

DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA

ESTUDIO DE CaCwt1 DE CANDIDA ALBICANS
HOMÓLOGO AL FACTOR DE TRANSCRIPCIÓN Rds2 DE
SACCHAROMYCES CEREVISIAE

INMACULADA MORENO GIMENO

UNIVERSITAT DE VALENCIA
Servei de Publicacions
2008

Aquesta Tesi Doctoral va ser presentada a València el dia 28 de Setembre de 2007 davant un tribunal format per:

- D. Enrique Herrero Perpiñán
- D. Joachim Ernst
- D. Antonio Marcilla Díaz
- D. Juan Carlos Argüelles Ordóñez
- D. Fernando Aniento Company

Va ser dirigida per:

D. Eulogio Valentín Gómez
D. Rafael Sentandreu Ramón
D. Luis Castillo Barahona

©Copyright: Servei de Publicacions
Inmaculada Moreno Gimeno

Depòsit legal:

I.S.B.N.:978-84-370-6999-9

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



VNIVERSITAT E VALÈNCIA

FACULTAD DE FARMACIA

Departamento de Microbiología y Ecología

Estudio de CaCwt1 de *Candida albicans* homólogo al factor de transcripción Rds2 de *Saccharomyces cerevisiae*.

Memoria que presenta
INMACULADA MORENO GIMENO
para optar al grado de Doctora en Bioquímica

Valencia, Abril de 2007

Parte de los resultados experimentales contenidos en esta Memoria se recogen en las siguientes publicaciones:

- **Moreno, I., Pedreño, Y., Maicas, S., Sentandreu, R., Herrero, E., Valentin, E. (2003)** Characterization of a *Candida albicans* gene encoding a putative transcriptional factor required for cell wall integrity. *FEMS Microbiol Lett.* **226**:159-67.
- **Maicas, S., Moreno, I., Nieto, A., Gomez, M., Sentandreu, R., Valentin, E. (2005)** *In silico* analysis for transcription factors with Zn(II)₂C₆ binuclear cluster DNA-binding domains in *Candida albicans*. *Comp Funct Genom.* **6**:345-56.
- **Moreno, I., Castillo, L., Sentandreu, R., Valentin, E. (2007)** Global transcriptional profiling of *Candida albicans cwt1* null mutant. *Yeast.* **24**:357-70.

βME	Beta-mercaptoethanol	Beta-mercaptoetanol
BSA	Bovine serum albumine	Albúmina de suero bovino
cDNA	Complementary DNA	DNA complementario
CSPD	Chemiluminiscent substrate	Substrato quimioluminiscente
CWP	Cell wall proteins	Proteínas de pared celular
DBD	DNA binding domain	Dominio de unión a ADN
DEPC	Diethyl pyrocarbonate	Dietilpirocarbonato
DIG	Digoxigenin	Digoxigenina
dNTPs	Deoxynucleotide triphosphate	desoxirribonucleótidos trifosfato
DO _n	Optical density at n nanometers	Densidad óptica a n nanómetros
DTT	Dithiothreitol	Ditiotreitol
ECL	Enhanced chemiluminescence	Técnica de quimioluminiscencia
ER	Endoplasmic reticulum	Retículo endoplásmico
FITC	Fluorescein isothiocyanate	Isotiocianato de fluoresceína
g	Gram	Gramo
xg	Gravity unit	Gravedades
GPI	Glycosyl phosphatidyl inositol	Glicosil fosfatidil inositol
GlcNAc	N-acetylglucosamine	N-acetilglucosamina
GTP	Guanosin triphosphate	Guanosina trifosfato
h	Hours	Horas
IPF	Individual protein file	
kb	Kilobase	
kDa	Kilodalton	
l	Litre	Litro
M	Molar	
min	Minute	Minuto
mARN	Messenger RNA	ARN mensajero
NLS	Nuclear localization signal	Señal de localización nuclear
ORF	Open reading frame	Pauta abierta de lectura
PAb	Polyclonal antibody	Anticuerpo policlonal
PAGE	Polyacrilamide gel electrophoresis	Electroforesis en gel de poliacrilamida
pb	Base pairs	Pares de bases
PBS	Phosphate buffer saline	Tampón fosfato salino
PCR	Polymerase chain reaction	Reacción en cadena de la polimerasa
PDB	Protein data bank	Banco de datos de proteínas
PEG	Polyethylene glycol	Polietilenglicol
PMSF	Phenylmethylsulphonyl fluoride	Fluoruro de fenil-metil sulfonilo
Q-RT-PCR	Quantitative RT-PCR	RT-PCR semicuantitativa
RMN	Nuclear magnetic resonance	Resonancia magnética nuclear
RSAT	Regulatory sequence analysis tools	
RT-PCR	Reverse transcriptase-PCR	Transcripción reversa-PCR
SDS	Sodium dodecyl sulphate	Dodecil sulfato sódico
seg	Seconds	Segundos
TBS	Tris buffer saline	Tampón tris salino
Tris	Tris (hydroxymethyl) aminomethane	Tris (hidroximetil) amino metano
TTBS	TBS plus Tween-20	TBS con Tween-20
UDP	Uridinediphosphoglucose	Uridina difosfoglucosa
V	Volt	Voltio
vol	Volume	Volumen
YNB	Yeast nitrogen base	Base nitrogenada de levaduras

Tabla de códigos internacionales de una o tres letras para designar a los aminoácidos.

AMINOÁCIDO	3 LETRAS	1 LETRA	PESO MOLECULAR (Da)
Ácido aspártico	Asp	D	133
Ácido glutámico	Glu	E	147
Alanina	Ala	A	89
Arginina	Arg	R	174
Asparagina	Asn	N	132
Cisteína	Cys	C	121
Fenilalanina	Phe	F	165
Glicina	Gly	G	75
Glutamina	Gln	Q	146
Histidina	His	H	155
Isoleucina	Ile	I	131
Leucina	Leu	L	131
Lisina	Lys	K	146
Metionina	Met	M	149
Prolina	Pro	P	115
Serina	Ser	S	105
Tirosina	Tyr	Y	181
Treonina	Thr	T	119
Triptófano	Trp	W	204
Valina	Val	V	117

Tabla de uso de codones universal.

		2ª base			
		U	C	A	G
1ª base	U	UUU Fenilalanina	UCU Serina	UAU Tirosina	UGU Cisteína
		UUC Fenilalanina	UCC Serina	UAC Tirosina	UGC Cisteína
		UUA Leucina	UCA Serina	UAA <i>Parada</i>	UGA <i>Parada</i>
		UUG Leucina	UCG Serina	UAG <i>Parada</i>	UGG Triptófano
	C	CUU Leucina	CCU Prolina	CAU Histidina	CGU Arginina
		CUC Leucina	CCC Prolina	CAC Histidina	CGC Arginina
		CUA Leucina	CCA Prolina	CAA Glutamina	CGA Arginina
		CUG Leucina ²	CCG Prolina	CAG Glutamina	CGG Arginina
	A	AUU Isoleucina	ACU Treonina	AAU Asparagina	AGU Serina
		AUC Isoleucina	ACC Treonina	AAC Asparagina	AGC Serina
		AUA Isoleucina	ACA Treonina	AAA Lisina	AGA Arginina
		AUG Metionina ¹	ACG Treonina	AAG Lisina	AGG Arginina
	G	GUU Valina	GCU Alanina	GAU Ác. aspártico	GGU Glicina
		GUC Valina	GCC Alanina	GAC Ác. aspártico	GGC Glicina
		GUA Valina	GCA Alanina	GAA Ác. glutámico	GGA Glicina
		GUG Valina	GCG Alanina	GAG Ác. glutámico	GGG Glicina

¹ El primer codón AUG de un mRNA indica el sitio de iniciación de la traducción.

² En *C. albicans* el codón universal de Leucina CUG codifica para Serina *in vivo*.

ÍNDICE

I. INTRODUCTION	1
I.1- GENERAL ASPECTS AND TAXONOMY OF <i>Candida albicans</i>	2
I.2- <i>C. albicans</i> PATHOGENICITY	2
I.2.1- Types of candidiasis	3
I.2.1.1- Superficial candidiasis	3
I.2.1.2- Internal candidiasis	3
I.2.2- Risk factors	4
I.2.3- Treatment of candidiasis	4
I.2.4- Incidence of candidiasis	5
I.3- VIRULENCE FACTORS	5
I.3.1- Adhesión	6
I.3.2- Secreted hydrolytic enzymes	7
I.3.2.1- Secreted aspartyl proteinases (Saps)	7
I.3.2.2- Phospholipases (PL)	8
I.3.2.3- Lipases (LIP)	8
I.3.3- Morphogenesis	9
I.3.3.1- Outside cues	10
I.3.3.2- Signalling pathways	10
I.3.3.2.1- The cAMP-dependent protein kinase A pathway	11
I.3.3.2.2- The mitogen-activated protein kinase pathway	12
I.3.3.2.3- Repressing factors	13
I.3.3.3- Co-regulation of virulence and morphogenesis genes	13
I.3.4- Phenotypic switching	13
I.3.5- Biofilms formation	14
I.4 <i>Candida albicans</i> CELL WALL	16
I.4.1- Cell wall composition	16
I.4.1.1- β-glucans	18
I.4.1.1.1- β -1,3-glucan	18
I.4.1.1.2- β -1,6-glucan	19
I.4.1.2- Chitin	20
I.4.1.3- Mannoproteins	21
I.4.1.3.1- Classification of cell wall mannoproteins	22
I.4.1.3.1.1- <u>N</u> on- <u>c</u> ovalently <u>l</u> inked (NCL-CWPs)	23
I.4.1.3.1.2- <u>R</u> educing <u>a</u> gents <u>e</u> xtractable (RAE-CWPs)	23
I.4.1.3.1.3- <u>G</u> lycosyl <u>p</u> hosphytydil <u>i</u> nositol anchored (GPI-CWPs)	23
I.4.1.3.1.4- <u>A</u> lkali- <u>s</u> ensitive <u>l</u> inkage (ASL-CWPs)	25

I.4.1.3.1.5- Atypical wall proteins	27
I.4.1.3.2- Post-translational modifications of cell wall proteins	28
I.4.1.3.2.1- N-glycosylation	29
I.4.1.3.2.2- O-glycosylation	29
I.4.2- Cell wall remodelling	30
I.4.2.1- Glucan remodelling enzymes	30
I.4.2.2- Chitin remodelling enzymes	30
I.4.2.3- Glucan-chitin cross-linking enzymes	31
I.4.3- Cell wall integrity signalling	31
I.4.3.1- PKC1-MAPK pathway	33
I.4.3.2- Cek1-mediated pathway	34
I.5 TRANSCRIPTIONAL FACTORS	35
I.5.1- Promoter binding sites	35
I.5.1.1- Promoter architecture	35
I.5.1.2- Promoter binding behaviour	36
I.5.2- Zinc finger proteins	37
I.5.3- Zinc cluster proteins Zn(II)₂Cys₆	38
I.5.3.1- General structure	38
I.5.3.1.1- Nuclear localization signal (NLS)	39
I.5.3.1.1.1- Classical NLS	39
I.5.3.1.1.2- Non-conventional NLS	40
I.5.3.1.2- DNA binding domain (DBD)	40
I.5.3.1.2.1- Zinc finger structure (Zn(II) ₂ Cys ₆)	40
I.5.3.1.2.2- Linker region	41
I.5.3.1.2.3- Dimerization domain	41
I.5.3.1.3- Regulatory domain (MHR)	41
I.5.3.1.4- Activation domain (AD)	41
I.5.3.2- Binding of zinc cluster transcriptional factors	42
I.5.3.2.1- Binding sites	42
I.5.3.2.2- Mechanism of action	44
I.5.4- Zinc cluster proteins in <i>C. albicans</i>	45
I.6- TRANSCRIPTION FACTORS REGULATING CELL WALL ARCHITECTURE IN <i>C. albicans</i>	46
I.6.1- Cas5p	46
I.6.2- Rlm1p	46
I.6.3- Ace2p	47
I.6.4- Efg1p	47

I.6.5- Rim101p	48
I.6.6- Bcr1p	48
II. ANTECEDENTES Y OBJETIVOS	50
III. MATERIALES Y MÉTODOS	53
III.1-MICROORGANISMOS	54
III.1.1- Levaduras	54
III.1.2- Bacterias	54
III.2- MEDIOS Y CONDICIONES DE CULTIVO	55
III.2.1- Cultivo de levaduras	55
III.2.2- Cultivo de bacterias	57
III.3- TAMPONES UTILIZADOS	58
III.4- PLÁSMIDOS	58
III.5- TRANSFORMACIÓN DE CÉLULAS CON ADN	59
III.5.1- Transformación de bacterias	59
III.5.1.1- Obtención de células competentes de <i>E.coli</i>	59
III.5.1.2- Transformación de células competentes de <i>E.coli</i>	60
III.5.2- Transformación de células de <i>C. albicans</i> .	60
III.6- PURIFICACIÓN DE ADN	61
III.6.1- Obtención de ADN plasmídico de <i>E.coli</i>	61
III.6.2- Obtención de ADN genómico de <i>C. albicans</i>	61
III.7. TRATAMIENTO ENZIMÁTICO DEL ADN	62
III.7.1- Digestión con endonucleasas de restricción	62
III.7.2- Ligación de ADN con ligasa de T4	62
III.8- REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR)	62
III.8.1- Diseño de oligonucleótidos	63
III.8.2- Condiciones de reacción de PCR	63
III.8.3- Transcripción reversa (RT-PCR)	64
III.8.3.1- RT-PCR semicuantitativa	64
III.9- ELECTROFORESIS DE ADN EN GELES DE AGAROSA	65
III.10- PURIFICACIÓN DE FRAGMENTOS DE ADN DE GELES DE AGAROSA	66
III.11- SECUENCIACIÓN DE FRAGMENTOS DE ADN	66
III.12- HIBRIDACIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS	67

III.12.1- Marcaje no radiactivo de sondas de ADN	67
III.12.2- Detección de secuencias específicas de ADN (Southern Blot)	67
III.12.2.1- Separación y transferencia de los fragmentos de ADN	67
III.12.2.2- Hibridación ADN/ADN	68
III.12.2.3- Detección de la unión ADN / sonda	68
III.13- PURIFICACIÓN DE ARN TOTAL DE <i>C. albicans</i>	69
III.14- CUANTIFICACIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS	69
III.15- ESTUDIO DEL TRANSCRIPTOMA MEDIANTE MICROMATRICES (MICROARRAYS) DE ADN	70
III.15.1- Marcaje del ADNc	70
III.15.2- Elución, cuantificación y concentración de los ADNc marcados	71
III.15.3- Hibridación de los microarrays de ADN	72
III.15.4- Obtención de imágenes y análisis de resultados	72
III.15.5- Análisis de promotores con RSAT	73
III.15.6- Estudio del estado celular mediante T-profiler	73
III.16- INTERRUPCIÓN GÉNICA EN <i>C. albicans</i>	73
III.17- ANÁLISIS FENOTÍPICO DE LA CEPA DISRUPTANTE	74
III.17.1- Estudio del efecto de calcofluor white, rojo Congo y SDS	74
III.17.2- Estudio del efecto de drogas	74
III.17.3- Sensibilidad a zimoliasa	75
III.17.4- Miceliación en medio sólido	75
III.18- OBTENCIÓN DE CÉLULAS EN FASE MICELIAR	75
III.19- ANÁLISIS DEL MEDIO DE CULTIVO	76
III.20- OBTENCIÓN DE PAREDES CELULARES	76
III.21- SOLUBILIZACIÓN DE COMPONENTES DE LA PARED CELULAR	76
III. 21.1- Tratamiento con dodecil sulfato sódico (SDS)	76
III. 21.2- Tratamiento con β -mercaptoetanol (β -ME)	77
III. 21.3- Tratamiento con zimoliasa	77
III.22- SEPARACIÓN DE PROTEÍNAS EN GELES DE SDS-POLIACRILAMIDA (SDS-PAGE)	78
III.23- TRANSFERENCIA Y DETECCIÓN DE PROTEÍNAS EN SOPORTES DE NITROCELULOSA (Western-blot)	78
III.23.1- Transferencia a membrana de nitrocelulosa	78
III.23.2- Inmunodetección de proteínas en soportes de nitrocelulosa	79
III.24- CUANTIFICACIÓN DE MACROMOLÉCULAS	80
III.24.1- Determinación de proteína total	80
III.24.2- Determinación de polisacáridos	80
III.24.2.1- Determinación de azúcares no-reductores	80

III.24.2.2- Determinación de β -glucanos	81
III.24.2.3- Determinación de manano	81
III.24.2.4- Determinación de quitina	82
III.25- MARCAJE DE PARED CELULAR EN CÉLULAS ENTERAS	82
III.25.1- Tinción de células con concanavalina A	82
IV. RESULTADOS	83
IV.1- IDENTIFICACIÓN DE POSIBLES FACTORES DE TRANSCRIPCIÓN DEL TIPO $Zn(II)_2Cys_6$ EN <i>C. albicans</i>	84
IV.2- SELECCIÓN DE LA <i>IPF 3781</i> PARA EL PRESENTE TRABAJO	88
IV.3- ANÁLISIS DEL TEÓRICO FACTOR DE TRANSCRIPCIÓN <i>Cwt1p</i>	90
IV.3.1- Análisis de la secuencia de aminoácidos	90
IV.3.1.1- Dominio $Zn(II)_2Cys_6$	93
IV.3.1.2- Dominio PAS	94
IV.4- ESTUDIO DE LA EXPRESIÓN DEL GEN <i>CaCWT1</i>	95
IV.5- DISRUPCIÓN DEL GEN <i>CaCWT1</i>	97
IV.5.1- Construcción de los casetes de interrupción	97
IV.5.1.1- Construcción del casete de arginina	98
IV.5.1.2- Construcción del casete de histidina	100
IV.5.2- Obtención del mutante nulo del gen <i>CaCWT1</i> de <i>C. albicans</i>	101
IV.6- REINTEGRACIÓN DE MARCADORES PARA ELIMINAR LAS AUXOTROFÍAS DE LAS CEPAS UTILIZADAS	104
IV.7- ANÁLISIS FENOTÍPICO DEL MUTANTE NULO <math>\Delta<i>Cacwt1</i></math>	105
IV.7.1- Crecimiento y morfología	105
IV.7.2- Estudio de filamentación en medio sólido	106
IV.7.3- Estudio de sensibilidad a estrés térmico, osmótico y oxidativo	107
IV.7.4- Estudio de sensibilidad a cafeína	108
IV.7.5- Estudio de resistencia a drogas	108
IV.7.6- Estudio de la integridad de la pared celular	110
IV.7.7- Estudio de sensibilidad a zimoliasa	111
IV.7.8- Análisis de polímeros de la pared celular	112
IV.7.9- Tinción de células con Concanavalina A acoplada a fluoresceína	114
IV.7.10- Caracterización de la pared celular del mutante nulo $\DeltaCacwt1$	115
IV.7.10.1- Western blot de extractos de pared con anticuerpo policlonal	116
IV.7.10.2- Western blot de extractos de pared con Anti- β -1,6-glucano	118
IV.7.11- Análisis del medio de cultivo	119

IV.8- SOBRE-EXPRESIÓN DEL GEN <i>CWT1</i> EN EL MUTANTE NULO <i>cwt1Δ/cwt1Δ</i>	121
IV.8.1- Construcción del plásmido pBI-CWT1	121
IV.8.2- Introducción de pBICWT1 en el mutante nulo	122
IV.8.3- Expresión de <i>CWT1</i> en la cepa reintegrante	122
IV.8.4- Análisis fenotípico de la cepa reintegrante	124
IV.9- PERFIL TRANSCRIPCIONAL DEL MUTANTE NULO <i>cwt1Δ/cwt1Δ</i>	125
IV.9.1- Perfil transcripcional del mutante nulo <i>cwt1Δ/cwt1Δ</i> en fase exponencial de crecimiento	127
IV.9.1.1- Genes involucrados en la arquitectura de la pared celular	128
IV.9.1.2- Genes relacionados con la traducción de proteínas	129
IV.9.1.3- Genes que codifican factores de transcripción	131
IV.9.2- Perfil transcripcional de $\Delta Cawt1$ en fase estacionaria de crecimiento	131
IV.9.2.1- Genes involucrados en la arquitectura de la pared celular	132
IV.9.2.2- Genes relacionados con la traducción de proteínas	134
IV.9.2.3- Genes que codifican factores de transcripción	135
IV.9.3- Validación de los resultados de las micromatrices de ADN del mutante nulo <i>cwt1Δ/cwt1Δ</i>	136
IV.9.4- Perfil transcripcional del mutante nulo <i>cwt1Δ/cwt1Δ</i> a lo largo del ciclo poblacional	137
IV.9.4.1- Análisis del patrón de expresión de <i>cwt1Δ/cwt1Δ</i> con el programa informático T-profiler	139
IV.10- PERFIL TRANSCRIPCIONAL DEL MUTANTE HETEROCIGÓTICO <i>CWT1/cwt1Δ</i>	141
IV.10.1- Perfil transcripcional del mutante heterocigótico <i>CWT1/cwt1Δ</i> en fase exponencial de crecimiento	141
IV.10.1.1- Genes involucrados en la arquitectura de la pared celular	142
IV. 10.1.2- Genes relacionados con respuesta a estrés oxidativo	143
IV. 10.1.3- Genes que codifican factores de transcripción	144
IV. 10.2- Perfil transcripcional del mutante heterocigótico <i>CWT1/cwt1Δ</i> en fase estacionaria de crecimiento	145
IV. 10.2.1- Genes involucrados en la arquitectura de la pared celular	146
IV. 10.2.2- Genes relacionados con la respuesta a estrés oxidativo	147
IV. 10.2.3- Genes que codifican para factores de transcripción	148
IV. 10.3- Validación de los resultados de las micromatrices de ADN del mutante heterocigótico <i>CWT1/cwt1Δ</i>	148
IV. 10.4- Perfil transcripcional del mutante heterocigótico <i>CWT1/cwt1Δ</i> a lo largo del ciclo poblacional	150
IV. 10.4.1- Análisis del patrón de expresión de <i>CWT1/cwt1Δ</i> con el programa informático T-profiler	154
IV.11- EFECTO TRANSCRIPCIONAL GLOBAL DE Cwt1p A LO LARGO DEL CICLO POBLACIONAL	155

IV.12- ANÁLISIS DE LAS SECUENCIAS PROMOTORAS DE LOS GENES REGULADOS POR Cwt1p	156
V. DISCUSSION	158
VI. CONCLUSIONES / CONCLUSIONS	172
VII. BIBLIOGRAFÍA / REFERENCES	175
VIII. AGRADECIMIENTOS / ACKNOWLEDGEMENTS	195

I. INTRODUCTION

I.1- GENERAL ASPECTS AND TAXONOMY OF *Candida albicans*

Candida is a genus made up of 154 ascomycetous-like fungal species. Seven of them, *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. krusei* (*Issatchenkia orientalis*), *C. dubliniensis* y *C. lusitaniae* (*Clavispora lusitaniae*), are frequently isolated from human infections, being *C. albicans* the most relevant in terms of pathogenicity.

C. albicans is a polymorphic organism capable of reproducing by budding (yeast cells) or by producing filamentous forms (mycelial cells) depending upon environmental factors (Odds, 1994), this morphological transition has been associated with pathogenicity (Kumamoto and Vines, 2005).

C. albicans has been taxonomically classified as:

Kingdom: *Fungi*

Phylum: *Ascomycota*

Subphylum: *Ascomycotina*

Class: *Ascomycetes*

Order: *Saccharomycetales*

Family: *Saccharomycetaceae*

Genus: *Candida*

I.2- *C. albicans* PATHOGENICITY

The most frequently encountered fungal infections are caused by the yeast *C. albicans* and by species of the filamentous fungus *Aspergillus*. Other fungal pathogens that have emerged in recent years include yeast species such as *T. glabrata*, *I. orientalis*, *C. tropicalis*, species of *Cryptococcus* and *Trichosporon* and filamentous fungi such as *Fusarium*, *Rhizopus* and *Rhizomucor* (Richardson, 2005).

C. albicans is a unicellular diploid fungus that usually grows in human skin and tissues as an innocuous commensal, but under different conditions can produce infections to the human host called candidiasis. *C. albicans* can respond rapidly to environmental changes, including those likely to be encountered *in vivo* and this flexibility could allow this organism to take advantage of impaired immunity in a debilitated patient and therefore facilitate establishment of disease (Haynes, 2001).

I.2.1- Types of candidiasis

Candidiasis can be classified in two different groups: superficial and internal.

I.2.1.1- Superficial candidiasis

Superficial candidiasis, involving skin, nails and mucosal surfaces are classified as follows:

Cutaneous candidiasis	Intertrigo Folliculitis
Mucosal candidiasis	Oropharyngeal Vulvovaginal Esophagus Urinary bladder
Nails candidiasis	Onychomycosis Paronychia
Other candidiasis	External otitis Keratitis

I.2.1.2- Internal candidiasis

Systemic candidiasis involves internal organs (brain, liver, lungs, heart) and can be widespread through the bloodstream affecting different organs (systemic infections).

Localized candidiasis	Peritonitis Esophagitis Pyelitis
Systemic candidiasis	Endocardial Intravenous drugs abuse syndrome Hepatosplenic Associated to parenteral nutrition Neonatal

I.2.2- Risk factors

Candida infections are being seen in ever rising numbers, largely because of the increasing size of population at risk. Risk factors for *C. albicans* bloodstream infections (Richardson, 2005) can be divided into:

- Host-related factors such as immunocompromising conditions: transplant recipients, cancer patients, AIDS and intensive care patients, individuals with prolonged and deep neutropenia and low birth weight.
- Healthcare-related factors: broad-spectrum antibiotic use, catheters, use of antifungals and chemoprophylaxis, invasive and aggressive therapeutic technologies and surgical procedures.

I.2.3- Treatment of candidiasis

Because *C. albicans* is a eukaryotic organism and shares biological components and processes with human cells, differences between these two types of cells are used for developing antifungal drugs with selective toxicity to *C. albicans* cells. Several targets have been used for antifungal drugs because they are different or not present in human cells: cell wall, ergosterol synthesis, microtubule assembly, DNA and RNA synthesis, protein synthesis (Odds *et al.*, 2003). Antifungal drugs currently available, their targets and mechanisms of action are detailed in table I.1.

Table I.1- Antifungal agents currently available

ANTIFUNGAL DRUG	MECHANISM	REFERENCES
Griseofulvin	Interference with microtubule assembly	Develoux, 2001
Flucytosine	Inhibition protein synthesis	Odds <i>et al.</i> , 2003
Polyene macrolide antibiotics - Amphotericin B - Nystatin	Disruption of fungal membrane, leakage and cellular death	Dupont, 2002
Azoles - ketoconazol - fluconazol - miconazol	Ergosterol depletion Alteration of permeability and fluidity of the plasma membrane	Kelly <i>et al.</i> , 1997
Echinocandins	Alteration of cell wall β -1,3-glucan synthesis	Van den Bossche, 2002
Nikkomycin and Polyoxins	Alteration of cell wall chitin synthases	Kim <i>et al.</i> , 2002
Sordarins	Inhibition of protein synthesis by blocking a translation elongation factor	Odds, 2001

Given the clinical importance of candidiasis, efforts continue to identify new drugs targets and therefore new anti-fungal drugs, to improve diagnostic assays and to provide alternative therapeutic options (Casadevall *et al.*, 2004).

I.2.4- Incidence of candidiasis

Candidiasis is regarded as one of the fourth most common cause of nosocomial and bloodstream infections (BSIs) in the USA, and published data indicate a similar pattern worldwide (Haynes, 2001; Chauhan *et al.*, 2006). From an analysis of multi-institutional surveys of *Candida* BSIs performed in Europe, including the large prospective survey by the European Confederation of Medical Mycology, rates of candidaemia ranging from 0.20 to 0.38 per 1000 admissions were reported with a global mortality of 44% of the reported cases (Tortorano *et al.*, 2004). The distribution of the different isolated *Candida* spp. is presented in figure. I.1.

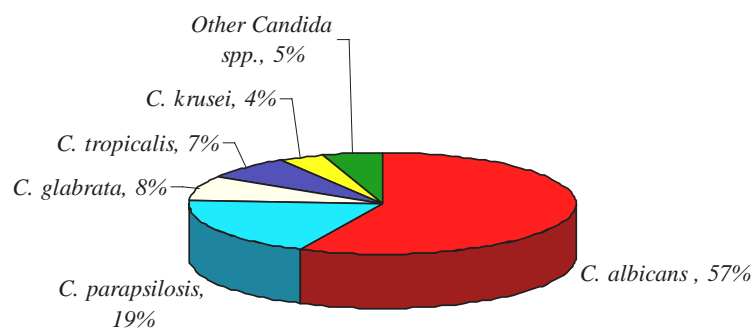


Figure I.1- *Candida* BSIs distribution in a multi-institutional study in Europe. Data obtained from prospective survey by the European Confederation of Medical Mycology (Adapted from Tortorano *et al.*, 2004).

I.3- VIRULENCE FACTORS

Although the most determinant factor in *C. albicans* infections is the immune condition of the host, there are also some features that enhance the capability of *C. albicans* as a pathogen. Virulence factors have been defined as “all traits required to

establish disease” (Furman and Ahearn, 1983), “factors that interact directly with mammalian host cells” (Odds *et al.*, 2001) and “a component of a pathogen that damages the host” (Casadevall and Pirofski, 2001). In this sense, *C. albicans* has to mediate the contact with the host cell, evade the immune system, survive and divide in the host environment and spread to new tissues to start the infection process. The virulence factors described for *C. albicans* include:

- adhesins
- hydrolytic enzymes
- morphogenesis
- phenotypic switching

I.3.1- Adhesion

Contact and adherence of *C. albicans* to host cells are the earlier steps during infection. In this process, different molecules present in the host cell surface can be recognized by fungal adhesins. While the receptors of the host cells are variable (can be constituted by proteins, lipids or sugars), adhesins in *C. albicans* are mainly mannoproteins.

Specific cell wall proteins play a key role in adhesion. All the primary amino acid sequences of the described adhesins share features of highly glycosylated yeast cell wall proteins with an N-terminal signal peptide and C-terminal features that mediate glycosylphosphatidylinositol (GPI) anchor (Sundstrom, 2002). The most important group of *C. albicans* adhesins is formed by Als (Agglutinin-like sequence) proteins (for a review see Hoyer, 2001). However, some other kinds of adhesins have been found in *C. albicans*: Hwp1p, (hyphal wall protein) a specific mannoprotein of mycelial forms (Staab *et al.*, 1999, Sundstrom, 1999; 2002), and Int1p (integrin-like protein) involved in adhesion and virulence (Gale *et al.*, 1998, 2001). Other kinds of proteins have also been found to be involved in adhesion, like Mnt1p (mannosyltransferase) a type II membrane protein involved in *N*- and *O*-glycosylation (Thomson *et al.*, 2000; Buurman *et al.*, 1998).

ALS family is a gene family in *C. albicans* encoding eight proteins. It is called *ALS* due to the resemblance of domains of its encoded proteins to α -agglutinin, a cell-surface glycoprotein in *S. cerevisiae* (Lipke *et al.*, 1989; Hoyer *et al.*, 1995).

The adhesive function of Als proteins has been suggested by expressing *C. albicans* ALS genes in the normally nonadherent *Saccharomyces cerevisiae* that acquires an adhesive phenotype. Genes of the *C. albicans* ALS family encode proteins with three characteristic domains: (i) the N-terminal region contains a signal peptide and is relatively conserved among Als proteins, although it has been suggested that N-terminal sequence variability confers substrate specificity (Sheppard *et al.* 2004); (ii) a central portion consisting of a variable number of tandem repeats with approximately 36 amino acids each; (iii) the C-terminal domain possesses a serine-threonine rich region and a GPI anchor sequence (Zhao *et al.*, 2003; Hoyer *et al.*, 2001).

Different subcategories of Als proteins have been described depending on their physicochemical properties. Als1p, Als3p and Als5p are considered the Als-group A, Als6p and Als7p are part of the Als-group B, and finally, Als2p, Als4p and Als9p appear to constitute the Als-group C.

I.3.2- Secreted hydrolytic enzymes

Extracellular hydrolytic enzymes are secreted for digesting complex molecules for nutrition. However, pathogenic microorganisms hydrolyse proteins and lipids of host cells to facilitate adhesion and invasion, or damaging cells and molecules of the host defense system (Cunningham and Agard, 2004; Naglik *et al.*, 2004; Stehr *et al.*, 2004).

I.3.2.1- Secreted aspartyl proteinases (Saps)

All secreted *C. albicans* proteinases belong to the aspartyl proteinases family, and these enzymes are essential for growth when proteins are the sole nitrogen source. Proteolytic activity has also been found in other *Candida* species like *C. dubliniensis*, *C. tropicalis* and *C. parapsilopsis*; since, the proteolytic activity of other non-pathogenic species is lower, this suggests that virulence is correlated with the level of Sap production (Schaller *et al.*, 2005).

The proteolytic activity in *C. albicans* is attributed to a multigene SAP family with 10 members known to date. All ten SAP genes encode for preproteins that are

processed when transported via the secretory pathway. Eight of these proteinases (Sap1p to Sap8p) are secreted into the extracellular space while Sap9p and Sap10p are membrane-anchored GPI proteins (Naglik *et al.*, 2004). The presence of 10 *SAP* genes suggests that different Saps are expressed in *C. albicans* in reaction to specific environmental conditions and may have a variety of functions during the infectious process. Many experimental studies have shown that Sap1-3ps play an important role in adherence while Sap4-6ps are responsible for the pathogenesis of invasive candidiasis as they are secreted after phagocytosis by macrophages (Hube *et al.*, 1997; Sanglard *et al.*, 1997; Hube and Naglik, 2001).

I.3.2.2- Phospholipases (PL)

Phospholipases are considered virulence factors in different fungi as *C. albicans* (Ibrahim *et al.*, 1995), *Aspergillus fumigatus* or *Cryptococcus neoformans*. However, among all the *Candida* species only *C. albicans* possesses PL activity (Lane and Garcia, 1991), although *T. glabrata*, *C. parapsilopsis*, *C. tropicalis*, *C. lusitaniae* and *I. orientalis* are able to secrete PL (Ghannoum, 2000; Kantarcioglu and Yucel, 2002).

Phospholipases are enzymes that hydrolyse ester linkages in glycerophospholipids. Different PL subclasses have been described: PL A, PL B, PL C and PL D depending on the mode of action and the target within the phospholipid molecule. To date, only proteins regarding to PL B subgroup have been found to be secreted, while all the others are supposed to be intracellular PLs. The functions of PLs during infection are not yet known, but may be involved in host cell penetration and interaction with host signal transduction pathways (Schaller *et al.*, 2005).

I.3.2.3- Lipases (Lip)

These enzymes catalyse the hydrolysis of ester bonds of mono-, di-, and triacylglycerols. In *C. albicans* these activities are carried out by a lipase gene family, formed by 10 genes (*LIP1-10*) encoding highly similar proteins. Although the role of each *LIP* gene remains to be elucidated, the large number of *LIP* genes may contribute to the persistence and virulence of *C. albicans* in human tissue (Hube *et al.*, 2000).

I.3.3- Morphogenesis

C. albicans can grow in a variety of morphological forms (Fig. I.2) depending on the environmental conditions (Ernst, 2000; Odds, 1988; Sonneborn *et al.*, 1999a):

- yeast or blastospore: oval-shaped unicellular budding yeast.
- pseudohyphae: cells grow by unipolar budding, buds develop into elongated cells, which remains attached to mother cell, stop growth and resume budding.
- true hyphae: cells grow by continuous apical extension followed by septation and the result are different mononuclear cells with cytoplasmic communication through porus in the septum.
- chlamydospore: formed by thick-walled spherical cells and developed on pseudohyphal support cells. They are considered resistant cellular forms.

The ability to change its morphology is considered to be necessary for virulence in *C. albicans*. As filamentous forms are invasive, they are supposed to promote tissue penetration during early stages of infection, whereas the yeast form might be more suited for dissemination in the bloodstream (Sudbery *et al.*, 2004).

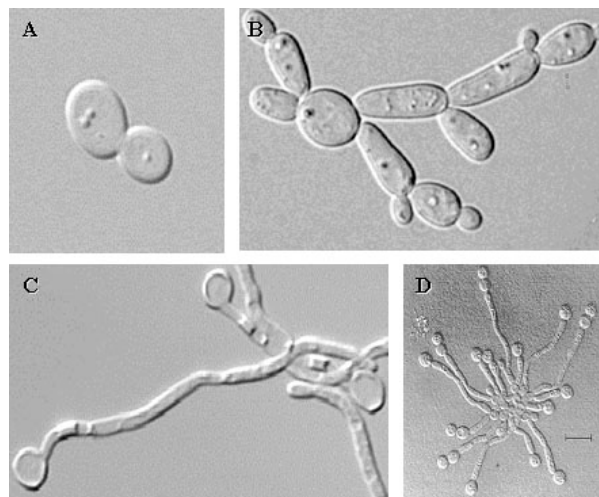


Figure I.2- Different morphogenic states of *C. albicans*. (A) yeast, (B) pseudohyphae, (C) hyphae, and (D) chlamydospore.

Hyphal development depends on two factors: (i) the nature, number and intensity of environmental signals, and (ii) the activity of signalling pathways including key transcription factors (Ernst, 2000).

I.3.3.1- Outside cues

The signals that promote morphological changes in *C. albicans* often impose stresses (Brown and Gow, 1999). Changes in growth temperature from 30°C to 37°C and neutral pH culture induce morphogenetic changes in *C. albicans* cells (Lee *et al.*, 1975; Saporito-Irwin *et al.*, 1995; Shepherd *et al.*, 1980).

Also, nitrogen and carbon starvation cause hyphal development. In this sense, serum (composed mainly of proteins that are inaccessible nutrient source for the *C. albicans* cell until they are hydrolysed) and N-acetylglucosamine (a poor source of carbon and nitrogen) (Gow and Gooday., 1982; Mattia *et al.*, 1982) are favourable conditions to obtain the filamentous forms. Supplementing these media with amino acids and glucose causes hyphae to revert to yeast cells.

Other *in vitro* factors facilitating hyphal development are incubation of *C. albicans* at low cells density (Shepherd *et al.*, 1980), presence of polyamines and hemin (Casanova *et al.*, 1997; Herrero *et al.*, 1999), and different levels of human hormones, suggesting that hyphal induction could be modulated by other host factors *in vivo*.

I.3.3.2- Signalling pathways

The signal transduction pathways that transduce environmental signals into morphological switching have been extensively studied. These studies have shown that most of the genes involved in hyphal morphogenesis in *C. albicans* are homologues to those required for polarized growth and pseudohyphal growth in *S. cerevisiae*. Although no sensors of environmental signals have been identified until this moment, several transduction pathways have been shown to play an important role in *C. albicans* morphogenesis (Fig. I.3).

These signal transduction pathways form a complex and interconnected network that integrates environmental cues to control morphogenesis and transcription appropriately. The existence of integration within this network is well illustrated by the transcription factor Efg1p, which receive information through multiple pathways and is involved in different programs such as hyphal development, chlamyospore formation, white-opaque switching and assembly of biofilms (Fig. I.3).

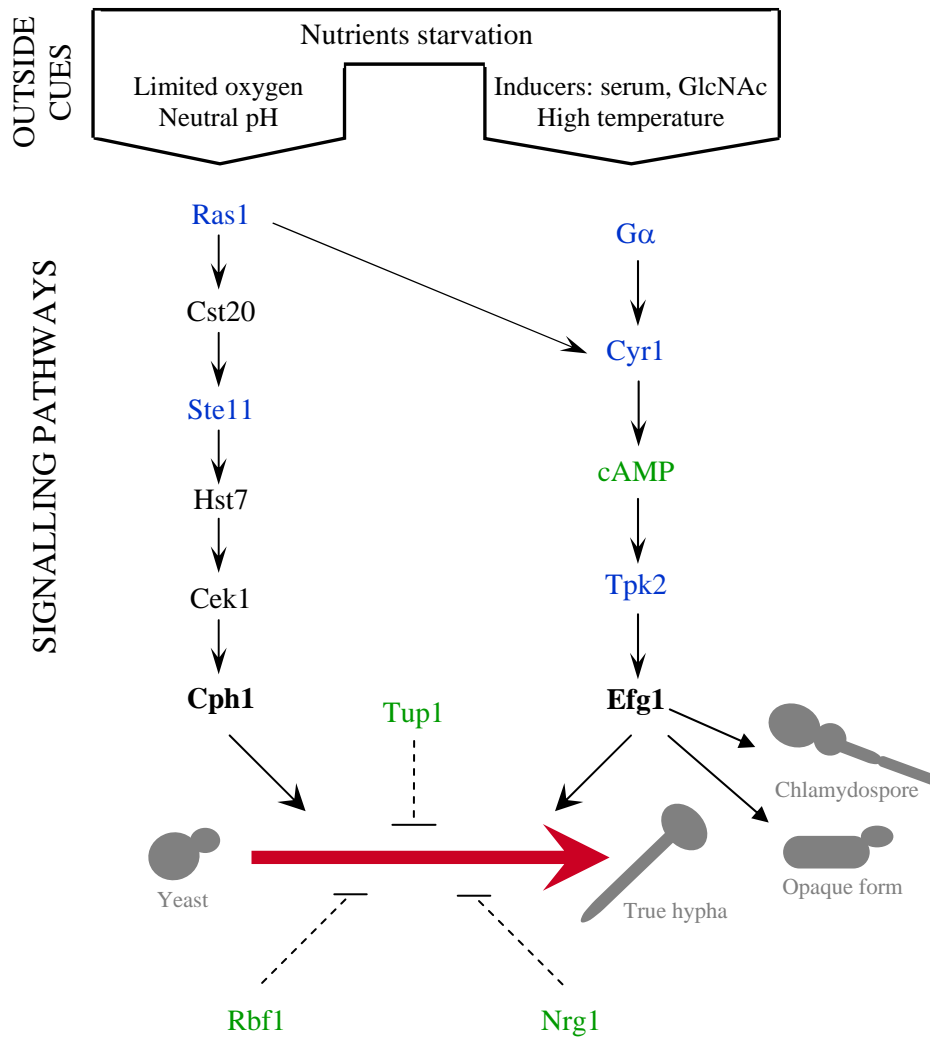


Figure I.3. *Candida albicans* morphogenesis networks. Environmental cues activate separate signalling pathways. Two major pathways, defined by the transcriptional factors Cph1p and Efg1p (in bold), induce hyphal growth. Components shown in black have been established in their position by epistasis analyses. Components shown in green are known to influence morphogenesis in their position unless no epistasis analyses have proved it so far. Components shown in blue represent proteins which have not been confirmed to affect morphogenesis experimentally. Blunt arrows mean negative regulation. Dash lines show components affecting morphogenesis through unknown pathways. (Adapted from Brown and Gow, 1999; Ernst, 2000)

I.3.3.2.1- The cAMP-dependent protein kinase A pathway

Hyphal development is stimulated by exogenous cAMP, and changes in intracellular cAMP levels have been associated with morphogenesis in *C. albicans* (Sabie and Gadd, 1992; Egidy *et al.*, 1990) suggesting that a cAMP pathway controls

hyphal morphogenesis as it controls pseudohyphal development in *S. cerevisiae* (Pan and Heitman, 1999).

cAMP-protein kinaseA (PKA) pathway is controlled in *C. albicans* by the transcriptional factor Efg1p, homologue to Phd1p in *S. cerevisiae*. Efg1p belongs to the family of APSES proteins, a conserved class of transcriptional regulators in fungi that contain a basic helix-loop-helix motif (Doedt *et al.*, 2004). The Efg1p protein is a strong regulator of morphogenetic processes, since it influences not only yeast-hypha interconversions (Stoldt *et al.*, 1997; Lo *et al.*, 1997), but also regulates phenotypic switching and chlamydospore formation of this pathogen (Sonneborn *et al.*, 1999a, b). The transcriptional factor Efg1p plays an important role in morphogenesis as disruption of *EFG1* causes a complete block of hyphal formation under standard induction conditions (Stoldt *et al.*, 1997) and alterations on biofilms construction (Ramage *et al.*, 2002), whereas Efg1p overexpression produces an increase in *C. albicans* filamentation. Moreover, Efg1p can act as an activator or a repressor of morphogenesis depending on the environmental cues (Stoldt *et al.*, 1997).

Other components of this signalling pathway, Ras protein (Ras1p), adenyl cyclase (Cyr1p) and protein kinase A (Tpk2p) have been described to be involved in morphogenesis (Ernst, 2000).

I.3.3.2.2- The mitogen-activated protein kinase pathway

Components of the mitogen-activated protein (MAP) kinase pathway in *S. cerevisiae* are involved in pseudohyphal growth and mating pheromone response (Fig. I.3). Homologues to *S. cerevisiae* MAP kinase components (Ste20p/Ste7p/Kss1p/Ste12p) have been found in *C. albicans* (Cst20p/Hst7p/Cek1p/Cph1p) with regard to structures and functions (Liu *et al.*, 1993; Madhani and Fink, 1997; Alonso-Monge *et al.*, 2003; Eisman *et al.*, 2006).

MAP kinase transduction pathway in *C. albicans* possesses a lower importance on morphogenesis than the cAMP-PKA pathway, as deficiencies in this pathway affect morphogenesis only under special conditions, but not during induction by serum and other inducers.

MAP kinase pathway is controlled by the transcriptional factor Cph1p. Mutant cells lacking Cph1p are defective in filamentation on solid media, but not in liquid inducing media or in presence of serum (Liu *et al.*, 1994). Mutations in any component

of this cascade cause a similar effect to that observed for *cph1Δ/cph1Δ* (Csank *et al.*, 1998). However, different mutants in MAP kinase components do not display identical virulence phenotypes in systemic infections since *cst20Δ/cst20Δ* and *cek1Δ/cek1Δ* mutants showed reduced virulence whereas *hst7Δ/hst7Δ* and *cph1Δ/cph1Δ* did not (Csank *et al.*, 1998; Leberer *et al.*, 1996; Lo *et al.*, 1997).

I.3.3.2.3- Repressing factors

Finally, some other transcription factors have been identified as hyphal repressors unless the mechanisms or pathways in which they function are still unknown. These transcription factors are Tup1p, Nrg1p and Rbf1p (Braun and Johnson, 1997; Braun *et al.*, 2001; Ishii *et al.*, 1997). Cells lacking these proteins grow in filamentous form in all media tested.

I.3.3.3- Co-regulation of virulence and morphogenesis genes

C. albicans exhibits considerable morphogenetic plasticity that is linked to its pathogenicity since most mutants that fail to produce hyphae present reduced virulence. However, it has been pointed out that co-regulation of genes controlling hyphal morphogenesis with genes encoding virulence factors confounds the analysis (Kobayashi and Cutler, 1998; Brown, 2002; Gow *et al.*, 2002; Liu, 2002). The set of virulence factor genes that are co-expressed with hyphal developmental genes are termed as the hyphal regulon, and includes *ALS3*, *HWPI*, *RBT1*, *RBT4*, *SAP4*, *SAP5* and *SAP6* among others. To ensure that all of the activities that favour virulence are expressed together at the appropriate time, proteins that control cellular form, such as, the hypha-specific G1 cyclin Hgc1p, are co-regulated with adhesins and proteases. (for a review see Kumamoto and Vences, 2005)

I.3.4- Phenotypic switching

Some *C. albicans* strains have the ability to undergo a reversible switch between the white and opaque phases. White-phase cells appear round and form dome-shaped,

white colonies, while opaque-phase cells appear more elongated and form flatter, darker colonies on solid agar (Bennet and Johnson, 2005). This reversible switching occurs at a frequency of 10^{-4} to 10^{-5} per cell generation from white to opaque cells and 5×10^{-4} per cell generation from opaque to white phase (Soll, 1997).

Different studies show that *C. albicans* uses the same signal transduction pathway for regulating dimorphism, mating and phenotypic switching (Bennet and Johnson, 2005; Monge *et al.*, 2006).

Although the role of phenotypic switching in virulence remains to be elucidated, it has been shown that opaque-phase cells are more virulent in cutaneous infections and that white-phase cells are more virulent in systemic infections (Kvaal *et al.*, 1999). DNA microarray experiments with WO-1 strain revealed that it is possible that white-opaque switching in *C. albicans* plays a role in pathogenesis, as the expression of 400 genes differs between cells in the white and opaque phases (Lan *et al.*, 2002; Tsong *et al.*, 2003). Moreover, specific genes for the white-phase (*SAP2*, *WH11* and *EFG1*) and opaque-phase (*SAP1*, *SAP3* and *CDR3*) were found.

I.3.5- Biofilms formation

Pathogenic yeasts have the capability to adhere to different surfaces and devices to gain access to the bloodstream and internal organs of patients (Kojic and Darouiche, 2004).

Biofilms are structured microbial communities in which the cells bind to a surface and get embedded in a matrix of extracellular polymeric substances (Ramage *et al.*, 2005). *C. albicans* biofilms are made up of a mixture of yeast cells, pseudohyphae and hyphae (Nett and Andes, 2006), as seen in Figure I.4. Extracellular matrix is made by cells within the biofilm, and consists of carbohydrate and protein (Douglas, 2003). The function of this extracellular polymeric matrix may be to strengthen the biofilm structure (Nobile and Mitchell, 2006).

Biofilm formation occurs over a period of 24-48 h, in three stages: (i) attachment of yeast cells to the substratum surface, (ii) growth and proliferation of yeast cells and begin of extracellular matrix formation, (iii) confluence of cells and transition to filamentous forms that get encased in the extracellular matrix. The resulting biofilm has a three-dimensional structure (Ramage *et al.*, 2005).

C. albicans can form biofilms on almost any medical device. The most commonly infected topical devices are contact lenses and dentures. Systemic devices include vascular and urinary catheters, joint prosthesis, cardiac valves, pace-markers, etc. (Nett and Andes, 2006).

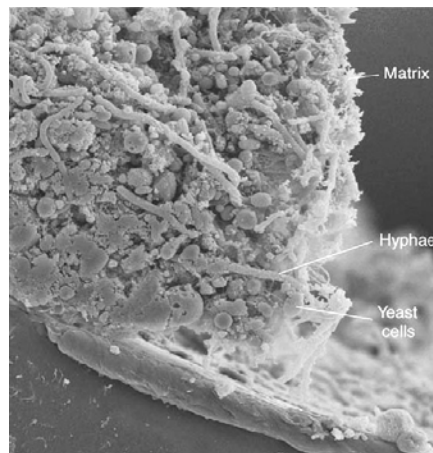


Figure I.4- Scanning electron micrograph of a cross section of a *C. albicans* biofilm. Different morphologies of *C. albicans* cells can be observed encased in matrix material. Depth of biofilms can range from 200-500 μm . (Adapted from Nett and Andes, 2006)

C. albicans cells present in biofilms have a characteristic architecture and phenotypic properties that are different from their planktonic counterparts. The most notable difference is a higher resistance to the host immune system and to conventional therapy (Kuhn and Ghannoum, 2004). To better understand biofilms formation and function several studies using *in vitro* and *in vivo* models have been performed. These studies showed that there are many factors involved in these processes: expression of transcriptional factors genes required for biofilms formation: *EFG1*, *CPH1*, *BCR1*, *TEC1* (Ramage *et al.*, 2002; Nobile and Mitchell, 2005), sensors of cell surface genes acting through the MAP kinase pathway (Kumamoto, 2005), differences in cell adherence and hyphal development (Garcia-Sanchez *et al.*, 2004; Granger *et al.*, 2005, Nobile and Mitchell, 2005), roughness and hydrophobicity of the material (Chandra *et al.*, 2005).

I.4 *Candida albicans* CELL WALL

Cell wall is the outermost structure present in bacteria, fungi, and plants but it is absent in mammal cells. This is a very important feature for human pathogens such as *C. albicans* because its absence in mammal cells turns it into a good target for antifungal therapy.

C. albicans cell wall has several functions:

- Maintenance of cell shape (Ruiz-Herrera, 1992) and adaptation to different morphologies.
- Protection against chemical and physical stresses combining mechanical strength and elasticity and biological aggressions (Klis *et al.*, 2001; Smith *et al.*, 2000).
- As a scaffold for external proteins (Sohn *et al.*, 2006).
- Contribution to pathogenesis, as (i) it is the first structure to come into contact with host cells; (ii) it carries antigenic determinants of the fungus; (iii) it is responsible for the adherence of the pathogen; and (iv) it establishes a cross-talk with the host (Ruiz-Herrera *et al.*, 2006).

I.4.1- Cell wall composition

The cell wall of *C. albicans* is a complex biochemical entity composed, as in *S. cerevisiae*, mainly of three components: glucans (β -1,3- and β -1,6-glucan), mannoproteins and chitin (Table I.2) and accounts for approximately 30% of the cell dry weight (Fleet, 1991; Valentin *et al.*, 2000). Besides these major components, some other molecules are present in the cell wall but in minor proportions. This is the case of phospholipomannan, a lipid in *C. albicans* wall that it has been suggested to be involved in cell adhesion and which reacts with specific antibodies against β -1,2-oligomannosides (Mille *et al.*, 2004)

Table I.2- Distribution of *C. albicans* cell wall components

MOLECULE	% DRY WEIGHT
β -1,3-glucan	40
β -1,6-glucan	20
Mannoproteins	30-40
Chitin	1-10

The ultrastructure of *C. albicans* cell wall has been observed using scanning electron microscopy (Fig. I.5) revealing the existence of different layers in the wall (Tokunaga, 1986; Osumi, 1998).

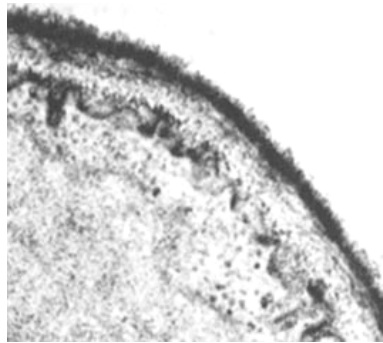


Figure I.5. Electron micrograph of a *C. albicans* cell wall section.

The inner part appears to be electron transparent and consists mainly of β -1,3-glucan, chitin and β -1,6-glucan molecules bound by hydrogen bonds and with a small amount of proteins (Marcilla *et al.*, 1991; Kapteyn *et al.*, 2000). The outer part is mainly made of mannoproteins attached to the polysaccharide network that determine cell surface properties (Klis *et al.*, 2001). All these features are represented in figure I.6.

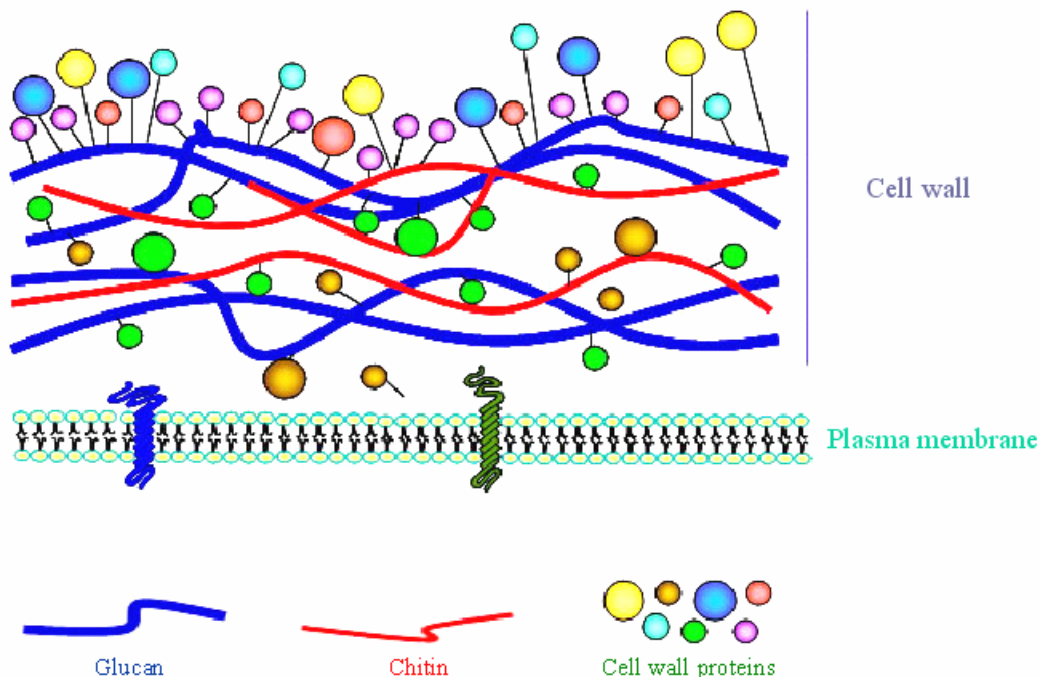


Figure I.6- Scheme of the structural organization of cell wall components in yeasts.

The cell wall is a dynamic structure that requires continuous remodelling of its components and structure in response to isotropic or apical growth, changes in environmental conditions, cell damage, etc. It has been estimated in *S. cerevisiae* that about 1200 genes cause a cell-wall related phenotype when deleted, supporting the notion that cell wall construction is an integral part of cell physiology (De Groot *et al.*, 2001).

I.4.1.1- β -glucans

They are the most abundant polysaccharides of the fungi and also of the *C. albicans* cell wall. β -glucans are polymers of D-glucose moieties that can be classified depending on whether they are joined by β -1,3 and/ or β -1,6-glycosidic linkages.

I.4.1.1.1- β -1,3-glucan

β -1,3-glucan chains are made up of around 1500 glucose units per chain. These polymers present a coiled microfibrillar structure that confers elasticity and tensile strength to the cell wall.

Studies carried out with *C. albicans* and *S. cerevisiae* provided evidence that initiation of synthesis of the polymer requires a protein acceptor. β -1,3-glucan chain growth involves a transglycosylation reaction of glucosyl residues from the cytoplasmic donor UDP-glucose to the growing polysaccharide chain (for a review see Ruiz-Herrera *et al.*, 2004).

In *S. cerevisiae* β -1,3-glucan synthase subunits have been identified. This enzymatic complex consists of a membrane-bound catalytic subunit (Fks1p and Gsc2p/Fks2p) and a cytosolic GTP-dependent regulatory subunit (Rho1p). *FKS1* and *GSC2* are 88% homologs and have similar topology and organization. *FKS1* and *GSC2* show differential patterns of expression, Fks1p is the major player during vegetative growth on rich medium, with Gsc2p being the protein functioning under more stressful conditions. Fks1p and Fks2p form a redundant essential pair with a double *fks1 Δ fks2 Δ* mutant being unviable (Dijkgraaf *et al.*, 2002; Mazur *et al.*, 1995). The *FKS* family has a third member, *FKS3*, whose product does not present any glucan synthase activity.

Fks3p function has been related to sporulation and mating (Deutschbauer *et al.*, 2002; Zeitlinger *et al.*, 2003). Rho1p is an essential G protein that in their active GTP-bound state binds and activates its effectors (Fks1p and Gsc2p). In addition to its role as β -1,3-glucan synthase regulator, Rho1p plays an important role in cell wall organization by acting through the PKC cell integrity pathway (Qadota *et al.*, 1996).

In *C. albicans* three *FKS* homologs to *S. cerevisiae FKS1* have been found: *GSCI/CaFKS1*, *GSL1* and *GSL2* (Mio *et al.*, 1997a). The main activity appears to result from Gsc1p. Interestingly, both *GSCI* and *RHO1* encode for essential proteins in *C. albicans* (Mio *et al.*, 1997a; Smith *et al.*, 2002). Moreover, *GSL1* and *GSL2* are overexpressed during the *de novo* synthesis of the cell wall as revealed by a transcriptomic study along the protoplasts regeneration process (Castillo *et al.*, 2006).

I.4.1.1.2- β -1,6-glucan

β -1,6-polymer is shorter than β -1,3-glucan, consisting in 350 units of glucose (Kollar *et al.*, 1997). Its structure presents branch points on approximately 7% of the residues in *C. albicans* (Mio *et al.*, 1997b), resulting in an highly branched structure that acts as a flexible glue by forming covalent cross-links to β -1,3-glucan and chitin and to cell wall mannoproteins (Kollar *et al.*, 1997). Because β -1,6-glucan is the receptor for killer toxin K1, toxin killer resistant-(kre) mutants became an excellent tool for the identification of genes involved in its synthesis.

In *S. cerevisiae*, at least 10 genes involved in β -1,6-glucan have been identified: *KRE1*, *KRE5*, *KRE6*, *KRE9*, *KRE11*, *CNE1*, *CWH41/GLS1*, *KNH1*, *ROT2/GLS2* and *SKN1* (Shahinian and Bussey, 2000). It still remains unclear which synthetic pathway is involved in this process. Genetic and structural studies (Montijn *et al.*, 1999) suggest that β -1,6-glucan synthesis may occur at the cell surface; however, components in the secretory pathway as Kre5p and Cwh41p, located in the ER, and Kre6p and Skn1p transmembrane Golgi proteins are required (Shahinian and Bussey, 2000). It has been shown that numerous genes are involved in the synthesis of this polymer: *KRE5*, *CNE1*, *CWH41* and *ROT2* encoding for UDP-glucose glycoprotein glucosyltransferases (Shahinian and Bussey, 2000); *KRE6* and *SKN1* encoding for a duplicated pair of type 2 Golgi proteins with similarity to family 16 glycoside hydrolases (Roemer *et al.*, 1994; Montijn *et al.*, 1999); *KRE1* encoding a plasma membrane-associated that extends the

chain by adding linear β -1,6-glucan onto a highly branched acceptor glucan (Boone *et al.*, 1990); *KRE9* and *KNH1* whose encoded proteins could be related to anchoring or cross-linking the new synthesized β -1,6-glucan in the wall (Brown and Bussey, 1993; Shahinian and Bussey, 2000). Moreover, the GTP dependence of the reaction implies involvement of Rho1p GTP-binding protein in regulating β -1,6-glucan like β -1,3-glucan synthesis.

In *C. albicans* homologs of several *KRE* genes have been isolated, providing evidence that the synthesis of β -1,6-glucan occurs by similar mechanisms in both fungi.

I.4.1.2- Chitin

Chitin is a linear polysaccharide made of more than 2000 units of N-acetylglucosamine (GlcNAc) joined by β -1,4-linkages. These chains are associated in an antiparallel fashion through hydrogen bonds to form microfibrils composed of 20-400 chains. This kind of organization makes chitin insoluble, what explains why its linkages to β -1,3-glucan form the basic cell wall scaffold to which mannoproteins are associated.

Chitin is not mainly found in the lateral walls of the cell, but in the chitin ring in the neck of the mother cell, in the primary septum and in the bud scars. Different chitin synthases genes have been found in both *S. cerevisiae* and *C. albicans* and their regulation is controlled spatially and temporally (Bulawa, 1993; Munro and Gow, 2001)

Synthesis of chitin involves a transglycosylation reaction of GlcNAc residues from the universal substrate UDP-N-acetylglucosamine to the growing chain of polysaccharide and requires a divalent metal, generally Mg^{2+} .

Chitin synthase activity is accumulated in the cytosol of fungi, also in *C. albicans*, in specialized microvesicles, chitosomes, responsible for the transfer of the enzyme from its site of synthesis to its place of action (Ruiz-Herrera *et al.*, 2004).

In *C. albicans* four genes encoding chitin synthases (*CHS* genes) have been described: *CHS1*, *CHS2*, *CHS3* and *CHS8*. *CHS1* gene expression presents low levels in both yeast and hyphae. Nevertheless, Chsp1p was found to be essential for cell integrity and virulence, apparently being involved in septum formation (Mio *et al.*, 1996; Munro *et al.*, 2001). *CHS2* is preferentially expressed in the hyphal form, and its encoded protein is the most abundant chitin synthase activity *in vitro*. However, the absence of

Chs2p does not affect dimorphism, the levels of chitin in the cell wall or its virulence (Gow *et al.*, 1994; Mio *et al.*, 1996). *CHS3* reaches its maximum level of expression during hyphal induction, but Chs3p is responsible for *in vivo* synthesis of most chitin in both yeast and hyphae (Mio *et al.*, 1996). *CHS8* encodes a protein similar to Chs2p. *chs8Δ/chs8Δ* mutants display normal growth rates, cellular morphology and chitin content, but their chitin synthase activity is reduced to 25%, and a double homozygous mutant *chs2Δ/chs2Δ chs8Δ/chs8Δ* possesses less than 3% of the wild-type chitin synthase activity *in vitro* although has normal growth rate and morphology (Munro *et al.*, 2003).

I.4.1.3- Mannoproteins

Linked to the cell wall polysaccharides are a varied set of glycoproteins. These glycoproteins consist in a protein with glycidic chains covalently attached. It has been shown in yeasts that the carbohydrate bound to the cell wall proteins (CWP) is mainly mannose, and phosphate groups have also been found (Ruiz-Herrera, 1992; Peberdy, 1999). The level of glycosylation is variable, often as high as 50-95% by weight.

The most important roles of cell wall proteins (CWP) in pathogenic fungi, as *C. albicans*, are:

(i) Enzymatic: some enzymes have been found in the cell wall to play different roles: degradation of impermeable molecules, making the products accessible for nutrition, one example of this is the acid trehalase Atc1p that is required for growth in trehalose (Pedreño *et al.*, 2004); and remodelling of cell wall components, necessary for cell growth, which is carried out by several enzymes with glucanase, chitinase or transglycosidase activities (Chaffin *et al.*, 1998).

(ii) Cell interaction: some cell wall proteins are involved in the contact of *C. albicans* with host tissues and some of their products such as fibrinogen, complement fragments and extracellular matrix components (Calderone, 1993), but also to abiotic surfaces. The best example for this function is the *ALS* gene family (see section I.3.1).

(iii) Antigenicity: several wall glycoproteins (not only the protein itself, but their mannan moieties) are antigenic, and are present differentially in the yeast or filamentous form (Sundstrom *et al.*, 1988).

(iv) Pathogenicity: cell wall proteins are considered virulence factors since they can favour *C. albicans* infections in different ways. Secreted aspartyl proteases (Saps)

proteins (see section I.3.2.1) are responsible, among other functions, for the elimination of cells and molecules of the host immune system to resist antimicrobial attack by the host (Naglik *et al.*, 2003; Albrecht *et al.*, 2006). Superoxide dismutases (Sods) in *C. albicans* are located in the cell surface and turns superoxide radicals, produced by the host macrophages, into hydrogen peroxide, defeating one of the host's defence mechanisms (Fradin *et al.*, 2005).

(v) Structure and morphogenesis: other glycoproteins may be important from a structural point of view, like Ssr1p, a covalently-linked cell wall protein which lack on the cell wall does not produce strong alterations in the cell (Garcera *et al.*, 2003; 2005); proteins with an important role in hypha formation, as Csf4p (Alberti-Segui *et al.*, 2004) or Dfg5p (Casanova *et al.*, 1990); or glycoproteins that have been suggested to be required for the correct assembly of cell wall components, some examples of these are Ecm33p (Pardo *et al.*, 2004) and Pir1p (Martinez *et al.*, 2004).

I.4.1.3.1- Classification of cell wall mannoproteins

Two methodological approaches have allowed the identification of different cell wall proteins: (i) sequencing and *in silico* analysis of the whole *C. albicans* genome, and (ii) proteomic analysis. In *C. albicans*, these analyses have identified hundreds of putative cell wall proteins (De Groot *et al.*, 2003; Garcera *et al.*, 2003; Eisenhaber *et al.*, 2004) that could be classified depending on the sort of linkage that remains them attached to the cell wall. A scheme of the different kinds of CWPs found in the cell wall is shown in figure I.7.

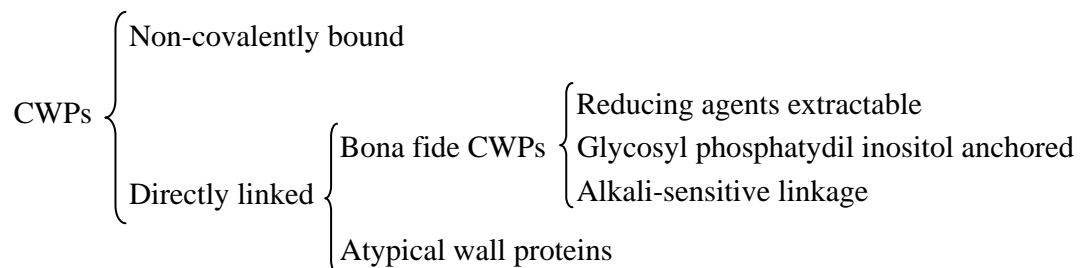


Figure I.7- Classification of cell wall proteins

I.4.1.3.1.1- Non-covalently linked (NCL-CWPs)

These proteins are bound to the cell wall through weak linkages (Fig. I.7) and they can be extracted by hot water, ionic detergents like SDS (Valentin *et al.*, 1984; Valentin *et al.*, 1987) or chaotropic agents as urea. However, some specific cell wall proteins can be also released using a hot detergent treatment, as is the case of the endoglucanase Bgl2p and the chitinase Cht1p (Capellaro *et al.*, 1998) in *S. cerevisiae*. Normally, these proteins are not real components of the cell wall but contaminant proteins coming from plasma membrane fragments (Klis, 1994; Eroles *et al.*, 1997; Cappellaro *et al.*, 1998; Klis *et al.*, 2001).

I.4.1.3.1.2- Reducing agents extractable (RAE-CWPs)

This group consists in proteins that are linked to other cell wall proteins through disulphide bridges (Fig. I.7), and consequently, they can be extracted from the cell wall by reducing agents as β -mercaptoethanol (β -ME) or dithiothreitol (DTT) as described by Moukadiri and Zueco (2001a).

I.4.1.3.1.3- Glycosyl phosphatidyl inositol anchored (GPI-CWPs)

GPI proteins appear to be the most abundant ones in *C. albicans*, representing about 88% of the covalently linked cell wall proteins.

Proteins of this group share conserved features (reviewed in Richard and Plaine, 2007): (i) an N-terminal signal peptide for secretion, (ii) a Ser/Thr-rich sequence which could provide sites for *O*-glycosylation, (iii) a C-terminal hydrophobic domain, and (iv) a ω site, upstream the hydrophobic tail, where the GPI anchor is attached (Caro *et al.*, 1997). The GPI anchor (Fig. I.8) consists of a lipid group, a mioinositol group, an N-acetylglucosamine group, three mannose groups, and a phosphoethanolamine group, which connects the GPI anchor to the protein.

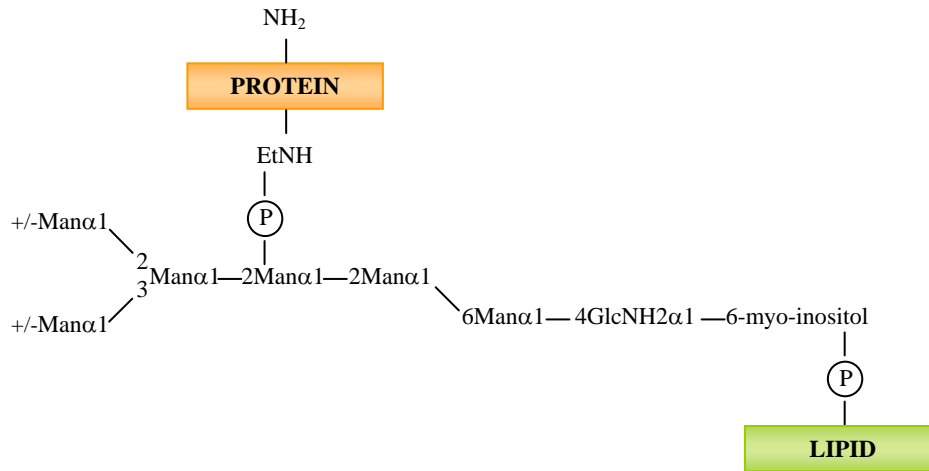


Figure I.8- Glycosyl phosphatidylinositol anchor structure of yeast proteins. EtNH, ethanolamine; (P), phosphate; Man, mannose. (Adapted from Sipos *et al.*, 1995).

Shortly, after protein synthesis in the ER, a preformed GPI anchor is transferred to the C- terminus of the target proteins and replaces the hydrophobic tail (De Groot *et al.*, 2003). The attachment reaction involves a proteolytic cleavage C terminal of the attachment residue and a transamidation between the generated amino acid and the ethanolamine phosphate of the GPI anchor (Tiede *et al.*, 1999; De Groot *et al.*, 2003).

These proteins are bound (through their GPI moiety) via β -1,6-glucan to either β -1,3-glucan, on 90% of the cases, or to chitin on the remaining 10% (Kapteyn *et al.*, 2000). The extraction of these proteins can be performed by enzymatic digestion of the polysaccharide network of the cell wall with β -1,6-glucanases (Kapteyn *et al.*, 2000), β -1,3-glucanases (Garcera *et al.*, 2003), chitinases (Marcilla *et al.*, 1991), or chemically by cleaving the phosphate bonds that link GPI-CWPs to β -1,6-glucan chains using hydrofluoric (HF)-pyridine (De Groot *et al.*, 2004).

GPI anchoring is encountered in every eukaryotic cell, including unicellular yeast cells, parasites, and mammalian cells (McConville and Menon, 2000; Bowman *et al.*, 2006). Different studies carried out in *S. cerevisiae* (Caro *et al.*, 1997; Hamada *et al.*, 1998) have revealed that approximately 70 GPI proteins are present in this organism. An *in silico* study has identified in *C. albicans* a total of 234 putative GPI proteins that can be bound to the cell wall or to the plasma membrane (Eisenhaber *et al.*, 2004). In *C. albicans*, three different research groups have reported their lists of putative GPI-CWPs (De Groot *et al.*, 2003; Garcera *et al.*, 2003; Eisenhaber *et al.*, 2004). Richard and Plaine (2007) have recently analyzed all the three studies about putative GPI-CWPs

and have published a list of 115 putative GPI proteins corresponding to the *C. albicans* genome. Among them, four classes can be described (Fig. I.9): (i) 76 of these putative proteins have unknown function, (ii) 15 proteins with functions related to cell wall biogenesis or remodelling, (iii) 13 related to cell-cell adhesion and other interactions, and (iv) 11 proteins presenting different enzymatic activities.

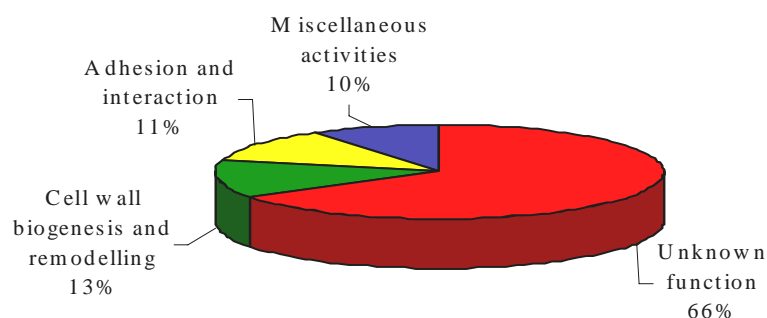


Figure I.9- Function distribution of GPI-CWPs in *C. albicans*.
(Adapted from Richard and Plaine, 2007).

It is worth to say that among the 76 proteins with unknown function, 41 of them have been shown to be regulated by various transcriptional factors and in different conditions. Some of the transcriptional factors regulating these GPI-protein genes are, Rim101p, Nrg1p, Tup1p, Efg1p, Cph1p and Ssn6p, (Bensen *et al.*, 2004; Murad *et al.*, 2001; Sohn *et al.*, 2003; Setiadi *et al.*, 2006; Garcia-Sanchez *et al.*, 2005).

I.4.1.3.1.4- Alkali-sensitive linkage (ASL-CWPs)

They are a small group of proteins directly attached to the cell wall β -1,3-glucan by covalent linkages sensitive to alkaline treatment (Fig. I.7).

The most remarkable ASL-CWPs are Pir proteins (proteins with internal repeats). These proteins are rich in Ser and Thr residues and are thought to be highly glycosylated. They consist of (i) a putative N-terminal signal peptide, followed by a Kex2p endoprotease cleavage site, (ii) variable number of internal repeats matching the consensus pattern Q[IV]XDGQ[IVP]Q, and (iii) a four C-terminal cysteine-based motif (Toh-e *et al.*, 1993).

In *S. cerevisiae* the Pir family is composed of four members: Pir1p (Toh-e *et al.*, 1993; Mrsa *et al.*, 1997), Pir2p/Hsp150p (Russo *et al.*, 1992; Toh-e *et al.*, 1993;

Moukadiri and Zueco, 2001a; 2001b), Pir3p (Toh-e *et al.*, 1993; Mrsa *et al.*, 1997) and Pir4p (Moukadiri *et al.*, 1999). Recently, a fifth member of this family, Pir5p, has been identified (M. Ecker, unpublished data). It has been also shown that some of them, Pir2p and Pir4p, can be also released to the culture media (Russo *et al.*, 1992; Moukadiri *et al.*, 2001a) or found attached to other cell wall proteins by disulphide bridges and extracted from the wall using reducing agents (Orlean *et al.*, 1986; Moukadiri *et al.*, 1999; Moukadiri and Zueco, 2001a). The PIR genes show cell-cycle dependent expression, Pir1p, Pir2p and Pir3p are highly expressed when the cells grow isotropically and the new cell wall components have to be assembled which is consistent with their supposed role in β -1,3-glucan cross-linking (De Nobel and Barnett, 1991).

The nature of the linkage that attaches Pir proteins to the cell wall has been recently elucidated. The presence of these proteins linked to β -1,3-glucan that can be released by mild alkali treatment suggested that a glycosidic bound links the β -1,3-glucan and a mannose residue of the *O*-linked chains of the Pir proteins (Klis *et al.*, 2002). Castillo *et al.* (2003) have shown by mutational analysis that the repeat sequences are required for binding to β -1,3-glucan. If these repeats, containing the “linking” sequence, are directly involved in binding β -1,3-glucan, then Pir-CWPs may interconnect two or more β -1,3-glucan molecules as represented in figure I.10. Recent studies made with Pir4p have identified the amino acid responsible for the binding of this protein to β -1,3-glucan. Pir4p is attached to the cell wall via glutamine residue 74, within the repeat sequence QIGDGQ₇₄VQ (Ecker *et al.*, 2006). Although which enzyme catalyzes the reaction is still unknown, it has been postulated that an ester linkage between the γ -carboxyl of a glutamate residue, arising from a glutamine, and the sugar hydroxyl is formed (Ecker *et al.*, 2006). This ester bond would be expected to be alkali labile, which is consistent with the knowledge that Pir proteins are extractable from the cell wall using mild alkali treatments.

In *C. albicans* only one typical Pir protein has been identified up to now. The two alleles of *C. albicans* *PIR1* in CAI4 strain (*IPF15363* and *IPF19968*) gene encode for two different-size cell wall mannoproteins with 9 and 7 internal repeats (-Q-I-(S/T/G/N)-D-G-Q-(I/V)-Q-H-Q-T-) respectively in their amino acid sequences that can be found attached to the cell wall by alkali-sensitive linkages and also secreted to the culture media (Martinez *et al.*, 2004). The main differences between *S. cerevisiae* and

C. albicans Pir proteins are: (i) the two polypeptides codified by *IPF19968* and *IPF15363* are not processed by the endoprotease Kex2p, and (ii) the spacing among cysteines within the cysteines domain is $-C-X_{65}-C-X_{16}-C-X_{12}-C-X_0-COOH$ in *C. albicans*, whereas in *S. cerevisiae* is $-C-X_{66}-C-X_{16}-C-X_{12}-C-X_0-COOH$. Heterozygous mutants cells in each of the two alleles of *PIR1* gene are elongated, form clumps of several cells and are hypersensitive to drugs that affect cell wall assembly. The homozygous mutant has not been obtained yet, suggesting an essential role for *PIR1* in *C. albicans* (Martinez *et al.*, 2004).

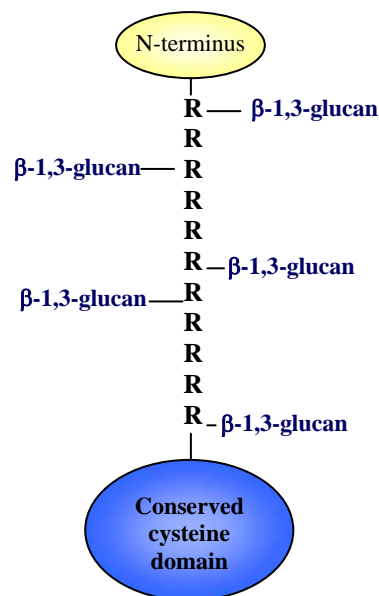


Figure I.10- Internal repeats of Pir proteins may act as crosslinkers between β-1,3-glucan chains. R, internal repeats of the consensus sequence $-(Q[I/V]XDGQ[I/V/P]Q)-$. (Adapted from Klis *et al.*, 2006).

I.4.1.3.1.5- Atypical wall proteins

This group consists of proteins that have been recently detected in the cell wall although they have been classically recognized as cytoplasmic proteins, and do not possess the characteristic features of cell wall proteins (signal peptide for secretion and potential glycosylation sites). Some of the atypical proteins found in cell wall extracts are glycolytic enzymes, chaperones and translation factors (Nombela *et al.*, 2006).

Whether these proteins are somehow trapped within the cell wall components or they arrive to the cell wall through a non-classical transport pathway is still unknown.

Putting together all the cell wall components described above, a model of the yeasts cell wall organization and assembly has been developed by the European Consortium Galar Fungail (Fig. I.11).

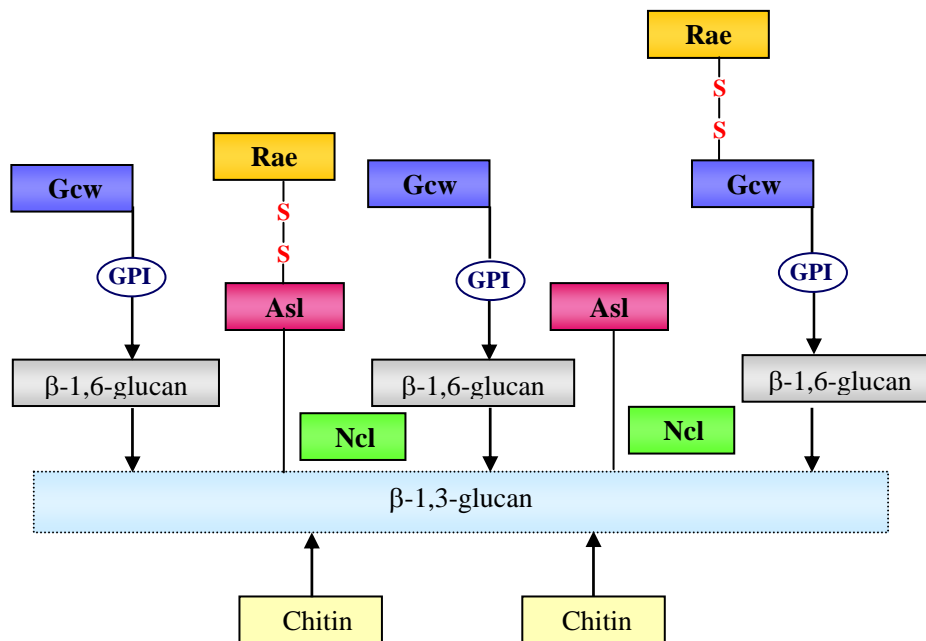


Figure I.11- Molecular organization of the cell wall of *C. albicans*. Gcw, covalently linked GPI-cell wall protein; GPI, glycosyl phosphatidil inositol remnant; Asl, Alkali-sensitive linked cell wall protein; Rae, reducing agents extractable cell wall protein; Ncl, Non-covalently linked protein. Model developed for the Galar Fungail I European Consortium.

I.4.1.3.2- Post-translational modifications of cell wall proteins

Once the cell wall proteins have been synthesized, several post-translational events may occur to make them fully functional and to drive them to the cell surface where they will be anchored to play their specific role.

Secretion pathways in *S. cerevisiae* have been widely studied using *sec* mutants, defective in different steps of the secretion process (Walworth and Novick, 1987). Proteins to be exported to the cell wall travel along the ER and Golgi where become

appropriately modified by addition of a GPI remnant (see section I.4.1.3.1.3) and glycosyl residues (see below). Then the mature proteins are transported to the cell surface in secretion vesicles that merge with the plasma membrane and pour their content outside the cell to favour the attachment of the glycoproteins to the cell wall.

I.4.1.3.2.1- *N*-glycosylation

N-glycosylation of proteins is present in every eukaryotic cell. In *C. albicans* it has been shown that this *N*-linked mannan is important for adhesion to host and surfaces and is also involved in generating the immune response of the host in *Candida* infections.

All *N*-modified glycoproteins acquire the initial oligosaccharide in the ER onto an asparagine residue of the sequence N-X-S-T (where X represents any amino acid except proline), through a direct bond between this asparagines and β -1,4-diacetylchitobiose. Then, cell wall and secreted mannoproteins are extensively mannosylated in the Golgi with a final structure of α -1,6-linked mannose chain of up to 50 mannose residues extending from the *N*-glycan core and to which are attached shorter chains of α -1,2 residues terminating in α -1,3-linked mannose residues, forming a highly branched structure containing as many as 200 mannose residues (Ballou, 1990; Dean, 1999; reviewed by Cutler, 2001).

N-glycosylation in yeasts has been elucidated using mutant strains in different steps of the process: (i) *mn* mutants, mannan synthesis (Ballou, 1990); (ii) *alg* mutants, asparagines-linked glycosylation deficient (Kukuruzinska *et al.*, 1999), and (iii) *och* mutants, outer chain-deficient (Nagasu *et al.*, 1992).

I.4.1.3.2.2- *O*-glycosylation

O-glycosylation of cell wall proteins is more abundant than *N*-glycosylation, although the grade of addition of mannose molecules is lower. Despite the small size of the *O*-linked chains, the number of *O*-chains per protein can be high and the amount of *O*-linked mannose in the cell wall significant (Strahl-Bolsinger *et al.*, 1999).

The initial step of *O*-mannosylation occurs in the ER where a single mannose residue is transferred to Ser and/or Trh residues of proteins by a family of protein-*O*-

mannosyltransferases (*PMT* family) (Ernst and Prill, 2001). Subsequent steps occur in the Golgi and are catalyzed by mannosyltransferases (Mnt) or mannansynthases (Mnn). The final molecule contains in two residues of mannose being α -1,2-linked and subsequent ones (in *C. albicans* can be up to five) α -1,3-linked (Jigami and Odani, 1999).

The *C. albicans* *PMT* family, consisting in 5 members (Pmt1p, Pmt2p, Pmt4p, Pmt5p, Pmt6p), has been shown to be related not only to *O*-glycosylation of proteins, but also to morphogenesis and antifungal resistance (Ernst and Prill, 2001; Prill *et al.*, 2005).

I.4.2- Cell wall remodelling

As stated the cell wall is a dynamic structure that needs to be restructured through the activity of different remodelling enzymes during cell cycle and in response to environmental changes or different growth programs.

The cellular localization of these enzymes within the cell wall is compatible with their having important roles as cell wall remodelling proteins.

I.4.2.1- Glucan remodelling enzymes

The product synthesized by β -1,3-glucan synthases is linear. However, the branched structure of the mature β -1,3-glucan network requires shortening of the polymer by nicks and the introduction of polymer branch points. Such reactions are catalyzed by exo- and endoglucanase activities (Adams, 2004).

In *C. albicans* some of these enzymes are encoded by *PHR1*, *PHR2*, *PHR3*, *PGA4*, *PGA5*, *BGL2*, *SCW1*, *SCW11*, *EXG1* and *EXG2* genes (Fonzi, 1999; Eckert *et al.*, 2006; Sarthy *et al.*, 1997; Gonzalez *et al.*, 1997; Stubbs *et al.*, 1999).

I.4.2.2- Chitin remodelling enzymes

Yeasts possess families of chitinase genes (Adams, 2004). In *C. albicans* the products of the chitinase genes *CTS* are putative cell wall proteins, suggesting a role as wall-remodelling enzymes.

The chitinases found in *C. albicans* up to now are encoded by *CTS1*, *CTS2*, *CHT1*, *CHT2* and *CHT3*.

I.4.2.3- Glucan-chitin cross-linking enzymes

Chitin is bound to the β -glucan network in the cell wall of yeasts, conferring rigidity to the structure.

In *S. cerevisiae*, 50% of the chitin is β -1,4-linked to β -1,3-glucan chains, and also some data suggest that chitin is covalently bound to β -1,6-glucan through its reducing end. Despite no evidence for their enzymatic activity have been proposed, they are supposed to be transglycosidases which cross-link β -glucan and chitin (Kollar *et al.*, 1995; 1997; Cabib *et al.*, 2007).

The products of the genes related to the *CRH* family (*Crh1p* and *Utr2p*) form a group of enzymes with glycoside hydrolase activity. These proteins are conserved from prokaryotic cells to fungal and plants and seem to have a role, directly or indirectly, in linking chitin to the β -1,3-glucan network (Rodriguez-Peña *et al.*, 2000).

The *CRH* family in *C. albicans* includes *CRH11*, *CHR12* and *UTR2* genes. Mutational analysis on these genes is consistent with the results obtained for this family in *S. cerevisiae*, leading to the conclusion that these enzymes mediate the cross-linking between β -1,3-glucan and chitin (Pardini *et al.*, 2006).

I.4.3- Cell wall integrity signalling

The response to cell wall-threatening conditions involves a cascade of signals beginning in the cell surface that is led to the nucleus and activate compensatory mechanisms to guarantee its integrity. Activation of these pathways can be caused by (i) presence of agents that produce cell wall stress, like calcofluor white, Congo red; (ii) cell wall lytic enzymes; (iii) mutations that impair cell wall biosynthesis; (iv) different environmental conditions weakening the cell wall structure.

Mitogen-activated protein kinases (MAPK) signal transduction pathways are widespread mechanisms in eukaryotic cells. These cascades generally consist in three kinases. The first step is the phosphorylation of the MAP kinase kinase kinase

(MAPKKK) as a result of an upstream stimulus, then, this MAPKKK phosphorylates a MAP kinase kinase (MAPKK) which in turn phosphorylates the MAP kinase (MAPK). This MAPK transmits the signal to a transcription factor that generates a specific adaptative response (for a review see Alonso Monge *et al.*, 2006).

In *S. cerevisiae* these pathways have been widely studied and a correlation of their components with those from *C. albicans* has been carried out (Fig. I.12). Different cell biological processes are controlled by these pathways: cell wall construction and integrity, adaptation to osmotic and oxidative stress, mating, and growth.

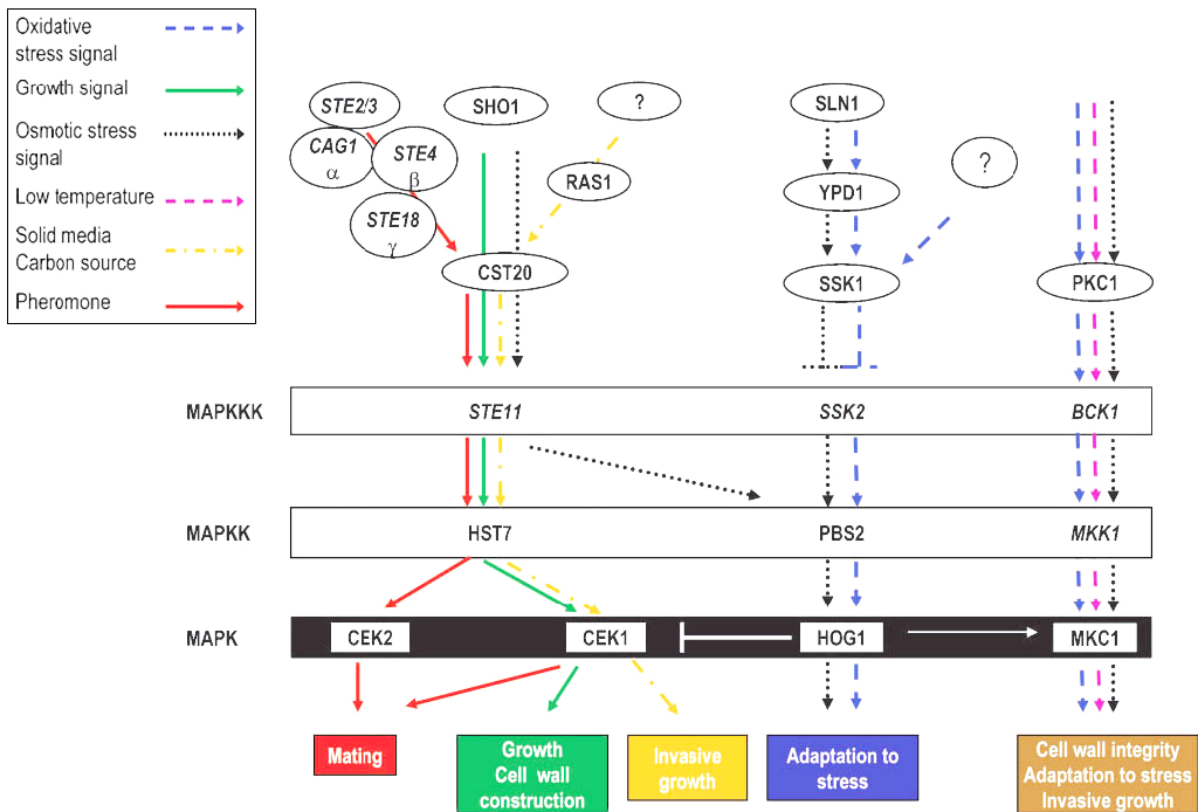


Figure I.12- Elements of the MAPK signal transduction network in *C. albicans*. Genes whose position is deduced from a *S. cerevisiae* model are typed in *italics*. Arrows represent positive stimuli, while blunt ended arrows represent inhibition. The position in this scheme do not established whether the interaction/crosstalk takes place by a direct or indirect mechanism. (Adapted from Alonso Monge *et al.*, 2006).

I.4.3.1- PKC-MAPK pathway

Although several signalling pathways contribute to the maintenance of the cell wall, the principal responsible for organizing and responding to challenges to this structure is the cell wall integrity (CWI) pathway.

The *PKC1*-mediated MAPK pathway (protein kinase C mitogen-activated protein kinase), or CWI pathway, in *S. cerevisiae* is used as the main signal transduction pathway that mediates the response to oxidative and cell wall stress (Heinisch *et al.*, 1999; Vilella *et al.*, 2005) but also plays a role in morphogenesis and cell cycle.

In *S. cerevisiae*, this pathway integrates signals from several environmental pathways in order to respond to cell wall damage by a set of membrane sensors: Wsc1p, Wsc2p, Wsc3p, Mid2p and Mtl1p (Verna *et al.*, 1997; Rajavel *et al.*, 1999; Ketela *et al.*, 1999). These surface sensors are coupled to a small G-protein, Rho1p, which activates a set of effectors. Rho1p receives the major inputs from the cell surface but also regulates a variety of outputs involved in cell wall biogenesis, actin organization and polarized secretion. This coordination is performed through a series of MAP kinase cascade that is responsible for amplification of the CWI signal from Rho1p (Heinisch *et al.*, 1999).

In *C. albicans* the MAPK pathway is important in virulence and morphological transitions (Ernst, 2000), and their components (Table I.3) are homologous to those in *S. cerevisiae* (Brown and Gow, 1999; Paravicini *et al.*, 1996).

Table I.3- Components of the *C. albicans* Pkc1p-mediated pathway and their equivalents in *S. cerevisiae*.

Pkc1p-MAPK PATHWAY COMPONENT	<i>S. cerevisiae</i>	<i>C. albicans</i>
Receptor	Wsc1-3p Mid2p Mtl1p	Wcs1p Wsc4p
Regulatory kinase	Pkc1p	Pkc1p
MAPKKK	Bkc1p	Bkc1p
MAPKK	Mkk1p Mkk2p	Mkk1p
MAPK	Slf2p	Mkc1p
Transcription factor	Swi6p Rlm1p	Swi6p Rlm1p

In *C. albicans* only two homologs to Wsc family proteins, Wsc1p and Wsc4p, have been identified, although its role as surface sensors remains to be proved.

The *C. albicans* homolog to *S. cerevisiae* MAPK Slf2p is Mkc1p (MAP kinase of *C. albicans*). Mkc1p plays a role in maintaining cellular integrity (Navarro-Garcia *et al.*, 1995) and *mkc1Δ/mkc1Δ* mutants present differences in the deposition of cell

surface mannan when compared to a wild-type strain (Navarro-Garcia *et al.*, 1998) although the rest of the cell wall components remain unaltered. Another evidence for its role in cell wall integrity comes from the observation that *pmr1Δ/pmr1Δ* mutants, that are altered in cell wall glycosylation, activate Mkc1p in a constitutive manner (Bates *et al.*, 2005).

At the end of the cell integrity pathway two transcription factors, Swi6p and Rlm1p control the expression genes in response to cell wall stress. The role of Rlm1p in *C. albicans* cell wall integrity has been proved by the activation of *RLM1* expression in response to caspofungin, an antifungal drug that inhibit the synthesis of β -1,3-glucan (Bruno *et al.*, 2006).

I.4.3.2- Cek1p-mediated pathway

The Cek1p-mediated (*Candida* ERK-like kinase) pathway (Fig. I.12) is known in *S. cerevisiae* as Kss1p-mediated pathway (Table I.4).

Table I.4- Components of the *C. albicans* Cek1p-mediated pathway and their equivalents in *S. cerevisiae*.

Cek1p-MAPK PATHWAY COMPONENT	<i>S. cerevisiae</i>	<i>C. albicans</i>
Receptor	Sho1p	Sho1p
Regulatory kinase	Ste20p	Cst20p
MAPKKK	Ste11p	Ste11p
MAPKK	Ste7p	Hst7p
MAPK	Kss1p	Cek1p
Transcription factor	Tec1p Ste12p	? Cph1p

This pathway is activated by different environmental signals and participates in the biogenesis of the cell wall during vegetative growth, mating and invasive growth through the regulation of Cph1p transcriptional factor (Liu *et al.*, 1994).

The activity of this MAPK pathway is dependent on Sho1p (Roman *et al.*, 2005). The relationship between this pathway and cell wall construction is clear since *sho1Δ/sho1Δ* mutants, which fail to activate the Cek1p-mediated pathway, present hypersensitivity to compounds that alter the cell wall architecture (Roman *et al.*, 2005).

I.5- TRANSCRIPTIONAL FACTORS

Gene expression can be controlled at various levels, including transcription, mRNA splicing, mRNA stability, translation and post-translation events, as protein stability and modification. Transcriptional regulators in *C. albicans* have been shown to play an important role in pathogenicity and other physiological roles and the knowledge of their function should help us to better understand the complex interactions between a parasite and its host.

Transcriptional factors (TFs) that regulate transcription are usually composed of a DNA-binding domain (DBD) and an activation domain (AD). The DBD targets these proteins to a specific binding site in the promoter of the gene to be regulated, and the AD mediates transcription initiation (Kadonaga, 2004). Transcriptional regulators in yeast always recruit additional proteins or complexes to the appropriate promoters to allow the binding of one of the three RNA polymerases to start the transcription process.

I.5.1- Promoter binding sites

The distribution of binding sites for transcriptional regulators reveals constraints on the organization of these sites in yeast promoters to ensure the specific and appropriate activation of target genes. The arrangements of DNA binding sites within promoters suggest that they also play a role in regulatory mechanisms.

I.5.1.1- Promoter architecture

Different promoter architectures have been found in yeasts (Harbison *et al.*, 2004) as represented in figure I.13:

- (i) presence of a DNA binding motif for a single regulator.
- (ii) repetitive motif architecture, promoter regions that contain multiple copies of a binding site sequence of a regulator and can also permit a graded transcriptional response.

(iii) multiple regulator architecture, promoter regions containing binding sites for multiple different regulators, implying a combinatorial regulation of the genes and in some cases in an environmental-specific fashion.

(iv) co-occurring regulator architecture, promoters containing binding site sequences for recurrent pairs of regulators, suggesting that the two transcriptional factors may interact physically or have related functions at multiple genes.

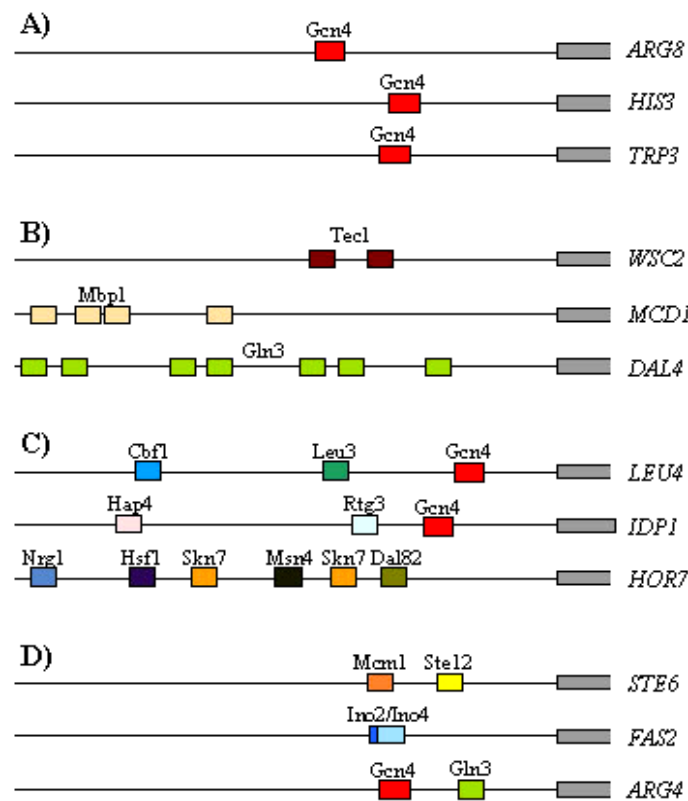


Figure I.13- Yeast promoter architectures. (A) single regulator, (B) repetitive motifs, (C) multiple regulator, and (D) co-occurring regulators. Architecture of the promoters shown has been simplified for the illustration and the scale is approximate. (Adapted from Harbison *et al.*, 2004).

I.5.1.2- Promoter binding behaviour

Binding of the transcriptional factors to these promoter sequences is dependent on the environmental conditions of the cell. Genome-wide binding experiments for some regulators under multiple cell-growth conditions (Harbison *et al.*, 2004) have shown different binding behaviours:

- (i) condition-invariant, regulators bind essentially the same set of promoters.
- (ii) condition-enabled, regulators do not bind the promoters under one condition, but bind a substantial number of promoters with a change in the environment.
- (iii) condition-expanded, regulators bind a core set of target promoters under one condition but bind an expanded set of promoters under another condition.
- (iv) condition-altered, regulators exhibit a preference for a set of promoters bound in different conditions.

I.5.2- Zinc finger proteins

Transcription factors have been grouped in different families depending on their DNA binding domains (DBD). Different known DBDs are: (i) helix-loop-helix (Robinson and Lopes, 2000), (ii) helix-turn-helix (Gehring *et al.*, 1994), (iii) high mobility group (HMG) box (Laudet *et al.*, 1993), (iv) basic region-leucine zipper (bZIP) (Vinson *et al.*, 1989), (v) MADS box (Shore and Sharrocks, 1995), (vi) TEA domain (Burglin, 1991), (vii) heat shock transcription factor (HSTF) (Jakobsen and Pelham, 1991) and, (viii) zinc finger proteins (Klug and Rhodes, 1987; Todd and Andrianopoulos, 1997).

Zinc finger proteins represent the largest and most diverse family of nucleic acid binding proteins in eukaryotes. It has been estimated that up to 10% of genes in the human genome may encode proteins with zinc finger domains (Hoovers *et al.*, 1992). Their main characteristic is that all of them possess a domain with one or more atoms of zinc bound by histidine or cysteine stabilizing the structure and contributing to the protein function. Zinc finger proteins are also involved in many other physiological roles, including mediating protein-protein interactions, chromatin remodelling, protein chaperoning, lipid binding, and zinc sensing (Laity *et al.*, 2001). Of the DNA-binding variety, three major classes of zinc finger proteins have been established in eukaryotes, based on their highly conserved consensus amino acid sequences (Table I.5).

Table I.5- Classes of eukaryotic zinc finger proteins

ZINC FINGER CLASS	CONSENSUS AMINO ACID SEQUENCE
I – C ₂ H ₂	Cys-X ₂₋₄ -Cys-X ₁₂ -His-X _{3,5} -His
II- C ₄	Cys-X ₂ -Cys-X _n -Cys-X ₂ -Cys-X _n -Cys-X ₂ -Cys-X _n -Cys-X ₂ -Cys
III- C ₆	Cys-X ₂ -Cys-X ₆ -Cys-X ₅₋₁₆ -Cys-X ₂ -Cys-X ₆₋₈ -Cys

Class I zinc finger proteins (C_2H_2) present the classical zinc finger structure (Wolfe *et al.*, 2000). It is one of the most common types of transcriptional factors found in eukaryotes, usually containing two or more repeating zinc finger units. Each unit consists of a conserved amino acid sequence that interacts with one zinc atom and binds to nucleic acids as monomers (Laity *et al.*, 2001). Examples of this kind of transcriptional factors are Msn2p and Msn4p in *S. cerevisiae* (Martinez-Pastor *et al.*, 1996; Estruch, 2000).

Class II represents the C_4 zinc fingers. These proteins usually contain one zinc finger unit binding to DNA as homodimers or heterodimers consisting in two C_4 proteins. GATA transcription factors are members of this subfamily (Urnov, 2002).

Class III zinc finger proteins (C_6) consists in six cysteine residues coordinating two atoms of zinc. They are strictly fungal proteins unlike C_2H_2 zinc finger, leucine zipper and helix-loop-helix, which are utilized by a much more diverse array of organisms (Krajewska, 1992). They are also referred to as zinc cluster, zinc binuclear cluster or $Zn(II)_2Cys_6$ proteins. The best studied zinc cluster protein is the *S. cerevisiae* Gal4p transcrional factor (Pan and Coleman, 1990).

I.5.3- Zinc cluster proteins $Zn(II)_2Cys_6$

This group of transcriptional factors have been found in several fungi such as *S. cerevisiae* (Pan and Coleman 1990; Akache *et al.*, 2001), *A. flavus* (Woloshuk *et al.*, 1994), *A. nidulans* (Ascone *et al.*, 1997), *A. niger* (Todd *et al.*, 1997), *Fusarium solani* (Li and Kolattukudy, 1997), *Kluyveromyces lactis* (Breunig and Kuger, 1987), *Neurospora crassa* (Yuan *et al.*, 1991) and *Schizosaccharomyces pombe* (Tang *et al.*, 1994), and also in *C. albicans*, all of them containing the well-conserved motif $Zn(II)_2C_6$.

I.5.3.1- General structure

Zinc cluster proteins, like most transcription factors, contain several functional domains apart from the cysteine-rich DBD (Fig. I.14), including the regulatory and activation domains.

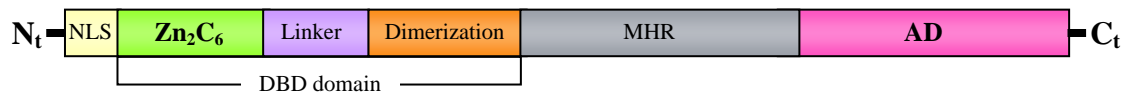


Figure I.14- General structure of yeasts zinc cluster proteins. Zinc cluster proteins contain four main functional domains. The nuclear localization signal (NLS) that drive the protein into the nucleus. The DNA binding domain (DBD) usually made up of three subregions: the zinc finger (Zn_2C_6), the linker and the dimerization domain. These three subregions contribute to specific DNA-protein binding and protein-protein interactions. The middle homology region (MHR) is involved in regulation. The activation domain (AD) mediating an individualized role in each zinc cluster protein. (Adapted from MacPherson *et al.*, 2006)

I.5.3.1.1- Nuclear localization signal (NLS)

To carry out their functions as transcriptional regulators, zinc cluster proteins must be transported to the nucleus.

Some transcriptional factors are permanently located in the nucleus, and they can remain bound to their promoters in an inactive state until they are activated by an effector (Harbison *et al.*, 2004). However, some others reside in the cytoplasm and are only imported to the nucleus under specific conditions.

Nuclear import of transcriptional factors generally proceeds via soluble transport receptors that bind to specific nuclear localization signals (NLSs) on their substrates and translocate them across the nuclear membrane through nuclear pores complexes (NPCs) (Nikolaev *et al.*, 2003).

I.5.3.1.1.1- Classical NLS

NLSs usually consist of one or two short stretches of basic amino acid residues (Nakielnny and Dreyfuss, 1999). Nuclear import is initiated by binding of the importin α/β heterodimer to the NLS cargo protein. The resultant heterotrimeric complex is recruited to the nuclear pore complex by interaction of importin β with NPC components and subsequent translocation to the nuclear compartment mediated by a small Ras-related GTP binding protein. Once transported, the importin heterodimer is dissociated, the cargo protein released into the nucleus and the transport proteins recycled back to the cytoplasm (Nikolaev *et al.*, 2003).

I.5.3.1.1.2- Non-conventional NLS

In the last few years different signals have been identified providing evidences of the existence of alternative nuclear import pathways. It is supposed that all of them are mediated by importin β -related receptors that can bind directly to NLS-like sequences in their cargoes. The complex form may be driven into the nucleus through NPCs (Nakielny and Dreyfuss, 1999).

I.5.3.1.2- DNA binding domain (DBD)

The characteristic DNA binding domain of zinc cluster proteins contains the highly conserved Cys-X₂-Cys-X₆-Cys-X₅₋₁₆-Cys-X₂-Cys-X₆₋₈-Cys pattern which was first described in *S. cerevisiae* by Pan and Coleman (1990). The entire DBD is separated into three regions: the zinc finger, the linker and the dimerization region (MacPherson *et al.*, 2006).

I.5.3.1.2.1- Zinc finger structure (Zn(II)₂Cys₆)

This structure is responsible for the binding of the transcriptional regulator to the promoters of the genes to be regulated. This interaction is usually produced via major-groove contacts.

The metal binding portion of the DBD presents two substructures, each containing three cysteine residues commonly surrounded on both sides by basic amino acids and joined by a region of variable length. Together, these form a pair of short alpha-helices, between which are nestled two zinc atoms bound and bridged by a total of six cysteine residues (Pan and Coleman, 1990). Mutagenic studies have revealed the importance of the six cysteine residues in DNA binding and protein function (Todd and Andrianopoulos, 1997) and also of a conserved proline in the loop between the two substructures that provides flexibility (Marmorstein *et al.*, 1992).

The cysteine-rich DBD is usually located at the N terminus of the protein. However, two C-terminal zinc cluster proteins have been characterized till now: *S. cerevisiae* Ume6p, involved in regulation of meiosis, and *C. albicans* Czf1p (Anderson *et al.*, 1995; Whiteway *et al.*, 1992).

I.5.3.1.2.2- Linker region

The linker region is located at the C-terminus of the zinc cluster motif. It can present different sequences and structures. No similarities among linker regions in different zinc cluster proteins have been found, suggesting a role in contributing to DNA-binding specificity. Moreover, changing the linker region from one DBD to another affects DNA targeting (Reece and Ptashne, 1993).

I.5.3.1.2.3- Dimerization domain

This region is the last element within the DBD. The dimerization domain consists in heptad repeats similar to those found in leucine zippers (Schjerling and Holmberg, 1996).

These heptad repeats form a highly conserved coil-coiled structure which is involved in dimerization and protein-protein interactions (Marmorstein *et al.*, 1992). However, some zinc cluster proteins do not present this dimerization domain suggesting that they bind to DNA as monomers.

I.5.3.1.3- Regulatory domain (MHR)

This region displays low homology among most members within this protein class. It is located in the middle of the protein, between the DBD and the activation domain and it was designated by Schjerling and Holmberg (1996) as the middle homology region (MHR).

Although is not always present, is a very common motif in zinc cluster proteins. Several works have shown that the deletion of the MHR often renders zinc cluster proteins constitutively active, suggesting a role in regulating the transcriptional activity of these proteins (Schjerling and Holmberg, 1996).

I.5.3.1.4- Activation domain (AD)

Most often C-terminally located, an acidic domain acts as an activation domain, although this is not a conserved domain and its function and/or structure is varied and not well-defined.

Because the activation properties of transcriptional activators cannot easily be recognized by sequence homology (Triezenberg, 1995), several studies tried to identify more general sequence features resulting in a number of different AD classes such as acidic activators (Sadowski *et al.*, 1988; Ptashne and Gann, 1990), glutamine-rich activators (Courey *et al.*, 1989), proline-rich activators (Mermod *et al.*, 1989), serine-rich activators (Van de Wetering *et al.*, 1993). Elevated asparagines levels of activators may indicate a role of an additional amino acid in transcription activation, possibly similar to the closely related amino acid glutamine in glutamine-rich activators (Titz *et al.*, 2006)

In a study performed by Titz *et al.* (2006) a set of 450 transcriptional activators previously identified (Uetz *et al.*, 2000; Ito *et al.*, 2001) was tested for their strength in activating two reporter genes: *HIS3* and β -galactosidase gene. According to these results the proteins were classified in three different groups: (i) strong, (ii) medium, and (iii) weak transcriptional activators. Further studies concerning their abundance, localization and physicochemical properties provided statistical correlations among the activator's strength and their features. In this regard, strong activators are correlated with nuclear localization, low abundance of the protein within the cell, higher molecular mass and low hydrophobicity. Making use of these conclusions the strength of an unknown transcriptional activator can be approximately inferred (Titz *et al.*, 2006).

I.5.3.2- Binding of zinc cluster transcriptional factors

Many proteins of the zinc cluster family bind to sequences containing trinucleotide sequences in single or repeat forms, in either a symmetrical or an asymmetrical format.

I.5.3.2.1- Binding sites

CGG triplets are common, although variations within these binding elements have also been reported (Fig. I.15). Because these highly conserved transcriptional regulators all target similar sequences, several strategies are needed to generate a vast repertoire of binding sites to ensure that the required protein is able to carry out its own specific regulatory task (Lohr *et al.*, 1995; Schjerling and Holmberg, 1996; Todd and Andrianopoulos, 1997).

Two important determinants of DNA-binding specificity are the orientation of the triplets (direct, inverted or everted) and the spacing between trinucleotide sequences. For example, Gal4p binds specifically to inverted CGG triplets spaced by 11 bp (CGG-N₁₁-CCG) (Vashee *et al.*, 1993). Moreover, nucleotides surrounding the CGG triplets also determine DNA-binding affinities to some extent (Noel and Turcotte, 1998).

CGG sequences are recognized by residues within the zinc finger domain. The most studied amino acid responsible for this recognition is a conserved lysine between the second and third cysteines. In some cases this lysine can be substituted by arginine, histidine or proline (Schjerling and Holmberg, 1996).

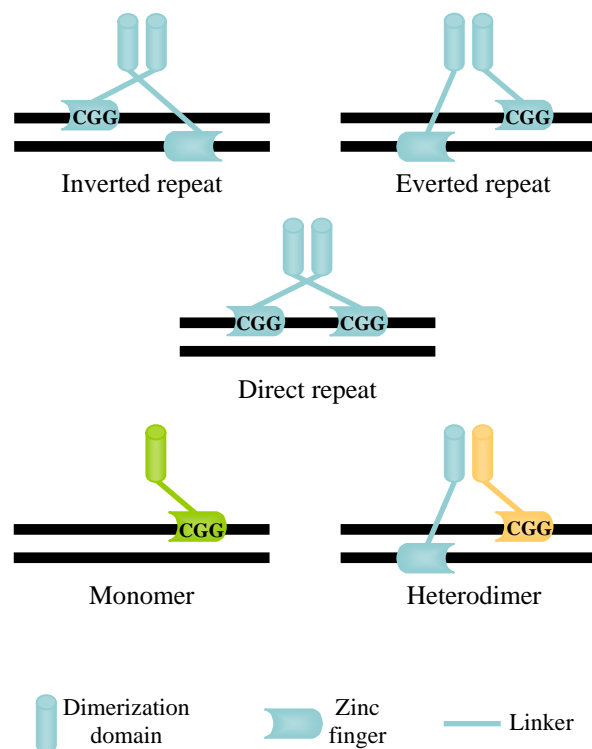


Figure I.15- A model for zinc cluster protein DNA recognition. Zinc cluster proteins preferentially bind to CGG triplets that can be oriented in three different configurations: the inverted, everted and direct repeats. The orientation of CGG triplets and the nucleotide spacing between the triplets are the major determinants of DNA-binding specificity. Zinc cluster proteins can also bind as monomers, homodimers (two molecules in blue) and heterodimers (MacPherson *et al.*, 2006).

I.5.3.2.2- Mechanism of action

A model of action for zinc cluster proteins have been proposed (Schjerling and Holmberg, 1996) integrating the main features described above (Fig. I.16). In this model they suggest that there are four domains in a typical zinc cluster protein that can be involved in DNA binding: (i) the zinc finger, which directly binds the CGG triplet; (ii) a linker region, which determines the length of the spacing between CGG triplets; (iii) several coil-coiled, responsible for dimerization; and (iv) the MHR domain, which lowers binding affinity to no-specific sequences between the CGG triplets.

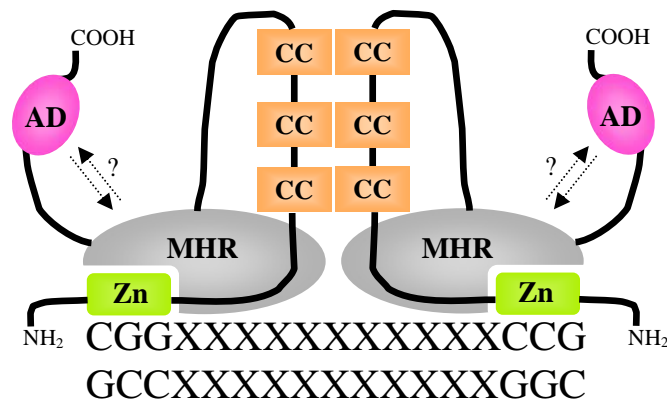


Figure I.16- Model for DNA binding of a prototypic zinc cluster protein. The zinc finger recognizes the CGG triplet. The spacing between the triplets is determined by the length of a linker region. Coil-coiled structures (CC) are responsible for dimerization. The MHR prevents binding to unspecific CGGN_xCGG regions and is also expected to share a, direct or indirect, regulatory role with the activation domain. (Schjerling and Holmberg, 1996).

Zinc cluster transcriptional factors in *S. cerevisiae* can act as (i) monomers, as the zinc cluster protein AlcR of *A. nidulans* (Cahuzac *et al.*, 2001); (ii) homodimers, like Gal4p, Leu2p and Hap1p (Marmorstein *et al.*, 1992; Fitzgerald *et al.*, 2006; Zhang and Guarente, 1994); (iii) heterodimers, with other zinc cluster proteins, like Oap1p and Pip2p, or even with members of other transcriptional factor families, as Arg81p that dimerizes with MADS box proteins (Rottensteiner *et al.*, 1997; Amar *et al.*, 2000). Moreover, it has been shown that zinc cluster transcription factors can not only bind to DNA but also interact with other proteins. Specific transcription activation is mediated by physical contact with the transcriptional machinery or other factors necessary for

transcription, like chromatin remodelling proteins (Koh *et al.*, 1998; Ptashne and Gann, 1997; Stringer *et al.*, 1990).

Like for many transcriptional regulators, a multitude of strategies exists in order to control their transcriptional activity. Some mechanisms employed by zinc cluster proteins to carry out their roles within the cell include nuclear-cytoplasmic shuffling, DNA binding, phosphorylation, and unmasking of the activation domain (Sellick and Reece, 2005; Struhl, 1995).

I.5.4- Zinc cluster proteins in *C. albicans*

In *S. cerevisiae* only 54 proteins contain the consensus sequence (Cys-X₂-Cys-X₆-Cys-X₅₋₁₆-Cys-X₂-Cys-X₆₋₈) described for zinc cluster proteins which may encode putative zinc cluster transcriptional factors (Akache *et al.*, 2001).

Sequence comparison with known zinc cluster transcriptional regulators reveals that some close orthologues exist in *S. cerevisiae* and *C. albicans*. However, few zinc cluster protein in *C. albicans* have been characterized (Table I.6) showing a specific function. Transcriptional factors can act as activators, as repressors, or as both activators and repressors for certain genes in different conditions.

Table I.6- Characterized zinc cluster transcriptional factors in *C. albicans* (Adapted from MacPherson *et al.*, 2006)

GENE	FUNCTION	REFERENCE
<i>CZF1</i>	Hyphal growth regulator	Whiteway <i>et al.</i> , 1992
<i>FCR1</i>	Negative regulator of drug resistance	Talibi and Raymond, 1999
<i>FGR17</i>	Regulator of filamentous growth	Uhl <i>et al.</i> , 2003
<i>FGR27</i>	Regulator of filamentous growth	Uhl <i>et al.</i> , 2003
<i>SEF2</i>	Involved in response to high-iron conditions	Lan <i>et al.</i> , 2004
<i>SUC1</i>	Regulator of sucrose metabolism	Kelly and Kwon-Chung, 1992
<i>TAC1</i>	Activator of multidrug transport	Coste <i>et al.</i> , 2004
<i>UPC2</i>	Activator of ergosterol biosynthesis	MacPherson <i>et al.</i> , 2005
<i>WAR1</i>	Involved in resistance to sorbate	Lebel <i>et al.</i> , 2006
<i>ZNC1</i>	Essential protein of unknown function	Coste <i>et al.</i> , 2004
<i>ZNC3</i>	Essential protein of unknown function	Coste <i>et al.</i> , 2004

I.6- TRANSCRIPTION FACTORS REGULATING CELL WALL ARCHITECTURE IN *C. albicans*

Because the cell wall is a vital structure for *C. albicans*, the response to cell wall damage becomes an interesting subject of study.

Several *C. albicans* transcription factors play a role in the regulation of cell wall components biosynthesis and assembly.

I.6.1- Cas5p

Cas5p is a *C. albicans* C₂H₂ zinc finger transcriptional factor that lacks a unique ortholog in *S. cerevisiae*.

cas5Δ/cas5Δ mutants are hypersensitive to caspofungin, SDS, and Congo red (chemical compounds that alter the plasma membrane and wall) suggesting a role in cell wall structure and integrity (Bruno *et al.*, 2006).

Cas5p plays a major role in the *C. albicans* cell wall damage response since it is required for the correct regulation of caspofungin-induced genes. It is known that some of these genes regulated by Cas5p are Rlm1p dependent in *S. cerevisiae*, suggesting that Cas5p may be the *C. albicans* functional equivalent of *S. cerevisiae* Rlm1p. These results hint that Cas5p could be a target of the PKC-MAPK pathway, although it can also integrate signals from different pathways or even function as a novel pathway in *C. albicans* (Bruno *et al.*, 2006).

I.6.2- Rlm1p

Rlm1p in *C. albicans* is the homolog to that MADS box transcription factor in *S. cerevisiae* where it is the final effector of the CWI pathway (see section I.4.3.1). *RML1* expression is induced by caspofungin in both *S. cerevisiae* and *C. albicans*.

In *S. cerevisiae* Rlm1p resides always in the nucleus and its phosphorylation by Slt2p at two residues within its transcriptional activation domain (Ser427 and Thr439) stimulates its activity (Jung *et al.*, 2002). A genome-wide gene expression analysis revealed that Rlm1p regulates the expression of at least 25 genes, most of them encoding for cell wall proteins or proteins implicated in cell wall biogenesis (Jung *et al.*, 1999).

In *C. albicans*, *rlm1Δ/rlm1Δ* mutants are hypersensitive to caspofungin and Congo red, implicating a conservation of ScRlm1p role in cell wall integrity. Nevertheless, only two Rlm1p-dependent cell wall related genes were found when cells were treated with caspofungin in *C. albicans* (*PGA13*, a GPI cell wall protein and *CRH11* a cell wall glycosyl hydrolase) whereas this transcription factor plays a central role in cell wall damage response in *S. cerevisiae* (Bruno *et al.*, 2006).

I.6.3- Ace2p

In *S. cerevisiae*, Ace2p and the related transcription factor Swi5p control the expression of genes involved in cell wall metabolism (Doolin *et al.*, 2001; Lee *et al.*, 2002). The transition from yeast to hyphae involves changes in cell wall structure and composition, including an increase in chitin levels in hyphae (Munro *et al.*, 1998). Transcription of the only chitinase gene in *S. cerevisiae*, *CTS1*, is regulated by Ace2p, so *ace2Δ/ace2Δ* mutants increase pseudohyphal growth (King and Butler, 1998).

In *C. albicans* a single homologue of *ACE2* and *SWI5* has been identified in its genome as a class I zinc finger protein. Deletion of *CaACE2* results in (i) altered adherence and defective biofilm formation, (ii) reduced expression of one chitinase gene, *CHT3*, and other genes with a potential role in cell wall metabolism, *DSE1* and *SCW11*, and (iii) no virulence in murine model of infection. The reduction in virulence could be caused by changes in the cell wall, which affect the adherence and interaction with host cells (Kelly *et al.*, 2004).

I.6.4- Efg1p

Efg1p is a transcription factor with a basic helix-loop-helix motif (Stoldt *et al.*, 1997). This protein is involved in different morphogenetic processes including chlamydospore formation, phenotypic switching and filamentous growth (Sonneborn *et al.*, 1999a and b; Lo *et al.*, 1997; Stoldt *et al.*, 1997).

Certain cell wall proteins have been reported to represent virulence factors in *C. albicans*. Efg1p plays a major role in the induction and repression of cell wall genes in both yeast and hyphal forms of *C. albicans* by regulating the expression of several cell wall mannoproteins genes such as *HWPI*, *HYR1* and *ALS8* (Braun and Johnson, 2000).

Transcriptional profiling studies of *efg1Δ/efg1Δ*, under different conditions, have revealed that *EFG1* is active under both *C. albicans* morphogenetic states, but that its activity has to be specified to regulate the transcription of the appropriate cell wall genes under the corresponding condition (Sohn *et al.*, 2003; Doedt *et al.*, 2004).

I.6.5- Rim101p

The zinc finger transcription factor Rim101p is crucial for the regulation of genes in response to external pH (Ramon *et al.*, 1999), but the processes involved in pH-specific alteration of cell wall composition in *C. albicans* remain unclear. The transcription factor of two cell wall genes *PHR1* and *PRA1* has been shown to be activated in response to neutral pH in a Rim101p-dependent manner (Davis *et al.*, 2000; Saporito-Irwin *et al.*, 1995; Sentandreu *et al.*, 1998), whereas *PHR2*, encoding a Rim101p-dependent glycosidase with an equivalent function to Phr1p, is present in the cell wall in an acidic environment (Muhlschlegel and Fonzi, 1997).

Transcriptional profiling experiments in *C. albicans* revealed several cell wall genes regulated by Rim101p in response to changes in environmental pH (Lotz *et al.*, 2004).

I.6.6- Bcr1p

Bcr1p is a C₂H₂ zinc finger transcription factor involved in biofilm formation. *bcr1Δ/bcr1Δ* mutant cells form defective biofilms with smaller depth than expected and presenting yeast cells interspersed with few hyphal filaments. However, *BCR1/BCR1* and *bcr1Δ/bcr1Δ* strains produce hyphae in a comparable manner in several hyphae-inducing media under free-living cell growth conditions (Nobile and Mitchell, 2005).

Gene-expression studies of parental and null mutant strain as free-living cells in biofilm-inducing medium have shown that an important set of cell wall related genes presents altered expression in the mutant strain. Among these genes encoding for either cell wall structural proteins or cell wall assembling enzymes were found, but the most important groups presenting lower levels of expression in the mutant strain were (i) genes preferentially expressed during hyphae formation (*HWPI*, *HYR1*, *ECE1*, *RBT5* and *ALS3*), and (ii) genes encoding for different surface adhesins (*ALS1*, *ALS3* and

ALS9). All these results suggest that Bcr1p may activate the expression of hyphae-specific genes in the context of biofilms formation by regulating the expression of several cell wall genes in *C. albicans* (Nobile and Mitchell, 2005).

Little is known at this moment about transcription of cell wall genes, however, the knowledge of these transcriptional regulators has opened new insights into *C. albicans* cell wall structure regulation. Characterization of unknown transcription factors and studies concerning their interactions and mechanisms of action will provide new evidences about the regulatory networks controlling cell wall composition and assembly of the cell wall of the pathogenic fungi *C. albicans*.

II. ANTECEDENTES Y OBJETIVOS

El proyecto de secuenciación del genoma de *S. cerevisiae* permitió la identificación de 55 reguladores transcripcionales que contenían el motivo de unión a ADN de tipo Zn(II)₂Cys₆ (Todd and Andrianopoulos, 1997; Akache *et al.*, 2001). La función reguladora de muchos de estos factores de transcripción todavía es desconocida, sin embargo, las proteínas que han sido estudiadas se han visto implicadas en una amplia variedad de procesos (Todd and Andrianopoulos, 1997).

Estudios fenotípicos realizados por el grupo de investigación del Dr. Bernard Turcotte sobre mutantes de estos factores de transcripción han facilitado una primera aproximación acerca de los procesos celulares que podrían estar regulados por cada uno de estos reguladores de tipo Zn(II)₂Cys₆ (Akache *et al.*, 2001; Akache and Turcotte, 2002). De entre todas las proteínas estudiadas, se han encontrado ocho factores de transcripción (Ylr266p, Yil130p, Ypl133p, Yll054p, Yor380p, Yfl052p, Yer184p, Yor162p) que podrían estar regulando la correcta arquitectura de la pared celular del hongo, como se revela por una mayor sensibilidad a CFW (Akache *et al.*, 2001), un compuesto que interfiere la síntesis de quitina de la pared celular. Uno de ellos, Ypl133p, se ha visto implicado en la regulación de sensibilidad a drogas, ya que la cepa mutante en este factor de transcripción presenta hipersensibilidad a la presencia ketoconazol, un antifúngico que altera la formación de ergosterol de la membrana plasmática de levaduras. A este factor de transcripción de *S. cerevisiae* se le denominó Rds2p (Regulator of Drug Sensitivity) y se ha descrito su implicación en resistencia a drogas (Akache and Turcotte, 2002; MacPherson *et al.*, 2006).

El análisis *in silico* de la secuencia proteica de Rds2p ha revelado que se trata de una proteína de 446 aminoácidos en la que se han encontrado algunas de las características típicas de factores de transcripción de tipo Zn(II)₂Cys₆ (Schjerling and Holmberg, 1996):

- (i) Presencia de un dedo de zinc de tipo Zn(II)₂Cys₆ dentro del dominio de unión a ADN de la proteína entre los aminoácidos 16 y 47.
- (ii) Presencia de un dominio de carácter ácido entre los aminoácidos 356 y 382, que presenta una carga total neta de -6 y que podría constituir el dominio de activación de la proteína.

Sin embargo, otras características estructurales típicas de estos reguladores transcripcionales tales como: las regiones espaciadora y de dimerización del dominio de unión a ADN y la región media de baja homología, no han sido descritas hasta el momento para Rds2p.

El objetivo principal de este trabajo consiste en la identificación de factores transcripcionales de *C. albicans* que puedan estar involucrados en la regulación de la composición y estructura de la pared celular de este hongo patógeno, y cuyo estudio permita un mejor conocimiento de los mecanismos moleculares que modulan la arquitectura de una estructura tan importante como es la pared celular de *C. albicans*.

III. MATERIALES Y MÉTODOS

III.1-MICROORGANISMOS

III.1.1- Levaduras

Las cepas de *C. albicans* utilizadas en este trabajo, así como sus características genéticas y procedencia se detallan en la Tabla III.1.

Tabla III.1- Cepas de *C. albicans*

CEPA	GENOTIPO	PARENTAL	PROCEDENCIA
CNC43	<i>Δura3::λimm434/ Δura3::λimm434</i> <i>Δhis1::hisG/Δhis1::hisG</i> <i>Δarg5,6::hisG/Δarg5,6::hisG</i>	RM1000	Negredo <i>et al.</i> , 1997
3A	<i>Δcwt1::ARG5,6/CWT1</i> <i>Δura3::λimm434/ Δura3::λimm434</i> <i>Δhis1::hisG/Δhis1::hisG</i>	CNC43	Este trabajo
3AH	<i>Δcwt1::ARG5,6/Δcwt1::HIS1</i> <i>Δura3::λimm434/ Δura3::λimm434</i>	3A	Este trabajo
CAI4	<i>Δura3::λimm434/ Δura3::λ:imm434</i>	SC5314	Fonzi and Irwin, 1993
CAI4-URA	<i>Δura3::λimm434/ Δura3::λ:imm434</i> <i>CIp10::URA3::Δura3::λimm434/λΔura3::λimm434</i>	CAI4	Este trabajo
3A-HISURA	<i>Δcwt1::ARG5,6/CWT1</i> <i>CIp20::URA3::Δura3::λimm434/λΔura3::λimm434</i>	3A	Este trabajo
3AH-URA	<i>Δcwt1::ARG5,6/Δcwt1::HIS1</i> <i>CIp10::URA3::Δura3::λimm434/λΔura3::λimm434</i>	3AH	Este trabajo
3BI	<i>Δcwt1::ARG5,6/Δcwt1::HIS1</i> <i>Δura3::λimm434/ Δura3::λimm434</i> <i>pBI-1::URA3::his1::hisG/ his1::hisG</i>	3AH	Este trabajo
3BICWT1	<i>Δcwt1::ARG5,6/Δcwt1::HIS1</i> <i>pBI-CWT1::URA3::his1::hisG/ his1::hisG</i>	3AH	Este trabajo

III.1.2- Bacterias

La cepa utilizada en las reacciones de transformación y posterior obtención de ADN plasmídico fue la cepa de *Escherichia coli* DH5α (Hanahan, 1985) cuyo genotipo es [F,φ80, *lac4M15*, *recA1*, *endA1*, *gyrA96*, *thi⁻¹*, (*rk⁻*, *mk⁻*), *supE44*, *relA1*, *deoR*, *Δ(lacZYA-argF) U169*].

III.2- MEDIOS Y CONDICIONES DE CULTIVO

III.2.1- Cultivo de levaduras

Los medios de cultivo que se utilizaron en el laboratorio para el crecimiento y mantenimiento de *C. albicans* se describen a continuación.

Medio YPD: es un medio rico que contiene todos los nutrientes necesarios para el crecimiento de levaduras. Su composición es:

Glucosa	20 g/l
Peptona	20 g/l
Extracto de levadura	10 g/l

Medio YNB: medio mínimo sintético que se utiliza como medio selectivo para el crecimiento de transformantes que hayan incorporado el gen marcador que complementa una auxotrofia, bien mediante la integración de un plásmido o un casete de interrupción. La composición de este medio es:

Glucosa	20 g/l
Base nitrogenada de levadura sin aminoácidos y sin sulfato amónico	1.7 g/l
Sulfato amónico	5 g/l

En este medio se añadieron los requerimientos nutricionales necesarios (aminoácidos y bases nitrogenadas) partiendo de soluciones madre estériles a las concentraciones descritas por Sherman *et al.* (1986).

Medio SD+4% glucosa: medio mínimo sintético que se utiliza para reprimir la expresión de genes bajo el control del promotor de *PCK1* en cepas que contienen el plásmido pBI-1.

Glucosa	40 g/l
Base nitrogenada de levadura sin aminoácidos y sin sulfato amónico	1.7 g/l
Sulfato amónico	5 g/l

Medio SCAA: medio mínimo que al carecer de glucosa favorece la inducción de la expresión de genes que se encuentran bajo el control del promotor *PCK1* en cepas que contienen el plásmido pBI-1.

Casaminoácidos	20 g/l
Base nitrogenada de levadura sin aminoácidos y sin sulfato amónico	1.7 g/l
Sulfato amónico	5 g/l

Medio de Lee: desarrollado por Lee *et al.* (1975) y modificado por Elorza *et al.* (1988).

Utilizado para la inducción de la miceliación en *C. albicans*.

(NH ₄) ₂ SO ₄	5 g/l
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.2 g/l
K ₂ HPO ₄	2.5 g/l
NaCl	5 g/l
Glucosa	12.5 g/l
Prolina	0.5 g/l
Biotina	1 mg/l

El pH final se ajustó a 6.8 con una solución de NaOH 1M.

Medio RPMI-1640 (Sigma): medio de cultivo comercial que se empleó para filantar las cepas de *C. albicans* en medio líquido.

En los ensayos de filamentación en medio sólido se emplearon distintos medios: medio Lee, medio Spider (Liu *et al.*, 1994), medio YE-Pro y medio YNB suplementado con suero humano; la composición en g/l de los tres últimos se detalla a continuación:

Medio Spider:

Manitol	10 g/l
Caldo nutritivo	10 g/l
K ₂ HPO ₄	2 g/l

Medio YE-Pro:

Extracto de levadura	1 g/l
Prolina	0.1 g/l

Medio YNB-Suero humano: a medio YNB líquido se le añadió suero humano al 10% previamente descomplementado a 68°C.

Los medios de cultivo descritos fueron preparados en agua destilada y esterilizados en autoclave a 120°C durante 20 minutos, excepto el medio RPMI-1640 que se esterilizó por filtración empleando filtros con un tamaño de poro de 0.2 µm.

Los medios de cultivo líquidos se prepararon en matraces Erlenmeyer de vidrio con un volumen de medio de cultivo no superior a un cuarto del volumen total del recipiente. La incubación se realizó a 28°C y 120 rpm en un agitador orbital (Orbi-Safe, SANYO). En los casos en que se quiso inducir la morfología de micelio la temperatura de incubación fue de 37°C. Los medios sólidos contenían agar al 2%.

III.2.2- Cultivo de bacterias

Medio LB (Luria-Bertani): cuya composición es:

Peptona	10 g/l
Extracto de levadura	5 g/l
NaCl	10 g/l

El pH final se ajustó a 7.4 con una solución de HCl 1M.

Medio LB-A: se utilizó para la selección de transformantes, que albergaban plásmidos con el gen de resistencia a ampicilina como marcador, adicionando al medio LB ampicilina a una concentración de 50 µg/ml

Los medios utilizados para el crecimiento de *E. coli* fueron los descritos por Sambrook *et al.* (1989). Los medios se prepararon con agua destilada y fueron esterilizados en autoclave. Los medios sólidos se obtuvieron mediante la adición de agar al 2%.

Los cultivos de las cepas de *E. coli* se incubaron a 37°C en un agitador orbital (Orbi-Safe, SANYO) a 200 rpm.

III.3- TAMPONES UTILIZADOS

Los tampones utilizados en los distintos experimentos, su composición y pH se detallan en la tabla III.2.

Tabla III.2- Composición de tampones utilizados

TAMPÓN	COMPOSICIÓN	pH
5 x SSC	NaCl 1 M / Citrato sódico 0.1 M	7.0
Electroforesis SDS-PAGE	Tris HCl 25 mM / 0.1% SDS / glicina 0.2 M	8.3
Empaquetador	Tris HCl 0.75 M / 0.2% SDS	6.8
LiCl	Tris-HCl 20 mM / LiCl 4M / EDTA 10 mM	7.4
Lisis	Tris HCl 0.1 M / EDTA 20 mM / SDS 1%	7.5
Neutralizante	Tris-HCl 0.5 M / NaCl 1.5 M	7.0
PBS	8 g/l NaCl / 0.2 g/l KCl / 1.44 g/l Na ₂ HPO ₄ / 0.24 g/l KH ₂ PO ₄	7.4
Prehibridación	5x SSC / 50% formamida desionizada / 0.02% SDS / 1% reactivo de bloqueo (Roche) / 0.1% N-laurilsarcosina	7.0
Separador	Tris HCl 0.37 M / 0.2% SDS	8.8
TAE	Tris-acetato 40 mM / EDTA 1 mM	8.3
TBS	Tris-HCl 10 mM / 10% NaCl	7.2
TE	Tris-HCl 50 mM / EDTA 1 mM	8.0
TTBS	Tris-HCl 10 mM / 10% NaCl / 0.1% Tween-20	7.2

III.4- PLÁSMIDOS

Los plásmidos utilizados como vectores de clonación en este trabajo se detallan en la Tabla III.3.

Tabla III.3- Plásmidos utilizados

PLÁSMIDO	USO	REFERENCIA
pGEM-T Easy	Clonación de fragmentos de PCR	Promega
pMOSBlue	Clonación de fragmentos de PCR	GE Healthcare
pAN9	Construcción del casete de interrupción Contiene el gen <i>CaARG5,6</i>	Cedido por A. Negrodo
p34HHIS2	Construcción del casete de interrupción Contiene el gen <i>CaHIS1</i>	Cedido por F. García-Navarro.
CIp10	Integración del gen <i>CaURA3</i> en el locus del gen <i>RPS10</i> en las cepas de <i>C.albicans</i>	Murad <i>et al.</i> , 2000
CIp20	Integración de los genes <i>CaURA3</i> y <i>CaHIS1</i> en el locus del gen <i>RPS10</i> en las cepas de <i>C.albicans</i>	Cedido por A. Brown.
pBI-1	Reintroducción del gen <i>CaCWT1</i> en el locus <i>LEU2</i> de <i>C. albicans</i> .	Stoldt <i>et al.</i> , 1997

Las características de los plásmidos construidos en este trabajo se especifican en la Tabla III.4.

Tabla III.4- Plásmidos construidos

PLÁSMIDO	CARACTERÍSTICAS
pGEM-YIE12	pGEM-T Easy con el inserto YIE12 de 312 pb del gen <i>CaCWT1</i>
pGEM-YIE34	pGEM-T Easy con el inserto YIE34 de 436 pb del gen <i>CaCWT1</i>
pYIE12A	pAN9 con el fragmento YIE12 de 311 pb subclonado entre los sitios de restricción <i>EcoRI</i> y <i>SacI</i>
pYIE12H	p34HHIS2 con el fragmento YIE12 de 311 pb subclonado entre los sitios de restricción <i>EcoRI</i> y <i>SacI</i>
pYIE14A	pYIE12A con el fragmento YIE34 de 436 pb subclonado entre los sitios de restricción <i>SphI</i> y <i>HindIII</i> . Casete de interrupción del gen <i>CaCWT1</i> con el gen <i>CaARG5,6</i>
pYIE14H	pYIE12H con el fragmento YIE34 de 436 pb subclonado entre los sitios de restricción <i>SphI</i> y <i>HindIII</i> . Casete de interrupción del gen <i>CaCWT1</i> con el gen <i>CaHIS1</i>
pMOSCWT1	pMOS que contiene la región codificante del gen <i>CaCWT1</i>
pBI-CWT1	pBI-1 que contiene la región codificante del gen <i>CaCWT1</i> para su sobreexpresión en <i>C. albicans</i> bajo el control del promotor del gen <i>PCK1</i>

III.5- TRANSFORMACIÓN DE CÉLULAS CON ADN

III.5.1- Transformación de bacterias

La transformación de células de *E. coli* se realizó siguiendo el método descrito por Hanahan, (1985) según el cual se requiere un tratamiento previo en el que las células de *E. coli* se hacen competentes para la incorporación de moléculas de ADN foráneo.

III.5.1.1- Obtención de células competentes de *E.coli*

Para la obtención de células competentes se inocularon 100 ml de medio LB con 500 µl de un cultivo en fase estacionaria, y se incubaron a 37°C hasta alcanzar una DO_{600 nm} de 0.5. Las células se recogieron por centrifugación a 7000 xg durante 10 min a 4°C, y se resuspendieron en 50 ml de una solución fría de CaCl₂ 100 mM / MnCl₂ 70 mM / acetato sódico 40 mM, pH 5.5, manteniéndose el conjunto a 4°C durante 45 min. Posteriormente, se recogieron por centrifugación a 7000 xg durante 5 min a 4°C, se resuspendieron en 5 ml de la solución anterior fría y se adicionaron 950 µl de glicerol estéril al 80% para su conservación en alícuotas de 200 µl a -80°C.

III.5.1.2- Transformación de células competentes de *E.coli*

Para realizar la transformación, las células competentes se descongelaron suavemente, manteniéndose en hielo durante 10 min. Una vez descongeladas, se añadieron 100 µl de las células competentes sobre el ADN transformante a 0°C y se mantuvieron en hielo durante 30 min. Pasado este tiempo, las células se sometieron a un choque térmico (5 min a 37°C), e inmediatamente después se pusieron en hielo durante 2 minutos. Mediante este procedimiento las células competentes internalizan el ADN exógeno. Tras el choque térmico, se adicionó 1 ml de LB al tubo con las células transformadas y la mezcla se incubó a 37°C durante una hora, con objeto de que las células transformadas expresaran la resistencia a la ampicilina. Tras ese tiempo, las bacterias se recogieron por centrifugación (5.000 xg, 5 min) y se resuspendieron en 200 µl de LB fresco. La selección de los transformantes se llevó a cabo sembrando la suspensión bacteriana en placas de medio LB-A. Las placas se incubaron a 37°C hasta la aparición de colonias (24 h).

III.5.2- Transformación de células de *C. albicans*.

Para las transformaciones integrativas de *C. albicans* se utilizó el método descrito por Gietz *et. al.* (1992). A partir de un cultivo de YPD crecido durante 16 h a 28°C, se inoculó un matraz con 50 ml de YPD se inoculó con 10^6 células/ml y se mantuvo a 28°C hasta que el nuevo cultivo alcanzaba una concentración de 1.5×10^7 células/ml. Las células se recogieron por centrifugación a 2000 xg durante 10 min, se lavaron con agua destilada estéril, se resuspendieron en 500 µl de LiAc 0.1 M/TE (1:1) y se centrifugaron a 3000xg durante 5 min para ser resuspendidas finalmente a una concentración de 2×10^9 células/ml en LiAc 0.1 M.

A 50 µl de la suspensión celular anterior se le añadieron 20 µg de ADN lineal resuspendido en 10 µl de tampón TE, 10 µg de ADN de esperma de salmón desnaturalizado (10 min a 100° C) y 300 µl de PEG al 40 %. La mezcla se mantuvo 30 min a 30° C y posteriormente 15 min a 42° C. Las células recogidas por centrifugación, se lavaron con TE y se resuspendieron en 200 µl de la misma solución tampón para finalmente ser sembradas en el correspondiente medio de selección. Las placas se incubaron a 28°C hasta la aparición de colonias, normalmente 3 ó 4 días.

III.6- PURIFICACIÓN DE ADN

III.6.1- Obtención de ADN plasmídico de *E.coli*

En la obtención del ADN plasmídico a pequeña y mediana escala, se usó el sistema comercial Flexi Prep (General Electric Healthcare) siguiendo las instrucciones descritas por el fabricante, partiendo de cultivos de 5 o 50 ml según la cantidad de plásmido a obtener.

III.6.2- Obtención de ADN genómico de *C. albicans*

La purificación de ADN genómico de *C. albicans* se realizó siguiendo el método de Fujimura y Sakuma (1993). Se partió de 5 ml de cultivo crecido durante 24 h en YPD o YNB a 28°C; las células fueron recogidas por centrifugación y lavadas con agua destilada estéril. Seguidamente, se resuspendieron en 500 µl de tampón de lisis (Tabla III.2). Las células se rompieron adicionando a la suspensión 0.6 g de perlas de vidrio de 0.45 mm de diámetro (Sigma) y sometiénolas a agitación vigorosa en vórtex 5 veces durante 1 min, con intervalos idénticos de reposo en hielo. Posteriormente se incubaron 10 min a 70°C para inactivar la acción de las DNAsas. A continuación se agitaron rápidamente en vórtex y se adicionaron 200 µl de KAc 5 M y 150 µl de NaCl 5 M y tras agitar nuevamente la mezcla se mantuvo en hielo 20 min.

A continuación, se centrifugaron los tubos a 10000 xg durante 20 min. Al sobrenadante de la centrifugación se le añadió un tercio de volumen de PEG 8000 al 30% en TE y la mezcla se mantuvo en hielo durante 10 min para favorecer la precipitación del ADN genómico. El sedimento se separó por centrifugación a 10000 xg durante 10 min y se resuspendió en 300 µl de agua. Posteriormente se realizaron dos extracciones con fenol:cloroformo:isoamílico (25:24:1) tomándose la fase acuosa que contenía el ADN. El ADN purificado se precipitó con 1/10 volúmenes de NH₄Ac 4 M y 3 volúmenes de etanol absoluto durante 1 h a -70°C. Finalmente se centrifugó, se secó al vacío y se resuspendió en 50 µl de H₂O.

III.7. TRATAMIENTO ENZIMÁTICO DEL ADN

III.7.1- Digestión con endonucleasas de restricción

Las condiciones empleadas para el uso de las enzimas de restricción fueron las recomendadas por las distintas casas comerciales suministradoras (General Electric Healthcare, Promega, Roche). Los ADNs fueron tratados con 5 μ l de RNasa (10 mg/ml) libre de actividad DNasa (General Electric Healthcare) para eliminar el ARN contaminante.

Para realizar digestiones con varias enzimas que requieren diferentes tampones con distintas concentraciones salinas se utilizó el tampón “One Phor All Buffer PLUS” (General Electric Healthcare). Si las enzimas necesitaban diferentes concentraciones de este tampón se adicionó primero la enzima que actuaba con mayor fuerza iónica y, una vez considerada como concluida esta primera digestión, se adicionó la segunda enzima más la cantidad de agua adecuada.

III.7.2- Ligación de ADN con ligasa de T4

Las reacciones de ligación se llevaron a cabo principalmente para subclonar fragmentos de ADN en plásmidos. Los fragmentos de ADN digeridos con enzimas de restricción se mezclaron en la relación molar vector:inserto 1:10. El volumen final de reacción era de 20 μ l, que se añadían a tubos de T4 DNA Ligase Ready to GoTM (General Electric Healthcare) que contenían liofilizadas las cantidades de tampón y enzima T4 necesarios para la reacción. Las reacciones se incubaron a 15°C durante un mínimo de una hora.

III.8- REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA

Las amplificaciones de fragmentos de ADN se realizaron por reacción en cadena de la polimerasa (a partir de aquí PCR, por Polymerase Chain Reaction) utilizando oligonucleótidos específicos flanqueantes de la zona que se deseaba amplificar.

III.8.1- Diseño de oligonucleótidos

Para el diseño de oligonucleótidos específicos se siguieron las recomendaciones de Saiki (1989). Básicamente se tomaron secuencias de 20 nucleótidos, con un 50 % de C y G. Se evitaron secuencias palindrómicas, y se procuró que el oligonucleótido sintetizado tuviera en el extremo 3' la secuencia CC, GG o GC. La secuencia de los oligonucleótidos ya diseñados se introdujo en el programa informático OLIGO para estudiar sus características y confirmar que cumplía con los requisitos citados. En la tabla III.5 se muestran los oligonucleótidos empleados en este trabajo, los nucleótidos subrayados corresponden a secuencias diseñadas para corte de endonucleasas de restricción seleccionadas.

Tabla III.5- Oligonucleótidos utilizados en este trabajo

OLIGONUCLEÓTIDO	SECUENCIA 5'-3'	SITIO DE RESTRICCIÓN DISEÑADO
YIE1	CACAGAATTCCTCCGGAGATAACAGAACCC	<i>EcoRI</i>
YIE2	CACAGAGTCATGGTGGCAACGGTAACGGC	<i>SacI</i>
YIE3	CACAGCATGCTTTTCGACCGGCTTTTAGGGC	<i>SphI</i>
YIE4	CACAAAGCTTCAATGGGGATAAAATTACCC	<i>HindIII</i>
Clp10	GATATCGAATTCACGCGTAG	-
RP10	GTACATTCCTACTCCGTTCG	-
FURA	GACAGTCAACACTAAGACCTATAG	-
RURA	CCAACCAGCATTCTATAACC	-
3781ini-5'	ATGTCTACCATGAGTAC	-
3781int-3'	GTACGGTTGTAGTAAACCTGCC	-
pBICWT1-5	CACAGGATCCATGTCTACCATGAGTACTC	<i>BamHI</i>
pBICWT1-3	TGTGAGATCTCTGCAGCTAAGGATCAATGGG GATAAAATTACCC	<i>BglII</i>
PCKp-stop	ACCACCATCAAATTCCTTG	-

III.8.2- Condiciones de reacción de PCR

Las reacciones de amplificación se realizaron en un termociclador Minicycler™ (MJ Research). Las mezclas de reacción contenían 0.25-2 unidades de DNA polimerasa Taq (General Electric Healthcare) o EcoTaq Plus (Ecogen), en el tampón suministrado por el fabricante. La concentración de dNTPs era de 0.25 mM y la de los oligonucleótidos iniciadores de 0.4 µM. El volumen final de reacción era de 25 µl ó 50 µl en función del experimento. La cantidad de molde empleada para las reacciones era de 10-100 ng.

Los programas de amplificación utilizados constaban de 15-30 ciclos (desnaturalización a 94°C durante 30 seg, hibridación durante 30 seg y extensión de la cadena a 72°C durante un tiempo que depende del tamaño del fragmento a amplificar, generalmente 1 min por cada 1000 pb). La temperatura de hibridación venía especificada en la hoja de síntesis de los oligonucleótidos suministrada por la casa comercial y puede calcularse mediante la fórmula:

$$T^a \text{ fusión} = 2 \times (A/T) + 4 \times (C/T)$$

donde: $T_{\text{hibridación}} = T_{\text{fusión}} - 5^{\circ}\text{C}$.

III.8.3- Transcripción reversa

La transcripción reversa (a partir de aquí RT-PCR) es una reacción que nos permite sintetizar ADN complementario (ADNc) a partir de ARN mensajero mediante la enzima ADN-polimerasa ARN-dependiente. Posteriormente se realiza una PCR sobre el ADN complementario obtenido.

La obtención de ARN total se describe en el apartado III.13. Para la síntesis de la cadena de ADNc, se partió de 5 µg de ARN total empleándose el Oligo(dT) como cebador y la retrotranscriptasa SuperScript First Strand Synthesis System (Invitrogen), según las indicaciones del fabricante.

En la reacción de amplificación se utilizaron 0.5 µg de ADNc como molde para la reacción de PCR. Se emplearon como control oligonucleótidos que amplificasen genes que presentasen intrones en su secuencia para descartar contaminaciones con ADN genómico. Las condiciones de la PCR utilizadas fueron las descritas en el apartado III.8.2.

III.8.3.1- RT-PCR semicuantitativa

El estudio de nivel de expresión de genes se realizó por RT-PCR semicuantitativa. Para ello, el ADNc obtenido tras la reacción de retrotranscripción se sometió a amplificación por PCR con oligonucleótidos específicos del gen a estudiar y

como control, el mismo procedimiento se llevó a cabo utilizando como cebadores específicos de un gen de expresión constitutiva. Durante la reacción de PCR para sintetizar los fragmentos de ADN se tomaron muestras tras distintos ciclos de amplificación y la abundancia de ADN obtenido en los amplicones del gen de interés y del gen control se compararon, permitiendo una cuantificación relativa. La obtención de amplicones por PCR a partir de ARN total de levadura se llevó a cabo como se describe en los apartados anteriores. En la tabla III.6 se especifican los oligonucleótidos utilizados para las reacciones de RT-PCR semicuantitativa.

Tabla III.6- Oligonucleótidos utilizados para las reacciones de RT-PCR semicuantitativa

Gen	SECUENCIAS (5' - 3')	
	Directa	Indirecta
<i>CWH41</i>	CCAATAGTTCATTATTATGGGGACC	GGGGCCATCGTTAATTTCCAATTC
<i>EFB1</i>	ATTGAACGAATTCTTGGCTGAC	CATCTTCTTCAACAGCAGCTTG
<i>IFS2</i>	CCACCAAGACCAGGATCTCC	CGTCTGCAACCACCTGTGG
<i>INO1</i>	GTTAGTCGGTATTGGCGG	GGCACGTTCACTTTGGTTC
<i>IPF8321</i>	CGCGACTATCTTGCTGGAGC	GGAAACCCGCTATCCAGTGC
<i>MET3</i>	GCCTATTCCTACTCCTC	CACGATGAGCTCTATGC
<i>PGA20</i>	GAAATTCTCCACCACTTTATTAGC	GACCAGCAATGGCTGCCAAGC
<i>PGA29</i>	GCTCTGCTCTTGCTACCATCTC	CCAGCAGCACCTTCAAAGTTGG
<i>PGI1</i>	GGCCTCCTTTAAATTAGCTACC	GCGGTATCTTTCCCATCAACTGGC
<i>RBT5</i>	GCTTCAGCTGCTGGTG	GCCTTGGTGGTTTCAGCG
<i>SCW11</i>	GTTTCACCTTCTGAATTGGTCAG	CCGTATGGACCTGGATCTTTCC
<i>YAE1</i>	GCCCCACAACAAAGACAAC	CATTTCAATTCATTCTCCC

III.9- ELECTROFORESIS DE ADN EN GELES DE AGAROSA

La separación de fragmentos de ADN se realizó mediante electroforesis en geles de agarosa. Debido a que el ADN posee una carga neta negativa, éste migra hacia el polo positivo al someterlo a una corriente eléctrica. La movilidad de fragmentos lineales de ADN depende de su tamaño, siendo independiente de la composición en bases. Así pues, la separación de fragmentos de ADN se realizaba en geles de agarosa, grado biología molecular (Roche Diagnostics) en una concentración entre el 0.8 y 1.5%, de acuerdo con las condiciones descritas por Sambrook *et al.*, (1989), en el tampón de electroforesis TAE (Tabla III.2). Las electroforesis se llevaron a cabo horizontalmente en una cubeta con el gel sumergido en el mismo tampón y a un voltaje constante de entre 60 y 90 V.

Antes de realizar la electroforesis, la muestra se mezclaba con una solución de azul de bromofenol al 0.025% y glicerol al 40% en tampón TAE (para visualizar el

frente de la electroforesis y aumentar la densidad de la muestra) en proporción 1:6 (tampón de carga: muestra). Paralelamente se corría una muestra de marcadores de peso molecular conocidos obtenidos mediante la digestión del ADN del fago λ gt11 con los enzimas de restricción *EcoRI* y *HindIII* (Fermentas).

Tras la electroforesis, el gel se teñía sumergiéndolo en una solución de bromuro de etidio (BrEt) 10 μ g/ml durante 10 min, siendo posteriormente visualizado en un transiluminador de luz ultravioleta (360 nm). Las fotografías de los geles se tomaron con un equipo GelPrinter Plus y el análisis de las imágenes se llevó a cabo con el programa ScionImage (TDI, S.A.)

III.10- PURIFICACIÓN DE FRAGMENTOS DE ADN DE GELES DE AGAROSA

Las muestras de ADN que contenían los fragmentos que se querían purificar eran separadas en geles de agarosa de alta resolución (Roche Diagnostics) y utilizando condiciones de electroforesis suaves (voltaje entre 60 y 80 V).

Tras la separación e identificación de los fragmentos a la luz ultravioleta, las bandas de interés fueron recortadas del gel lo más rápidamente posible para evitar posibles alteraciones por la luz ultravioleta. Posteriormente se eluyeron utilizando una resina con afinidad por el ADN (Agarose Gel DNA Extraction Kit, Roche) o un sistema de columnas (Rapid Gel Extraction System, Marligen Biosciences) siguiendo las instrucciones de los fabricantes.

III.11- SECUENCIACIÓN DE FRAGMENTOS DE ADN

Las reacciones de secuenciación se llevaron a cabo con el sistema comercial Taq DyDeoxy Terminator (Applied Biosystems, Inc.) y la secuencia nucleotídica se determinaba en un secuenciador automático Applied Biosystems modelo 373A en el Servicio Central de Soporte a Investigación Experimental (SCSIC) de la Universidad de Valencia. Como cebadores se emplearon oligonucleótidos comerciales y/o específicos, éstos últimos diseñados a partir de las secuencias de los insertos de ADN.

III.12- HIBRIDACIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS

III.12.1- Marcaje no radiactivo de sondas de ADN

Fragmentos de ADN purificados a partir de geles de agarosa fueron marcados no radiactivamente utilizando el sistema comercial DIG DNA Labeling and Detection Kit (Roche) que incorpora digoxigenina-11-dUTP en una reacción catalizada por la subunidad Klenow de la DNA polimerasa de *E. coli* (Roche), de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

Cuando los fragmentos para utilizar como sonda procedían de una reacción de PCR, el marcaje se realizó simultáneamente a la reacción de amplificación incorporando dig-dNTPs marcados a la mezcla de reacción de PCR. Para ello la reacción de PCR se llevó a cabo como se describe en el apartado III.8, pero la mezcla de oligonucleótidos utilizada se sustituyó por el mismo volumen de PCR DIG Labelling Mix, que contenía 2mM dATP/ 2mM dCTP/ 2mM dGTP/ 1.9 mM dTTP/ 0.1 mM DIG-11-dUTP, de modo que durante la amplificación de estos fragmentos, aproximadamente uno de cada 80 nucleótidos incorporados estaba marcado con digoxigenina y podía ser posteriormente detectado por un anticuerpo específico (ver apartado III.12.2.3).

III.12.2- Detección de secuencias específicas de ADN (Southern Blot)

La detección de secuencias específicas de ADN se llevó a cabo utilizando la técnica descrita por Southern (1975) y modificada por Sambrook *et al.* (1989).

III.12.2.1- Separación y transferencia de los fragmentos de ADN

Muestras de ADN, generalmente genómico (20 µg), fueron digeridas con una o varias endonucleasas de restricción; los fragmentos resultantes se separaron de acuerdo a su tamaño en geles de agarosa al 0.8-1.5% en TAE. Una vez teñido el gel y visto que las digestiones habían sido correctas, el gel se lavó dos veces durante 15 min con HCl 0.25 M para depurinizarlo parcialmente y así facilitar su transferencia a la membrana. Después se desnaturalizó con NaOH 0.5 M/ NaCl 1.5 M durante 30 min y se incubó en

tampón neutralizante durante 30 min. Por último se realizó un lavado en el tampón 5xSSC.

El ADN se transfirió por capilaridad a una membrana de Nylon cargada positivamente (Roche). Para la transferencia se utilizó tampón 5x SSC a temperatura ambiente durante 15-20 horas. Transcurrido este tiempo la membrana fue lavada 10 min en 5xSSC para eliminar posibles restos de agarosa y el ADN fue fijado a la membrana por calor (30 min a 120°C).

III.12.2.2- Hibridación ADN/ADN

La hibridación de las membranas se realizó mediante el empleo de sondas marcadas no radiactivamente como se ha descrito en el apartado III.12.1.

Los filtros con ADN cromosómico fueron prehibridados en tampón de prehibridación durante 2 h a 42°C. Pasado este tiempo se retiró la solución de prehibridación y se llevo a cabo la hibridación añadiendo al tubo la sonda marcada, desnaturalizada a 100°C durante 10 min. Los filtros se incubaron 16 h a 42°C. A continuación los filtros se lavaron dos veces con la solución de lavado 2 x SSC / 0.1% SDS durante 5 min a temperatura ambiente y otras dos veces con 0.1x SSC / 0.1% SDS durante 15 min a 68°C, para eliminar el exceso de sonda así como la sonda unida de forma no específica.

Tanto la prehibridación como la hibridación se realizaron en tubos de vidrio siliconizados en un horno de hibridación Hybridizer HB-1D (Techne).

III.12.2.3- Detección de la unión ADN / sonda

La detección de la sonda unida al ADN se realizó mediante un método quimioluminiscente que utiliza anticuerpos Anti-DIG-AP (Roche), anti-digoxigenina acoplados a fosfatasa alcalina, y CSPD como sustrato quimioluminiscente (Roche) siguiendo las instrucciones del fabricante.

III.13- PURIFICACIÓN DE ARN TOTAL DE *C. albicans*

La obtención de ARN total de *C. albicans* se obtuvo siguiendo el protocolo recomendado por el fabricante según indica el reactivo Tripure Isolation Reagent (Roche). Las células crecidas en distintas condiciones fueron recogidas por centrifugación (10 min a 2000 xg) y se les agregó 1 ml del reactivo Tripure Isolation Reagent. La suspensión de células se llevó a microtubos de 2 ml (Sarstedt) que contenían 1 g de perlas de vidrio estériles de 0.45 mm de diámetro (Sigma). Las células se rompieron en un Fast-Prep tras 6 agitaciones de 30 segundos con intervalos alternos de 30 segundos en hielo. Una vez rotas las células se dejaron 5 min a temperatura ambiente, se centrifugaron y el sobrenadante se separó a un nuevo tubo. Se agregaron 400 µl de cloroformo por cada 0.5 ml de sobrenadante separado y se agitaron 15 segundos. Se incubaron 15 min a temperatura ambiente y se centrifugaron a 12000 xg 15 min a 4°C con la finalidad de separar las fases. La fase acuosa se transfirió a un tubo limpio y se adicionó 1 vol. De isopropanol con la finalidad de precipitar el ARN. Se homogeneizó la mezcla y se incubó 10 min a temperatura ambiente. Se recogió el precipitado por centrifugación a 12000 xg durante 10 min a 4°C. Tras eliminar el sobrenadante el precipitado se lavó con 1ml de etanol al 70%, se centrifugó a 4°C a 12000 xg durante 10 min, se eliminó el sobrenadante y el pellet se secó en bomba de vacío durante 10 min. Posteriormente, el ARN se resuspendió en 300 µl de agua adicionada del inhibidor de RNasas DEPC (dietilpirocarbonato) al 0.1% en frío. A continuación se realizó una segunda precipitación del ARN añadiendo a la suspensión anterior 300 µl de tampón LiCl a -20°C durante 12 h. Transcurrido este tiempo, el ARN se separó por centrifugación, se lavó dos veces con etanol 70%, se secó a vacío y se resuspendió en 50 µl de agua adicionada de DEPC.

III.14- CUANTIFICACIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS

Para el cálculo de la concentración y pureza de las muestras de ADN y ARN se empleó un espectrofotómetro GeneQuant II de General Electric Healthcare. Dicho aparato mide las densidades ópticas a 260nm y 280nm simultáneamente, y realiza automáticamente el cálculo de la concentración, empleando la fórmula:

$$\text{Concentración}(\mu\text{g} / \text{ml}) = A_{260\text{nm}} \times \text{factor de conversión}$$

El factor depende del tipo de muestra, siendo 50 para ADN de doble cadena y 40 para el ARN. Asimismo, el aparato estima la pureza de la muestra mediante el cálculo de la relación A_{260}/A_{280} . Muestras puras de ADN y ARN tienen valores cercanos a 1.8 y 2 respectivamente.

III.15- ESTUDIO DEL TRANSCRIPTOMA MEDIANTE MICROMATRICES DE ADN

Las micromatrices de ADN de *C. albicans* fueron fabricadas por la empresa Eurogentec S.A. (Bélgica) en colaboración con el Consorcio Europeo Galar Fungal (www.pasteur.fr/recherche/unites/Galar-Fungal/). Se diseñaron oligonucleótidos para amplificar regiones específicas de cada una de las 6039 posibles ORFs del genoma de *C. albicans*. Los oligonucleótidos diseñados contenían 15 pb de una secuencia universal en el extremo 5' que generaba un producto amino-modificado para la unión covalente a la superficie del portaobjeto. Las sondas amplificadas tenían una media de 300 pb y fueron depositadas por duplicado en el portaobjetos, así como los amplificados de 27 genes usados como control. Para la impresión del portaobjetos se empleó un robot de fabricación de micromatrices ChipWriter Pro (Virtek Vision Intl., Ontario, Canada).

III.15.1- Marcaje del ADNc

La obtención de ADNc etiquetado con los fluoróforos Cy3- o Cy5-dCTP (General Electric Healthcare) se realizó como sigue: a 15 μg de ARN total se le añadió 0.005 pmoles de la mezcla de oligonucleótidos específicos de *C. albicans*, 0.0025 pmoles de oligo(dT) (12-18 mer); 0.5 mM de los nucleótidos dATP, dGTP y dTTP (Sigma); 0.025 mM de dCTP; 0.0375 mM de Cy3- o Cy5-dCTP (General Electric Healthcare); 1 μl de RNasin (Promega); 10 mM DTT (ditiotretol), en el tampón de reacción First-strand buffer (Invitrogen).

La mezcla de reacción fue desnaturalizada a 65°C durante 5 min e incubada 5 min a 42°C, después de los cuales se añadió a la mezcla 300 U de la transcriptasa

reversa Superscript II (Life Technologies/Invitrogen). La reacción de retrotranscripción y marcaje se llevó a cabo a 42°C durante 1.5 h, transcurrido este tiempo se le añadieron 200 U más de la enzima y la reacción se incubó 1h más a 42°C. La acción de la transcriptasa reversa se detuvo añadiendo EDTA 5mM, pH 8.0 y NaOH a una concentración final de 0.5 M. Se incubó 20 min a 65°C y finalmente se añadió ácido acético hasta una concentración de 0.4 M para estabilizar el pH de la mezcla.

III.15.2- Elución, cuantificación y concentración de los ADNc marcados

Para purificar el ADNc marcado, se le añadieron 50 µl de agua, se mezcló con 0.5 ml de tampón PB Plus (Qiagen) y 13 µl de acetato de sodio 3 M, pH 5.2. A continuación se midió el pH de la mezcla cuidando que éste no fuera superior a 7. La muestra fue pasada a través de una columna de Qia-quick (Qiagen) y se centrifugó 1 min a 10000 xg. Se eliminó el eluido y se lavó dos veces con 650 µl de tampón PE (Qiagen). Después de una centrifugación de 1 min para secar la columna, se le añadieron 50 µl de agua precalentada a 42° C y se incubó 3 min a temperatura ambiente. Este paso de elución se repitió con otros 50 µl de agua para aumentar el rendimiento de la elución.

A continuación se cuantificó la eficiencia del marcaje en un espectrofotómetro determinando la cantidad de sonda obtenida (ng de ADNc), la cantidad de fluoróforo incorporado (pmoles de incorporación) y la frecuencia de incorporación (f.o.i) de nucleótidos marcados, utilizando la fórmula:

$$f.o.i = \frac{pmol \text{ incorporación de fluoróforo} \times 324.5}{ng \text{ de cADN}}$$

donde:

pmol incorporación Cy3 = D.O_{550nm} x volumen total ADNc (µl)/ 0.15;

pmol incorporación Cy5 = D.O_{650nm} x volumen total ADNc (µl)/ 0.25;

ng ADNc = D.O_{260nm} x 37 x volumen ADNc (µl).

Se obtienen resultados satisfactorios con una incorporación mínima de 20 pmoles de fluoróforo y una frecuencia de incorporación de 20-50 nucleótidos etiquetados por cada 1000 nucleótidos.

El ADNc etiquetado se concentró con un filtro Microcon-30 (Amicon) mediante centrifugación a máxima velocidad durante 60 seg en microfuga. El volumen final se ajustó a 5 μ l con agua.

III.15.3- Hibridación de las micromatrices de ADN

En los ensayos de hibridación de las micromatrices de ADN se utilizaron 5 μ l de cada ADNc a comparar etiquetados con Cy3- y Cy5-dCTP respectivamente, a los que se añadió 5 μ l de ADN de esperma de salmón (10 mg/ml) previamente desnaturalizado. Se incubó 2 min a 95°C y se enfrió rápidamente en hielo. A las sondas preparadas se añadieron 35 μ l de tampón de hibridación DIG Easy Hyb (Roche). La mezcla de hibridación se colocó entre el portaobjetos, que lleva unidos los amplificadores de cada gen, y un cubreobjetos de plástico. La hibridación se llevó a cabo en cámaras de hibridación (Corning Life Science) en ambiente húmedo dentro de un baño de agua a 42°C durante toda la noche.

Para lavar la micromatriz, se le retiró el cubreobjetos y se incubó a temperatura ambiente en 0.2 x SSC / 0.1 % SDS durante 5 min en agitación, posteriormente en 0.2 x SSC durante 5 min a temperatura ambiente con agitación, y finalmente lavados con agua MilliQ para eliminar el exceso de sales. A continuación fueron secados centrifugando los arrays a 500 rpm en una centrífuga con adaptadores especiales para secar los portaobjetos.

Se hibridaron micromatrices de ADN por triplicado en cada experimento y se realizó un cambio de fluoróforo en el marcaje de los ADNc.

III.15.4- Obtención de imágenes y análisis de resultados

Las micromatrices de ADN fueron escaneadas usando un GenePix Scanner y el programa informático GenePix 1.0 (Axon Instruments). La normalización de los datos y el análisis estadístico se realizó mediante el programa informático GeneSpring versión 7.2 (Silicon Genetics, CA, USA). Se tomaron como diferencias significativas de expresión aquellos valores que presentaran una sobre-expresión o represión de 1.5 veces respecto del control.

III.15.5- Análisis de promotores con RSAT

Los promotores de los genes pertenecientes a los grupos funcionales que presentaban niveles de expresión más significativos en los distintos experimentos de micromatrices de ADN fueron estudiados para identificar posibles motivos de unión para factores de transcripción. Este análisis se realizó en secuencias de 800 pb aguas arriba del codón de iniciación de los genes seleccionados con el programa informático RSAT (<http://rsat.ulb.ac.be/rsat/>).

III.15.6- Estudio del estado celular mediante T-profiler

El análisis de los datos del transcriptoma de los distintos mutantes a lo largo de las distintas fases de crecimiento se relacionó con el estado celular global haciendo uso del programa informático T-profiler (Boorsma *et al.*, 2005). El análisis se llevó a cabo suministrando los datos obtenidos de las micromatrices de ADN al programa informático disponible en línea (<http://www.t-profiler.org>).

III.16- INTERRUPCIÓN GÉNICA EN *C. albicans*

En el método de interrupción génica empleado en este trabajo se parte de una cepa parental que sea auxotrófica para tres nutrientes. De este modo, la interrupción secuencial de los dos alelos del gen de *C. albicans* puede llevarse a cabo haciendo uso de dos casetes de interrupción distintos que contengan como marcadores de selección las regiones codificantes de dos de los nutrientes para los que la cepa parental es auxótrofa. En la primera ronda de transformación, el primer casete se integra interrumpiendo el primer alelo del gen y la cepa mutante en el primer alelo gana una prototrofia. En el segundo paso de interrupción se utiliza la cepa mutante en un alelo que al integrar el segundo casete gana otra prototrofia. Así se obtiene una cepa mutante en los dos alelos del gen y que pasa a ser auxótrofa para un solo nutriente.

En este trabajo la cepa parental utilizada fue CNC43 que es auxótrofa para arginina, histidina y uracilo. La interrupción del primer alelo del gen se llevó a cabo empleando el plásmido pAN9, que contenía como marcador de selección la región

codificante del gen *CaARG5,6*, obteniéndose una cepa mutante heterocigótica auxótrofa para histidina y uracilo. La interrupción del segundo alelo del gen se realizó utilizando el plásmido pHHIS34, que contenía como marcador de selección la región codificante del gen *CaHIS1*, obteniéndose así el mutante homocigótico o mutante nulo, que es únicamente auxótrofo para uracilo.

III.17- ANÁLISIS FENOTÍPICO DE LA CEPA DISRUPCIONADA

III.17.1- Estudio del efecto de calcofluor white, rojo Congo y SDS

Se estudió el efecto de sustancias que afectan específicamente el ensamblaje de la pared celular o la síntesis de sus componentes. Para ello, se ajustó la densidad óptica de cultivos en fase exponencial a $D.O_{600nm}$ 1 y se hicieron diluciones decimales hasta 10^{-5} . A continuación se gotearon 5 μ l de cada dilución en placas de YPD que contenían:

- calcofluor white 0, 20 y 30 μ g/ml
- rojo Congo 0, 200 y 300 μ g/ml
- SDS 0, 100 y 150 μ g/ml

Posteriormente se incubaron durante 48 h a 28°C.

III.17.2- Estudio del efecto de drogas

El método utilizado en este estudio fue igual al descrito en el apartado anterior. Las drogas y concentraciones utilizadas fueron:

- anfotericina B: 0, 3 y 6 μ g/ml
- bleomicina: 0, 10, 25 y 50 μ g/ml
- cerulenina: 0, 4 y 6 μ M
- cicloheximida: 0 y 0.2 μ g/ml
- higromicina B: 0, 150 y 200 μ g/ml
- nistatina: 0, 5, 10 y 12 μ g/ml
- ketoconazol: 0, 0.75 y 1.5 μ g/ml
- quinidina: 0 y 500 μ g/ml
- tunicamicina: 0, 2, 4 y 6 μ g/ml

III.17.3- Sensibilidad a zimoliasa

El ensayo fue realizado siguiendo el protocolo descrito por Van Der Vaart *et al.* (1995) modificado para *C. albicans* (Garcerá *et al.*, 2003). Cultivos de las cepas CNC43, 3A y 3AH en fase exponencial o estacionaria de crecimiento se centrifugaron y ajustaron a una D.O_{600nm} aproximada de 0.6 en tampón Tris-HCl 10mM pH 7.5 conteniendo zimoliasa 20T a una concentración de 100 µg/ml. Las variaciones de D.O_{600nm} fueron seguidas durante 90 min en un espectrofotómetro Graphicord (Shimadzu).

III.17.4- Miceliación en medio sólido

Cultivos de las cepas CAI4-URA y 3AH-URA fueron recogidas y su D.O_{600nm} se ajustó a 1. Se hicieron diluciones decimales seriadas hasta 10⁻⁶ y se plaquearon 100 µl de las diluciones 10⁻⁵ y 10⁻⁶ en placas de los medios de micelación: Lee, YNB-suero humano, YE-Pro y Spider (ver apartado III.2.1).

Las placas se incubaron 7 días a 37°C.

III.18- OBTENCIÓN DE CÉLULAS EN FASE MICELIAL

Inicialmente con el fin de obtener un preinóculo de células levaduriformes, se cultivaron células de *C. albicans*, a 28°C en medio YNB hasta fase exponencial tardía de crecimiento (~ 24 h). En este punto, los cultivos presentaban una concentración aproximada de 5x10⁸ células/ml.

Las células se recogieron por centrifugación 10 min a 2000 xg, se lavaron con tampón PBS y se resuspendieron en medio RPMI-1640 (Sigma), precalentado a 37°C, a una concentración de 5x10⁶ células/ml. Esta suspensión fue incubada durante 4h a 37°C con agitación (250 rpm), durante la cual se tomaron fotografías de las células de las distintas cepas en miceliación para evaluar la capacidad y velocidad de miceliación de éstas.

III.19- ANÁLISIS DEL MEDIO DE CULTIVO

Células de las cepas CNC43 y 3AH, crecidas en fase exponencial y estacionaria, fueron recogidas por centrifugación a 2000 xg durante 10 min. El sobrenadante se volvió a centrifugar en las mismas condiciones y fue dializado durante 72 h frente a agua conteniendo azida sódica al 0.02% (para evitar contaminaciones). Las muestras fueron dializadas y resuspendidas en Tris HCl 50 mM, pH 7.4 conteniendo PMSF 1mM y guardadas a -20° C hasta su utilización.

III.20- OBTENCIÓN DE PAREDES CELULARES

El método seguido para la obtención y purificación de paredes celulares fue el descrito por Pastor *et al.*, (1984) y Valentín *et al.* (1984) para *S. cerevisiae*. Así, las células de *C. albicans* crecidas en forma de levadura se recogieron por centrifugación (8000 xg, 10 min) y se lavaron dos veces con agua y una con PMSF 1 mM. A continuación, se procedió a su rotura balística con perlas de vidrio de 0.45 mm de diámetro (Sigma) por agitación en vortex durante períodos de 1 min alternando con intervalos de 1 min en hielo, este proceso fue repetido hasta que la rotura fue al menos del 90% de las células, lo que se comprobó mediante observación en un microscopio de contraste de fases. Una vez realizada la rotura, se recuperó el extracto celular separándolo de las perlas de vidrio por decantación.

La fracción correspondiente a las paredes celulares se purificó por centrifugación a 2000 xg durante 10 min lavándose posteriormente con PMSF 1 mM hasta que la solución de lavado aparecía limpia.

III.21- SOLUBILIZACIÓN DE COMPONENTES DE LA PARED CELULAR

III.21.1- Tratamiento con dodecil sulfato sódico

Las paredes celulares aisladas (apartado III.20.1.) fueron tratadas con SDS 2% en PMSF 1 mM, a razón de 500 µl por cada 100 mg (peso húmedo) de paredes

purificadas, a 100°C durante 10 min (Valentín *et al.*, 1984). Tras enfriar la muestra, el material

solubilizado se separó de las paredes celulares insolubles por centrifugación 10 min a 2000 xg. Este tratamiento se realizó de nuevo para evitar posibles contaminaciones de proteínas no covalentemente unidas a la pared en posteriores extractos, pero esta vez el material solubilizado se desechó.

Las paredes extraídas se lavaron con PMSF 1mM para eliminar el exceso de detergente y ser sometidas a posteriores tratamientos.

III.21.2- Tratamiento con β -mercaptoetanol (β -ME)

Las paredes celulares aisladas y previamente extraídas con SDS se incubaron en la relación de 5 ml de una solución de β -mercaptoetanol al 2% (v/v) en tampón NH₄Ac 10 mM, pH 6.3 /g de paredes húmedas. El tratamiento se realizó durante 3h a 30°C con agitación. Una vez finalizado el tratamiento, el material solubilizado por el β -ME se separó por centrifugación de 10 min a 2000 xg.

Las paredes extraídas se lavaron con PMSF 1mM para eliminar los restos de β -ME y ser empleadas en otros procesos de solubilización de sus componentes.

III.21.3- Tratamiento con zimoliasa

Las paredes aisladas y previamente extraídas con SDS (apartado III.21.1) y β -ME (apartado III.21.2) fueron digeridas en la relación de 1 ml de solución de zimoliasa 20T (1 mg/ml) en PMSF 1mM / g pared húmeda, durante 3 h, a 30°C y con agitación suave. En ocasiones se añadió al tratamiento una mezcla de inhibidores de proteasas (Protease Inhibitor Cocktail, Sigma) 50 μ l/g de pared húmeda. La fracción solubilizada se separó por centrifugación a 2000 xg durante 10 min. Puesto que las proteínas de pared celular son glicoproteínas de elevado peso molecular, el extracto obtenido se dializó durante 48 horas frente a agua (con cambios periódicos de agua) empleando membranas con tamaño de poro que permitían la salida de proteínas del extracto de hasta 12kDa. Una vez dializados los extractos se liofilizaron y se concentraron para su posterior análisis.

III.22- SEPARACIÓN DE PROTEÍNAS EN GELES DE SDS-POLIACRILAMIDA (SDS-PAGE)

Los materiales proteicos obtenidos en los diferentes tratamientos fueron analizados mediante electroforesis en geles de SDS-poliacrilamida, según la técnica descrita por Laemmli (1970) de electroforesis vertical entre placas de vidrio.

Para ello se emplearon geles separadores de poliacrilamida al 10% (relación de acrilamida:bisacrilamida de 30:0.2) preparados en tampón de separación. Los geles de empaquetamiento se prepararon en tampón empaquetador y una concentración de acrilamida del 6 %. A las muestras a analizar (10 µg de proteína en un volumen de 10 µl) se les adicionaron 7 µl de una solución solubilizadora que contenía glicerol al 40 %, SDS al 8 %, β-mercaptoetanol al 20 % y azul de bromofenol al 0.001 % en tampón Tris HCl 0.25, pH 6.8. Antes de ser cargadas en el gel fueron desnaturalizadas por calentamiento 10 min a 100° C.

El tampón utilizado para la electroforesis SDS-PAGE se describe en la tabla III.2. Las muestras se empaquetaron a un voltaje constante de 100 V, realizándose el resto del proceso a 200V.

Como patrón de peso molecular en la separación de especies proteicas por SDS-PAGE se empleó BenchMark Pre-Stained Protein Ladder (Invitrogen) que consiste en 10 proteínas de pesos moleculares aparentes entre 10 y 190 kDa.

III.23- TRANSFERENCIA Y DETECCIÓN DE PROTEÍNAS EN SOPORTES DE NITROCELULOSA (Western-blot)

III.23.1- Transferencia a membrana de nitrocelulosa

Las proteínas separadas mediante SDS-PAGE fueron transferidas y retenidas en membranas de nitrocelulosa (Hybond C extra, Amersham Pharmacia Biotech). Para ello los geles y las membranas fueron sumergidos 10 min en el tampón de transferencia (Tris 25 mM, glicina 192 mM, pH 8.3 y metanol al 20 %). Los geles se pusieron en contacto con los soportes de nitrocelulosa y se introdujeron en una cubeta Mini Protean

II (Bio-Rad) donde se realizó la transferencia aplicando una corriente constante de 100 V durante 1 h a 4°C. (Burnette, 1981; Towbin *et al.*, 1979). Una vez transferido el material proteico a la membrana de nitrocelulosa, se procedió a la detección de especies proteicas como se describe a continuación.

III.23.2- Inmunodetección de proteínas en soportes de nitrocelulosa

El primer paso en la detección fue el bloqueo de las membranas con leche desnatada en polvo al 5 % en tampón TTBS, a temperatura ambiente, durante 1 h y en agitación suave. Tras esta etapa las membranas se lavaron 30 min con tampón TTBS.

A continuación las membranas con las proteínas fijadas fueron incubadas con diferentes anticuerpos específicos. La dilución (en tampón TTBS) a la que se emplearon los anticuerpos primarios y el tiempo de incubación de cada uno es variable en función de las características del anticuerpo utilizado en cada caso. El anticuerpo policlonal PAbL se utilizó en dilución 1:1000 durante una hora. El anticuerpo policlonal Anti- β -1,6-glucano se utilizó en dilución 1:10000 durante una hora.

Después los filtros se lavaron 30 min con TTBS y se incubaron 20 min a temperatura ambiente con una dilución 1/10000 del segundo anticuerpo (IgG de cabra anti-inmunoglobulina de conejo acoplada a peroxidasa , Bio-Rad). Posteriormente las membranas se lavaron varias veces con TTBS y una vez con TBS, procediéndose a continuación al revelado.

El método de revelado empleado fue la quimioluminiscencia, se utilizó la técnica de ECL (Lumi-light western blotting substrate, Roche) que está basada en la oxidación del luminol por acción de la peroxidasa en presencia de un potenciador (fenol) capaz de aumentar hasta 1000 veces la luz emitida por el luminol oxidado. Las proteínas son detectadas por su unión a anticuerpos conjugados directa o indirectamente a peroxidasa. Se eliminó el exceso de tampón TBS de la membrana y se incubó entre dos plásticos transparentes 1 min con los líquidos de revelado 1 y 2 del kit comercial Lumi-light western blotting substrate (Roche) en una relación 1:1. Posteriormente se eliminó el exceso de líquido de la membrana y se expuso un tiempo variable sobre una película de autorradiografías MXB Film (Kodak). Finalmente, se reveló la película que mostró las bandas del antígeno reconocido por el anticuerpo en un equipo Curix 60 (AGFA).

III.24- CUANTIFICACIÓN DE MACROMOLÉCULAS

Con el fin de determinar la concentración de las distintas macromoléculas presentes en las fracciones subcelulares, extractos de pared, o en los medios de cultivo se realizó un análisis de la composición de polímeros de estas muestras.

En el caso de cuantificaciones de macromoléculas en pared celular se partió de paredes extraídas con SDS (ver apartado III.21.1).

III.24.1- Determinación de proteína total

La cuantificación de proteína total se realizó por el método de Bradford (Bradford, 1976).

Las proteínas de la muestra fueron extraídas con NaOH 1 M durante 30 min a 100°C. A continuación se separó la fracción proteica por centrifugación y el sobrenadante se utilizó para llevar a cabo la cuantificación. La muestra fue diluida en un total de 800 µl a los que se les añadieron 200 µl de una dilución (1:4) del reactivo de Bradford (Bio-Rad) en agua. Transcurridos 10 min se leyó la $D.O_{595nm}$ de las muestras y los resultados se interpolaron en una curva patrón de cantidades conocidas de BSA (entre 0 y 20 µg de proteína).

Para cuantificar las proteínas secretadas por *C. albicans* al medio de cultivo, se precipitaron las glicoproteínas del medio de cultivo con 20 volúmenes de propanona a -80°C antes de la cuantificación.

III.24.2- Determinación de polisacáridos

III.24.2.1- Determinación de azúcares no-reductores

Se utilizó la técnica descrita por Dubois *et al.* (1956), que básicamente consiste en: a 2 ml de la suspensión problema, conteniendo entre 10 y 80 µg de azúcar, se añadieron 50 µl de una solución de fenol al 80% y a continuación, se adicionaron rápidamente 5 ml de ácido sulfúrico concentrado (95.5%). La mezcla se agitaba y se

dejaba reposar 30 min a temperatura ambiente. El color desarrollado se determinaba midiendo la $D.O_{490nm}$ y los valores obtenidos se interpolaban en una curva patrón realizada con distintas cantidades conocidas de glucosa (desde 0 a 100 μ g de glucosa).

III.24.2.2- Determinación de β -glucanos

Se utilizó el método descrito por Dijkgraaf *et al.*, 1996. Las muestras a cuantificar se trataron 3 veces consecutivas con 1 ml de NaOH 4 % durante 1 h a 75°C, Se lavaron las muestras con 1 ml de tampón Tris-HCl 0.1 M, pH 7.5. Se resuspendieron en 1 ml de zimoliasa 20T 1 mg/ml en tampón Tris-HCl 10 mM, pH 7.5 y se digirieron 12 h a 37°C. Las digestiones resultantes se centrifugaron a 10000 xg, 15 min y se tomaron 400 μ l para valorar los glucanos totales (β -1,6-glucano y β -1,3-glucano), los 600 μ l restantes se dializaron 48 h frente a agua.

Las concentración de glucano en cada de las fracciones se determinó por el método de Dubois (ver apartado III.24.2.1). La cantidad de β -1,6-glucano en la muestra corresponde al valor de azúcar después de dializar, mientras que el valor del β -1,3-glucano se halla restando el valor del β -1,6-glucano al valor correspondiente a los glucanos totales (antes de dializar).

III.24.2.3- Determinación de manano

La cuantificación de manano se realizó utilizando el método de precipitación de azúcares reductores con reactivo de Fehling.

Para ello, extractos de pared celular se hidrolizaron con 1 ml de NaOH 4% a 75°C durante 1 h y los componentes solubles de la pared, entre los que se encuentra el manano, se separaron por centrifugación. El sobrenadante obtenido se precipitó con 500 μ l de reactivo de Fehling (Solución de Fehling I: Solución de Fehling II (1:2); siendo solución I, 7% $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ y solución II, 3.4% tartrato de sodio y potasio tetrahidrato ($C_4H_4KNaO_6 \cdot 4H_2O$) en 10% NaOH) durante 45 min a 4°C. El precipitado azul obtenido se disolvió en 500 μ l de HCl 1M y se volvió a precipitar con 2 ml de reactivo de Fehling durante 2 h. El precipitado obtenido se recogió por centrifugación, 5 min a 12000 rpm, y se resuspendió en 500 μ l de HCl 0.5 M y la manosa contenida en la solución se valoró por el método de Dubois (ver apartado III.24.2.1).

III.24.2.4- Determinación de quitina

Se empleó el método descrito por Kapteyn *et al.*, 2000. Las muestras se trataron con 1 ml de HCl 6 N en ampollas de vidrio cerradas y se incubaron durante 12 h a 100°C. Pasado este tiempo se abrieron las ampollas y se pusieron en una estufa a 65°C, para que se evaporara el HCl. Una vez evaporado el HCl, las muestras hidrolizadas se resuspendieron en 1 ml de agua.

A 100 µl de la suspensión obtenida, se le añadieron 100 µl de una solución 1.5 N Na₂CO₃ / acetilacetona al 4 %, se incubó a 100°C durante 20 min. Posteriormente se le añadieron 700 µl de etanol al 96 %, dejando la reacción 1 h a temperatura ambiente. Por último se le añadió 100 µl de una solución 1:1 de HCl y etanol absoluto al 2.7 % de p-dimetilaminobenzaldehído. La mezcla se dejó incubar a 70°C hasta que el precipitado formado se hidrolizó completamente.

Se midió la D.O_{520nm}, comparándose los datos obtenidos con una curva patrón realizada con concentraciones conocidas de N-acetilglucosamina (de 0 a 200 µg).

III.25- MARCAJE DE PARED CELULAR EN CÉLULAS ENTERAS

III.25.1- Tinción de células con concanavalina A

En este experimento se partió de cultivos en fase exponencial y estacionaria a 28°C en YNB a los que se añadió el volumen necesario de una solución de Concanavalina A acoplada a fluoresceína (ConA-FITC) para conseguir una concentración final de 0.2 mg/ml. La mezcla se incubó 30 min a temperatura ambiente con agitación suave. Las células tratadas se lavaron 4 veces con tampón PBS estéril y se prepararon para su observación al microscopio de fluorescencia.

IV. RESULTADOS

IV.1- IDENTIFICACIÓN DE POSIBLES FACTORES DE TRANSCRIPCIÓN DEL TIPO Zn(II)₂Cys₆ EN *C. albicans*

La secuenciación del genoma completo de *C. albicans*, por la Universidad de Standford, <http://www-sequence.stanford.edu/group/candida>, ha permitido la creación de una base de datos en la que están representados todos los genes de este organismo. El Proyecto Europeo: *Novel approaches for the control of fungal diseases*, en el cual participó nuestro grupo de investigación, realizó la anotación del genoma de *C. albicans* (d'Enfert *et al.*, 2005), <http://www.pasteur.fr/CandidaDB>, generando las *Individual Protein Files* (IPFs) en las que se incluyen las ORFs (pautas abiertas de lectura) de todos los genes de *C. albicans*.

En el presente trabajo se realizó una búsqueda en la base de datos del genoma de *C. albicans* con el fin de seleccionar aquellas IPFs que codificasen para posibles factores transcripcionales del tipo Zn(II)₂Cys₆. En este rastreo se utilizó como patrón de búsqueda la secuencia CysX₂CysX₆CysX₅₋₁₆CysX₂CysX₆₋₈Cys típica de unión a ADN en levaduras (Vallee *et al.*, 1991). De este modo se identificaron 70 ORFs, especificadas en la (Fig. IV.1), que contenían la secuencia aminoacídica que corresponde a este motivo, entre ellas las correspondientes a los genes *SUC1* (Kelly y Kwon-Chung, 1992), *FCR1* (Talibi y Raymond, 1999) y *CZF1* (Whiteway *et al.*, 1992). En el genoma completo de *S. cerevisiae* se han identificado 54 proteínas de tipo Zn(II)₂Cys₆ (Akache *et al.*, 2001).

Otras similitudes fuera del dedo de zinc se han encontrado entre las proteínas de tipo Zn(II)₂Cys₆ identificadas en *C. albicans* y *S. cerevisiae*, como se expone a continuación.

Un análisis global con el programa informático PSORTII (Horton y Nakai, 1997) de las proteínas de tipo Zn(II)₂Cys₆ encontradas mostró la presencia de una teórica señal de localización nuclear para cada una de estas proteínas (Tabla IV.1).

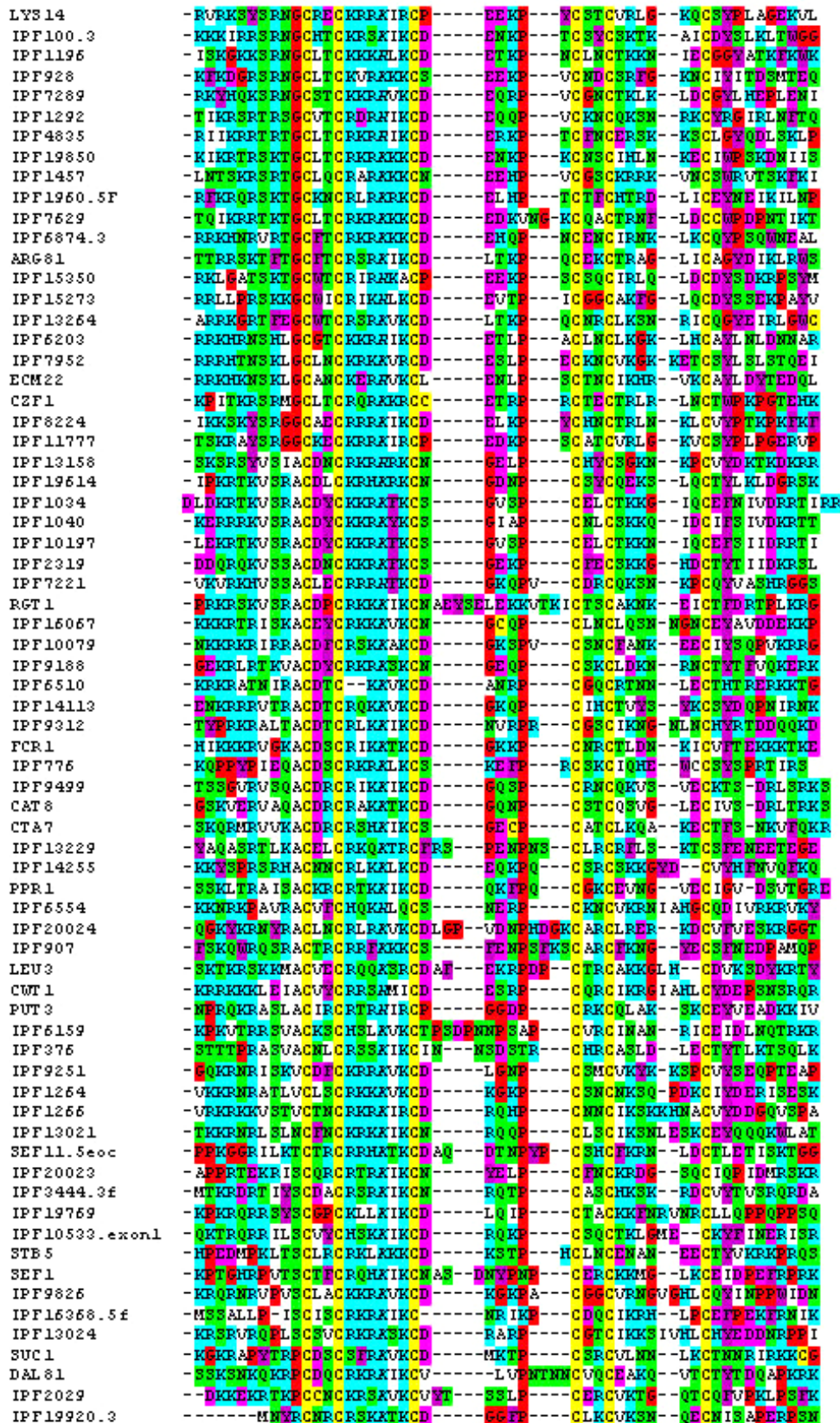


Figura IV.1- Alineamiento de la regiones Zn(II)₂Cys₆ encontradas en proteínas de *C. albicans*. El código de colores es: Amarillo y negrita, Cys; azul, Arg, His y Lys (residuos que establecen contacto específico con ADN resaltados en cursiva negrita); blanco, Ala, Met, Val, Leu y Ile; rosa, Glu y Asp; violeta, Phe, Tyr y Trp; verde, Gln, Ser, Asn y Thr; rojo, Gly y Pro.

La presencia de elementos responsables de dimerización (coil-coiled) fue analizada entre estas 70 ORFs (Tabla IV.1) con los programas informáticos: (i) COIL (Taylor y Zhulin, 1999) para conocer la probabilidad de dimerización de las proteínas debido a una estructura super-enrollada y (ii) el programa desarrollado por Lupas *et al.*, (1991) que identifica secuencias de siete aminoácidos (heptadas) y les asigna la probabilidad de verse involucrados en dominios super-enrollados dependiendo de las secuencias adyacentes. Estos análisis mostraron que la presencia teórica de motivos de dimerización en posición C-terminal al dedo de zinc es bastante frecuente para este tipo de proteínas.

Tabla IV.1- Resumen de los datos obtenidos para las proteínas de tipo Zn(II)₂Cys₆ en *C. albicans*. Ct representa la última cisteína en posición Carboxilo-terminal.

NOMBRE ORF	LOCALIZACIÓN NUCLEAR (%)	ULTIMA Cys	PROBABILIDAD DE SUPERENROLLAMIENTO >0.9 (EN 150 RESIDUOS)		
			2 HEPTADAS	3 HEPTADAS	4 HEPTADAS
IPF16368.5f	94.1	36	+	+	+
IPF19850	94.1	45	-	-	-
IPF15350	94.1	Ct	NA	NA	NA
IPF10079	94.1	45	-	-	-
SEF11.5eoc	56.5	59	-	-	+
LYS14	4.3	67	-	-	-
IPF15273	87.0	Ct	NA	NA	NA
IPF14113	69.6	61	-	-	-
ECM22	82.6	143	+	+	+
IPF11777	95.7	60	-	-	-
IPF6159	73.9	86	+	+	+
IPF1034	94.1	42	-	-	-
IPF13264	31.8	44	+	+	-
RGT1	69.6	125	-	-	-
IPF14255	78.3	Ct	NA	NA	NA
ARG81	52.2	135	+	-	-
IPF19920.3	13.0	31	-	-	-
IPF1040	100.0	43	-	-	-
IPF9312	21.7	267	-	-	-
IPF13021	65.2	121	-	-	-
IPF7629	87.0	84	-	-	-
IPF19614	43.5	57	-	-	-
IPF10197	21.7	41	+	-	-
IPF13024	82.6	61	-	-	-
IPF6874.3	21.7	51	-	-	-
CAT8	65.2	80	+	+	+
IPF8224	65.2	71	-	-	-
IPF6510	65.2	141	-	-	-
SEF1	73.9	120	+	+	+
IPF9188	52.2	52	+	+	+
IPF16067	43.5	93	+	+	+
IPF9499	69.6	58	+	+	+

NOMBRE ORF	LOCALIZACIÓN NUCLEAR (%)	ULTIMA Cys	PROBABILIDAD DE SUPERENROLLAMIENTO >0.9 (EN 150 RESIDUOS)		
			2 HEPTADAS	3 HEPTADAS	4 HEPTADAS
IPF19769	21.7	97	+	+	+
IPF13158	26.1	39	-	-	-
CWT1	78.3	79	-	-	-
CTA7	73.9	201	-	-	-
IPF9826	43.5	67	+	+	+
IPF3444.3f	0.0	37	+	-	-
PUT3	69.6	57	+	+	+
IPF10533.exon1	65.2	74	+	+	+
IPF13229	65.2	74	-	-	-
CZF1	73.9	Ct	NA	NA	NA
IPF9251	39.1	39	+	+	-
IPF6203	82.6	155	-	-	-
IPF7289	65.2	141	-	-	-
IPF7221	73.9	48	-	-	-
LEU3	65.2	112	+	+	-
IPF2319	17.4	57	+	+	+
IPF7952	43.5	46	-	-	-
STB5	22.2	66	-	-	-
IPF6554	95.7	48	-	-	-
PPR1	69.6	62	+	-	-
IPF1196	69.6	55	-	-	-
IPF1457	87.0	78	-	-	-
IPF2029	69.6	45	+	+	-
IPF20023	43.5	68	+	-	+
IPF20024	60.9	78	-	-	-
DAL81	65.2	149	-	-	-
IPF776	69.6	50	+	-	-
IPF1960.5f	65.2	44	-	-	-
SUC1	47.8	39	-	-	-
IPF1264	69.6	50	+	+	+
IPF1266	47.8	59	+	+	+
IPF1292	65.2	46	-	-	-
IPF376	11.1	43	-	-	-
FCR1	82.6	52	+	+	-
IPF928	21.7	101	+	+	-
IPF907	39.1	55	+	-	-
IPF4835	56.5	Ct	NA	NA	NA
IPF100.3	21.7	70	-	-	-

Además, se realizó una análisis de las secuencias aminoacídicas globales de las proteínas de tipo $Zn(II)_2Cys_6$ en *C. albicans* con el fin de encontrar motivos que pudieran estar implicados en la regulación y activación de los factores transcripcionales teóricos. El análisis informático con SCANPROSITE (Gattiker *et al.*, 2002) reveló la existencia de diferentes motivos en las secuencias peptídicas de esta familia de proteínas (Fig. IV.2) normalmente localizados cerca del extremo C-

terminal. Los motivos más comúnmente encontrados fueron: (i) regiones ricas en glutamina, que podrían facilitar su unión a otras proteínas por puentes de hidrógeno (Courey y Tjian, 1988), como se ha descrito para otros factores de transcripción (Aro *et al.*, 2001); (ii) regiones ricas en prolina, cuyo plegamiento da lugar a una estructura pequeña que permitiría el contacto de la proteína con la maquinaria transcripcional sin impedimentos estéricos (Mermod *et al.*, 1989); (iii) regiones ricas en residuos de histidina, serina y treonina; (iv) dominios con cremallera de leucinas, que son bastante frecuentes en *S. cerevisiae* (Fernandes *et al.*, 1997) y *C. albicans* (Yang *et al.*, 2001) y que pueden estar implicados en procesos de dimerización (Busch y Sassone-Corsi, 1990) y finalmente se identificó la presencia de un dominio PAS (Per, Arnst, Sim) un motivo conservado de 100-120 aminoácidos (Taylor y Zhulin, 1999), en dos de las ORFs analizadas (*CWT1* e *IPF6554*); se ha sugerido que este dominio PAS podría estar involucrado en diversos procesos, entre ellos la transducción de señal en eucariotas o la formación de dímeros (Taylor y Zhulin, 1999).

IV.2- SELECCIÓN DE *CWT1* (*IPF3781*) PARA EL PRESENTE TRABAJO

Tras el análisis *in silico* de la base de datos de *C. albicans* y la elaboración de una tabla con todas las ORFs que codifican para posibles factores de transcripción de tipo Zn(II)₂Cys₆, se seleccionó una de ellas como objeto del presente trabajo. La IPF seleccionada fue la *IPF3781* (*orf19.5849*), a partir de aquí llamada Cwt1p, que presentaba una homología alta con la proteína Rds2p (ORF YPL133c) de *S. cerevisiae*. El motivo de esta elección fue que la cepa que carece de la proteína Rds2p en *S. cerevisiae* es sensible a la acción de CFW (Akache *et al.*, 2001) lo que indicaba que Rds2p podría estar involucrada en la arquitectura de la pared celular. Este hecho resultó bastante interesante ya que nuestro grupo de investigación ha estado durante años dedicado al estudio de la pared celular de levaduras.

Utilizando los programas informáticos CLUSTALW y Boxshade 3.31 se realizó un alineamiento de las secuencias aminoácidas de Cwt1p de *C. albicans* con Rds2p de *S. cerevisiae* con el fin de obtener el grado de homología entre ambas (Fig. IV.3).

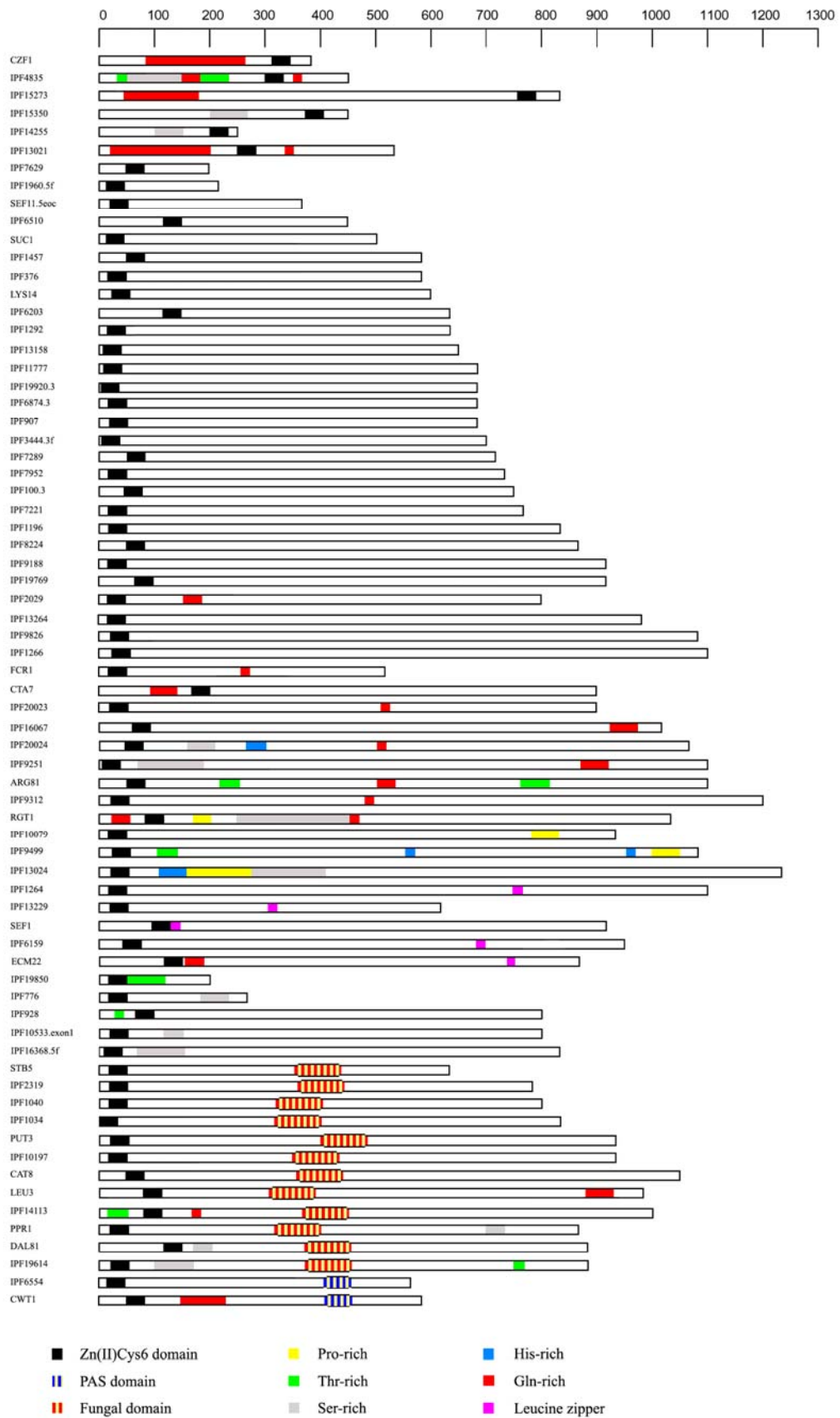


Figura IV.2.- Representación de los motivos estructurales más frecuentemente encontradas en los teóricos factores de transcripción de tipo $Zn(II)_2Cys_6$ en *C. albicans*.

De este modo se observó una homología del 49% entre ambos productos proteicos cuando la comparación se hacía con la secuencia completa. Sin embargo, si se hacía un alineamiento parcial de los 350 aminoácidos finales del extremo carboxilo-terminal de las proteínas, la homología era del 82%, indicando que *CWT1* era el gen homólogo a *RDS2* en *C. albicans*.

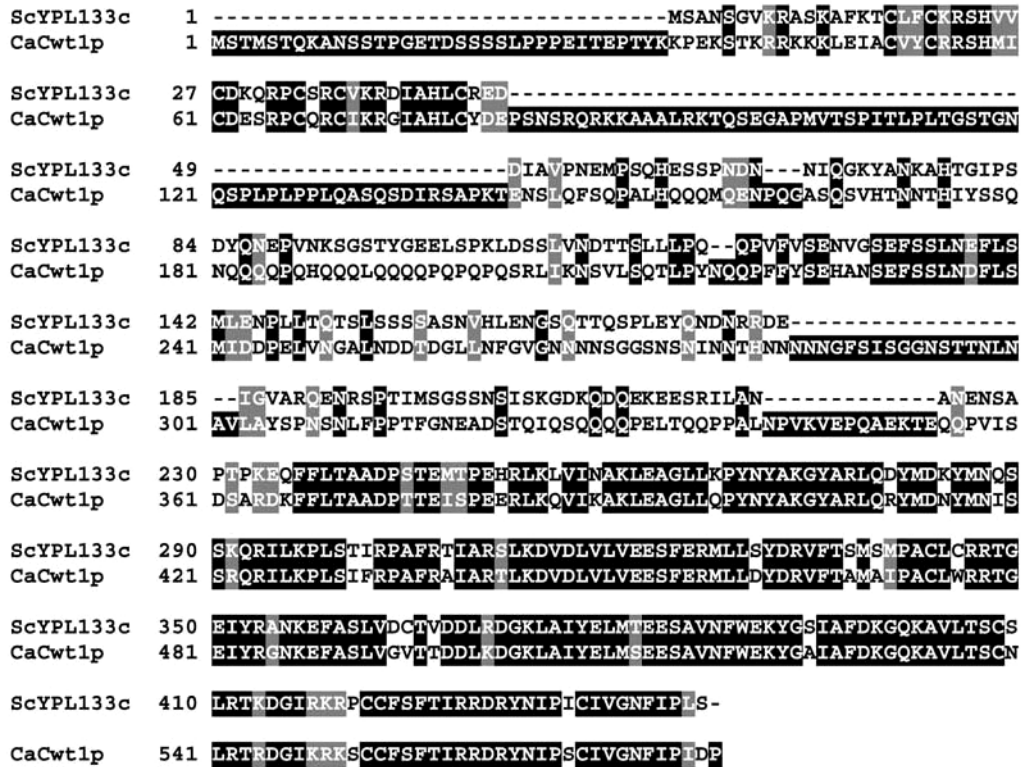


Figura IV.3- Alineamiento de las secuencias aminoacídicas de las proteínas Cwt1p de *C. albicans* y Rds2p de *S. cerevisiae*. Los residuos idénticos se presentan sombreados en negro y los residuos de carácter conservado sombreados en gris. Los guiones representan espacios realizados para optimizar el alineamiento.

IV.3-ANÁLISIS DEL TEÓRICO FACTOR DE TRANSCRIPCIÓN Cwt1p

IV.3.1- Análisis de la secuencia de aminoácidos

El gen *CWT1* codifica un polipéptido con una masa molecular teórica de 64.7 kDa y un punto isoeléctrico de 8.33. La composición de aminoácidos de la proteína Cwt1p se detalla en la tabla IV.2.

La proteína se compone de 578 aminoácidos, de los cuales 340 son de carácter polar y 238 son de carácter apolar. Además entre los aminoácidos con carga se encuentran 65 aminoácidos ácidos y 91 aminoácidos básicos, lo cual es importante para conformar la estructura secundaria de la proteína.

Tabla IV.2- Composición de aminoácidos de la proteína Cwt1p.

Aminoácido		Número	% mol/mol	% w/w
Ala	A	37	6.40	4.39
Arg	R	32	5.54	7.42
Asn	N	43	7.44	7.56
Asp	D	26	4.50	4.61
Cys	C	11	1.91	1.77
Glu	E	31	5.36	6.07
Gln	Q	50	8.65	9.73
Gly	G	26	4.50	2.60
His	H	8	1.38	1.65
Ile	I	30	5.19	5.24
Leu	L	48	8.30	8.38
Lys	K	31	5.36	6.03
Met	M	11	1.91	2.18
Phe	F	21	3.63	4.62
Pro	P	43	7.44	6.59
Ser	S	56	9.69	7.84
Thr	T	35	6.05	5.56
Trp	W	2	0.35	0.54
Tyr	Y	17	2.94	4.10
Val	V	20	3.46	3.12

El análisis de la secuencia peptídica con el programa informático PSORT reveló la existencia de los dominios y características que se detallan a continuación y en la figura IV.4.

- (i) En el extremo amino-terminal (aminoácidos 35-47) se encontró una señal de localización nuclear (Hicks y Raikhel, 1995). El análisis de la secuencia mediante el programa PROSITE indica una localización nuclear de la misma (78.3% de probabilidad).
- (ii) Presencia de un dominio de unión a ADN típico de hongos del tipo $Zn(II)_2Cys_6$ (Pan y Coleman, 1990) entre los aminoácidos 50 y 82.

```

1 M S T M S T Q K A N S S T P G E T D S S S S L P P P E I T E
      * * *
31 P T Y K K P E K S T K R R K K K L E I A C V Y C R R S H M I
      * * *
61 C D E S R P C Q R C I K R G I A H L C Y D E P S N S R Q R K
      * * *
91 K A A A L R K T Q S E G A P N V T S P I T L P L T G S T G N
      * * *
121 Q S P L P L P P L Q A S Q S D I R S A P K T E N S L Q F S Q
      * * *
151 P A L H Q Q Q M Q E N P Q G A S Q S V H T N N T H I Y S S Q
      * * *
181 N Q Q Q Q P Q H Q Q Q L Q Q Q Q P Q P Q P Q S R L I K N S V
      * * *
211 L S Q T L P Y N Q Q P F F Y S E H A N S E F S S L N D F L S
      * * *
241 M I D D P E L V N G A L N D D T D G L L N F G V G N N N N S
      * * *
271 G G S N S N I N N T H N N N N N G F S I S G G N S T T N L N
      * * *
301 A V L A Y S P N S N L F P P T F G N E A D T S Q I Q S Q Q Q
      * * *
331 Q P E L T Q Q P P A N L P V K V E P Q A E K T E Q Q P V I S
      * * *
361 D S A R D K F F L T A A D P T T E I S P E E R L K Q V I K A
      * * *
391 K L E A G L L Q P Y N Y A K G Y A R L Q R Y M D N Y M N I S
      * * *
421 S R Q R I L K P L S I F R P A F R A I A R T L K D V D L V L
      * * *
451 V E E S F E R M L L D Y D R V F T A M A I P A C L W R R T G
      * * *
481 E I Y R G N K E F A S L V G V T T D D L K D G K L A I Y E L
      * * *
511 M S E E S A V N F W E K Y G A I A F D K G Q K A V L T S C N
      * * *
541 L R T L D G I K R K S C C P S F T I R R D R Y N I P S C I V
      * * *
571 G N F I P I D P

```

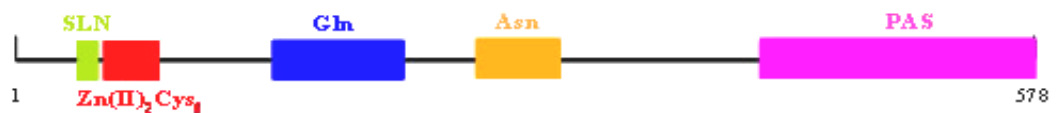


Figura IV.4- Secuencia aminoacídica de la proteína Cwt1p. Verde: Señal de localización nuclear; rojo: dominio $Zn(II)_2Cys_6$; azul: región rica en Gln; naranja: región rica en Asn; violeta: dominio PAS. Los aminoácidos marcados con *, • y ° indican sitios de fosforilación por protein quinasa C, casein quinasa II y protein quinasa dependiente de cAMP y cGMP, respectivamente.

- (iii) Región rica en residuos de glutamina (aminoácidos 147-220) similar al dominio rico en glutaminas de otros factores de transcripción, como por ejemplo el factor transcripcional ACEII de *Trichoderma reesei* (Aro *et al.*, 2001).
- (iv) Región rica en residuos de arginina (aminoácidos 261- 310).
- (v) Dominio PAS en el extremo carboxilo-terminal (entre los aminoácidos 423 y 578).

Las zonas de la proteína que muestran mayor homología con la proteína Rds2p de *S. cerevisiae* son aquellas que contienen los dominios Zn(II)₂Cys₆ y PAS, por lo que probablemente son estos dominios los responsables de las funciones específicas de estas dos proteínas homólogas.

IV.3.1.1- Dominio Zn(II)₂Cys₆

Experimentos de mutagénesis en otros factores de transcripción conocidos que poseen el motivo Zn(II)₂Cys₆ han demostrado que este dominio participa en la unión de la proteína al ADN (Todd y Andrianopoulos, 1997), por lo que el dedo de zinc presente en la proteína Cwt1p podría tener la misma función. Con la finalidad de averiguar si la proteína Cwt1p tiene una estructura adecuada para unión a ADN se realizó una modelización del dominio Zn(II)₂Cys₆.

Para poder predecir la estructura terciaria de la proteína se realizó una modelización teórica por homología con otras proteínas cristalizadas cuya estructura tridimensional ha sido resuelta por difracción de rayos X o por análisis de resonancia magnética nuclear (RMN).

El plegamiento del dominio Zn(II)₂Cys₆ de Cwt1p se predijo por homología con el dominio de unión a ADN Cyp de la proteína Hap1p de *S. cerevisiae* (entrada en PDB: 1PYC) utilizando los programas informáticos JIGSAW y 3D-PSSM para obtener el modelo y posteriormente se utilizó el programa informático Rasmol para generar la estructura tridimensional de la secuencia aminoacídica. En la figura IV.5 se muestra la estructura de Cwt1p que pertenece a la familia de proteínas conocidas como *cluster* de zinc. Está formado por estructura secundaria de α -hélice y caracterizado por la presencia de dos átomos de zinc coordinados por los átomos de azufre de las seis cisteínas presentes en el dominio.

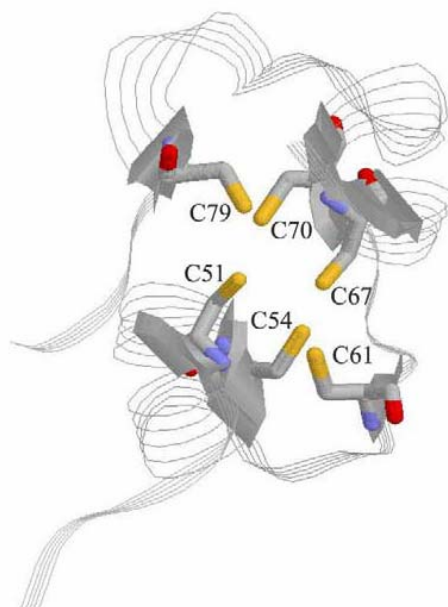


Figura IV.5- Representación esquemática del dominio $Zn(II)_2Cys_6$ de Cwt1p. La estructura tridimensional se dedujo a partir del motivo Cyp de la proteína Hap1p de *S. cerevisiae*. Oxígeno, nitrógeno y azufre se muestran coloreados de rojo, azul y amarillo respectivamente.

IV.3.1.2- Dominio PAS

El plegamiento del dominio PAS de la proteína Cwt1p (Fig.IV.6) se estudió del mismo modo que el motivo $Zn(II)_2Cys_6$, por homología con un modelo de estructura conocida. En este caso se utilizó como modelo el dominio FixL de un sensor de tipo PYP de *Rhizobium meliloti* (entrada en PBD: 1ew0).

En el análisis de la estructura del dominio PAS se encontraron dos subdominios. El subdominio N-terminal (aminoácidos 472-507) tiene una gran cantidad de residuos conservados con motivos PAS de otras proteínas (Zhulin *et al.*, 1997), por lo que parece ser el núcleo del dominio o “PAS core”. Esta región del dominio está formada por dos láminas β (A_β y B_β) y tres α -hélices (C_α , D_α y E_α). El subdominio encontrado en posición C-terminal (aminoácidos 543-578) está formado únicamente por estructuras en lámina- β (G_β , H_β y I_β) cuya principal función es el mantenimiento de la estructura tridimensional del motivo PAS.

Entre ellos se encuentra una zona poco conservada (aminoácidos 508-542) cuya función es la unión de ambos subdominios y que presenta una estructura secundaria helicoidal.

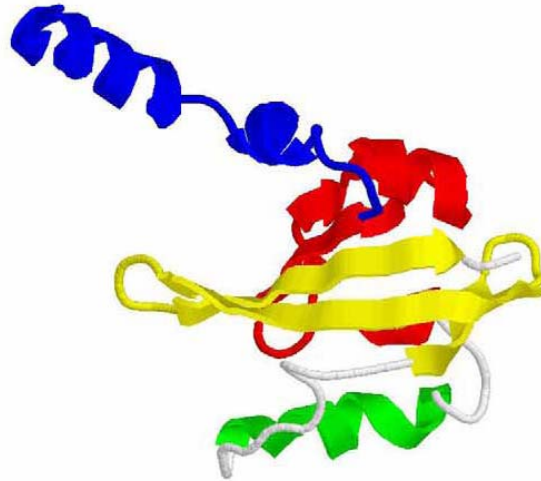


Figura IV.6- Representación esquemática del dominio PAS de Cwt1p. El plegamiento del dominio se modeló por homología con el dominio FixL del sensor PYP de *Rhizobium meliloti*. El subdominio N-terminal se muestra en azul, el “PAS core” en rojo, el conector helicoidal en verde, y el subdominio C-terminal en amarillo.

Los dominios PAS conocidos hasta el momento se han relacionado funcionalmente con la transducción de señal en eucariotas. En hongos se han descrito algunas estructuras PAS que actúan como activadores transcripcionales (Taylor y Zhulin, 1999).

IV.4- ESTUDIO DE LA EXPRESIÓN DEL GEN *CWT1*

Con el fin de determinar si la expresión de *CWT1* era homogénea a lo largo de la curva de crecimiento o variaba en función de la fase en que se encontrasen las células, regulando la expresión de genes de forma diferencial en distintos momentos del crecimiento celular, se realizó un estudio del patrón de expresión del gen.

Para ello se realizó una curva de crecimiento de la cepa parental CNC43 en YPD a 28°C (Fig. IV.7.A) y se recogieron células a distintos tiempos a lo largo del ciclo de crecimiento.

Se obtuvo ARN de las muestras recogidas y se realizó una RT-PCR para estudiar los niveles de expresión del mensajero del gen *CWT1* en cada tiempo. Se usaron los oligonucleótidos YIE1 e YIE2, que amplifican 312 pb del gen *CWT1*. Como control se utilizaron oligonucleótidos específicos del gen *CaEFB1*, que amplifican un fragmento específico de 526 pb (Maneu *et al.*, 1996). *CaEFB1* tiene una expresión constitutiva a lo largo del ciclo celular. Además posee un intrón, lo que sirve como control para comprobar que no había contaminación de ADN genómico en las muestras, ya que en este caso el amplificado tendría un tamaño de 890 pb.

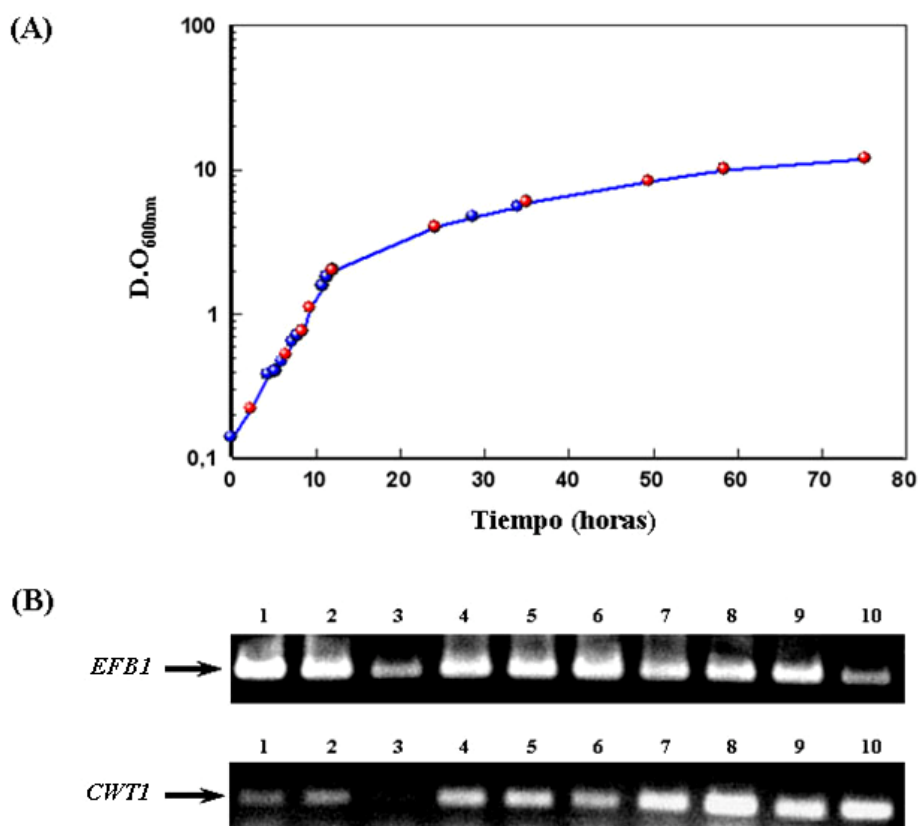


Figura IV.7. Estudio de la expresión del gen *CWT1* en *C. albicans* mediante RT-PCR. (A) Representación de las fases de crecimiento de la cepa CNC43 en YPD. Los puntos rojos representan las muestras de las que se extrajo el ARN para la RT-PCR. (B) Un microgramo de cADN de cada uno de los puntos rojos de la curva se utilizó como molde para la reacción de PCR y los amplificados obtenidos fueron cuantificados tras electroforesis en gel de agarosa.

Las reacciones contenían 1 μ g de cADN cada una y se sometieron a 30 ciclos de amplificación. Los amplificados obtenidos se corrieron en un gel de agarosa al 1% (Fig. IV.7.B).

Se observó que el gen *CWT1* tenía un patrón de expresión diferencial en función de las fases de crecimiento, expresándose mayoritariamente cuando las células alcanzaban la fase estacionaria tardía de crecimiento.

IV.5- DISRUPCIÓN DEL GEN *CWT1*

Tras el estudio de la expresión del gen *CWT1* se procedió a su interrupción para averiguar que consecuencias tenía sobre las células la falta de este hipotético factor de transcripción.

De manera habitual se ha utilizado en nuestro laboratorio la técnica conocida como “Ura-Blaster” (Alani *et al.*, 1987), modificada por Fonzi e Irwin (1993) para la interrupción génica de *C. albicans*. Esta técnica permite la delección secuencial de los dos alelos de un gen utilizando el gen *CaURA3* como marcador. Al utilizarse este único marcador para la selección de transformantes, es necesario recuperar la auxotrofia para uracilo después de cada transformación.

En este trabajo, la disrupción de los dos alelos del gen se realizó en dos pasos, utilizando en cada uno de ellos un casete de interrupción distinto. Para esta técnica se ha realizado la disrupción del gen *CaARG5,6* (Negredo *et al.*, 1997) en la cepa RM1000 con la doble delección *Caura3Δ/Cahis1Δ*, obteniéndose así la cepa CNC43 con triple auxotrofia (*Caura3Δ/Cahis1Δ/Caarg5,6Δ*). Esta técnica presenta la ventaja de que no necesita el paso intermedio de recuperación del marcador que es necesario en el método “Ura-Blaster”. Sin embargo, se hace necesaria la construcción de dos casetes de disrupción diferentes, ya que cada alelo del gen se interrumpirá con un casete que le confiere una prototrofia diferente.

IV.5.1- Construcción de los casetes de interrupción

El primer paso para la interrupción del gen *CWT1* fue la construcción de dos casetes de disrupción. Cada uno de ellos se integraría en un alelo del gen, interrumpiendo el producto génico del mismo.

IV.5.1.1- Construcción del casete de arginina

La construcción de este casete se llevó a cabo introduciendo en el plásmido pAN9, dos fragmentos del gen *CWT1* flanqueando al gen *CaARG5,6* que servirá como marcador de selección (Fig.IV.8).

En la construcción del plásmido que contenía el casete de arginina se realizaron los siguientes pasos:

- 1) Amplificación por PCR de un fragmento de 312 pb utilizando los oligonucleótidos YIE1 y YIE2 (ver Tabla III.5), dando lugar al amplicón YIE12. Estos oligonucleótidos llevan incorporados los sitios de corte *EcoRI* y *SacI* respectivamente, a fin de favorecer posteriormente la clonación dirigida en el plásmido pAN9.
- 2) Amplificación por PCR de un fragmento de 436 pb mediante el empleo de los oligonucleótidos YIE3 y YIE4 (ver Tabla III.5), dando lugar al amplicón YIE34. Los oligonucleótidos incorporan en su secuencia los sitios de corte diseñados *SphI* y *HindIII* respectivamente.
- 3) Clonación de los amplicones YIE12 y YIE34 en pGEM-T Easy, originando los plásmidos pGEM-YIE12 y pGEM-YIE34
- 4) Digestión del plásmido pGEM-YIE12 con las enzimas de restricción *EcoRI* y *SacI*, elución del fragmento de 312 pb y ligación con el fragmento eluido de 6.5 kb correspondiente al plásmido pAN9 digerido con las mismas enzimas. El plásmido originado se denominó pYIE12A. La comprobación se realizó mediante digestión del plásmido pYIE12A con *EcoRI* y *SacI*, observándose la liberación de un fragmento de 312 pb.
- 5) Digestión del plásmido pGEM-YIE34 con las enzimas de restricción *SphI* y *HindIII*, elución del fragmento de 436 pb y ligación con el fragmento eluido de 6.8 kb correspondiente al plásmido pYIE12A digerido con las mismas enzimas y originando el plásmido pYIE14A. Se comprobó la correcta clonación del fragmento mediante su liberación del plásmido pYIE14A por digestión con *EcoRI* y *HindIII*.
- 6) Digestión del plásmido pYIE14A con las endonucleasas de restricción *EcoRI* y *HindIII* que da como resultado un fragmento lineal de 4.4 kb, en las que 908 pb (52%) del gen se han deleccionado, utilizado como casete de interrupción.

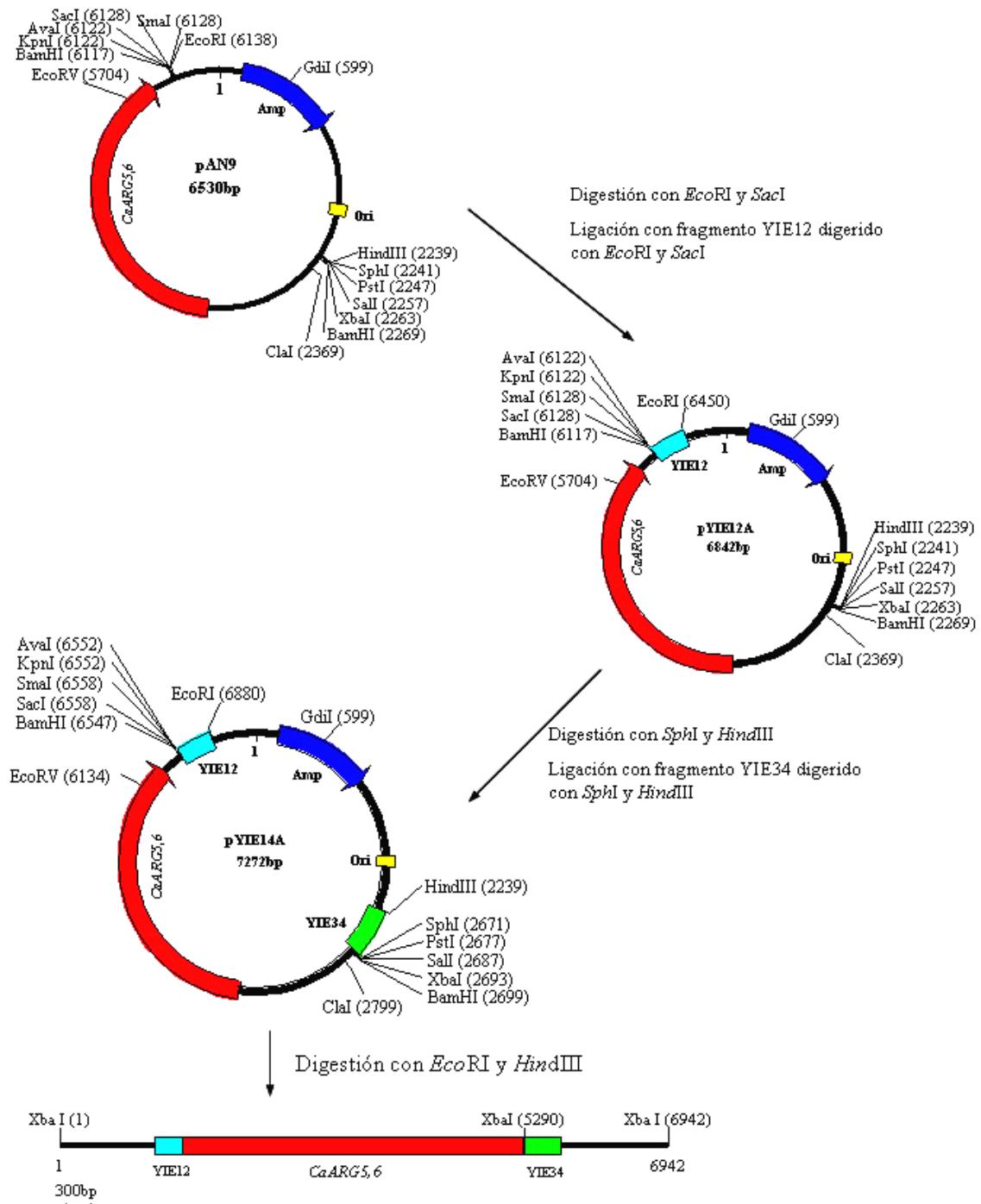


Figura IV.8- Esquema de la construcción del plásmido pYIE14A que contiene el casete de interrupción de arginina para la interrupción de uno de los alelos de *CWT1*.

IV.5.1.2- Construcción del casete de histidina

La construcción de este casete se llevó a cabo introduciendo en el plásmido p34HHIS2 (cedido por el Dr. Navarro-García), dos fragmentos del gen *CWT1* flanqueando al gen *CaHIS1* que servirá como marcador de selección (Fig.IV.9).

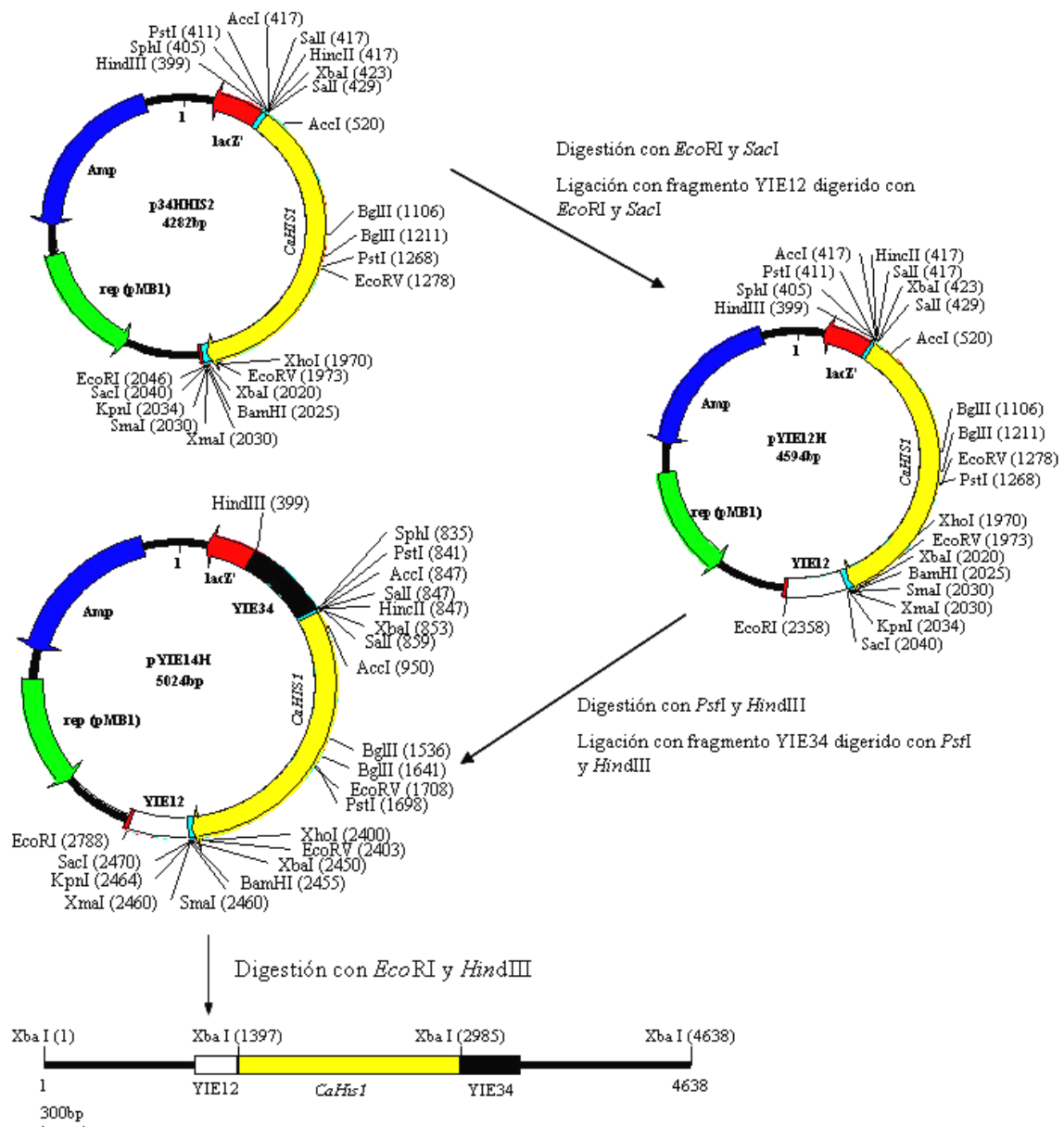


Figura IV.9- Esquema de la construcción del plásmido pYIE14H que posee el casete de interrupción con el gen *CaHIS1* para la interrupción de uno de los alelos de *CWT1*.

En la construcción del plásmido que contenía el casete de histidina se siguieron los mismos pasos que para el casete de arginina e introduciendo los cambios detallados a continuación:

- 1) Digestión del plásmido pGEM-YIE12 (ver apartado anterior) con las enzimas de restricción *EcoRI* y *SacI*, elución del fragmento de 312 pb y ligación con el fragmento eluido de 4.3 kb correspondiente al plásmido p34HHIS2 digerido con las mismas enzimas. El plásmido originado se denominó pYIE12H. la comprobación se realizó mediante digestión del plásmido pYIE12H con *EcoRI* y *SacI*, observándose la liberación de un fragmento de 312 pb.
- 2) Digestión del plásmido pGEM-YIE34 (ver apartado anterior) con las enzimas de restricción *SphI* y *HindIII*, elución del fragmento de 436 pb y ligación con el fragmento eluido de 4.6 kb correspondiente al plásmido pYIE12H digerido con las mismas enzimas y originando el plásmido pYIE14H. Se comprobó la correcta clonación del fragmento mediante su liberación del plásmido pYIE14H por digestión con *EcoRI* y *HindIII*.
- 3) Digestión del plásmido pYIE14H con las enzimas de restricción *EcoRI* y *HindIII* obteniendo como resultado un fragmento lineal de 2.4 kb, en las que 908 pb (52%) del gen han sido deleccionadas, empleado como casete de interrupción.

IV.5.2- Obtención de los mutantes del gen *CWT1* de *C. albicans*

Una vez obtenidos los casetes de disrupción se procedió a transformar la cepa CNC43 (auxótrofa para uracilo, histidina y arginina) como se describe en Materiales y Métodos con el casete de arginina y posteriormente con el de histidina.

Para la deleción del primer alelo del gen se utilizaron, en la transformación de la cepa CNC43, 10 µg del fragmento lineal de ADN que se libera al digerir el plásmido pYIE14A con las enzimas *EcoRI* y *HindIII*. La selección de los transformantes que habían incorporado el casete (protótrofos para arginina) se realizó en medio YNB adicionado de uridina e histidina y se seleccionaron por PCR aquellos transformates que habían incorporado el casete de arginina para eliminar falsos positivos. La correcta integración en el *locus* del gen *CWT1* se verificó mediante análisis Southern blot (Fig. IV.10, calle 2). Para ello se obtuvo ADN genómico de la

cepa parental y los transformantes seleccionados y se digirió con *XbaI*, como sonda se emplearon los amplicones YIE12 y YIE34 del gen, marcados con digoxigenina (ver Materiales y Métodos).

En la hibridación con la sonda del gen, la cepa parental debía dar un fragmento de 3.94 kb, que incluía el gen completo. El transformante que hubiese incorporado de forma correcta el casete de interrupción de arginina presentaría la misma banda de 3.94 kb, correspondiente al alelo que permanece intacto y además dos bandas correspondientes al alelo interrumpido: una de ellas de 5.29 kb y la otra de 1.65 kb (ver Fig. IV.8).

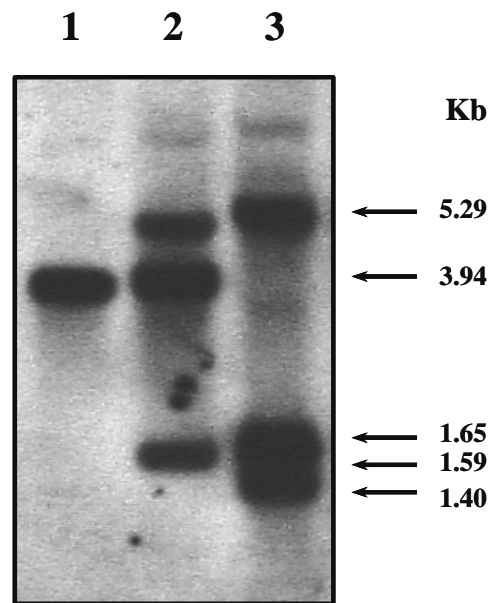


Figura IV.10- Análisis Southern blot de las cepas interrumpias en el gen *CWT1*. (1) CNC43, (2) 3A, (3) 3AH. El ADN genómico de las cepas se digirió con *XbaI* y la membrana se hibridó con la sonda del gen.

De este modo se corroboró que la integración del casete se había producido en uno de los alelos del locus correspondiente al gen *CWT1*. Así se obtuvo el mutante heterocigótico para el gen *CWT1*. Uno de estos transformantes se seleccionó para estudios posteriores, a este mutante heterocigótico *CWT1/cwt1Δ* se le denominó 3A.

El mutante heterocigótico obtenido se utilizó para la disrupción del segundo alelo del gen, utilizando el mismo método pero en este caso se transformó la cepa 3A con el fragmento lineal que contenía el casete de disrupción con el marcador de histidina y que se liberaba al digerir el plásmido pYIE14H con las enzimas de

restricción *EcoRI* y *HindIII*. Los transformantes se seleccionaron en medio YNB suplementado con uridina, ya que tras esta transformación las células debían adquirir prototofia para histidina. La correcta integración del casete en el locus correspondiente al alelo del gen que todavía permanecía salvaje se realizó por análisis Southern blot (Fig. IV.10, calle 3). Se obtuvo ADN genómico de la cepa parental, y varios transformantes del segundo alelo. El ADN se digirió con la enzima *XbaI* y la membrana de nylon con el ADN transferido se hibridó con la sonda del gen. El patrón de bandas que se esperaba para la interrupción del segundo alelo del gen no debía contener la banda de 3.94 kb perteneciente al gen completo, pero sí aquellas de 5.29 y 1.65 kb del mutante heterocigótico, además cabía esperar tres bandas correspondientes al segundo alelo interrumpido: una de 1.65 kb, otra de 1.59 kb y la última de 1.4 kb, ya que hay dos sitios de corte *XbaI* en el casete de disrupción.

De entre los transformantes que habían integrado correctamente ambos casetes de disrupción y que por tanto eran mutantes nulos en el gen *CWT1* se eligió uno al que se denominó *C. albicans* 3AH y que se utilizó para estudios posteriores.

La obtención del mutante nulo para el gen *CWT1* se comprobó por RT-PCR. Para ello se obtuvo ARN total de las cepas CNC43 y 3AH crecidas a 28°C en YPD, y los cADN obtenidos se amplificaron con los oligonucleótidos 3781ini-5' y 3781int-3' (ver Tabla III.5). Este último cebador está diseñado dentro de la zona delecionada por el casete de disrupción, de modo que si el mutante nulo estaba bien construido, este cebador no podría hibridar en el gen y no habría ningún amplificado en la cepa mutante, mientras que en la cepa parental se esperaba un amplificado de aproximadamente 1200 pb. Como control se utilizaron oligonucleótidos específicos del *EFB1* (*EFB1F* y *EFB1R*), que amplificaban únicamente un fragmento de 526 pb en ausencia de contaminación con ADN genómico (Fig. IV.11). Además *EFB1* contiene un intrón lo que nos permitiría detectar contaminaciones de ADN genómico en el ARN utilizado en caso de obtener amplificados de 890 pb.

El resultado mostró que en la cepa mutante 3AH no existía mRNA del gen *CWT1* y por tanto la célula no podía sintetizar este factor de transcripción (Fig. IV.11, calle 2) a pesar de que la extracción de ARN total de esta había sido eficiente, ya que sí que se encontró mRNA del gen *EFB1* (Fig. IV.11, calle 4) empleado como control. Con este experimento quedó demostrada la correcta disrupción del gen *CWT1* en el mutante nulo 3AH.

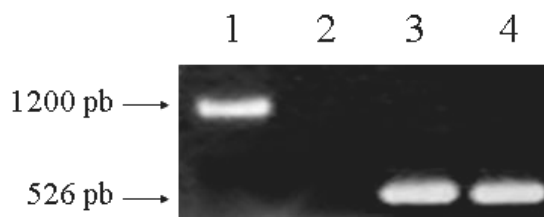


Figura IV.11- RT-PCR de los cADN de las cepas de *C. albicans*. Las cepas CNC43 (calles 1 y 3) y 3AH (calles 2 y 4) se crecieron en YPD a 28°C y se obtuvo cADN. Un microgramo de cADN se utilizó de molde para la reacción de PCR utilizando los oligonucleótidos del gen *CaCWT1*: 3781ini-5' y 3781int-3' (calles 1 y 2), y del gen control *CaEFB1*: EFB1F y EFB1R (calles 3 y 4).

IV.6- REINTEGRACIÓN DE MARCADORES PARA ELIMINAR LAS AUXOTROFÍAS DE LAS CEPAS UTILIZADAS

Para restablecer las prototrofías por arginina, histidina y uracilo en las cepas de *C. albicans* utilizadas y eliminar así posibles efectos derivados de estas diferencias genéticas, plásmidos conteniendo genes que codifican para proteínas de síntesis de uracilo e histidina fueron introducidos en las cepas parental, mutante heterocigótico y mutante homocigótico.

Para la reintegración de estos genes en las cepas correspondientes se utilizaron vectores de integración que poseen los marcadores requeridos y que pueden ser integrados en el *locus* del gen *CaRP10*:

- (i) La cepa parental sin auxotrofías (CAI4-URA) se consiguió reintroduciendo el gen *CaURA3* en la cepa CAI4 (ura⁻) albergado en el plásmido CIp10.
- (ii) La cepa mutante heterocigótica sin auxotrofías (3A-HISURA) se consiguió reintroduciendo los genes *CaURA3* y *CaHIS1* en la cepa 3A haciendo uso del plásmido CIp20.
- (iii) La cepa mutante homocigótica sin auxotrofías (3AH-URA) se consiguió reintroduciendo el gen *CaURA3* en la cepa 3AH con el plásmido CIp10.

La correcta integración de los marcadores en las cepas obtenidas se comprobó por PCR (no mostrado). Estas cepas se utilizaron posteriormente para ciertos análisis fenotípicos que requieren la eliminación de auxotrofias. Además, las cepas CAI4-URA, 3A-HISURA y 3AH-URA son isogénicas para *CaURA3*, minimizando así los efectos que podría tener la localización de este gen en *locus* diferentes.

IV.7- ANÁLISIS FENOTÍPICO DEL MUTANTE NULO *cwt1Δ/cwt1Δ*

Con la intención de poder elucidar la posible función de la proteína Cwt1p se llevó a cabo un análisis fenotípico de las cepas mutantes bajo distintas condiciones y los resultados se compararon con los de su cepa parental que sirvió como control.

IV.7.1- Crecimiento y morfología

Para estudiar si la falta de la proteína Cwt1p afectaba a la velocidad de crecimiento del mutante se realizaron curvas de crecimiento de la forma levaduriforme de las cepas parental (CNC43), mutante heterocigótico (3A) y mutante homocigótico (3AH) en diferentes condiciones:

- medios de cultivo YPD e YNB
- condiciones de cultivo aerobias y anaerobias
- distintas temperaturas de crecimiento: 28°C y 37°C

Se observó que la tasa de crecimiento de ambas poblaciones celulares era similar en todas las condiciones y no se encontraron diferencias morfológicas entre las distintas cepas en las distintas condiciones de cultivo.

Además se estudió la velocidad de formación de tubo germinativo en medios líquidos que favorecen la filamentación (medio de Lee, medio RPMI-1640 y medio YNB suplementado con 10% de suero humano), no observándose diferencias significativas entre la cepa parental y las cepas con unos o dos alelos delecionados.

IV.7.2- Estudio de filamentación en medio sólido

La morfología colonial que presenta *C. albicans* se puede considerar como el reflejo de la morfología celular. Así, la morfología que presentan las colonias de *C. albicans* en determinados medios ha sido considerada como prueba macroscópica de la capacidad de sus células para llevar a cabo la transición dimórfica. Para estudiar el efecto de la interrupción del gen *CWT1* en la transición dimórfica se analizaron las colonias obtenidas tras 5 días de incubación a 37°C en distintos medios para el estudio de la filamentación (Fig. IV.12). Las cepas que se utilizaron para los ensayos de filamentación fueron la parental CAI4-URA y la mutante 3AH-URA, de este modo se evitó la posibilidad de encontrar diferencias en la morfología de las colonias que pudiera ser debida a las distintas auxotrofías que presentaban las cepas CNC43 y 3AH.

La morfología colonial, el tamaño de las colonias y el grado o capacidad de filamentación de la cepa 3AH-URA en todos los medios sólidos empleados fue diferente a la que presentaba su cepa parental CAI4-URA.

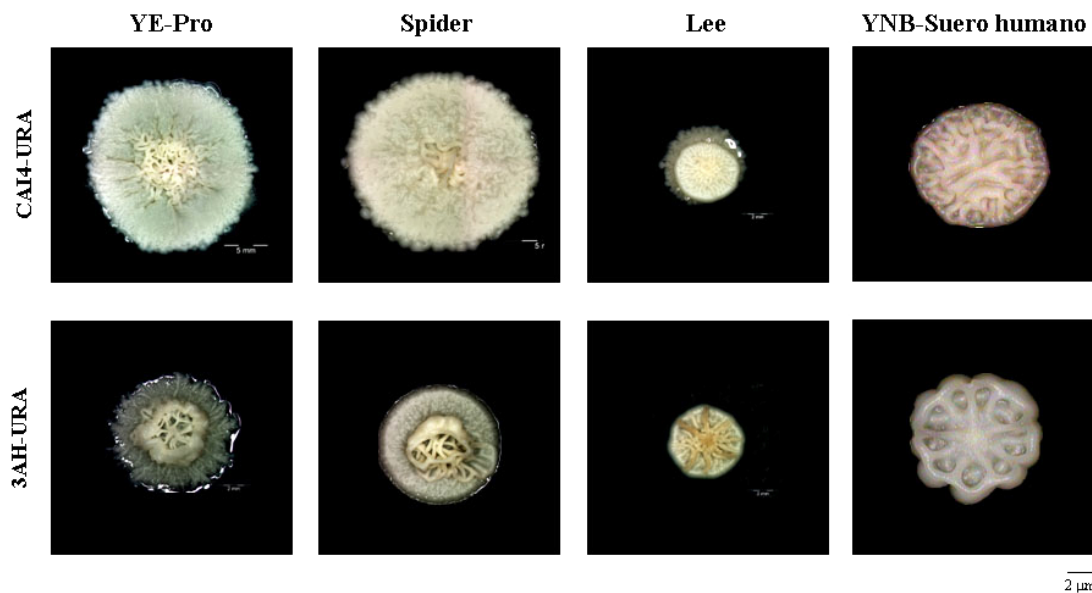


Figura IV.12- Morfología de las colonias de las cepas CAI4-URA y 3AH-URA. Las células se crecieron en medio YE-Pro, medio Spider, medio de Lee y medio YNB suplementado con suero humano al 10%. Las placas se incubaron durante 5 días a 37°C.

En cuanto a la capacidad de filamentación, se pudo observar que en todos los medios utilizados la filamentación de la cepa mutante 3AH-URA se ve reducida en las colonias respecto de la cepa parental. En la figura IV.13 se muestran fotografías de los bordes coloniales tras 5 días de incubación a 37°C en los distintos medios empleados.

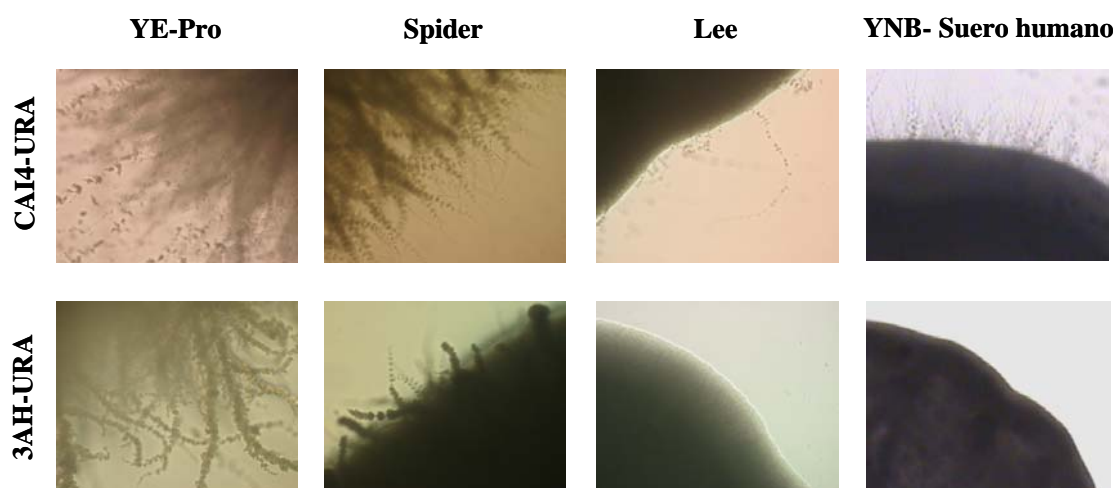


Figura IV.13- Morfología de los bordes de colonias. Las cepas CAI4-URA y 3AH-URA se sembraron en placas de medio de YE-Pro, Spider, medio de Lee y medio YNB suplementado con suero humano al 10%. Las placas se incubaron durante 5 días a 37°C.

IV.7.3- Estudio de sensibilidad a estrés térmico, osmótico y oxidativo

Para determinar el papel de Cwt1p y su posible implicación en la integridad celular, se realizó un estudio de sensibilidad de los mutantes en *CWT1* a choques térmico, osmótico y oxidativo.

No se observaron diferencias significativas en la sensibilidad al choque térmico (incubación a 55°C durante periodos de 0, 45 y 90 minutos y posterior incubación a 28 y 37°C) de las cepas CNC43, 3A y 3AH de *C. albicans*.

Tampoco se observaron diferencias en el comportamiento de las distintas cepas en medios hipertónicos mediante adición de NaCl (0-2 M), CaCl₂ (0-0.7 M) y LiCl (0-200 mM).

Se estudió además el efecto del estrés oxidativo sobre las distintas cepas exponiéndolas al crecimiento en presencia de peróxido de hidrógeno (Fig. IV.14). Se detectó cierta sensibilidad de la cepa que posee un alelo del gen *CWT1* disrupcionado. Sin embargo, el mutante homocigótico no parecía presentar cambios de sensibilidad frente a estrés oxidativo respecto de la cepa parental.

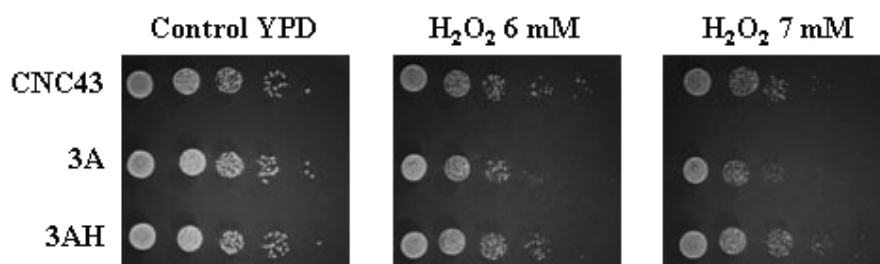


Figura IV.14- Estudio de sensibilidad a estrés oxidativo. Para analizar el efecto de un agente oxidante sobre las distintas cepas se obtuvieron cultivos a $D.O_{600nm}$ 1 y se realizaron diluciones decimales seriadas. Se gotearon 5 μ l de cada dilución en placas de YPD que contenían peróxido de oxígeno a distintas concentraciones y se incubaron 48 h a 28°C.

IV.7.4- Estudio de sensibilidad a cafeína

Se estudió el efecto de la cafeína sobre las distintas cepas. Este efecto es interesante ya que la cafeína es un inhibidor de la fosfodiesterasa dependiente de AMP cíclico, que aumenta los niveles intracelulares de AMP cíclico y activa proteínas quinasas dependientes de éste. Diferencias de sensibilidad a cafeína pondría de manifiesto la implicación del gen *CWT1* en la ruta de las MAP-quinasas dependientes de AMP cíclico (Navarro-García *et al.*, 1995).

En este experimento no se observaron diferencias significativas en la sensibilidad a cafeína de los mutantes heterocigótico y nulo respecto de la cepa parental.

IV.7.5- Estudio de resistencia a drogas

Se comparó el comportamiento de las cepas parental y mutante en presencia de drogas que afectan distintos compuestos y procesos celulares. En este experimento se utilizaron:

- anfotericina B y nistatina: ambos son macrólidos poliénicos que actúan formando poros hidrofílicos en la membrana plasmática.
- bleomicina: forma complejos con los iones Fe^{2+} que se unen al ADN, reduciendo el O_2 del medio ambiente. Se crean radicales superóxido, radicales libres de O_2 y daño al ADN.

- cerulenina: antibiótico inhibidor de la síntesis de ácidos grasos.
- cicloheximida: antibiótico inhibidor de la síntesis de proteínas.
- higromicina B: antibiótico que inhibe la síntesis de proteínas.
- ketoconazol: antifúngico de la familia de los azoles que actúa sobre el citocromo P-450 en la ruta de síntesis de ergosterol, alterando así la permeabilidad de la membrana plasmática.
- quinidina: sustancia que bloquea los canales para iones potasio.
- tunicamicina: inhibidor de la N-glicosilación.

No se observaron diferencias de sensibilidad significativas de los distintos mutantes a la acción de anfotericina B, nistatina, bleomicina, cerulenina, cicloheximida y tunicamicina con respecto a la cepa parental.

Curiosamente el mutante heterocigótico presentó mayor resistencia al antifúngico ketoconazol que la cepa parental. Esta resistencia también se observó en el mutante nulo pero en menor medida (Fig. IV.15).

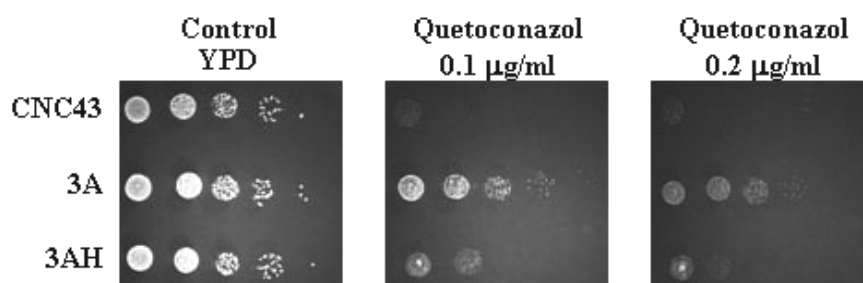


Figura IV.15- Sensibilidad a antifúngicos. Para analizar el efecto de este tipo de drogas sobre las distintas cepas se obtuvieron cultivos a $D.O_{600nm}$ 1 y se realizaron diluciones decimales seriadas. Se gotearon 5 µl de cada dilución en placas de YPD que contenían concentraciones crecientes de ketoconazol y se incubaron 48 h a 28°C.

Del resto de pruebas realizadas con antibióticos, se encontró cierta hipersensibilidad de la cepa mutante nula para *CWT1* a quinidina e higromicina B (Fig. IV.16). Esta sensibilidad no afectaba al mutante heterocigótico para este mismo gen.

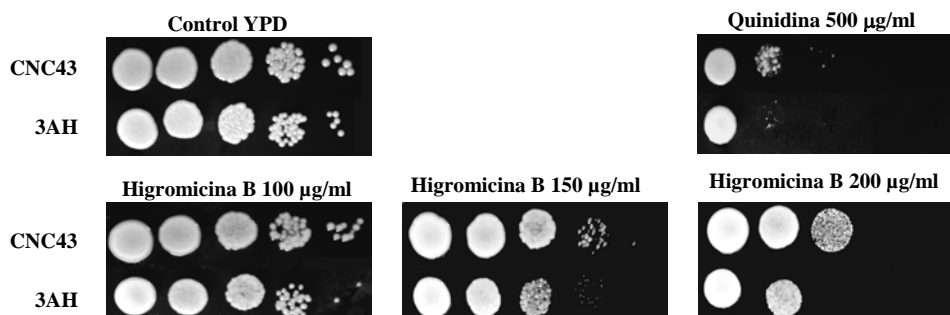


Figura IV.16- Sensibilidad de las cepas CNC43 y 3AH a antibióticos. Para analizar el efecto de estas drogas sobre las distintas cepas se obtuvieron cultivos a $D.O_{600nm}$ 1 y se realizaron diluciones decimales seriadas. Se gotearon 5 μ l de cada dilución en placas de YPD que contenían las sustancias en las concentraciones indicadas, incubándose 48 h a 28°C.

IV.7.6- Estudio de la integridad de la pared celular

Para determinar el efecto producido por la interrupción del gen *CWT1* en la síntesis y ensamblaje de los componentes de la pared celular se realizaron pruebas de sensibilidad a sustancias que alteran el correcto ensamblaje de los mismos. Se estudió la sensibilidad a:

- blanco de calcofluor o calcofluor white (CFW): molécula bipolar que distorsiona el ensamblaje de los diferentes componentes de la pared celular por unión a la quitina (Elorza *et al.*, 1983; Ram *et al.*, 1994).
- de β -1,3-glucano (Kopecka y Gabriel, 1992).
- dodecil sulfato sódico (SDS): detergente que afecta la estabilidad de la membrana plasmática y por tanto también a la construcción de la pared celular.

Las cepas 3A y 3AH presentaron mayor sensibilidad a calcofluor white y a rojo Congo que la cepa parental CNC43 (Fig. IV.17). Sin embargo, las cepas mutantes en uno o dos alelos presentan más resistencia a la presencia de SDS que la cepa parental.

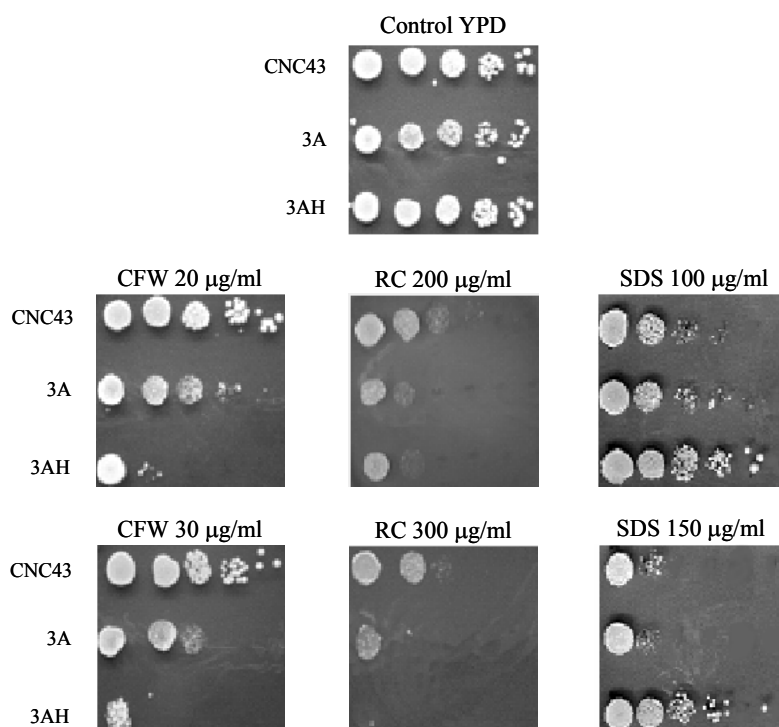


Figura IV.17- Sensibilidad a calcofluor white, rojo Congo y SDS de las cepas CNC43, 3A y 3AH. Para analizar el efecto de estas sustancias sobre las distintas cepas se obtuvieron cultivos a $D.O_{600nm}$ 1 y se realizaron diluciones decimales seriadas. Se gotearon 5 μ l de cada dilución en placas de YPD que contenían las sustancias en las concentraciones indicadas, incubándose 48 h a 28°C.

IV.7.7- Estudio de sensibilidad a zimoliasa

La zimoliasa es un complejo enzimático con actividad principalmente β -1,3-glucanasa. La sensibilidad a zimoliasa se ha utilizado para monitorizar los cambios en la composición y la organización de la pared celular de las levaduras como *C. albicans* (De Nobel *et al.*, 1990; Ram *et al.*, 1994; Van der Vaart *et al.*, 1995). La observación de una mayor o menor sensibilidad de las células a la degradación enzimática del β -1,3-glucano puede reflejar alteraciones en la estructura de la pared derivadas de la ausencia o de la superabundancia de la proteína estudiada o de otros componentes.

El ensayo se realizó siguiendo el protocolo descrito por Van der Vaart *et al.* (1995) monitorizándose las variaciones de densidad óptica durante 90 minutos. El estudio se realizó utilizando cultivos de las cepas parental y mutantes heterocigótico y homocigótico tanto en fase exponencial ($D.O_{600nm}$ 0.5) como en fase estacionaria de crecimiento ($D.O_{600nm}$ 9).

Como se muestra en la figura IV.18.A, correspondiente a la fase exponencial de crecimiento, la densidad óptica medida para estimar la concentración de células intactas de la cepa mutante no desciende a lo largo de los 90 minutos por lo que puede concluirse que en fase exponencial de crecimiento hay una alteración de la pared celular de la cepa mutante que impide el acceso de la zimoliasa al β -1,3-glucano.

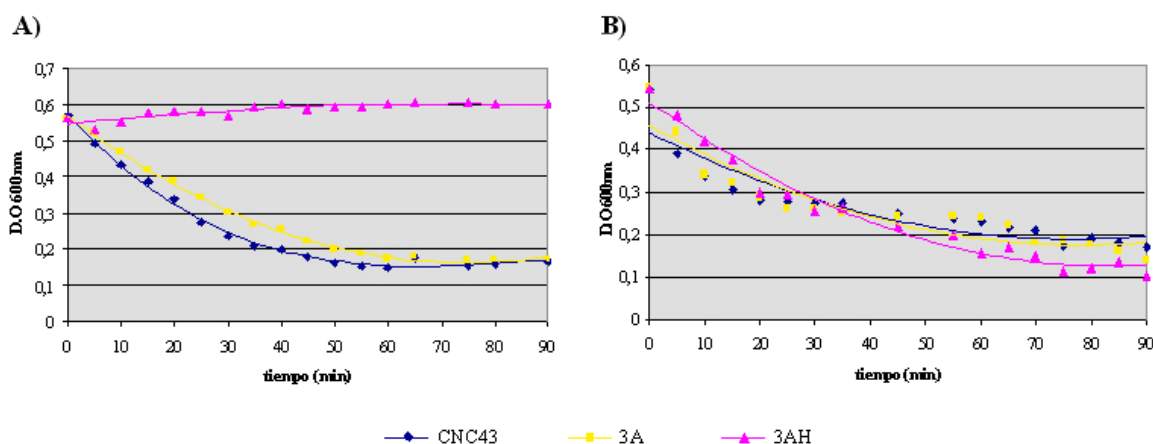


Figura IV.18- Sensibilidad a zimoliasa 20T. Cultivos de las cepas CNC43, 3A y 3AH en fase exponencial (A) y estacionaria (B) de crecimiento fueron incubados en presencia de zimoliasa 20T (100 μ g/ml, en tampón Tris HCl 10mM pH 7.5) y la variación de la densidad óptica a 600 nm fue seguida durante 90 min.

Sin embargo, en fase estacionaria de crecimiento (Fig. IV.18.B) el comportamiento de ambas cepas es muy similar, esto podría significar una recuperación de la normalidad de la pared del mutante nulo en *CWT1* cuando las células alcanzan la fase estacionaria de crecimiento.

IV.7.8- Análisis de polímeros de la pared celular

Con el propósito de comprobar si existían diferencias apreciables en la composición de los polisacáridos y proteínas que forman la pared celular de la cepa parental, el mutante heterocigótico y el mutante nulo en el gen *CWT1* se procedió a llevar a cabo un análisis cuantitativo de la composición química de las paredes de estas cepas. Este análisis se realizó sobre paredes aisladas de células en fase exponencial (D.O._{600nm} 0.5) y estacionaria de crecimiento (D.O._{600nm} 9).

Tanto en fase exponencial como en fase estacionaria se pudieron observar claras diferencias en la composición de la pared celular de las células de la cepa parental y el mutante nulo. Sin embargo, el mutante heterocigótico presentaba una

composición similar a la cepa parental en prácticamente todos los componentes analizados.

En fase exponencial de crecimiento, la cepa mutante presentó una pared celular que contenía aproximadamente la mitad de glucano (β -1,3- y β -1,6-glucano) que la cepa parental, pero lo más significativo fue la alta cantidad de manano que se encontró en la pared de la cepa mutante, seis veces más de manano de la que compone la pared de la cepa parental (Fig. IV.19).

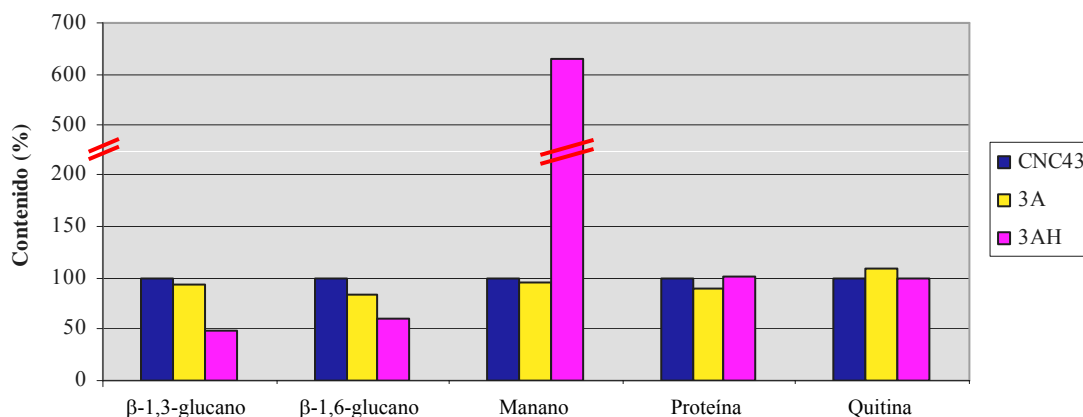


Figura IV.19- Relación de los componentes de la pared celular de las cepas parental (CNC43), mutante heterocigótico (3A) y mutante nulo (3AH) en el gen *CWT1* en fase exponencial de crecimiento.

En fase estacionaria de crecimiento (Fig. IV.20), la cantidad de manano en la cepa mutante era prácticamente igual a la de la cepa parental y el nivel de β -1,3-glucano parecía haberse normalizado a lo largo del crecimiento. Sin embargo, la cantidad de β -1,6-glucano en la pared de la cepa mutante era mucho menor a la que se encontró en la cepa parental.

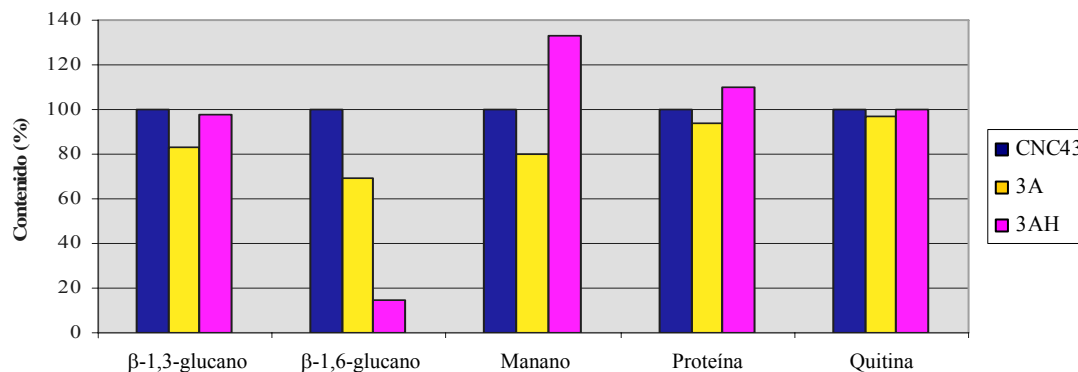


Figura IV.20- Relación de los componentes de la pared celular de las cepas parental (CNC43), mutante heterocigótico (3A) y mutante nulo (3AH) en el gen *CWT1* en fase estacionaria de crecimiento.

IV.7.9- Tinción de células con Concanavalina A acoplada a fluoresceína

Para corroborar las diferencias en la composición de manano de la pared celular de las cepas CNC43 y 3AH en las distintas condiciones estudiadas, células enteras se tiñeron con concanavalina A acoplada a fluoresceína (ConA-FITC)

La concanavalina A es una lectina que se une a los restos de manosa de las glicoproteínas. Al estar esta lectina acoplada a fluoresceína, podemos observar de manera indirecta la cantidad y distribución de manosa en la pared celular por la fluorescencia emitida por las células teñidas. El resultado de la tinción de células en fase exponencial de crecimiento se muestra en la figura IV.21, y las células teñidas al alcanzar la fase estacionaria de crecimiento se muestran en la figura IV.22.

En fase exponencial de crecimiento se pudo observar que las células de la cepa mutante emitían mucha más fluorescencia que las células de la cepa parental, lo cual significa que la pared de las células del mutante nulo en el gen *CWT1* acumula mayor cantidad de manano, que se localiza en la parte más externa de la pared, que las células de la cepa parental y esto corrobora los resultados obtenidos en la cuantificación de manano de la pared celular (Fig. IV.19).

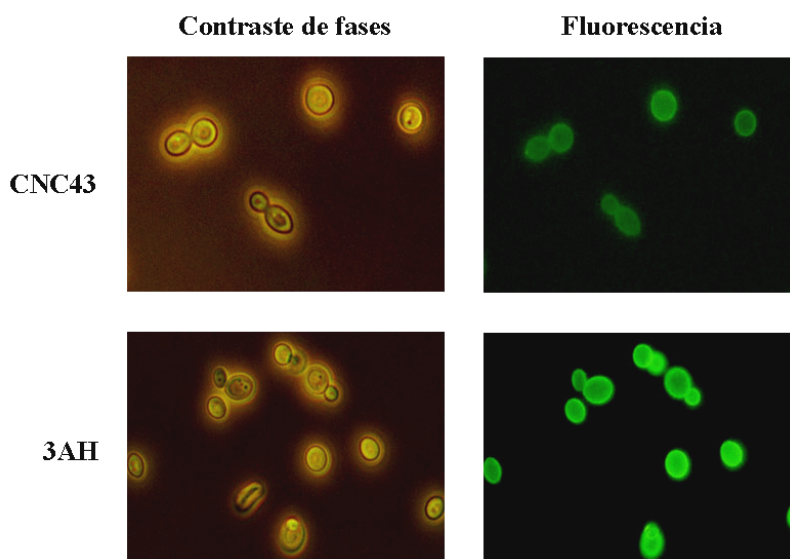


Figura IV.21- Tinción de células en fase exponencial con ConA-FITC. Células de las cepas CNC43 y 3AH en fase exponencial de crecimiento ($D.O_{600nm}=0.5$) se tiñeron con concanavalina A acoplada a fluoresceína y se observaron al microscopio de fluorescencia.

En fase estacionaria de crecimiento las diferencias de fluorescencia entre las cepas parental y mutante prácticamente habían desaparecido. El resultado coincide con el análisis cuantitativo de manano de la pared celular (Fig. IV.20) en el que se encontró aproximadamente la misma cantidad de manano en ambas cepas cuando estas alcanzan la fase estacionaria tardía de crecimiento.

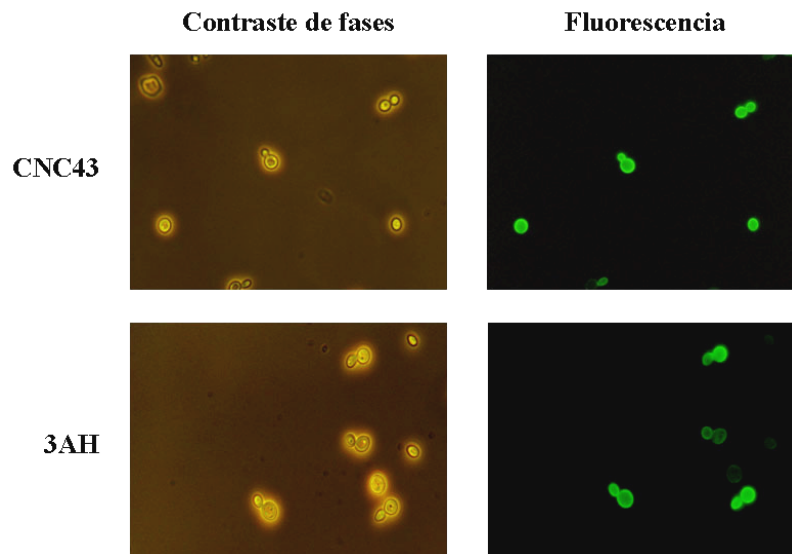


Figura IV.22- Tinción de células en fase estacionaria con ConA-FITC. Células de las cepas CNC43 y 3AH en fase estacionaria de crecimiento ($D.O_{600nm}=9$) se tiñeron con concanavalina A acoplada a fluoresceína y se observaron al microscopio de fluorescencia.

IV.7.10- Caracterización del perfil proteico de la pared celular del mutante nulo *cwt1Δ/cwt1Δ*

Los resultados obtenidos en los apartados anteriores conducían a una posible alteración de la pared celular del mutante nulo. Esta alteración producida por la falta de la proteína Cwt1p podría estar causando fallos en la composición o el ensamblaje de los componentes de la pared celular de *C. albicans*. Para demostrar esta hipótesis se realizó un fraccionamiento de la pared de células en fases exponencial y estacionaria de crecimiento ($D.O_{600nm}$ 0.5 y 9 respectivamente) de las cepas CNC43 y 3AH y se estudió el perfil proteico del material extraído de las paredes celulares mediante Western blot.

El proceso de obtención, purificación y posterior extracción de las paredes celulares se realizó como se describe en Materiales y Métodos. Un esquema del proceso de extracción se detalla en la figura IV.23. Las distintas fracciones obtenidas: SDS, β -mercaptoetanol y zimoliasa se analizaron mediante electroforesis en geles de SDS-poliacrilamida al 10%, pero sólo en los extractos de zimoliasa se pudieron observar diferencias significativas. La cantidad de proteína cargada fue en todos los casos de 10 μ g de proteína total por calle. El material separado en los geles de poliácridamida se transfirió a membrana de nitrocelulosa y las especies proteicas se detectaron como se indica a continuación.

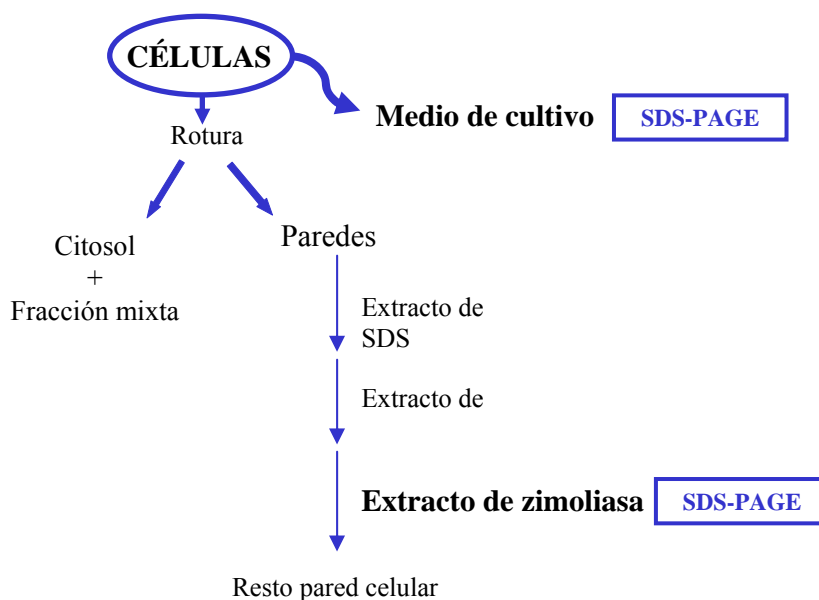


Figura IV.23- Esquema de purificación de los distintos extractos celulares.

IV.7.10.1- Western blot de extractos de pared con anticuerpo policlonal frente a proteínas de pared de levadura.

En una primera aproximación se utilizó un anticuerpo policlonal (PAbL) obtenido frente a paredes celulares de *C. albicans* crecidas en forma levaduriforme.

El análisis mediante esta técnica de los extractos de SDS y β -mercaptoetanol no mostró diferencias cualitativas apreciables. En cambio, el material extraído por efecto de la zimoliasa (β -1,3-glucanasa) de las paredes celulares previamente extraídas con SDS y β -mercaptoetanol y posteriormente analizado por Western blot con el

anticuerpo policlonal PAbL, reveló ciertas diferencias en el perfil proteico del material analizado (Fig. IV.24).

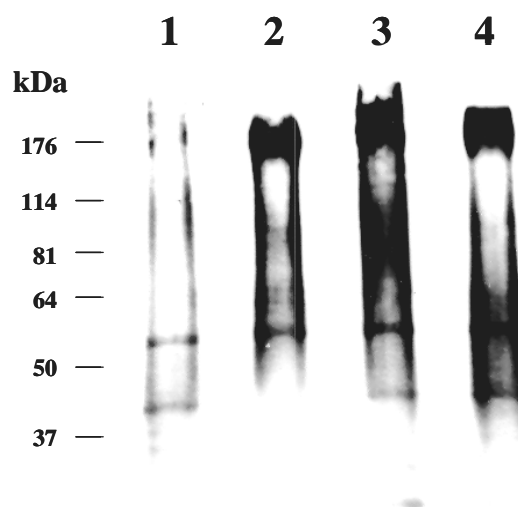


Figura IV.24- Western inmunoblot con el anticuerpo PAbL del material extraído con zimoliasa de las paredes purificadas de *C. albicans*. El análisis se realizó en paredes de las cepas CNC43 (calles 1 y 3) y 3AH (calles 2 y 4) en fase exponencial (calles 1 y 2) y estacionaria de crecimiento (calles 3 y 4).

En la fase exponencial de crecimiento (Fig. IV.24, calles 1 y 2), el extracto de zimoliasa de la cepa mutante mostró mayor cantidad de glicoproteínas que el extracto de la cepa parental, a pesar de que ambas calles estaban cargadas con la misma cantidad de proteína total. Esto podría justificarse por el hecho de que este anticuerpo reconoce tanto la parte proteica como la parte azucarada de las glicoproteínas, y como ya se ha expuesto anteriormente, la cepa mutante presentó una mayor cantidad de manano en su pared de la que se encuentra en la cepa parental (ver sección IV.7.8).

Cuando las células alcanzaban la fase estacionaria tardía de crecimiento (Fig.IV.24, calles 3 y 4), el material glicoproteico extraído con zimoliasa de ambas cepas parecía haberse igualado en cuanto a cantidad. Sin embargo, los perfiles proteicos obtenidos son cualitativamente distintos. En la cepa mutante se observó un descenso de masa molecular de ciertas especies reconocidas por el anticuerpo. En la cepa parental se observó una material polidisperso que corre entre 70 y 100 kDa ausente en el caso de la cepa mutante.

IV.7.10.2- Western blot de extractos de pared con Anti- β -1,6-glucano

Puesto que una de las variaciones más acusadas respecto a la composición de la pared celular era referente a la cantidad de β -1,6-glucano, se realizó un análisis Western blot con un anticuerpo policlonal que era capaz de reconocer específicamente este azúcar.

Para este experimento se utilizaron únicamente los extractos de zimoliasa, ya que posee actividad enzimática β -1,3-glucanasa, pero también β -1,6-glucanasa, por lo que liberaba el β -1,6-glucano y las proteínas que se encuentran unidas a él (proteínas GPI) del entramado de la pared celular (Fig. IV.25).

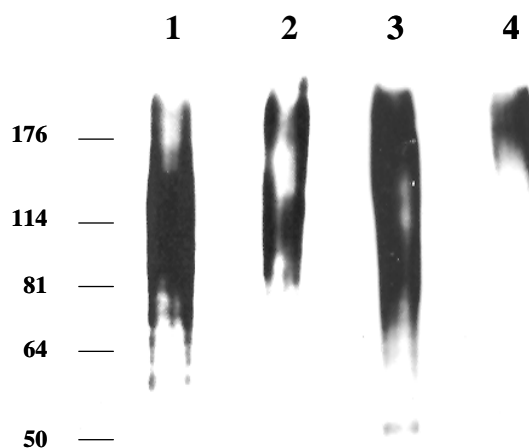


Figura IV.25- Western inmunoblot con el anticuerpo Anti- β -1,6-glucano del material extraído con zimoliasa de las paredes purificadas de *C. albicans*. El análisis se realizó en paredes de las cepas CNC43 (calles 1 y 3) y 3AH (calles 2 y 4) en fase exponencial (calles 1 y 2) y estacionaria de crecimiento (calles 3 y 4).

En la fase exponencial de crecimiento (Fig. IV.25, calles 1 y 2) se observó una menor cantidad de proteínas unidas a la pared celular a través de β -1,6-glucano en la pared de la cepa mutante, como ya reveló el análisis cuantitativo de los componentes de la pared celular.

En fase estacionaria de crecimiento (Fig. IV.25, calles 3 y 4), la pared celular de la cepa mutante presentó una carencia importante especies proteicas unidas a la

pared por β -1,6-glucano respecto a la pared de la cepa parental. La baja cantidad de β -1,6-glucano en la pared de la cepa 3AH en fase estacionaria de crecimiento podría estar impidiendo el anclaje de proteínas GPI que utilizan el β -1,6-glucano para su incorporación a la pared.

IV.7.11- Análisis del medio de cultivo

Teniendo en cuenta los resultados del apartado anterior, se llevó a cabo un estudio del medio de cultivo de células creciendo en fase estacionaria de crecimiento. La hipótesis de la que se partió fue que si la falta de β -1,6-glucano imposibilitaba el ensamblaje de proteínas GPI a la pared celular de la cepa mutante, estas proteínas GPI que no podían unirse podrían estar siendo liberadas al medio de cultivo.

En primer lugar se procedió a una cuantificación de las macromoléculas liberadas al medio de cultivo por parte de las cepas parental y mutante en fase exponencial (Fig. IV.26.A) y estacionaria de crecimiento (Fig. IV.26.B). Se utilizó medio YNB que es un medio pobre para minimizar el contenido de azúcares y proteínas procedentes del medio que podrían enmascarar los resultados del análisis.

El análisis mostró una mayor cantidad de material liberado al medio de cultivo por parte de la cepa mutante, tal y como se esperaba (Fig. IV.26), tanto de proteínas como de azúcares.

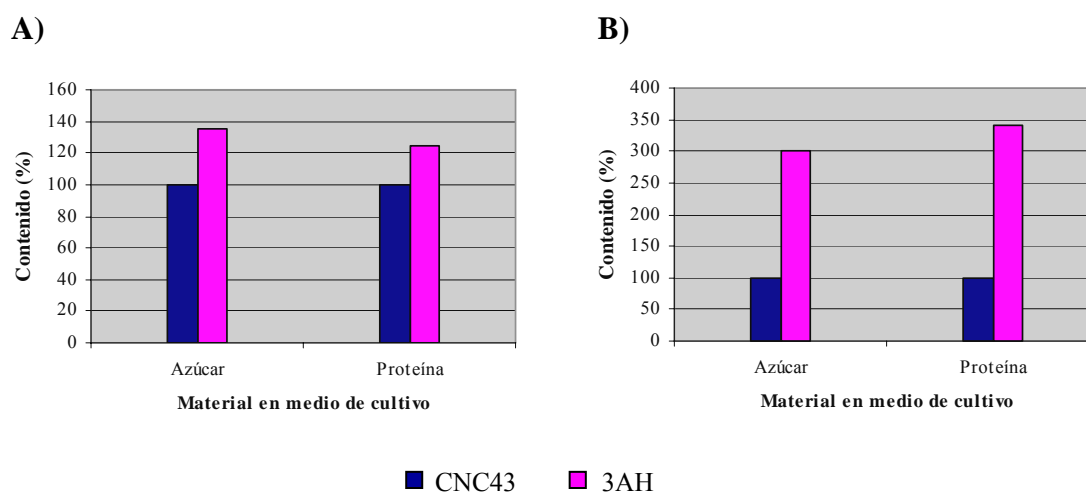


Fig IV.26- Composición del medio de cultivo de las cepas CNC43 y 3AH crecidas en medio YNB en (A) fase exponencial de crecimiento, D.O_{600nm}=0.5, y (B) fase estacionaria de crecimiento D.O_{600nm}=9.

Para comprobar estos datos se realizó Western blot de medio de cultivo de ambas cepas creciendo en fase exponencial $D.O_{600nm}=0.5$ y fase estacionaria $D.O_{600nm}=9$ y se revelaron con el anticuerpo policlonal PAbL (Fig. IV.27) que nos permitió ver diferencias cuantitativas y cualitativas del material contenido en el medio de cultivo.

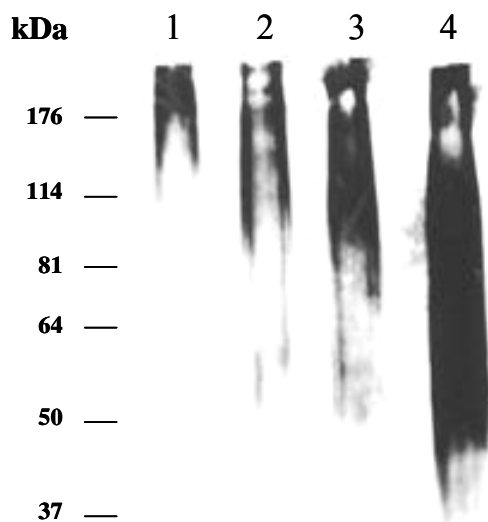


Figura IV.27- Western inmunoblot con el anticuerpo PAbL del material secretado al medio de cultivo por *C. albicans*. El análisis se realizó sobre 10 ml de medio de cultivo de las cepas CNC43 (calles 1 y 3) y 3AH (calles 2 y 4) en fase exponencial (calles 1 y 2) y estacionaria de crecimiento (calles 3 y 4).

En fase exponencial de crecimiento (Fig. IV.27, calles 1 y 2) se observó que el mutante nulo libera al medio de cultivo especies glicoproteicas distintas de las que son liberadas por la cepa parental. En fase estacionaria de crecimiento (Fig. IV.27, calles 3 y 4) las especies proteicas liberadas al medio de cultivo por la cepa mutante, 3AH, son distintas en cuanto a peso molecular y más abundantes que las encontradas en el medio de cultivo de la cepa mutante. Este resultado corroboró la hipótesis de que una menor cantidad de β -1,6-glucano en la pared celular de la cepa mutante podría estar impidiendo el correcto ensamblaje de ciertas glicoproteínas a la pared celular y éstas glicoproteínas podrían ser liberadas al medio de cultivo.

IV.8- SOBRE-EXPRESIÓN DEL GEN *CWT1* EN EL MUTANTE NULO *cwt1Δ/cwt1Δ*

Con la finalidad de demostrar que los efectos fenotípicos producidos en el mutante nulo (cepa 3AH) eran producidos realmente por la falta del factor de transcripción Cwt1p en la célula, se procedió a reintroducir una copia del gen *CWT1* en la cepa mutante. Para ello se clonó la región codificante del gen *CWT1* en el plásmido pBI-1 (Stoldt *et al.*, 1997).

IV.8.1- Construcción del plásmido pBI-CWT1

Para la expresión del gen *CWT1* se construyó un plásmido que incluía la región codificante del gen bajo el control de un promotor fuerte inducible, como es el promotor del gen *CaPCK1* (fosfoenolpiruvato carboxiquinasa), originando el plásmido pBI-CWT1 (Fig. IV.28). El promotor del gen *CaPCK1* se encuentra reprimido en presencia de glucosa y su expresión puede inducirse sustituyendo la glucosa del medio por casaminoácidos.

El primer paso para la construcción del plásmido fue la clonación de la región codificante de *CWT1* por PCR utilizando los oligonucleótidos pBICWT1-5 y pBICWT1-3, que poseían las dianas de restricción de *Bam*HI y *Bgl*III respectivamente (ver Tabla III.5). El fragmento obtenido se subclonó en el plásmido pMOS*Blue* (GE Healthcare) originando el plásmido pMOSCWT1 y la región codificante se liberó de este plásmido por digestión con *Bam*HI y *Bgl*III para ser finalmente clonado en el plásmido pBI-1 digerido con *Bgl*III. La ligación de plásmido e inserto fue posible ya que *Bam*HI y *Bgl*III son enzimas que producen extremos compatibles. La correcta orientación del gen en el plásmido obtenido (pBICWT1) se comprobó amplificando por PCR la región codificante de *CWT1* con una pareja de oligonucleótidos, PCKp-stop y pBICWT1-3, que sólo producían el amplicón deseado cuando la orientación del gen en el plásmido era correcta.

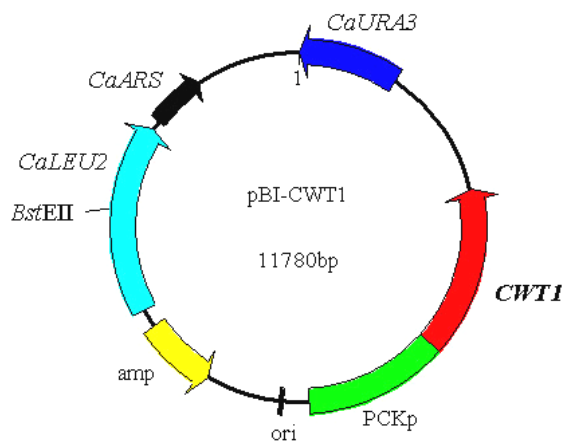


Figura IV.28- Plásmido pBICWT1

IV.8.2- Introducción de pBICWT1 en el mutante nulo

El plásmido pBICWT1 se empleó para transformar el mutante nulo 3AH. Se utilizó el sitio único de restricción *BstEII* del plásmido para linearizarlo e integrarlo por recombinación homóloga en uno de los alelos del *locus* natural del gen *CaLEU2* de la cepa a transformar. Las cepas transformantes se seleccionaron por pérdida de la auxotrofia a uracilo de la cepa 3AH que había introducido el plásmido. Se seleccionó uno de los transformantes para estudios posteriores, al que se denominó 3BICWT1.

Como control de expresión del gen, el mismo proceso de transformación se realizó con el plásmido pBI-1 sin el inserto de *CWT1*. La cepa obtenida en este caso se denominó 3BI.

IV.8.3- Expresión de *CWT1* en la cepa reintegrante

Antes de realizar los experimentos necesarios para corroborar la relación entre la interrupción de *CWT1* y el fenotipo observado en la cepa mutante, se realizó un estudio de expresión del gen *CWT1* reintroducido en la cepa reintegrante 3BICWT1. Con este estudio se pretendía evaluar la calidad del promotor del gen *CaPCK1* y ver si existía una expresión basal de *CWT1* bajo este promotor aun en condiciones de represión.

Células creciendo en un medio represor del promotor del gen *CaPCK1* (medio SD + 4% glucosa) fueron recogidas, lavadas con agua estéril y divididas en dos alícuotas. Una de ellas se reservó a 4°C y la otra alícuota se inoculó en un medio que produce la inducción del promotor de *CaPCK1* (medio SCAA). Tras 30 minutos de incubación a 30°C las células creciendo en el medio inductor se recogieron y se lavaron.

Se obtuvo ARN total de los dos cultivos obtenidos, uno en condición de represión y otro en condición de inducción y la expresión de *CaCWT1* bajo el control del promotor *CaPCK1* se cuantificó por RT-PCR semicuantitativa utilizando los oligonucleótidos 3781ini-5' y 3781int-3' que amplifican un fragmento de *CWT1* de aproximadamente 1200 pb. Como control de carga se emplearon oligonucleótidos específicos de *CaEFB1*, un gen de expresión constitutiva, que producen un amplicón de 526 pb.

Con este estudio de expresión se comprobó que no existe ARN mensajero de *CWT1* en las condiciones de represión. Sin embargo, al crecer las células en un medio carente de glucosa el promotor se activa, induciendo la expresión de *CWT1* (Fig. IV.29).

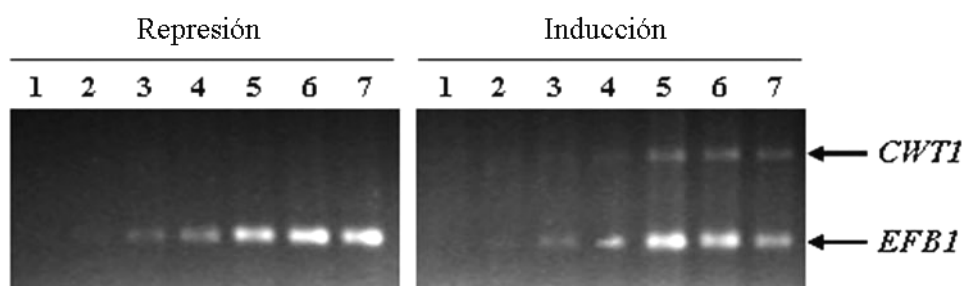


Figura IV.29- RT-PCR semicuantitativa de la expresión de *CWT1* bajo el promotor inducible del gen *CaPCK1*. Se comprobó que la expresión basal de *CWT1* en el plásmido pBICWT1 es nula y que este gen sólo se expresa en condiciones de inducción del promotor *CaPCK1*. La expresión del gen *CaEFB1* fue utilizada como control de carga y para asegurar que no existían contaminaciones de ADN genómico en el ARN utilizado, ya que *CaEFB1* posee un intrón. La represión de *CWT1* se indujo por inactivación del promotor *CaPCK1* en medio SD + 4% glucosa. La inducción de la expresión de *CWT1* se consiguió activando el promotor en medio SCAA sin glucosa que contenía casaminoácidos como fuente de carbono alternativa. Los números 1-7 representan los ciclos a los que las muestras fueron obtenidas (18, 20, 22, 24, 26, 28, 30).

IV.8.4- Análisis fenotípico de la cepa reintegrante

El análisis fenotípico del mutante nulo en el gen *CWT1* mostró, entre otras alteraciones, que la cepa 3AH presentaba hipersensibilidad a ciertos compuestos que interfieren el correcto ensamblaje de los componentes de la pared celular respecto de la cepa parental (ver sección IV.7.6). Además el mutante heterocigótico 3A era más resistente al antifúngico quetoconazol que las cepas parental y mutante nulo (ver sección IV.7.5). Estas características fenotípicas fueron utilizadas para estudiar el fenotipo de la cepa reintegrante 3BICWT1. Esta cepa que expresa el gen *CWT1* bajo el control del promotor de *CaPCK1* debería perder la hipersensibilidad por estos compuestos en caso de que el fenotipo observado en el mutante nulo fuera debido exclusivamente a la delección de este gen.

Para llevar a cabo este estudio, se realizaron pruebas de sensibilidad a calcofluor white, rojo Congo y quetoconazol. Puesto que las cepas 3BI y 3BICWT1 no presentaban ninguna auxotrofia, la comparación se realizó con las cepas CAI4-URA, 3A-HISURA y 3AH-URA para anular un posible efecto causado por las diferencias en el fondo genético de las cepas utilizadas. Cultivos de las distintas cepas creciendo en los medios de represión e inducción se ajustaron a D.O_{600nm} 1 y gotas 3 µl de diluciones seriadas fueron depositadas en placas con los medios de inducción (SCAA) y represión (SD + 4% glucosa) y conteniendo calcofluor white (0-20 µg/ml), rojo Congo (0-5 µg/ml) o quetoconazol (0-0.5 µg/ml).

La sobre-expresión del gen *CWT1* en el mutante nulo produjo la pérdida de hipersensibilidad observada anteriormente por calcofluor white o rojo Congo (ver Fig. IV.17), ya que la cepa sobre-expresante (3BICWT1) se comportó de la misma manera que la cepa parental (CAI4-URA) en presencia de estos compuestos que alteran la arquitectura de la pared celular (Fig. IV.30).

Se estudió también la sensibilidad de la cepa 3BICWT1 a quetoconazol, ya que se había observado que el mutante homocigótico, y en mayor medida el mutante heterocigótico, eran menos sensibles a la acción de este antifúngico que la cepa parental (ver Fig. IV.15), la cepa que sobre-expresa el gen *CWT1* presentó la misma sensibilidad a quetoconazol que la cepa parental (Fig. IV.30).

Los resultados obtenidos con este experimento demostraron que los efectos fenotípicos observados tras seleccionar uno o los dos alelos del gen *CWT1* eran debidos a la ausencia de este gen y no a cualquier otro efecto producido en la célula, ya que la reintegración y sobre-expresión de *CWT1* bajo el control del promotor del gen *CaPCK1* en el mutante nulo produjo la recuperación del fenotipo original observado para la cepa parental (Fig. IV.30).

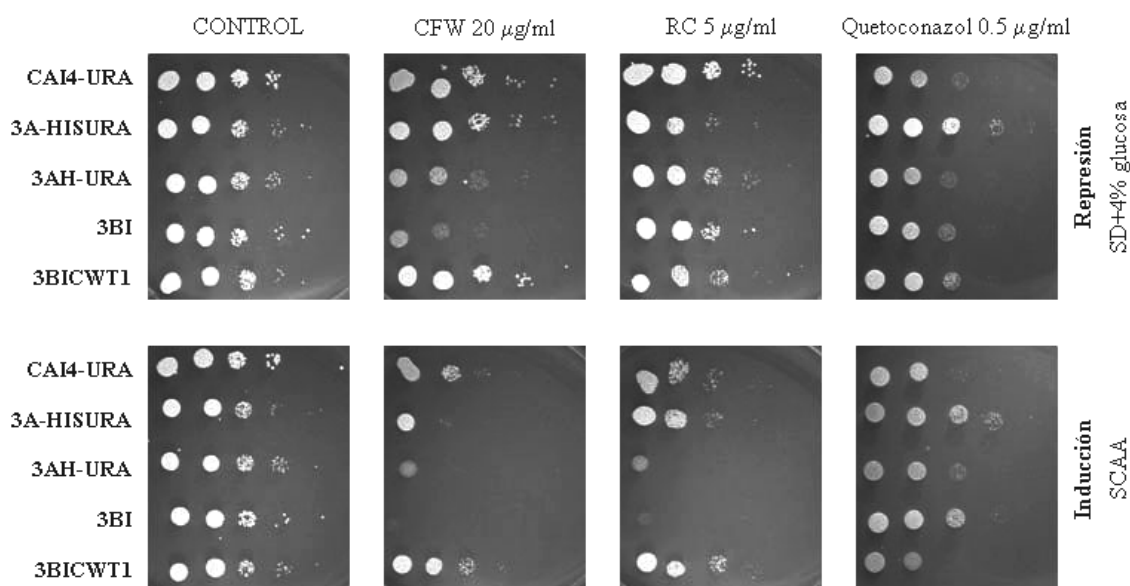


Figura IV.30- Análisis fenotípico de la cepa sobre-expresante de *CWT1*. Para demostrar que los efectos fenotípicos observados en el mutante nulo eran debidos a la disrupción de *CWT1* se reintegró el gen en la cepa mutante bajo el control de un promotor inducible y se realizaron pruebas de sensibilidad a sustancias como CFW y RC para las que la cepa mutante es hipersensible. Para analizar el efecto de estas sustancias sobre las distintas cepas se obtuvieron cultivos en condiciones de represión e inducción del promotor, se ajustaron a $D.O_{600nm}$ 1 y se realizaron diluciones decimales seriadas. Se gotearon 3 μ l de cada dilución en placas de los medios correspondientes que contenían CFW (0-20 mg/ml) y RC (0-5 mg/ml) y se incubaron 48 h a 28°C. La sobre-expresión de *CWT1* en la cepa mutante producía la recuperación del fenotipo original de la cepa parental.

IV.9- ANÁLISIS DEL PERFIL TRANSCRIPCIONAL DEL MUTANTE NULO *cwt1* Δ /*cwt1* Δ

A la vista de las múltiples alteraciones que reveló el estudio fenotípico del mutante nulo en el gen *CWT1* se puede deducir que un factor de transcripción puede regular simultáneamente diversos de genes (activando o reprimiendo su expresión) que estén involucrados en distintas funciones celulares.

Con el fin de estudiar la expresión global de los genes de *C. albicans* en respuesta a la interrupción del gen *CWT1*, se realizó un estudio del transcriptoma del mutante nulo (cepa 3AH) utilizando micromatrices de ADN específicas de *C. albicans*.

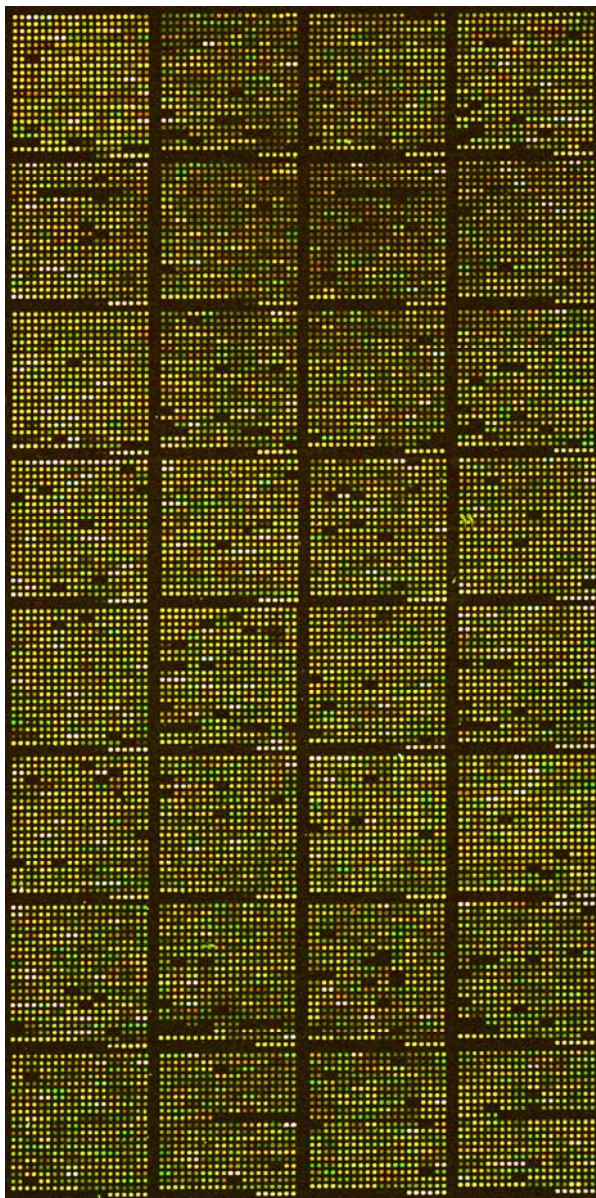


Fig IV.31- Imagen de una de las micromatrices de ADN utilizadas para el estudio transcripcional de los mutantes en el gen *CWT1*.

Las micromatrices de ADN (Fig. IV.31) fueron fabricadas por la empresa Eurogentec S.A. (Ivoz-Ramet, Belgium) en colaboración con el Consorcio Europeo Galar Fungail, proyecto en el cual participo nuestro grupo de investigación. En la fabricación de las micromatrices se utilizaron oligonucleótidos específicos de las 6039 ORFs del genoma de *C. albicans* para amplificar sondas, de un tamaño aproximado de 300 pb, correspondientes a cada uno de los genes.

Las 6039 sondas obtenidas, así como otros amplicones utilizados como controles se encuentran inmovilizados por duplicado en el soporte de la micromatriz.

Se realizaron micromatrices comparativas utilizando las cepas CNC43 y 3AH crecidas en medio YPD tanto en fase exponencial de crecimiento ($D.O_{600nm}=0.5$) como en fase estacionaria ($D.O_{600nm}=9$). Para cada condición de estudio se realizaron tres micromatrices con la finalidad de obtener resultados estadísticamente significativos. Además, en cada experimento se realizó un cambio de fluoróforo para normalizar las posibles diferencias en la eficiencia de emisión de ambos fluoróforos. La metodología utilizada, normalización de datos y análisis estadísticos seguidos en este experimento se describen en el capítulo de Materiales y Métodos (ver sección III.15).

IV.9.1- Perfil transcripcional del mutante nulo *cwt1Δ/cwt1Δ* en fase exponencial de crecimiento

El análisis de las micromatrices de ADN de células creciendo en fase exponencial mostró un total de 460 genes que modificaban su expresión (1.5 veces) en el mutante debido a la interrupción del gen *CWT1* (Fig. IV.32). Entre ellos se encontraron 233 genes sobre-expresados y 227 genes reprimidos. Del total de los genes cuya expresión está regulada por *CWT1*, 160 genes (35%) son de función desconocida.

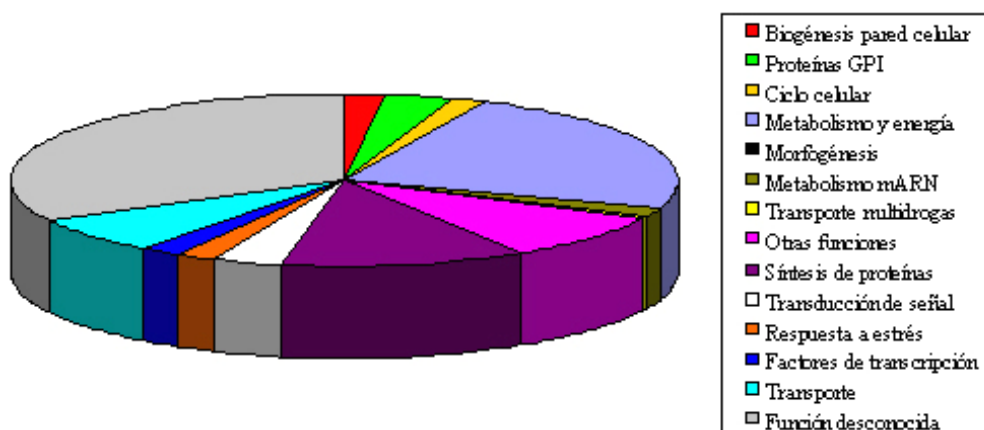


Figura IV.32- Distribución de los genes con expresión diferencial en el mutante nulo *cwt1Δ/cwt1Δ* en fase exponencial de crecimiento. Se consideraron genes con expresión diferencial a aquellos que presentaban un nivel de expresión superior a 1.5 o inferior a 0.6.

Debido a la gran cantidad de genes que modificaban su expresión como respuesta a la interrupción de *CWT1*, el análisis de los resultados de los micromatrices se focalizó en tres categorías funcionales:

- (i) genes implicados con la composición y arquitectura de la pared celular.
- (ii) genes relacionados con la síntesis de proteínas o proteínas ribosomales.
- (iii) genes que codifican para factores de transcripción.

IV.9.1.1- Genes involucrados en la arquitectura de la pared celular

Puesto que los estudios fenotípicos realizados sobre la cepa mutante revelaron una relación entre el factor de transcripción *Cwt1p* y la arquitectura de la pared celular, se analizaron los genes de esta categoría funcional que presentaban alteraciones de expresión en el mutante nulo.

Clasificados en esta categoría funcional se encontraron 23 genes con expresión diferencial en respuesta a la eliminación de *Cwt1p* de la célula, 8 genes relacionados con la organización de los componentes de la pared y 15 genes que codifican proteínas estructurales de pared (Tabla IV.3).

Tabla IV.3- Genes relacionados con la arquitectura de la pared celular de *C. albicans* que presentan un nivel de expresión diferencial en el mutante nulo *cwt1Δ/cwt1Δ* en fase exponencial.

GEN	ORF	FUNCIÓN	NIVEL DE EXPRESIÓN
<i>PGA13</i>	<i>orf19.6420</i>	Similar a proteínas tipo mucina	3.8
<i>PGA20</i>	<i>orf19.535</i>	Función desconocida	2.9
<i>ALS1</i>	<i>orf19.5741</i>	Proteína tipo aglutinina	2.9
<i>PGA54</i>	<i>orf19.2685</i>	Función desconocida	2.3
<i>PGA36</i>	<i>orf19.5760</i>	Función desconocida	2.3
<i>ECM33.3</i>	<i>orf19.3010.1</i>	Implicada en biogenesis y arquitectura de pared	2.1
<i>ALS4</i>	<i>orf19.2122</i>	Proteína tipo aglutinina	2.1
<i>ALS12</i>	<i>orf19.4556</i>	Proteína tipo aglutinina	2.1
<i>PGA6</i>	<i>orf19.4765</i>	Similar a <i>Flo1p</i>	1.8
<i>PGA1</i>	<i>orf19.7625</i>	Proteína de pared tipo GPI	1.8
<i>MNN9</i>	<i>orf19.7383</i>	Requerida para N-glicosilación	1.8
<i>TOS1</i>	<i>orf19.1690</i>	Teórica subunidad de anclaje de α -agglutinin	1.6
<i>PSA1</i>	<i>orf19.6190</i>	GDP-manosa pirofosforilasa	1.6
<i>SUN41</i>	<i>orf19.3642</i>	Teórica beta-glucosidasa de pared celular	1.6
<i>ANP1</i>	<i>orf19.3622</i>	Manosiltransferasa de Golgi	1.5
<i>IPF9096</i>	<i>orf19.2838</i>	Probable manosidasa	0.6
<i>GSL22</i>	<i>orf19.2495</i>	Subunidad de 1,3- β -D-glucan sintasa	0.6

GEN	ORF	FUNCIÓN	NIVEL DE EXPRESIÓN
<i>MNN3</i>	<i>orf19.4874</i>	α -1,2-manosiltransferasa de Golgi	0.6
<i>PIR1(IPF19968)</i>	<i>orf19.220</i>	Teórica proteína de pared de la familia PIR	0.6
<i>PGA15</i>	<i>orf19.2878</i>	Función desconocida	0.6
<i>HYR1</i>	<i>orf19.4975</i>	Proteína regulada en hifa	0.6
<i>PGA45</i>	<i>orf19.2451</i>	Función desconocida	0.5
<i>PGA29</i>	<i>orf19.5305</i>	Función desconocida	0.2

Entre los genes sobre-expresados, *MNN9* y *ANPI*, importantes para la manosilación de proteínas extracelulares, junto con la represión de la manosidasa *IPF9096*, podrían ser los causantes de la gran cantidad de manano presente en la pared de la cepa 3AH en fase exponencial de crecimiento. Además, se encontraron alteraciones en genes que codifican para enzimas relacionadas con la síntesis y degradación de β -glucano, como la sobre-expresión del gen que codifica la glucosidasa *SUN41* y la represión del gen de la glucan sintasa *GSL22*.

En cuanto a proteínas estructurales de pared, cabe destacar que la expresión de *PGA13* (un gen que actualmente está siendo estudiado en nuestro grupo de investigación) y *PGA20* se encontró aumentada 3.8 y 2.9 veces respectivamente. Además se encontraron sobre-expresados tres genes de la familia de aglutininas *ALS*, *ALS1*, *ALS4* y *ALS12*. Entre los genes reprimidos se encontró la *IPF19968*, uno de los dos alelos del gen *PIR1* que codifica para una proteína cuya función en la célula podría ser esencial (Martínez *et al.*, 2004). La represión más acusada ante falta de Cwt1p se detectó en el gen *PGA29*, nivel de expresión 0.2, que codifica para una proteína que se ha detectado en la superficie celular (De Groot *et al.*, 2004).

IV.9.1.2- Genes relacionados con la traducción de proteínas

Los genes que codifican para proteínas relacionadas con la traducción de proteínas constituyeron una de las categorías funcionales con más diferencias en los niveles de expresión en la cepa mutante nula respecto de la parental. Se encontraron 45 genes con expresión diferencial (Tabla IV.4), todos ellos sobre-expresados excepto *RPS27A* que presentaba una ligera represión (nivel de expresión 0.6).

Este grupo estaba formado en su mayoría por genes que codifican para proteínas ribosomales y entre ellos se encontró también el factor de elongación de la traducción *EFB1* con un nivel de expresión en el mutante de 1.9.

Tabla IV.4- Genes relacionados con traducción de proteínas de *C. albicans* que presentan un nivel de expresión diferencial en el mutante nulo *cwt1Δ/cwt1Δ* en fase exponencial.

GEN	ORF	FUNCIÓN	NIVEL DE EXPRESIÓN
<i>RPS24</i>	<i>orf19.5466</i>	Proteína ribosomal S24.e	3.3
<i>RPL38</i>	<i>orf19.2111.2</i>	Proteína ribosomal L38	2.9
<i>RPL25.3</i>	<i>orf19.687.1</i>	Proteína ribosomal L23a	2.7
<i>RPS26A</i>	<i>orf19.1470</i>	Proteína ribosomal S26.e.A, citosólica	2.7
<i>RPL11</i>	<i>orf19.2232</i>	Proteína ribosomal 60S	2.7
<i>RPL32</i>	<i>orf19.3415.1</i>	Proteína ribosomal L32	2.3
<i>IPF7840</i>	<i>orf19.4204</i>	Proteína ribosomal similar a <i>S. cerevisiae</i> Pet123p	2.1
<i>RPS7A</i>	<i>orf19.9267</i>	Proteína ribosomal	2.1
<i>RPL21A.3</i>	<i>orf19.840</i>	Proteína ribosomal	2.1
<i>RPS13.3</i>	<i>orf19.4193.1</i>	Proteína ribosomal	2.0
<i>RPS30.3</i>	<i>orf19.4375.1</i>	Proteína ribosomal S30 de 40S	2.0
<i>RPL43A.3</i>	<i>orf19.3942.1</i>	Proteína ribosomal	2.0
<i>EFB1</i>	<i>orf19.3838</i>	Factor de elongación de la traducción EF1beta	1.9
<i>RPL13</i>	<i>orf19.2994</i>	Proteína ribosomal	1.9
<i>RPL23B.3</i>	<i>orf19.3504</i>	Proteína ribosomal L23.e	1.9
<i>RPS22A</i>	<i>orf19.6265</i>	Proteína ribosomal S15a.e.c10	1.9
<i>RPS10.3</i>	<i>orf19.2179.2</i>	Proteína ribosomal	1.9
<i>RPL23.B</i>	<i>orf19.3504</i>	Proteína ribosomal L23	1.9
<i>IPF4955</i>	<i>orf19.7675</i>	Proteína ribosomal similar a <i>S. cerevisiae</i> Mrpl25p	1.8
<i>RPS4A</i>	<i>orf19.5341</i>	Proteína ribosomal S4	1.8
<i>RPS15.3</i>	<i>orf19.5927</i>	Proteína ribosomal S15 de 40S	1.8
<i>RPL19A.3</i>	<i>orf19.5904</i>	Proteína ribosomal L19	1.8
<i>RPL12</i>	<i>orf19.1635</i>	Proteína ribosomal	1.8
<i>RPS27</i>	<i>orf19.6286.2</i>	Proteína ribosomal S27	1.8
<i>RPL30.3</i>	<i>orf19.3788.1</i>	Proteína de unión a ARN	1.8
<i>RPS6A</i>	<i>orf19.4660</i>	Proteína ribosomal S6	1.7
<i>RPL17B</i>	<i>orf19.4490</i>	Proteína ribosomal L17	1.7
<i>RPS19A.3</i>	<i>orf19.5996.1</i>	Proteína ribosomal S19	1.7
<i>IPF5446</i>	<i>orf19.5698</i>	Teórica proteína ribosomal	1.7
<i>RPL81</i>	<i>orf19.6002</i>	Proteína ribosomal L7 de 60S	1.7
<i>RPS28B.3</i>	<i>orf19.7048.1</i>	Proteína ribosomal S28B	1.7
<i>RPS25B</i>	<i>orf19.6663</i>	Proteína ribosomal citosólica	1.7
<i>RPL24A</i>	<i>orf19.11269</i>	Proteína ribosomal L24	1.6
<i>YST1.EXON2</i>	<i>orf19.6975</i>	Proteína ribosomal	1.6
<i>RPL15B</i>	<i>orf19.8123</i>	Proteína ribosomal L15.e.c13	1.6
<i>RPL20B</i>	<i>orf19.4632</i>	Proteína ribosomal	1.6
<i>RPS22</i>	<i>orf19.6375</i>	Proteína ribosomal	1.6
<i>IPF9582</i>	<i>orf19.688</i>	Proteína ribosomal similar a <i>S. cerevisiae</i> Mrps18p	1.5
<i>RPL5</i>	<i>orf19.6541</i>	Proteína ribosomal	1.5
<i>MRPL8</i>	<i>orf19.6129</i>	Proteína ribosomal mitocondrial de 60S	1.5

GEN	ORF	FUNCIÓN	NIVEL DE EXPRESIÓN
<i>IPF3361</i>	<i>orf19.4018</i>	Teórica proteína ribosomal mitocondrial S7	1.5
<i>RPL18.EXON2</i>	<i>orf19.5982</i>	Proteína ribosomal RPL18B	1.5
<i>RPL10A</i>	<i>orf19.3465</i>	Proteína ribosomal L10A	1.5
<i>MRP17</i>	<i>orf19.947</i>	Proteína ribosomal mitocondrial	1.5
<i>RPS27A</i>	<i>orf19.413.1</i>	Proteína ribosomal S27.e	0.6

IV.9.1.3- Genes que codifican factores de transcripción

Entre la gran cantidad de genes con expresión diferencial encontrados en la cepa mutante en fase exponencial de crecimiento se identificaron 7 factores transcripcionales (Tabla IV.5). El análisis de estos factores de transcripción es importante ya que nos permite ver como responde la célula en términos de regulación ante la falta del factor de transcripción Cwt1p. Dentro de esta clasificación funcional se encontraron 5 genes sobre-expresados y sólo 2 genes reprimidos, *MBF1* y *SUA70*.

Tabla IV.5- Factores de transcripción de *C. albicans* que presentan un nivel de expresión diferencial en el mutante nulo *cwt1Δ/cwt1Δ* en fase exponencial de crecimiento.

GEN	ORF	FUNCIÓN	NIVEL DE EXPRESIÓN
<i>CTA29.EXON2</i>	<i>orf19.7127</i>	Proteína con dominio teórico de activación transcripcional	2.2
<i>CTA25.3F</i>	<i>orf19.362</i>	Activador transcripcional	2.1
<i>CTA241.EXON2</i>	<i>orf19.5699.1</i>	Activador transcripcional	2.1
<i>SSN6</i>	<i>orf19.6798</i>	Represor transcripcional	1.8
<i>CTA24.3</i>	<i>orf19.4054</i>	Activador transcripcional	1.7
<i>MBF1</i>	<i>orf19.3294</i>	Factor de unión de multiproteínas que facilita la activación transcripcional dependiente de Gcn4	0.6
<i>SUA70</i>	<i>orf19.3059</i>	Subunidad del factor de iniciación de la transcripción TFIIB	0.5

IV.9.2- Perfil transcripcional del mutante nulo *cwt1Δ/cwt1Δ* en fase estacionaria de crecimiento

El análisis de los datos obtenidos de las micromatrices de células crecidas hasta alcanzar la fase estacionaria tardía de crecimiento ($D.O_{600nm}=9$), que es donde el gen *CWT1* se expresa mayoritariamente, mostró un total de 666 genes cuya expresión

aparecía modificada como resultado de la interrupción de dicho gen (Fig. IV.33), 345 sobre-expresados y 321 genes reprimidos. Del total de los genes cuya expresión está regulada por Cwt1p en fase estacionaria de crecimiento, 229 genes (34%) son de función desconocida.

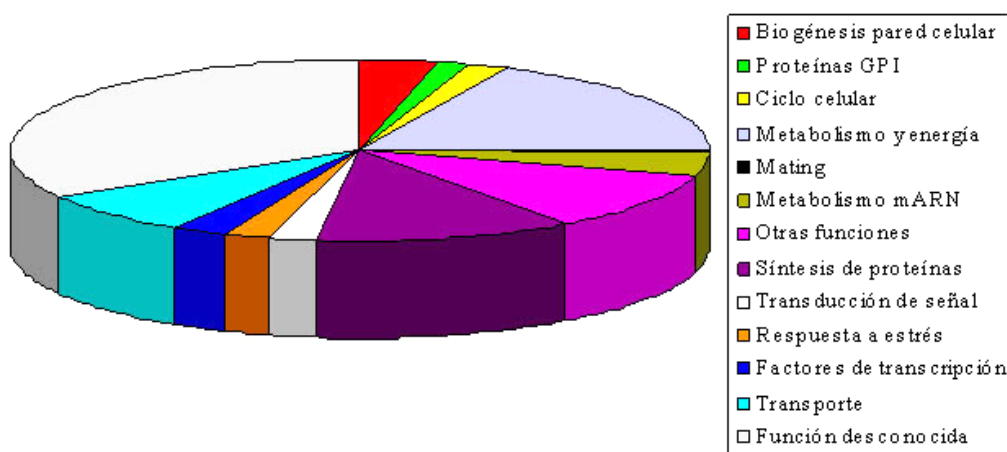


Figura IV.33- Distribución de los genes con expresión diferencial en el mutante nulo *cwt1Δ/cwt1Δ* en fase estacionaria de crecimiento. Se consideró genes con expresión diferencial a aquellos que presentaban un nivel de expresión superior a 1.5 o inferior a 0.6.

Al igual que se hizo con el estudio del perfil transcripcional de la fase exponencial de crecimiento, en fase estacionaria el análisis de micromatrices se limitó a los genes relacionados con la pared celular, síntesis de ribosomas y proteínas, y otros factores de transcripción.

IV.9.2.1- Genes involucrados en la arquitectura de la pared celular

Se encontraron 34 genes con expresión diferencial respecto de la cepa control dentro de esta categoría (Tabla IV.6). Entre ellos había 10 genes que codifican para proteínas estructurales de pared celular y 23 genes de proteínas con una función catalítica en la biogénesis o ensamblaje de los componentes de la pared celular.

De estos últimos cabe destacar la presencia de varios genes de enzimas responsables de la degradación de glucano como: *SCW11*, *SUN41*, *IPF6318*, *BGL21*, *SUN42*, y *BGL22* (niveles de expresión: 2.3, 1.9, 1.6, 1.6, 1.5 y 0.6 respectivamente).

Tabla IV.6- Genes relacionados con la biogénesis de la pared celular de *C. albicans* que presentan nivel de expresión diferencial en el mutante *cwt1Δ/cwt1Δ* en fase estacionaria de crecimiento.

GEN	ORF	FUNCIÓN	NIVEL DE EXPRESIÓN
<i>CHT3</i>	<i>orf19.7586</i>	Precursor de quitinasa 3	2.9
<i>PGA20</i>	<i>orf19.535</i>	Función desconocida	2.9
<i>SAP9</i>	<i>orf19.6928</i>	Proteinasa aspártica 9	2.3
<i>SCW11.3EOC</i>	<i>orf19.3893</i>	Miembro de la familia de glucanasas	2.3
<i>TOS1</i>	<i>orf19.1690</i>	Hipotética subunidad de anclaje de α -aglutinina	2.2
<i>GLC3</i>	<i>orf19.13067</i>	Enzima ramificante de 1,4-glucano	1.9
<i>SUN41</i>	<i>orf19.3642</i>	Hipotética β -glucosidasa de pared celular	1.9
<i>PGA54</i>	<i>orf19.2685</i>	Función desconocida	1.9
<i>PMT1</i>	<i>orf19.5171</i>	Manosiltransferasa	1.8
<i>MNT1</i>	<i>orf19.1665</i>	Manosiltransferasa implicada en <i>N</i> - y <i>O</i> -glicosilación	1.8
<i>KRE6</i>	<i>orf19.7363</i>	Subunidad de glucan sintasa	1.7
<i>MNN9</i>	<i>orf19.7383</i>	Requerido para <i>N</i> -glicosilación compleja	1.6
<i>BGL21</i>	<i>orf19.4565</i>	Endo- β -1,3-glucanasa	1.6
<i>IPF6318</i>	<i>orf19.1664</i>	β -glucosidasa	1.6
<i>PGA38</i>	<i>orf19.10273</i>	Función desconocida	1.6
<i>SAP1</i>	<i>orf19.5714</i>	Proteinasa aspártica	1.5
<i>SUN42</i>	<i>orf19.5032</i>	Teórica β -glucosidasa de pared celular	1.5
<i>IPF9647</i>	<i>orf19.3994</i>	Similar a subunidad γ -oligosiltransferasa de ScOst3	1.5
<i>RHO1</i>	<i>orf19.2843</i>	Proteína de union a GTP de la familia Ras	1.5
<i>ANP1</i>	<i>orf19.3622</i>	Manosiltransferasa de Golgi	1.5
<i>PGA14</i>	<i>orf19.968</i>	Función desconocida	1.5
<i>PGA4</i>	<i>orf19.4035</i>	Putative GPI-anchored protein	1.5
<i>PGA35</i>	<i>orf19.4910</i>	Función desconocida	1.5
<i>BGL22</i>	<i>orf19.7339</i>	Endo- β -1,3-glucanasa	0.6
<i>IPF6332</i>	<i>orf19.1112</i>	Similar a la proteína de biosíntesis de quitina ScBud7 implicada en posicionamiento de la yema	0.6
<i>CHS3.5F</i>	<i>orf19.4938</i>	Quitín-UDP acetil-glucosamil transferasa 3	0.6
<i>IPF5604</i>	<i>orf19.2996</i>	Función desconocida	0.6
<i>PGA17</i>	<i>orf19.893</i>	Función desconocida	0.6
<i>PLB3</i>	<i>orf19.6594</i>	Fosfolipasa B	0.6
<i>PCM1</i>	<i>orf19.5013</i>	Fosfoacetilglucosamina mutasa	0.5
<i>GSL22</i>	<i>orf19.2495</i>	Subunidad de β -1,3-glucano sintasa	0.5
<i>CWH41.5EOC</i>	<i>orf19.4421</i>	Glucosidasa I de reticulo endoplásmico	0.4
<i>PGA37</i>	<i>orf19.3923</i>	Función desconocida	0.4

IV.9.2.2- Genes relacionados con la traducción de proteínas

En fase estacionaria de crecimiento, 62 genes relacionados con el proceso de traducción de proteínas mostraron alterado su nivel de expresión (53 sobre-expresados y 9 reprimidos) en el mutante nulo *cwt1Δ/cwt1Δ*. La tendencia dentro de este grupo fue similar a la observada en la fase exponencial de crecimiento, con una mayoría de genes que codifican para proteínas ribosomales y sólo 2, en este caso, relacionados con el proceso de traducción, *SUI2* y *EFB1*, que codifican para factores de iniciación y elongación, respectivamente, de la traducción (Tabla IV.7).

Tabla IV.7- Genes relacionados con traducción de proteínas de *C. albicans* que presentan un nivel de expresión diferencial en el mutante nulo *cwt1Δ/cwt1Δ* en fase estacionaria.

GEN	ORF	FUNCIÓN	NIVEL DE EXPRESIÓN
<i>RPL32</i>	<i>orf19.3415.1</i>	Proteína ribosomal L32	3.2
<i>RPL10A</i>	<i>orf19.3465</i>	Proteína ribosomal L10A	2.7
<i>EFB1</i>	<i>orf19.3838</i>	Factor de elongación de la traducción EF1beta	2.5
<i>RPS12</i>	<i>orf19.6785</i>	Proteína ribosomal S12	2.5
<i>RPS17.3</i>	<i>orf19.2329.1</i>	Proteína ribosomal S17	2.5
<i>RPL24A</i>	<i>orf19.11269</i>	Proteína ribosomal L24	2.5
<i>RPS13.3</i>	<i>orf19.4193.1</i>	Proteína ribosomal	2.4
<i>RPL81</i>	<i>orf19.6002</i>	Proteína ribosomal de 60S L7a.e.B	2.4
<i>BEL1.EXON2</i>	<i>IPF2221.1</i>	Proteína ribosomal de 40S	2.3
<i>RPL15B</i>	<i>orf19.8123</i>	Proteína ribosomal L15.e.c13	2.3
<i>RPL25.3</i>	<i>orf19.687.1</i>	Proteína ribosomal L23	2.2
<i>RPS22A</i>	<i>orf19.6265</i>	Proteína ribosomal S15a.e.c10	2.2
<i>RPL43A.3</i>	<i>orf19.3942.1</i>	Proteína ribosomal	2.2
<i>RPL82</i>	<i>orf19.2311</i>	Proteína ribosomal de 60S L7a.e.B	2.2
<i>BEL1.EXON1</i>	<i>orf19.6906</i>	Proteína ribosomal de 40S	2.2
<i>RPL19A.3</i>	<i>orf19.5904</i>	Proteína ribosomal L19.e	2.1
<i>RPS6A</i>	<i>orf19.4660</i>	Proteína ribosomal S6	2.1
<i>RPS22</i>	<i>orf19.6375</i>	Proteína ribosomal	2
<i>RPS19A.3</i>	<i>orf19.3942.1</i>	Proteína ribosomal S19.e	2
<i>RPL20B</i>	<i>orf19.4632</i>	Proteína ribosomal	1.9
<i>RPS21</i>	<i>orf19.3334</i>	Proteína ribosomal	1.9
<i>RPL9B</i>	<i>orf19.236</i>	Proteína ribosomal L9	1.9
<i>RPL18.EXON2</i>	<i>orf19.5982</i>	Proteína ribosomal L18B	1.9
<i>RPS15.3</i>	<i>orf19.5927</i>	Proteína ribosomal de 40S S15	1.8
<i>RPL7A.3</i>	<i>orf19.2478.1</i>	Proteína ribosomal de 60S L7-A	1.8
<i>RPS4A</i>	<i>orf19.5341</i>	Proteína ribosomal S4	1.8
<i>RPL38</i>	<i>orf19.2111.2</i>	Proteína ribosomal L38	1.8
<i>RPS22.EXON2</i>	<i>orf19.6265</i>	Proteína ribosomal S15a	1.8
<i>RPS31</i>	<i>orf19.3087</i>	Proteína de unión a ubiquitina	1.7
<i>RPP2B</i>	<i>orf19.5928</i>	Proteína ribosomal	1.7
<i>YST1.EXON2</i>	<i>orf19.6975</i>	Proteína ribosomal	1.7

GEN	ORF	FUNCIÓN	NIVEL DE EXPRESIÓN
<i>RPS10</i>	<i>orf19.10520</i>	Proteína ribosomal 10	1.7
<i>RPL3</i>	<i>orf19.1601</i>	Proteína ribosomal de 60S L3.e	1.7
<i>RPL21A.3</i>	<i>orf19.840</i>	Proteína ribosomal	1.7
<i>RPS7A</i>	<i>orf19.9267</i>	Proteína ribosomal	1.7
<i>PRORS.3F</i>	<i>orf19.2533</i>	Prolil-tRNA sintasa	1.7
<i>RPL12</i>	<i>orf19.1635</i>	Proteína ribosomal	1.7
<i>RPP1B</i>	<i>orf19.7188</i>	Proteína ribosomal L44	1.6
<i>RPL6.3</i>	<i>orf19.3003.1</i>	Proteína ribosomal	1.6
<i>RPL30.3</i>	<i>orf19.3788.1</i>	Proteína de union a RNA	1.6
<i>RPS30.3</i>	<i>orf19.4375.1</i>	Proteína ribosomal de 40S S30	1.6
<i>MRP7</i>	<i>orf19.7203</i>	Precursor de proteína ribosomal mitocondrial YmL2	1.6
<i>RPL10E</i>	<i>orf19.7015</i>	Proteína ribosomal L10, citosólica	1.6
<i>RPS24</i>	<i>orf19.5466</i>	Proteína ribosomal S24.e	1.6
<i>RPP2</i>	<i>orf19.6403.1</i>	Proteína ribosomal	1.6
<i>RPL37B</i>	<i>orf19.667.1</i>	Proteína ribosomal	1.6
<i>RPL5</i>	<i>orf19.6541</i>	Proteína ribosomal	1.6
<i>RPS18</i>	<i>orf19.7018</i>	Proteína ribosomal S18	1.5
<i>RPS16.3</i>	<i>orf19.2994.1</i>	Proteína ribosomal	1.5
<i>RPA1</i>	<i>orf19.2992</i>	Proteína ribosomal de 60S	1.5
<i>RPL23B.3</i>	<i>orf19.3504</i>	Proteína ribosomal L23.e	1.5
<i>RPL16A</i>	<i>orf19.6085</i>	Proteína ribosomal	1.5
<i>RPL11</i>	<i>orf19.2232</i>	Proteína ribosomal de 60S	1.5
<i>MSK1</i>	<i>orf19.6533</i>	Lisil-tRNA	0.6
<i>IPF9150</i>	<i>orf19.9441</i>	Requerida para síntesis de proteínas, similar a <i>S. cerevisiae</i> Mpt1p	0.6
<i>YML6</i>	<i>orf19.7019</i>	Proteína ribosomal	0.6
<i>MRPL40</i>	<i>orf19.484</i>	Teórica proteína ribosomal mitocondrial	0.6
<i>MRPL6</i>	<i>orf19.7486</i>	Precursor de proteína ribosomal L6 mitocondrial	0.5
<i>MRPL27</i>	<i>orf19.3064</i>	Proteína ribosomal	0.5
<i>RPS27A</i>	<i>orf19.413.1</i>	Proteína ribosomal S27.e	0.4
<i>IPF823</i>	<i>orf19.7245</i>	tRNA metiltransferasa	0.4
<i>SUI2</i>	<i>orf19.6213</i>	Factor de iniciación de la traducción IF2	0.4

IV.9.2.3- Genes que codifican para factores de transcripción

Dentro de la clasificación funcional de factores de transcripción, se hallaron 16 genes que presentaban diferencias de expresión en la cepa mutante 3AH en comparación con la cepa control CNC43 en fase estacionaria de crecimiento (Tabla IV.8). En este caso, al contrario de lo que ocurría en fase exponencial, la mayoría de genes estaban reprimidos, presentando valores de expresión relativa entre 0.6 y 0.2, y sólo uno, *IPF14782*, presentó un nivel de expresión superior en el mutante nulo que el la cepa parental.

Tabla IV.8- Factores de transcripción de *C. albicans* que presentan un nivel de expresión diferencial en el mutante nulo *cwt1Δ/cwt1Δ* en fase estacionaria de crecimiento.

GEN	ORF	FUNCIÓN	NIVEL DE EXPRESIÓN
<i>IPF14782</i>	<i>orf19.1566</i>	β-transducina	2
<i>MBF1</i>	<i>orf19.3294</i>	Factor de unión de multiproteínas que facilita la activación transcripcional dependiente de Gcn4	0.6
<i>IPF6067</i>	<i>orf19.6734</i>	Teórico factor de transcripción	0.6
<i>CAT8</i>	<i>orf19.12563</i>	Factor de transcripción implicado en gluconeogénesis	0.6
<i>SSU72</i>	<i>orf19.9939</i>	Supresor de mutante <i>cs</i> de <i>sua7</i>	0.6
<i>SPT20</i>	<i>orf19.422</i>	Factor de transcripción miembro del complejo histona acetiltransferasa SAGA	0.6
<i>IPF19850</i>	<i>orf19.1227</i>	Función desconocida	0.6
<i>IPF13021</i>	<i>orf19.2647</i>	Función desconocida	0.6
<i>IPF9704</i>	<i>orf19.12345</i>	Similar a la subunidad TFIIE de ScTfa2	0.5
<i>IPF556</i>	<i>orf19.7098</i>	Regulador transcripcional	0.5
<i>TYE7</i>	<i>orf19.4941</i>	Factor de transcripción de tipo hélice-bucle-hélice	0.5
<i>LEU3</i>	<i>orf19.11700</i>	Unión a motivo UAS de los promotores de <i>LEU1</i> , <i>LEU2</i> , <i>LEU4</i> , <i>ILV2</i> , <i>ILV5</i> y <i>GDH1</i>	0.5
<i>SWI1</i>	<i>orf19.5657</i>	Regulador transcripcional	0.4
<i>RRN3</i>	<i>orf19.1923</i>	Factor de transcripción específico de ARN polimerasa I	0.4
<i>IPF9826</i>	<i>orf19.11621</i>	Función desconocida	0.3
<i>IPF9251</i>	<i>orf19.5133</i>	Función desconocida	0.2

IV.9.3- Validación de los resultados de las micromatrices de ADN del mutante nulo *cwt1Δ/cwt1Δ*

Para validar los datos obtenidos en el estudio del transcriptoma del mutante nulo tanto en fase exponencial como en estacionaria, se confirmaron los datos de expresión de algunos genes por RT-PCR semicuantitativa. Los niveles de expresión obtenidos en las micromatrices y por RT-PCR semicuantitativa se compararon para cada gen, observando una buena correlación de ambos valores en todos los casos (Fig. IV.34). Se realizaron PCRs con ARN como molde para asegurar que no había contaminaciones de ADN genómico en las muestras de ARN (no mostrado).

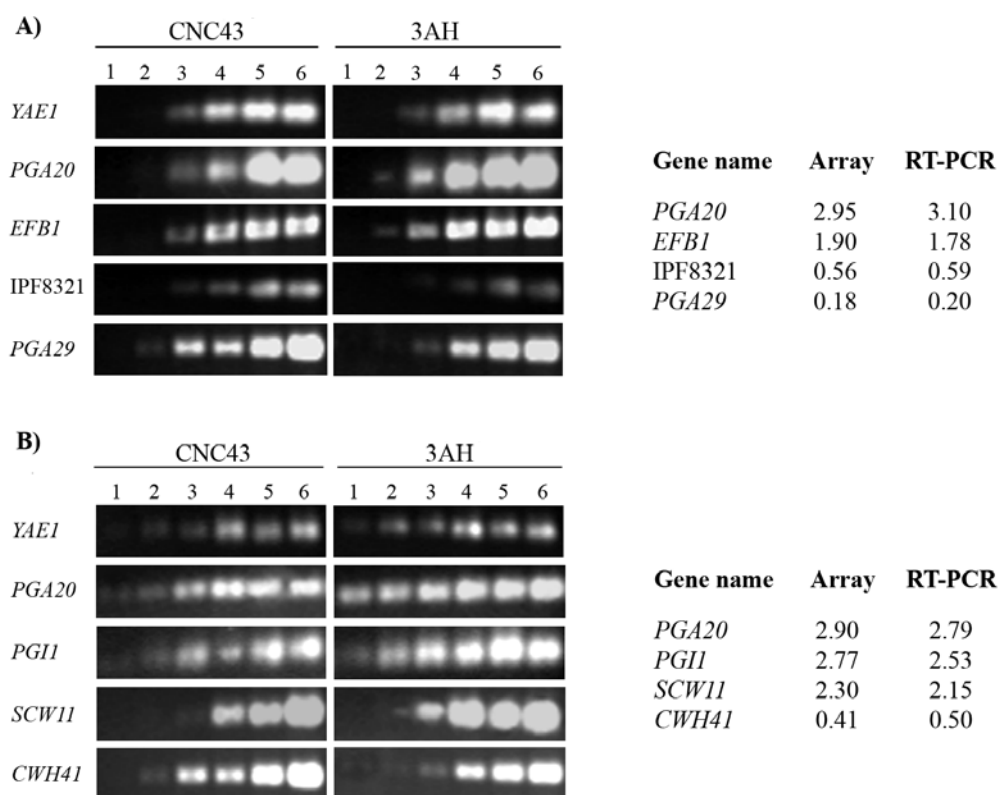


Figura IV.34- Confirmación de los niveles de expresión obtenidos en las micromatrices del mutante nulo *cwt1Δ/cwt1Δ* por RT-PCR semicuantitativa. Los niveles de expresión en el mutante nulo de algunos genes seleccionados por presentar expresión diferencial en las micromatrices de cADN fueron comparados con su nivel de expresión en la cepa parental. La expresión del gen *YAE1* fue utilizada como control de carga. Los números 1-6 representan los ciclos a los que las muestras fueron obtenidas (20, 22, 24, 26, 28, 30). (A) Genes seleccionados del experimento en fase exponencial. (B) Genes seleccionados del experimento en fase estacionaria. En ambos casos se encontró una buena correlación entre los datos de las micromatrices y los obtenidos por RT-PCR semicuantitativa como se muestra en las tablas de la derecha.

IV.9.4- Perfil transcripcional del mutante nulo *cwt1Δ/cwt1Δ* a lo largo del ciclo poblacional

Tras analizar el transcriptoma de la cepa mutante 3AH respecto de la parental CNC43 en las fases exponencial y estacionaria de crecimiento, se realizó una comparación de ambos perfiles transcripcionales para determinar los genes que se encontraban comúnmente regulados por Cwt1p en ambas condiciones. Con los datos

de las micromatrices se realizó un diagrama de Venn que muestra los genes que presentan expresión diferencial en el mutante nulo en ambos experimentos.

Se encontraron 121 genes regulados por Cwt1p independientemente de la fase de crecimiento (Fig. IV.35).

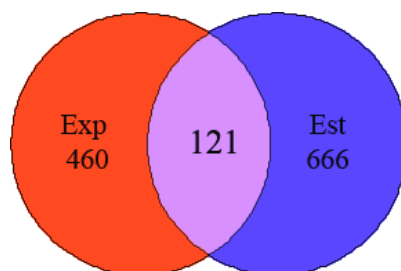


Figura IV.35- Diagrama de Venn del transcriptoma del mutante nulo *cwt1Δ/cwt1Δ* a lo largo de ciclo poblacional. Exp, número de genes regulados por Cwt1p en fase exponencial de crecimiento; Est, número de genes regulados por Cwt1p en fase estacionaria de crecimiento.

Los genes con expresión alterada en ambas fases de crecimiento en el mutante homocigótico se clasificaron por categorías funcionales para conocer cuales eran los procesos celulares más afectados por la falta de este factor de transcripción (Fig. IV.36). El análisis conjunto de los datos obtenidos en los dos experimentos con micromatrices de ADN reveló que el grupo con mayor proporción de genes alterados frente a la falta de Cwt1p era el de genes relacionados con biosíntesis de proteínas y síntesis de proteínas ribosomales, que representaba un 26% del total de genes (ver apartados IV.9.1.2 y IV.9.2.2). Otros grupos importantes en este análisis fueron el de genes relacionados con (i) metabolismo y obtención de energía, que representa el 20% de los genes con expresión diferencial, y (ii) genes relacionados con la arquitectura de la pared celular (ver apartados IV.9.1.1 y IV.9.2.1), que representan un 8% del total (Fig. IV.36).

Los genes que codifican enzimas metabólicas y de obtención de energía respondían generalmente con la misma pauta de regulación a la delección de *CWT1*, es decir se encontraban o sobre-expresados o reprimidos en ambas fases de crecimiento.

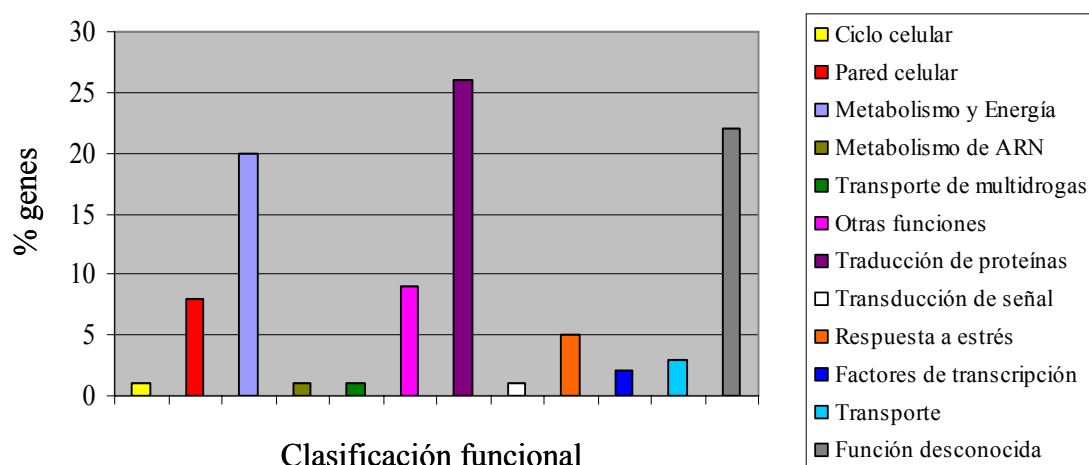


Figura IV.36- Histograma de categorías funcionales comúnmente afectadas en el mutante nulo *cwt1Δ/cwt1Δ* en fase exponencial y estacionaria de crecimiento. Las barras muestran el porcentaje de genes de cada categoría funcional con expresión diferencial respecto del número total de genes.

Sin embargo, los genes que codifican para proteínas involucradas en la síntesis de glicerol presentaban respuestas distintas a la falta de Cwt1p en las distintas fases de crecimiento (Fig. IV.37). Los genes de las enzimas de esta ruta biosintética se veían mayoritariamente reprimidos en el mutante nulo creciendo en fase exponencial, pero estos mismos genes se encontraban sobre-expresados en el mutante nulo cuando las células crecían hasta fase estacionaria tardía de crecimiento.

Finalmente, en cuanto a otros factores de transcripción con diferencias de expresión en el mutante nulo, se observó que mientras en fase exponencial y estacionaria de crecimiento había varios factores de transcripción desregulados por la carencia de Cwt1p, sólo uno *MBF1* presentaba expresión diferencial en ambas condiciones estudiadas.

IV.9.4.1- Análisis del patrón de expresión de *cwt1Δ/cwt1Δ* con el programa informático T-profiler

Con los datos generados tras el análisis de las micromatrices de ADN se realizó un estudio *in silico* para identificar las funciones celulares afectadas por la delección de *CWT1*.

T-profiler es un programa informático (<http://www.t-profiler.org>) que permite el estudio de expresión global de *S. cerevisiae* y *C. albicans* usando los resultados de micromatrices de ADN (Boorsma *et al.*, 2005). Mediante un análisis estadístico se relaciona el nivel de expresión de cada gen con su programa transcripcional o el estado celular global, para ello asigna a cada valor de expresión un t-valor (positivo indica que el grupo de genes está mayoritariamente sobre-expresado y negativo que la mayoría de genes dentro de este grupo están reprimidos), y un E-valor (menor de 0.05 para valores estadísticamente significativos).

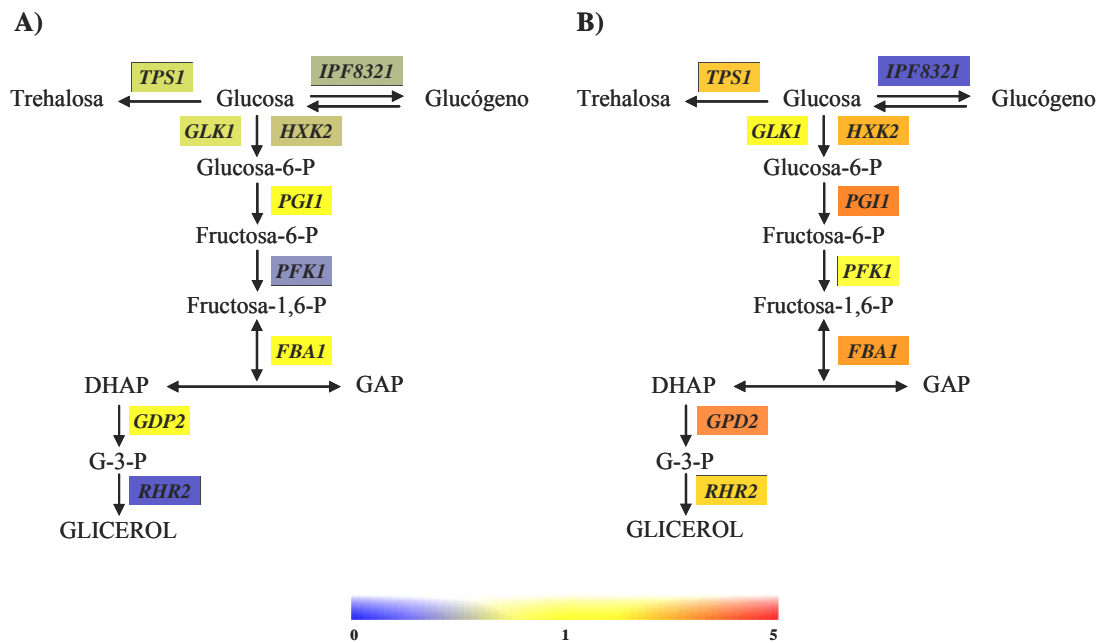


Figura IV.37- Regulación transcripcional de la síntesis de glicerol en el mutante nulo *cwt1Δ/cwt1Δ*. (A) Fase exponencial de crecimiento. (B) Fase estacionaria de crecimiento. *TPS1*, trehalosa-6-P-sintasa; *GLK1*, glucoquinasa; *HXK2*, hexoquinasa; *PGII*, Fosfogluco isomerasa; *PFKI*, Fosfofructoquinasa; *FBAI*, aldolasa; *GPD2*, glicerol-3-P-deshidrogenasa; *RHR2*, glicerol-3-fosfatasa. (Adaptado de Liu *et al.*, 2003).

Una vez correlacionados todos los datos, el programa facilita los grupos funcionales más afectados en el experimento y el número de ORFs que podrían estar afectadas para cada función celular descrita.

Los resultados del análisis con T-profiler para las micromatrices del mutante nulo se muestran en la tabla IV.9. Las funciones celulares reguladas en el mutante nulo por Cwt1p de manera más importante, según el programa T-profiler, tanto en fase exponencial, como en fase estacionaria comprenden: (i) la biogénesis de ribosomas, (ii) la síntesis de proteínas, y (iii) la biosíntesis de la pared celular.

Tabla IV.9- Análisis de funciones celulares alteradas en el mutante nulo con el programa informático T-profiler. (*, valores estadísticamente no significativos)

Función celular	ORFs	FASE EXPONENCIAL		FASE ESTACIONARIA	
		t-value	E-value	t-value	E-value
Ribosoma	112	12.41	<1.0E-15	9.79	<1.0E-15
Ribosoma citosólico	47	11.57	<1.0E-15	12.16	<1.0E-15
Biosíntesis de proteínas	249	9.94	<1.0E-15	8.89	<1.0E-15
Metabolismo de proteínas	588	5.73	1.5E-06	6.48	1.3E-08
Pared celular y morfología celular	21	*1.62	1.0	4.65	4.8E-04
Ensamblaje de subunidades ribosómicas	26	4.89	1.5E-04	*3.80	1.8E-01
Organización y biogénesis de la célula	589	4.48	1.1E-03	3.95	1.1E-02
Actividad reguladora de traducción	37	3.62	4.2E-02	4.28	2.7E-03
Pared celular	68	*0.62	1.0	3.84	1.8E-02

IV.10- PERFIL TRANSCRIPCIONAL DEL MUTANTE HETEROCIGÓTICO *CWT1/cwt1Δ*

El análisis fenotípico de las cepas mutantes en uno o dos alelos de *CWT1* (3A y 3AH, respectivamente) mostró diferencias de comportamiento inesperadas entre ambas cepas (ver sección IV.7). Con la finalidad de estudiar los posibles mecanismos moleculares responsables de estas diferencias se realizó un estudio global del transcriptoma del mutante heterocigótico *CWT1/cwt1Δ*.

Se realizaron micromatrices comparativas de las cepas CNC43 y 3A crecidas tanto en fase exponencial de crecimiento ($D.O_{600nm}=0.5$) como en fase estacionaria ($D.O_{600nm}=9$) siguiendo el mismo proceso descrito para el estudio de micromatrices del mutante nulo (ver sección IV.9).

IV.10.1- Perfil transcripcional del mutante heterocigótico *CWT1/cwt1Δ* en fase exponencial de crecimiento

El análisis de las micromatrices de la cepa 3A (mutante heterocigótico para el gen *CWT1*) creciendo en fase exponencial mostró un total de 192 genes que modificaban su expresión en el mutante (1.5 veces respecto al nivel de expresión en la cepa parental) debido a la interrupción de uno de los alelos del gen *CWT1* (Fig. IV.38).

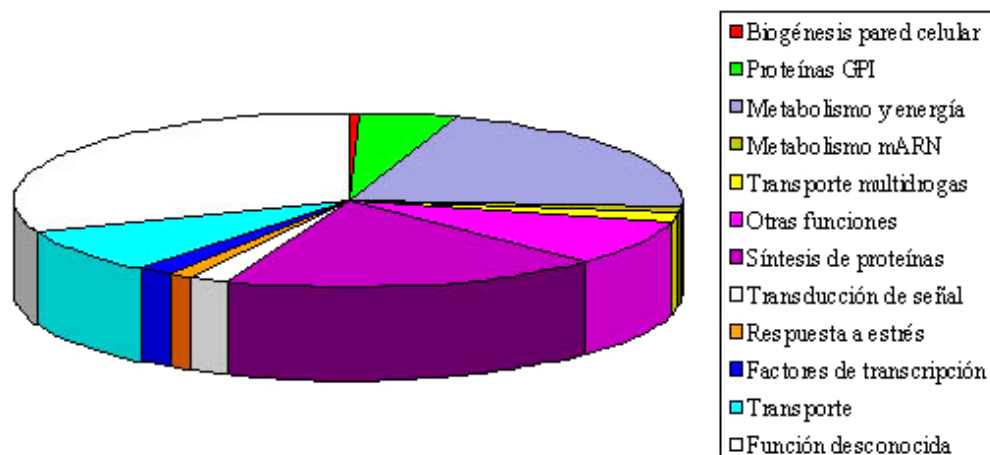


Figura IV.38- Distribución de los genes con expresión diferencial en el mutante heterocigótico *CWT1/cwt1Δ* en fase exponencial de crecimiento. Se consideró genes con expresión diferencial a aquellos que presentaban un nivel de expresión superior a 1.5 o inferior a 0.6.

Entre ellos se encontraron 130 genes sobre-expresados y 62 genes reprimidos. Del total de los genes cuya expresión está regulada por la falta de un alelo de *CWT1*, 60 genes (31%) son de función desconocida.

El análisis de los resultados de las micromatrices del mutante heterocigótico, 3A, en fase exponencial de crecimiento se focalizó en tres categorías funcionales:

- (i) genes relacionados con la arquitectura de la pared celular.
- (ii) genes implicados en respuesta a estrés oxidativo.
- (iii) genes que codifican para factores de transcripción.

IV.10.1.1- Genes involucrados en la arquitectura de la pared celular

El estudio de la composición e integridad de pared celular reveló que las alteraciones producidas en el mutante heterocigótico a nivel de pared eran pequeñas (ver sección IV.7.6). Sin embargo, puesto que el mutante nulo en *Cwt1p* presentaba un efecto importante en la arquitectura de la pared, se realizó un análisis de los genes implicados en esta función celular que presentaban alteraciones de expresión en la cepa 3A.

Clasificados en esta categoría funcional se encontraron 10 genes con expresión diferencial en respuesta a la eliminación de un alelo de *CWT1*, 9 genes que codifican proteínas estructurales de pared y sólo 1 gen, *EXG1* que codifica para una enzima de

degradación de glucano, relacionado con la biosíntesis y organización de sus componentes (Tabla IV.10).

Tabla IV.10- Genes relacionados con la biosíntesis de la pared celular que presentan un nivel de expresión diferencial en el mutante heterocigótico *CWT1/cwt1Δ* en fase exponencial de crecimiento.

GEN	ORF	FUNCIÓN	NIVEL DE EXPRESIÓN
<i>RBT5</i>	<i>orf19.5636</i>	Proteína de pared celular de micelio	2.1
<i>ALS4</i>	<i>orf19.2122</i>	Proteína tipo aglutinina	1.9
<i>PGA10</i>	<i>orf19.5674</i>	Proteína implicada en utilización de hierro	1.9
<i>PGA1</i>	<i>orf19.7625</i>	Proteína de superficie de tipo GPI	1.9
<i>ALS1</i>	<i>orf19.5741</i>	Proteína tipo aglutinina	1.8
<i>PLB4.5</i>	<i>orf19.1442</i>	Fosfolipasa	1.7
<i>PLB4.3</i>	<i>orf19.1443</i>	Fosfolipasa	1.7
<i>PGA29</i>	<i>orf19.5305</i>	Función desconocida	0.6
<i>PGA6</i>	<i>orf19.4765</i>	Similar a proteína Flo1p	0.6
<i>EXG1</i>	<i>orf19.2990</i>	β -1,3-glucosidasa	0.6

Entre los genes sobre-expresados, se encuentran dos genes de aglutininas *ALS1* y *ALS4* y el gen de la fosfolipasa *PLB4*, todos ellos codificando para proteínas que actúan como factores de virulencia de *C. albicans*.

IV. 10.1.2- Genes relacionados con respuesta a estrés oxidativo

A la vista de los resultados obtenidos en las pruebas fenotípicas del mutante heterocigótico en respuesta a peróxido de hidrógeno y bleomicina (ver secciones IV.7.3 y IV.7.5) se analizaron los datos obtenidos en los experimentos de micromatrices de ADN en busca de una justificación para este comportamiento de la cepa mutante en un alelo.

Entre los genes que presentaban diferencias de expresión en el mutante heterocigótico respecto de la cepa parental, se encontraron 11 genes relacionados con respuesta a estrés oxidativo y también involucrados en procesos de captación y utilización de hierro, así como procesos de oxido-reducción de metales como hierro y cobre (Tabla IV.11).

Tabla IV.11- Genes de respuesta a estrés oxidativo que presentan un nivel de expresión diferencial en el mutante heterocigótico *CWT1/cwt1Δ* en fase exponencial de crecimiento.

GEN	ORF	FUNCIÓN	NIVEL DE EXPRESIÓN
<i>SOD22.3</i>	<i>orf19.7111</i>	Superóxido dismutasa	8.6
<i>FRE30.5</i>	<i>orf19.6140</i>	Alta homología con reductasas férricas	6.9
<i>FRE30.3</i>	<i>orf19.6139</i>	Alta homología con reductasas férricas	5.9
<i>FRE7</i>	<i>orf19.7077</i>	Activada reductasa férrica y quelante de hierro	2.9
<i>FET34.3</i>	<i>orf19.1206</i>	Ferroxidasa regulada por hierro	2.4
<i>FET33</i>	<i>orf19.4211</i>	Ferroxidasa de superficie celular	2.3
<i>FRE10</i>	<i>orf19.1415</i>	Reductasa férrica de superficie celular	1.9
<i>FET5</i>	<i>orf19.4215</i>	Ferroxidasa regulada por hierro	1.9
<i>AOX2</i>	<i>orf19.4773</i>	Oxidasa alternativa	1.8
<i>IFK1</i>	<i>orf19.1523</i>	Posible mono-oxigenasa	0.6
<i>SOD1</i>	<i>orf19.2770</i>	Protección frente a estrés oxidativo	0.6

IV. 10.1.3- Genes que codifican factores de transcripción

Los resultados de micromatrices de ADN del mutante heterocigótico en fase exponencial mostraron 4 factores de transcripción regulados por la falta de uno de los dos alelos de *CWT1* (Tabla IV.12).

Tabla IV.12- Factores de transcripción de *C. albicans* que presentan un nivel de expresión diferencial en el mutante heterocigótico *CWT1/cwt1Δ* en fase exponencial de crecimiento.

GEN	ORF	FUNCIÓN	NIVEL DE EXPRESIÓN
<i>SEF11.5</i>	<i>orf19.1926</i>	Teórico factor de transcripción	1.6
<i>MAC1</i>	<i>orf19.7068</i>	Teórico regulador por unión de metal	1.6
<i>CBF1</i>	<i>orf19.2876</i>	Factor de transcripción de tipo hélice-bucle-hélice	0.6
<i>SUA70</i>	<i>orf19.3059</i>	Subunidad del factor de iniciación de la transcripción TFIIB	0.6

Entre los genes de factores transcripcionales encontrados dos de ellos, *SEF11* y *MAC1*, presentaban una ligera sobre-expresión (nivel de expresión respecto de la cepa parental 1.6 para ambos genes) y los otros dos, *CBF1* y *SUA70*, se encontraron ligeramente reprimidos (ambos con nivel de expresión 0.6 en el mutante heterocigótico).

IV. 10.2- Perfil transcripcional del mutante heterocigótico *CWT1/cwt1Δ* en fase estacionaria de crecimiento

El análisis de los datos obtenidos de las micromatrices de células del mutante heterocigótico *CWT1/cwt1Δ* crecidas hasta alcanzar la fase estacionaria tardía de crecimiento ($D.O_{600nm}=9$), mostró un total de 766 genes cuya expresión aparecía modificada como consecuencia de la interrupción de un sólo alelo del gen *CWT1* (Fig. IV.39). De los 766 genes, 414 se encontraban sobre-expresados y 110 reprimidos. Se realizó una clasificación funcional de los genes y se observó que 252 (33%) eran de función desconocida.

Al igual que se hizo con el estudio del perfil transcripcional de las células de la cepa 3A en fase exponencial de crecimiento, en fase estacionaria el análisis de micromatrices se limitó a los genes relacionados con la pared celular, respuesta a estrés oxidativo, y otros factores de transcripción.

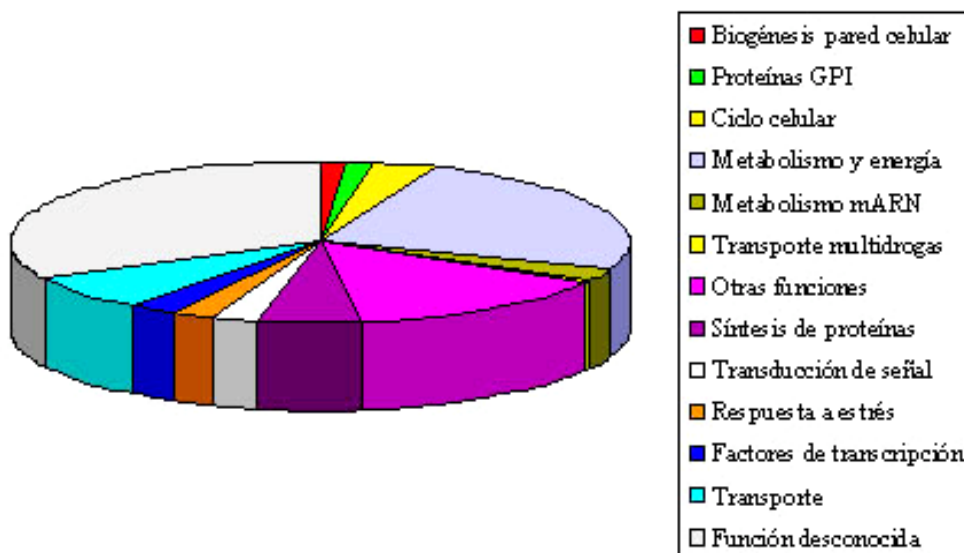


Figura IV.39- Distribución de los genes con expresión diferencial en el mutante heterocigótico *CWT1/cwt1Δ* en fase estacionaria de crecimiento. Se consideró genes con expresión diferencial a aquellos que presentaban un nivel de expresión superior a 1.5 o inferior a 0.6.

IV. 10.2.1- Genes involucrados en la arquitectura de la pared celular

Se encontraron 32 genes con expresión diferencial en la cepa 3A respecto de la cepa control dentro de esta categoría (Tabla IV.13). Entre ellos había 9 genes de proteínas catalíticas de organización de los componentes de la pared celular y 23 genes que codifican para proteínas estructurales de la pared.

Tabla IV.13- Genes relacionados con la biosíntesis de la pared celular que presentan un nivel de expresión diferencial en el mutante heterocigótico *CWT1/cwt1Δ* en fase estacionaria de crecimiento.

GEN	ORF	FUNCIÓN	NIVEL DE EXPRESIÓN
<i>RBT5</i>	<i>orf19.5636</i>	Proteína de pared celular de micelio	12.1
<i>PGA10</i>	<i>orf19.5674</i>	Proteína implicada en utilización de hierro	11.2
<i>HWPI</i>	<i>orf19.1321</i>	Proteína de pared celular de hifa	4.8
<i>PGA7</i>	<i>orf19.5635</i>	Precursor de antígeno de superficie de micelio	4.3
<i>ALS1</i>	<i>orf19.5741</i>	Proteína tipo aglutinina	4.1
<i>PGA34</i>	<i>orf19.2833</i>	Función desconocida	3.1
<i>TOS1</i>	<i>orf19.1690</i>	Hipotética subunidad de anclaje de α -aglutinina	3.1
<i>SUN41</i>	<i>orf19.3642</i>	Hipotética β -glucosidasa de pared celular	2.9
<i>SCW1</i>	<i>orf19.1779</i>	Miembro de la familia de glucanasas	2.7
<i>PGA54</i>	<i>orf19.2685</i>	Función desconocida	2.6
<i>SUN42</i>	<i>orf19.5032</i>	Teórica β -glucosidasa de pared celular	2.4
<i>PHR1</i>	<i>orf19.3829</i>	Glicosil-transferase dependiente de pH	2.4
<i>GLC3</i>	<i>orf19.13067</i>	Enzima ramificante de 1,4-glucano	2.2
<i>SSR1</i>	<i>orf19.7030</i>	Proteína de secreción en respuesta a estrés	2.2
<i>CHT2</i>	<i>orf19.3895</i>	Precursor de quitinasa 2	2.1
<i>PGA48</i>	<i>orf19.6321</i>	Teórica proteína se superficie de tipo Sed1p	2.1
<i>PLB4.3</i>	<i>orf19.1443</i>	Fosfolipasa	1.9
<i>PLB4.5</i>	<i>orf19.1442</i>	Fosfolipasa	1.8
<i>PGA52</i>	<i>orf19.1911</i>	Función desconocida	1.8
<i>ROT2</i>	<i>orf19.974</i>	Subunidad catalítica de glucosidasa II	1.7
<i>CSA1</i>	<i>orf19.7114</i>	Antígeno de superficie de micelio	1.7
<i>PGA29</i>	<i>orf19.5305</i>	Función desconocida	1.7
<i>PGA1</i>	<i>orf19.7625</i>	Proteína de superficie de tipo GPI	1.6
<i>PGA22</i>	<i>orf19.3738</i>	Función desconocida	1.6
<i>UTR2</i>	<i>orf19.1671</i>	1,3-1,4-beta-glucanasa	1.6
<i>PGA4</i>	<i>orf19.4035</i>	Teórica proteína GPI relacionada con Phr1p, Phr2p y Phr3p	1.6
<i>ALS2.3</i>	<i>orf19.1098</i>	Proteína tipo aglutinina	1.5
<i>CHS4</i>	<i>orf19.7349</i>	Factor regulador de quitin sintasa	0.6
<i>MNN1</i>	<i>orf19.4279</i>	Teórica manosiltransferasa	0.6
<i>IPF885</i>	<i>orf19.7214</i>	1,3-beta-glucosidasa	0.6
<i>YWP1</i>	<i>orf19.3618</i>	Teórica proteína de pared de levadura	0.3
<i>PIR1(IPF19968)</i>	<i>orf19.220</i>	Teórica proteína de pared de la familia PIR	0.2

Algunos de los genes que presentaron mayor nivel de sobre-expresión codificaban para proteínas presentes con mayor frecuencia en la forma micelial de *C. albicans* (*RBT5*, *HWP1*, *PGA7*, *CSA1*). Sin embargo, la capacidad o velocidad de formación de micelio no se vio alterada en el mutante heterocigótico (ver sección IV.7.1).

IV. 10.2.2- Genes relacionados con la respuesta a estrés oxidativo

A la vista de los datos obtenidos en las micromatrices de ADN de células creciendo en fase exponencial de crecimiento, respecto a los genes involucrados en la respuesta a estrés oxidativo, se realizó un análisis de este mismo grupo de genes en la micromatrices de células crecidas hasta alcanzar la fase estacionaria tardía de crecimiento.

En este caso se encontraron 18 genes, relacionados con procesos de oxido-reducción y respuesta a estrés oxidativo, que presentaban diferente nivel de expresión en el mutante heterocigótico que en la cepa parental (Tabla IV.14). Entre estos genes, 11 se encontraban sobre-expresados y 7 de ellos reprimidos.

Tabla IV.14- Genes de respuesta a estrés oxidativo que presentan un nivel de expresión diferencial en el mutante heterocigótico *CWT1/cwt1Δ* en fase estacionaria de crecimiento.

GEN	ORF	FUNCIÓN	NIVEL DE EXPRESIÓN
<i>FRE30.3</i>	<i>orf19.6139</i>	Alta homología con reductasas férricas	6.8
<i>FRE30.5</i>	<i>orf19.6140</i>	Alta homología con reductasas férricas	6.0
<i>FET33</i>	<i>orf19.4211</i>	Ferroxidasa de superficie celular	4.7
<i>SOD22.3</i>	<i>orf19.7111</i>	Superóxido dismutasa	4.3
<i>FET5</i>	<i>orf19.4215</i>	Ferroxidasa regulada por hierro	3.9
<i>FRE5</i>	<i>orf19.5634</i>	Reductasa férrica transmembranal	2.6
<i>FET34.3</i>	<i>orf19.1206</i>	Ferroxidasa regulada por hierro	2.6
<i>IFG3.3</i>	<i>orf19.944</i>	Aminoácido oxidase	2.5
<i>FRE7</i>	<i>orf19.7077</i>	Activida reductasa férrica y quelante de hierro	2.5
<i>FRE10</i>	<i>orf19.1415</i>	Reductasa férrica de superficie celular	2.0
<i>SOD4</i>	<i>orf19.2062</i>	Superóxido dismutasa	1.6
<i>AOX1</i>	<i>orf19.4774</i>	Oxidasa alternativa	0.6
<i>TSA1</i>	<i>orf19.7417</i>	Señalización de estrés inducido por peróxido	0.6
<i>GRX5</i>	<i>orf19.2782</i>	Glutarredoxina, respuesta a estres oxidativo	0.6
<i>GRP4</i>	<i>orf19.3150</i>	Reductasa inducida por baja concentración de hierro	0.6
<i>SOD1</i>	<i>orf19.2770</i>	Protección frente a estrés oxidativo	0.5
<i>AOX2</i>	<i>orf19.4773</i>	Oxidasa alternativa	0.4
<i>TTR1</i>	<i>orf19.6059</i>	Glutation reductasa	0.2

IV. 10.2.3- Genes que codifican para factores de transcripción

Dentro de la clasificación funcional de factores de transcripción, se hallaron 15 genes que presentaban niveles de expresión diferencial en la cepa mutante heterocigótica 3A, en comparación con la cepa control CNC43, en fase estacionaria de crecimiento (Tabla IV.15).

De estos 15 genes de factores de transcripción, siete (*UME6*, *CZF1*, *ARG83*, *ZCF1*, *LYS144*, *SEF11* y *LEU3*) codifican para proteínas con dedo de zinc de tipo $Zn(II)_2Cys_6$ al cual pertenece *CWT1*.

Tabla IV.15- Factores de transcripción de *C. albicans* que presentan un nivel de expresión diferencial en el mutante heterocigótico *CWT1/cwt1Δ* en fase estacionaria de crecimiento.

GEN	ORF	FUNCIÓN	NIVEL DE EXPRESIÓN
<i>UME6</i>	<i>orf19.1822</i>	Homólogo a Ume6p en <i>S.cerevisiae</i>	2.5
<i>CZF1</i>	<i>orf19.3127</i>	Teórico factor de transcripción con dedo de zinc	2.3
<i>ARG83</i>	<i>orf19.2748</i>	Factor de transcripción tipo $Zn(II)_2Cys_6$	2.1
<i>ZCF1</i>	<i>orf19.255</i>	Función desconocida	1.9
<i>SKN7</i>	<i>orf19.971</i>	Factor de transcripción	1.9
<i>CBF1</i>	<i>orf19.2876</i>	Factor de transcripción de tipo hélice-bucle-hélice	1.8
<i>MSB2</i>	<i>orf19.1490</i>	Similar al represor Msb2p de <i>S. cerevisiae</i>	1.7
<i>ZCF1</i>	<i>orf19.256</i>	Función desconocida	1.6
<i>LYS144</i>	<i>orf19.5380</i>	Factor de transcripción tipo $Zn(II)_2Cys_6$	1.6
<i>SEF11.5</i>	<i>orf19.1926</i>	Teórico factor de transcripción, extremo-5'	1.5
<i>IPF6857</i>	<i>orf19.1757</i>	Teórico regulador de la transcripción	0.6
<i>LEU3</i>	<i>orf19.11700</i>	Unión a motivo UAS de los promotores de <i>LEU1</i> , <i>LEU2</i> , <i>LEU4</i> , <i>ILV2</i> , <i>ILV5</i> y <i>GDH1</i>	0.6
<i>CAP1</i>	<i>orf19.1623</i>	Activador transcripcional	0.6
<i>ZMS1</i>	<i>orf19.5026</i>	Proteína con dedo de zinc tipo C_2H_2	0.5
<i>MBF1</i>	<i>orf19.3294</i>	Factor de unión de multiproteínas que facilita la activación transcripcional dependiente de Gcn4	0.4

IV. 10.3- Validación de los resultados de las micromatrices de ADN del mutante heterocigótico *CWT1/cwt1Δ*

La validación de los datos obtenidos en el análisis de micromatrices de ADN del mutante heterocigótico, tanto en fase exponencial como en estacionaria, se realizó

por RT-PCR semicuantitativa sobre un grupo de genes que presentaban valores de expresión diferencial en el mutante heterocigótico respecto de la cepa parental.

Los niveles de expresión obtenidos en las micromatrices y por RT-PCR semicuantitativa se compararon para cada gen seleccionado, observando una buena correlación de ambos valores de expresión para todos los genes estudiados (Fig. IV.40).

En el caso de genes que presentan niveles de expresión mayores a 5 en las micromatrices de ADN, la correlación exacta de las diferencias de expresión por RT-PCR semicuantitativa fue imposible debido a una saturación del sistema de cuantificación y el valor devuelto por el programa informático utilizado en estas cuantificaciones fue el máximo para estos casos (valor 5).

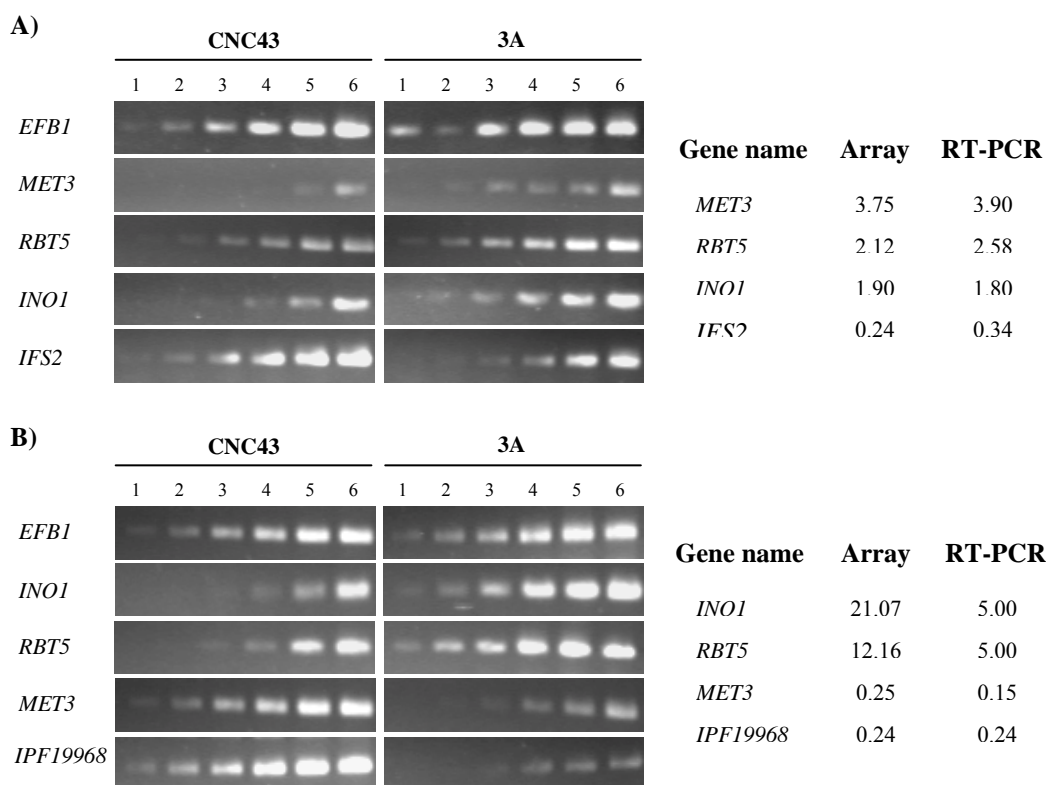


Figura IV.40- Confirmación de los niveles de expresión obtenidos en las micromatrices del mutante heterocigótico *CWT1/cwt1Δ* por RT-PCR semicuantitativa. Los niveles de expresión de algunos genes seleccionados por presentar expresión diferencial en el mutante heterocigótico en las micromatrices de cADN fueron comparados con sus niveles de expresión en la cepa parental. La expresión del gen *EFB1* fue utilizada como control de carga y para asegurar que no existían contaminaciones de ADN genómico en el ARN utilizado, ya que *EFB1* posee un intrón. Los números 1-6 representan los ciclos a los que las muestras fueron recogidas (20, 22, 24, 26, 28, 30). (A) Genes seleccionados del experimento en fase exponencial. (B) Genes seleccionados del experimento en fase estacionaria. En ambos casos se encontró una buena correlación entre los datos de las micromatrices y los obtenidos por RT-PCR semicuantitativa como se muestra en las tablas de la derecha.

IV. 10.4- Perfil transcripcional del mutante heterocigótico *CWT1/cwt1Δ* a lo largo del ciclo poblacional

El análisis del transcriptoma de la cepa mutante en un alelo 3A respecto de la parental CNC43 en dos fases distintas de crecimiento, permitió hacer un estudio comparativo de ambos perfiles transcripcionales para ver qué genes presentaban diferencias de expresión comunes en ambos experimentos.

Con los datos de las micromatrices se realizó un diagrama de Venn en el que mostraban los genes que presentan expresión diferencial en el mutante heterocigótico en las dos condiciones estudiadas. Se encontraron 85 genes con expresión alterada en el mutante heterocigótico independientemente de la fase de crecimiento (Fig. IV.41).

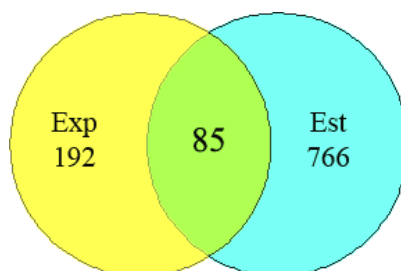


Figura IV.41 - Diagrama de Venn del transcriptoma del mutante heterocigótico *CWT1/cwt1Δ* a lo largo de ciclo poblacional. Exp, número de genes regulados por Cwt1p en fase exponencial de crecimiento; Est, número de genes regulados por Cwt1p en fase estacionaria de crecimiento.

Los genes con expresión alterada en ambas fases de crecimiento en el mutante heterocigótico se clasificaron por categorías funcionales para conocer las funciones celulares más afectadas en la cepa 3A (Fig. IV.42). Esta clasificación mostró que el grupo con más genes regulados por Cwt1p en estas condiciones era el de metabolismo y energía, que representaba un 31% del total de genes con expresión diferencial en *CWT1/cwt1Δ*. Otros grupos de genes importantes en el estudio comparativo de micromatrices del mutante heterocigótico en fase exponencial y estacionaria fueron:

(i) genes implicados en la biosíntesis de proteínas y proteínas ribosomales que constituyen un 11% de los genes, mientras que en un estudio equivalente con el mutante homocigótico era el grupo mayoritario representando un 26% de los genes regulados por Cwt1p, y (ii) genes que codifican para proteínas relacionadas con la composición y estructura de la pared celular, constituyendo un 8% de los genes, al igual que ocurría en el mutante homocigótico.

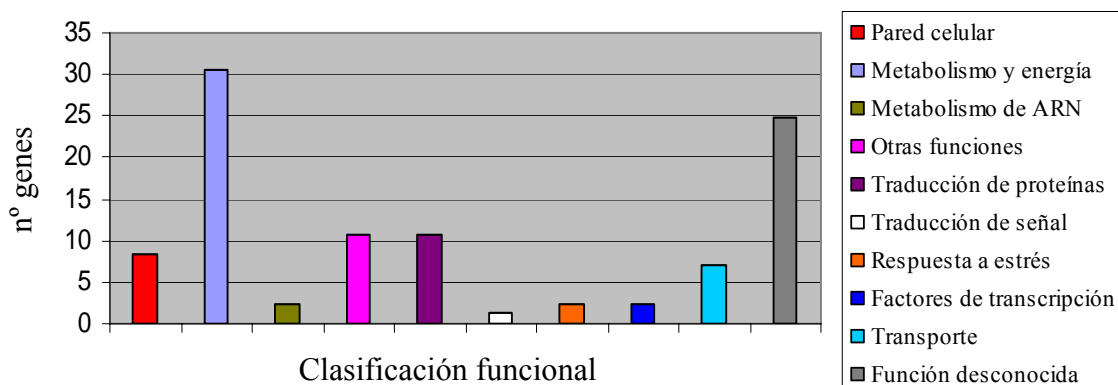


Figura IV.42- Histograma de categorías funcionales comúnmente afectadas en el mutante heterocigótico *CWT1/cwt1Δ* en fase exponencial y estacionaria de crecimiento. Las barras muestran el porcentaje de genes de cada categoría funcional con expresión diferencial respecto del número total de genes.

El grupo funcional denominado “metabolismo y energía” comprende una gran cantidad de genes implicados en procesos muy diversos de captación de energía y utilización de nutrientes para llevar a cabo los procesos metabólicos celulares.

En este estudio se observó que un elevado número de genes implicados en la biosíntesis de aminoácidos azufrados (*SUL1*, *MET2*, *MET3*, *MET5*, *MET14*, *MET16*, *MET25*, y *CYS3*), presentaban alteraciones en sus niveles normales de expresión en el mutante heterocigótico de *CWT1* en ambas fases de crecimiento. Además, al realizar un diagrama de la ruta biosintética de estos aminoácidos se vio que la regulación por Cwt1p de estos genes en las fases exponencial y estacionaria era distinta (Fig. IV.43 y IV.44). La expresión de los genes responsables del proceso de síntesis de estos aminoácidos en fase exponencial estaba aumentada en el mutante *CWT1/cwt1Δ*, mientras que en fase estacionaria tardía su expresión era menor que en la cepa parental.

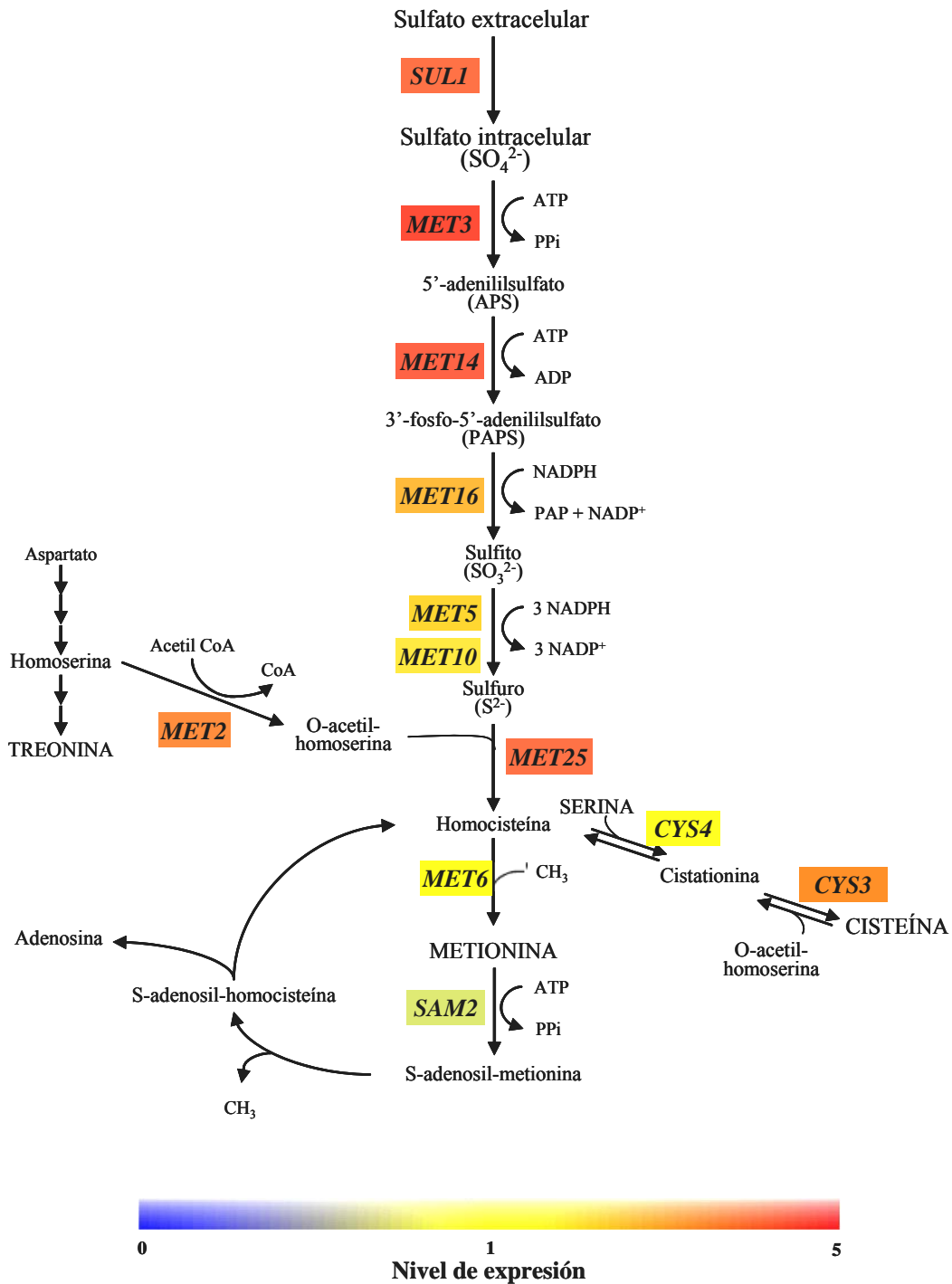


Figura IV.43- Regulación transcripcional de la síntesis de aminoácidos azufrados en el mutante heterocigótico *CWI1/cwi1Δ* en fase exponencial de crecimiento. *SUL1*, captación de sulfato; *MET3*, ATP sulfurilasa; *MET14*, 5'-adenililsulfato quinasa; *MET16*, 3'-fosfo-5'-adenililsulfato reductasa; *MET5* y *MET10*, sulfito reductasa; *MET25*, homocisteína sintasa; *MET6*, homocisteína metil-transferasa; *SAM2*, S-adenosil metionina sintasa; *MET2*, homoserina transacetilasa; *CYS4*, cistationina β-sintasa; *CYS3*, cistationina γ-liasa. (Adaptado de Thomas y Surdin-Kerjan, 1997).

La búsqueda de factores de transcripción con expresión diferencial en ambas fases de crecimiento del mutante heterocigótico mostró dos genes *SEF11* y *CBF1*. El gen *SEF11* se encuentra sobre-expresado en las dos condiciones estudiadas (tablas IV.12 y IV.15). Sin embargo, *CBF1* se encuentra reprimido en el mutante heterocigótico en fase exponencial (Tabla IV.12) y sobre-expresado en fase estacionaria (Tabla IV.15), sugiriendo una diferente regulación de este gen por Cwt1p en función del tiempo.

IV. 10.4.1- Análisis del patrón de expresión de *CWT1/cwt1Δ* con el programa informático T-profiler

Con los resultados obtenidos a partir de las micromatrices de ADN del mutante heterocigótico se realizó el estudio global de expresión con el programa T-profiler.

El análisis con el programa T-profiler reveló una serie de categorías ontológicas mayoritariamente afectadas por la delección de un alelo de *CWT1* (Tabla IV.16). En fase exponencial de crecimiento, las categorías ontológicas más destacadas fueron las referentes a (i) síntesis de proteínas y formación de ribosomas, y (ii) asimilación y utilización de azufre. En fase estacionaria tardía de crecimiento las funciones celulares reguladas de manera más importante en este mutante fueron: (i) transporte y homeostasis de hierro, y (ii) actividades oxido-reductasas que implican oxidación de elementos metálicos.

Tabla IV.16 - Análisis de funciones celulares alteradas en el mutante heterocigótico con el programa informático T-profiler. (*, valores estadísticamente no significativos).

Función celular	ORFs	FASE EXPONENCIAL		FASE ESTACIONARIA	
		t-value	E-value	t-value	E-value
Ribosoma	112	12.96	<1.0E-15	*-1.27	1.0
Biosíntesis de proteínas	250	10.21	<1.0E-15	*-0.97	1.0
Asimilación de sulfato	10	5.63	2.5E-05	*-2.31	1.0
Utilización de azufre	10	5.63	2.5E-05	*-1.92	1.0
Actividad reductasa férrica	13	*3.21	8.4E-01	5.32	1.4E-04
Actividad oxido-reductasa de iones metálicos	13	*3.21	8.4E-01	5.32	1.4E-04
Homeostasis de ion hierro	20	*1.97	1.0	4.41	1.4E-02

IV.11- EFECTO TRANSCRIPCIONAL GLOBAL DE Cwt1p A LO LARGO DEL CICLO POBLACIONAL

Una vez estudiados los perfiles transcripcionales de los mutantes heterocigótico y nulo para el gen *CWT1* en fase exponencial y estacionaria de crecimiento, se agruparon todos los datos obtenidos a partir de las micromatrices de ADN para realizar una comparación global que permitiera conocer los genes que se encuentran regulados por Cwt1p independientemente de la cantidad de proteína presente en la célula o la fase de crecimiento en que estas se encontraran. El diagrama de Venn que reúne todos los experimentos realizados (Fig. IV.45) mostró que, del total del genoma de *C. albicans*, la expresión de 20 genes depende de alguna manera de Cwt1p en todas las condiciones estudiadas en este trabajo.

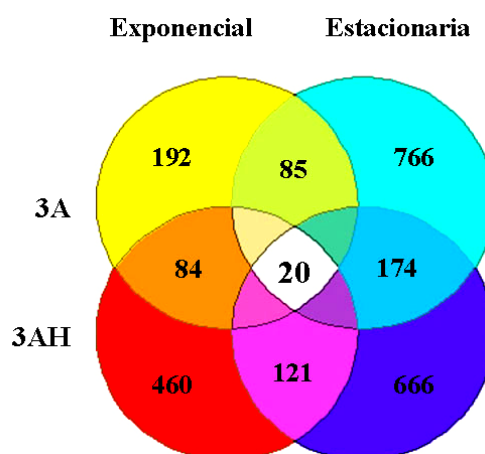


Figura IV.45 - Diagrama de Venn del transcriptoma de los mutantes heterocigótico y homocigótico a lo largo de ciclo poblacional.

La clasificación funcional de estos 20 genes (Tabla IV.17), reveló 7 genes que codifican para proteínas ribosomales, 2 genes implicados en procesos de oxidoreducción y 4 genes cuyos productos proteicos son de función desconocida.

Los resultados obtenidos de esta clasificación están en consonancia con los datos obtenidos anteriormente que apuntaban a estas dos funciones celulares, la biogénesis de ribosomas y la respuesta frente a estrés oxidativo, como posibles dianas de regulación de Cwt1p en las distintas condiciones estudiadas.

Tabla IV.17- Genes que presentan nivel de expresión diferencial en los mutantes heterocigótico y homocigótico en fases exponencial y estacionaria de crecimiento.

GEN	ORF	FUNCIÓN
<i>RPL20</i>	<i>orf19.4632</i>	Proteína ribosomal
<i>RPS22</i>	<i>orf19.6265</i>	Proteína ribosomal
<i>RPL23</i>	<i>orf19.3504</i>	Proteína ribosomal
<i>RPL24</i>	<i>orf19.11269</i>	Proteína ribosomal L24
<i>RPL25</i>	<i>orf19.687.1</i>	Proteína ribosomal L23a
<i>RPL32</i>	<i>orf19.3415.1</i>	Proteína ribosomal
<i>IPF5615</i>	<i>orf19.7107</i>	Homólogo a proteína ribosomal Alb1p de <i>S. cerevisiae</i>
<i>RPN4</i>	<i>orf19.1069</i>	Teórico regulador de tipo C ₂ H ₂ de proteínas del proteosoma
<i>POL93</i>	<i>orf19.6078</i>	Teórica transcriptasa reversa
<i>HTB1</i>	<i>orf19.6925</i>	Teórica histona H2B
<i>SOD22</i>	<i>orf19.7111</i>	Superóxido dismutasa
<i>HSP78</i>	<i>orf19.882</i>	Proteína de estrés térmico
<i>FRE30</i>	<i>orf19.6139</i>	Alta homología con reductasas férricas
<i>EHT1</i>	<i>orf19.3040</i>	Similar a acetil-transferasa Eht1p de <i>S. cerevisiae</i>
<i>CTR1</i>	<i>orf19.3646</i>	Transportador de cobre
<i>IPF12316</i>	<i>orf19.5069</i>	Similar a proteína específica de meiosis Sae3p en <i>S. cerevisiae</i>
<i>IPF8762</i>	<i>orf19.822</i>	Función desconocida
<i>IPF11625</i>	<i>orf19.4149</i>	Función desconocida
<i>IPF16795</i>	<i>orf19.2989</i>	Función desconocida
<i>IPF17131</i>	<i>orf19.69</i>	Función desconocida

IV.12- ANÁLISIS DE LAS SECUENCIAS PROMOTORAS DE LOS GENES REGULADOS POR Cwt1p

Puesto que Cwt1p es un teórico factor de transcripción que posee un dominio de unión a ADN de tipo Zn(II)₂Cys₆, se hizo una búsqueda *in silico* de posibles sitios de unión de Cwt1p en los promotores de aquellos grupos de genes que presentaban expresión diferencial en las cepas mutante heterocigótico y homocigótico en ambas fases de crecimiento y que estaban incluidos en una de las categorías funcionales más afectadas por la disminución o falta de esta proteína. Para este análisis se utilizó el programa informático RSAT (Van Helden, 2003). Se analizaron las secuencias promotoras (800 pb aguas arriba del codón de iniciación) de los genes involucrados en los distintos grupos funcionales: (i) pared celular, (ii) síntesis de proteínas, (iii) procesos de oxidación-reducción, y (iv) metabolismo de aminoácidos azufrados.

El algoritmo usado por este programa localiza posibles motivos reguladores que aparecen en los promotores de los genes analizados con una frecuencia mayor de la que lo hace de forma aleatoria en el genoma. Tomamos como significativas aquellas secuencias que presentaban una frecuencia de aparición, en los genes regulados por

Cwt1p, al menos dos veces superior a la frecuencia aleatoria en el genoma. Los resultados obtenidos más significativos se muestran en la tabla IV.18.

Tabla IV.18- Análisis de promotores de genes inducidos o reprimidos por Cwt1p.

POSIBLES SITIOS DE UNIÓN DE Cwt1p	FRECUENCIA (%)	
	Genes regulados por Cwt1p	Aleatoriamente en genoma
Genes involucrados en pared celular		
CCTTTC	78	31
GTGCCT	22	9
CACTCG	33	8
GGAACG	22	9
GTCTTA	44	19
AATTCA	89	70
ACATTG	78	40
Genes involucrados en traducción de proteínas		
AGGGCT	80	9
AGCCCT	80	9
Genes involucrados en síntesis de aminoácidos azufrados		
TACCCA	100	26
CACCAC	100	39
GTAATC	100	15

Así se encontraron 7 posibles secuencias reguladoras en los promotores de los genes involucrados en arquitectura de pared celular que se analizaron. Entre los promotores de los 30 genes relacionados con síntesis de ribosomas y traducción de proteínas se encontraron únicamente 2 posibles secuencias de unión a ADN de Cwt1p y con una frecuencia de aparición muy elevada. Finalmente, entre los promotores de los genes relacionados con el metabolismo de aminoácidos azufrados se encontraron tres secuencias que se encontraban en el total de genes analizados, sin embargo, su aparición global en el genoma era bastante inferior.

V. DISCUSSION

The fungal cell wall is an important structure for growth, development and interaction of cells with their environment. The response to cell wall damage is well understood from studies in *S. cerevisiae*, and some evidences suggest that the regulation of this response may be conserved in the fungal pathogen *C. albicans*.

Regulation of this and other cellular functions is determined at different levels, ranging over transcription, translation and protein modification processes. The first step in these regulating events resides in the modulation of specific genes mediated by transcription factors. One of the main features of these proteins is that they usually possess a DNA binding domain (DBD). Transcriptional factors have been classically classified in relation to their DBD structures. A group of transcriptional regulators containing the DNA binding sequence CysX₂CysX₆CysX₅₋₁₆CysX₂CysX₆₋₈Cys, referred to as Zn(II)₂Cys₆ proteins or zinc cluster proteins, have been shown to be strictly fungal proteins (Pan and Coleman, 1990; Krajewska, 1992).

In *S. cerevisiae*, Rds2p, a transcriptional regulator belonging to the family of zinc cluster proteins that is involved in drug sensitivity and cell wall organization has been studied (Akache *et al.*, 2001; Akache and Turcotte, 2002). This transcriptional factor presents, as main structural motifs, a Zn(II)₂Cys₆ DNA binding domain at the N-terminus of the protein and a PAS motif in C-terminal position, which may act as an activation domain (Jiang *et al.*, 1996; Taylor and Zhulin, 1999).

In this work, a search in the *C. albicans* genome database was done to find out putative transcriptional regulators containing the conserved sequence responsible for DNA binding in fungal zinc cluster proteins. Seventy ORFs were found in the *C. albicans* genome matching the Zn(II)₂Cys₆ motif pattern (Fig. IV.1). An *in silico* analysis of these ORFs was performed to evaluate the presence within them of the typical structures of transcriptional regulators.

From these *C. albicans* putative transcriptional factors, *CWT1* (*IPF3781*, *orf19.5849*) that presented a high homology with Rds2p was selected for further studies. The alignment of the amino acid sequences of Rds2p and Cwt1p showed 49% of homology between both proteins when the comparison was made over the entire length of the protein and 82% when comparison was made in the last 350 C-terminal amino acid residues (Fig. IV.3), indicating that Rds2p and Cwt1p are homologs.

Detailed *in silico* analyses of the predicted amino acid sequence of Cwt1p (Fig. IV.4) revealed the following features: (i) an N-terminal nuclear localization signal, (ii) a

zinc cluster DNA binding domain (Fig. IV.5), (iii) a glutamine-rich region, (iv) an asparagine-rich region, and (v) a PAS domain (Fig. IV.6). These structural data suggested its implication as a transcriptional factor, in which the Zn(II)₂Cys₆ domain could act as a DNA binding factor (Pan and Coleman, 1990) and the PAS domain could contribute to the activation of the molecule (Taylor and Zhulin, 1999).

Expression of *CWT1* was examined by semiquantitative-RT-PCR. The results obtained from this experiment indicated that *CWT1* follows a differential expression pattern throughout the growth phases, being mainly expressed when cells reached the late stationary growing phase (Fig. IV.7). It has been shown in *S. cerevisiae* that differences in the levels of *N*-glycosylation between cells at exponential and stationary phases of growth occur (Valentin *et al.*, 1987), meaning that the cell wall components are regulated within the population cell cycle. The concomitant regulation of Cwt1p with the *N*-glycosylation process, may lead to the hypothesis that *CWT1* could be one of the transcriptional factors involved in regulating cell wall composition and architecture.

In order to know the possible role of *CWT1*, the disruption of the coding region of this gene was performed, and the phenotypes of the heterozygous (3A) and homozygous (3AH) mutants were observed under different conditions, and compared with those of the parental (CNC43) strain. The disruption of either one or the two alleles of *CWT1* did not produce differences on the growth rate of the yeast form, regarding to the parental strain, in both aerobic and anaerobic conditions, and no alterations in cell morphology were observed in the mutant yeast cells. As *C. albicans* is a dimorphic fungal pathogen which uses the yeast-to-hyphae transition as a virulence factor, the kinetics of germ tube formation was also tested. The heterozygous and homozygous strains showed a normal hyphal formation in liquid media. However, the null mutant in *CWT1* presented a decreased ability to form hyphae on solid media such as Spider (Fig. IV.12 and Fig. IV.13), this fact could be due to an enhancement of the effect of the inducers in solid media and a longer time of exposition to these inducers. Differences in colony morphology on solid media have been observed in strains lacking different components of the Cek1-mediated and cAMP protein kinase A signal transduction pathways (Csank *et al.*, 1998; Bockmuhl and Ernst, 2001). Cwt1p is a putative transcription factor and its depletion could affect any step of these filamentation pathways.

Possible alterations in the cell wall were studied by testing the sensitivities of the mutants to different compounds affecting normal cell wall construction, such as

calcofluor white, Congo red and SDS. Sensitivities to CFW and CR was increased in the mutants with respect to the parental strain (Fig. IV.17); however, the sensitivity to SDS was decreased (Fig. IV.17). As these compounds alter chitin and β -glucans in the cell surface, the phenotypic results could suggest an important role for Cwt1p in cell wall architecture.

To better characterize the effect of the deletion of *CWT1* in the cell wall construction, the sensitivity of the mutant strains to zymolyase was quantified as described by Van der Vaart *et al.* (1995) in exponential and stationary growing cells. A high decrease in sensitivity to zymolyase was observed for the null mutant in the exponential phase of growth (Fig. IV.18.A). This minor sensitivity could be related to changes in the structure of the β -glucan network or an increment in the thickness of the outer layer of the cell wall as suggested for *S. cerevisiae* (Van der Vaart *et al.*, 1995). However, it is interesting to point out that the null mutant strain in stationary phase of growth was susceptible to the β -1,3-glucanase effect of zymolyase to the same extent that the parental strain (Fig. IV.18.B). These observations pointed out that the different components of the cell wall could be in no adequate concentrations in the null mutant strain.

In order to know it, comparative chemical composition analyses of cell walls from the wild-type (CNC43), the heterozygous mutant (3A) and the null mutant strain (3AH) were performed in both growth phases. The results obtained showed important alterations in the composition of the null mutant isolated cell walls. In cells growing exponentially, null mutant walls presented half β -glucans that the parental strain and a great increase (about six times) of the mannan fraction, whereas no differences were observed in both chitin and protein content when compared to the parental strain (Fig. IV.19). Because *cwt1 Δ /cwt1 Δ* strain presented defects in cell wall architecture, a transcriptional profiling of the null mutant strain was performed to discover how Cwt1p was involved in cell wall structure and biogenesis. The analysis of the microarrays data in this respect showed that several genes related to cell wall biogenesis were misregulated in the null mutant strain in exponential growth. The fact that null mutant possessed 50% less β -glucan in their cell walls than the parental strain could be caused by the overexpression of the glucosidase encoded by *SUN41* together with the repression of the β -glucan synthase encoded by *GSL22* (Table IV.3). Moreover, two genes required for protein mannosylation (*MNN9* and *ANP1*), were found among the

upregulated genes, which along with the lower expression of the putative mannosidase *IPF9096*, could be responsible for the high amount of mannan present in the cell wall of the null mutant strain in the exponential growth phase (Table IV.3). In order to verify the increase of cell wall mannan in the mutant strain, cells of the parental and null mutant strains growing exponentially were treated with concanavalin A-FITC, to label the mannose residues of the cell wall glycoproteins; the fluorescence emitted (Fig. IV.21) confirmed the result obtained by the chemical analysis. Hence, it is possible that the high amount of mannan in the outermost surface of the null mutant cell walls could be hampering the accessibility of zymolyase to its β -1,3-glucan target in the mutant strain.

The chemical composition analyses of isolated walls from cells growing until stationary phase revealed that the β -1,6-glucan levels detected in the mutant strain were six times lower when compared to the parental strain, and no differences were observed in mannan, protein and chitin content (Fig. IV.20). Microarrays performed to study the transcriptome of the null mutant in stationary phase of growth revealed that some genes encoding for β -glucan degradative enzymes (*SCW11*, *SUN41*, *BGL21*, *IPF6318* and *SUN42*) were upregulated (Table IV.6). The overexpression of these genes could lead to a serious lack of β -1,6-glucan in the cell wall of the mutant strain in stationary phase of growth. However, this degradation of β -glucan did not seem to affect the β -1,3-glucan content, as its presence in the cell wall was similar to that in the parental strain. The amount of β -1,3-glucan could be balanced due to simultaneous overexpression and repression of the genes *BGL21* and *BGL22*, both of them encoding for endo- β -1,3-glucanases (Table IV.6). These results clearly showed a different composition in the cell wall of the *cwt1 Δ /cwt1 Δ* strain depending on the cell age.

Taking the alterations in the cell wall composition presented by the null mutant into account, qualitative analyses of the protein pattern of isolated cell walls of parental and null mutant strain were carried out by western blot using different antibodies against cell wall polymers. For this purpose, isolated cell walls of the parental and null mutant strains in exponential and stationary phase of growth were treated with SDS, β -ME and zymolyase to release proteins attached by different linkages to the wall and probed with an antibody against *C. albicans* yeast-form cell walls (PAbL). No differences among parental and mutant walls were found in the SDS and β -ME extracted material. Nevertheless, the zymolyase extracted proteins presented substantial

differences between strains and also as a function of the growth time. In the exponential phase of growth, the amount of material revealed by this antibody was higher in the null mutant strain, although the same quantity of total protein was loaded for all the samples (Fig. IV.24). This could be explained by the higher degree of glycosylation of the proteins found in the cell wall of the null mutant cells, as the PAbL antibody mainly recognizes the glycydic part of the proteins. In the stationary phase of growth the amount of material extracted from the cell walls by zymolyase and detected by the PAbL antibody was similar in parental and mutant strains. However, some differences in the protein profile were detected. In the null mutant strain, a decrease in the molecular weight of the glycoproteins was observed when compared with those released from the parental cell walls (Fig. IV.24), suggesting that the cell wall protein species present in both strains are different in this phase of growth.

Another important component of the cell wall, which content was unbalanced in null mutant cells, was β -1,6-glucan. The composition analyses of isolated cell walls have revealed decreases of two and six folds in *cwt1 Δ /cwt1 Δ* cell walls in exponential and stationary phases, respectively (Fig. IV.19 and Fig. IV.20). Western blot analyses of the material released by zymolyase were performed using a polyclonal antibody against β -1,6-glucan to check the chemical quantification of β -1,6-glucan. The amount of glycoproteins attached to the cell wall through β -1,6-glucan found in the isolated cell walls by western blot matched up with the lower values of β -1,6-glucan obtained in the chemical polymers quantification of the mutant strain. This correlation was performed using an antibody against β -1,6-glucan which identified a lower abundance of this polymer linked to cell wall proteins in cell walls of the null mutant strain in both growth phases, despite the more striking difference between parental and null mutant was found in the stationary phase of growth (Fig. IV.25).

The largest group of mannoproteins present in *C. albicans* cell wall is the GPI-CWPs representing up to 90% of covalently linked cell wall proteins. These proteins are attached to cell wall β -1,3-glucan or chitin via β -1,6-glucan (Kapteyn *et al.*, 2000). Therefore, cells deficient in β -1,6-glucan may involve important alterations regarding the attachment of GPI-CWPs and this fact could affect the correct assembly of this kind of cell wall mannoproteins within the cell surface. Then, the GPI-CWPs that could not be linked to the cell wall, because of the lack of β -1,6-glucan moieties, should be spent to the culture media. To verify this hypothesis, culture media of CNC43 and 3AH cells

were analyzed for the amount of sugars and proteins released by these cells. After the elimination of small molecules of sugar and proteins coming from the culture media composition, the remaining macromolecules were quantified. A general increase of the material secreted by the null mutant strain to the culture media in both growth phases was observed, although this effect was stronger when cells reached the stationary phase. The chemical analyses showed three times more sugar and protein released in the culture media of the null mutant than of the parental strain (Fig.IV.26). Western blot analyses of the spent cultures media of both parental and mutant strains in exponential and stationary phases of growth using the polyclonal antibody PAbL were used to ensure that the differences observed for the culture media composition were due to *C. albicans* cell wall glycoproteins. The result of this qualitative assay showed a great difference regarding to the amount and molecular mass of the glycoproteins released to the culture media by parental and null mutant cells in both conditions tested, but mainly in the stationary phase of growth (Fig. IV.27).

DNA microarrays data were screened for genes commonly regulated by Cwt1p in exponential and stationary phases of growth. As far as cell wall proteins are concerned, six genes encoding for enzymes that are responsible for cell wall components assembly and two genes encoding for proteins with features of cell wall structural proteins were found to present regulation changes in both growth phases, supporting previous results for the role of Cwt1p in cell wall architecture. Nevertheless, misregulation of cell wall-related genes has also been found in response to the deletion of other transcription regulators, such as Efg1p, Tup1p, Nrg1p, Mig1p, Cas5p and Bcr1p (Doedt *et al.*, 2004; Murad *et al.*, 2001; Bruno *et al.*, 2006; Nobile *et al.*, 2005), among others. All these results confirmed that *C. albicans* cell wall composition and architecture depend to some extent on the transcription factor Cwt1p in both exponential and stationary phase of growth, although it seems that Cwt1p does not directly regulate cell wall genes but rather is somehow involved in this function through the regulation of intermediary genes.

To check that the observed phenotype of the null mutant was a direct consequence of *CWT1* gene disruption, one copy of the gene was reintegrated into the genome of the *C. albicans* 3AH strain into the *LEU2 locus*, making use of the plasmid pBI-1 (Stoldt *et al.*, 1997). In this plasmid, *CWT1* was under the transcriptional control of the strong *PCK1* gene promoter, which is repressible in the presence of glucose (Fig. IV.28). Upon reintroduction of *CWT1* gene, the overexpressing strain (3BICWT1)

became more resistant to CFW and RC when the expression of the promoter was induced, being its behaviour similar to that shown by the parental strain (Fig. IV.30). The recovery of the original phenotype, with regard to CFW and RC sensitivities, when overexpressing a functional copy of *CWT1* in the null mutant strain constituted another evidence of the implication of Cwt1p in cell wall architecture.

In *S. cerevisiae*, the *CWT1* ortholog, *RDS2* is involved in drug sensitivity (Akache and Turcotte, 2002). It has been shown that *rds2Δ* mutant is hypersensitive to the effect of the antifungal ketoconazol, which interferes with the synthesis of the ergosterol in fungal membranes (Lupetti *et al.*, 2002). In order to know whether Cwt1p is also involved in multidrug resistance in *C. albicans*, the sensitivity of mutants in *CWT1* gene to a wide set of drugs was tested. Surprisingly, when cells were grown in presence of ketoconazol, cells of the null mutant strain were slightly more resistant to this drug than cells of the parental strain. But the most important effect observed in this regard was a higher resistance of the heterozygous strain for ketoconazol (Fig. IV.15). The results obtained were contrary to what it was expected from the results concerning Rds2p in *S. cerevisiae* reported by Akache and Turcotte (2002). The ergosterol biosynthetic pathway can be divided into two parts: the biochemical conversion of acetyl coenzyme A into squalene and the transformation of squalene into ergosterol (Parks and Casey, 1995). The expression of the genes that may be involved in ergosterol biosynthesis was analyzed using DNA microarray data, and genes implicated in the two steps of ergosterol synthesis were found to present altered expression levels in both heterozygous and homozygous mutants. It is not know how the deletion of one or two alleles of *CWT1* can affect the sensitivity of the cells to ketoconazol in such a different way, but it can be inferred that the response of *C. albicans* to ketoconazol is dependent on the dose of Cwt1p present in the cell, since the overexpression of *CWT1* in the null mutant strain leads to a hypersensitivity of these cells for ketoconazol, as occurred in the parental strain. This mean that the amount of protein produced by one copy of this transcription factor (present in the parental strain of *S. cerevisiae* and heterozygous strain 3A of *C. albicans*) makes the cell resistant to ketoconazol, but when this amount is increased or reduced in *C. albicans*, the resulting phenotype is always more sensitive to this antifungal agent (Fig. IV.30).

However, *cwt1Δ/cwt1Δ* cells were slightly more sensitive to hygromycin B. It has been reported for *S. cerevisiae* that defective mutants in *N*-glycosylation, having mutations in at least two *PMT* (protein mannosyltransferases) genes, often present

hypersensitivity to hygromycin B (Dean, 1995). In *C. albicans*, defective mutants in mannosylation, as *pmr1Δ/pmr1Δ* and *pmt1Δ/pmt1Δ*, and the null mutant strain *ecm33Δ/ecm33Δ*, lacking a cell wall GPI glycoprotein, are also sensitive to this drug (Bates *et al.*, 2005; Timpel *et al.*, 2000; Martinez-Lopez *et al.*, 2004). However, *cwt1Δ/cwt1Δ* mutant, unlike glycosylation mutants, present up to six times more mannan in its cell wall than the parental strain and still it is sensitive to hygromycin B. A relationship between the glycoproteins present in the cell wall and the sensitivity of *C. albicans* to hygromycin B has been suggested, but the molecular mechanisms by which the amount of mannan modifies sensitivity to antifungal agents, such as hygromycin B, remains to be established. Hygromycin B is a drug that blocks the process of protein synthesis by inhibiting polypeptide elongation. In order to find out the molecular mechanisms responsible for the sensitivity of the null mutant strain to this drug, DNA microarrays data were analyzed for genes involved in proteins synthesis that presented altered expression levels in the mutant strain. In both exponential and stationary phase of growth, 10% of the genes presenting expression changes in response to the absence of Cwt1p corresponded to this cellular function (Table IV.4 and IV.7). The majority of these genes were upregulated along the time of growth and code for ribosomal proteins. Among them, *EFBI* a translational elongation factor gene is commonly upregulated in exponential and stationary growth phases (1.9 and 2.5 fold expression, respect the parental strain, respectively). Moreover, a comparison of transcriptomes of the null mutant strain growing at exponential and stationary phases of growth showed that the deletion of *CWT1* had a striking effect on protein biosynthesis, since 26% of the genes showing differential expression irrespective of cell's growth phase, were related to protein synthesis and ribosomal biogenesis. This alteration of the whole process of protein biosynthesis in the null mutant strain may cause a higher susceptibility of these cells for drugs which mechanisms of action consist in disturbing protein synthesis, such as hygromycin B.

Homozygous and heterozygous strains were also subjected to different stresses such as osmotic stress, heat shock and oxidative stress. No differences among strains were observed in respect of heat shock and osmotic stress. However, cells from the heterozygous mutant strain presented an increased sensitivity to hydrogen peroxide when compared to parental and homozygous cells (Fig. IV.14). After analyzing microarray data from the heterozygous mutant in both exponential and stationary phases

of growth, an important set of genes related to oxidative stress response were shown to present expression changes in comparison with those from the parental strain. These genes are mainly upregulated in *CWT1/cwt1Δ* strain presenting high expression levels, regarding the parental strain, up to 8.6 (*SOD22*, *orf19.7111*) in exponential phase of growth and 6.8 (*FRE30*, *orf19.6139*) in cells growing until late stationary phase (Tables IV.11 and IV.14). The misregulation of these redox enzymes genes may cause the susceptibility of the heterozygous mutant in oxidative stress conditions.

A whole-genome study of the transcriptional changes produced by deletion of one and the two alleles of *CWT1* gene and both mutants in exponential and stationary phases of growth was carried out using DNA microarrays. The analyses of the data obtained showed the implication of Cwt1p in a wide range of cellular functions in a way dependent on the amount of protein present in the cell, as heterozygous and homozygous mutants respond in a different way to the lack of the protein in terms of global transcript expression. It is also important to point out that transcriptional profile of both mutants presented significant differences between exponential and stationary growth phases according to the differential expression pattern of *CWT1* throughout the cell growth. One of the groups of genes with a high number of genes presenting modulation in *CWT1/cwt1Δ* or *cwt1Δ/cwt1Δ* mutants along the growth phases is that formed by genes involved in metabolism and recruitment of energy (Fig. IV.36 and IV.42). This functional category comprises a large and heterogeneous set of genes that participate in different metabolic pathways, and that is the reason why an in-depth analysis of these metabolic genes is not accessible for this work. In both heterozygous and homozygous mutants, genes that are commonly regulated along the growth phases presented the same tendency of regulation, being up- or downregulated under both conditions tested. Interestingly, two metabolic pathways were found to present opposite regulation fashions throughout the growth cycle. Regulation of the metabolism of sulphur amino acids was altered in both phases of growth in the heterozygous mutants. However, genes involved in this pathway presented a general overexpression in the exponential phase of growth (Fig. IV.43) whereas a general repression of the genes encoding for the enzymes related to this pathway was observed when cells reached the stationary phase of growth (Fig. IV.44). Another example of this behaviour lies in the biosynthesis of glycerol in the null mutant strain. It has been reported that *C. albicans* can produce glycerol in response to stress conditions (Pahlman *et al.*, 2001), and the deletion of *CWT1* modulates this process in both exponential and stationary growth

phases. While a general repression of the genes taking part in this pathway was observed in the exponential phase (Fig. IV.37.A), these genes were generally overexpressed in the stationary growth phase (Fig. IV.37.B). These two findings proved different roles for Cwt1p in exponential and stationary phases of growth.

The fact that the heterozygous and the homozygous mutants have such pleiotropic effects on gene expression (cell wall architecture, oxidative stress response, protein synthesis, metabolic pathways, etc), supports the idea that Cwt1p is a co-activator, acting simultaneously in several regulatory networks. The expression changes observed in other genes encoding for transcriptional factor genes may indicate that Cwt1p could presumably regulate the expression of several sets of genes indirectly by controlling the levels of transcriptional activators or repressors that act directly on these genes. Nowadays, very little information regarding transcriptional regulators in *C. albicans* is available, but the repression or activation of this group of genes by Cwt1p is interesting, since it raises the possibility that Cwt1p is a global regulator of gene expression.

Several transcription factors showed changes in their expression levels in response to the lack of one or two copies of Cwt1p in both exponential and stationary phases. However, only those that modulate their expression along the population growth were taken into account in this study, because this co-regulation may mean an increased possibility for these transcription factors to act concomitantly with Cwt1p. Two transcriptional regulators genes, *SEF11* and *CBF1*, whose expression levels were commonly modified in the heterozygous mutant in both growth phases were found. *SEF11* encodes for a putative zinc cluster protein whose expression is repressed by Sfu1p under high-iron conditions. Its expression level is increased in the heterozygous mutant in both conditions tested when compared to its basal level in the parental strain. On the other hand, *CBF1* encodes for a transcription factor containing a helix-loop-helix DNA binding domain involved in sulphur amino acid biosynthesis. The expression levels of *CBF1* gene were found to be modulated when one copy of Cwt1p is eliminated of the cell, but its expression was not altered in the *CWT1* null mutant. Phenotypic characterization of *cbf1Δ/cbf1Δ* strain revealed that Cbf1p is necessary for transcription activation of methionine or cysteine biosynthesis genes and also for the expression of genes involved in assimilation of inorganic sulphate (Biswas *et al.*, 2003). However, when the transcriptional factor Cbf1p was regulated in *CWT1/cwt1Δ* mutant, its transcript levels were not absent but up- or down regulated depending on the cell

growth phase, and the biosynthesis of sulphur amino acids was not blocked but altered. Thus, in the exponential phase of growth, *CBF1* presented a slight repression in *CWT1/cwt1Δ* that in turns produced an overexpression of genes involved in sulphur amino acid metabolism (Table IV.12 and Fig. IV.43), whereas in the stationary phase of growth, *CBF1* was upregulated and the genes involved in methionine and cysteine biosynthesis were repressed (Table IV.15 and Fig. IV.44).

Several transcription factors presented changes in their expression levels when the two alleles of *CWT1* were disrupted (Tables IV.5 and IV.8). However, only *MBF1*, a gene encoding for an evolutionarily conserved transcriptional co-activator that connects regulatory factors and the TATA element-binding protein, was affected under both growth conditions. The fact that only one transcription factor is commonly regulated in the null mutant strain along the cell's growth cycle could mean that: (i) transcriptional regulators play an important role in the cell, adapting the expression levels of different genes in response to cell necessities in each condition, (ii) Cwt1p must play different roles in exponential and stationary growth phases, as shown by the differences in the two transcriptome patterns, and (iii) Mbf1p could play an important role in Cwt1p activity, since it is the only transcriptional factor that is affected by the deletion of *CWT1*, resulting in a repression of *MBF1* under both conditions. Although *MBF1* suffered a mild downregulation in *cwt1Δ/cwt1Δ*, it is known that transcriptional factors are present in very small amounts within the cell, so slight changes in its expression could be enough to produce severe defects in cell biology (Titz *et al.*, 2006).

As Cwt1p is a zinc cluster protein that presents a DNA-binding domain in the N-terminal part of the amino acid sequence, it was argued that the identification of multiple transcription factor binding sites in the promoters of genes commonly regulated by Cwt1p throughout the growth period should provide an idea of the genes that might be directly regulated by this transcriptional factor. Using the RSAT program (Van Helden, 2003), the 800 bp non-coding upstream sequences of genes regulated by Cwt1p were analysed for putative DNA binding motifs. The most important results from this analysis can be seen in Table IV.18, which shows the percentages of appearance of these sequences in the Cwt1p-modulated genes, containing the corresponding putative binding sites, compared with their random appearance in the genome. Two putative DNA binding sequences with significant scores were found out after screening the 5'-non-coding regions of genes involved in protein synthesis. These DNA sequences AGGGCT and/or AGCCCT could act as direct promoter binding sites

for the zinc finger structure within Cwt1p or for other transcriptional regulators working together with Cwt1p. Zinc cluster proteins recognize highly related elements containing CGG trinucleotide sequences in single or repeat forms, in either a symmetrical or an asymmetrical format. Interestingly, the putative promoter binding sites found for Cwt1p contained a single CGG triplet (and its complementary GCC). Monomer or dimer status can be inferred based on the sequence of its target regulatory element. It is proposed that some zinc cluster proteins act as monomers because its target sequence contains a single trinucleotide (for a review see MacPherson *et al.*, 2006). This is the case of *A. nidulans* AlcR, *S. cerevisiae* Ecm22p, Rgt1p and Upc2p. Because of the theoretical promoter binding sites found for Cwt1p only presented a single triplet in their sequences, it could be inferred that Cwt1p binds to its targets as a monomer.

A great number of cellular processes have been shown to be modulated by members of the zinc cluster proteins superfamily. These processes include sugar metabolism, respiration, amino acid metabolism, mitosis, meiosis, chromatin remodelling, nitrogen utilization, stress response, etc. (MacPherson *et al.*, 2006). Different transcription profiling studies designed for studying cell wall architecture have shown that regulation of several sets of genes are concomitantly affected by changes in cell wall assembly. The transcription profiles of calcofluor white- and zymolyase-treated cells shared upregulation of genes involved in (i) stress response, (ii) cell wall structure and biogenesis, (iii) carbohydrate utilization, and (iv) budding and cell polarity; and repression of genes involved in (i) ribosomal proteins and (ii) rRNA transcription and processing (Boorsma *et al.*, 2004). Moreover, caspofungin treatment altering cell wall β -glucans also produced downregulation of ribosomal protein genes (Bruno *et al.*, 2006). Nevertheless, *cwt1 Δ /cwt1 Δ* , which also had a typical phenotype of cell wall defective mutants, presented a general upregulation of ribosomal proteins genes (Tables IV.4 and IV.7). Interestingly, Li *et al.* (2000) showed that in *S. cerevisiae* regulation of ribosomal protein genes is part of the cell wall integrity pathway, dependent on *PKC1* but not dependent on *SLT2*. Further studies concerning this signal transduction pathway will provide new insights into ribosomal protein genes regulation in *cwt1 Δ /cwt1 Δ* .

Many of these transcriptional regulators not only have more than one distinct role but can also have overlapping functions. They often coordinate gene regulation of different subsets of genes together or at different times. Protein biosynthesis is the

functional group with more gene expression levels commonly altered in *cwt1Δ/cwt1Δ*. Almost all the misregulated genes during exponential growth within this group were also misregulated by the absence of Cwt1p in the stationary growth phase, leading to the conclusion that ribosome biogenesis and protein synthesis regulation could be the main role of Cwt1p. Ribosomes are important protein biosynthetic machines, but transcriptional regulation of ribosomal proteins is not well understood. Many promoters of ribosomal protein genes can be recognized by a single input motif being all of them regulated by a unique transcription factor or a multi input motif involving more than one regulator, which suggests that expression of these genes may be coordinated by multiple regulators under various growth conditions (Lee *et al.*, 2002). The way in which Cwt1p regulates ribosomal protein genes is still unknown, unless several data point to an important contribution of this transcriptional factor in modulating their expression.

Finally, it is important to highlight that transcriptional regulators can differ in their ability to activate or inhibit transcription depending on the promoters to which they are bound under each condition (Harbury and Struhl, 1989). In view of these results, it is possible that Cwt1p was a co-regulator taking part in different cellular processes through binding to different promoters as a function of the total amount of this protein within the cell and the cell age.

Taking into account that little is known about transcriptional regulation in *C. albicans*, different approaches could be undertaken in order to elucidate whether Cwt1p is able to recognize specific DNA binding sites, interact with other proteins or transcriptional complexes and the mechanisms in which this transcriptional factor regulates different cellular functions in response to different conditions. The knowledge of these and other issues regarding gene expression would help to a better understanding of the global transcriptional regulation network in *C. albicans*.

VI. CONCLUSIONES / CONCLUSIONS

1. El rastreo del genoma completo de *C. albicans* ha permitido la identificación de 70 ORFs que codifican para factores de transcripción de tipo Zn(II)₂Cys₆. De entre ellas el gen *CWT1* fue seleccionada para estudio.
2. Cwt1p posee las características estructurales típicas de factores de transcripción de tipo Zn(II)₂Cys₆ y presenta una homología del 49% a lo largo de su secuencia con el factor de transcripción Rds2p de *S. cerevisiae*. Cuando la comparación se hacía en el extremo carboxilo terminal de ambas proteínas, la homología era del 82%.
3. El gen *CWT1* se expresa a lo largo de las distintas fases de crecimiento de *C. albicans*, haciéndolo de forma mayoritaria en fase estacionaria tardía.
4. El factor de transcripción Cwt1p está involucrado en la sensibilidad de *C. albicans* a drogas antifúngicas.
5. Diversos estudios realizados en el mutante nulo para el gen *CWT1* han demostrado la implicación de este factor de transcripción en la regulación de la arquitectura de la pared celular de *C. albicans*.
6. El estudio del perfil transcripcional de los mutantes *CWT1/cwt1Δ* y *cwt1Δ/cwt1Δ* ha revelado que Cwt1p puede ser considerado como un regulador global de la transcripción ya que regula la expresión de genes implicados en distintas funciones celulares.
7. Cwt1p es un factor de transcripción que modula específicamente distintos grupos de genes dependiendo de la cantidad de proteína presente en la célula y de la fase de crecimiento en que se encuentren.

1. The screening of the whole *C. albicans* genome has allowed the identification of 70 ORFs coding for Zn(II)₂Cys₆ transcription factors. Among them, *CWT1* gene was selected for further studies.
2. Cwt1p possesses the typical structural features of Zn(II)₂Cys₆ transcription factors and presents 49% of homology with the *S. cerevisiae* transcriptional regulator Rds2p along the whole sequences. When the comparison was made in the C-terminal end of both proteins 82% of homology was found.
3. *CWT1* is differentially expressed along the growth phases of *C. albicans*, and is mainly expressed in late stationary growing cells.
4. Cwt1p transcriptional factor is involved in *C. albicans* sensitivity to antifungal drugs.
5. Different studies performed on the null mutant strain for *CWT1* gene have shown that this transcriptional factor is involved in the regulation of *C. albicans* cell wall architecture.
6. Transcriptional profiling studies of *CWT1/cwt1Δ* and *cwt1Δ/cwt1Δ* mutants have revealed that Cwt1p can be considered as a global transcription regulator since it modulates the expression of genes involved in different cellular functions.
7. Cwt1p is a transcriptional factor that specifically modulates different sets of genes depending on the amount of protein present within the cell and the age of the cell.

VII. BIBLIOGRAFÍA / REFERENCES

- Adams, D.J. (2004)** Fungal cell wall chitinases and glucanases. *Microbiology* **150**:2029-35.
- Akache, B., Wu, K., Turcotte, B. (2001)** Phenotypic analysis of genes encoding yeast zinc cluster proteins. *Nucleic Acids Res.* **29**:2181-90.
- Akache, B., Turcotte, B. (2002)** New regulators of drug sensitivity in the family of yeast zinc cluster proteins. *J Biol Chem.* **277**:21254-60.
- Alani, E., Cao, L., Kleckner, N. (1987)** A method for gene disruption that allows repeated use of *URA3* selection in the construction of multiply disrupted yeast strains. *Genetics.* **116**:541-5.
- Alberti-Segui, C., Morales, A.J., Xing, H., Kessler, M.M., Willins, D.A., Weinstock, K.G., Cottarel, G., Fechtel, K., Rogers, B. (2004)** Identification of potential cell-surface proteins in *Candida albicans* and investigation of the role of a putative cell-surface glycosidase in adhesion and virulence. *Yeast* **21**:285-302.
- Albrecht, A., Felk, A., Pichova, I., Naglik, J., Schaller, M., De Groot, P., MacCallum, D., Odds, F.C., Schafer, W., Klis, F., Monod, M., Hube, B. (2006)** Glycosylphosphatidylinositol - anchored proteases of *Candida albicans* target proteins necessary for both cellular processes and host-pathogen interactions. *J Biol Chem.* **281**:688-94.
- Alonso-Monge, R., Navarro-Garcia, F., Roman, E., Negro, A.I., Eximan, B., Nombela, C., Pla, J. (2003)** The Hog1 mitogen-activated kinase is essential in the oxidative stress response and chlamydospore formation in *Candida albicans*. *Eukaryot Cell.* **2**: 351-61.
- Alonso Monge, R., Roman, E., Nombela, C., Pla, J. (2006)** The MAP kinase signal transduction network in *Candida albicans*. *Microbiology* **152**:905-912.
- Amar, N., Messenguy, F., El Bakkoury, M., Dubois, E. (2000)** ArgRII, a component of the ArgR-Mcm1 complex involved in the control of arginine metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*, is the sensor of arginine. *Mol Cell Biol.* **20**:2087-97.
- Anderson, S.F., Steber, C.M., Esposito, R.E., Coleman, J.E. (1995)** *UME6*, a negative regulator of meiosis in *Saccharomyces cerevisiae*, contains a C-terminal Zn₂Cys₆ binuclear cluster that binds the *URS1* DNA sequence in a zinc-dependent manner. *Protein Sci.* **4**:1832-43.
- Aro, N., Saloheimo, A., Ilmen, M., Penttila, M. (2001)** ACEII, a novel transcriptional activator involved in regulation of cellulose and xylanase genes of *Trichoderma reesei*. *J. Biol. Chem.* **26**:24309-14.
- Ascone, I., Lenouvel, F., Sequeval, D., Dexpert, H., Felenbok, B. (1997)** First experimental evidence of a zinc binuclear cluster in AlcR protein, mutational and x-ray absorption studies. *Biochim Biophys Acta* **1343**: 211-20.
- Backen, A.C., Broadbent, I.D., Fetherston, R.W., Rosamond, J.D.C., Schnell, N.F., Stark, M.J.R. (2000)** Evaluation of the *CaMAL2* promoter for regulated expression of genes in *Candida albicans*. *Yeast.* **16**:1121-29.
- Ballou, C.E. (1990)** Isolation, characterization, and properties of *Saccharomyces cerevisiae mnn* mutants with nonconditional protein glycosylation defects. *Methods Enzymol.* **185**:440-70.
- Bates, S., MacCallum, D.M., Bertram, G., Munro, C.A., Hughes, H.B., Burman, E.T., Brown, A.J., Odds, F.C., Gow, N.A. (2005)** *Candida albicans* Pmr1p, a secretory pathway P-type Ca²⁺/Mn²⁺-ATPase, is required for glycosylation and virulence. *J Biol Chem.* **280**:23408-15.
- Bennett, R.J., Johnson, A.D. (2005)** Mating in *Candida albicans* and the search for a sexual cycle. *Annu. Rev. Microbiol.* **59**: 233-55.
- Bensen, E.S., Martin, S.J., Li, M.,**

- Berman, J., Davis, D.A. (2004)** Transcriptional profiling in *Candida albicans* reveals new adaptive responses to extracellular pH and functions for Rim101p. *Mol Microbiol.* **54**:1335-51.
- Biswas, K., Rieger, K.J., Morschhauser, J. (2003)** Functional characterization of *CaCBF1*, the *Candida albicans* homolog of centromere binding factor 1. *Gene.* **323**:43-55.
- Bockmuhl, D.P., Ernst, J.F. (2001)** A potential phosphorylation site for an A-type kinase in the Efg1 regulator protein contributes to hyphal morphogenesis of *Candida albicans*. *Genetics.* **157**:1523-30.
- Boone, C., Sommer, S.S., Hensel, A., Bussey, H. (1990)** Yeast KRE genes provide evidence for a pathway of cell wall beta-glucan assembly. *J Cell Biol.* **110**:1833-43.
- Boorsma, A., de Nobel, H., ter Riet, B., Bargmann, B., Brul, S., Hellingwerf, K.J., Klis, F.M. (2004)** Characterization of the transcriptional response to cell wall stress in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast.* **21**:413-27.
- Boorsma, A., Foat, B.C., Vis, D., Klis, F., Bussemaker, H.J. (2005)** T-profiler: scoring the activity of predefined groups of genes using gene expression data. *Nucleic Acids Res.* **33**:W592-5.
- Bowman, S.M., Piwowar, A., Al Dabbous, M., Vierula, J., Free, S.J. (2006)** Mutational analysis of the glycosylphosphatidylinositol (GPI) anchor pathway demonstrates that GPI-anchored proteins are required for cell wall biogenesis and normal hyphal growth in *Neurospora crassa*. *Eukaryot Cell.* **5**:587-600.
- Bradford, M.M. (1976)** A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* **72**: 248-54.
- Braun, B.R., Johnson, A.D. (1997)** Control of filament formation in *Candida albicans* by the transcriptional repressor *TUP1*. *Science.* **277**:105-9.
- Braun, B.R., Johnson, A.D. (2000)** *TUP1*, *CPH1* and *EFG1* make independent contributions to filamentation in *Candida albicans*. *Genetics.* **155**:57-67.
- Braun, B.R., Kadosh, D., Johnson, A.D. (2001)** *NRG1*, a repressor of filamentous growth in *Candida albicans*, is down-regulated during filament induction. *EMBO J.* **20**:4753-61.
- Breunig, K.D., Kuger, P. (1987)** Functional homology between the yeast regulatory proteins *GAL4* and *LAC9*: *LAC9*-mediated transcriptional activation in *Kluyveromyces lactis* involves protein binding to a regulatory sequence homologous to the *GAL4* protein-binding site. *Mol Cell Biol.* **7**:4400-6.
- Brown, A.J.P., Gow, N.A.R. (1999)** Regulatory networks controlling *Candida albicans* morphogenesis. *Trends Microbiol.* **7**:333-8
- Brown, A.J.P. (2002)** Morphogenetic signalling pathways in *Candida albicans*. *Candida and Candidiasis*. Calderone, R.A. (ed.). Washington, DC: American Society for Microbiology Press, pp.95-106.
- Brown, J.L., Bussey, H. (1993)** The yeast *KRE9* gene encodes an O- glycoprotein involved in cell surface beta-glucan assembly. *Mol Cell Biol.***13**:6346-56.
- Bruno, V.M., Kalachikov, S., Subaran, R., Nobile, C.J., Kyratsous, C., Mitchell, A.P. (2006)** Control of the *C. albicans* cell wall damage response by transcriptional regulator Cas5. *PLoS Pathog.* **2**:e21.
- Bulawa, C.E. (1993)** Genetics and molecular biology of chitin synthesis in fungi. *Annu Rev Microbiol.* **47**: 505-34.
- Burglin, T.R. (1991)** The TEA domain: a novel, highly conserved DNA-binding motif. *Cell.* **66**:11-2.
- Burnette, W. N. (1981)** Western-blotting: Electrophoretic transfer of proteins from

- sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein. *Anal Biochem.* **112**:191-203.
- Busch, S.J., Sassone-Corsi, P. (1990)** Dimers, leucine zippers and DNA-binding domains. *Trends Genet.* **6**:36-40.
- Buurman, E.T., Westwater, C., Hube, B., Brown, A.J., Odds, F.C., Gow, N.A. (1998)** Molecular analysis of CaMnt1p, a mannosyl transferase important for adhesion and virulence of *Candida albicans*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **95**:7670-5.
- Cabib, E., Blanco, N., Grau, C., Rodriguez-Pena, J.M., Arroyo, J. (2007)** Crh1p and Crh2p are required for the cross-linking of chitin to beta(1-6)glucan in the *Saccharomyces cerevisiae* cell wall. *Mol Microbiol.* **63**:921-35.
- Cahuzac, B., Cerdan, R., Felenbok, B., Guittet, E. (2001)** The solution structure of an AlcR-DNA complex sheds light onto the unique tight and monomeric DNA binding of a Zn(2)Cys(6) protein. *Structure.* **9**:827-36.
- Calderone, R.A. (1993)** Recognition between *Candida albicans* and host cells. *Trend Microbiol.* **1**: 55-8.
- Cappellaro, C., Mrsa, V., and Taner, W. (1998)** New potential cell wall glucanases of *Saccharomyces cerevisiae* and their involvement in mating. *J. Bacteriol.* **180**: 5030-7.
- Caro, L., Tettelin, H., Vossen, J., Ram, A., Van den Ende, H., Klis, F. (1997)** *In silicio* identification of glycosyl-fosfatidy linositol-anchored plasma membrane and cell wall proteins of *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* **13**:1477-89.
- Casadevall, A., Pirofski, L. (2001)** Host-pathogen interactions: the attributes of virulence. *J Infect Dis.* **184**:337-44.
- Casadevall, A., Dadachova, E., Pirofski, L. (2004)** Passive antibody therapy for infectious diseases. *Nature Rev Microbiol.* **2**: 695-703.
- Casanova, M., Martinez, J.P., Chaffin, W.L. (1990)** Fab fragments from a monoclonal antibody against a germ tube mannoprotein block the yeast-to mycelium transition in *Candida albicans*. *Infect Immun.* **57**: 262-271.
- Casanova, M., Cervera, A.M., Gozalbo, D., Martínez J.P. (1997)** Hemin induces germ tube formation in *Candida albicans*. *Infect Immun.* **65**:4360-4.
- Castillo, L., Martínez, A.I., Garcerá, A., Elorza, M.V., Valentín, E., Sentandreu, R. (2003)** Functional analysis of the cysteine residues and the repetitive sequence of *Saccharomyces cerevisiae* Pir4/Cis3: the repetitive sequence is needed for binding to the cell wall β -1,3-glucan. *Yeast.* **20**:973-83.
- Castillo, L., Martinez, A.I., Garcera, A., Garcia-Martinez, J., Ruiz-Herrera, J., Valentin, E., Sentandreu, R. (2006)** Genomic response programs of *Candida albicans* following protoplasting and regeneration. *Fungal Genet Biol.* **43**:124-34.
- Chaffin, W.L., Lopez-Ribot, J.L., Casanova, M., Gozalbo, D., Martinez, J.P. (1998)** Cell wall and secreted proteins of *Candida albicans*: identification, function, and expression. *Microbiol Mol Biol Rev.* **62**: 130-80.
- Chandra, J., Patel, J.D., Li, J., Zhou, G., Mukherjee, P.K., McCormick, T.S., Anderson, J.M., Ghannoum, M.A. (2005)** Modification of surface properties of biomaterials influences the ability of *Candida albicans* to form biofilms. *Appl Environ Microbiol.* **71**: 8795-8801.
- Chauhan, N., Latge, J.P., Calderone, R. (2006)** Signalling and oxidant adaptation in *Candida albicans* and *Aspergillus fumigatus*. *Nat Rev Microbiol.* **4**: 435-44.
- Coste, A.T., Karababa, M., Ischer, F., Bille, J., Sanglard, D. (2004)** *TAC1*, transcriptional activator of *CDR* genes, is a

new transcription factor involved in the regulation of *Candida albicans* ABC transporters *CDR1* and *CDR2*. *Eukaryot Cell*. **3**:1639-52.

Courey, A.J., Tjian, R. (1988) Analysis of Sp1 in vivo reveals multiple transcriptional domains, including a novel glutamine-rich activation motif. *Cell*. **55**:887-98.

Courey, A.J., Holtzman, D.A., Jackson, S.P., Tjian, R. (1989) Synergistic activation by the glutamine-rich domains of human transcription factor Sp1. *Cell*. **59**:827-36.

Csank, C., Schroppel, K., Leberer, E., Marcus, D., Mohamed, O., Meloche, S., Thomas, D.Y., Whiteway, M. (1998) Roles of the *Candida albicans* mitogen-activated protein kinase homolog, Cek1p, in hyphal development and systemic candidiasis. *Infect Immun*. **66**:2713-21.

Cunningham, E.L., Agard, D.A. (2004) Disabling the folding catalyst is the last critical step in alpha-lytic protease folding. *Protein Sci*. **13**:325-31.

Cutler, J.E. (2001) N-glycosylation of yeast, with emphasis on *Candida albicans*. *Med Mycol*. **1**:75-86.

Davis, D., Wilson, R.B., Mitchell, A.P. (2000) RIM101-dependent and-independent pathways govern pH responses in *Candida albicans*. *Mol Cell Biol*. **20**:971-8.

Dean, N. (1995) Yeast glycosylation mutants are sensitive to aminoglycosides. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **92**:1287-91.

Dean, N. (1999) Asparagine-linked glycosylation in the yeast Golgi. *Biochim Biophys Acta* **1426**: 309-22.

De Groot, P.W.J., Ruiz, C., Vázquez de Aldana, C.R., Dueñas, E., Cid, V.J., Del Rey, F., Rodríguez-Peña, J.M., Pérez, P., Andel, A., Caubín, J., Arroyo, J., García, J.C., Gil, C., Molina, M., García J.L., Nombela, C., Klis, F.M. (2001) A genomic approach for the identification and classification of genes involved in cell wall formation and its regulation in

Saccharomyces cerevisiae. *Comp Funct Genom*. **2**: 124-42.

De Groot, P.W., Hellingwerf, K.J., Klis, F.M. (2003) Genome-wide identification of fungal GPI proteins. *Yeast*. **20**: 781-96.

De Groot, P.W., de Boer, A.D., Cunningham, J., Dekker, H.L., de Jong, L., Hellingwerf, K.J., de Koster, C., Klis, F.M. (2004) Proteomic analysis of *Candida albicans* cell walls reveals covalently bound carbohydrate-active enzymes and adhesins. *Eukaryot Cell*. **3**:955-65.

De Nobel, J.G., Klis, F.M., Priem, J., Munnik, T., Van den Ende, H. (1990) The glucanase-soluble mannoproteins limit cell wall porosity in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*. **6**:491-9.

De Nobel, J.G., Barnett, J.A. (1991) Passage of molecules through yeast cell walls: a brief essay-review. *Yeast* **7**:313-23.

Deutschbauer, A.M., Williams, R.M., Chu, A.M., Davis, R.W. (2002) Parallel phenotypic analysis of sporulation and postgermination growth in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc Natl Acad Sci USA*. **99**:15530-5.

Develoux, M. (2001) Griseofulvin. *Ann Dermatol Venereol*. **128**: 1317-25.

Dijkgraaf, G.J., Brown, J.L., Bussey, H. (1996) The *KNH1* gene of *Saccharomyces cerevisiae* is a functional homolog of *KRE9*. *Yeast*. **12**:683-92.

Dijkgraaf, G.J., Abe, M., Ohya, Y., Bussey, H. (2002) Mutations in Fks1p affect the cell wall content of β -1,3- and β -1,6-glucan in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*. **19**: 671-90.

Djaczenko, W., Cassone, A. (1972) Visualization of new ultrastructural components in the cell wall of *Candida albicans* with fixatives containing TAPO. *J Cell Biol*. **52**: 186-90.

Doedt, T., Krishnamurthy, S., Bockmuhl, D.P., Tebarth, B., Stempel, C., Russell, C.L., Brown, A.J., Ernst, J.F. (2004)

- APSES proteins regulate morphogenesis and metabolism in *Candida albicans*. *Mol Biol Cell*. **15**:3167-80.
- Doolin, M.T., Johnson, A.L., Johnston, L.H., Butler, G. (2001)** Overlapping and distinct roles of the duplicated yeast transcription factors Ace2p and Swi5p. *Mol Microbiol*. **40**:422-32.
- Douglas, L.J. (2003)** *Candida* biofilms and their role in infection. *Rev Iberoam Micol*. **19**: 139-43.
- Dubois, M., Giles, K.A., Hamilton, J.K., Rebes, P.A., Smith, F. (1956)** Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Anal Chem*. **28**:350-6.
- Dupont, B. (2002)** Overview of the lipid formulation of Amphotericin B. *J Antimicrob Chemother*. **49**:31-6.
- Ecker, M., Deutzmann, R., Lehle, L., Mrsa, V., Tanner, W. (2006)** Pir proteins of *Saccharomyces cerevisiae* are attached to beta-1,3-glucan by a new protein-carbohydrate linkage. *J Biol Chem*. **281**:11523-9.
- Eckert, S.E., Heinz, W.J., Zakikhany, K., Thewes, S., Haynes, K., Hube, B., Muhlschlegel, F.A. (2006)** *PGA4*, a *GAS* homologue from *Candida albicans*, is up-regulated early in infection processes. *Fungal Genet Biol*. doi:10.1016/j.fgb.2006.12.006
- Egidy, G., Paveto, C., Passeron, S., Galvagno, M.A. (1990)** cAMP levels and in situ measurement of cAMP related enzymes during yeast-to-hyphae transition in *Candida albicans*. *Cell Biol Int Rep*. **14**:59-68.
- Eisenhaber, B., Schneider, G., Wildpaner, M., Eisenhaber, F. (2004)** A sensitive predictor for potential GPI lipid modification sites in fungal protein sequences and its application to genome-wide studies for *Aspergillus nidulans*, *Candida albicans*, *Neurospora crassa*, *Saccharomyces cerevisiae* and *Schizosaccharomyces pombe*. *J Mol Biol*. **337**:243-53.
- Eisman, B., Alonso-Monge, R., Roman, E., Arana, D.M., Nombela, C., Pla, J. (2006)** The Cek1 and Hog1 mitogen-activated protein kinases play complementary roles in cell wall biogenesis and chlamydo-spore formation in the fungal pathogen *Candida albicans*. *Eukaryot Cell*. **5**: 347-58.
- Elorza, M.V., Rico, H., Sentandreu, R. (1983)** Calcofluor white alters the assembly of chitin fibrils in *Saccharomyces cerevisiae* and *Candida albicans* cells. *J Gen Microbiol*. **129**:1577-82.
- Elorza, M. V., Marcilla, A., Sentandreu, R. (1988)** Wall mannoproteins of the yeast and mycelial cells of *Candida albicans*: nature of the glycosidic bonds and polydispersity of their mannan moieties. *J Gen Microbiol*. **134**:2393-403.
- d'Enfert, C., Goyard, S., Rodríguez-Arnaveilhe, S., Frangeul, L., Jones, L., Tekaiia, F., Bader, D., Antje Albrecht., Castillo, L., Domínguez, A., Ernst, J.F., Fradin, C., Gaillardin, C., García-Sánchez, S., de Groot, P., Hube, B., Klis, F.M., Krishnamurthy, S., Kunze, D., Lopez, M.C., Mavor, A., Martin, N., Moszer, I., Onésime, D., Perez Martin, J., Sentandreu, R., Valentin, E., Brown, A.J.P. (2005)** Candida DB: a genome database for *Candida albicans* pathogenomics. *Nucleic Acids Res*. **33**:D353-7.
- Ernst, J.F. (2000)** Transcription factors in *Candida albicans* – environmental control of morphogenesis. *Microbiology* **146**: 1763-74.
- Ernst, J.F., Prill, S.K. (2001)** O-glycosylation. *Med Mycol*. **39**:67-74.
- Eroles, P., Sentandreu, M., Elorza, M.V., Sentandreu, R. (1997)** The highly immunogenic enolase and Hsp70p are adventitious *Candida albicans* cell wall proteins. *Microbiology*. **143**:313-20.
- Estruch, F. (2000)** Stress-controlled transcription factors, stress induced genes and stress tolerance in budding yeast. *FEMS Microbiol Rev*. **24**:469-86.

- Fernandes, L., Rodrigues-Pousada, C., Struhl, K. (1997)** Yap, a novel family of eight bZIP proteins in *Saccharomyces cerevisiae* with distinct biological functions. *Mol Cell Biol.* **17**:6982-93.
- Fitzgerald, M.X., Rojas, J.R., Kim, J.M., Kohlhaw, G.B., Marmorstein, R. (2006)** Structure of a Leu3-DNA complex: recognition of everted CGG half-sites by a Zn₂Cys₆ binuclear cluster protein. *Structure.* **14**:725-35.
- Fleet, G. H. (1991)** Cell walls. In Rose, A.H. and Harrison, J.S. The yeasts, vol 4. Academic Press, Inc., New York, pp 199-277.
- Fonzi, W.A., Irwin, M.Y. (1993)** Isogenic strain construction and gene mapping in *Candida albicans*. *Genetics.* **134**:717-28.
- Fonzi, W.A. (1999)** *PHR1* and *PHR2* of *Candida albicans* encode putative glycosidases required for proper cross-linking of beta-1,3- and beta-1,6-glucans. *J Bacteriol.* **181**:7070-9
- Fradin, C., De Groot, P., MacCallum, D., Schaller, M., Klis, F., Odds, F.C., Hube, B. (2005)** Granulocytes govern the transcriptional response, morphology and proliferation of *Candida albicans* in human blood. *Mol Microbiol.* **56**: 397-415.
- Fujimura, H., Sakuma, Y. (1993)** Simplified isolation of chromosomal and plasmid DNA from yeasts. *Biotechniques.* **14**:538-40.
- Furman, R.M., Ahearn, D.G. (1983)** *Candida ciferrii* and *Candida Chiropterorum* isolated from clinical specimens. *J Clin Microbiol.* **18**: 1252-5.
- Gale, C.A., Bendel, C.M., McClellan, M., Hauser, M., Becker, J.M., Berman, J., Hostetter, M.K. (1998)** Linkage of adhesion, filamentous growth, and virulence in *Candida albicans* to a single gene, *INT1*. *Science.* **279**: 1355-8.
- Gale, C.A., Gerami-Nejad, M., McClellan, M., Vandoninck, S., Longtine, M.S., Berman, J. (2001)** *Candida albicans* Int1p interacts with the septin ring in yeast and hyphal cells. *Mol Biol Cell* **12**: 3538-49.
- Garcera, A., Martínez, A.I., Castillo, L., Elorza, M.V., Sentandreu, R., Valentín, E. (2003)** Identification and study of a *Candida albicans* protein homologous to *Saccharomyces cerevisiae* Ssr1p, an internal cell-wall protein. *Microbiology.* **149**:2137-45.
- Garcera, A., Castillo, L., Martinez, A., Elorza, M.V., Valentin, E., Sentandreu, R. (2005)** Anchorage of *Candida albicans* Ssr1 to the cell wall, and transcript profiling of the null mutant. *Res Microbiol.* **156**: 911-20.
- Garcia-Sanchez, S., Aubert, S., Iraqui, I., Janbon, G., Ghigo, J.M., d'Enfert, C. (2004)** *Candida albicans* biofilms: a developmental state associated with specific and stable gene expression patterns. *Eukaryot Cell.* **3**: 536-45.
- Garcia-Sanchez, S., Mavor, A.L., Russell, C.L., Argimon, S., Dennison, P., Enjalbert, B., Brown, A.J. (2005)** Global roles of Ssn6 in Tup1- and Nrg1-dependent gene regulation in the fungal pathogen, *Candida albicans*. *Mol Biol Cell.* **16**:2913-25.
- Gattiker, A., Gasteiger, E., Bairoch, A. (2002)** ScanProsite: a reference implementation of a PROSITE scanning tool. *Appl Bioinformatics.* **1**:107-8.
- Gehring, W.J., Affolter, M., Burglin, T. (1994)** Homeodomain proteins. *Annu Rev Biochem.* **63**:487-526.
- Ghannoum, M.A. (2000)** Potential role of phospholipases in virulence and fungal pathogenesis. *Clin Microbiol Rev.* **13**: 122-43.
- Gietz, D., St. Jean, A., Woods, R. A., Schiestl, R. H. (1992)** Improved method for high efficiency transformation of intact yeast cells. *Nucleic Acids Res.* **20**:1425.
- Gonzalez, M.M., Diez-Orejas, R., Molero, G., Alvarez, A.M., Pla, J.,**

- Nombela, C., Sanchez-Perez, M. (1997)** Phenotypic characterization of a *Candida albicans* strain deficient in its major exoglucanase. *Microbiology*. **143**:3023-32.
- Gow, N.A.R., Gooday, G.W. (1982)** Vacuolation, branch production and linear growth of germ tubes in *Candida albicans*. *J Gen Microbiol*. **128**:2195-8.
- Gow, N.A., Robbins, P.W., Lester, J.W., Brown, A.J., Fonzi, W.A., Chapman, T., Kinsman, O.S. (1994)** A hyphal-specific chitin synthase gene (*CHS2*) is not essential for growth, dimorphism, or virulence of *Candida albicans*. *Proc Natl Acad Sci USA*. **91**:6216-20.
- Gow, N.A.R., Brown, A.J., Odds, F.C. (2002)** Fungal morphogenesis and host invasion. *Curr Opin Microbiol*. **5**: 366-71.
- Granger, B. L., Flenniken, M.L., Davis, D.A., Mitchell, A.P., Cutler, J.E. (2005)** Yeast wall protein 1 of *Candida albicans*. *Microbiology*. **150**: 1631-44.
- Hamada, K., Fukuchi, S., Arisawa, M., Baba, M. and Kitada, K. (1998)** Screening for glycosylphosphatidylinositol (GPI)-dependent cell wall proteins in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Gen. Genet*. **258**, 53-59.
- Hanahan, D. (1985)** Techniques for transformation of *Escherichia coli*. En: Glover D. M, ed. DNA cloning: a practical approach. *Oxford, IRL Press*, **109**.
- Harbison, C.T., Gordon, D.B., Lee, T.I., Rinaldi, N.J., Macisaac, K.D., Danford, T.W., Hannett, N.M., Tagne, J.B., Reynolds, D.B., Yoo, J., Jennings, E.G., Zeitlinger, J., Pokholok, D.K., Kellis, M., Rolfe, P.A., Takusagawa, K.T., Lander, E.S., Gifford, D.K., Fraenkel, E., Young, R.A. (2004)** Transcriptional regulatory code of a eukaryotic genome. *Nature* **431**:99-104.
- Harbury, P.A., Struhl, K. (1989)** Functional distinctions between yeast TATA elements. *Mol Cell Biol*. **9**:5298-304.
- Haynes, K. (2001)** Virulence in *Candida* species. *Trends Microbiol*. **9**: 591-6.
- Heinisch, J.J., Lorberg, A., Schmitz, H.P., Jacoby, J.J. (1999)** The protein kinase C-mediated MAP kinase pathway involved in the maintenance of cellular integrity in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Microbiol*. **32**:671-80.
- Herrero, A.B., López, M.C., García, S., Schmidt, A., Spaltmann, F., Ruiz-Herrera, J., Domínguez, A. (1999)** Control of filament formation in *Candida albicans* by polyamines levels. *Infect Immun*. **67**:4870-8.
- Hicks, G.R., Raikhel, N.V. (1995)** Protein import into the nucleus: an integrated view. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol*. **11**:155-88.
- Hoovers, J.M.N., Mannens, M., John, R., Blick, J., van Heyningen, V., Porteus, D.J., Leschot, N.J., Westerveld, A., Little, P.F.R. (1992)** High-resolution localization of 69 potential human zinc finger protein genes: a number are clustered. *Genomics*. **12**:254-63.
- Horton, P., Nakai, K. (1997)** Better prediction of protein cellular localization sites with the k nearest neighbors classifier. *Proc Int Conf Intell Syst Mol Biol*. **5**:147-52.
- Hoyer, L.L., Scherer, S., Shatzman, A.R., Livi, G.P. (1995)** *Candida albicans* *ALS1*: domains related to a *Saccharomyces cerevisiae* sexual agglutinin separated by a repeating motif. *Mol Microbiol*. **15**:39-54.
- Hoyer, L.L. (2001)** The *ALS* gene family of *Candida albicans*. *Trends Microbiol*. **9**:176-80.
- Hoyer, L.L., Fundyga, R., Hecht, J.E., Kapteyn, J.C., Klis, F.M., Arnold, J. (2001)** Characterization of agglutinin-like sequence genes from non-*albicans* *Candida* and phylogenetic analysis of the *ALS* family. *Genetics*. **157**:1555-67.
- Hube, B., Sanglard, D., Odds, F.C., Hess, D., Monod, M., Schafer, W., Brown, A.J., Gow, N.A. (1997)** Disruption of each of the

- secreted aspartyl proteinase genes *SAP1*, *SAP2*, and *SAP3* of *Candida albicans* attenuates virulence. *Infect Immun.* **65**:3529-38.
- Hube, B., Stehr, F., Bossenz, M., Mazur, A., Kretschmar, M., Schäfer, W. (2000)** Secreted lipases of *Candida albicans*: cloning, characterisation and expression analysis of a new gene family with at least ten members. *Arch Microbiol.* **174**: 362–74.
- Hube, B., Naglik, J. (2001)** *Candida albicans* proteinases: resolving the mystery of a gene family. *Microbiology.* **147**:1997-2005.
- Ibrahim, A.S., Mirbod, F., Filler, S.G., Banno, Y., Cole, G.T., Kitajima, Y., Edwards, J.E. Jr., Nozawa, Y., Ghannoum, M.A. (1995)** Evidence implicating phospholipase as a virulence factor of *Candida albicans*. *Infect Immun.* **63**: 1993–8.
- Ishii, N., Yamamoto, M., Yoshihara, F., Arisawa, M., Aoki, Y. (1997)** Biochemical and genetic characterization of Rbf1p, a putative transcription factor of *Candida albicans*. *Microbiology.* **143**:429-35.
- Ito, T., Chiba, T., Ozawa, R., Yoshida, M., Hattori, M., Sakaki, Y. (2001)** A comprehensive two-hybrid analysis to explore the yeast protein interactome. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **98**:4569-74.
- Jakobsen, B.K., Pelham, H.R. (1991)** A conserved heptapeptide restrains the activity of the yeast heat shock transcription factor. *EMBO J.* **10**:369-75.
- Jigami, Y., Odani, T. (1999)** Mannosylphosphate transfer to yeast mannan. *Biochim Biophys Acta.* **1426**:335-45.
- Jung, U.S., Levin, D.E. (1999)** Genome-wide analysis of gene expression regulated by the yeast cell wall integrity signalling pathway. *Mol Microbiol.* **34**:1049-57.
- Jung, U.S., Sobering, A.K., Romeo, M.J., Levin, D.E. (2002)** Regulation of the yeast Rlm1 transcription factor by the Mpk1 cell wall integrity MAP kinase. *Mol Microbiol.* **46**:781-9.
- Kadonaga, J.T. (2004)** Regulation of RNA polymerase II transcription by sequence-specific DNA binding factors. *Cell.* **116**:247-57.
- Kantarcioglu, A.S., Yucel, A. (2002)** Phospholipase and protease activities in clinical *Candida* isolates with reference to the sources of strains. *Mycoses.* **45**: 160–5.
- Kapteyn, J.C., Hoyer, L.L., Hecht, J.E., Muller, W.H., Andel, A. Verjleij, A.J., Makarow, M., Van Den Ende, H., Klis, F.M. (2000)** The cell wall architecture of *Candida albicans* wild-type cells and cell wall-defective mutants. *Mol Microbiol.* **35**:601-11.
- Kelly, R., Kwon-Chung, K.J. (1992)** A zinc finger protein from *Candida albicans* is involved in sucrose utilization. *J Bacteriol.* **174**:222-32.
- Kelly, S.L., Lamb, D.C., Baldwin, B.C., Corran, A.J., Kelly, D.E. (1997)** Characterization of *Saccharomyces cerevisiae* CYP61, sterol $\Delta 22$ -desaturase, and inhibition by azole antifungal agents. *J Biol Chem.* **272**:9986-8.
- Kelly, M.T., MacCallum, D.M., Clancy, S.D., Odds, F.C., Brown, A.J., Butler, G. (2004)** The *Candida albicans* *CaACE2* gene affects morphogenesis, adherence and virulence. *Mol Microbiol.* **53**:969-83.
- Ketela, T., Green, R., Bussey, H. (1999)** *Saccharomyces cerevisiae* Mid2p is a potential cell wall stress sensor and upstream activator of the *PKC1-MPK1* cell integrity pathway. *J Bacteriol.* **181**:3330-40.
- Kim, M.K., Park, H.S., Kim, C.H., Park, H.M., Choi, W. (2002)** Inhibitory effect of nikkomycin Z on chitin synthases in *Candida albicans*. *Yeast.* **19**: 341-9.
- King, L., Butler, G. (1998)** Ace2p, a regulator of *CTS1* (chitinase) expression, affects pseudohyphal production in *Saccharomyces cerevisiae*. *Curr Genet.* **34**:183-91.

- Klis, F.M. (1994)** Cell wall assembly in yeast. *Yeast*. **10**: 851-869.
- Klis, F.M., de Groot, P., Hellingwerf, K. (2001)** Molecular organization of the cell wall of *Candida albicans*. *Med Mycol*. **39**:1-8.
- Klis, F.M., Mol, P., Hellingwerf, K., Brul, S. (2002)** Dynamics of cell wall structure in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiol Rev*. **26**:239-56.
- Klis, F.M., Boorsma, A., De Groot, P.W. (2006)** Cell wall construction in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*. **23**: 185-202.
- Klug, A., Rhodes, D. (1987)** Zinc fingers: a novel protein fold for nucleic acid recognition. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*. **52**:473-82.
- Kobayashi, S.D., Cutler, J.E. (1998)** *Candida albicans* hyphal formation and virulence: is there a clearly defined role?. *Trends Microbiol*. **6**:42-4.
- Koh, S.S., Ansari, A.Z., Ptashne, M., Young, R.A. (1998)** An activator target in the RNA polymerase II holoenzyme. *Mol Cell*. **1**:895-904.
- Kojic, E.M., Darouiche, R.O. (2004)** *Candida* infections of medical devices. *Clin Microbiol Rev*. **17**:255-67.
- Kollar, R., Petrakova, E., Ashwell, G., Robbins, P.W., Cabib, E. (1995)** Architecture of the yeast cell wall. The linkage between chitin and beta(1-->3)-glucan. *J Biol Chem*. **270**:1170-8.
- Kollar, R., Reinhold, B.B., Petrakova, E., Yeh, H.J., Ashwell, G., Drgonova, J., Kapteyn, J.C., Klis, F.M., Cabib, E. (1997)** Architecture of the yeast cell wall. Beta(1-->6)-glucan interconnects mannoprotein, beta(1-->3)-glucan, and chitin. *J Biol Chem*. **272**: 17762-75.
- Kopecka, M., Gabriel, M. (1992)** The influence of Congo red on the cell wall and (1,3)-beta-D-glucan microfibril biogenesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Arch Microbiol*. **158**:115-26.
- Krajewska, W.M. (1992)** Regulation of transcription in eukaryotes by DNA-binding proteins. *Int J Biochem*. **24**:1885-98.
- Kuhn, D.M., Ghannoum, M.A. (2004)** *Candida* biofilms: antifungal resistance and emerging therapeutic options. *Curr Opin Investig Drugs*. **5**:186-97.
- Kukuruzinska, M.A., Lennon-Hopkins, K. (1999)** *ALG* gene expression and cell cycle progression. *Biochim Biophys Acta*. **1426**:359-72.
- Kumamoto, C.A. (2005)** A contact-activated kinase signals *Candida albicans* invasive growth and biofilm development. *Proc Natl Acad Sci USA*. **102**: 5576-81.
- Kumamoto, C.A., Vinces, M.D. (2005)** Contributions of hyphae and hyphae-co-regulated genes to *Candida albicans* virulence. *Cell Microbiol*. **7**: 1546-54.
- Kvaal, C.A., Lachke, S.A., Srikantha, T., Daniels, K., McCoy, J., Soll, D.R. (1999)** Misexpression of the opaque-phase-specific gene *PEP1* (*SAP1*) in the white phase of *Candida albicans* confers increased virulence in a mouse model of cutaneous infection. *Infect Immun*. **67**:6652-62.
- Laemmli, U. K. (1970)** Structural proteins during the head assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. **227**:680-85.
- Laity, J.H., Lee, B.M., Wright, P.E. (2001)** Zinc finger proteins: new insights into structural and functional diversity. *Curr. Opin. Struct. Biol*. **11**:39-46.
- Lan, C.Y., Newport, G., Murillo, L.A., Jones, T., Scherer, S., Davis, R.W., Agabian, N. (2002)** Metabolic specialization associated with phenotypic switching in *Candida albicans*. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **99**:14907-12.
- Lan, C.Y., Rodarte, G., Murillo, L.A., Jones, T., Davis, R.W., Dungan, J., Newport, G., Agabian, N. (2004)** Regulatory networks affected by iron

- availability in *Candida albicans*. *Mol Microbiol.* **53**:1451-69.
- Lane, T., Garcia, J.R. (1991)** Phospholipase production in morphological variants of *Candida albicans*. *Mycoses.* **34**: 217-20.
- Laudet, V., Stehelin, D., Clevers, H. (1993)** Ancestry and diversity of the HMG box superfamily. *Nucleic Acids Res.* **21**:2493-501.
- Lebel, K., MacPherson, S., Turcotte, B. (2006)** New tools for phenotypic analysis in *Candida albicans*: the *WAR1* gene confers resistance to sorbate. *Yeast.* **23**:249-59.
- Leberer, E., Harcus, D., Broadbent, I.D., Clark, K.L., Dignard, D., Ziegelbauer, K., Schmidt, A., Gow, N.A., Brown, A.J., Thomas, D.Y. (1996)** Signal transduction through homologs of the Ste20p and Ste7p protein kinases can trigger hyphal formation in the pathogenic fungus *Candida albicans*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **93**:13217-22.
- Lee, K.L., Buckley, H. R., Campbell, C. (1975)** An aminoacid liquid synthetic medium for the development of the mycelial and yeast forms of *Candida albicans*. *Sabouradia.* **13**:148-53.
- Lee, T.I., Rinaldi, N.J., Robert, F., Odom, D.T., Bar-Joseph, Z., Gerber, G.K., Hannett, N.M., Harbison, C.T., Thompson, C.M., Simon, I., Zeitlinger, J., Jennings, E.G., Murray, H.L., Gordon, D.B., Ren, B., Wyrick, J.J., Tagne, J.B., Volkert, T.L., Fraenkel, E., Gifford, D.K., Young, R.A. (2002)** Transcriptional regulatory networks in *Saccharomyces cerevisiae*. *Science.* **98**:799-804.
- Li, D., Kolattukudy, P.E. (1997)** Cloning of cutinase transcription factor 1, a transactivating protein containing Cys6Zn2 binuclear cluster DNA-binding motif. *J Biol Chem.* **272**:12462-7.
- Li, Y., Moir, R.D., Sethy-Coraci, I.K., Warner, J.R., Willis, I.M. (2000)** Repression of ribosome and tRNA synthesis in secretion-defective cells is signaled by a novel branch of the cell integrity pathway. *Mol Cell Biol.* **20**:3843-51.
- Lipke, P.N., Wojciechowicz, D., Kurjan, J. (1989)** AG α 1 is the structural gene for the *Saccharomyces cerevisiae* α -agglutinin, a cell surface glycoprotein involved in cell-cell interactions during mating. *Mol Cell Biol.* **9**:3155-65.
- Liu, H., Styles, C.A., Fink, G.R. (1993)** Elements of the yeast pheromone response pathway required for filamentous growth of diploids. *Science.* **262**:1741-4.
- Liu, H., Kohler, J., Fink, G.R. (1994)** Suppression of hyphal formation in *Candida albicans* by mutation of a *STE12* homolog. *Science.* **266**:1723-6.
- Liu, H. (2002)** Co-regulation of pathogenesis with dimorphism and phenotypic switching in *Candida albicans*, a commensal and a pathogen. *Int J Med Microbiol.* **292**: 299-311.
- Lo, H.J., Köhler, J.R., Di Domenico, B., Loebenberg, D., Cacciapuoti, A., Fink, G.R. (1997)** Nonfilamentous *C. albicans* mutants are avirulent. *Cell.* **90**:939-49.
- Lohr, D., Venkov, P., Zlatanova, J. (1995)** Transcriptional regulation in the yeast *GAL* gene family: a complex genetic network. *FASEB J.* **9**:777-87.
- Lotz, H., Sohn, K., Brunner, H., Muhlschlegel, F.A., Rupp, S. (2004)** *RBR1*, a novel pH-regulated cell wall gene of *Candida albicans*, is repressed by *RIM101* and activated by *NRG1*. *Eukaryot Cell.* **3**:776-84.
- Lupas, A., Van Dyke, M., Stock, J. (1991)** Predicting coiled coils from protein sequences. *Science.* **252**:1162-4.
- Lupetti, A., Danesi, R., Campa, M., Del Tacca, M., Kelly, S. (2002)** Molecular basis of resistance to azole antifungals. *Trends Mol. Med.* **8**:76-81.
- MacPherson, S., Akache, B., Weber, S.,**

- De Deken, X., Raymond, M., Turcotte, B. (2005)** *Candida albicans* zinc cluster protein Upc2p confers resistance to antifungal drugs and is an activator of ergosterol biosynthetic genes. *Antimicrob Agents Chemother.* **49**:1745-52.
- MacPherson, S., Laroche, M., Turcotte, B. (2006)** A fungal family of transcriptional regulators: the zinc cluster proteins. *Microbiol Mol Biol Rev.* **70**:583-604.
- Madhani, H.D., Fink, G.R. (1997)** Combinatorial control required for the specificity of yeast MAPK signaling. *Science.* **275**:1314-7.
- Maneu, V., Cervera, A.M., Martinez, J.P., Gozalbo, D. (1996)** Molecular cloning and characterization of a *Candida albicans* gene (*EFB1*) coding for the elongation factor EF-1 beta. *FEMS Microbiol Lett* **145**:157-62.
- Marcilla, A., Elorza, M. V., Mormeneo, S., Rico, H. and Sentandreu, R. (1991)** *Candida albicans* mycelial wall structure, supramolecular complexes released by zymoliasis, chitinase and β -mercaptoetanol. *Arch. Microbiol.* **155**: 312-9.
- Marmorstein, R., Carey, M., Ptashne, M., Harrison, S.C. (1992)** DNA recognition by *GAL4*: structure of a protein-DNA complex. *Nature.* **356**:408-14.
- Martinez, A.I., Castillo, L., Garcera, A., Elorza, M.V., Valentin, E., Sentandreu, R. (2004)** Role of Pir1 in the construction of the *Candida albicans* cell wall. *Microbiology.* **150**: 3151-61.
- Martinez-Lopez, R., Monteoliva, L., Diez-Orejas, R., Nombela, C., Gil, C. (2004)** The GPI-anchored protein CaEcm33p is required for cell wall integrity, morphogenesis and virulence in *Candida albicans*. *Microbiology.* **150**:3341-54.
- Martinez-Pastor, M.T., Marchler, G., Schuller, C., Marchler-Bauer, A., Ruis, H., Estruch, F. (1996)** The *Saccharomyces cerevisiae* zinc finger proteins Msn2p and Msn4p are required for transcriptional induction through the stress response element (STRE). *EMBO J.* **15**:2227-35.
- Mattia, E., Carruba, G., Angiolella, L., Cassone, A. (1982)** Induction of germ tube formation by N-acetyl-D-glucosamine in *Candida albicans*: uptake of inducer and germinative response. *J Bacteriol.* **152**:555-62.
- Mazur, P., Morin, N., Baginsky, W., el-Sherbeini, M., Clemas, J.A., Nielsen, J.B., Foor, F. (1995)** Differential expression and function of two homologous subunits of yeast 1,3-beta-D-glucan synthase. *Mol Cell Biol.* **15**:5671-81.
- McConville, M.J., Menon, A.K. (2000)** Recent developments in the cell biology and biochemistry of glycosyl phosphatidyl inositol lipids. *Mol Membr Biol.* **17**:1-16.
- Mermod, N., O'Neill, E.A., Kelly, T.J., Tjian, R. (1989)** The proline-rich transcriptional activator of CTF/NF-I is distinct from the replication and DNA binding domain. *Cell.* **58**:741-53.
- Mille, C., Janbon, G., Delplace, F., Ibata-Ombetta, S., Gaillardin, C., Strecker, G., Jouault, T., Trinel, P.A., Poulain, D. (2004)** Inactivation of *CaMIT1* inhibits *Candida albicans* phospholipomannan beta-mannosylation, reduces virulence, and alters cell wall protein beta-mannosylation. *J Biol Chem.* **279**: 47952-60.
- Mio, T., Yabe, T., Sudoh, M., Satoh, Y., Nakajima, T., Arisawa, M., Yamada-Okabe, H. (1996)** Role of three chitin synthase genes in the growth of *Candida albicans*. *J Bacteriol.* **178**:2416-9.
- Mio, T., Adachi-Shimizu, M., Tachibana, Y., Tabuchi, H., Inoue, S.B., Yabe, T., Yamada-Okabe, T., Arisawa, M., Watanabe, T., Yamada-Okabe, H. (1997a)** Cloning of the *Candida albicans* homolog of *Saccharomyces cerevisiae* *GSC1/FKS1* and its involvement in beta-1,3-glucan synthesis. *J Bacteriol.* **179**: 4096-105.
- Mio, T., Yamada-Okabe, T., Yabe, T.,**

- Nakajima, T., Arisawa, M., Yamada-Okabe, H. (1997b)** Isolation of the *Candida albicans* homologs of *Saccharomyces cerevisiae* *KRE6* and *SKN1*: expression and physiological function. *J Bacteriol.* **179**: 2363-72.
- Monge, R.A., Roman, E., Nombela, C., Pla, J. (2006)** The MAP kinase signal transduction network in *Candida albicans*. *Microbiology.* **152**:905-12.
- Montijn, R.C., Vink, E., Muller, W.H., Verkleij, A.J., Van Den Ende, H., Henrissat, B., Klis, F.M. (1999)** Localization of synthesis of beta-1,6-glucan in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Bacteriol.* **181**:7414-20.
- Moukadiri, I., Jaafar, L., Zueco, J. (1999)** Identification of two mannoproteins released from cell walls of a *Saccharomyces cerevisiae* *mnn1 mnn9* double mutant by reducing agents. *J Bacteriol.* **181**:4741-5.
- Moukadiri, I., Zueco, J. (2001a)** Evidence for the attachment of Hsp150/Pir2 to the cell wall of *Saccharomyces cerevisiae* through disulfide bridges. *FEMS Yeast Research* **1**: 241-5.
- Moukadiri, I., Zueco, J. (2001b)** YJL159w does encode Pir2/Hsp150. *Yeast.* **18**:323-4.
- Mrsa, V., Seidl, T., Gentsch, M., Tanner, W. (1997)** Specific labelling of cell wall proteins by biotinylation. Identification of four covalently linked O-mannosylated proteins of *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast.* **13**:1145-54.
- Muhlschlegel, F.A., Fonzi, W.A. (1997)** *PHR2* of *Candida albicans* encodes a functional homolog of the pH-regulated gene *PHR1* with an inverted pattern of pH-dependent expression. *Mol Cell Biol.* **17**:5960-7.
- Munro, C.A., Schofield, D.A., Gooday, G.W., Gow, N.A. (1998)** Regulation of chitin synthesis during dimorphic growth of *Candida albicans*. *Microbiology.* **144**:391-401.
- Munro, C.A., Gow, N.A. (2001)** Chitin synthesis in human pathogenic fungi. *Med Mycol.* **39**: 41-53.
- Munro, C.A., Winter, K., Buchan, A., Henry, K., Becker, J.M., Brown, A.J., Bulawa, C.E., Gow, N.A. (2001)** Chs1 of *Candida albicans* is an essential chitin synthase required for synthesis of the septum and for cell integrity. *Mol Microbiol.* **39**: 1414-26.
- Munro, C.A., Whitton, R.K., Hughes, H.B., Rella, M., Selvaggini, S., Gow, N.A. (2003)** *CHS8*-a fourth chitin synthase gene of *Candida albicans* contributes to in vitro chitin synthase activity, but is dispensable for growth. *Fungal Genet Biol.* **40**:146-58.
- Murad, A.M.A., Lee, P.L., Broadbent, I.D., Barelle, C.J., Brown, A.J.P. (2000)** Clp10, an efficient and convenient integrating vector for *Candida albicans*. *Yeast.* **16**:325-7.
- Murad, A.M., d'Enfert, C., Gaillardin, C., Tournu, H., Tekaia, F., Talibi, D., Marechal, D., Marchais, V., Cottin, J., Brown, A.J. (2001)** Transcript profiling in *Candida albicans* reveals new cellular functions for the transcriptional repressors CaTup1, CaMig1 and CaNrg1. *Mol Microbiol.* **42**:981-93.
- Nagasu, T., Shimma, Y. I., Nakanishi, Y., Kuromitsu, J., Iwama, K., Nakayama, K. I., Suzuki, K., and Jigami, Y (1992)** Isolation of new temperature-sensitive mutants of *Saccharomyces cerevisiae* deficient in mannose outer chain elongation. *Yeast.* **8**: 525-47.
- Naglik, J.R., Challacombe, S.J., Hube, B. (2003)** *Candida albicans* secreted aspartyl proteinases in virulence and pathogenesis. *Microbiol Mol Biol Rev.* **67**: 400-28.
- Naglik, J., Albrecht, A., Bader, O., Hube, B. (2004)** *Candida albicans* proteinases and host/pathogen interactions. *Cell Microbiol.* **6**:915-26.
- Nakielny, S., Dreyfuss, G. (1999)** Transport of proteins and RNAs in and out of the nucleus. *Cell.* **99**:677-90.

- Navarro-García, F., Sanchez, M., Pla, J., Nombela, C. (1995)** Functional characterization of the *MKC1* gene of *Candida albicans*, which encodes a mitogen-activated protein kinase homolog related to cell integrity. *Mol Cell Biol.* **15**:2197-206.
- Navarro-García, F., Alonso-Monge, R., Rico, H., Pla, J., Sentandreu, R., Nombela, C. (1998)** A role for the MAP kinase gene *MKC1* in cell wall construction and morphological transitions in *Candida albicans*. *Microbiology.* **144**:411-24.
- Negredo, A., Monteoliva, L., Gil, C., Pla, J., Nombela, C. (1997)** Cloning, analysis and one-step disruption of the *ARG5,6* gene of *Candida albicans*. *Microbiology.* **143**:297-302.
- Nett, J., Andes, D. (2006)** *Candida albicans* biofilm development, modelling a host-pathogen interaction. *Curr Opin Microbiol.* **9**:340-5.
- Nikolaev, I., Cochet, M.F., Felenbok, B. (2003)** Nuclear import of zinc binuclear cluster proteins proceeds through multiple, overlapping transport pathways. *Eukaryot Cell.* **2**:209-21.
- Nobile, C.J., Mitchell, A.P. (2005)** Regulation of cell surface genes and biofilm formation by the *C. albicans* transcription factor Bcr1p. *Curr Biol.* **15**:1150-5.
- Nobile, C.J., Mitchell, A.P. (2006)** Genetics and genomics of *Candida albicans* biofilm formation. *Cell Microbiol.* **8**: 1382-91.
- Noel, J., Turcotte, B. (1998)** Zinc cluster proteins Leu3p and Uga3p recognize highly related but distinct DNA targets. *J Biol Chem.* **273**:17463-8.
- Nombela, C., Gil, C., Chaffin, W.L. (2006)** Non-conventional protein secretion in yeast. *Trends Microbiol.* **14**:15-21.
- Odds, F.C. (1988)** *Candida* and Candidosis: A review and bibliography. 2nd. Ed, London.
- Odds, F.C. (1994)** *Candida* species and virulence. *Am. Soc. Microbiol. News* **60**, 313-8.
- Odds, F.C. (2001)** Sordarin antifungal agents. *Expert Opin Ther Pat.* **11**: 283-94.
- Odds, F.C., Gow, N.A., Brown, A.J. (2001)** Fungal virulence studies come of age. *Genome Biol.* **2**:1009-14.
- Odds, F.C., Brown, A.J.P., Gow, N.A. (2003)** Antifungal agents: mechanism of action. *Trends Microbiol.* **11**:272-9.
- Orlean, P., Ammer, A., Watzele, M., Tanner, W. (1986)** Synthesis of an O-glycosylated cell surface protein induced in yeast by alpha-factor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **83**: 6263-6.
- Osumi, M. (1998)** The ultrastructure of yeast: cell wall structure and formation. *Micron* **29**: 207-33.
- Pahlman, A.K., Granath, K., Ansell, R., Hohmann, S., Adler, L. (2001)** The yeast glycerol 3-phosphatases Gpp1p and Gpp2p are required for glycerol biosynthesis and differentially involved in the cellular responses to osmotic, anaerobic, and oxidative stress. *J Biol Chem.* **276**:3555-63.
- Pan, T., Coleman, J.E. (1990)** Gal4 transcription factor is not a 'zinc finger' but forms a Zn(II)₂Cys₆ binuclear cluster. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **87**: 2077-81.
- Pan, X., Heitman, J. (1999)** Cyclic AMP-dependent protein kinase regulates pseudohyphal differentiation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol.* **19**: 4874-87.
- Paravicini, G., Mendoza, A., Antonsson, B., Cooper, M., Losberger, C., Payton, M.A. (1996)** The *Candida albicans* *PKC1* gene encodes a protein kinase C homolog necessary for cellular integrity but not dimorphism. *Yeast.* **12**:741-56.
- Pardini, G., De Groot, P.W., Coste, A.T., Karababa, M., Klis, F.M., de Koster, C.G., Sanglard, D. (2006)** The *CRH* family coding for cell wall glycosyl phosphatidyl

- inositol proteins with a predicted transglycosidase domain affects cell wall organization and virulence of *Candida albicans*. *J Biol Chem.* **281**:40399-411.
- Pardo, M., Monteoliva, L., Vazquez, P., Martinez, R., Molero, G., Nombela, C., Gil, C. (2004)** *PST1* and *ECM33* encode two yeast cell surface GPI proteins important for cell wall integrity. *Microbiology* **150**: 4157-70.
- Parks, L.W., Casey, W.M. (1995)** Physiological implications of sterol biosynthesis in yeast. *Annu. Rev. Microbiol.* **49**:95-116.
- Pastor, F.I.J., Valentín, E., Herrero, E., Sentandreu, R. (1984)** Structure of the *Saccharomyces cerevisiae* cell-wall mannoproteins released by zymolyase and their contribution to wall architecture. *Biochem Biophys.* **802**:292-300.
- Peberdy, J.F. (1999)** Extracellular proteins in fungi: a cytological and molecular perspective. *Acta Microbiol. Immunol. Hung.* **46**: 165-74.
- Pedreño, Y., Maicas, S., Arguelles, J.C., Sentandreu, R., Valentin, E. (2004)** The *ATC1* gene encodes a cell wall-linked acid trehalase required for growth on trehalose in *Candida albicans*. *J Biol Chem.* **279**: 40852-60.
- Prill, S.K., Klinkert, B., Timpel, C., Gale, C.A., Schroppel, K., Ernst, J.F. (2005)** *PMT* family of *Candida albicans*: five protein mannosyltransferase isoforms affect growth, morphogenesis and antifungal resistance. *Mol Microbiol.* **55**:546-60.
- Ptashne, M., Gann, A.A. (1990)** Activators and targets. *Nature.* **346**:329-31.
- Ptashne, M., Gann, A. (1997)** Transcriptional activation by recruitment. *Nature.* **386**:569-77.
- Qadota, H., Python, C.P., Inoue, S.B., Arisawa, M., Anraku, Y., Zheng, Y., Watanabe, T., Levin, D.E., Ohya, Y. (1996)** Identification of yeast Rho1p GTPase as a regulatory subunit of 1,3-beta-glucan synthase. *Science.* **272**: 279-81.
- Rajavel, M., Philip, B., Buehrer, B.M., Errede, B., Levin, D.E. (1999)** Mid2 is a putative sensor for cell integrity signalling in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol.* **19**:3969-76.
- Ram, A.F., Wolters, A., Ten Hoopen, R., Klis, F.M. (1994)** A new approach for isolating cell wall mutants in *Saccharomyces cerevisiae* by screening for hypersensitivity to calcofluor white. *Yeast.* **10**:1019-30.
- Ramage, G., VandeWalle, K., Lopez-Ribot, J.L., Wickes, B.L. (2002)** The filamentation pathway controlled by the Efg1 regulator protein is required for normal biofilm formation and development in *Candida albicans*. *FEMS Microbiol Lett.* **214**: 95-100.
- Ramage, G., Saville, S.P., Thomas, D.P., Lopez-Ribot, J.L. (2005)** *Candida* biofilms: an update. *Eukaryot Cell.* **4**:633-8.
- Ramon, A.M., Porta, A., Fonzi, W.A. (1999)** Effect of environmental pH on morphological development of *Candida albicans* is mediated via the PacC-related transcription factor encoded by *PRR2*. *J Bacteriol.* **181**:7524-30.
- Reece, R.J., Ptashne, M. (1993)** Determinants of binding-site specificity among yeast C₆ zinc cluster proteins. *Science.* **261**:909-11.
- Richard, M.L., Plaine, A. (2007)** Comprehensive analysis of glycosyl phosphatidylinositol-anchored proteins in *Candida albicans*. *Eukaryot Cell.* **6**:119-33.
- Richardson, M.D. (2005)** Changing patterns and Trends in systemic fungal infections. *J Antimicrob Chemother.* **56**: 5-11.
- Robinson, K.A., Lopes, J.M. (2000)** SURVEY AND SUMMARY: *Saccharomyces cerevisiae* basic helix-loop-helix proteins regulate diverse biological processes. *Nucleic Acids Res.* **28**:1499-505.

- Rodriguez-Peña, J.M., Cid, V.J., Arroyo, J., Nombela, C. (2000)** A novel family of cell wall-related proteins regulated differently during the yeast life cycle. *Mol Cell Biol.* **20**:3245-55.
- Roemer, T., Paravicini, G., Payton, M.A., Bussey, H. (1994)** Characterization of the yeast (1 \rightarrow 6)-beta-glucan biosynthetic components, Kre6p and Skn1p, and genetic interactions between the PKC1 pathway and extracellular matrix assembly. *J Cell Biol.* **127**:567-79.
- Roman, E., Nombela, C., Pla, J. (2005)** The Sho1 adaptor protein links oxidative stress to morphogenesis and cell wall biosynthesis in the fungal pathogen *Candida albicans*. *Mol Cell Biol.* **25**:10611-27.
- Rottensteiner, H., Kal, A.J., Hamilton, B., Ruis, H., Tabak, H.F. (1997)** A heterodimer of the Zn2Cys6 transcription factors Pip2p and Oaf1p controls induction of genes encoding peroxisomal proteins in *Saccharomyces cerevisiae*. *Eur J Biochem.* **247**:776-83.
- Ruiz-Herrera, J. (1992)** Fungal cell wall, structure, synthesis and assembly. *CRC Press, Boca Raton Ann Arbor London*.
- Ruiz-Herrera, J., Elorza, M.V., Alvarez, P.E., Sentandreu, R. (2004)** Synthesis of the fungal cell wall. Pathogenic fungi: Structural Biology and Taxonomy (San-Blas, G. and Calderone, R., eds). *Caister Academic Press, Wymondham, UK*. 41-99.
- Ruiz-Herrera, J., Elorza, M.V., Valentin, E., Sentandreu, R. (2006)** Molecular organization of the cell wall of *Candida albicans* and its relation to pathogenicity. *FEMS Yeast Res.* **6**: 14-29.
- Russo, P., Kalkkinen, N., Sareneva, H., Paakkola, J., Makarow, M. (1992)** A heat shock gene from *Saccharomyces cerevisiae* encoding a secretory glycoprotein. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **89**:8857.
- Sabie, F.T., Gadd, G.M. (1992)** Effect of nucleosides and nucleotides and the relationship between cellular adenosine 3':5'-cyclic monophosphate (cyclic AMP) and germ tube formation in *Candida albicans*. *Mycopathologia.* **119**:147-56.
- Sadowski, I., Ma, J., Triezenberg, S., Ptashne, M. (1988)** GAL4-VP16 is an unusually potent transcriptional activator. *Nature.* **335**:563-4.
- Saiki, R.K., Walsh, P.S., Levenson, C.H., Erlich, H.A. (1989)** Genetic analysis of amplified DNA with immobilized sequence-specific oligonucleotide probes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **86**:6230-4.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F., Maniatis, T. (1989)** Molecular cloning: a laboratory manual. 2nd ed. Cold Spring Harbor, N.Y. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Sanglard, D., Hube, B., Monod, M., Odds, F.C., Gow, N.A. (1997)** A triple deletion of the secreted aspartyl proteinase genes *SAP4*, *SAP5*, and *SAP6* of *Candida albicans* causes attenuated virulence. *Infect Immun.* **65**:3539-46.
- Saporito-Irwin, S.M., Birse, C.E., Sypherd, P.S., Fonzi, W.A. (1995)** *PHR1*, a pH-regulated gene of *Candida albicans*, is required for morphogenesis. *Mol Cell Biol.* **15**:601-13.
- Sarthy AV, McGonigal T, Coen M, Frost DJ, Meulbroek JA, Goldman RC. (1997)** Phenotype in *Candida albicans* of a disruption of the *BGL2* gene encoding a 1,3-beta-glucosyltransferase. *Microbiology.* **143**:367-76.
- Schaller, M., Borelli, C., Korting, H.C., Hube, B. (2005)** Hydrolytic enzymes as virulence factors of *Candida albicans*. *Mycoses.* **48**:365-77.
- Schjerling P, Holmberg S. (1996)** Comparative amino acid sequence analysis of the C₆ zinc cluster family of transcriptional regulators. *Nucleic Acids Res.* **24**:4599-607.
- Sellick, C.A., Reece, R.J. (2005)** Eukaryotic transcription factors as direct nutrient sensors. *Trends Biochem Sci.* **30**:405-12.
- Jiang, B.H., Rue, E., Wang, G.L., Roe,**

- R., Semenza, G.L. (1996)** Dimerization, DNA binding, and transactivation properties of hypoxia-inducible factor 1. *J Biol Chem.* **271**:17771-8.
- Sentandreu, M., Elorza, M.V., Sentandreu, R., Fonzi, W.A. (1998)** Cloning and characterization of *PRA1*, a gene encoding a novel pH-regulated antigen of *Candida albicans*. *J Bacteriol.* **180**:282-9.
- Setiadi, E.R., Doedt, T., Cottier, F., Noffz, C., Ernst, J.F. (2006)** Transcriptional response of *Candida albicans* to hypoxia: linkage of oxygen sensing and Efg1p-regulatory networks. *J Mol Biol.* **361**:399-411.
- Shahinian, S., Bussey, H. (2000)** beta-1,6-Glucan synthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Microbiol.***35**: 477-89.
- Shepherd, M.G., Yin, C.Y., Ram, S.P., Sullivan, P.A. (1980)** Germ tube induction in *Candida albicans*. *Can J Microbiol.* **26**:21-6.
- Sheppard, D.C., Yeaman, M.R., Welch, W.H., Phan, Q.T., Fu, Y., Ibrahim, A.S., Filler, S.G., Zhang, M., Waring, A.J., Edwards, J.E. Jr. (2004)** Functional and structural diversity in the Als protein family of *Candida albicans*. *J Biol Chem.* **279**:30480-9.
- Sherman, F., Fink, G.R., Hicks, J.B. (1986)** Methods in yeast genetics. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.
- Shore, P., Sharrocks, A.D. (1995)** The MADS-box family of transcription factors. *Eur J Biochem.* **229**:1-13.
- Sipos, G., Puoti, A., Conzelmann, A. (1995)** Biosynthesis of the side chain of yeast glycosylphosphatidylinositol anchors is operated by novel mannosyltransferases located in the endoplasmic reticulum and the Golgi apparatus. *J Biol Chem.* **270**:19709-15.
- Smith, A.E., Zhang, Z., Thomas, C.R., Moxham, K.E., Middelberg, A.P. (2000)** The mechanical properties of *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc Natl Acad Sci USA.* **97**: 9871-4.
- Smith, S.E., Csank, C., Reyes, G., Ghannoum, M.A., Berlin, V. (2002)** *Candida albicans RHO1* is required for cell viability in vitro and in vivo. *FEMS Yeast Res.* **2**: 103-11.
- Sohn K, Urban C, Brunner H, Rupp S. (2003)** *EFG1* is a major regulator of cell wall dynamics in *Candida albicans* as revealed by DNA microarrays. *Mol Microbiol.* **47**:89-102.
- Sohn, K., Schwenk, J., Urban, C., Lechner, J., Schweikert, M., Rupp, S. (2006)** Getting in touch with *Candida albicans*: the cell wall of a fungal pathogen. *Curr Drug Targets.* **7**:505-12.
- Soll, D.R. (1997)** Gene regulation during high-frequency switching in *Candida albicans*. *Microbiology.* **143**: 279-88.
- Sonneborn, A., Bockmuhl, D.P., Ernst, J.F. (1999a)** Chlamydospore formation in *Candida albicans* requires the Efg1p morphogenetic regulator. *Infect Immun* **67**: 5514-7.
- Sonneborn, A., Tebarth, B., Ernst, J.F. (1999b)** Control of white-opaque phenotypic switching in *Candida albicans* by the Efg1p morphogenetic regulator. *Infect Immun.***67**:4655-60.
- Southern, E. M. (1975)** Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J Mol Biol.* **98**:503-17.
- Staab, J.F., Bradway, S.D., Fidel, P.L., Sundstrom, P. (1999)** Adhesive and mammalian transglutaminase substrate properties of *Candida albicans* Hwp1. *Science.* **283**:1535-8.
- Stehr, F., Felk, A., Gacser, A., Kretschmar, M., Mahnss, B., Neuber, K., Hube, B., Schafer, W. (2004)** Expression analysis of the *Candida albicans* lipase gene family during experimental infections and in patient samples. *FEMS Yeast Res.*

4:401-8.

Stoldt, V.R., Sonneborn, A., Leuker, C.E., Ernst, J.F. (1997) Efg1p, an essential regulator of morphogenesis of the human pathogen *Candida albicans*, is a member of a conserved class of bHLH proteins regulating morphogenetic processes in fungi. *EMBO J.* **16**:1982-91.

Strahl-Bolsinger S, Gentsch M, Tanner W. (1999) Protein O-mannosylation. *Biochim Biophys Acta.* **1426**:297-307.

Stringer, K.F., Ingles, C.J., Greenblatt, J. (1990) Direct and selective binding of an acidic transcriptional activation domain to the TATA-box factor TFIID. *Nature.* **345**:783-6.

Struhl, K. (1995) Yeast transcriptional regulatory mechanisms. *Annu Rev Genet.* **29**:651-74.

Stubbs HJ, Brasch DJ, Emerson GW, Sullivan PA. (1999) Hydrolase and transferase activities of the beta-1,3-exoglucanase of *Candida albicans*. *Eur J Biochem.* **263**:889-95.

Sudbery, P., Gow, N.A.R., Berman, J. (2004) The distinct morphogenetic states of *Candida albicans*. *Trends Microbiol* **12**: 317-24.

Sundstrom, P.M., Tam, M.R., Nichols, E.J., Kenny, G.E. (1988) Antigenic differences in the surface mannoproteins of *Candida albicans* as revealed by monoclonal antibodies. *Infect Immun* **56**:601-20.

Sundstrom, P. (1999) Adhesins in *Candida albicans*. *Curr Opin Microbiol.* **2**: 353-7.

Sundstrom, P. (2002) Adhesion in *Candida* spp. *Cell Microbiol.* **4**:461-9.

Talibi, D., Raymond, M. (1999) Isolation of a putative *Candida albicans* transcriptional regulator involved in pleiotropic drug resistance by functional complementation of a *pdr1 pdr3* mutation in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Bacteriol.* **181**:231-40.

Tang, C.S., Bueno, A., Russell, P. (1994) *ntf1+* encodes a 6-cysteine zinc finger-containing transcription factor that regulates the *nmt1* promoter in fission yeast. *J Biol Chem* **269**: 11921-6.

Taylor, B.L., Zhulin, I.B. (1999) PAS domains: internal sensors of oxygen, redox potential and light. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **63**:479-506.

Thomas, D., Surdin-Kerjan, Y. (1997) Metabolism of Sulfur Amino Acids in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol Mol Biol.* **61**:503-32.

Thomson, L.M., Bates, S., Yamazaki, S., Arisawa, M., Aoki, Y., Gow, N.A. (2000) Functional characterization of the *Candida albicans* *MNT1* mannosyltransferase expressed heterologously in *Pichia pastoris*. *J Biol Chem.* **275**: 18933-8.

Tiede, A., Bastisch, I., Schubert, J., Orlean, P., Schmidt, R.E. (1999) Biosynthesis of glycosyl phosphatidyl inositols in mammals and unicellular microbes. *Biol Chem.* **380**:503-23.

Timpel, C., Zink, S., Strahl-Bolsinger, S., Schroppel, K., Ernst, J. (2000) Morphogenesis, adhesive properties, and antifungal resistance depend on the Pmt6 protein mannosyltransferase in the fungal pathogen *Candida albicans*. *J Bacteriol.* **182**:3063-71.

Titz, B., Thomas, S., Rajagopala, S.V., Chiba, T., Ito, T., Uetz, P. (2006) Transcriptional activators in yeast. *Nucleic Acids Res.* **34**:955-67.

Todd, R.B., Andrianopoulos, A. (1997) Evolution of a fungal regulatory family: The Zn(II)₂(Cys)₆ binuclear cluster DNA binding motif. *Fungal Genet. Biol.* **21**:388-405.

Todd, R.B., Murphy, R.L., Martin, H.M., Sharp, J.A., Davis, M.A., Katz, M.E., Hynes, M.J. (1997) The acetate regulatory gene *facB* of *Aspergillus nidulans* encodes a Zn(II)₂Cys₆ transcriptional activator. *Mol Gen Genet.* **254**:495-504.

Toh-e, A., Yasunaga, S., Nisogi, H.,

- Tanaka, K., Oguchi, T., Matsui, Y. (1993)** Three yeast genes, *PIR1*, *PIR2* and *PIR3*, containing internal tandem repeats, are related to each other, and *PIR1* and *PIR2* are required for tolerance to heat shock. *Yeast*. **9**:481-94.
- Tokunaga, M., Kusamichi, M., Koike, H. (1986)** Ultrastructure of outermost layer of cell wall in *Candida albicans* observed by rapid-freezing technique. *J Electron Microsc.* **35**: 237-46.
- Tortorano, A.M., Peman, J., Bernhardt, H., Klingspor, L., Kibbler, C.C., Faure, O., Biraghi, E., Canton, E., Zimmermann, K., Seaton, S., Grillot, R.; ECMM Working Group on Candidaemia. (2004)** Epidemiology of candidaemia in Europe: results of 28-month European Confederation of Medical Mycology (ECMM) hospital-based surveillance study. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. **23**:317-22.
- Towbin, H., Staehelin, T., Gordon, J. (1979)** Electrophoretic transfer of proteins of polyacrilamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **76**:4350-4.
- Triezenberg, S.J. (1995)** Structure and function of transcriptional activation domains. *Curr Opin Genet Dev*. **5**:190-6.
- Tsong, A.F., Miller, M.G., Raisner, R.M., Johnson, A.D. (2003)** Evolution of a combinatorial transcriptional circuit: a case study in yeasts. *Cell*. **115**: 389-99.
- Uetz, P., Giot, L., Cagney, G., Mansfield, T.A., Judson, R.S., Knight, J.R., Lockshon, D., Narayan, V., Srinivasan, M., Pochart, P., Qureshi-Emili, A., Li, Y., Godwin, B., Conover, D., Kalbfleisch, T., Vijayadamodar, G., Yang, M., Johnston, M., Fields, S., Rothberg, J.M. (2000)** A comprehensive analysis of protein-protein interactions in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nature*. **403**:623-7.
- Uhl, M.A., Biery, M., Craig, N., Johnson, A.D. (2003)** Haploinsufficiency-based large-scale forward genetic analysis of filamentous growth in the diploid human fungal pathogen *C. albicans*. *EMBO J*. **22**:2668-78.
- Urnov, F.D. (2002)** A feel for the template: zinc finger protein transcription factors and chromatin. *Biochem. Cell Biol*. **80**:321-33.
- Valentín, E., Herrero, E., Pastor, F.I.J., Sentandreu, R. (1984)** Solubilization and analysis of mannoprotein molecules from the cell wall of *Saccharomyces cerevisiae*. *J Gen Microb*. **130**:1419-28.
- Valentin, E., Herrero, E., Rico, H., Miragall, F., Sentandreu, R. (1987)** Cell wall mannoproteins during the population growth phases in *Saccharomyces cerevisiae*. *Arch Microbiol*. **148**:88-94.
- Valentin, E., Mormeneo, S., Sentandreu, R. (2000)** The cell surface of *Candida albicans* during morphogenesis. In Contributions in Microbiology: Dimorphism in Human Pathogenic and Apathogenic Yeasts, Ernst JF, Schmidt A (eds). Karger: Basel; 138-50.
- Vallee, B.L., Coleman, J.E., Auld, D.S. (1991)** Zinc fingers, zinc clusters, and zinc twists in DNA-binding protein domains. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **88**:999-1003.
- Van den Bossche, H. (2002)** Echinocandins -an update. *Expert Opin Ther Pat*. **12**: 151-67.
- Van der Vaart, J.M., Caro, L.H., Chapman, J.W., Klis, F.M., Verrips, C.T. (1995)** Identification of three mannoproteins in the cell wall of *Saccharomyces cerevisiae*. *J Bacteriol*. **177**:3104-10.
- Van de Wetering, M., Oosterwegel, M., Van Norren, K., Clevers, H. (1993)** Sox-4, a Sry-like HMG box protein, is a transcriptional activator in lymphocytes. *EMBO J*. **12**:3847-54.
- Van Helden, J. (2003)** Regulatory sequences analysis tools. *Nucleic Acids Res*. **31**: 3593-6.
- Vashee, S., Xu, H., Johnston, S.A., Kodadek, T. (1993)** How do "Zn₂ cys6"

proteins distinguish between similar upstream activation sites? Comparison of the DNA-binding specificity of the *GAL4* protein in vitro and in vivo. *J Biol Chem.* **268**:24699-706.

Verna, J., Lodder, A., Lee, K., Vagts, A., Ballester, R. (1997) A family of genes required for maintenance of cell wall integrity and for the stress response in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **94**:13804-9.

Vilella, F., Herrero, E., Torres, J., de la Torre-Ruiz, M.A. (2005) Pkc1 and the upstream elements of the cell integrity pathway in *Saccharomyces cerevisiae*, Rom2 and Mtl1, are required for cellular responses to oxidative stress. *J Biol Chem.* **280**: 9149-59.

Vinson, C.R., Sigler, P.B., McKnight, S.L. (1989) Scissors-grip model for DNA recognition by a family of leucine zipper proteins. *Science.* **246**:911-6.

Walworth, N.C., Novick, P.J. (1987) Purification and characterization of constitutive secretory vesicles from yeast. *J Cell Biol.* **105**:163-74.

Whiteway, M., Dignard, D., Thomas, D.Y. (1992) Dominant negative selection of heterologous genes: isolation of *Candida albicans* genes that interfere with *Saccharomyces cerevisiae* mating factor-induced cell cycle arrest. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **89**:9410-4.

Wolfe, S.A., Nekludova, L., Pabo, C.O. (2000) DNA recognition by Cys2His2 zinc finger proteins. *Annu Rev Biophys Biomol Struct.* **29**:183-212.

Woloshuk, C.P., Fotz, K.R., Brewer, J.F., Bhtnagar, D., Cleveland, T.E., Playne, G.A. (1994) Molecular characterization of *aflR*, a regulatory locus for aflatoxin biosynthesis. *Appl. Environ. Microbiol* **60**: 2408-14.

Yang, X., Talibi, D., Weber, S., Poisson, G., Raymond, M. (2001) Functional isolation of the *Candida albicans* *FCR3* gene encoding a bZip transcription factor

homologous to *Saccharomyces cerevisiae* Yap3p. *Yeast.* **18**:1217-25.

Yuan, G.F., Fu, Y.H., Marzluf, G.A. (1991) *nit-4*, a pathway-specific regulatory gene of *Neurospora crassa*, encodes a protein with a putative binuclear zinc DNA-binding domain. *Mol Cell Biol.* **11**:5735-45.

Zeitlinger, J., Simon, I., Harbison, C.T., Hannett, N.M., Volkert, T.L., Fink, G.R., Young, R.A. (2003) Program-specific distribution of a transcription factor dependent on partner transcription factor and MAPK signaling. *Cell.* **13**:395-404.

Zhang L, Guarente L. (1994) The yeast activator Hap1--a Gal4 family member--binds DNA in a directly repeated orientation. *Genes Dev.* **8**:2110-9.

Zhao, X., Pujol, C., Soll, D.R., Hoyer, L.L. (2003) Allelic variation in the contiguous loci encoding *Candida albicans* *ALS5*, *ALS1* and *ALS9*. *Microbiology.* **149**:2947-60.

Zhulin, I.B., Taylor, B.L., Dixon, R. (1997) PAS domain S-boxes in archaea, bacteria and sensors for oxygen and redox. *Trends Biochem. Sci.* **22**:331-3.

VIII. AGRADECIMIENTOS / ACKNOWLEDGEMENTS

Me gustaría expresar mi agradecimiento a las personas que científica o personalmente han participado en esta tesis doctoral.

A mis directores de tesis, el Dr. Eulogio Valentín, el Dr. Rafael Sentandreu y el Dr. Luis Castillo por la confianza que han depositado en mí. A Don Rafael por enseñarme su dedicación a la ciencia. A Eulogio por compartir conmigo la ilusión por nuestro factor de transcripción, por su apoyo y ánimo y porque durante todo este tiempo la puerta de su despacho siempre ha estado abierta, ha sido genial trabajar contigo. A Chin, co-director, compañero y amigo, por tu parte del trabajo y porque siempre consigues hacerme reír.

A la Dra. Victoria Elorza, Toyi, por los consejos profesionales y personales, y por cuidarnos tanto. A la Dra. Mariela Gómez del departamento de Bioquímica y al Dr. Lucas del Castillo, porque gracias a ellos llegué a este grupo de investigación.

A los doctores A. Negredo, F. Navarro García y A. Brown por ceder desinteresadamente algunos de los plásmidos utilizados en este trabajo.

A mis compañeros de laboratorio. A la Dra. Yolanda Pedreño, mi primera “seño” y a las Dras. Ana Martínez y Ana Garcerá, sin vuestra ayuda esta tesis no existiría. Gracias Yoli por acogerme como becaria al principio de este trabajo y por tu buen humor. Garce, gracias por todos los momentos y risas compartidas. Ana, contigo he vivido muchas penas y alegrías, gracias por tu amistad y apoyo constante dentro y fuera del labo. A Lizzy, la becaria más “ridícula en chileno” y la amiga que siempre sabe entender mi forma de ver las cosas. A Sam, por todo el tiempo compartido. A la Dra. Almudena Nieto por su positividad contagiosa y al Dr. Sergi Maicas por ser único. Al resto de compañeros con los que he coincidido, Leda, Ana P., Geno, Jose María, Antonio. A Toni, por su simpatía y su ayuda con los papeles.

I would like to thank Professor Joachim Ernst, from the Institut für Mikrobiologie, Heinrich Heine Universität, Düsseldorf, for giving me the opportunity to join his group and for contributing to my PhD with valuable advices. Thanks to all my labmates in Düsseldorf: Klaus, Sven, Nora, Christine, Jessica, Dagmar, Eva, Catrin, Inga, Isabelle, Carsten, Ute, Rainer for making me feel at home and especially to Pilar, Jacek, Fabien and Christian, it would not have been the same without you.

A los compañeros de comidas y cafés, Isabel, Pedro, Ainoa, Patricio, por los buenos momentos, las pocas conversaciones serias y las muchas risas.

A mis amigos de toda la vida Belén, Merche y Paco. Muchas gracias Beli, el tiempo pasa, nuestras vidas cambian y tú siempre estás ahí. A Silvia Mateo y a primo Alberto por su interés, su apoyo y su cariño. A Felip, por poner música a mi vida y por estar tan cerca a 2000 km. A Pablo, por todo, por ser el mejor amigo del mundo.

A mi familia; mis padres, mi hermana y Edu, sois lo mejor que tengo, gracias por estar siempre a mi lado, por apoyarme en todas mis decisiones y por ilusionaros con mis ilusiones.

Muchas gracias a todos.