, J., N. A. Gow, G. W. Gooday, D. W. Gregory, and D. Marshall.** 1992. Contact sensing in *Candida albicans*: a possible aid to epithelial penetration. *J. Med. Vet. Mycol.* **30**:461-469.
- **Sietsma, J. H., D. Rast, and J. G. Wessels.** 1977. The effect of carbon dioxide on fruiting and on the degradation of a cell wall glucan in *Schizophyllum commune*. *J. Gen. Microbiol.* **102**:385-389.
- **Simoneti, N., V. Strippoli, and A. Cassone.** 1974. Yeast-mycelial conversion induced by N-acetyl-D-glucosamine in *Candida albicans*. *Nature* **250**:344-346.
- **Slutsky, B., J. Buffo, and D. R. Soll.** 1985. High-frequency switching of colony morphology in *Candida albicans*. *Science* **42**:666-669.
- **Slutsky, B., M. Staebell, J. Anderson, L. Risen, M. Pfaller, and D. R. Soll.** 1987. White-opaque transition: a second high-frequency switching system in *Candida albicans*. *J. Bacteriol.* **169**:189-197.
- **Smits, G. J., J. C. Kapteyn, H. Van Den Ende, and F. M. Klis.** 1999. Cell wall dynamics in yeast. *Curr. Opin. Microbiol.* **2**:348-352.
- **Sobel, J. D., P. G. Myers, D. Kaye, and M. E. Levison.** 1981. Adherence of *Candida albicans* to human vaginal and buccal epithelial cells. *J. Infect. Dis.* **143**:76-82.

- **Soll, D. R.** 1990. Dimorphism and high-frequency switching in *Candida albicans*. In Kirsch, D. R., Kelly, R. and Kurtz, M. B. (eds.), *The genetics of Candida*, p. 147-176. CRC Press.
- **Soll, D. R.** 1992 a. High-frequency switching in *Candida albicans*. *Clin. Microbiol. Rev.* **5**:183-203.
- **Soll, D. R.** 1992 b. Switching and its possible role in *Candida* pathogenesis, p. 156-172. In J. E. Bennet, R. J. Hay, and P. K. Peterson (ed.), *New strategies in fungal disease*. Churchill Livingstone, Edinburgh, United Kingdom.
- **Soll, D. R.** 2001 a. Phenotypic switching, p. 123-142. In R. Calderone (ed.), *Candida and candidiasis*. American Society for Microbiology, Washington, D. C.
- **Soll, D. R.** 2001 b. The molecular biology of switching in *Candida*, p. 161-182. In R. Cihlar and R. Calderone (ed.), *Fungal pathogenesis: principles and clinical application*. Marcel Dekker, New York, N. Y.
- **Soll, D. R.** 1997. Gene regulation during high-frequency switching in *Candida albicans*. *Microbiology* **143**:279-288.
- **Soll, D. R., J. Anderson, and M. Bergen.** 1991. The developmental biology of the white-opaque transition in *Candida albicans*, p. 20-45. In R. Prasad (ed.), *Candida albicans: cellular and molecular biology*. Springer-Verlag, New York, N. Y.
- **Soll, D. R., L. J. Langtimm, J. McDowell, J. Hicks, and D. Galask.** 1987. High-frequency switching in *Candida albicans*. *J. Clin. Microbiol.* **25**:1611-1622.
- **Soll, D. R., B. Morow, and T. Strikantha.** 1993. High-frequency phenotypic switching in *Candida albicans*. *Trends Genet.* **9**:61-65.
- **Southern, E.** 1975. Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J. Mol. Biol.* **98**:503-510.
- **Spanu, P.** 1997. HCF-1, a hydrophobin from the tomato pathogen *Cladosporium fulvum*. *Gene* **193**:89-96.
- **Staab, J. F., S. D. Bradway, P. L. Fidel, and P. Sundstrom.** 1999. Adhesive and mammalian transglutaminase substrate properties of *Candida albicans* Hwp1. *Science* **283**:1535-1538.

- **Sterk, P., H. Booij, G. A. Schellekens, A. Van Kammen, and S. C. de Vries.** 1991. Cell-specific expression of the carrot lipid transfer protein gene. *Plant Cell* **3**:907-921.
- **Stevenson, K. J., J. A. Slater, and S. Takai.** 1979. Cerato-ulmin, a wilting toxin of Dutch elm disease fungus. *Phytochemistry* **18**:235-138.
- **St. Leger, R. J., R. C. Staples, and D. W. Roberts.** 1992. Cloning and regulatory analysis of starvation-stress gene, *ssgA*, encoding a hydrophobin-like protein from the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. *Gene* **120**:119-124.
- **Stringer, M. A., R. A. Dean, T. C. Sewall, and W. E. Timberlake.** 1991. Rodletless, a new *Aspergillus* developmental mutant induced by directed gene inactivation. *Genes Dev.* **5**:1161-1171.
- **Stringer, M. A., and W. E. Timberlake.** 1995. *dewA* encodes a fungal hydrophobin component of the *Aspergillus* spore wall. *Mol. Microbiol.* **16**:33-44.
- **Stringer, M. A., and W. E. Timberlake.** 1993. Cerato-ulmin, a toxin involved in Dutch Elm disease, is a fungal hydrophobin. *Plant Cell.* **5**:145-146.
- **Sullivan, D., and D. Coleman.** 1998. *Candida dubliniensis*: characteristics and identification. *J. Clin. Microbiol.* **36**:329-334.
- **Summers, D. F., A. Grollman, and H. F. Hasenclever.** 1964. Polysaccharide antigens of *Candida* cell wall. *J. Immunol.* **92**:491-499.
- **Sundstrom, P. M., and G. E. Kenny.** 1984. Characterization of antigen specific to the surface of germ tubes of *Candida albicans* by immunofluorescence. *Infect. Immun.* **43**:850-855.
- **Surarit, R., P. K. Gopal, and M. G. Shepherd.** 1988. Evidence for a glycosidic linkage between chitin and glucan in the cell wall of *Candida albicans*. *J. Gen. Microbiol.* **134**:1723-1730.
- **Swoboda, R. K., G. Bertram, H. Hollander, D. Greenspan, J. S. Greenspan, N. A. Gow, G. W. Gooday, and A. J. Brown.** 1993. Glycolytic Enzymes of *Candida albicans* are nonubiquitous immunogens during candidiasis. *Infect. Immun.* **10**:4263-4271.
- **Tagu, D., B. Nasse, and F. Martin.** 1996. Cloning and characterization of hydrophobin-encoding cDNAs from the ectomycorrhizal basidiomycete *Pisolithus tinctorius*. *Gene* **168**:93-97.

- **Takai, S.** 1974. Pathogenicity and cerato-ulmin production in *Ceratocystis ulmi*. *Nature* **252**:124-126.
- **Takai, S.** 1980. Relationship of the production of toxin, cerato-ulmin, to synnemata formation, pathogenicity, mycelial habit, and growth of *Ceratocystis ulmi* isolates. *Can. J. Bot.* **58**:658-662.
- **Takai, S., Y. Hiratsuka, J. Krywienczyk, W. C. Richards, and Y. P. Davies.** 1980. Evidence for the presence of the toxin cerato-ulmin in the synnema head fluid of *Ceratocystis ulmi*. *Can. J. Bot.* **58**:669-675.
- **Takai, S., and W. C. Richards.** 1978. Cerato-ulmin, a wilting toxin of *Ceratocystis ulmi*: isolation and some properties of cerato-ulmin from the culture of *C. ulmi*. *Phytopathol. Z.* **91**:129-146.
- **Talbot, N. J., D. J. Ebbole, and J. E. Hamer.** 1993. Identification and characterization of MPG1, a gene involved in pathogenicity from the rice blast fungus *Magnaporthe grisea*. *Plant Cell* **5**:1575-1590.
- **Talbot, N. J., M. Kershaw, G. E. Walkley, O. M. de Vries, J. G. Wessels, and J. E. Hamer.** 1996. MPG1 encodes a fungal hydrophobin involved in surface interactions during infection-related development of the rice blast fungus *Magnaporthe grisea*. *Plant Cell* **8**:985-999.
- **Tanner, W., and Lehle.** 1987. Protein glycosilation in yeast. *Biochimica et Biophysica Acta.* **27**:81-99.
- **Taveres, D., P. Ferreira, M. Vilanova, A. Videira, and M. Arala-Chaves.** 1995. Immunoprotection against systemic candidiasis in mice. *Inf. Immunol.* **7**:785-796.
- **Taveres, D., A. Salvador, P. Ferreira, and M. Arala-Chaves.** 1993. Immunological activities of a *Candida albicans* protein which plays an important role in the microorganism in host. *Infect. Immun.* **6**:1881-1888.
- **Temple B., P. A. Horgen, L. Bernier, and W. E. Hintz.** 1997. Cerato-ulmin, a hydrophobin secreted by the causal agents of Dutch elm disease, is a parasitic fitness factor. *Fungal Genet. Biol.* **22**:39-53.
- **Templeton, M. D., D. R. Greenwood, and R. E. Beever.** 1995. Solubilization of *Neurospora crassa* rodlet proteins and identification of the predominant protein as the proteolytically processed eas (ccg-2) gene product. *Exp Mycol.* **19**:166-169.

- **Templeton, M. D., E. H. Rikkerink, and R. E. Beaver.** 1994. Small, cysteine-rich proteins and recognition in fungal-plant interactions. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **7**:320-25.
- **Thau, N., M. Monod, B. Crestani, C. Rolland, G. Tronchin, J. P. Latge, and S. Paris.** 1994. Rodletless mutants of *Aspergillus fumigatus*. *Infect. Immun.* **62**:4380-4388.
- **Thomas, D.** 1995. Nanotechnology's many disciplines. *BioTechnology* **13**:439-443.
- **Thomson, L. M., S. Bates, S. Yamazaki, M. Arisawa, Y. Aoki, and N. A. Gow.** 2000. Functional characterization of the *Candida albicans* *MNT1* mannosyltransferase expressed heterologously in *Pichia pastoris*. *J. Biol. Chem.* **275**:18933-18938.
- **Tosh, F.D., and L. J. Douglas.** 1992. Characterization of a fucoside-binding adhesin of *Candida albicans*. *Infect. Immun.* **60**:4734-4739.
- **Towbin, H. T., T. Staehelin, and J. Gordon.** 1979. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheet: procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sca. U. S. A.* **76**:4350- 4354.
- **Tronchin, G., R. Robert, A. Bouali, J. M. Senet.** 1987. Immunocytochemical localization of in vitro binding of human fibronectin to *Candida albicans* germ tube and mycelium. *Ann. Inst. Pasteur Microbiol.* **138**:177-187.
- **Tzung, K. W., R. M. Williams, S. Scherer, N. Federspiel, T. Jones, N. Hansen, V. Bivolarevic, L. Huizar, C. Komp, R. Surzycki, R. Tamse, R. W. Davis, and N. Agabian.** 2001. Genomic evidence for a complete sexual cycle in *Candida albicans*. Graduate Program in Oral Biology, Department of Stomatology, University of California, San Francisco, CA 94143-0422. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **98**:3249-53.
- **Úbeda, P., A. Viudes, V. Peset, E. Cantón, J. Pemán, y M. Gobernado.** 1999. Tipificación molecular y sensibilidad de aislamientos de *Candida albicans* procedentes de pacientes críticos. *Enferm. Infecc. Microbiol. Clin.* **17**:350-353.
- **Van Belkum, A., W. Melchers, B. E. de Pauw, S. Scherer, W. Quint, and J. F. Meis.** 1994. Genotypic characterization of sequential *Candida albicans* isolates from fluconazole-treated neutropenic patients. *J. Infect. Dis.* **169**:1062-1070.
- **Van den Ackervecken, G. F., J. A. Van Kan, and P. J. De Wit.** 1992. Molecular analysis of the avirulence gene *avr9* of the fungal tomato pathogen

Cladosporium fulvum fully supports the gene-for-gene hypothesis. *Plan J.* **2**:359-366.

- **Van der Vegt, W., H. C. Van der Mei, H. A. Wösten, J. G. Wessels, and H. J. Busscher.** 1996. A comparison of the surface activity of the fungal hydrophobin SC3p with those of other proteins. *Biophys Chem.* **57**:253-260.
- **Van Wetter, M. A., F. H. Schuren, and J. G. Wessels.** 1996. Targeted mutation of the *Sc3* hydrophobin gene of *Schizophyllum commune* affects formation of aerial hyphae. *FEMS Microbiol. Lett.* **140**:265-270.
- **Van Wetter, M. A., H. A. Wösten, J. H. Sietsma, and J. G. Wessels.** 2000 b. Hydrophobin gene expression affects hyphal wall composition in *Schizophyllum commune*. *Fungal Genet. Biol.* **31**:99-104.
- **Van Wetter, M. A., H. A. Wösten, and J. G. Wessels.** 2000 a. SC3 and SC4 Hydrophobins have distinct functions in formation of aerial structures in dikaryons of *Schizophyllum commune*. *Mol. Microbiol.* **36**:201-210.
- **Vargas, K., P. W. Wertz, D. Drake, B. Morrow, and D. R. Soll.** 1994. Differences in adhesion of *Candida albicans* 3153A cells exhibiting switch phenotypes to buccal epithelium and stratum corneum. *Infect. Immun.* **62**:1328-1335.
- **Vespa, M. N., J. L. López-Ribot, and W. L. Chaffin.** 1995. Adherence of germ tubes of *Candida albicans* to tissues from immunocompromised mice. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* **11**:57-64.
- **Voss, A., R. J. Hollis, M. A. Pfaller, R. P. Wenzel, and B. N. Doebbeling.** 1994. Investigation of the sequence of colonization and candidemia in nonneutropenic patients. *J. Clin. Microbiol.* **32**:975-980.
- **Voss, A., M. A. Pfaller, R. J. Hollis, J. Rhine Chalberg, and B. N. Doebbeling.** 1995. Investigation of *Candida albicans* transmission in a surgical intensive care unit cluster by using genomic DNA typing methods. *J. Clin. Microbiol.* **33**:576-580.
- **Walsh, T. J., and P. A. Pizzo.** 1993. Laboratory diagnosis of candidiasis, p. 109-135. In G. P. Bodey (ed.), *Candidiasis: Pathogenesis, Diagnosis and Treatment*. Raven Press Ltd., New York, N. Y.
- **Wenzel, R. P.** 1995. Nosocomial candidemia: risk factors and attributable mortality. *Clin. Infect. Dis.* **20**:1531-1534.
- **Wessels J. G.** 1997. Hydrophobins: proteins that change the nature of the fungal surface. *Adv. Microb. Physiol.* **38**:1-45.

- **Wessels J. G.** 1994. Developmental regulation of fungal cell wall formation. *Annu. Rev. Phytopathol.* **32**:413-437.
- **Wessels, J. G.** 1996. Fungal hydrophobins proteins that function at an interface. *Trends Plant Sci.* **1**:9-13.
- **Wessels, J. G.** 1986. Cell wall synthesis in apical hyphal growth. *Int. Rev. Cytol.* **104**:37-97.
- **Wessels, J. G., S. A. Ásgeirsdóttir, K. U. Birkenkamp, O. M. de Vries, and L. G. Lugones.** 1995. Genetic regulation of emergent growth in *Schizophyllum commune*. *Can. J. Bot.* **73**:237-281.
- **Wessels, J. G., O. M. de Vries, S. A. Ásgeirsdóttir, and F. H. Schuren.** 1991 a. Hydrophobin genes involved in formation of aerial hyphae and fruit bodies in *Schizophyllum commune*. *Plant Cell.* **3**:793-799.
- **Wessels, J. G., O. M. de Vries, S. A. Ásgeirsdóttir, and J. Springer.** 1991 b. The *thn* mutation of *Schizophyllum commune*, which suppresses formation of aerial hyphae, affects expression of the SC3 hydrophobin gene. *J. Gen. Microbiol.* **137**:2439-2445.
- **White, T. C., S. H. Miyasaki, and N. Agabian.** 1993. Three distinct secreted aspartyl proteinases in *Candida albicans*. *J. Bacteriol.* **177**:6126-6133.
- **Winner, H. I., and R. Hurley.** 1964. *Candida albicans*. London: Churchill.
- **Wösten, H. A.** 2001. Hydrophobins: multipurpose proteins. *Annu. Rev. Microbiol.* **55**:625-46.
- **Wösten, H. A., S. A. Ásgeirsdóttir, J. H. Krook, J. H. Drenth, and J. G. Wessels.** 1994 b. The Sc3p hydrophobin self-assembles at the surface of aerial hyphae as a protein membrane constituting the hydrophobic rodlet layer. *Eur. J. Cell Biol.* **63**:122-129.
- **Wösten, H. A., and M. L. de Vocht.** 2000. Hydrophobins, the fungal coat unravelled. *Biochim. Biophys. Acta.* **1469**:79-86.
- **Wösten, H. A., O. M. de Vries, H. C. Van der Mei, H. J. Busscher, and J. G. Wessels.** 1994 c. Atomic composition of the hydrophobic and hydrophilic sides of self-assembled SC3P hydrophobin. *J. Bacteriol.* **176**:7085-7086.
- **Wösten, H. A., O. M. de Vries, and J. G. Wessels.** 1993. Interfacial self-assembly of a fungal hydrophobin into a rodlet layer. *Plant Cell* **5**:1567-1574.

- **Wösten, H. A., T. G. Ruardy, H. C. Van der Mei, H. J. Busscher, and J. G. Wessels.** 1995. Interfacial self-assembly of a *Schizophyllum commune* hydrophobin into an insoluble amphipathic membrane depends on surface hydrophobicity. *Colloids Surf.* **5**:189-195.
- **Wösten, H. A., F. H. Schuren, and J. G. Wessels.** 1994 a. Interfacial self-assembly of a hydrophobin into an amphipathic membrane mediates fungal attachment to hydrophobic surfaces. *EMBO J.* **13**:5848-5854.
- **Wösten, H. A., M. A. Van Wetter, L. G. Lugones, H. C. Van der Mei, H. J. Busscher, and J. G. Wessels.** 1999. How a fungus escapes the water to grow into the air. *Curr. Biol.* **9**:85-88.
- **Yaguchi, M., M. Pusztai-Carey, C. Roy, W. K. Surewicz, and P. R. Carey.** 1993. Amino acid sequence and spectroscopic studies of Dutch elm disease toxin, cerato-ulmin. *Molecular Approaches*, ed. MB Sticklen, J. L. Sherald, pp 152-170. New York: Springer-Verlag.
- **Yan, S., R. G. Rodrigues, D. Cahn-Hidalgo, T. J. Walsh, and D. D. Roberts.** 1998. Hemoglobin induces binding of several extracellular matrix proteins to *Candida albicans*. Identification of a common receptor for fibronectin, fibrinogen, and laminin. *J. Biol. Chem.* **6**:5638-5644.
- **Yang, M. C., D. M. Magee, L. Kaufman, Y. Zhu, and R. A. Cox.** 1997. Recombinant *Coccidioides immitis* complement-fixing antigen: detection of an epitope shared by *Coccidioides immitis*, *Histoplasma capsulatum*, and *Blastomyces dermatitidis*. *Clin. Diag. Lab. Immunol.* **4**:19-22.
- **Yanisch-Perron, C., J. Vieira, and J. Messing.** 1985. Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of the M13mp 18 and pUC19 vectors. *Gene* **33**:103-119.
- **Young, R. A., and R. W. Davis.** 1983. Efficient isolation of genes by using antibody probes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **80**:1194-1198.
- **Yu, L., K. K. Lee, K. Ens, P. C. Doig, M. R. Carpenter, W. Staddon, R. S. Hodges, W. Paranchych, and R. T. Irvin.** 1994 a. Partial carcterization of a *Candida albicans* fimbrial adhesin. *Infect. Immun.* **62**:2834-2842.
- **Yu, L., K. K. Lee, H. B. Sheth, P. Lane-Bell, G. Srivastava, O. Hindsgaul, W. Paranchych, and R. T. Irvin.** 1994 b. Fimbria-mediated adherence of *Candida albicans* to glycosphingolipid receptors on human buccal epithelial cells. *Infect Immun.* **62**:2843-2848.
- **Zajic, J. E., and W. Seffens.** 1983. Biosurfactants. *CRC Crit. Rev. Biotechnol.* **1**:87-107.

- **Zanetta, J., R. Bonaly, S. Maschke, G. Strecker, and J. Michalski.** 1998. Differential binding IL-2 and CLS to *Candida albicans* and cancer cells. *Glycobiology*. **8**:221-225.
- **Zhang, L., D. Villalon, Y. Sin, P. Kazmierczak, and N. K. Van Alfen.** 1994. Virus-associated down-regulation of the gene encoding cryparin, an abundant cell surface protein of the chestnut blight fungus *Cryphonectria parasitica*. *Gene* **139**:59-64.
- **Zhu, Y., C. Yang, D. M. Magee, and R. Cox.** 1996. Molecular cloning and characterization of *Coccidioides immitis* antigen 2 cDNA. *Infect. Immun.* **64**:2695-2699.
- **Zueco, J., S. Mormeneo, and R. Sentandreu.** 1986. Temporal aspects of the O-glycosylation of *Saccharomyces cerevisiae* proteins. *Biochim. Biophys. Acta.* **884**:93-100.