

DEPARTAMENT DE MICROBIOLOGIA I ECOLOGIA

ESTUDIO DE PGA 26, UNA PROTEÍNA IMPLICADA EN LA  
ARQUITECTURA DE LA PARED CELULAR DE *CANDIDA*  
*ALBICANS*.

LESLIE LAFORET AGUILERA

UNIVERSITAT DE VALÈNCIA  
Servei de Publicacions  
2010

Aquesta Tesi Doctoral va ser presentada a València el dia 16 d'octubre de 2009 davant un tribunal format per:

- Dra. Concepción Gil García
- Dra. María Martínez-Esparza Alvargonzález
- Dra. Teresa Ruiz Martín
- Dr. José Luis Sánchez Carazo
- Dr. Manuel Casanova Monroig

Va ser dirigida per:

Dr. Eulogio Valentín Gómez  
Dr. Rafael Sentandreu Ramón  
Dr. Juan Carlos Argüelles

©Copyright: Servei de Publicacions  
Leslie Laforet Aguilera

---

Dipòsit legal: V-1052-2011  
I.S.B.N.: 978-84-370-7788-8

Edita: Universitat de València  
Servei de Publicacions  
C/ Arts Gràfiques, 13 baix  
46010 València  
Spain  
Telèfon:(0034)963864115







VNIVERSITATIS VALÈNCIA

FACULTAD DE FARMACIA

DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA Y ECOLOGÍA

Estudio de Pga26, una proteína implicada  
en la arquitectura de la pared celular  
de *Candida albicans*

Memoria presentada por  
LESLIE LAFORET AGUILERA  
para optar al grado de Doctora

Valencia, 2009



**Dr. Eulogio Valentín Gómez**, Profesor Titular de Microbiología de la Universidad de Valencia, **Dr. Rafael Sentandreu Ramón**, Catedrático de Microbiología de la Universidad de Valencia y **Dr. Juan Carlos Argüelles**, Profesor Titular de Microbiología de la Universidad de Murcia.

CERTIFICAN: Que la Memoria de Tesis Doctoral titulada: “**Estudio de Pga26, una proteína implicada en la arquitectura de la pared celular de *Candida albicans*.**”, realizada por la Licenciada **Dña. Leslie Laforet Aguilera** para aspirar al Grado de Doctora, contiene fielmente el trabajo experimental realizado bajo nuestra dirección en los laboratorios de la Sección Departamental de Microbiología de la Universidad de Valencia.

Examinado el contenido, consideramos que la Memoria reúne, a nuestro juicio, las condiciones de originalidad y rigor científico necesarias para ser presentada y defendida ante el Tribunal correspondiente.

Para que así conste y a los efectos oportunos, expedimos y firmamos la presente certificación.

VNIVERSITAT  
DE VALÈNCIA

Fdo. Rafael Sentandreu Ramón

Fdo. Eulogio Valentín Gómez

Fdo. Juan Carlos Argüelles

Valencia, 2009



*A mi familia  
a mis padres, Leticia y Oscar  
a mi abuelo*

*Un viaje de mil millas comienza con el primer paso.  
Lao-tsé*



**ÍNDICE**



## ÍNDICE DE MATERIAS

### I INTRODUCCIÓN

|   |    |
|---|----|
| I.1 Taxonomía y generalidades del género <i>Candida</i> .....                         | 1  |
| I.2 Patogenicidad de <i>C. albicans</i> .....   | 2  |
| I.3 Clasificación de las candidiasis y diagnóstico .....                              | 5  |
| I.3.1 Tratamiento de las candidiasis .....  | 7  |
| I.4 Factores de virulencia.....   | 9  |
| I.4.1 Adhesión.....   | 9  |
| I.4.2 Secreción de enzimas hidrolíticas .....   | 12 |
| I.4.2.1 Secreción de aspartil proteasas .....   | 12 |
| I.4.2.2 Producción de fosfolipasas extracelulares.....                                | 13 |
| I.4.2.3 Lipasas (Lip).....  | 14 |
| I.4.3 Biopelículas.....   | 15 |
| I.4.4 Variaciones fenotípicas .....   | 16 |
| I.4.5 Polimorfismo .....  | 17 |
| I.4.5.1 Regulación de morfogénesis por señales del medio ambiente .....               | 20 |
| I.4.5.2 Bases moleculares del dimorfismo .....  | 20 |
| I.4.5.3 Rutas de señalización .....   | 21 |
| I.4.5.3.1 La ruta de la proteína quinasa A dependiente de AMPc .....                  | 22 |
| I.4.5.3.2 La ruta de las MAP quinasas .....   | 24 |
| I.4.5.3.3 Regulación convergente de Cph1 y Efg1: implicación de Tec1 y Cph2 .....     | 25 |
| I.4.5.3.4 La ruta catabólica N-acetilglucosamina (GlcNAc) de <i>C. albicans</i> ..... | 26 |
| I.4.5.3.5 Factores de represión.....  | 26 |
| I.4.5.3.6 Co-regulación de genes de virulencia y morfogénesis .....                   | 28 |
| I.5 La pared celular de las levaduras .....   | 28 |
| I.5.1 Composición química de la pared celular .....                                   | 30 |
| I.5.1.1 Quitina .....   | 30 |
| I.5.1.2 $\beta$ - glucanos.....   | 33 |
| I.5.1.3 Manoproteínas .....   | 36 |
| I.5.1.4 Clasificación de las manoproteínas de pared celular .....                     | 37 |
| I.5.1.4.1 Proteínas no covalentemente unidas a la pared celular .....                 | 37 |
| I.5.1.4.2 Proteínas extraíbles por agentes reductores.....                            | 38 |
| I.5.1.4.3 Proteínas unidas por enlaces GPI.....                                       | 38 |
| I.5.1.4.4 Proteínas unidas por enlaces álcali sensibles .....                         | 40 |
| I.5.1.4.5 Proteínas atípicas de pared .....   | 43 |
| I.6 Modificaciones postraduccionales.....   | 44 |
| I.7 Estrés en levaduras: <i>C. albicans</i> .....                                     | 47 |
| I.7.1 Estrés oxidativo.....   | 47 |

|   |           |
|---|-----------|
| I.7.2 Estrés térmico .....  | 48        |
| I.7.3 Estrés osmótico .....   | 48        |
| I.7.4 Protección frente a estrés .....                                | 49        |
| I.8 Objetivos y justificación del trabajo .....                       | 51        |
| <b>II MATERIALES Y MÉTODOS .....</b>                                  | <b>55</b> |
| II.1 Microorganismos y plásmidos empleados.....                       | 55        |
| II.1.1 Levaduras .....  | 55        |
| II.1.2 Bacterias.....   | 55        |
| II.1.3 Plásmidos .....  | 56        |
| II.2 Medios y condiciones de cultivo.....                             | 57        |
| II.2.1 Cultivo de levaduras.....                                      | 57        |
| II.2.2 Cultivo de <i>Escherichia coli</i> .....                       | 60        |
| II.3 Transformaciones con ADN.....                                    | 60        |
| II.3.1 Transformación de bacterias.....                               | 60        |
| II.3.1.1 Obtención de células competentes con cloruro de calcio ..... | 61        |
| II.3.1.2 Transformación de las células competentes.....               | 61        |
| II.4 Transformación de levaduras.....                                 | 62        |
| II.4.1 Transformación de <i>C. albicans</i> .....                     | 62        |
| II.5 Recuentos celulares .....  | 62        |
| II.6 Determinación del contenido intracelular de trehalosa .....      | 63        |
| II.7 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).....                   | 63        |
| II.7.1 Diseño de oligonucleótidos .....                               | 63        |
| II.7.2 Condiciones de reacción .....                                  | 64        |
| II.7.3 Transcripción reversa (RT-PCR).....                            | 65        |
| II.8 Purificación de ADN.....   | 66        |
| II.8.1 Obtención de ADN plasmídico de <i>E. coli</i> .....            | 66        |
| II.8.2 Obtención de ADN genómico de levaduras.....                    | 66        |
| II.9 Electroforesis en geles de agarosa .....                         | 67        |
| II.10 Purificación de fragmentos de ADN .....                         | 68        |
| II.11 Secuenciación de ADN .....                                      | 68        |
| II.12 Tratamiento enzimático del ADN.....                             | 68        |
| II.12.1 Digestión con endonucleasas de restricción.....               | 68        |
| II.12.2 Tratamiento con ligasa T4.....                                | 69        |
| II.13 Purificación de ARN de <i>C. albicans</i> .....                 | 69        |
| II.14 Cuantificación de ADN y ARN.....                                | 70        |
| II.15 Obtención de fracciones subcelulares.....                       | 70        |
| II.15.1 Paredes celulares .....                                       | 70        |
| II.15.2 Citosol y fracción mixta de membranas .....                   | 71        |

---

|   |           |
|---|-----------|
| II.16 Solubilización de componentes de la pared celular .....                     | 71        |
| II.16.1 Tratamiento con dodecil sulfato sódico (SDS) .....                        | 71        |
| II.16.2 Tratamiento con $\beta$ -mercaptoetanol ( $\beta$ -ME) .....              | 72        |
| II.16.3 Tratamiento con zimoliasa .....   | 72        |
| II.17 Cuantificación de macromoléculas.....                                       | 72        |
| II.17.1 Determinación de proteína total .....                                     | 73        |
| II.17.2 Determinación de polisacáridos .....                                      | 73        |
| II.17.2.1 Determinación de azúcares no reductores .....                           | 73        |
| II.17.2.2 Determinación de $\beta$ - glucanos .....                               | 74        |
| II.17.2.3 Determinación de manano.....  | 74        |
| II.17.2.4 Determinación de quitina .....  | 75        |
| II.18 Estudio del transcriptoma mediante micromatrices de ADN .....               | 75        |
| II.18.1 Marcaje del ADNc .....  | 76        |
| II.18.2 Elución, cuantificación y concentración de los ADNc marcados .....        | 76        |
| II.18.3 Hibridación de las micromatrices de ADN .....                             | 77        |
| II.18.4 Obtención de imágenes y análisis de resultados .....                      | 78        |
| II.19 Interrupción génica en <i>C. albicans</i> .....                             | 78        |
| II.20 Análisis de las cepas disruptantes .....                                    | 81        |
| II.20.1 Estudio del efecto de calcoflúor white, rojo Congo y SDS .....            | 81        |
| II.20.2 Estudio de la sensibilidad a choque térmico.....                          | 81        |
| II.20.3 Estudio del efecto de un medio hipertónico sobre el crecimiento .....     | 82        |
| II.20.4 Estudio del efecto de peróxido de hidrógeno sobre el crecimiento .....    | 82        |
| II.20.5 Estudio del efecto de la cafeína .....                                    | 82        |
| II.20.6 Estudio del efecto del sorbitol.....                                      | 82        |
| II.20.7 Estudio del efecto del etanol .....                                       | 82        |
| II.20.8 Estudio del efecto del glicerol.....                                      | 83        |
| II.20.9 Estudio del efecto de EDTA .....  | 83        |
| II.20.10 Estudio de sensibilidad frente a drogas antifúngicas o antibióticas..... | 83        |
| II.21 Estudio de concentración mínima inhibitoria (CMI) frente a drogas.....      | 83        |
| II.22 Sensibilidad a la zimoliasa .....   | 84        |
| II.23 Miceliación en medio sólido .....   | 84        |
| II.24 Inducción de la transición dimórfica .....                                  | 85        |
| II.24.1 Inducción de la filamentación con suero humano .....                      | 85        |
| II.25 Formación de biopelículas .....   | 86        |
| II.26 Estudio de virulencia en modelo murino.....                                 | 86        |
| <b>III RESULTADOS .....</b>   | <b>91</b> |
| III.1 Selección <i>in silico</i> de Pga26 una potencial proteína de pared.....    | 91        |
| III.2 Análisis de la secuencia aminoácídica de la proteína Pga26 .....            | 92        |

## Estudio de la proteína Pga26

---

|   |            |
|---|------------|
| III.3 Construcción del casete de interrupción para el gen <i>PGA26</i> .....                          | 94         |
| III.4 Obtención del mutante homocigótico para el gen <i>PGA26</i> .....                               | 95         |
| III.5 Reintegración de marcadores para la eliminación de la auxotrofia a uracilo .....                | 100        |
| III.6 Análisis fenotípico .....   | 100        |
| III.6.1 Estudio de la integridad de la pared celular.....   | 100        |
| III.6.1.1 Estudio de sensibilidad al rojo Congo y a calcoflúor white .....                            | 100        |
| III.6.1.2 Estudio de sensibilidad al SDS.....   | 101        |
| III.6.1.3 Estudio de sensibilidad a zimoliaza .....   | 102        |
| III.6.2 Estudio de composición de polímeros de pared .....  | 103        |
| III.6.3 Estudio del efecto de la cafeína, sorbitol, etanol, glicerol y EDTA .....                     | 104        |
| III.7 Estudio de sensibilidad frente a drogas.....  | 105        |
| III.7.1 Estudio de concentración mínima inhibitoria (CMI) frente a drogas.....                        | 107        |
| III.8 Estudio de la respuesta a estrés .....  | 108        |
| III.8.1 Estudio de la sensibilidad a choque térmico.....  | 108        |
| III.8.2 Estudio de sensibilidad a choque osmótico.....  | 109        |
| III.8.3 Estudio del efecto del estrés oxidativo sobre el crecimiento.....                             | 110        |
| III.8.4 Contenido intracelular de trehalosa en respuesta a estrés oxidativo,<br>térmico y salino..... | 110        |
| III.9 Crecimiento y morfología .....  | 111        |
| III.9.1 Estudios de inducción de la transición dimórfica .....  | 112        |
| III.9.2 Inducción de la filamentación en suero humano.....  | 114        |
| III.9.3 Estudios de floculación en medio líquido.....   | 115        |
| III.10 Estudio de filamentación en medio sólido .....   | 116        |
| III.11 Estudios de formación de biopelículas .....  | 119        |
| III.12 Estudio de virulencia en modelo murino.....  | 120        |
| III.13 Reintegración del gen <i>PGA26</i> en el mutante nulo <i>pga26/pga26</i> .....                 | 122        |
| III.13.1 Construcción del plásmido pBI-PGA26 .....  | 122        |
| III.13.2 Introducción de pBI-PGA26 en el mutante nulo.....  | 123        |
| III.13.3 Expresión de <i>PGA26</i> en la cepa reintegrante.....                                       | 123        |
| III.13.4 Análisis fenotípico de la cepa reintegrante .....  | 125        |
| III.14 Análisis del perfil transcripcional del mutante nulo <i>pga26/pga26</i> .....                  | 127        |
| <b>IV DISCUSIÓN .....</b>   | <b>131</b> |
| <b>V CONCLUSIONES.....</b>  | <b>145</b> |
| <b>VI BIBLIOGRAFÍA .....</b>  | <b>149</b> |
| <b>VII AGRADECIMIENTOS .....</b>  | <b>175</b> |

## ÍNDICE DE FIGURAS

|   |    |
|---|----|
| I.1. Esquema de las relaciones parásito-hospedador entre <i>C. albicans</i> y su hospedador .....   | 3  |
| I.2. Porcentaje de aislamientos de las distintas especies de hongos del género <i>Candida</i> .....   | 4  |
| I.3. Micrografía electrónica de una biopelícula de <i>C. albicans</i> .....   | 16 |
| I.4. Cambios morfológicos en <i>C. albicans</i> .....   | 17 |
| I.5. Crecimiento pseudomicelias .....   | 18 |
| I.6. Morfología del hongo <i>C. albicans</i> . a) levadura; b) pseudomicelio; c) clamidospora; d) micelio; (Odds, 1988) .....   | 18 |
| I.7. Esquema de los elementos implicados en el proceso de diferenciación en hongos dimórficos .....   | 19 |
| I.8. Regulación del dimorfismo en <i>C. albicans</i> mediante múltiples rutas de señalización .....   | 22 |
| I.9. Modelo propuesto para la arquitectura de la pared celular en levaduras (Adaptado de Molina <i>et al.</i> , 2000) .....   | 29 |
| I.10. Clasificación de las proteínas de pared celular .....   | 37 |
| I.11. Estructura del enlace glicosil fosfatidil inositol (GPI) de proteínas de levaduras .....  | 38 |
| I.12. Distribución según la función de las proteínas unidas por enlace GPI en <i>C. albicans</i> .....  | 40 |
| I.13. Las repeticiones internas de las proteínas Pir pueden actuar en el ensamblaje entre las cadenas de $\beta$ -1,3-glucano .....   | 42 |
| I.14. Organización molecular de la pared celular de <i>C. albicans</i> .....  | 43 |
| I.15. Modificaciones postraduccionales a).O-glicosilación y b).N-glicosilación de proteínas de pared celular en <i>Candida albicans</i> .....                               | 45 |
| II.1. Recombinación intracromosómica entre las secuencias <i>hisG</i> del casete empleado en la interrupción génica de <i>C. albicans</i> .....                             | 79 |
| II.2. Esquema de la interrupción secuencial de los dos alelos de un gen de <i>C. albicans</i> mediante el método del "Ura-blaster" .....                                    | 80 |
| III.1. Análisis <i>in silico</i> de la secuencia aminoacídica de la proteína Pga26 .....  | 93 |
| III.2. Plásmido p5921 que contiene el casete <i>hisG::URA3::hisG</i> (Fonzi y Irwin, 1993), utilizado para la construcción del casete de interrupción de <i>PGA26</i> ..... | 94 |

|  |     |
|--|-----|
| III.3. Diagrama de la construcción del casete de interrupción para el gen <i>PGA26</i> .....   | 95  |
| III.4. Plásmido F1p5921F2, digerido con <i>Sac I</i> y <i>Pst I</i> , enzimas que liberan el casete.....   | 95  |
| III.5. Análisis de transformantes por PCR de colonias, utilizando los oligonucleótidos Ext-5' y HisG2-3', transformante 26-1a1 (1130pb).....   | 96  |
| III.6. Diagrama de la obtención del mutante heterocigótico ( <i>PGA26/pgs26</i> ) y del mutante nulo ( <i>pgs26/pgs26</i> ) del gen <i>PGA26</i> mediante la transformación de la cepa parental CA14 de <i>C. albicans</i> ..... | 97  |
| III.7. Análisis de transformantes por PCR, con los oligonucleótidos ext-5' y ext-3'; 1- CA14; 2- 26-1a1; 3- <i>PGA26/pgs26</i> ; 4- 26- 2a1; 5- <i>pgs26/pgs26</i> .....   | 98  |
| III.8. RT-PCR de los ADNc de las cepas de <i>C. albicans</i> .....   | 99  |
| III.9. Sensibilidad a rojo Congo y calcofluor white .....  | 101 |
| III.10. Sensibilidad a dodecil sulfato sódico (SDS) .....  | 102 |
| III.11. Sensibilidad a zimoliasa.....  | 103 |
| III.12. Análisis de la composición de polímeros de la pared celular.....   | 104 |
| III.13. Sensibilidad a tunicamicina, anfotericina B y ketoconazol.....   | 106 |
| III.14. Concentración mínima inhibitoria (CMI) a Fluconazol, Posaconazol, Caspofungina y Anfotericina de las cepas parental (CA14-URA), y el mutante nulo ( <i>pgs26/pgs26</i> -URA).....  | 108 |
| III.15. Sensibilidad a choque térmico (55°C) a diferentes períodos de tiempo.....  | 109 |
| III.16. Sensibilidad a choque osmótico.....  | 109 |
| III.17. Sensibilidad a estrés oxidativo .....  | 110 |
| III.18. Prueba de miceliación, morfología celular de las cepas; parental (CA14), y homocigótica ( <i>pgs26/pgs26</i> ) incubadas a 37°C en medio de Lee y en medio de Lee sin prolina ni biotina .....                           | 113 |
| III.19. Prueba de miceliación, morfología celular de las cepas; parental (CA14), y homocigótica ( <i>pgs26/pgs26</i> ) incubadas a 28°C en medio de Lee y en medio de Lee sin prolina ni biotina .....                           | 113 |
| III.20. Prueba de floculación en medio líquido de las cepas; parental CA14-URA (1), y homocigótica <i>pgs26/pgs26</i> -URA (2), incubadas a 28°C y a 37°C en medio de Lee y en medio de Lee sin prolina ni biotina.....          | 116 |
| III.21. Morfología de colonias y de bordes de colonias en medio de Spider. ....  | 117 |
| III.22. Morfología de colonias y de bordes de colonias en medio YNB con suero humano (10%) .....   | 118 |

---

|   |     |
|---|-----|
| III.23. Morfología de colonias y de los bordes coloniales en medio de extracto de levadura y prolina .....  | 118 |
| III.24. Morfología de colonias y de bordes de colonias en medio de Lee .....  | 119 |
| III.25. Porcentajes de formación de biopelículas de las cepas; parental (CAI4-URA), mutante heterocigótica ( <i>PGA26/pga26-URA</i> ) y mutante homocigótica ( <i>pga26/pga26-URA</i> ).....  | 120 |
| III.26. Estudio de virulencia en modelo murino de la cepa parental CAI4-URA, del mutante heterocigótico ( <i>PGA26/pga26-URA</i> ) y del mutante homocigótico ( <i>pga26/pga26-URA</i> )..... | 121 |
| III.27. Plásmido pBIPGA26 .....   | 123 |
| III.28. RT-PCR semicuantitativa de la expresión de <i>PGA26</i> bajo el promotor inducible del gen <i>CaPCK1</i> .....  | 125 |
| III.29. Análisis fenotípico de la cepa reintegrante de <i>PGA26</i> .....   | 126 |
| III.30. Estudio de micromatrices de ADN del mutante nulo <i>pga26/pga26</i> .....   | 128 |

## ÍNDICE DE TABLAS

|  |     |
|--|-----|
| I.1. Taxonomía de <i>C. albicans</i> .....   | 1   |
| I.2. Clasificación de las candidiasis.....   | 6   |
| I.3. Agentes con actividad antifúngica.....  | 8   |
| I.4. Expresión de los genes de la familia <i>SAP</i> .....   | 13  |
| I.5. Distribución de los componentes de la pared celular de <i>C. albicans</i> .....   | 30  |
| II.1. Cepas de <i>C. albicans</i> .....  | 55  |
| II.2. Cepa de <i>E. coli</i> empleada .....  | 55  |
| II.3. Plásmidos utilizados .....   | 56  |
| II.4. Plásmidos construidos .....  | 56  |
| II.5. Oligonucleótidos empleados en este trabajo.....  | 64  |
| III.1. Nivel de expresión de <i>PGA26</i> en regeneración de la pared celular de protoplastos .....  | 92  |
| III.2. Composición aminoacídica de la proteína Pga26.....  | 93  |
| III.3. Contenido intracelular de trehalosa en respuesta a estrés oxidativo (5 mM y 50 mM H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ), térmico (42 °C) y osmótico (1,2 M NaCl), en la cepa parental CAI4 y en ambos mutantes del gen <i>PGA26</i> ..... | 111 |
| III.4. Nivel de dimorfismo alcanzado por las cepas de <i>Candida albicans</i> , parental (CAI4) y mutantes heterocigótico ( <i>PGA26/pga26</i> ) y homocigótico ( <i>pga26/pga26</i> ) .....   | 115 |

## **INTRODUCCIÓN**



## I.1. Taxonomía y generalidades del género *Candida*

*Candida albicans* es considerada un hongo patógeno oportunista en mamíferos, entre ellos el hombre, que puede causar varias formas de candidiasis, desde infecciones superficiales en mucosas hasta enfermedades sistémicas que comprometen la vida, predominantemente, en individuos con el sistema inmune debilitado. *C. albicans* al igual que otros patógenos tiene la capacidad de adherirse y formar biopelículas en aparatos implantados, especialmente catéteres intravasculares lo que les confiere mayor resistencia a antifúngicos.

*C. albicans* ha recibido diferentes nombres, desde que Robin la denominó en 1853 *Oidium albicans*, esta especie estuvo incluida en 100 sinónimos y pasada a través de 18 géneros. De estos géneros, sólo dos han prevalecido por largo tiempo para referirse a esta especie: El género *Monilia*, en el cual estaba incluida la especie *Monilia candida* (Plaut, 1885), luego *Monilia albicans* (Zopt, 1890) que dominó la literatura hasta el trabajo de C.M. Berkhout, quien en 1923 propone el género *Candida* y la especie *C. albicans*, que fue aceptado por el 3<sup>er</sup> Congreso Internacional de Microbiología en Nueva York en 1939. Desde entonces se pasaron al género *Candida* todas aquellas levaduras que no encajaban en el género *Monilia* (Pardi y Cardozo, 2002).

La clasificación taxonómica de *C. albicans* puede observarse en la tabla I.1.

**Tabla I.1. Taxonomía de *C. albicans*.**

|                  |                    |
|------------------|--------------------|
| <b>Reino</b>     | Fungi              |
| <b>Phylum</b>    | Ascomycota         |
| <b>Subphylum</b> | Ascomycotina       |
| <b>Clase</b>     | Ascomycetes        |
| <b>Orden</b>     | Saccharomycetales  |
| <b>Familia</b>   | Saccharomycetaceae |
| <b>Género</b>    | <i>Candida</i>     |

El género *Candida* incluye aproximadamente a 154 especies, entre ellas, *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis* y *C. dublinensis*, son frecuentemente aisladas de infecciones en humanos, siendo *C. albicans* la más relevante en términos de patogenicidad (Pfaller y Diekema, 2007).

### **I.2 Patogenicidad de *C. albicans*.**

*C. albicans* es una levadura comensal, presente en las mucosas de los seres humanos y los animales de sangre caliente (Brown *et al.*, 2007; Greene y Chandler, 2006), siendo habitualmente aislada de la cavidad oral, el tracto gastrointestinal y urogenital, y su conversión en agente patógeno depende principalmente de la alteración del equilibrio entre la microbiota y el sistema inmunitario del hospedador.

Es considerada por ello un patógeno oportunista. Las relaciones con su hospedador, representadas en la figura I.1 cobran un importante papel en este tipo de infección. El estado fisiológico del hospedador es el primer factor que gobierna la etiología de las candidiasis, variaciones de este estado pueden desencadenar que las levaduras comensales se conviertan en patógenas, causando infecciones (Fidel *et al.*, 1999).

*C. albicans* es capaz de sobrevivir como comensal en distintas localizaciones, y por ello está sometido a distintas presiones medioambientales. Esta habilidad amplía el espectro de enfermedades causadas por *C. albicans* y otras especies de *Candida*, siendo su incidencia mayor que la de otros microorganismos comensales.

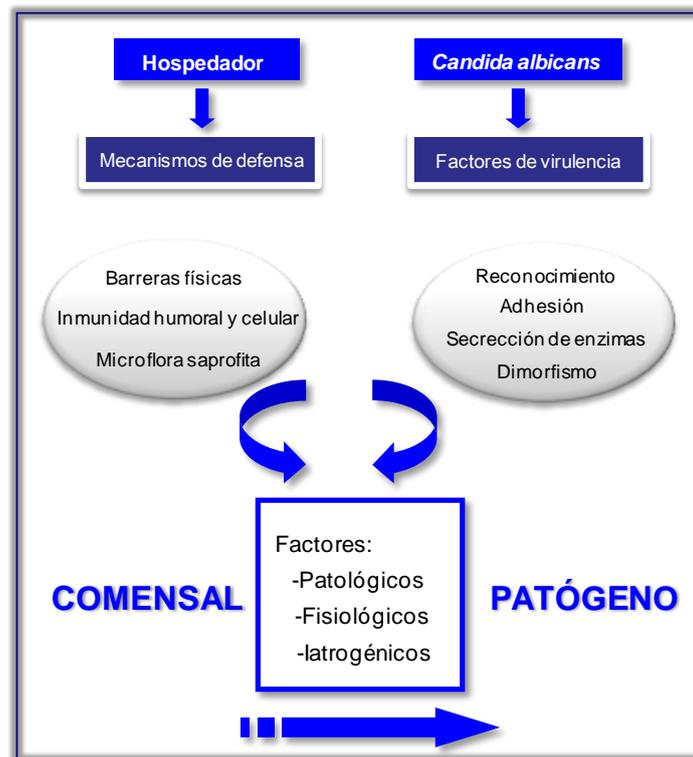


Figura I.1. Esquema de las relaciones entre *C. albicans* y su hospedador

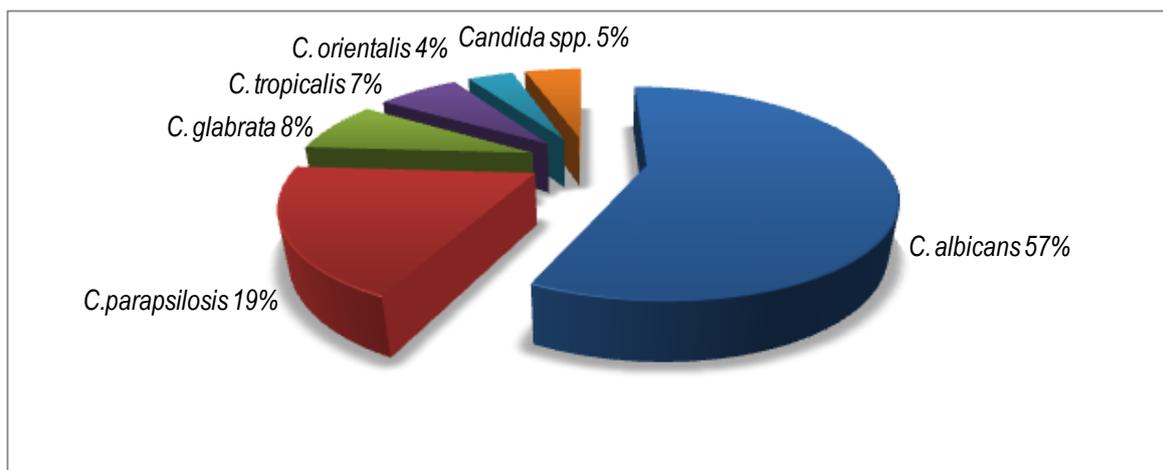
En estos últimos años en las unidades de cuidados intensivos hospitalarias se ha experimentado un avance considerable en los sistemas de soporte vital, con un incremento en la utilización de antibióticos de amplio espectro, un evidente aumento de edad y gravedad de los enfermos ingresados, y mayor utilización de nutrición parenteral total y suspensiones lipídicas. Como consecuencia de lo anterior la incidencia de infección fúngica invasora (IFI) ha aumentado significativamente en este contexto; siendo, por consiguiente, la morbimortalidad asociada a este tipo de patología muy elevada (Ostrosky-Zeichner, 2003)

Un estudio efectuado en el instituto de Patología de la Universidad de Greifswald, Alemania, donde se realizaron 2027 necropsias, en el período 1994-1998 la incidencia de la candidiasis invasora (CI) fue de un 3.2%, dicha incidencia se triplicó en el período entre 1999-2003, alcanzando el 10% (Schwesinger *et al.*, 2005).

La clasificación, de las distintas especies del género *Candida*, se basa en la capacidad de asimilar y fermentar distintos compuestos, empleándose auxonogramas con este fin. En la actualidad se emplean, además, técnicas moleculares como movilidad electroforética de isoenzimas, polimorfismos en genes, técnicas RAPDs (“Random Amplification of Polymorphic DNA”), secuenciación de genes (subunidad ribosomal grande y pequeña, beta-tubulina etc...), (Kurtzman, 2000).

La candidiasis es una infección común producida por diferentes especies del género *Candida*. Aunque *C. albicans* ha sido la especie más significativa en las últimas décadas, las especies *C. tropicalis*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis*, *C. dubliniensis*, y *C. lusitanae* entre otras, se aíslan de forma frecuente como agentes causales de infecciones. Otras especies aisladas frecuentemente son, *Issatchenkia orientalis*, *Pichia guillermondii* y *Debariomyces hanseii*, anteriormente incluidas dentro del género *Candida*.

En la figura I.2 se pueden observar los porcentajes de aislamientos de las distintas especies de hongos del género *Candida* y otros géneros de levaduras.



**Figura I.2. Porcentaje de aislamientos de las distintas especies de hongos del género *Candida*.** Datos obtenidos de una revisión prospectiva por la Confederación de Micología Médica. (Adaptado de Tortorano *et al.*, 2004).

En especial se ha descrito un aumento de riesgo de fungemia producida por *C. tropicalis* en pacientes con cáncer (Kontoyiannis *et al.*, 2001), en pacientes postoperatorios sometidos a terapias con antibióticos de amplio espectro (Mathews *et al.*, 2001) y en casos de septicemia descritos en niños recién nacidos en unidades de cuidados intensivos, donde la morbilidad por candidiasis producidas por *C. albicans*, *C. parapsilosis* y *C. tropicalis* es de un 25%, y la mortalidad oscila entre el 30 y el 50% debido a una gran vulnerabilidad a esta infección entre los niños de bajo desarrollo y bajo peso (Leibovitz, 2002).

### **I.3. Clasificación de las candidiasis y diagnóstico**

Las candidiasis se clasifican generalmente en superficiales y profundas (Tabla I.2). Las candidiasis superficiales afectan principalmente a la piel y a las mucosas oral y genital. La candidiasis oral se puede presentar en varias formas clínicas, siendo la más común la pseudomembranosa o muguet, que afecta a la mucosa de boca y faringe, y suele producirse en recién nacidos y en ancianos o inmunodeprimidos. La candidiasis genital ocurre principalmente en las mujeres y se denomina candidiasis vulvovaginal representa alrededor del 20% de los casos de vaginitis (Gentry *et al.*, 1985), y si no se trata adecuadamente puede ser recurrente (Fidel *et al.*, 1996), y ocurre con menos frecuencia en hombres y se denomina balanitis (Ono y Yasumoto, 2009). Las candidiasis profundas producen lesiones agudas o crónicas que pueden afectar a uno o más órganos, y generalmente terminan en una septicemia, denominándose entonces candidiasis sistémicas o diseminadas. Se observan principalmente en pacientes inmunocomprometidos y suelen ser de pronóstico grave. La mortalidad puede superar el 50%, aunque hay que tener en cuenta que casi siempre aparece como complicación a una enfermedad grave, con lo que el índice de mortalidad aumenta (Verduyn Lunel *et al.*, 1999)

**Tabla. I.2. Clasificación de las candidiasis.**

| CANDIDIASIS SUPERFICIALES |                 | CANDIDIASIS PROFUNDAS |                                 |
|---------------------------|-----------------|-----------------------|---------------------------------|
| <b>Cutáneas</b>           | Intértrigo      | <b>Localizadas</b>    | Peritonitis                     |
|                           | Foliculitis     |                       | Esofagitis                      |
|                           |                 |                       | Pielitis                        |
| <b>Mucosas</b>            | Orofaringeas    | <b>Sistémicas</b>     | Endocarditis                    |
|                           | Vulvovaginal    |                       | Síndrome de abuso de drogas     |
|                           | Esófagitis      |                       | Hepatoesplénica                 |
|                           | Vejiga urinaria |                       | Asociada a nutrición parenteral |
|                           |                 |                       | Neonatal                        |
| <b>Ungeales</b>           | Onicomycosis    |                       |                                 |
|                           | Paroniquia      |                       |                                 |
| <b>Otras</b>              | Otitis externas |                       |                                 |
|                           | Queratitis      |                       |                                 |

A la hora de diagnosticar una candidiasis hay que distinguir entre colonización e infección, ya que muchas especies del género *Candida* suelen estar presentes como comensales inoocuos en el hombre, por ello deben evaluarse los datos de laboratorio así como el cuadro clínico.

El diagnóstico de las candidiasis superficiales se realiza mediante criterios clínicos, junto con la observación al microscopio de muestras de lesiones o cultivos selectivos. Hay que tener en cuenta que un cultivo positivo demuestra la presencia de *Candida* pero no la infección.

En las candidiasis sistémicas resulta más complicado llegar a un diagnóstico seguro. En la actualidad se dispone de una serie de métodos sensibles y específicos, para el diagnóstico, entre ellos se encuentran: detección de antígenos circulantes contra manano (Matthews, 1996; Mitsutake *et al.*, 1996), utilización de anticuerpos específicos para la identificación de *Candida* spp. (Marcilla *et al.*, 1999) y técnicas de PCR (reacción en cadena de la polimerasa) (Bartie *et al.*, 2001; Chang *et al.*, 2001; Fujita *et al.*, 2001; García, 2008) diseñadas especialmente para la detección de especies de *Candida* a partir de aislados clínicos.

### I.3.1. Tratamiento de las candidiasis

La candidiasis invasora y la candidemia se han asociado con ratios elevados de mortalidad cruda que oscilan entre un 30 y un 81% (Chang *et al.*, 2008). Adicionalmente, la introducción de nuevos antifúngicos durante la pasada década no ha llevado consigo una disminución significativa de estos porcentajes (Fridkin, 2005).

Las candidiasis superficiales son tratadas con los fármacos antifúngicos disponibles, sin presentar complicaciones; en cambio, el tratamiento de las candidiasis sistémicas, al requerir el empleo de altas dosis de fármacos, llega a presentar toxicidad y puede desencadenar una depresión medular que agrava el estado de inmunosupresión en la mayoría de los pacientes tratados.

La búsqueda de nuevos antifúngicos se ha centrado en la actuación de éstos sobre dianas presentes en los hongos y ausentes en células de mamíferos. Una de estas diferencias es la presencia de ergosterol en la membrana plasmática de las células fúngicas, en lugar del colesterol presente en las células animales. Sobre esta diana actúan antifúngicos como anfotericina B y similares (macrólidos poliénicos) (Tabla I.3), que tienen un amplio espectro de acción, pero causan toxicidad en las células de mamíferos. Se han desarrollado formulaciones de estos antifúngicos en forma liposomal para reducir sus efectos secundarios nocivos (Adler-Moore y Proffitt, 2002; Dix y Andriole, 2000).

La investigación actual se dirige hacia la identificación de nuevas dianas específicas en las células fúngicas, de manera que el fármaco resulte inocuo, en gran medida, para el ser humano (Rex *et al.*, 2001). Algunas de las aproximaciones seguidas han sido:

- La realización de pruebas de susceptibilidad *in vitro*, de diferentes productos naturales o sintéticos.
- Identificación molecular de factores de virulencia fúngica, mediante el uso de nuevas técnicas como las micromatrices de ADN, que han permitido determinar la expresión génica de distintos aislados clínicos de *C. albicans* resistentes a azoles (Rogers y Barker, 2003).

Varios de los antifúngicos empleados con mayor éxito en la actualidad son sustancias que interfieren en la biosíntesis normal de la pared celular. Las equinocandinas son metabolitos secundarios de ciertos hongos que consisten en un hexapéptido cíclico con una cadena lipídica responsable de la actividad antifúngica, (Tabla I.3.). Las equinocandinas se unen a la enzima Fks1 localizada en la membrana plasmática y participa en la síntesis de  $\beta$ -1,3-glucano. Así es como anidulafungina, una nueva equinocandina, ha demostrado ser eficaz en el tratamiento de la candidiasis invasiva, con una efectividad similar a Fluconazol, uno de los agentes de primera elección (Reboli *et al.*, 2007). Otro antifúngico desarrollado recientemente ha sido la caspofungina (Dinubile *et al.*, 2002; Vázquez *et al.*, 1997), usado con éxito en pacientes con aspergilosis invasivas que no respondían a otros tratamientos, así como en tratamientos de candidiasis orofaríngea y esofágica (Gupta y Tomas, 2003). Una ventaja notable es la disminución de los efectos secundarios (Kartsonis *et al.*, 2003), pero tiene el inconveniente de su administración por vía exclusivamente parenteral.

**Tabla I.3. Agentes con actividad antifúngica.**

| ANTIFÚNGICOS   | DIANA                    | MECANISMO DE ACCIÓN  |
|--|--------------------------|--|
| Griseofulvina  | Microtúbulos             | Interfiere con el ensamblaje de los microtubulos.          |
| Flucitosina  | ARN                      | Inhibición de la síntesis proteica.                        |
| Antibióticos<br>Macrólidos poliénicos<br>(nistatina, anfotericina B) | Ergosterol               | Formación de poros hidrofílicos en la membrana plasmática. |
| Azoles<br>(ketoconazol, fluconazol, miconazol)                       | Citocromo P-450          | Alteración de la fluidez permeabilidad celular.            |
| Equinocandinas<br>Pneumocandinas                                     | $\beta$ -glucano sintasa | Alteración de la pared celular.                            |
| Nikomincinas y Polioxinas  | Quitina sintasas         | Alteración de la pared celular.                            |
| Pradimicinas   | Mano proteínas           | Alteración de la membrana plasmática.                      |
| Sordarinas   | Factor de elongación     | Inhiben la síntesis proteica.                              |

La síntesis de la quitina también ha sido objeto de estudio, desarrollándose antifúngicos como polioxinas y nikomicinas, que son potentes inhibidores competitivos de las quitina sintasas, por ser análogos de la UDP-N-acetilglucosamina. El inconveniente de estos fármacos es que deben ser

empleados a elevadas concentraciones y causan efectos secundarios importantes (McCarthy y Gull, 1985).

#### **I.4. Factores de virulencia**

Las interacciones del hongo con el hospedador son críticas para determinar la evolución hacia un proceso infeccioso, siendo determinantes los mecanismos intrínsecos y adquiridos de resistencia del hospedador. La capacidad patógena del género *Candida* depende principalmente del estado inmunológico del hospedador. Sin embargo, algunas características del hongo hacen de él un patógeno potencial y son las responsables de que se comporte como tal en determinadas circunstancias. Dichas características que confieren capacidad patógena vienen determinadas por una serie de factores de virulencia que están en relación con el hospedador. Es necesario considerar las relaciones entre *Candida* y su hospedador como un conjunto de procesos que incluyen la expresión de determinantes fúngicos de virulencia frente a las barreras y las respuestas inmunitarias del hospedador.

Existen múltiples factores de virulencia que se expresan diferencialmente en los diversos estadios de la infección. Las características biológicas que puede requerir el hongo varían según se encuentre en una etapa de colonización o en una fase invasiva. Los factores de virulencia más característicos del género *Candida* son la síntesis de receptores y moléculas implicadas en la adhesión al hospedador o a catéteres, la secreción de enzimas hidrolíticas, variabilidad antigénica, cambios fenotípicos y el dimorfismo (Cutler, 1991).

##### **I.4.1. Adhesión**

El reconocimiento específico y posterior adhesión a las células del hospedador por parte del hongo es un paso esencial del éxito en la infección y colonización. En los últimos años se han descrito numerosas moléculas que actúan a modo de receptor frente a ligandos específicos del hospedador, como son las proteínas de matriz extracelular y moléculas superficiales de células epiteliales y endoteliales.

Estos receptores fúngicos, conocidos como adhesinas (Calderone, 1993; Chaffin *et al.*, 1998), se expresan en la superficie del hongo y son de naturaleza manoproteica.

En *C. albicans* han sido clonados varios genes que codifican para posibles adhesinas. El hecho de que células de *Saccharomyces cerevisiae* se adhieran a una variedad de superficies significativamente menor que *C. albicans* ha motivado la realización de estudios conducentes a la identificación de ocho miembros de una familia de genes relacionados. Los genes de la familia ALS de *C. albicans* (“agglutinin-like sequence”) codifican glicoproteínas de superficie celular como Als1p, Als3p, Als5p, Als6p, Als7p, Als2p, Als4p y Als9p, implicadas en la adhesión del microorganismo a las células del hospedador, y están relacionados con genes de aglutininas en *S. cerevisiae* que median interacciones célula-célula durante el apareamiento (“mating”) de células haploides (Hoyer *et al.*, 1995; 2008). Las proteínas ALS tienen un dominio central con un motivo repetido en tándem, rico en serina, treonina y prolina (Hoyer *et al.*, 2001). Als1p es de gran interés, ya que por sus características se agrupa dentro de la superfamilia de las inmunoglobulinas, que contiene numerosas proteínas importantes para la adherencia de células de mamífero. El gen *ALA1* (“agglutinin-like adhesin”) fue aislado por rastreo de una librería genómica de secuencias que conferían adherencia a proteínas de matriz extracelular (ECM) (Gaur *et al.*, 1997). Células de *S. cerevisiae* mutantes y complementadas con el gen *ALA1* de *C. albicans* se unen a fibronectina, laminina y colágeno tipo IV (Gaur *et al.*, 1997). La matriz extracelular o membrana basal, que tiene función estructural, de adhesión y de diferenciación celular (Liotta *et al.*, 1986), es un conjunto de macromoléculas que incluye, entre otras proteínas: colágeno, laminina, fibronectina y elastina (Yamada *et al.*, 1985).

La fibronectina es una proteína dimérica que circula en forma soluble en el plasma y se encuentra en abundancia en tejido conectivo y membrana basal. Se han identificado numerosos receptores en *C. albicans* para esta proteína, que parecen estar relacionados con integrinas de mamífero. Las integrinas son proteínas

heterodiméricas compuestas por diferentes combinaciones de subunidades  $\alpha$  y  $\beta$ , lo cual podría explicar el elevado número de receptores identificados para esta molécula (DeMuri *et al.*, 1996).

La laminina es una glicoproteína multifuncional de elevado peso molecular, capaz de unirse a una gran cantidad de los componentes de la matriz extracelular como colágeno tipo IV, heparina, proteoglicano y entactina, lo cual le confiere un importante papel en la arquitectura de la membrana basal. Interviene, además, en adhesión y diseminación celular, desarrollo de neuronas, morfogénesis y movilidad celular. En *C. albicans* se han descrito moléculas con capacidad de unión a esta proteína (Bouchara *et al.*, 1990; López-Ribot *et al.*, 1994).

Tanto *in vivo* como *in vitro* se ha observado la unión de manoproteínas de la pared celular de *C. albicans* al fibrinógeno (Bouali *et al.*, 1986), proteína sérica importante en la coagulación, así como en la respuesta inflamatoria y reparación de tejidos.

Además, existen proteínas superficiales responsables de la interacción del hongo con diversos constituyentes de los sistemas de defensa del hospedador como plaquetas o proteínas séricas del sistema de complemento. El desarrollo de esta capacidad de adhesión permite al hongo recubrirse de moléculas o células del hospedador y evadir sus sistemas defensivos (Calderone *et al.*, 1994; Robert *et al.*, 1991).

*C. albicans* tiene, además, una superficie celular hidrofóbica que parece jugar un papel importante en la adhesión a materiales como el poliestireno de prótesis y catéteres (Klotz *et al.*, 1985), la unión es de tipo electrostático y se ha propuesto que también puede participar en la unión del hongo a células epiteliales, favoreciendo la interacción del mismo con proteínas de la matriz extracelular (Silva *et al.*, 1995).

## I.4.2. Secreción de enzimas hidrolíticas

### I.4.2.1. Secreción de aspartil proteasas.

La actividad proteolítica extracelular juega un papel importante en la patogenicidad de *Candida* spp. y se debe a una familia de 10 aspartil proteasas (proteínas Sap). Aunque no son conocidas las consecuencias de la secreción de proteasas durante la infección, estudios llevados a cabo en humanos, animales e *in vitro*, han implicado a las proteasas en la virulencia en *C. albicans* según uno de los siguientes modos propuestos: (i) la correlación existente entre la producción de Sap *in vitro* y la virulencia de *Candida*; (ii) degradación de proteínas humanas y análisis estructural en sustratos específicos Sap; (iii) asociación de producción de Sap con otros procesos de virulencia de *C. albicans*; (iv) producción de proteínas Sap y respuesta inmune Sap en infecciones humanas y animales; (v) expresión de genes *SAP* durante infecciones por *Candida* spp.; (vi) moderación de virulencia de *C. albicans* mediante inhibidores de aspartil proteasas; y (vii) el uso de mutantes disruptados en *SAP* para analizar la virulencia de *C. albicans*. Las proteínas Sap tienen diversas funciones durante el proceso infeccioso, que incluyen el simple papel de digestión de moléculas para la adquisición de nutrientes, distorsión de membranas celulares del hospedador para facilitar la adhesión y la invasión de tejidos, y la digestión de células y moléculas del sistema inmunitario del hospedador para evitar o resistir la respuesta inmune (Naglik *et al.*, 2003).

La producción de proteasas extracelulares provoca la lisis de la capa mucosa que recubre la superficie de las células y facilita la invasión de tejidos al degradar la queratina, el colágeno, la laminina y la fibronectina (Collina *et al.*, 1996). Se ha observado actividad aspartilproteásica en estadíos iniciales de la infección por *C. albicans*, y es probable que facilite la penetración a través de los tejidos y la resistencia a la fagocitosis, ya que al ser atrapadas por el macrófago se presentan proteasas en la superficie del hongo y algunas de las levaduras sobreviven y germinan causando la muerte de la célula fagocítica. La clonación de al menos 10

genes *SAP* que codifican aspartil proteasas en *C. albicans* ha supuesto un avance decisivo en la caracterización de este factor de virulencia (Monod *et al.*, 1994), y la obtención y estudio de cepas con triple interrupción en estos genes ha demostrado su implicación en la patogenicidad del hongo (Sanglard *et al.*, 1997; Watts *et al.*, 1998). *C. albicans* secreta *in vitro* Sap1p en medios que contengan albúmina de suero bovino (BSA) como única fuente de nitrógeno y han sido clonados hasta la fecha 4 genes *SAP* (Zaugg *et al.*, 2001). Sap2p y Sap3p son proteínas altamente activas e inhibidas por pepstatina A. Se ha demostrado en *C. albicans* que los genes *SAP4*, *SAP5* y *SAP6* son inducidos después de la internalización de células de levadura por macrófagos (Borg von Zepelin *et al.*, 1998), en la tabla I.4 se presenta un esquema de la expresión de los genes de la familia *SAP*.

**Tabla. I.4. Expresión de los genes de la familia *SAP***

| PROTEASA   | EXPRESIÓN  | REFERENCIA  |
|------------|--|---|
| Sap2       | En condiciones de laboratorio es el gen más expresado y es regulado positivamente por proteólisis de péptidos. | (Hube <i>et al.</i> , 1994)                               |
| Sap1,Sap2  | Expresados diferencialmente durante los cambios fenotípicos en distintas cepas.                                | (Morrow <i>et al.</i> , 1992; White <i>et al.</i> , 1993) |
| Sap4,Sap6  | Expresados exclusivamente durante la formación de la hifa, en medio sin proteína y a pH neutro.                | (Hube <i>et al.</i> , 1994; White y Agabian, 1995)        |
| Sap8       | Regulado por la temperatura.   | (Monod <i>et al.</i> , 1998)                              |
| Sap9,Sap10 | Expresión constitutiva tanto en levadura como micelio.   | (Hube y Naglik, 2001)                                     |

#### I.4.2.2. Producción de fosfolipasas extracelulares

La producción de fosfolipasas, está relacionada con la capacidad patógena de *C. albicans*, ya que se observa una correlación entre el carácter virulento y la actividad fosfolipásica, *C. albicans* secreta fosfolipasa A, B, C, D1, lisofosfolipasa y lisofosfolipasa transacilasa, que participan activamente en los procesos de respuesta ante señales de estrés. Por su acción enzimática son consideradas como un factor de virulencia ya que dañan las células del hospedador y favorecen la invasión de los tejidos. Han sido descritas secuencias homólogas a los genes

implicados en la producción de fosfolipasas en diferentes especies de *Candida* (Bennett *et al.*, 1998). Estas enzimas están implicadas en el daño a nivel de membranas de las células del hospedador, así como en adherencia y penetración. Ibrahim y colaboradores (1995) basaron esta propuesta en tres evidencias fundamentales:

- 1) La actividad extracelular fosfolipasa fue siempre mayor en cepas aisladas de infecciones clínicas respecto a cepas comensales.
- 2) Un aislado productor de gran actividad fosfolipasa extracelular mostró invasividad en ratones mientras que uno de baja producción no.
- 3) Los niveles de actividad fosfolipasa resultaron predictivos de mortalidad en estudios con animales.

Estos resultados demuestran la participación de estas enzimas en la infección sistémica, de hecho, cepas de *C. albicans* con el gen de la fosfolipasa B (*PLB1*) interrumpido, presentan una disminución drástica de la capacidad de penetración en las células del hospedador, y cepas mutantes en el gen *PLD1* (fosfolipasa D fosfatidilcolina específica) son menos virulentas en ratones y presentan alteraciones en la formación de micelio, debido probablemente a la ausencia de la proteína Pld1, que no generaría ácido fosfatídico y diacilglicerol, y cuyos niveles son importantes para la transición morfológica bajo ciertas condiciones en *C. albicans* (Hube *et al.*, 2001).

### **I.4.2.3. Lipasas (Lip)**

Las lipasas catalizan la hidrólisis de ésteres de mono-, di-, y triacilgliceroles. En *C. albicans* estas funciones son llevadas a cabo por una familia formada por 10 proteínas muy similares (Lip1-10) (Schaller *et al.*, 2005; Stehr *et al.*, 2004). Aunque el papel de cada gen *LIP* no ha sido elucidado, la gran cantidad de genes *LIP* podría indicar una contribución importante a la virulencia de este patógeno oportunista en mamíferos.

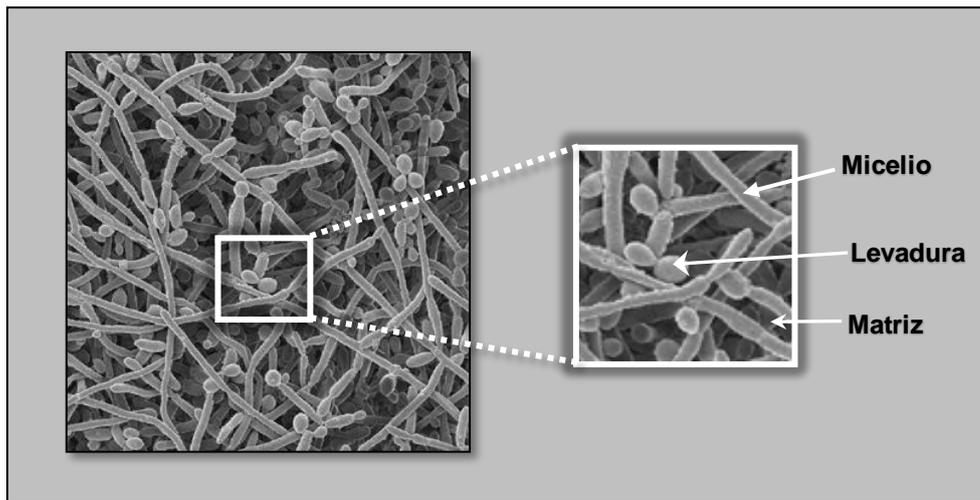
### I.4.3. Biopelículas

*C. albicans* es un organismo polimórfico, es decir, experimenta transiciones morfológicas reversibles entre formas de crecimiento de levadura, pseudomicelio y micelio. Esta habilidad de cambiar su patrón de crecimiento ha sido considerada un requisito importante para la virulencia (Saville *et al.*, 2003), pero también juega un papel muy importante la formación de biopelículas (Richard *et al.*, 2005). Las biopelículas son el modo más común de crecimiento de los microorganismos en la naturaleza y un factor importante en las infecciones clínicas debido a la resistencia a antibióticos asociadas a estas estructuras (Chandra *et al.*, 2001; Lewis, 2008; Nobile y Mitchell, 2006; Xu *et al.*, 2000).

*C. albicans* al adherirse a una superficie produce una biopelícula que consiste en una matriz donde están inmersas levaduras e hifas (Figura I.3), dispuesta en una estructura de bicapa que les confiere resistencia a un amplio espectro de antifúngicos (Douglas, 2003). Estas resistencias son importantes ya que en el caso de candidiasis invasivas en humanos, aún administrando una terapia antifúngica continua, la mortalidad asociada puede llegar a ser mayor del 40% (Pappas *et al.*, 2003; Pierce *et al.*, 2009; Wey *et al.*, 1988).

Las superficies de catéteres, válvulas, implantes, etc., actúan como sustratos en la formación de biopelículas (Chandra *et al.*, 2001; Ramage *et al.*, 2006), este hecho asociado a factores como vías abiertas e inmunosupresión en los pacientes que permanecen largos periodos en hospitales, aumentan el riesgo de padecer fungemias, siendo *C. albicans* el aislado más frecuente en estos casos.

Según las condiciones, la biopelícula puede diferir en la morfología así como en el contenido de la matriz. Así, las que se desarrollan en el interior del hospedador son diferentes a las formadas sobre una superficie inerte (agujas, gotero, entre otros). La investigación en este campo ha sido muy novedosa en los últimos años, pero quedan puntos claves por averiguar, como las causas que dirigen la formación de la biopelícula (Kumamoto, 2002; Nobile y Mitchell, 2006; Nett y Andes, 2006).



**Figura I.3. Micrografía electrónica de una biopelícula de *C. albicans*.** Se pueden observar diferentes morfologías celulares de *C. albicans* embebidas en la matriz celular (Adaptado de Aubert, *et al.*, 2003).

#### I.4.4. Variaciones fenotípicas

La gran variabilidad adaptativa que presentan las especies del género *Candida*, en especial *C. albicans*, obedece a un mecanismo desarrollado por el hongo para sobrevivir a las difíciles condiciones ambientales que en el desarrollo de una infección le permite evadir los sistemas de defensa del hospedador. Algunas cepas de *C. albicans* tienen la habilidad de sufrir cambios reversibles entre las fases blanca y opaca. En la fase blanca las colonias son blancas redondas y con forma de cúpula, mientras que en la fase opaca las colonias son más oscuras alargadas y planas en agar sólido (Bennet y Johnson, 2005). Dichos cambios ocurren con un frecuencia de  $10^{-4}$  a  $10^{-5}$  por generación celular de blanco a opaco, y  $5 \times 10^{-4}$  por generación celular de fase opaca a blanca (Soll, 1997). Pero además, se producen cambios morfológicos a nivel celular así como alteraciones en las propiedades fisiológicas como adhesividad, secreción de proteasas, contenido lipídico, sensibilidad a antifúngicos y capacidad de asimilar diferentes fuentes de carbono.

Células provenientes de un mismo progenitor son capaces de expresar fenotipos muy diferentes reflejados en una amplia variedad de morfología colonial y son

capaces de transmitirlo a la progenie (Soll, 1992). La pared celular de las variantes fenotípicas es diferente en estructura (Soll *et al.*, 1993) y composición (Martínez *et al.*, 1990). Sin embargo, el contenido de ADN y el cariotipo son iguales en las diferentes fases de la misma cepa.

Los anticuerpos desarrollados frente a un primer antígeno no son eficaces frente a la población de células con modificaciones en la composición antigénica y estas células se desarrollarán selectivamente respecto a las que no han experimentado modificaciones. El mecanismo molecular de este proceso no se conoce, pero se ha observado una expresión diferencial de genes que parecen estar implicados en la regulación de la transcripción (Soll *et al.*, 1993).

#### I.4.5 Polimorfismo

La transición dimórfica en hongos se describe como la capacidad de las células para alternar durante su ciclo de crecimiento entre la forma de levadura y la de micelio. Esta diferenciación se considera un factor de virulencia muy importante en muchos hongos patógenos. Dentro del ciclo celular de los hongos dimórficos las morfologías básicas observadas son levadura (forma unicelular) y micelio (forma pluricelular), (Figura I.4).

Numerosos factores nutricionales y ambientales, incluyendo temperatura, aminoácidos, cambios de pH, y suero pueden inducir la transición de levadura también denominada blastospora o blastoconidia, a micelio en *C. albicans* (Ernst, 2000; Eckert *et al.*, 2007).

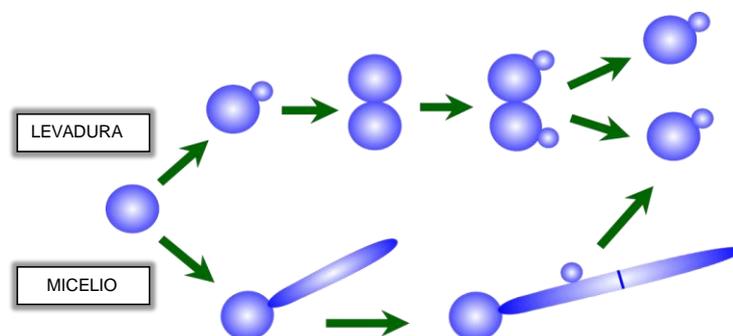
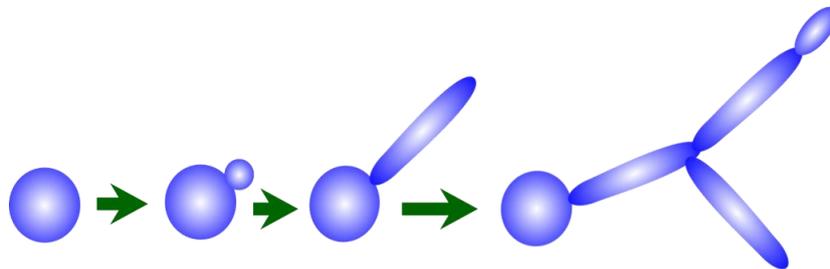


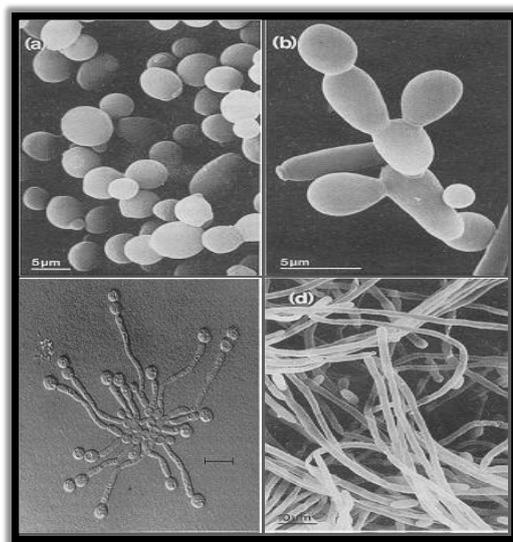
Figura I.4. Cambios morfológicos en *C. albicans*.

Los filamentos puede ser caracterizados como: (a) hifas verdaderas o micelios si nacen y continúan su crecimiento apical continuo y se mantienen comunicadas por poros a través de sus septos de división, creando células mononucleadas que generan yemas laterales o ramas, o (b) pseudohifas o pseudomicelios si los filamentos que surgen a partir de células por gemación unipolar continúan unidos a la célula precedente dando lugar a células elongadas unidas que forman a su vez ramas por continuación del proceso de gemación en filamentos carentes de continuidad citoplasmática (Figura I.5).



**Figura I.5. Crecimiento pseudomiceliar.** Tras la citoquinesis las células son alargadas y permanecen unidas.

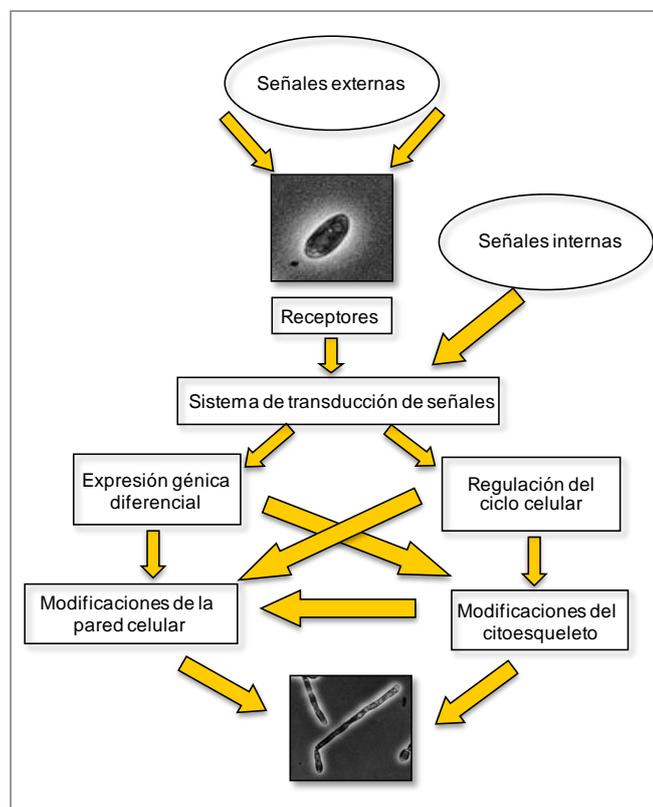
Por último las clamidosporas son células de forma más o menos esférica, que se generan a partir de hifas en fase estacionaria cuando se encuentran en condiciones desfavorables, por lo que es considerada una posible forma de resistencia (Figura I.6).



**Figura I.6. Morfología del hongo *C. albicans*.** a) Levadura; b) pseudomicelio; c) clamidospora; d) micelio (Odds, 1988).

El paso de un tipo de morfología a otro es un proceso reversible, pero se ha dado más importancia a la transición de fase de levadura a micelio debido a su relación con la virulencia en hongos dimórficos (Calderone, 1993), aunque mutantes monomórficos y especies que no forman micelios conservan la capacidad patógena, lo que indica que el cambio dimórfico no sería crítico en la virulencia de *C. albicans*. Además de la morfología, se ha descrito que las hifas de *C. albicans* tienen características distintas a las levaduras, tales como la hidrofobicidad de su superficie celular y la adherencia que, por sí mismos, constituyen factores de virulencia; además, la forma miceliana estaría mejor adaptada para penetrar a través de discontinuidades en el epitelio (Gow *et al.*, 1994). Las hifas presentan tigmotropismo (respuesta de orientación hacia un estímulo de contacto localizado), que les confiere la capacidad de reconocer oquedades e incisiones tisulares y penetrar a través de las mismas (Sherwood *et al.*, 1992) considerándose importante en la diseminación de la enfermedad.

Algunos de los posibles mecanismos implicados en la regulación de la transición dimórfica se muestran en la figura I.7.



**Figura I.7. Esquema de los elementos implicados en el proceso de diferenciación en hongos dimórficos.**

### **I.4.5.1. Regulación de morfogénesis por señales del medio ambiente**

El proceso de inducción de hifas en *C. albicans* consta de tres fases. En la primera, las señales externas son percibidas por receptores específicos localizados en la superficie celular. A continuación, se activan las señales de transducción intracelular, y en la tercera fase se producen los componentes reguladores estructurales necesarios para la formación de la hifa (Figura I.7).

Para un eficiente proceso morfogénético se requiere la presencia o ausencia de elementos reguladores o represores. Se conocen al menos tres factores que actúan positivamente en la formación de hifas, estos son la temperatura a 37°C (Lee *et al.*, 1975), el pH neutro (Buffo *et al.*, 1984) y crecimiento en medio líquido a baja densidad (<0.1-0.5 DO<sub>600</sub>) previo ayuno metabólico en las condiciones anteriores de temperatura y pH (Elorza, 1988; Lee *et al.*, 1975). Han sido descritas numerosas sustancias que funcionan como inductores positivos del crecimiento en forma de hifa. El inductor más efectivo y fisiológico es el suero (5-20%) (Gow *et al.*, 1982), capaz de promover una elevada producción de tubos germinativos en *C. albicans*.

### **I.4.5.2. Bases moleculares del dimorfismo**

Esencialmente, la transición dimórfica consiste en un proceso de diferenciación celular, desencadenado por las células ante determinadas señales externas específicas. El estímulo extracelular ha de ser transmitido al interior de la célula por medio de múltiples sistemas de transmisión de señales, que promoverán una expresión génica diferencial, originando cambios en la regulación del ciclo celular, en la pared celular y en el citoesqueleto que tendrán como consecuencia la transición dimórfica. Los inductores son muy variados por lo que se postula que existe más de un sistema de transmisión de señales. Los mecanismos por los que señales físico-químicas y bioquímicas se van a traducir en respuestas intracelulares específicas implican la participación de segundos mensajeros como el calcio o el adenosin monofosfato cíclico (AMPc). La mayoría de rutas de transmisión de señales consisten en una serie de proteínas de unión a guanosa trifosfato (GTP), proteinquinasas y proteínas reguladoras como los factores de

transcripción. En *C. albicans* no se conocen los receptores que transducen los estímulos externos. Se ha establecido una ruta en respuesta a ayuno de aminoácidos como ocurre en *S. cerevisiae*, donde la presencia de ácido ribonucleico de transferencia (ARNt) no cargados se traduce en la activación transcripcional de numerosos genes (Hinnebusch, 1990).

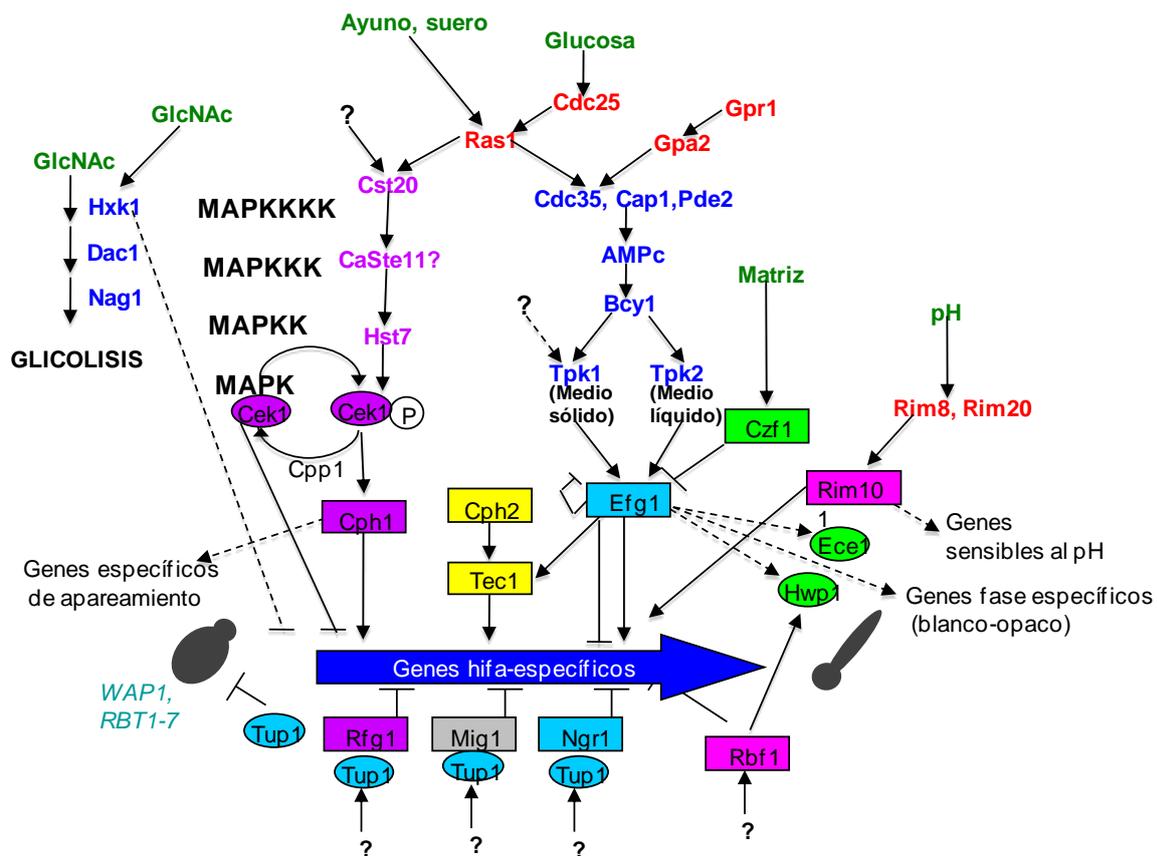
La detección de esta señal no dependería de receptores externos, pero otras señales químicas o bioquímicas sí deben transmitirse por medio de receptores, aunque éstos aún son desconocidos. Sin embargo, se han identificado en *C. albicans* proteínas homólogas a componentes de rutas de transmisión de señales de *S. cerevisiae*.

En la figura I.8 se resumen las múltiples rutas de señalización implicadas en la regulación del dimorfismo en *C. albicans*.

#### **I.4.5.3- Rutas de señalización**

Las rutas de señalización que transducen señales ambientales en cambios morfológicos han sido profundamente estudiadas. Estos estudios han demostrado que la mayoría de los genes implicados en la morfogénesis de hifas en *C. albicans* son homólogos a aquellos que se requieren para el crecimiento polarizado y el crecimiento pseudohifal en *S. cerevisiae*. Aunque hasta este momento, no han sido identificados los sensores de señales ambientales, se ha demostrado que varias rutas de transducción juegan un papel importante en la morfogénesis de *C. albicans* (Biswas *et al.*, 2007). (Figura I.8).

Estas rutas de transducción forman una red compleja e interconectada que integra señales ambientales que controlan apropiadamente la morfogénesis y la transcripción. Un ejemplo de la existencia de integración entre estas redes es el factor de transcripción Efg1p, que recibe información a través de múltiples rutas y está implicado en diferentes procesos tales como desarrollo de hifas, formación de clamidosporas, cambio fenotípico “blanco-opaco” y formación de biopelículas (Biswas *et al.*, 2007). (Figura I.8)



**Figura I.8. Regulación del dimorfismo en *C. albicans* mediante múltiples rutas de señalización.** La ruta Cph1 mediada por MAPK y la de Efg1 mediada por AMPc están bien caracterizadas en la regulación dimórfica en *C. albicans*. Ras1 es un importante regulador del desarrollo hifal que probablemente actúe en la parte alta de ambas rutas. En la ruta PKA-AMPC dos subunidades catalíticas o isoformas de PKA, Tpk1 y Tpk2, tienen diferentes efectos en la morfogénesis de las hifas bajo diferentes condiciones de inducción de crecimiento de hifas. La cascada MAPK incluye Cst20 (PAK), Hst7 (MAPKK), Cpk1 (MAPK), y el factor de transcripción Cph1, que es un homólogo del factor de transcripción Ste12 de *S. cerevisiae*. La Transcripción del regulador de hifas *TEC1* está regulada por Efg1 y Cph2. Rim101 o Czf1 pueden actuar a través Efg1 o actuar en paralelo con Efg1. Tup1 es el regulador negativo de la transición a hifa. Tup1, es reclutado por Rfg1, Nrg1, o Mig1, y Rbf1 está implicado también en la transición dimórfica. La hexoquinasa GlcNAc-inducible, Hxk1, bajo ciertas condiciones juega un papel negativo en el desarrollo de hifas. Las proteínas de pared celular (*HWP1* y *ECE1*, etc., que están involucradas en la adherencia) también están reguladas por Efg1. Los factores de transcripción se muestran en rectángulos (Adaptado de Biswas *et al.*, 2007).

#### I.4.5.3.1- La ruta de la proteína quinasa A dependiente de AMPc

El desarrollo de hifas es estimulado por AMPc exógeno y se han asociado cambios en los niveles intracelulares de AMPc con morfogénesis en *C. albicans* (Egidy *et al.*, 1990; Sabie y Gadd, 1992) lo que sugiere que la vía de señalización de AMPc controla la morfogénesis de hifas así como en *S. cerevisiae* controla el

desarrollo de pseudohifas (Pan y Heitman, 1999).

La ruta de la proteína quinasa A dependiente de AMPc (PKA) en *C. albicans* es controlada por el factor de transcripción Efg1p, homólogo de Phd1p en *S. cerevisiae*. Efg1p pertenece a la familia de las proteínas APSES, una clase conservada de reguladores transcripcionales de hongos (Doedt *et al.*, 2004). La proteína Efg1p es un fuerte regulador del proceso de morfogénesis ya que no solo regula el desarrollo de hifas (Lo *et al.*, 1997; Stoldt *et al.*, 1997), sino también los cambios fenotípicos y la formación de clamidosporas en este patógeno (Sonnenborn *et al.*, 1999a, 1999b). El factor transcripcional Efg1p juega un papel importante en morfogénesis, ya que la disrupción de *EFG1* causa un bloqueo completo de la formación de hifas bajo condiciones de inducción, así como la sobreexpresión de *EFG1* induce crecimiento pseudofilamentoso en *S. cerevisiae* y provoca crecimiento miceliar en *C. albicans* (Stoldt *et al.*, 1997) y alteraciones en la formación de biopelículas (Ramage *et al.*, 2002); además, Efg1p puede actuar como un activador o represor de la morfogénesis dependiendo de factores ambientales (Stoldt *et al.*, 1997).

Se han descrito otros componentes de esta ruta de señalización implicados en morfogénesis tales como: proteína Ras (Ras1p), adenilato ciclasa (Cyr1p) y proteína quinasa A (Tpk2p) (Ernst, 2000). Tpk2 se ha identificado como la subunidad catalítica PKA requerida en *C. albicans* para el crecimiento filamentoso en numerosas condiciones, incluida la inducción por suero (Sonnenborn *et al.*, 1999a). La sobreexpresión de *TPK2* induce la formación de hifas en condiciones normales. El mutante *tpk2* recupera la capacidad de filamentación al sobreexpresar *CEK1* o el factor transcripcional *EFG1*. En cambio, la sobreexpresión de *TPK2* recupera el defecto en la formación de hifas en el mutante *cek1*, pero no en el mutante *efg1* (Sonnenborn *et al.*, 1999a). Aunque Efg1 juega un papel importante en la regulación de la filamentación de *C. albicans*, la mutación en el factor de transcripción Phd1 le confiere sólo un pequeño defecto en la pseudofilamentación a *S. cerevisiae* (Gimeno y Fink, 1994; Lo *et al.*, 1997; Ward *et al.*, 1995). En *S. cerevisiae* la proteína Ras2 regula y es esencial para el crecimiento pseudohifal.

En *C. albicans* se ha identificado un homólogo de este gen y aunque no es esencial, el mutante nulo presenta serios problemas de miceliación en respuesta a suero y otros estímulos (Feng *et al.*, 1999).

### **I.4.5.3.2- La ruta de las MAP quinasas**

En células eucariotas las rutas MAP quinasas (Mitogen Activated Proteins) son elementos claves en la mediación de la transducción de muchas señales generadas desde la superficie al núcleo. Al igual que en *S. cerevisiae*, esta ruta está implicada en la filamentación de *C. albicans*. Esta ruta consiste en la quinasa Cst20 (homólogo de la quinasa p21-activada [PAK] Ste20), Hst7 (homólogo de la MAPK quinasa [MAPKK] Ste7), y Cek1 (homólogo de Fus3 y Kss1 MAPKs).

En *S. cerevisiae* los componentes de esta vía participan en el crecimiento de pseudohifas y en las respuestas a feromonas de apareamiento (Figura I.8). Se han encontrado homólogos de la ruta de las MAP quinasas de *S. cerevisiae* (Ste20p/Ste7p/Kss1p/Ste12p) en *C. albicans* (Cst20p/Hst7p/Cek1p/Cph1p) respecto a estructuras y funciones (Alonso-Monge *et al.*, 2003; Eisman *et al.*, 2006; Liu *et al.*, 1993; Madhani y Fink, 1997).

La ruta de transducción de MAP quinasas en *C. albicans* tiene una menor importancia en morfogénesis que la ruta de PKA AMPc, ya que su deficiencia afecta la morfogénesis sólo bajo condiciones especiales pero no durante la inducción con suero y otros inductores de la formación de hifas.

La ruta de MAP quinasas está controlada por el factor transcripcional Cph1p. Las células mutantes que carecen de Cph1p son defectuosas en la filamentación en medio sólido pero no en medio inductor líquido o en presencia de suero (Liu *et al.*, 1994). El crecimiento del mutante *cek1* en suero está ralentizado y presenta una menor virulencia (Csank *et al.*, 1998; Guhad *et al.*, 1998). Por tanto, parece probable pensar que Cek1 MAP quinasa puede estar involucrada en más de una ruta, de forma similar a como lo está Fus3 en *S. cerevisiae*. Otro componente descrito es una MAP quinasa fosfatasa, *CPP1*; el mutante nulo en este gen

presenta un fenotipo de hiperfilamentación y menor virulencia, el cual se suprime con la interrupción de la MAP quinasa Cek1 (Csank *et al.*, 1998.). Mutaciones en cualquier componente de esta cascada causan un efecto similar al observado en *cph1Δ/cph1Δ* (Csank *et al.*, 1998). Sin embargo, mutaciones en diferentes componentes de la ruta no presentan el mismo fenotipo de virulencia en infecciones sistémicas ya que los mutantes *cst20Δ/cst20Δ* y *cek1Δ/cek1Δ* muestran virulencia reducida, mientras que *hst7Δ/hst7Δ* y *cph1Δ/cph1Δ* no (Csank *et al.*, 1998; Leberer *et al.*, 1996; Lo *et al.*, 1997). El doble mutante *efg1/cph1* no filamta en casi ninguna condición, y es avirulento, ambos factores de transcripción definen dos rutas distintas de filamentación las cuales conjuntamente son esenciales para la filamentación y virulencia (Figura I.8.) (Lo *et al.*, 1997).

#### **I.4.5.3.3. Regulación Convergente de Cph1 y Efg1: Implicación de Tec1 y Cph2**

Se ha demostrado que el factor transcripcional Tec1, regula el desarrollo de hifas y la virulencia en *C. albicans* (Schweizer *et al.*, 2000). En *S. cerevisiae* ScTec1 y ScSte12 forman un complejo de factores transcripcionales que activan genes implicados en el crecimiento de pseudohifas (Chou *et al.*, 2006). Estos complejos no han sido identificados en *C. albicans*, donde, *TEC1* no esta regulado por Cph1, homólogo de ScSte12, pero si por Cph2 y Efg1. La proteína Cph2, regula el desarrollo de hifas en *C. albicans* (Lane *et al.*, 2001). El mutante *cph2* tiene el desarrollo de hifas defectuoso, Cph2 es necesario para la inducción transcripcional de *TEC*. Además, la expresión de *TEC1* suprime el defecto del desarrollo de hifas de *cph2*. Por lo tanto, la función de Cph2 en la formación de hifas está mediada en parte por Tec1. El mutante *tec1* exhibe una ausencia de filamentación en medio líquido con suero. La sobreexpresión de *EFG1* no suprime el defecto morfológico del mutante *tec1*, mientras que la sobreexpresión de *TEC1* tiene un fenotipo parcial en el mutante *efg1* (Schweizer *et al.*, 2000). Estos resultados, unidos al hecho de que el mutante *efg1* tiene un defecto más severo en el desarrollo de hifas que el mutante *tec*, sugieren que Tec1 actúa más abajo

en la cascada que Efg1 y Cph2.

### **I.4.5.3.4. La ruta catabólica N-acetilglucosamina (GlcNAc) de *C. albicans***

En *C. albicans* GlcNAc es uno de los inductores conocidos en la transición levadura-hifa promoviendo la emisión de los tubos germinativos. La respuesta de *C. albicans* a GlcNAc implica grandes cambios en los niveles enzimáticos en la ruta catabólica de la glucosamina. La característica más interesante de esta ruta es que todos los genes implicados en el catabolismo de GlcNAc conforman un grupo de seis genes (Kumar *et al.*, 2000). Tres de ellos codifican enzimas conocidas; glucosamina-6-fosfato deaminasa (Nag1), GlcNAc-6-fosfato deacetilasa (Dac1/Nag2), y GlcNAc quinasa (Hxk1/Nag5) que actúan secuencialmente sobre la GlcNAc para generar fructosa-6-fosfato, que entra en la vía glicolítica. Esta vía metabólica es inducible por GlcNAc, que también puede utilizarse como única fuente de carbono.

Cuando los genes *NAG1*, *DAC1*, y *HXK1* son deleccionados individualmente, el patrón de crecimiento permanece igual, es decir, los tres mutantes muestran crecimiento defectuoso en presencia de GlcNAc aunque crecen normalmente con glucosa. El fenotipo de filamentación aumentada en medio Spider y SLAD parece atribuible a la disrupción del gen *NAG1*. La virulencia en modelo murino de candidiasis sistémica se afecta de manera variable en cada uno de los mutantes individualmente, con una mayor atenuación para el mutante *hxk1* seguido de los mutantes *dac1* y *nag1* (Singh *et al.*, 2001, Yamada-Okabe *et al.*, 2001). En resumen, estos tres genes están implicados, no solo en el metabolismo de GlcNAc, sino también en el cambio dimórfico y la virulencia.

### **I.4.5.3.5- Factores de represión**

Han sido identificados como represores de la formación de hifas, algunos factores de transcripción, aunque el mecanismo o las rutas de funcionamiento aún no se conocen. Estos factores de transcripción son Tup1p, Nrg1p y Rbf1p (Braun y

Johnson, 1997; Braun *et al.*, 2001; Ishii *et al.*, 1997). Células que carecen de estas proteínas crecen como hifas en todos los medios probados.

El mutante *tup1* presenta un fenotipo pleiotrópico: floculación, sensibilidad a la temperatura, y en *S. cerevisiae*, incapacidad de esporular, siendo necesario para el mantenimiento de la diploidía. La expresión de *TUP1* de *C. albicans* en *S. cerevisiae* suprime estos defectos, en cambio su eliminación en *C. albicans* produce micelio constitutivo en todas las condiciones probadas (Braun y Johnson, 2000). El triple mutante *cph1/efg1/tup1* puede filantar en respuesta a señales medioambientales poniendo en evidencia la existencia de alguna ruta alternativa. El mutante *tup1* tiene defectos en virulencia (Braun y Johnson, 1997).

Las células del mutante *nrg1* son predominantemente filamentosas bajo condiciones que no inducen la filamentación y presentan virulencia atenuada. Nrg1 reprime algunos genes específicos de filamentación tales como *ECE1* y *HWP1*, que suelen contener un motivo de respuesta a Nrg1 en sus promotores. Estos genes constituyen un subgrupo de aquellos bajo el control de Tup1, proporcionando nuevas evidencias de que Nrg1 actúa reclutando Tup1 a sus genes diana (Biswas *et al.*, 2007). El homólogo de *C. albicans* Rap1 no es esencial para la supervivencia pero es necesario para reprimir la formación de pseudohifas bajo condiciones que favorecen el crecimiento de levadura. Un factor de transcripción de *C. albicans* Rbf1p está involucrado en la regulación de la transición levadura-micelio (Ishii *et al.*, 1997), el mutante nulo *rbf1* es constitutivamente filamentosos, las hifas formadas son más características de pseudohifas que de hifas verdaderas. La virulencia del mutante *rbf1* en modelo murino o en infección sistémica está significativamente atenuada (Biswas *et al.*, 2007). Rfg1, homólogo de ScRox1 en *S. cerevisiae*, es también un importante represor ya que recluta a Tup1 cuando se expresan los genes que promueven el desarrollo de hifas.

En *S. cerevisiae*, otro represor transcripcional ScMig1, proporciona nuevos datos en cuanto a las funciones reguladoras de Tup1, Nrg1, y Mig1 en *C. albicans*. Nrg1

y Tup1 regulan a un grupo de genes diferentes a los que son regulados por Mig1 y Tup1. Esto corrobora la idea de que Mig1 y Nrg1 utilizan como diana al represor Tup1 (Murad *et al.*, 2001a). Sin embargo, Mig1 y Nrg1 reprimen otros genes en *C. albicans* de una manera independiente a Tup1. (Murad *et al.*, 2001a, 2001b).

### **I.4.5.3.6. Co-regulación de genes de virulencia y morfogénesis**

*C. albicans* exhibe una gran plasticidad morfogenética que está relacionada con su patogenicidad, ya que la mayoría de los mutantes deficientes en la formación de hifas presentan una virulencia reducida. Sin embargo, se ha mencionado que la co-regulación de los genes que controlan la formación de hifas con genes que codifican la virulencia, confunde el análisis (Brown, 2002; Gow *et al.*, 2002; Kobayashi y Cutler, 1998; Liu, 2002). Entre los genes que manifiestan ambos tipos de co-expresión están *ALS3*, *HWP1*, *RBT1*, *RBT4*, *SAP4*, *SAP5* y *SAP6* entre otros.

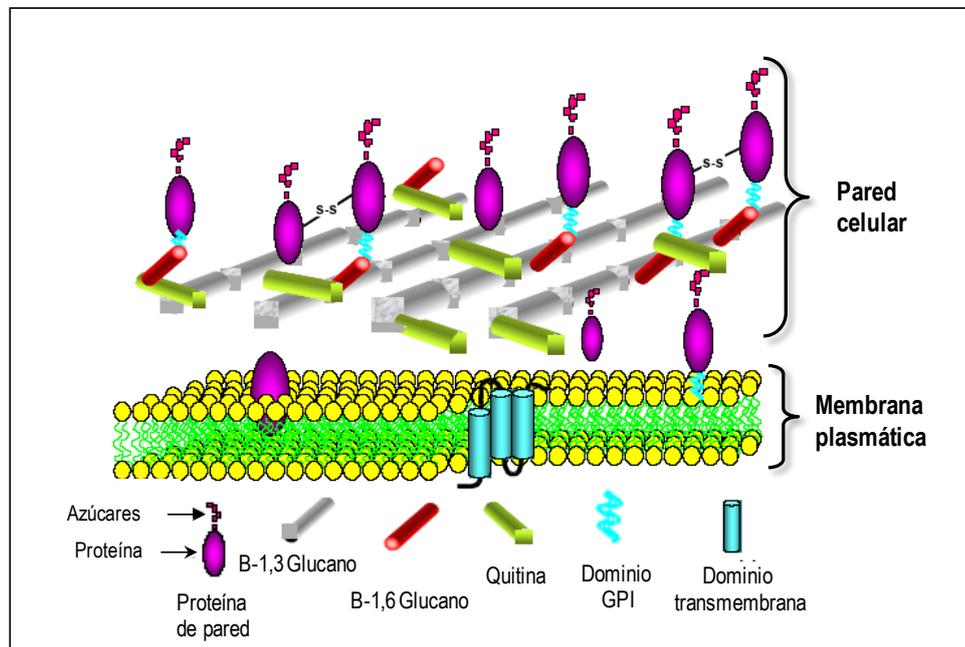
## **I.5. La pared celular de las levaduras.**

Levaduras y hongos filamentosos poseen una pared celular externa esencial para la integridad y forma de las células (Klis, 1994; Ruiz Herrera, 1992). La rigidez de la pared no solo protege a la célula de agresiones físicas externas sino que también resiste la presión de turgencia del protoplasto y evita la lisis de la célula cuando ocurren descensos en la osmolaridad del medio. También actúa como barrera frente a sustancias potencialmente dañinas del medio ambiente y evita que proteínas periplasmáticas sean secretadas al exterior, proporcionando a su vez, una estructura donde las proteínas integrales de pared pueden ser ancladas. Además sirve de sustrato para la exposición de proteínas que juegan un papel importante en interacciones célula-célula, ya sean de carácter sexual, inmunogénico o inmunomodulador.

La pared celular, que constituye aproximadamente un 30% del peso seco de la célula (Valentín *et al.*, 1987), está compuesta principalmente por tres clases de

polímeros de naturaleza polisacáridica: polímeros de manosa (manano) covalentemente unidos a péptidos (manoproteínas), polímeros de glucosa (glucanos) y un polímero de N-acetil-glucosamina (quitina). Estos componentes conforman una estructura con dos capas, donde las proteínas están mayoritariamente en la superficie externa y el glucano en la parte interna (Fleet, 1991; Klis, 1994). Han sido descritas diferentes interacciones covalentes entre los componentes de la pared celular, así se han encontrado uniones entre proteínas y  $\beta$ -1,6-glucano (Montijn *et al.*, 1994), entre  $\beta$ -1,3-glucano y quitina (Kollár *et al.*, 1995) y entre  $\beta$ -1,3-glucano y proteínas a través de  $\beta$ -1,6-glucano (Kapteyn *et al.*, 1996); también se han descrito uniones entre  $\beta$ -1,6-glucano y quitina (Kollár *et al.*, 1997).

Los distintos constituyentes de la pared son sintetizados tanto en la membrana plasmática (quitina y  $\beta$ -1,3-glucano), como a través de pasos sucesivos durante la ruta de secreción (proteínas de la pared celular y posiblemente  $\beta$ -1,6-glucano) y se disponen espacialmente formando una red tridimensional como se puede observar en el modelo propuesto en la figura I.9.



**Figura I.9. Modelo propuesto para la arquitectura de la pared celular de *C. albicans*.** (Adaptado de Molina *et al.*, 2000).

A pesar de esta aparente rigidez, la pared celular es una estructura muy dinámica susceptible a muchas modificaciones que ocurren a través de los diferentes

estadios del ciclo celular (Biely, 1978; Díaz *et al.*, 1992; Sentandreu *et al.*, 1995). Estos cambios tanto en la composición como en la estructura de la pared celular deben estar controlados por una estricta regulación del balance entre las rutas de síntesis y degradación de los polímeros que la forman.

### I.5.1. Composición química de la pared celular.

La pared celular de *C. albicans* es una entidad bioquímica compleja compuesta como en *S. cerevisiae*, principalmente por tres componentes: glucanos ( $\beta$ -1,3- y  $\beta$ -1,6-glucano), manoproteínas y quitina (Tabla I.5) y corresponde aproximadamente al 30% del peso seco de la célula (Fleet, 1991; Valentín *et al.*, 2000).

Tabla I.5- Distribución de los componentes de la pared celular de *C. albicans*.

| MOLECULA             | % PESO SECO |
|----------------------|-------------|
| $\beta$ -1,3-glucano | 40          |
| $\beta$ -1,6-glucano | 20          |
| Manoproteínas        | 30-40       |
| Quitina              | 1-10        |

#### I.5.1.1. Quitina.

La quitina es un homopolímero lineal de  $\beta$ -1,4-N-acetil-D-glucosamina que supone solo un pequeño porcentaje del peso seco total en células con crecimiento vegetativo. La estructura encontrada en los hongos es de  $\alpha$ -quitina, donde las cadenas de azúcar adoptan una disposición antiparalela. La presencia de puentes de hidrógeno conlleva la formación de una serie de estructuras similares a una cinta, lo que hace que la quitina sea insoluble (Ruiz-Herrera, 1992; Shaw *et al.*, 1991).

En *S. cerevisiae*, la quitina se encuentra principalmente en la cicatriz de gemación (Bacon *et al.*, 1969; Cabib y Bowers 1971) siendo fácilmente detectable por tinción con calcofluor white (Pringle, 1991). Además, también encontramos pequeñas cantidades de quitina dispersada uniformemente en las paredes laterales, que se pone de manifiesto por tinción con aglutinina de germen de trigo acoplada a un fluorocromo (FITC) (Molano *et al.*, 1980). Se han encontrado diferentes genes quitina sintetasas tanto en *S. cerevisiae* como en *C. albicans* y su regulación está controlada espacial y temporalmente (Bulawa, 1993; Munro y Gow, 2001).

En *C. albicans*, el papel de la quitina es de gran importancia en el mantenimiento de la estructura de la pared y en la transición morfogénica del hongo. Así, durante la formación del tubo germinativo ocurre un cambio ultraestructural, que consiste en el enriquecimiento de una capa interna transparente a los electrones supuestamente rica en quitina necesaria para aportar rigidez a la pared emergente (Cassone 1973). Esta observación estructural sugirió el uso de la N-acetilglucosamina, un activador de la quitina-sintetasa (Cabib, 1987; Cabib *et al.*, 1982; Gooday y Trinci, 1980), como inductor del tubo germinativo (Cassone, 1984; Mattia *et al.*, 1982). Estos resultados venían a confirmar los previamente obtenidos por Chattaway *et al.* (1968), en el sentido de que la quitina es tres veces más abundante en la pared micelial que en la levaduriforme.

La función más importante de la quitina es la de mantener la rigidez de la pared celular, aspecto confirmado por varias evidencias: la eliminación de componentes amorfos de la pared en condiciones en las que sólo permanezca la quitina, no afecta en modo alguno a la forma original de la célula (Ruiz-Herrera, 1967) y tampoco a la organización de microfibrillas de quitina (Burnett, 1979).

En tanto que, los mutantes incapaces de sintetizar quitina son osmóticamente frágiles (Katz y Rosemberg, 1971). Polioxinas y nikomicinas, que son inhibidores específicos de la quitina sintetasa, afectan el crecimiento de los hongos e inducen alteraciones morfológicas (Muller *et al.*, 1981).

Los mutantes con un bajo contenido de quitina en sus paredes son sensibles osmoticamente (Bulawa, 1993; Pammer *et al.*, 1992), presentan una morfología anormal y son resistentes a calcofluor white, entre otros efectos fenotípicos.

El estudio de los mutantes *cal3*, *chs1*, *chs2*, *csd1*, *csd2*, *csd3*, *csd4* y *shc1* ha permitido la clonación de genes que intervienen en la síntesis de la quitina.

Se han descrito varios complejos enzimáticos capaces de sintetizar de quitina, localizados en dos compartimentos, quitosomas (Ruiz-Herrera *et al.*, 1977) y periplasma. Mientras que la quitina sintetasa II, codificada por el gen *CHS2*, se encarga de la formación del septo primario (Klis, 1994), la quitina sintetasa III es la responsable de la síntesis de la quitina localizada en las paredes laterales y en el anillo de gemación. Se cree que la subunidad catalítica de la quitina sintetasa III está codificada por el gen *CSD2/CAL1/DIT1* (Bulawa, 1993; Pammer *et al.*, 1992; Valdivieso *et al.*, 1991).

Varias experiencias han puesto de manifiesto la presencia de quitina en las paredes de las células madre mientras que parece estar ausente en las yemas (De Nobel *et al.*, 1991; Roncero *et al.*, 1988a; Shaw *et al.*, 1991), lo que estaría de acuerdo con el nivel máximo de transcripción de *CSD2* observado durante las fases finales del ciclo celular después de que se haya formado el septo (Pammer *et al.*, 1992). Esto indicaría que la formación del complejo glucano-quitina, que aunque beneficioso, no es esencial para la célula, estaría regulado también por el ciclo celular (Klis, 1994). La quitina sintetasa I realiza una función de reparación al final de la citoquinesis (Cabib *et al.*, 1992) y está codificada por el gen *CHS1*, cuyo homólogo en *C. albicans* ha sido clonado por complementación de la cepa mutante de *S. cerevisiae chs1* y es mayoritariamente expresado en la forma micelial (Au-Young y Robins, 1990). La actividad quitina sintetasa está afectada por los productos de los genes *CHS4* (*CSD4*, *CAL2*), *CHS5* (*CAL3*) Y *CHS6* (*CSD3*) (Bulawa, 1993; Cid *et al.*, 1995; Santos y Duran *et al.*, 1992). *CHS6* parece estar implicado en la localización de Chs3p y en la activación de *CHS4*.

Se han descrito cuatro genes que codifican quitina sintetasas (*CHS* genes) en *C. albicans*: *CHS1*, *CHS2*, *CHS3* y *CHS8*. La expresión del gen *CHS1* es baja tanto en levadura como en micelio. Sin embargo, Chsp1p es esencial para la integridad celular y la virulencia, involucrado aparentemente en la formación del septo (Mio *et al.*, 1996; Munro *et al.*, 2001). *CHS2* está expresado preferentemente durante la formación de micelio, y codifica una proteína que tiene la mayor actividad quitina sintetasa *in vitro*. Sin embargo, la ausencia de Chs2p no afecta el dimorfismo, los niveles de quitina en la pared celular o la virulencia (Gow *et al.*, 1994; Mio *et al.*, 1996). *CHS3* alcanza su máximo nivel de expresión durante la inducción de micelio, aunque Chs3p es responsable de la mayor parte de la síntesis de quitina *in vivo* tanto en levadura como en micelio (Mio *et al.*, 1996). *CHS8* codifica una proteína similar a Chs2p. El mutante *chs8Δ/chs8Δ* presenta niveles normales en cuanto a la tasa de crecimiento, morfología celular y contenido de quitina, pero tiene reducido a un 25% su actividad quitina sintetasa, y el doble mutante *chs2Δ/chs2Δ chs8Δ/chs8Δ* posee menos del 3% de la actividad quitina sintetasa de la cepa parental *in vitro* aunque tiene una tasa de crecimiento y morfología normal (Munro *et al.*, 2003).

#### **1.5.1.2. β-glucanos.**

El glucano de la pared celular está constituido por la unión de moléculas de D-glucosa en configuración β. Según el tipo de enlace predominante, se puede clasificar al β-glucano en dos tipos de polímeros: el β-1,3-glucano y el β-1,6-glucano. El β-1,3-glucano, el componente más abundante (80% del total del β-glucano), está constituido aproximadamente por 1500 residuos de glucosa por molécula, que forman una cadena lineal con uniones β-1,3 y con un 3% aproximadamente de ramificaciones unidas mediante enlaces β-1,6 (Maners *et al.*, 1973a).

Inicialmente, el β-1,3-glucano fue clasificado en β-1,3-glucano álcali soluble y álcali insoluble. Posteriormente, se ha demostrado que esta diferencia en la solubilidad del β-1,3-glucano es debida a su unión con la quitina, haciéndolo

insoluble en álcali (Kollár *et al.*, 1995). Este resultado está de acuerdo con datos aportados previamente por otros autores, como en el caso de los mutantes deficientes en quitina en los que el  $\beta$ -1,3-glucano es completamente soluble en álcali (Roncero *et al.*, 1988b), el tratamiento del glucano álcali insoluble, con quitinasa, lo transforma en álcali soluble (Mol y Wessels, 1987) que, a su vez, sirve como precursor *in vivo* para la fracción álcali insoluble (Hartland *et al.*, 1994). En cuanto a las funciones celulares, la fracción de  $\beta$ -1,3-glucano unida a quitina (fracción álcali insoluble) tiene un papel directo en el mantenimiento de la rigidez y morfología de la pared celular, ya que la forma de la célula permanece inalterada después de haber realizado una extracción del manano y el glucano álcali soluble (Fleet y Manners, 1976; Kopecka *et al.*, 1974).

La síntesis del  $\beta$ -1,3-glucano se realiza a nivel de la membrana plasmática por un complejo enzimático que requiere UDP-glucosa como sustrato (Shematek *et al.*, 1980) y está formado, al menos, por dos subunidades, una con acción catalítica unida a membrana y otra soluble con acción reguladora (GTP dependiente) (Cabib y Kang, 1987; Mol *et al.*, 1994).

Siguiendo diferentes aproximaciones se han clonado varios genes que posiblemente codifican las subunidades del complejo  $\beta$ -1,3-glucano sintetasa. El producto génico de *FKS1/GSC1/CWH53* (Douglas *et al.*, 1994; Eng *et al.*, 1994; Inoue *et al.*, 1995; Parent *et al.*, 1993; Ram *et al.*, 1994; Ram *et al.*, 1995) es un componente estructural de la subunidad catalítica, aunque no se ha encontrado ningún sitio de unión para UDP-glucosa. El gen *RHO1* codifica una proteína con actividad GTPasa, localizada en la periferia celular, que formaría parte de la subunidad reguladora (Drgonova *et al.*, 1996; Qadota *et al.*, 1996). También se han descrito genes implicados en el procesamiento y ensamblaje del  $\beta$ -1,3-glucano como *BGL2* (Goldman *et al.*, 1995; Klebl y Tanner, 1989; Mrsa *et al.*, 1993) y *GAS1* (Nuoffer *et al.*, 1991; Popolo *et al.*, 1993; Ram *et al.*, 1995). El gen *GSC/FKS* ha sido clonado en *C. albicans* y en otros hongos como *Aspergillus nidulans* (Mio *et al.*, 1997).

La elevada homología entre ellos sugiere un mecanismo similar de la síntesis del  $\beta$ -1,3-glucano en los distintos organismos estudiados.

El  $\beta$ -1,6-glucano se encuentra también en las fracciones álcali soluble y álcali insoluble de la pared celular. Puede ser parcialmente purificado de la fracción álcali insoluble de la pared celular como una molécula altamente ramificada que consiste principalmente en residuos unidos mediante enlaces  $\beta$ -1,6 con una pequeña proporción de residuos unidos mediante enlaces  $\beta$ -1,3; el tamaño medio del  $\beta$ -1,6-glucano es aproximadamente de 140-200 residuos por molécula (Boone *et al.*, 1990; Manners *et al.*, 1973b). También ha sido detectado en la fracción álcali soluble como un heteropolímero  $\beta$ -1,3/ $\beta$ -1,6-glucano (Fleet y Manners, 1977). Si ambas fracciones contienen el mismo tipo de polímero  $\beta$ -1,6-glucano es todavía desconocido. Se ha visto que un conjunto específico de proteínas de la pared celular están unidas a un heteropolímero  $\beta$ -1,3/ $\beta$ -1,6-glucano que podría ser el responsable del anclaje de estas proteínas a la pared (Kapteyn *et al.*, 1996) y se ha propuesto que este polímero es igual al heteropolímero  $\beta$ -1,3/ $\beta$ -1,6-glucano encontrado en la fracción soluble caracterizado por Fleet y Manners (1976,1977).

En el hongo dimórfico *C. albicans*, la proporción entre  $\beta$ -1,3 y  $\beta$ -1,6-glucano es similar en células levaduriformes y miceliales, lo cual indica que la proporción de estas uniones no determina su morfología. Sin embargo, el glucano insoluble de las células que emiten tubo germinativo contiene una mayor cantidad de uniones  $\beta$ -1,3 que el glucano de las células levaduriformes o miceliales (Gopal *et al.*, 1984a). Esta situación se observa también en protoplastos de *S. cerevisiae* en regeneración, los cuales sintetizan mayoritariamente  $\beta$ -1,3-glucano (Gopal *et al.*, 1984b; Kreger y Kopecka, 1976) y en protoplastos de *C. albicans* donde la malla microfibrilar contiene un 45% de uniones  $\beta$ -1,3-glucano y un 20% de  $\beta$ -1,6, sin uniones intracatenarias mezcladas (Gopal *et al.*, 1984b). Probablemente, este aumento en el contenido de  $\beta$ -1,3-glucano en la pared del tubo germinativo, en analogía a lo que ocurre en la pared aberrante de los protoplastos en

regeneración, sea debido al requerimiento por parte de la pared celular de un aumento de rigidez en las etapas críticas de su construcción y remodelaje.

### **I.5.1.3. Manoproteínas.**

Las glicoproteínas son componentes muy importantes de todas las células eucariotas, poseen una estructura básica común, que consiste en una matriz proteica a la cual se unen covalentemente cadenas de carbohidratos.

En los hongos, se denominan manoproteínas porque las cadenas de carbohidratos contienen mayoritariamente unidades de manosa, aunque frecuentemente también presentan pequeñas cantidades de otros azúcares y grupos fosfato (Peberdy, 1990; Ruiz-Herrera, 1992).

Podemos clasificarlas en manoproteínas funcionales, como la invertasa y la trehalasa ácida y manoproteínas estructurales, que son componentes intrínsecos de la estructura de pared (Ballou, 1976; 1982).

Se encuentran ampliamente distribuidas, pudiendo estar presentes a nivel del espacio periplásmico, ser secretadas al medio o formar parte estructural de la pared celular, donde se expanden de manera continua desde las capas más internas a las más externas (Valentín *et al.*, 1987).

Las proteínas estructurales de la pared celular pueden ser extraídas por agentes reductores (Orlean *et al.*, 1986), dodecil sulfato sodico (SDS) en caliente (Valentín *et al.*, 1984) y por digestión enzimática del  $\beta$ -glucano (Kapteyn *et al.*, 1996; Montijn *et al.*, 1994; Pastor *et al.*, 1984; Valentín *et al.*, 1984; Van Risum *et al.*, 1991) o de la quitina (Marcilla *et al.*, 1991). Aunque la mayoría de las proteínas extraídas por SDS probablemente representan una contaminación derivada de membranas adheridas (Klis, 1994) así como precursores biosintéticos de proteínas de la pared celular (Lu *et al.*, 1994).

#### I.5.1.4. Clasificación de las manoproteínas de pared celular

Las técnicas de proteómica, más la secuenciación y análisis *in silico* del genoma de *C. albicans* han permitido la clasificación de diferentes tipos de proteínas de pared celular. Los análisis han identificado un centenar de posibles proteínas (De Groot *et al.*, 2003; Garcerá *et al.*, 2003; Eisenhaber *et al.*, 2004; Richard y Plaine, 2007) que pueden clasificarse dependiendo de la manera en que se unen a la pared celular. En la figura I.10 se muestra un esquema de los diferentes tipos de proteínas de pared celular

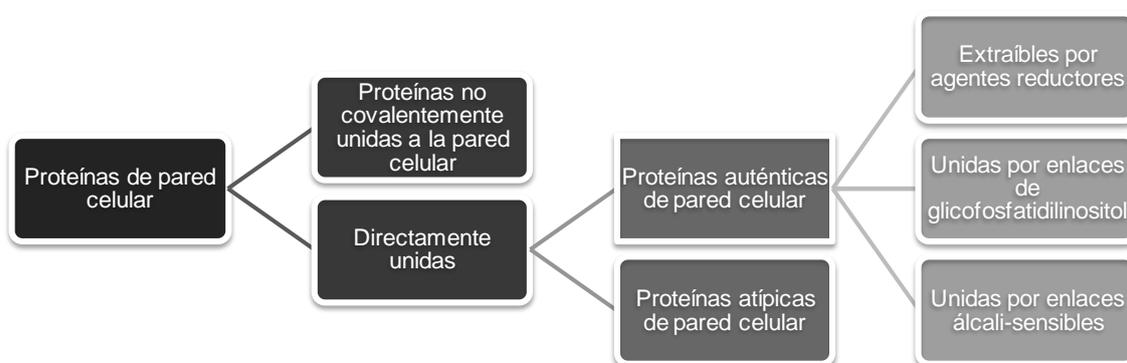


Figura I.10 Clasificación de las proteínas de pared celular.

##### I.5.1.4.1. Proteínas no covalentemente unidas a la pared celular

Estas proteínas están unidas a la pared mediante uniones débiles y pueden ser extraídas utilizando detergentes iónicos como SDS (Valentín *et al.*, 1984) o agentes caotrópicos como la urea. Sin embargo, algunas proteínas específicas de pared celular pueden liberarse también mediante el tratamiento con detergentes en caliente, como es el caso de endoglucanasas Bgl2p y la quitinasa Cht11p en *S. cerevisiae* (Capellaro *et al.*, 1998). En *C. albicans*, un ejemplo de estas proteínas es la trehalasa ácida, codificada por el gen *ATC1*, que es un gen estructural. Atc1p esta localizada en la pared celular y se necesita para el crecimiento en trehalosa como fuente de carbono (Pedreño *et al.*, 2004).

Algunas de estas proteínas no son componentes reales de la pared celular sino proteínas contaminantes provenientes de fragmentos de la membrana plasmática. (Capellaro *et al.*, 1998; Eroles *et al.*, 1997; Klis, 1994; Klis *et al.*, 2001).

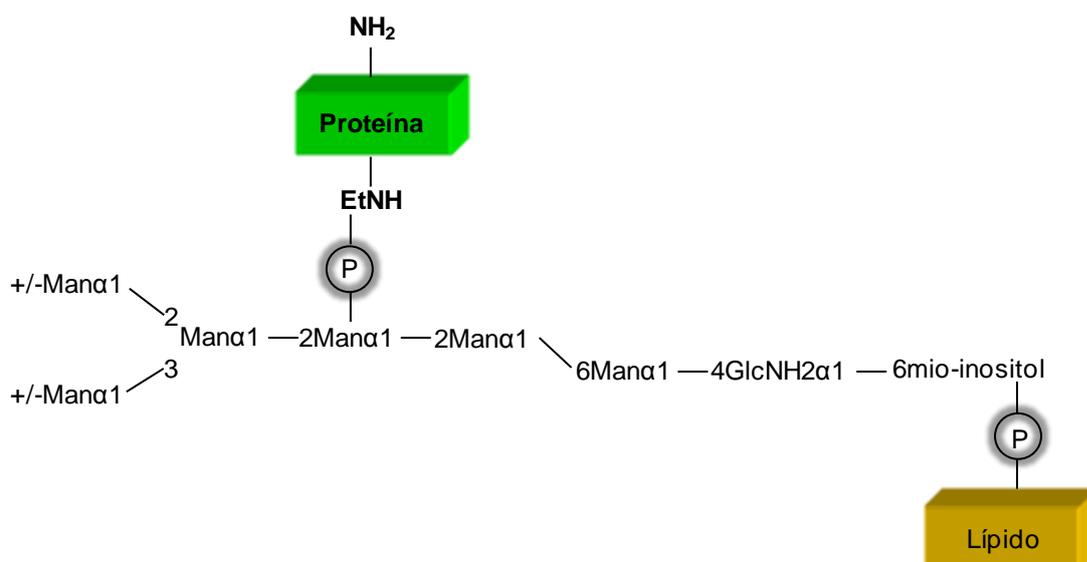
### I.5.1.4.2 Proteínas extraíbles por agentes reductores

Este grupo se halla unido a otras proteínas de pared a través de puentes disulfuro y consecuentemente pueden extraerse por agentes reductores como  $\beta$  mercaptoetanol ( $\beta$ -ME) o ditioneitol (DTT) como ha sido descrito por Moukadiri y Zueco (2001a).

### I.5.1.4.3. Proteínas unidas por enlaces GPI (glicofosfatidilinositol)

Las proteínas GPI son aparentemente las más abundantes en *C. albicans* representando aproximadamente el 88% de las proteínas de pared celular unidas covalentemente. Este grupo comparte las siguientes características ampliamente conservadas (Richard y Plaine, 2007): (i) un péptido señal en la región N terminal, (ii) una secuencia rica en serinas y treoninas que podría proporcionar sitios para O-glicosilación, (iii) un dominio hidrofóbico C terminal y (iv) un sitio  $\omega$  en la cola hidrofóbica donde se une el enlace GPI (Caro *et al.*, 1997).

El enlace GPI (figura I.11) consiste en un grupo lipídico, un grupo mioinositol, un grupo N-acetilglucosamina, tres grupos de manosa y un grupo fosfoetanolamina que conecta el enlace GPI a la proteína.

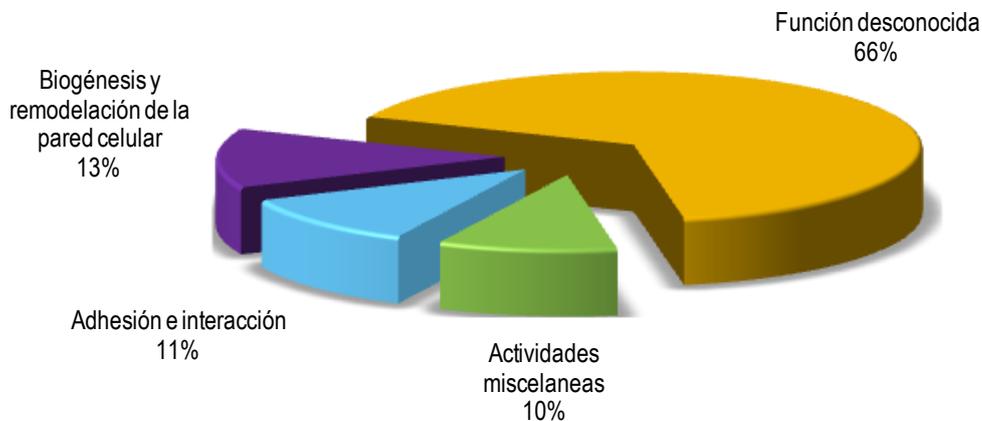


**Figura I.11- Estructura del enlace glicosil fosfatidil inositol (GPI) de proteínas de levaduras.** EtNH, etanolamina; (P), fosfato; Man, manosa. (Adaptado de Sipos *et al.*, 1995).

Después de la síntesis proteica en el retículo endoplásmico un enlace GPI se transfiere a la proteína blanco y reemplaza la cola hidrofóbica (De Groot *et al.*, 2003).

Estas proteínas se unen (a través de su anclaje GPI) vía  $\beta$ -1,6-glucano a  $\beta$ -1,3-glucano, en un 90% de los casos o a quitina en el 10% restante (Kapteyn *et al.*, 2000). La extracción de esas proteínas puede hacerse por digestión enzimática de la red de polisacáridos de la pared celular con  $\beta$ -1,6-glucanasas (Kapteyn *et al.*, 2000),  $\beta$ -1,3-glucanasas (Garcerá *et al.*, 2003), quitinasas (Marcilla *et al.*, 1991), o químicamente rompiendo los puentes fosfato que unen las proteínas GPI a las cadenas de  $\beta$ -1,6-glucano usando ácido fluorhídrico-piridina (HF) (De Groot *et al.*, 2004). Los anclajes GPI se encuentran en todas las células eucariotas, incluyendo levaduras unicelulares, parásitos, y células de mamíferos (McConville y Menon, 2000; Bowman *et al.*, 2006). Diferentes estudios llevados a cabo en *S. cerevisiae* (Caro *et al.*, 1997; Hamada *et al.*, 1998) han revelado que aproximadamente 70 proteínas GPI están presentes en este organismo. Un estudio *in silico* ha identificado en *C. albicans* un total de 234 probables proteínas GPI que pueden enlazarse a la pared celular o a la membrana plasmática (Eisenhaber *et al.*, 2004). Asimismo, tres grupos de investigación han publicado listas de proteínas putativas GPI (De Groot *et al.*, 2003; Eisenhaber *et al.*, 2004; Garcerá *et al.*, 2003). Richard y Plaine (2007) han analizado estos estudios y han publicado una lista de 115 posibles proteínas GPI que corresponden al genoma de *C. albicans*. Entre ellas, pueden describirse cuatro clases (Figura I.12): (i) 76 de esas proteínas putativas tienen funciones desconocidas, (ii) 15 proteínas tienen funciones relacionadas con la biogénesis o remodelación de la pared celular, (iii) 13 relacionadas con la adhesión célula a célula y otras interacciones, y (iv) 11 proteínas presentan actividades enzimáticas diferentes. En los experimentos realizados por Castillo *et al.* (2008) donde se analizó la proteómica de la pared celular de *C. albicans*, mediante espectrofotometría de masas, se detectó Ecm33 una proteína unida por enlace GPI, que posee las características propias de proteínas de pared celular y que está involucrado en la integridad de la

pared celular y morfogénesis (Martínez-López *et al.*, 2004), otros ejemplos de este tipo de proteínas son: Pga2, Pga4, Pga24, Pga29, Pga30, Pga31 y Pga45.



**Figura I.12 Distribución según la función de las proteínas unidas por enlace GPI en *C. albicans*.** (Adaptado de Richard y Plaine, 2007)

Es importante mencionar que entre las 76 proteínas con función desconocida, 41 de ellas están reguladas por diversos factores de transcripción y en diferentes condiciones. Algunos de los factores de transcripción que regulan estas proteínas GPI son, Rim101p, Nrg1p, Tup1p, Efg1p, Cph1p y Ssn6p, (Bensen *et al.*, 2004; García-Sánchez *et al.*, 2005; Murad *et al.*, 2001a; Sohn *et al.*, 2003; Setiadi *et al.*, 2006).

#### I.5.1.4.4. Proteínas unidas por enlaces álcali-sensibles

Son un grupo pequeño de proteínas directamente unidas al  $\beta$ -1,3-glucano mediante enlaces covalentes sensibles al tratamiento alcalino. Las proteínas más importantes de este grupo son las proteínas Pir (proteínas con repeticiones internas). Estas proteínas son ricas en residuos de Ser y se cree que están altamente glicosiladas. Están compuestas de (i) un péptido señal en la región N-terminal seguido por un sitio para la proteasa Kex2p, (ii) un número variable de repeticiones internas del patrón Q[IV]XDGQ[IVP]Q, y (iii) cuatro motivos de cisteína C-terminal (Toh-e *et al.*, 1993).

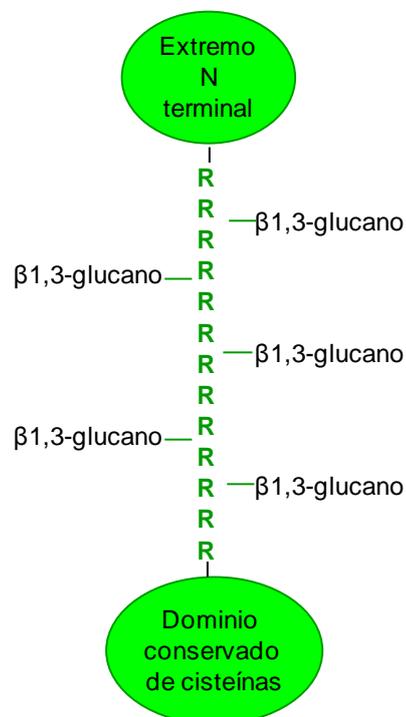
En *S. cerevisiae* la familia Pir está compuesta por cuatro miembros: Pir1p (Mrsa *et*

*al.*, 1997; Toh-e *et al.*, 1993), Pir2p/Hsp150p (Moukadiri y Zueco, 2001a; 2001b; Russo *et al.*, 1992; Toh-e *et al.*, 1993), Pir3p (Mrsa *et al.*, 1997; Toh-e *et al.*, 1993) y Pir4p (Moukadiri *et al.*, 1999). Recientemente, un quinto miembro de esta familia, Pir5p, ha sido identificado (M. Ecker, datos no publicados). Se ha demostrado que, Pir2p y Pir4p, pueden ser liberados al medio de cultivo (Russo *et al.*, 1992; Moukadiri *et al.*, 2001a) o encontrarse unidos a otras proteínas de pared por puentes disulfuro y extraerse utilizando agentes reductores (Orlean *et al.*, 1986; Moukadiri *et al.*, 1999; Moukadiri y Zueco, 2001a). Los genes *PIR* muestran una expresión dependiente del ciclo celular, Pir1p, Pir2p y Pir3p están altamente expresadas cuando las células crecen isotrópicamente y los nuevos componentes de la pared celular han sido ensamblados lo que concuerda con su supuesto papel en el ensamblaje del  $\beta$ -1,3-glucano (De Nobel y Barnett, 1991).

En *C. albicans* hasta ahora se ha identificado solo una proteína Pir típica. Los dos alelos del gen *C. albicans PIR1* en la cepa CAI4 (*IPF15363* y *IPF19968*) codifican para dos manoproteínas de la pared celular de diferente tamaño con 9 y 7 repeticiones internas (-Q-I-(S/T/G/N)-D-G-Q-(I/V)-Q-H-Q-T-) respectivamente, en sus secuencias aminoacídicas y se encuentran unidas a la pared celular por uniones álcali sensibles y también secretadas al medio de cultivo (Martínez *et al.*, 2004). Las principales diferencias entre las proteínas Pir de *S. cerevisiae* y *C. albicans* son: (i) los dos polipéptidos codificados por *IPF19968* y *IPF15363* no son procesados por la proteasa Kex2p, y (ii) el espacio entre las cisteínas dentro del dominio de cisteínas es -C-X<sub>65</sub>-C-X<sub>16</sub>-C-X<sub>12</sub>-C-X<sub>0</sub>-COOH en *C. albicans*, mientras que en *S. cerevisiae* es -C-X<sub>66</sub>-C-X<sub>16</sub>-C-X<sub>12</sub>-C-X<sub>0</sub>-COOH. Las células del mutante heterocigótico en cada uno de los dos alelos del gen *PIR1* son elongadas y se presentan en grupos multicelulares, además, tienen mayor sensibilidad a drogas que afectan la pared celular. El mutante homocigótico aún no se ha obtenido, lo que sugiere un papel esencial de *PIR1* en *C. albicans* (Martínez *et al.*, 2004).

La naturaleza del enlace que une las proteínas Pir con la pared celular ha sido recientemente elucidada. La presencia de estas proteínas unidas al  $\beta$ -1,3-glucano que son liberadas por un tratamiento con álcali sugiere que un puente glicosídico

une al  $\beta$ -1,3-glucano y al residuo de manosa de las cadenas O-glicosiladas de las proteínas Pir. Se ha demostrado que se requieren las secuencias repetidas para la unión al  $\beta$ -1,3-glucano (Castillo *et al.*, 2003; Klis *et al.*, 2002). Si estas repeticiones contienen la secuencia “de unión”, están directamente implicadas en la unión de  $\beta$ -1,3-glucano, así las proteínas Pir pueden interconectar dos o más moléculas de  $\beta$ -1,3-glucano como se representa en la figura I.13. Estudios con Pir4p han identificado el aminoácido responsable de la unión de esta proteína al  $\beta$ -1,3-glucano. Pir4p se une a la pared mediante un residuo de glutamina 74, dentro de la secuencia repetida QIGDGQ<sub>74</sub>VQ (Ecker *et al.*, 2006). Aunque aún no se conoce la enzima que cataliza dicha reacción, se ha postulado la existencia de un enlace éster, entre el  $\gamma$ -carboxilo del residuo glutamato, que proviene de la glutamina y forma el hidróxido de glucosa (Ecker *et al.*, 2006). Podría esperarse que este enlace éster sea álcali lábil, lo que concordaría con la idea de que las proteínas Pir se extraen de la pared celular utilizando tratamientos con álcali. En la figura I.13, se representan las repeticiones internas de las proteínas Pir.

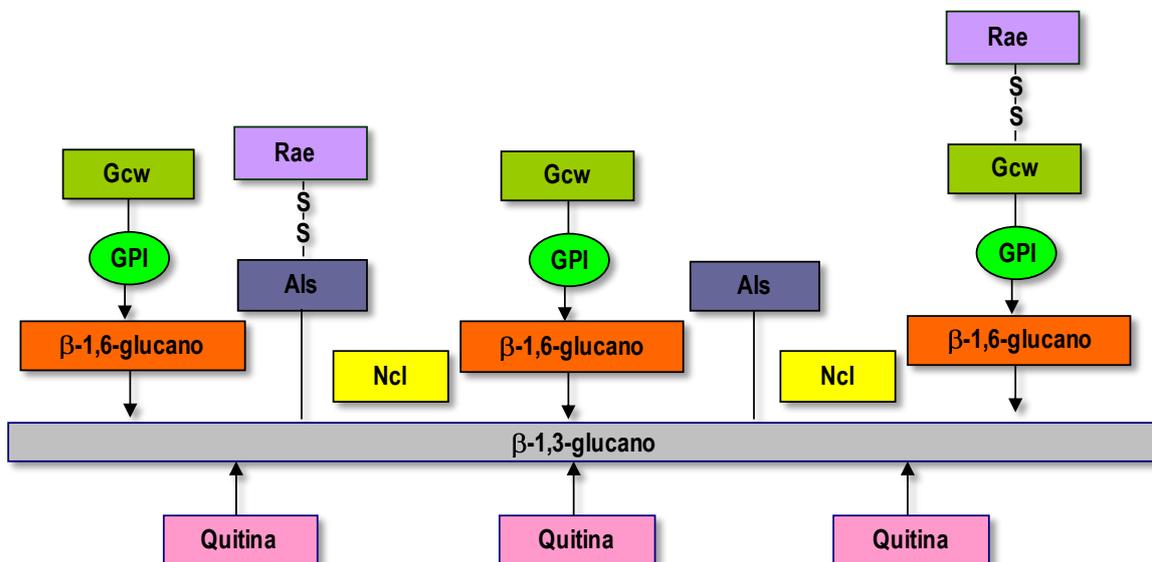


**Figura I.13 Las repeticiones internas de las proteínas Pir pueden actuar en el ensamblaje entre las cadenas de  $\beta$ -1,3-glucano.** R, repeticiones internas de la secuencia consenso - (Q[I/V]XDGQ[I/V/P]Q)-. (Adaptado de Klis *et al.*, 2006).

#### I.5.1.4.5. Proteínas atípicas de pared

Este grupo está compuesto por proteínas que aunque detectadas en la pared, son reconocidas como proteínas citoplasmáticas, y no poseen las características propias de proteínas de pared celular (péptido señal y sitios potenciales de glicosilación). Algunas de estas proteínas atípicas encontradas en extractos de pared celular son enzimas glicolíticas, chaperonas y factores de traducción (Nombela *et al.*, 2006). Algunos ejemplos de estas proteínas son los siguientes: Gap1, Tdh3 y Tef1 (Elorza *et al.*, 1988), Eno1 y Eft2 (Lee *et al.*, 1975), Kar2, Ssa4, Cdc19 y Pma1 (Pitarch *et al.*, 2002), y Ssb1 (De Groot *et al.*, 2004). Aún no se sabe si estas proteínas están atrapadas de alguna manera dentro de los componentes de la pared celular, o si llegan a la pared celular a través de rutas de transporte no conocidas.

El consorcio europeo Galar Fungail, reuniendo todos los datos correspondientes a los componentes de la pared celular, ha desarrollado un modelo de la organización y ensamblaje de la pared celular de *C. albicans*, que podemos observar en la figura I.14.



**Figura I.14. Organización molecular de la pared celular de *C. albicans*.** Gcw, Proteínas de pared unidas por GPI; GPI, remanente glicofosfatidilinositol; ALS, proteína de pared celular unida por enlace álcali sensible; Rae, proteína de pared celular extraíble con agentes reductores; Ncl, proteína unida no covalentemente a la pared celular. Modelo desarrollado por el consorcio europeo Galar Fungal.

## I.6.modificaciones postraduccionales

El número de proteínas maduras liberadas de la pared mediante tratamiento con glucanasas es difícil de determinar, puesto que la mayoría de ellas migran como bandas difusas en electroforesis en geles de SDS-poliacrilamida debido a que contienen cadenas hipermanosiladas unidas por enlaces N-glicosídicos.

El uso de la endoglicosidasa Endo- $\beta$ -N-acetilglucosaminidasa H (Endo H), que elimina las cadenas unidas por enlaces N-glicosídicos, la tunicamicina, un inhibidor de la N-glicosilación, (Orlean *et al.*,1991) así como la utilización de los mutantes *mnn9*, en el caso de *S. cerevisiae*, donde la N-glicosilación se encuentra severamente reducida (Montijn *et al.*,1994; Moukadiri *et al.*, 1997; Tsai, *et al.*,1984) han permitido la detección de bandas más discretas.

Sin embargo, no todas las proteínas liberadas por glucanasas son sensibles a la acción de Endo H, esto indica que algunas proteínas de pared están solo O-glicosiladas, como ya fue descrito por Cappelaro *et al.* (1991) y Orlean *et al.* (1986). Un segundo problema para la determinación del número de proteínas extraídas por glucanasas es que las minoritarias serán enmascaradas por las mayoritarias en geles de SDS-poliacrilamida.

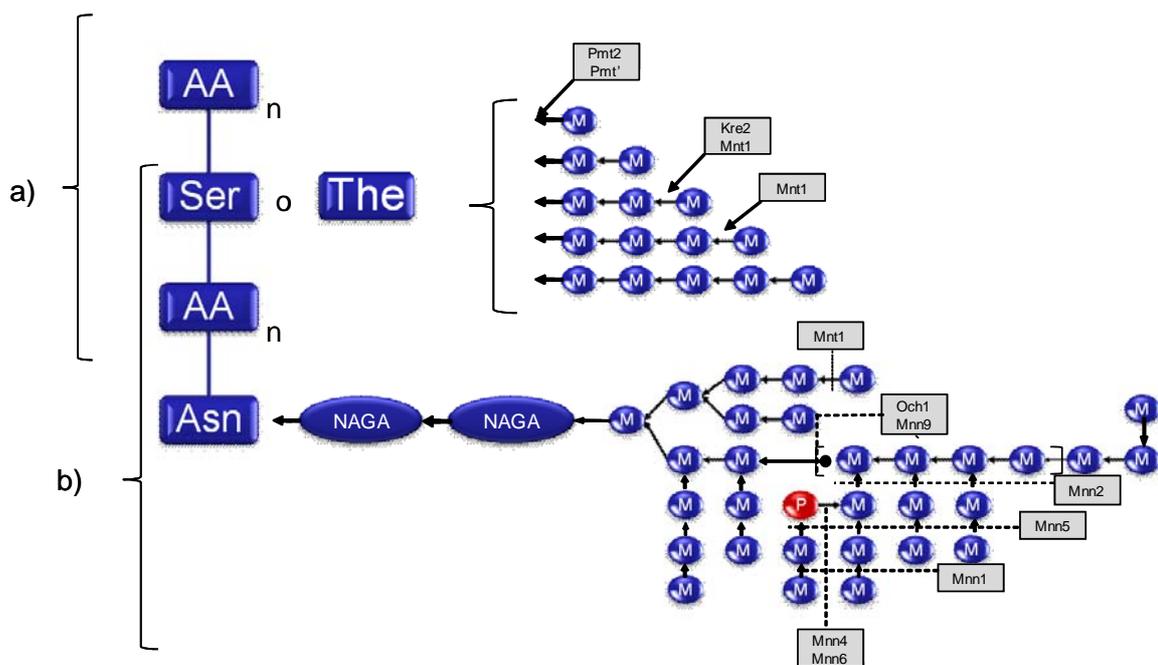
Estas proteínas son altamente modificadas con carbohidratos, y al igual que en otros organismos superiores pueden ejercer diversos papeles biológicos, entre los que se incluyen: protección de la cadena peptídica frente a ataques proteolíticos, facilitar la secreción de determinadas proteínas o su movilización a la superficie celular, inducción y mantenimiento de la conformación proteica en la forma biológicamente activa, desencadenar la respuesta inmune y su importancia como determinantes antigénicos en diferenciación y desarrollo (Lee *et al.*, 1990).

Podemos distinguir tres formas diferentes de glicosilación

i) La glicosilación a través de enlaces N-glicosídicos. Este enlace consiste en la unión de una unidad de quitobiosa a un residuo de asparragina de la proteína, que puede ser prolongada con más de 150 residuos de manosa (Ballou, 1990).

La secuencia proteica consenso para que se den este tipo de enlaces es Asn-Xxx-Thr (Ser). La unidad de quitobiosa se encuentra unida a un núcleo interno que consta de 8 a 15 residuos de manosa que en muchos casos puede ser alargado con una cadena externa altamente ramificada, constituida por hasta 150 residuos de  $\alpha$ -1,6-manosa, de la que derivan ramificaciones más cortas de  $\alpha$ -1,2-manosa que terminan en residuos de  $\alpha$ -1,3-manosa; además, algunos residuos de manosa pueden encontrarse fosforilados a través de enlaces manosilfosfodiéster (Figura I.15.).

La importancia de este tipo de glicosilación para la viabilidad de las levaduras ha sido enfatizada con los mutantes *och*, (Nagasu *et al.*, 1992) y en los mutantes *mnn* (Ballou, 1990) que carecen de las cadenas externas de manano.



**Figura I.15. Modificaciones postraduccionales; a) O-glicosilación y b) N-glicosilación de proteínas de pared celular en *Candida albicans*.** Las proteínas Pmt son las responsables de la adición del primer residuo de manosa; M: manosa, AA: aminoácido, Ser: serina, Thr, treonina, NAGA: N acetilglucosamina, Asn: Asparagina, P: fosfato.

ii) Oligomanósidos unidos por enlaces O-glicosídicos a residuos de serina y/o treonina de la proteína (Ballou, 1982). En este tipo de enlaces no se ha determinado todavía una secuencia consenso como en el caso anterior.

Son cadenas cortas lineales que contienen de una a cinco unidades de  $\alpha$ -manosa, con la siguiente estructura: Man- $\alpha$ 1,3-Man- $\alpha$ 1,3-Man- $\alpha$ 1,2-Man- $\alpha$ 1,2-Man- $\alpha$ -O-Treonina/Serina (Hard *et al.*, 1989; Zueco *et al.*, 1986) figura I.15. Este enlace se caracteriza por ser sensible al tratamiento con un álcali débil ( $\beta$ -eliminación) (Lehle *et al.*, 1991; Sentandreu *et al.*, 1969). En proteínas altamente O-glicosiladas estos enlaces podrían dar una configuración extendida a la proteína.

**iii)** Se ha demostrado la unión del GPI (glicosilfosfatidilinositol) a la región carboxi terminal de algunas proteínas de la pared celular (Lu *et al.*, 1994). Dicha región carboxi debe presentar una región hidrofóbica terminal y tres aminoácidos consecutivos de cadena corta a una distancia de 10-12 aminoácidos, encontrándose el lugar de corte y anclaje de GPI entre el primer y segundo aminoácidos. La composición del GPI, es la siguiente: Man- $\alpha$ 1,2-Man- $\alpha$ 1,6-Man- $\alpha$ 1,4-GlcN- $\alpha$ 1,6-inositol fosfolípido, el cual se une a la proteína a través de un enlace etanolamina-fosfato. Mientras que la parte oligosacáridica se encuentra altamente conservada entre mamíferos y protozoos, la parte lipídica difiere bastante de unas proteínas a otras (Thomas *et al.*, 1990). Este núcleo sacarídico se encuentra ramificado por  $\alpha$ -1,3- y  $\alpha$ -1,2-manosas (Sipos *et al.*, 1995)

En *C. albicans* se ha estudiado el gen *SSR1* que codifica para una glicoproteína unida a la pared celular mediante GPI, ya que la interrupción del gen causa la desaparición de una especie proteica de 70 kDa en el extracto de zimoliasa y su sobreexpresión causa la aparición *de novo* de la proteína en dicho extracto. La falta de Ssr1p no produce grandes alteraciones en la célula (Garcerá *et al.*, 2003; 2005).

Otro ejemplo corresponde a los genes de la familia *ALS*, codifican 8 proteínas, estas glicoproteínas tienen tres dominios característicos: un péptido señal en la región N-terminal; una porción central con repeticiones en tándem de aproximadamente 36 aminoácidos cada una y en el dominio C-terminal, una región rica en serina y treonina con una secuencia de anclaje GPI. (Hoyer *et al.*, 2001; Zhao *et al.*, 2003).

## **I.7. Estrés en levaduras: *C. albicans*.**

Las levaduras han desarrollado un eficaz sistema de protección, que les permite elaborar respuestas rápidas para neutralizar los efectos provocados por el estrés nutritivo o ambiental, junto con una reparación eficaz de los daños causados por el mismo (Estruch, 2000). Se ha propuesto la existencia de una denominada "Respuesta General al Estrés" como mecanismo global que regula la inducción coordinada de genes detoxificantes, portadores de secuencias promotoras conocidas como "elementos de respuesta a estrés" (STRE) (Moradas-Ferreira y Costa, 2000), inducibles por distintos tipos de estímulos metabólicos o ambientales. En los párrafos siguientes, se exponen brevemente algunos de los tipos más habituales de estrés descritos en levaduras.

### **I.7.1. Estrés oxidativo**

En organismos aerobios es constante la exposición tóxica a estrés oxidativo, debido a la formación intracelular de especies reactivas del oxígeno (ROS), dentro de las cuales se incluyen: el anión superóxido ( $\cdot O_2^-$ ), el radical hidroxilo ( $\cdot OH$ ) y el peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ), producidas bien por el propio metabolismo oxidativo o por la adición de agentes externos. El efecto tóxico de ROS resulta esencial para la destrucción de los patógenos intracelulares, ya que daña componentes esenciales de las células como son los ácidos nucleicos, proteínas o lípidos (Estruch, 2000; Storz *et al.*, 1987). Se ha comprobado que las perturbaciones oxidativas causadas por los ROS están asociadas con enfermedades humanas, tales como el Parkinson, la diabetes o la esclerosis múltiple (Berlet y Stadtman, 1997).

En levaduras, la acumulación del disacárido no reductor, trehalosa, es un importante mecanismo defensivo frente a diferentes condiciones de estrés, tales como: exposición a temperaturas elevadas, ausencia de nutrientes, deshidrataciones, exposición a compuestos tóxicos o frente a estrés oxidativo (Argüelles, 2000; Thevelein, 1996). Además, se ha descrito la presencia del factor de transcripción *Cap1* en *C. albicans* regulan los mecanismos defensivos a estrés oxidativo. *Cap1p* pertenece a la familia de los denominados factores con dedos de

zinc y es homólogo del factor Yap1 p previamente estudiado en *S. cerevisiae* (Alarco y Raymond, 1999; Cao *et al.*, 2008).

### **I.7.2. Estrés térmico**

Se entiende como estrés térmico al conjunto de alteraciones y daños fisiológicos que experimentan las células cuando son sometidas a temperaturas superiores al óptimo de crecimiento. Numerosos microorganismos eucariotas y procariontes presentan el mecanismo de "termotolerancia adquirida", fenómeno que consiste en que las células en fase exponencial son capaces de resistir la exposición a altas temperaturas (>50°C) incompatibles con el crecimiento, si previamente se han expuesto a temperaturas permisivas y no letales (como referencia: incubación a 28°C, pretratamiento a 42°C y choque térmico a 52,5°C) (Argüelles, 2000; Thevelein, 1996). La termotolerancia también parece depender de la síntesis masiva de trehalosa (hasta 6 veces sobre los niveles basales). La acumulación de trehalosa tiene lugar paralelamente con la aparición de un grupo de proteínas llamadas "Heat Shock Proteins" (HSPs) (Craig *et al.*, 1993; Hottiger *et al.*, 1989; Piper, 1993). Se ha visto que algunas HSPs funcionan como chaperonas, previniendo la agregación proteica y las alteraciones causadas por el calentamiento excesivo de proteínas y membranas biológicas, restableciendo así la estructura nativa de las proteínas (Singer y Lindquist, 1998).

### **I.7.3. Estrés osmótico**

Las membranas biológicas son más permeables al agua que a otros solutos y eso afecta a la composición y concentración total de solutos internos en las células. El estrés osmótico al que son expuestas las células de fase exponencial, se genera habitualmente adicionando al medio de cultivo NaCl. El ión Na<sup>+</sup> causa toxicidad sódica además de estrés osmótico, por ello el estrés causado por la adición de NaCl se especifica como salino (Hohmann y Mager, 2003). Este tipo de perturbación induce el cese del crecimiento, debido a que provoca la contracción celular y la plasmoptosis (pérdida de turgencia), entendida como la diferencia de

presión entre el exterior e interior osmótico celular, mantenida gracias a la pared celular, siendo ligeramente superior dentro de la célula (Albertyn *et al.*, 1994; Hohmann y Mager, 2003; Mager y Moradas-Ferreira, 1993).

La acumulación de glicerol como soluto compatible es una respuesta esencial al incremento de la osmolaridad externa, que incluye tanto la regulación de su producción como de su flujo (Estruch, 2000), junto con un aumento en la síntesis de transportadores específicos de sal, con el fin de adaptar su fuerza iónica interna a las variaciones de presión osmótica externa (Enjalbert *et al.*, 2003).

#### **I.7.4. Protección frente a estrés**

*C. albicans* ha desarrollado diversas estrategias de protección frente a los diferentes tipos de estrés. Por ejemplo la acumulación diferencial de algunos solutos como la trehalosa que es un disacárido no reductor compuesto por dos moléculas de glucosa ( $\alpha$ -D-glucopiranosil- $\alpha$ -D-glucopiranosido), unidas con enlace  $\alpha$ ,  $\alpha \rightarrow 1:1$  a través de sus carbonos anoméricos, cumple una importante función en la protección de las células frente al daño térmico (Singer y Lindquist, 1998) y al estrés oxidativo (Benaroudj *et al.*, 2001; Estruch, 2000).

Se ha demostrado que la trehalosa, es capaz de proteger y estabilizar la estructura de las enzimas, manteniendo su función, así como la integridad de las membranas biológicas bajo condiciones extremas de perturbación ambiental, del tipo desecación, altas temperaturas, congelación, alta salinidad, oxidación y radiación (Colaço *et al.*, 1992; Crowe *et al.*, 1984; Hottiger *et al.*, 1994; Wiemken, 1990). Las proteínas mantienen un mejor nivel de actividad bajo condiciones de estrés en presencia de trehalosa, debido a que ésta, reemplaza las moléculas de agua y se une a las cabezas polares de los fosfolípidos, formando una especie de cápsula alrededor de la proteína deshidratada, protegiendo su estructura terciaria y su actividad (Crowe, 2007; Lins *et al.*, 2004). La interacción por puentes de hidrógeno entre ambas moléculas es debida a los grupos polares de la proteína y los hidroxilos del azúcar (Elbein *et al.*, 2003). La capacidad del disacárido para proteger a las membranas durante la deshidratación, radica en su interacción física con éstas, favoreciendo la permanencia del estado fluido de los lípidos y

evitando así la fusión, separación de fases y la desintegración de las membranas (Crowe *et al.*, 1984). Parece que la trehalosa retarda la transición del estado líquido a gel mediante el reemplazo de las moléculas de agua, manteniendo las membranas en forma de cristal líquido. (Crowe *et al.*, 2001; Weisburd, 1988).

La síntesis preferencial de este carbohidrato tiene lugar en las siguientes circunstancias:

**a)** En períodos de ausencia de crecimiento, tales como la entrada en fase estacionaria o la brusca eliminación de nutrientes esenciales.

**b)** En estructuras celulares reproductoras o de resistencia (esporas, conidios, esclerocios), donde incrementa la estabilidad celular frente a condiciones ambientales extremas, como altas temperaturas, congelación o desecación (Jorge *et al.*, 1997; Lillie y Pringle, 1980; San Miguel y Argüelles, 1994; Thevelein, 1996). A su vez, la recuperación del crecimiento activo en medio fresco, implica la rápida movilización de la reserva intracelular de trehalosa, que provee la energía necesaria en las etapas iniciales de germinación.

**c)** Si a un cultivo de células en reposo que ha agotado su reserva de fuente de carbono fermentable, se le añade de nuevo glucosa o cualquier otro monosacárido, el contenido de trehalosa endógena es degradado rápidamente. Este fenómeno también ocurre con células que han estado sometidas a estrés y retornan a condiciones fisiológicas normales, la recuperación del crecimiento activo en medio fresco conlleva la inmediata movilización de las reservas intracelulares de trehalosa almacenadas (Argüelles, 2000; Hottiger *et al.*, 1987; Thevelein, 1996; Wiemken, 1990).

## I.8. Objetivos y justificación del trabajo

Dentro del género *Candida*, *C. albicans* es la especie que se encuentra con mayor frecuencia como patógeno humano y por ello es la más estudiada y utilizada como modelo de investigación y correlación con respecto a otras especies; además, la incidencia de infecciones producidas por *Candida* se ha incrementado en los últimos años observándose paralelamente un aumento significativo de la morbilidad y la mortalidad como consecuencia de estas infecciones.

La pared celular fúngica es la estructura más externa de la célula, responsable de su impermeabilidad, rigidez y de su morfología característica. No es una estructura inerte, si no que cumple importantes funciones metabólicas, como la regulación del flujo de sustancias a su través, o la detección primaria de cambios en el medio físico externo. En el caso de las levaduras patógenas oportunistas, cuyo ejemplo más característico es *C. albicans*, la pared participa en el reconocimiento específico y adhesión a los tejidos del hospedador (Marcilla *et al.*, 1998; Ruiz-Herrera, 1992; Ruiz-Herrera *et al.*, 2006).

A fin de desarrollar nuevas dianas para fármacos que produzcan una menor toxicidad para los pacientes dada la ausencia de pared en células animales, las moléculas ubicadas en la superficie externa se han considerado como dianas de gran interés potencial para el desarrollo de nuevos compuestos con actividad antifúngica (Cassone, 2008). En consecuencia, el estudio de proteínas integrales de la pared, tiene importancia tanto desde un punto de vista básico como aplicado. Es por ello que se ha profundizado en el estudio de la pared celular de *C. albicans*, debido a su gran repercusión e importancia clínica.

El objetivo principal de esta tesis es estudiar un gen de *C. albicans* llamado *PGA26*, también conocido como *orf19.2475*, *CA2885* e *IPF 7204*, de función desconocida ya que en trabajos previos realizados por nuestro equipo de investigación, se ha observado que *PGA26* está sobreexpresado en el proceso de regeneración de la pared celular por protoplastos (Castillo, *et al.*, 2006), con lo que, probablemente codifique para una proteína de superficie o pared celular.



## **MATERIALES Y MÉTODOS**



## II. MATERIALES Y MÉTODOS

### II.1 microorganismos y plásmidos empleados

#### II.1.1. Levaduras

Las diferentes cepas de *C. albicans* empleadas en este trabajo, así como sus características y procedencia, se detallan en la tabla II.1.

**Tabla II.1. Cepas de *C. albicans*.**

| Cepa                     | Genotipo  | Parental            | Referencia          |
|--------------------------|---|---------------------|---------------------|
| CAI4                     | $\Delta\text{ura3}::\text{imm434}/\Delta\text{ura3}::\text{imm434}$   | SC5314              | Fonzi e Irwin, 1993 |
| PGA26/ <i>pga26</i>      | $\Delta\text{ura3}::\text{imm434}/\Delta\text{ura3}::\text{imm434}$<br>$\Delta\text{pga26}::\text{hisG}/\text{PGA26}$   | CAI4                | Este trabajo        |
| <i>pga26/pga26</i>       | $\Delta\text{ura3}::\text{imm434}/\Delta\text{ura3}::\text{imm434}$<br>$\Delta\text{pga26}::\text{hisG}/\Delta\text{pga26}::\text{hisG}$  | PGA26/ <i>pga26</i> | Este trabajo        |
| CAI4-URA                 | $\Delta\text{ura3}::\text{imm434}/\Delta\text{ura3}::\text{imm434}$<br><i>rp10::URA3</i>  | CAI4                | Este trabajo        |
| PGA26/ <i>pga26</i> -URA | $\Delta\text{ura3}::\text{imm434}/\Delta\text{ura3}::\text{imm434}$<br>$\Delta\text{pga26}::\text{hisG}/\text{PGA26}$<br><i>rp10::URA3</i>  | PGA26/ <i>pga26</i> | Este trabajo        |
| <i>pga26/pga26</i> -URA  | $\Delta\text{ura3}::\text{imm434}/\Delta\text{ura3}::\text{imm434}$<br>$\Delta\text{pga26}::\text{hisG}/\Delta\text{pga26}::\text{hisG}$<br><i>rp10::URA3</i>                         | <i>pga26/pga26</i>  | Este trabajo        |
| RBI                      | $\Delta\text{pga26}::\text{ura3}/\Delta\text{pga26}::\text{ura3}$<br>$\Delta\text{ura3}::\text{imm434}/\Delta\text{ura3}::\text{imm434}$<br><i>pBI-1::URA3::his1::hisG/his1::hisG</i> | <i>pga26/pga26</i>  | Este trabajo        |
| RBIPGA26                 | $\Delta\text{pga26}::\text{ura3}/\Delta\text{pga26}::\text{ura3}$<br><i>pBI-1::URA3::his1::hisG/his1::hisG</i>  | <i>pga26/pga26</i>  | Este trabajo        |

#### II.1.2. Bacterias

Las características de la cepa de *Escherichia coli* empleada en este trabajo se detalla en la tabla II.2

**Tabla II.2. Cepa de *E. coli* empleada.**

| Cepa         | Genotipo  | Referencia    |
|--------------|---|---------------|
| DH5 $\alpha$ | <i>F, <math>\phi</math>80, lac4M15, recA1, endA1, gyrA96, thi1, (r<sub>K</sub><sup>-</sup>, m<sub>K</sub><sup>-</sup>), supE44, relA1, deoR, <math>\Delta(\text{lacZYA-argF})\text{U169}</math></i> | Hanahan, 1985 |

### II.1.3. Plásmidos

Los plásmidos empleados como herramientas de trabajo y vectores de clonación se detallan en la tabla II.3 y los plásmidos construidos en este trabajo en la tabla II.4.

**Tabla II.3. Plásmidos utilizados.**

| Plásmido    | Características   | Referencia                   |
|-------------|---|------------------------------|
| pGEM-T Easy | Amp <sup>R</sup> , β-galactosidasa  | Promega                      |
| Ptz57R/T    | Clonación de fragmentos de PCR<br>Secuenciación de fragmentos de ADN              | Fermentas                    |
| p5921       | pUC18 con el inserto HisG-URA3-HisG   | Fonzi e Irwin, 1993          |
| pADH        | Promotor de alcohol deshidrogenasa de <i>C. albicans</i> .                        | Bertram <i>et al.</i> , 1996 |
| Clp10-MAL2p | Plásmido con el promotor del gen <i>CaMAL2</i> .<br><i>CaURA3.Amp<sup>R</sup></i> | Backen <i>et al.</i> , 2000  |

**Tabla II.4. Plásmidos construidos**

| Plásmido    | Características   | Referencia   |
|-------------|---|--------------|
| p5921-PGA26 | Plásmido p5921 con el gen URA flanqueado por secuencias de <i>PGA26</i>   | Este trabajo |
| pBI-PGA26   | pBI que contiene la región codificante del gen <i>PGA26</i> para su sobreexpresión en <i>C. albicans</i> bajo el control del promotor del gen <i>PCK1</i> | Este trabajo |
| pTZ-PGA26   | pTZ que contiene la región codificante del gen <i>CaPGA26</i>   | Este trabajo |

## II.2. Medios y condiciones de cultivo

### II.2.1. Cultivo de levaduras

Las cepas de *C. albicans* se mantuvieron mediante resiembras periódicas en agar Sabouraud-dextrosa, YPD y/o medio mínimo SD en placa. Estos dos últimos, tanto en su versión líquida como sólida, se utilizaron para su manejo rutinario en el laboratorio.

El medio YPD es un medio rico que contiene todas las sales minerales y vitaminas necesarias para el crecimiento de levaduras, mientras que el medio mínimo sintético YNB, se utiliza como medio selectivo para el crecimiento de transformantes que hayan incorporado el marcador que complementa la auxotrofia, bien mediante la integración de un plásmido o de un casete. La composición de los medios se detalla a continuación.

#### MEDIO YPD

|                      |          |
|----------------------|----------|
| Peptona              | 2% (p/v) |
| Glucosa              | 2%(p/v)  |
| Extracto de levadura | 1%(p/v)  |

#### MEDIO SD

|  |            |
|--|------------|
| Base nitrogenada de levadura sin aminoácidos,<br>y sin sulfato amónico (DIFCO) | 0,17%(p/v) |
| Sulfato amónico  | 0,5%(p/v)  |
| Glucosa  | 2%(p/v)    |

#### MEDIO SCAA

|  |            |
|--|------------|
| Base nitrogenada de levadura sin aminoácidos,<br>y sin sulfato amónico (DIFCO) | 0,17%(p/v) |
| Sulfato amónico  | 0,5%(p/v)  |
| Casaminoácidos   | 2%(p/v)    |

### **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 <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> | 0,5%( p/v)   |
| MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O            | 0,02%(p/v)   |
| K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (anhidro)       | 0,25%(p/v)   |
| NaCl  | 0,5%(p/v)    |
| Glucosa   | 1,25%(p/v)   |
| Prolina   | 0,05%(p/v)   |
| Biotina   | 0,0001%(p/v) |

El pH final del medio se ajustó con NaOH a un valor de 6,8.

### **MEDIO RPMI-1640 (Sigma):**

Medio de cultivo comercial que se empleó para filamentar, en algunos experimentos, las cepas de *C. albicans* en medio líquido.

Los medios de cultivo se prepararon con agua destilada, y cuando fue necesario, se suplementaron con aminoácidos a las concentraciones adecuadas, partiendo de soluciones originales estériles (Sherman *et al.*, 1986).

Los cultivos en medios líquidos se realizaron en matraces del tipo Erlenmeyer de vidrio con un volumen medio de cultivo no superior a un cuarto del volumen total. La incubación se realizó a 28°C y 120 rpm en un agitador orbital, salvo en los casos en los que se quiso inducir la morfología de micelio, en los que las células fueron incubadas a 37°C.

Como medio empleado para la selección de cepas de *C. albicans* interrumpidas se empleó SD-FOA. La composición de dicho medio se detalla a continuación:

**SD-FOA**

|  |            |
|--|------------|
| Base nitrogenada de levadura sin aminoácidos,<br>y sin sulfato amónico (DIFCO) | 0,17%(p/v) |
| Sulfato-amónico  | 0,5%(p/v)  |
| Glucosa  | 2%(p/v)    |
| Agar   | 2%(p/v)    |
| Ácido 5-Fluororótico   | 0,1%(p/v)  |
| Uridina  | 2%(p/v)    |

En los ensayos de filamentación en medio sólido se emplearon distintos medios: medio Lee, medio Spider (Liu *et al.*, 1994) y medio YE-Pro, la composición de los dos últimos se detalla a continuación:

**MEDIO SPIDER**

|                                 |           |
|---------------------------------|-----------|
| Manitol                         | 1%(p/v)   |
| Caldo nutritivo                 | 1%(p/v)   |
| K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> | 0,2%(p/v) |
| Agar                            | 2%(p/v)   |

**YE-Pro**

|                      |            |
|----------------------|------------|
| Extracto de lavadura | 0,1%(p/v)  |
| Prolina              | 0,01%(p/v) |
| Agar                 | 2%(p/v)    |

**YNB SUERO HUMANO**

|  |            |
|--|------------|
| Base nitrogenada de levadura sin aminoácidos,<br>y sin sulfato amónico (DIFCO) | 0,17%(p/v) |
| Sulfato amónico  | 0,5%(p/v)  |
| Glucosa  | 2%(p/v)    |

Al medio YNB líquido se adicionó suero humano al 10%, previa inactivación del factor complemento 10 minutos a 68°C.

## II.2.2. Cultivo de *Escherichia coli*

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 cultivos de las cepas de *E. coli* se incubaron a 37°C en medio LB (Luria-Bertani), cuya composición fue:

### **MEDIO LB** (Luria Bertani)

|                      |           |
|----------------------|-----------|
| Tripticasa peptona   | 1%(p/v)   |
| Extracto de levadura | 0,5%(p/v) |
| NaCl                 | 1%(p/v)   |

(Se ajustó el pH a 7,4 con una solución de HCl 1M)

Los medios sólidos se obtuvieron mediante la adición de agar al 2%. La selección de transformantes se llevó a cabo en el mismo medio de cultivo adicionando ampicilina a una concentración de 50 µg/ml (LB-Ampicilina).

Los medios de cultivo se prepararon con agua destilada y fueron esterilizados en autoclave.

La incubación se realizó a 37°C y con agitación a 200 rpm.

## II.3. Transformaciones con ADN

### II.3.1. Transformación de bacterias

La transformación de células de *E. coli* se realizó siguiendo el método descrito por Hanahan (1985).

Previamente a la introducción de moléculas de ADN en *E. coli* es necesario hacerlas competentes o adecuadas para la incorporación de ADN foráneo.

### **II.3.1.1. Obtención de células competentes con cloruro de calcio**

Para la obtención de células competentes se inocularon 100 ml de medio LB con 500  $\mu$ l de un cultivo en fase estacionaria, y se incubaron a 37°C hasta alcanzar una densidad óptica a 600<sub>nm</sub> de 0.6, (D.O.<sub>600 nm</sub>=0,6). Las células se recogieron por centrifugación a 6000 **xg** durante 10 min a 4°C, y se resuspendieron en 20 ml de una solución fría de CaCl<sub>2</sub> 100 mM / MnCl<sub>2</sub> 70 mM / acetato sódico 40 mM, pH 5,5, manteniéndose el conjunto a 4°C durante 45 min. Posteriormente, se recogieron por centrifugación a 4°C, se resuspendieron en 5 ml de la solución anterior y se adicionaron 0,94 ml de glicerol estéril al 80% para su conservación en alícuotas de 100 a 500  $\mu$ l a -80°C.

### **II.3.1.2. Transformación de las células competentes**

Para realizar la transformación, las células competentes se descongelaron suavemente, manteniéndose en hielo durante 10 min. Una vez descongeladas, se añadieron 100  $\mu$ l 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 a 37°C, 5 min para *E.coli* DH5 $\alpha$ , e inmediatamente después se pusieron en hielo durante 2 min. Mediante este procedimiento las células competentes internalizan el ADN exógeno. Tras el choque térmico, se adicionaron 0,8 ml de medio LB al tubo, con las células transformadas y la mezcla resultante se incubó a 37°C durante una hora, con objeto de que las células transformadas expresaran el marcador de selección. Tras ese tiempo, las bacterias se recogieron por centrifugación (5.000 **xg**, 5 min) y se resuspendieron en 200  $\mu$ l de LB fresco. La selección de los transformantes se llevó a cabo plaqueando la suspensión bacteriana en medio selectivo adecuado.

Las placas se incubaron a 37°C hasta la aparición de colonias (generalmente 24 h).

## II.4. Transformación de levaduras

### II.4.1. Transformación de *C. albicans*

Para las transformaciones integrativas de *C. albicans* se utilizó el método de Gietz *et al.* (1992).

A partir de un cultivo de YPD crecido durante 16 h a 28°C, un matraz con 50 ml de YPD se inoculó con  $10^6$  células/ml y se incubó a 30°C hasta una concentración de  $1,5 \times 10^7$  células/ml. Las células recogidas por centrifugación, se lavaron con agua destilada estéril, se resuspendieron en 500  $\mu$ l de LiAc 0,1 M/TE (1:1) y se centrifugaron a 2000  $\times g$  durante 5 min para ser resuspendidas finalmente a una concentración de  $2 \times 10^9$  células/ml en LiAc 0,1 M.

A 50  $\mu$ l de la suspensión celular anterior se le añadió 1  $\mu$ g de ADN lineal (5-10  $\mu$ l de una miniprep o extracción de ADN plasmídico) resuspendido en 10  $\mu$ l de tampón TE (Tris-HCl 50 mM / EDTA 1 mM), 10  $\mu$ g de ADN de esperma de salmón desnaturalizado (10 min a 100°C) y 300  $\mu$ l de PEG al 40%. La mezcla se mantuvo 30 min a 30°C y posteriormente 5 min a 42°C. Las células recogidas por centrifugación, se lavaron con TE y se resuspendieron en 200  $\mu$ l de TE para finalmente ser plaqueadas en el medio de selección.

## II.5. Recuentos celulares

El recuento celular a diferentes tiempos de incubación se llevó a cabo mediante el uso de una Hemocitómetro de Neubauer utilizando un microscopio de contraste de fases Olympus BX41. La concentración se calculó como, número de células por mililitro (N) según la ecuación:

$$N = A \times 5 \times 10^4 \times D$$

Donde:            **A** = media de los recuentos efectuados por cuadrícula del hemocitómetro  
                      **D** = factor de dilución correspondiente

## **II.6. Determinación del contenido intracelular de trehalosa**

La determinación de trehalosa endógena se realizó según el protocolo descrito por Blázquez *et al.* (1994). Los extractos se prepararon a partir de muestras de cultivo celular (15 ml) recogidas en fase exponencial o estacionaria de crecimiento, se centrifugaron, se lavaron, y se resuspendieron en 1 ml de agua destilada, pudiendo conservar las muestras a -20°C hasta su análisis. Los tubos se introdujeron en un baño de agua a 95°C, durante 30 min produciéndose la lisis celular y la liberación del contenido interno de trehalosa al sobrenadante. Posteriormente estos tubos fueron centrifugados a 300 rpm durante diez minutos recuperándose el sobrenadante. La mezcla de reacción de 200 µl consiste en: 90 µl de tampón acetato sódico 25 mM pH 5,6, 100 µl de las muestras correspondientes a los extractos libres de células, y 10 µl de trehalasa comercial (Sigma) que hidroliza una molécula de trehalosa a dos moléculas de glucosa a pH 5,6 y 37°C. Paralelamente, se dispuso una mezcla control preparada de igual manera, pero sustituyendo las muestras problema por trehalosa comercial. En los blancos, la trehalasa comercial es reemplazada por agua destilada, debiendo incluirse al menos un blanco y dos medidas de referencia por cada valoración distinta. La incubación se realiza a 37°C durante toda la noche. Este método mide la cantidad de glucosa formada en el extracto, siendo valorada mediante el empleo de una reacción acoplada con glucosa oxidasa-peroxidasa.

## **II.7. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)**

### **II.7.1. 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, GC o CG. La

secuencia de los oligonucleótidos ya diseñados se introdujo en el programa informático OLIGO versión 7 (National Biosciences, Plymouth, MN, USA) para estudiar sus características y confirmar que cumplía con los requisitos citados. En la tabla II.5 se muestran los oligonucleótidos empleados en este trabajo.

**Tabla II.5. Oligonucleótidos empleados en este trabajo:** en negrita y subrayado se muestran los puntos de reconocimiento para las endonucleasas de restricción.

| Oligonucleótidos | Secuencia 3' - 5'                                    | Sitio de restricción diseñado |
|------------------|--|-------------------------------|
| F1-5'            | CACA <u><b>GAGCTC</b></u> GGTCCTCTTATTAATTCAG        | <i>SacI</i>                   |
| F1-3'            | TGTG <u><b>AGATCT</b></u> GTGAGTAGTAACAGTTCC         | <i>BglII</i>                  |
| F2-5'            | CACA <u><b>GTCGAC</b></u> GCTCCTGCCAATGTCACATC       | <i>SalI</i>                   |
| F2-3'            | TGTG <u><b>CTGCAG</b></u> GTCAAAGTGGTTAATCCCTC       | <i>PstI</i>                   |
| hisG2-3'         | GCGCGGCGGTTGAGTAGCTCT                                | -                             |
| Ext-5'           | CACACAATCGTCATTGACATGC                               | -                             |
| Ext-3'           | CACAGTCCTCTCAATGTGC                                  | -                             |
| EFB1-F           | ATTGAACGAATTCCTGGCTGAC                               | -                             |
| EFB1-R           | CATCTTCTTCAACAGCAGCTTG                               | -                             |
| Int-3'           | CAACGACTTCGGTAGTTTCGTAGG                             | -                             |
| Cip10            | GATATCGAATTCACGCGTAG                                 | -                             |
| RP10             | GTACATTCTACTCCGTTCCG                                 | -                             |
| PBI26-5'         | CACA <u><b>AGATCT</b></u> ATGCACTTTTCAAAAATTATTGCTGG | <i>BglII</i>                  |
| PBI26-3'         | CACA <u><b>AGATCT</b></u> TTACATCATGGCAGCAGC         | <i>BglII</i>                  |
| PCKp-stop        | ACCACCATCAAATCCCTTG                                  |                               |

### II.7.2. Condiciones de reacción

Las reacciones de amplificación se realizaron en un termociclador Minicycler™ (MJ Research). Las mezclas de reacción contenían 0,25-2 unidades de ADN polimerasa Taq (GE 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 necesaria para las reacciones oscilaba entre 10-100 ng.

Los programas utilizados constaban de 30-40 ciclos: desnaturalización a 94°C durante 1 min, hibridación durante 1 min y extensión de la cadena a 72°C durante un tiempo en función del tamaño del fragmento a amplificar, generalmente 1 min por cada 1000 pares de bases (pb). La temperatura de hibridación empleada viene especificada en la hoja de síntesis de los oligonucleótidos o bien calcularse mediante la fórmula:

$$T^a_{fusión} = 2x (A/T) + 4x (C/G)$$

Donde:  $T^a_{hibridación} = T^a_{fusión} - 5^{\circ}\text{C}$ .

### II.7.3- transcripción reversa (RT-PCR)

El estudio de nivel de expresión de genes se realizó por RT-PCR semicuantitativa.

La transcripción reversa es una reacción que permite sintetizar ADN complementario (ADNc) a partir de ARN mensajero mediante una enzima ADN-polimerasa ARN-dependiente. Posteriormente el ADNc obtenido, tras la reacción de retrotranscripción se sometió a amplificación por PCR con oligonucleótidos específicos del gen a estudiar, y como control se emplearon cebadores específicos de un gen de expresión constitutiva, el gen *EFB1* (Maneu *et al.*, 1996). Durante la reacción de PCR para sintetizar los fragmentos de ADN se tomaron muestras tras distintos ciclos de amplificación; 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 el apartado II.13. Para la síntesis de la cadena de ADNc, se partió de 5 µg de ARN total y se empleó un Oligo (dT<sub>18 mer</sub>) y la retrotranscriptasa SuperScript First Strand Synthesis System (Invitrogen), según las indicaciones del fabricante. En la reacción de amplificación se utilizó 1 µg de ADNc como molde para la reacción de PCR. Como control se emplearon oligonucleótidos que amplifican el gen *EFB1* (*EFB1F* y *EFB1R*, tabla II.5.), que presenta intrones en su secuencia para detectar contaminaciones con ADN genómico. Las

condiciones de la PCR variaron en función del tamaño del amplificado esperado y de la temperatura de hibridación de los oligonucleótidos utilizados.

### **II.8. Purificación de ADN**

#### **II.8.1. Obtención de ADN plasmídico de *E. coli***

La obtención del ADN de los transformantes que contenían el plásmido deseado se llevó a cabo utilizando los sistemas Flexi Prep (GE Healthcare) o Wizard Minipreps (Promega) siguiendo las instrucciones indicadas por el fabricante.

#### **II.8.2. Obtención de ADN genómico de levaduras**

Para el análisis rápido de transformantes de *C. albicans* y *S. cerevisiae* se utilizó el método de Fujimura y Sakuma (1993). Donde, las células fueron crecidas durante toda la noche a 28°C en 10 ml del medio de cultivo adecuado. Se recogieron por centrifugación, se lavaron con agua destilada estéril y se resuspendieron en 500 µl del tampón de lisis (EDTA 20 mM, Tris HCl 50 mM pH 7,5, SDS 1%). Posteriormente se rompieron adicionando a la suspensión 0,6 g de perlas de vidrio de 0,45 mm de diámetro y sometiénolas a agitación vigorosa en agitador vórtex 5 veces durante 1 min, con intervalos idénticos de reposo a 4°C. Posteriormente se incubaron 10 min a 70°C. A continuación se agitaron rápidamente en vórtex y se adicionaron 200 µl de la solución KAc 5 M, NaCl 5 M. El conjunto se homogeneizó y se mantuvo 20 min en hielo. 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 6000 al 30% en TE y la mezcla se mantuvo en hielo durante 10 min para favorecer la precipitación del ADN genómico. El precipitado se recogió por centrifugación a 10000 xg durante 10 min y se resuspendió en TE. Posteriormente se realizaron dos extracciones con fenol:cloroformo:alcohol

isoamílico (25:24:1) para eliminar las proteínas. El ADN purificado en la fase acuosa, se precipitó con 1/10 volumen de NaAc 3 M y 2,5 volúmenes de etanol absoluto durante 12 h a -20°C. Finalmente se centrifugó, se secó al vacío y se resuspendió en 50 µl de TE o H<sub>2</sub>O.

## II.9. Electroforesis en geles de agarosa

Los fragmentos de ADN obtenidos por digestión con endonucleasas de restricción pueden separarse mediante electroforesis en geles de agarosa ya que debido a su carga negativa, migran hacia el polo positivo. 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 realizó en geles de agarosa SeaKEM LE (FMC Bioproducts) en una concentración variable entre el 0,8 y 1,2%, en función de los fragmentos que se querían separar, en el tampón de electroforesis TAE (Tris-acetato 40 mM, pH 8,3; EDTA 1 mM). La electroforesis se llevó a cabo horizontalmente en una cubeta con el gel sumergido en el tampón correspondiente y a un voltaje constante de entre 60 y 90 V.

Antes de realizar la electroforesis, la muestra a separar se mezcló en una proporción 1:6 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). Paralelamente se corrió una muestra de marcadores de peso molecular obtenidos mediante la digestión del ADN del fago λgt11 con las enzimas de restricción *EcoRI* y *HindIII* o solamente con *EcoRI* (Roche).

Tras la electroforesis el ADN era visualizado, tras una tinción de 10 min en bromuro de etidio (BrEt, 10 µg/ml), en un transiluminador de luz ultravioleta Spectroline (360 nm). Las fotografías de los geles se tomaron con un equipo GelPrinter Plus.

## **II.10. Purificación de fragmentos de ADN**

Las muestras de ADN que contenían los fragmentos a purificar eran separadas en geles de agarosa de bajo punto de fusión (SeaKEM GTG) y utilizando condiciones de electroforesis suaves (voltaje entre 60 y 80 V).

Tras la electroforesis y la identificación de los fragmentos a la luz ultravioleta (en transiluminador), las bandas de interés fueron cortadas del gel lo más rápidamente posible para evitar alteraciones por la luz ultravioleta. Posteriormente se eluyeron utilizando el sistema Agarose Gel ADN Extraction Kit (Roche) o Band Preparation Kit (GE Healthcare) siguiendo las instrucciones del fabricante.

## **II.11. Secuenciación 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 determinó en un secuenciador automático Applied Biosystems modelo 373A en el Servicio Central de Soporte a Investigación Experimental (SCSIC) de la Universitat de València (Dra. Amparo Martínez).

Como cebadores se emplearon oligonucleótidos comerciales y/o específicos, éstos últimos diseñados a partir de las secuencias de los insertos.

## **II.12. Tratamiento enzimático de ADN**

### **II.12.1. Digestión con endonucleasas de restricción**

Las condiciones empleadas para el uso de las enzimas de restricción fueron las recomendadas por la casa comercial suministradora (GE Healthcare).

Para realizar digestiones con varias enzimas que requerían diferentes tampones con distintas concentraciones salinas se utilizó el tampón “One Phor All Buffer PLUS” (GE Healthcare). Si las enzimas necesitaban diferentes

concentraciones de este tampón se adicionó primero la enzima que actuaba con menor fuerza iónica y, una vez concluida esta primera digestión, se adicionó la segunda enzima.

### **II.12.2. Tratamiento 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 proporción molar vector:inserto 1:10. El volumen total de reacción fue 20  $\mu$ l que se completaron con agua estéril y se llevaron a tubos de T4 ADN Ligase Ready to Go™ (GE Healthcare) que incluían liofilizadas las cantidades de tampón, y enzima T4 para la reacción. Las reacciones se incubaron a 16°C durante un mínimo de una hora.

### **II.13. Purificación de ARN de *C. albicans***

La obtención de ARN total de *C. albicans* se obtuvo siguiendo el protocolo recomendado por el fabricante empleando el reactivo Tripure Isolation Reagent (Roche). Las células crecidas en las condiciones adecuadas fueron recogidas por centrifugación durante 10 min a 2000 **xg** y se llevaron a un volumen de 100-200  $\mu$ l de agua adicionada del inhibidor de ARNsas DEPC (dietilpircarbonato). Las células se llevaron a tubos que contenían 500  $\mu$ l de perlas de vidrio estériles de diámetro de 425-600 micras y se agregó 1 ml del reactivo Tripure Isolation Reagent por cada  $5-10 \times 10^6$  células. Las células se rompieron en un agitador Fast-Prep tras 6 agitaciones de 30 segundos con intervalos de 30 segundos en hielo. Una vez rotas las células se incubaron 5 min a temperatura ambiente y se les agregaron 200  $\mu$ l de cloroformo por cada ml de Tripure Isolation Reagent, y se agitaron 15 segundos. Se incubaron 15 min a temperatura ambiente y se centrifugaron a 12000 **xg** 10 min. Se transfirió la fase acuosa a un tubo limpio y se precipitó el ARN adicionando 0,5 ml de isopropanol. Se homogeneizó la mezcla y se mantuvo 10 min a temperatura

ambiente. Luego se recogió el precipitado por centrifugación a 12000 xg durante 10 min a 4°C. Tras eliminar el sobrenadante el pellet se lavó con 1 ml de etanol al 75%, se centrifugó a 4°C a 7500 xg durante 5 min, se eliminó el sobrenadante, y el pellet se secó en bomba de vacío durante 10 min. Posteriormente, el ARN se resuspendió en agua adicionada de DEPC y se cuantificó mediante un espectrofotómetro GeneQuant II (GE Healthcare). Para el estudio de la expresión de genes mediante RT-PCR el ARN se trató con Dnasa I (Roche) según las instrucciones del fabricante.

### II.14. Cuantificación de ADN y ARN

Para el cálculo de la concentración y pureza de las muestras de ADN y ARN se empleó un espectrofotómetro GeneQuant II de GE Healthcare que mide las densidades ópticas a 260 y 280 simultáneamente, y realiza automáticamente el cálculo de la concentración, empleando la fórmula  $A_{260} \times \text{Factor} = \text{concentración}$  ( $\mu\text{g/ml}$ ). 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.

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

### II.15- obtención de fracciones subcelulares

#### II.15.1- 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 o micelio se recogieron por centrifugación (8000 xg, 10 min) y se lavaron dos veces con agua y con PMSF (fluoruro de fenilmetil sulfonilo) 1 mM. A continuación, se

procedió a su rotura balística con perlas de vidrio de 425-600 micras (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 microscopio de contraste de fases Olympus BX41. 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 transparente. De este modo se eliminan restos de proteínas citoplasmáticas y de membranas.

### **II.15.2- Citosol y fracción mixta de membranas**

Tras recoger las paredes del extracto celular mediante centrifugación (apartado anterior), el sobrenadante fue recuperado, ya que contiene el citosol y las membranas celulares. Este sobrenadante fue centrifugado durante 15 min a 100000 xg para separar la fracción citosólica, que queda en el nuevo sobrenadante y una fracción mixta de membranas en el precipitado. Esta última se lavó varias veces con PMSF 1 mM y se resuspendió en PMSF 1 mM. Ambas fracciones se guardaron a -20°C para posteriores análisis.

## **II.16- solubilización de componentes de la pared celular**

### **II.16.1- Tratamiento con dodecil sulfato sódico (SDS)**

Las paredes celulares aisladas (apartado II.15.1.) fueron tratadas con SDS 2% en PMSF 1 mM, a razón de 750 µl por cada 10 mg (peso seco) de paredes, a 100°C durante 10 min (Valentín *et al.*, 1984). Tras enfriar la muestra a temperatura ambiente, el material solubilizado se separó de las paredes celulares insolubles por centrifugación 10 min a 2000 xg. Este tratamiento se

repite 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 1 mM hasta eliminar el detergente.

### **II.16.2- Tratamiento con $\beta$ -mercaptoetanol ( $\beta$ -ME)**

Las paredes celulares aisladas y previamente extraídas con SDS se incubaron en razón de 5 ml/g de paredes húmedas en una solución de  $\beta$ -mercaptoetanol al 2% (v/v) en tampón  $\text{NH}_4\text{Ac}$  10 mM, pH 6,3. El tratamiento se realizó durante 3 h a 30°C en agitación suave. Una vez finalizado el tratamiento, el material solubilizado por el  $\beta$ -ME se separó por centrifugación (10 min a 2000 xg).

Las paredes extraídas se lavaron con PMSF 1 mM para eliminar los restos de  $\beta$ ME.

### **II.16.3- Tratamiento con zimoliasa**

Las paredes aisladas y previamente extraídas con SDS (apartado II.16.1) y  $\beta$ -ME (apartado II.16.2) fueron digeridas en 1 ml/g pared húmeda de solución de zimoliasa 20T (1 mg/ml) en PMSF 1 mM, durante 3 h, a 30°C y con agitación. En ocasiones se añadió al tratamiento 50  $\mu\text{l/g}$  de pared húmeda de una mezcla de inhibidores de proteasas (Roche). La fracción solubilizada se separó por centrifugación a 2000 xg durante 10 min.

### **II.17- 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 (apartado II.16.1).

### **II.17.1- 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.<sub>595nm</sub> 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 acetona a -80°C antes de la cuantificación.

### **II.17.2- Determinación de polisacáridos**

#### **II.17.2.1- Determinación de azúcares no reductores**

Se utilizó la técnica descrita por Dubois *et al.* (1956), que básicamente consiste en: a 2 ml de la solución problema, conteniendo entre 10 y 80 µg de azúcar, se añadieron 50 µl de una solución de fenol al 80% (v/v) y a continuación, se adicionaron rápidamente 5 ml de ácido sulfúrico concentrado 95,5% (v/v). La mezcla se agitaba y se dejaba reposar 30 min a temperatura ambiente. El color desarrollado se determinaba midiendo la D.O.<sub>490nm</sub> y los valores obtenidos se interpolaban en una curva patrón realizada con distintas cantidades conocidas de glucosa (desde 0 a 100 µg de glucosa).

### II.17.2.2- Determinación de $\beta$ -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% (p/v) 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  $\times g$ , 15 min, y de los cuales se tomaron 400  $\mu$ l para valorar los glucanos totales ( $\beta$ -1,6-glucano y  $\beta$ -1,3-glucano), los 600  $\mu$ l restantes se dializaron 48 h frente a agua.

Las concentración de glucano en cada una de las fracciones se determinó por el método de Dubois (apartado anterior). La cantidad de  $\beta$ -1,6-glucano en la muestra corresponde al valor de azúcar después de dializar, mientras que el valor del  $\beta$ -1,3-glucano se calcula restando el valor del  $\beta$ -1,6-glucano al valor correspondiente a los glucanos totales (antes de dializar).

### II.17.2.3- 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% (p/v) 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  $\mu$ l de reactivo de Fehling [Solución de Fehling I: Solución de Fehling II (1:2); siendo solución I, 7% (p/v)  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  y Solución II, 3,4% (p/v) tartrato de sodio y potasio tetrahidrato ( $\text{C}_4\text{H}_4\text{KNaO}_6 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ ) en 10% (p/v) NaOH] durante 45 min a 4°C. El precipitado azul obtenido se disolvió en 500  $\mu$ l de HCl 1 M 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 259  $\times g$ , y se resuspendió en 500  $\mu$ l de HCl 0,5 M y la manosa contenida en la solución se valoró por el método de Dubois (apartado II.17.2.1.)

#### II.17.2.4- Determinación de quitina

Se empleó el método descrito por Kapteyn *et al.* (2000). Las paredes extraídas con SDS (50 mg de peso húmedo) se liofilizaron y posteriormente 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 evaporase 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 Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> / acetilacetona al 4% (p/v), se incubó a 100°C durante 20 min. Posteriormente se le añadieron 700 µl de etanol al 96% (v/v), dejando la reacción 1 h a temperatura ambiente. Por último se le añadió 100 µl de una solución 1:1 de HCl y 2,7% (p/v) de p-dimetilaminobenzaldehído en etanol absoluto. La mezcla se dejó incubar a 70°C hasta que el precipitado formado se hidrolizó completamente.

Se midió la D.O.<sub>520nm</sub>, comparándose los datos obtenidos con una curva patrón, realizada con concentraciones conocidas de N-acetilglucosamina (de 0 a 200 µg).

#### II.18- estudio del transcriptoma mediante micromatrices de ADN

Las micromatrices de *C. albicans* fueron fabricadas por la empresa Eurogentec S.A. (Bélgica) en colaboración con el Consorcio Europeo Galar Fungail ([www.pasteur.fr/recherche/unites/Galar-Fungail/](http://www.pasteur.fr/recherche/unites/Galar-Fungail/)) del que formó parte nuestro grupo de investigación. 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, Canadá).

### II.18.1- Marcaje del ADNc

Para la incorporación de los fluoróforos al ADNc que se iba a formar se utilizaron 15 µg de ARN total a los que se añadió la mezcla de oligonucleótidos: 0,005 pmoles de la mezcla de oligos específicos de *C. albicans*; 0,0025 pmoles de oligo(dT<sub>12-18mer</sub>); 0,5 mM de los nucleótidos dATP, dGTP y dTTP (Sigma); 0,025 mM de dCTP; 0,0375 mM de Cy3- o Cy5-dCTP (GE Healthcare); 1 µl de RNasin (Promega); 10 mM DTT (ditiotreitól), todo en el tampón de reacción First-strand buffer (Invitrogen).

La mezcla de reacción fue desnaturalizada a 65°C durante 5 min e incubada durante el mismo tiempo a 42°C, tras los cuales se añadieron a la mezcla 300 U de la transcriptasa reversa Superscript II (LifeTechnologies/Invitrogen). La reacción de retrotranscripción y marcaje se realizó 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 adicional a 42°C. La reacción se detuvo añadiendo EDTA 5 mM, 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.

### II.18.2- 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 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  $\mu$ l 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:

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

Donde: pmol incorporación Cy3 =  $D.O_{550nm} \times \text{volumen total ADNc } (\mu\text{l}) / 0,15$ ;  
 pmol incorporación Cy5 =  $D.O_{650nm} \times \text{volumen total ADNc } (\mu\text{l}) / 0,25$ ;  
 ng ADNc =  $D.O_{260nm} \times 37 \times \text{volumen ADNc } (\mu\text{l})$ .

Para poder obtener resultados satisfactorios de las micromatrices se necesitaban un mínimo de 20 pmoles de fluoróforo incorporado con una frecuencia de incorporación de 20 a 50 nucleótidos marcados por cada 1000 nucleótidos.

El ADNc marcado recogido se concentró con un filtro Microcon-30 (Amicon) y se centrifugó durante 60 seg. a 10000  $\times g$ . El volumen final se ajustó a 5  $\mu$ l con agua.

### II.18.3- Hibridación de las micromatrices de ADN

Se utilizaron 5  $\mu$ l de cada ADNc a comparar marcados con Cy3 y Cy5 respectivamente, a los que se añadió 5  $\mu$ l de ADN de esperma de salmón (10 mg/ml) previamente desnaturalizado. El conjunto se incubó 2 min a 95°C y se enfrió rápidamente en hielo. A las sondas preparadas se añadieron 35  $\mu$ 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 retiró el cubreobjetos y fue incubado a temperatura ambiente en 0,2 x SSC / 0,1% SDS durante 5 min en agitación, 0,1% SDS durante 5 min y enjuagado con 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, las micromatrices fueron secadas centrifugando a 28 xg en una centrífuga con adaptadores especiales para los portaobjetos.

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

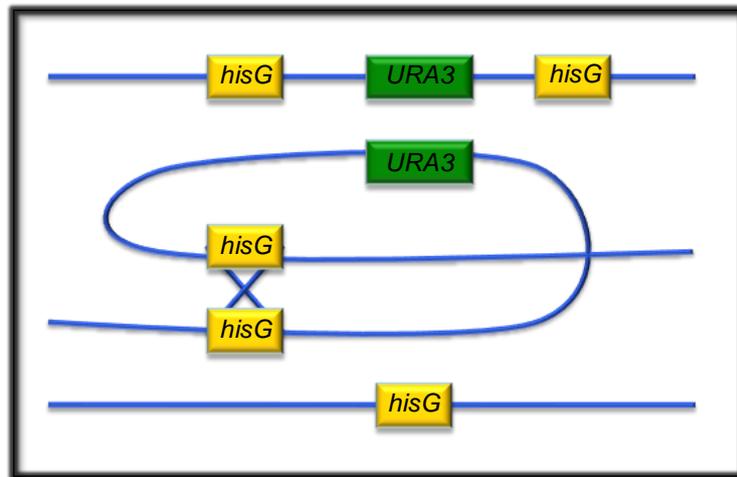
### **II.18.4- Obtención de imágenes y análisis de resultados**

Las micromatrices 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 sobreexpresión o represión de 1,5 veces respecto del control.

### **II.19. Interrupción génica en *C. albicans***

La adaptación de un método de interrupción inicialmente diseñado para *S. cerevisiae* por Alani *et al.* 1987, ha permitido la delección secuencial de genes mediante la utilización de un casete que lleva el gen *URA3* de *C. albicans* flanqueado por dos secuencias *hisG* homólogas de *Salmonella typhimurium* (Fonzi e Irwin, 1993). La importancia de estas secuencias radica en su capacidad para recombinar espontáneamente, lo que permite recuperar el marcador después de cada transformación (Figura II.1). La selección de los recombinantes se realiza en medio con ácido 5-fluoroorótico (placas SD-FOA) que genera un compuesto tóxico en presencia de la orotidina 5-fosfato decarboxilasa codificada por el gen *URA3* de forma que sólo las células que

han perdido el *URA3* son capaces de crecer en este medio. Para llevar a cabo la interrupción, se construye un plásmido que contenga el casete flanqueado por las secuencias adyacentes al gen a deleccionar o interrumpir. Esto es necesario para la integración de la construcción en el *locus* correspondiente.



**Figura II.1. Recombinación intracromosómica** entre las secuencias *hisG* del casete empleado en la interrupción génica de *C. albicans*

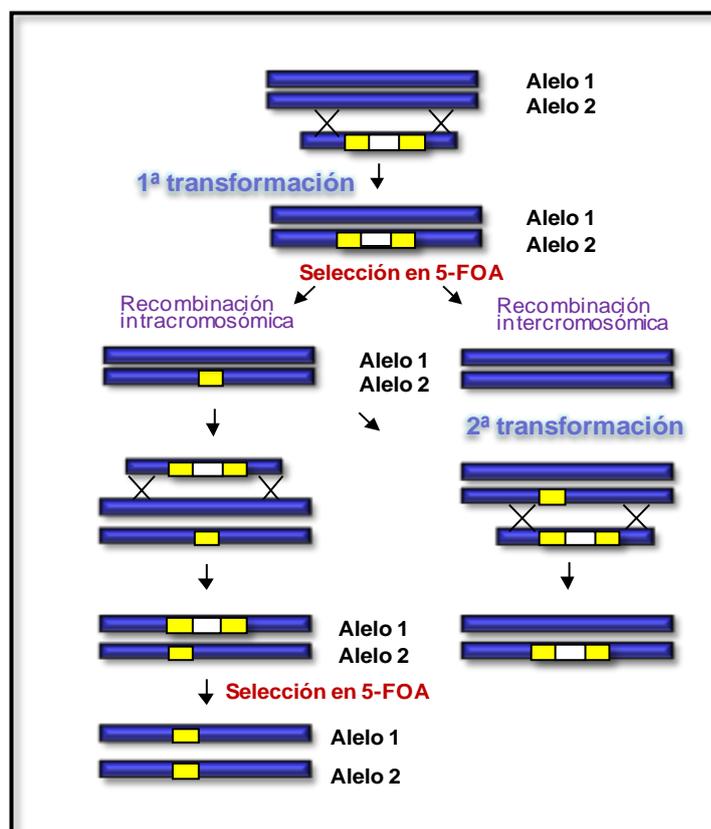
Una vez obtenido el casete de interrupción, éste se digirió con las enzimas de restricción adecuadas (*SacI* y *PstI*) con el fin conseguir un fragmento de ADN lineal para aumentar la eficiencia de la transformación integrativa. Aproximadamente 10 µg de plásmido digerido se utilizaron para transformar la cepa de *C. albicans* CA14 según el protocolo descrito por Gietz *et al.* (1992).

Los transformantes obtenidos de cada una de las interrupciones secuenciales se seleccionaron en medio YNB sin uridina y se analizaron por PCR.

Los transformantes positivos, es decir, los que habían incorporado el casete en el *locus* deseado se sembraron en placas de YPD y posteriormente en placas de SD-FOA. En estas condiciones las cepas que crecen son aquellas que espontáneamente han perdido el gen *URA3*. Se seleccionó una colonia que se volvió a transformar con el fragmento lineal del ADN correspondiente, repitiéndose el proceso hasta la selección de la cepa deleccionada homocigótica.

El proceso completo viene representado en la figura II.2. La dificultad de este método radica en la necesidad de llevarlo a cabo secuencialmente. En la etapa de recuperación del marcador, por el paso por medio con FOA, se pueden producir dos tipos de recombinaciones: intracromosómica, que es la que interesa, ya que se pierde el gen *URA3*, o intercromosómica, entre las regiones homólogas de los dos alelos del gen, con lo que se recupera el genotipo salvaje.

En la etapa de la segunda interrupción, el casete se puede integrar tanto en el segundo alelo, como en el alelo ya interrumpido, dada la homología de las secuencias flanqueantes. Todo ello hace que sea necesario analizar mediante PCR las cepas obtenidas en cada una de las etapas, antes de proceder a la siguiente.



**Figura II.2. Esquema de la interrupción secuencial de los dos alelos de un gen de *C. albicans* mediante el método del "Ura-blaster". En color amarillo se representan las secuencias *hisG* de *S. typhimurium* y en color blanco el gen *URA3*, marcador de selección.**

## **II.20. Análisis de las cepas disruptantes**

Para dilucidar el grado de afectación de la pared celular de las cepas a estudiar, se analizó el efecto de diversas sustancias que afectan la pared celular de *C. albicans* o la síntesis de sus componentes, drogas antifúngicas o antibióticas y diferentes condiciones de estrés. Para esto, a partir de cultivos en fase exponencial en YPD de las distintas cepas a estudiar (CAI4-URA, *PGA26/pga26*-URA, y *pga26/pga26*-URA) y cuya densidad óptica D.O.<sub>600nm</sub> se había ajustado a 1, se hicieron diluciones decimales hasta  $10^{-5}$ , y 5  $\mu$ l de cada dilución se gotearon en placas de YPD, que en los casos en que correspondía contenían concentraciones crecientes de las drogas a analizar. Posteriormente se incubaron durante 72 h a 28°C, y se observó la capacidad de crecimiento de estas cepas bajo las diversas condiciones, utilizándose como control a la cepa parental.

### **II.20.1. Estudio del efecto del calcoflúor 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, las distintas cepas a estudiar, se gotearon en placas que contenían de 60 a 200  $\mu$ g/ml de rojo Congo; de 30 a 100  $\mu$ g/ml de calcoflúor white, y de 0,04 a 0,1% de SDS.

### **II.20.2. Estudio de la sensibilidad a choque térmico**

Se analizó el efecto del choque térmico sobre el crecimiento de las cepas mutantes y se comparó con la cepa parental. Para esto y tal como se describió anteriormente, se hicieron diluciones decimales hasta  $10^{-5}$  y 5  $\mu$ l de cada dilución, se gotearon en placas de YPD. Una vez inoculadas las placas se introducían en una estufa a 55°C para someterlas al choque térmico, y tras períodos de tiempo de 5, 10, 15, 20 y 30 min se pasaban a 28°C y se incubaban durante 2-3 días.

### **II.20.3. Estudio del efecto de un medio hipertónico sobre el crecimiento (choque osmótico)**

Se prepararon placas que contenían concentraciones de 0,8 M, 1 M y 1,3 M de NaCl; 0,1 M, 0,3 M y 0,5 M de LiCl y 0,5 M, 1 M y 1,5 M CaCl<sub>2</sub>; y se sembraron las cepas mediante goteo. Las placas fueron incubadas a 28°C y se estudió la capacidad de crecimiento de las distintas cepas al someterlas al choque osmótico.

### **II.20.4. Estudio del efecto de peróxido de hidrógeno sobre el crecimiento (estrés oxidativo)**

Se analizó el efecto del estrés oxidativo sobre las cepas, para esto se prepararon placas que contenían concentraciones de 4 mM, 6 mM y 8 mM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, procediéndose a continuación como en las pruebas anteriores, se sembraron gotas con las distintas diluciones de las cepas CAI4-URA, *PGA26/pga26-URA*, y *pga26/pga26-URA*.

### **II.20.5. Estudio del efecto de la cafeína**

Se estudió el efecto de la cafeína sobre el crecimiento de las cepas, para lo que se prepararon placas que contenían concentraciones crecientes de cafeína desde 8 mM hasta 20 mM con o sin sorbitol 0,5 M.

### **II.20.6. Estudio del efecto del sorbitol**

Para analizar el efecto del sorbitol sobre las cepas, se prepararon placas que contenían concentraciones de sorbitol desde 1,6 M hasta 2,5 M.

### **II.20.7. Estudio del efecto del etanol**

Se utilizaron placas que contenían concentraciones de etanol de 15% y 20%.

#### **II.20.8. Estudio del efecto del glicerol**

Se prepararon placas de medio YPD con concentraciones de glicerol de 6%, 10% y 15%.

#### **II.20.9. Estudio del efecto de EDTA**

Se prepararon placas con concentraciones de EDTA desde 0,8 mM hasta 1,5 mM.

#### **II.20.10. Estudio de sensibilidad frente a drogas antifúngicas o antibióticas**

Se estudió el efecto de diferentes antifúngicos y antibióticos. Para ello se prepararon placas que contenían: 4 a 6 µg de anfotericina B; 200 y 300 µg de bleomicina; 0,5 y 0,9 mg de quinidina; 1 y 1,5 µg de ketoconazol; 4, 6 y 8 µg de tunicamicina; 6 y 8 µm de cerulenina, 200 y 300 µg de higromicina B.

#### **II.21. Estudio de concentración mínima inhibitoria (CMI) frente a drogas**

Se comparó el comportamiento de la cepa parental y las cepas mutantes en cuanto a la CMI de drogas que afectan diferentes compuestos y procesos celulares, tales como: fluconazol, posaconazol, caspofungina y anfotericina B.

Se utilizó el método de microdilución para levaduras (M27-A) propuesto por el comité norteamericano de estándares en laboratorios clínicos (NCCLS), que básicamente consiste en cuantificar la inhibición de crecimiento producida por el antifúngico comparada con el crecimiento de la levadura en el mismo medio pero sin antifúngico (control), teniendo en cuenta que el medio de cultivo, pH, tampón, inóculo, tiempo y temperatura que deben estar ajustados de manera estricta a lo propuesto por el NCCLS.

El medio de cultivo utilizado fue RPMI 1640 con glutamina y sin bicarbonato (Sigma), tamponado con ácido morfolino propano sulfónico (MOPS) (Sigma) a

pH 7. Se preparó una solución madre de los antifúngicos a utilizar, luego se hicieron diluciones seriadas de estas soluciones en RPMI 1640, que se traspasaron a una placa microtiter estéril de 96 pocillos.

La preparación del inóculo se realizó tocando con el asa de siembra una colonia (de la cepa parental CA14-URA y el mutante nulo *pga26/pga26-URA*) resuspendiéndola en solución salina, luego se ajustó a una  $D.O_{.600nm}=0,5$  con esta dilución, se inocularon las placas con el antifúngico, luego las placas se incubaron a 35°C durante 48 horas

La lectura de las placas se realizó tanto por lectura visual de los resultados en la que la CMI es la concentración más baja de antifúngico que produce una reducción aparente del crecimiento de la levadura ( $\geq 50\%$ ), como por lectura espectrofotométrica a 405 nm (longitud de onda de máxima absorbancia del medio), donde la CMI es la concentración más baja de antifúngico cuya densidad óptica es  $\geq 50\%$  del pocillo control de crecimiento.

### **II.22. 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). Cultivo de las cepas CA14 de *C. albicans* y los mutantes heterocigótico y homocigótico en fase exponencial se centrifugaron y ajustaron a  $D.O_{.600nm}=0,5$  en tampón Tris-HCl 10 mM pH 7,5 conteniendo zimoliasa 20T a una concentración de 100  $\mu\text{g/ml}$ . Las variaciones de  $D.O_{.600nm}$  fueron monitorizadas tomando muestras a distintos tiempos, durante 100 min.

### **II.23. Miceliación en medio sólido.**

Cultivos en medio YNB de las cepas CA14, el mutante heterocigótico y el homocigótico fueron recogidos y su  $D.O_{.600nm}$  ajustándose a 1. Se hicieron

diluciones decimales seriadas y se plaquearon aproximadamente 100 colonias en placas que contenían los medios de inducción de la micelación: Lee, YNB-suero humano, YE-Pro y Spider. Las placas se incubaron 7 días a 37°C.

## **II.24. Inducción de la transición dimórfica.**

El método utilizado para inducir la formación de tubos germinativos fue el descrito por Elorza *et al.* (1985). Inicialmente con el fin de obtener un preinóculo de células levaduriformes, se cultivaron células de *C. albicans* a 28°C en medio de Lee modificado (Elorza *et al.*, 1988).

El crecimiento celular fue valorado a partir de una curva patrón construida con las mediciones de peso seco y de D.O.<sub>600nm</sub>. Las células, una vez crecidas hasta fase estacionaria, se recogieron por centrifugación (2000 xg, 10 min), se lavaron y se resuspendieron en agua destilada estéril a una concentración de 1 mg peso seco/ml. Esta suspensión fue incubada con agitación durante 2h a 28°C, y posteriormente mantenida a 4°C durante 48-72 horas.

Las levaduras sometidas a reposo metabólico fueron inoculadas a D.O.<sub>600</sub>=0,4 en medio de Lee precalentado a 37°C, para inducir la formación de micelio.

### **II.24.1. Inducción de la filamentación con suero humano**

Para inducir la emisión de hifas en *C. albicans*, se empleó el método descrito por Argüelles *et al.* (1999), que consiste en provocar la formación de tubos germinativos mediante la adición de suero humano procedente de muestras clínicas.

Los cultivos iniciales se crecieron en YPD líquido a 28°C y fueron recogidos a una D.O.<sub>600nm</sub>=0,2, se lavaron con agua estéril y se resuspendieron en medio YPD fresco conteniendo 10% de suero humano, previamente descomplementado a 68°C por 10 min y esterilizado por filtración (0,45 µm, Millipore), posteriormente los cultivos fueron incubados a 37°C.

Se tomaron muestras en intervalos de 15, 30, 60, 90 y 120 min y se analizaron en un hemocitómetro Neubauer, utilizando un microscopio de contraste de fases Olympus BX41. El porcentaje de dimorfismo se expresa como la relación entre las levaduras que emiten tubo germinativo respecto al número total de células. Se examinaron al menos 200 células por cada campo.

### **II.25. Formación de biopelículas**

Las cepas a estudiar se sembraron en medio YPD líquido y se incubaron a 37°C durante la noche, al día siguiente se recogieron por centrifugación y se lavaron tres veces con tampón PBS, resuspendiéndose a continuación en medio RPMI suplementado con L-glutamina y tamponado con HEPES (ácido N-2-Hidroxiethylpiperacina-N'-2'-etanesulfónico). Luego se ajustó a  $D.O_{600nm} = 0,1$  y se incubó en una placa de poliestireno de 96 pocillos a 37°C y el porcentaje de adherencia al pocillo se comprobó a diferentes períodos de tiempo (4, 12, 24 y 48 h).

Esto se comprobó primero quitando el medio de cultivo de los pocillos por inversión y secándose en la estufa a 37°C para posteriormente teñir con 100  $\mu$ l Cristal Violeta durante 15 min a 37°C. A continuación se eliminó el colorante lavando cuidadosamente con agua, las células se resuspendieron en etanol absoluto, y se transfirió a una nueva placa de poliestireno para determinar la absorbancia a 570 nm. Al comparar las absorbancias entre las cepas podemos inferir la capacidad de formación de biopelículas de cada una de ellas.

### **II.26. Estudio de virulencia en modelo murino**

Se utilizaron ratones hembra CD Swiss-inmunocompetentes obtenidos en la Universidad de Murcia, España. Respetando las directrices de ética del cuidado de los animales sometidos a experimentación.

Los ratones de 6 a 8 semanas de edad, con un peso aproximado de 20 g fueron inyectados vía intravenosa en la vena lateral de la cola, con las levaduras crecidas en medio de YPD en 28°C.

Las cepas objeto del análisis de infectividad fueron crecidas en medio de YPD a 28°C, recogidas, lavadas dos veces con agua y resuspendidas en buffer salino fisiológico para obtener un inóculo del  $1,5 \times 10^6$  cfu (unidades formadoras de colonias) en un volumen de 150  $\mu$ l. Este inóculo fue inyectado a los ratones, vía intravenosa en la vena lateral de la cola.

Se hicieron cuatro grupos de diez ratones cada uno, a uno de ellos se les inyectó suero salino fisiológico como grupo control, y los otros grupos fueron inyectados con la cepa parental CAI4-URA, el mutante heterocigótico *PGA26/pga26-URA* y el mutante homocigótico *pga26/pgs26-URA* respectivamente, y el porcentaje de supervivencia de los ratones fue supervisado cada día, durante un período de 30 días



**RESULTADOS**



### III.RESULTADOS

#### III.1 selección *in silico* de Pga26, una proteína potencial de pared.

La secuenciación del genoma completo de *C. albicans*, por la Universidad de Stanford <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*.

El análisis *in silico* de la base de datos de *C. albicans*, se realizó mediante el programa PSORT II, desarrollado por Nakai y Horton (1999), con el fin de predecir la localización subcelular.

Las ORFs con una probabilidad mayor del 33% de ser proteínas extracelulares (incluyendo la pared celular), presentan las siguientes características:

1. Presencia de péptido señal en la región N-terminal, que se analizó mediante el programa Signal II P (Nielsen *et al.*, 1997).
2. Sitios putativos de anclaje de glicosilfosfatidilinositol (GPI) en la región C-terminal de la proteína (Hamada *et al.*, 1998).
3. Contenido rico en residuos de serina y treonina.
4. Presencia de sitios putativos de N-glicosilación (N-X-S/T), que se determinaron mediante el programa PROSITE (Gattiker *et al.*, 2002; Sigrist *et al.*, 2002).

Pga26 corresponde a una proteína con un anclaje putativo GPI de función desconocida, también conocido como *orf19.2475*, CA2885 e *IPF 7204*. Estudios previos realizados por nuestro grupo (Castillo, *et al.*, 2006) han demostrado que *PGA26* está sobreexpresada a los 60 min de la regeneración de la pared celular

en protoplastos (tabla III.1). Por esta razón se seleccionó este gen para un estudio más profundo. El análisis *in silico* de la secuencia aminoacídica de Pga26 indicó la presencia de una señal hidrofóbica N-terminal. Esta secuencia, tiene un 10,7% de serina y un 17,6% de treonina, y contiene también dos señales putativas de N-glicosilación y una señal potencial de anclaje GPI (glicosilfosfatidilinositol).

**Tabla III.1. Nivel de expresión *PGA26* en regeneración de la pared celular de protoplastos.**

| Tiempo (min.)      | 0   | 30  | 60  | 120 | 180 | 300 |
|--------------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Nivel de expresión | 1,0 | 1,0 | 2,6 | 0,8 | 0,9 | 0,9 |

### III.2. Análisis de la secuencia aminoacídica de la proteína Pga26

*PGA26* codifica una proteína de 131 aminoácidos, con un peso molecular teórico deducido de su secuencia de 13,5 kDa y un punto isoeléctrico de 4,74. El análisis de la secuencia de aminoácidos de la proteína Pga26 se detalla a continuación y se resume en la figura III.1.

- a) La región N-terminal de la secuencia aminoacídica mostró la presencia de un péptido señal (Von Heijine, 1986), con un punto de corte teórico para la peptidasa señal entre los aminoácidos 18 y 19.
- b) De los 131 aminoácidos correspondientes a la proteína sin el péptido señal, el 28,3% de éstos corresponden a residuos de serina y treonina, localizados en la parte central.
- c) La proteína es también rica en residuos de alanina, y valina (Tabla II.2)

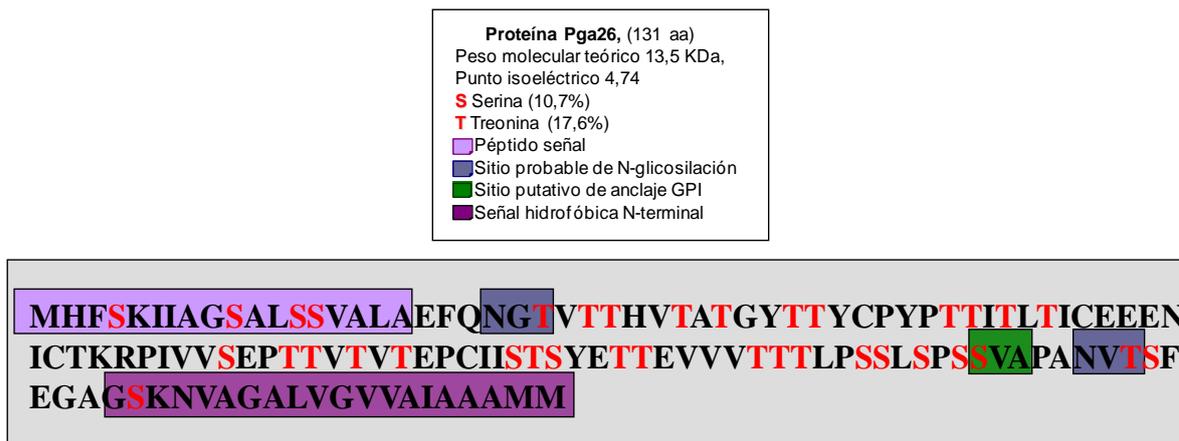


Figura III.1. Análisis *in silico* de la secuencia aminoacídica de la proteína Pga26.

Todas las características descritas para Pga26, son comunes a otras proteínas localizadas en la superficie externa de la célula (Lipke *et al.*, 1989; Roy *et al.*, 1991; Teunissen *et al.*, 1993; Lu *et al.*, 1994; Van der Vaart *et al.*, 1995; Moukadiri *et al.*, 1997), por lo que cabe pensar que Pga26 podría ser una proteína de pared celular.

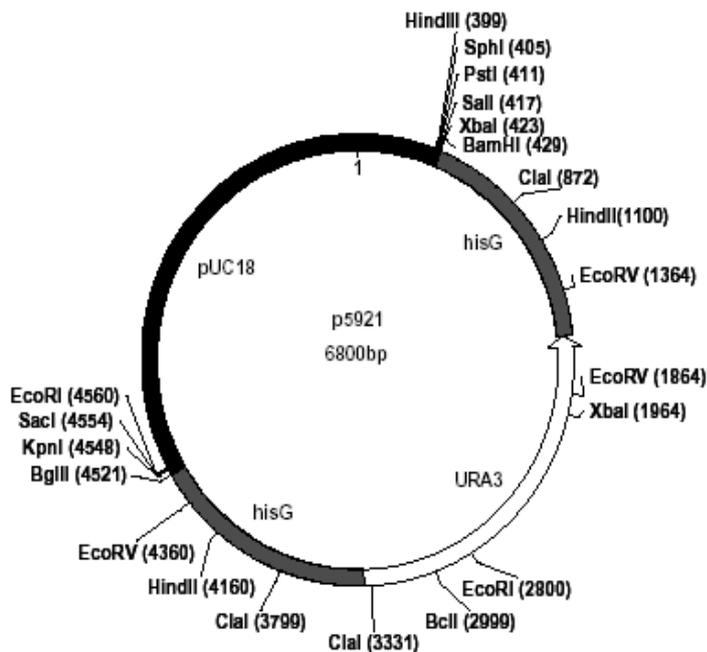
Tabla III.2. Composición aminoacídica de la proteína Pga26.

| aa      | N  | %     |
|---------|----|-------|
| Ala (A) | 14 | 10,7% |
| Arg (R) | 1  | 0,8%  |
| Asn (N) | 4  | 3,1%  |
| Asp (D) | 0  | 0,0%  |
| Cys (C) | 4  | 3,1%  |
| Gln (Q) | 1  | 0,8%  |
| Glu (E) | 9  | 6,9%  |
| Gly (G) | 7  | 5,3%  |
| His (H) | 2  | 1,5%  |
| Ile (I) | 9  | 6,9%  |
| Leu (L) | 6  | 4,6%  |
| Lys (K) | 3  | 2,3%  |
| Met (M) | 3  | 2,3%  |
| Phe (F) | 3  | 2,3%  |
| Pro (P) | 8  | 6,1%  |
| Ser (S) | 14 | 10,7% |
| Thr (T) | 23 | 17,6% |
| Trp (W) | 0  | 0,0%  |
| Tyr (Y) | 4  | 3,1%  |
| Val (V) | 16 | 12,2% |
| Asx (B) | 0  | 0,0%  |
| Glx (Z) | 0  | 0,0%  |
| Xaa (X) | 0  | 0,0%  |

### III.3. Construcción del casete de interrupción para el gen *PGA26*

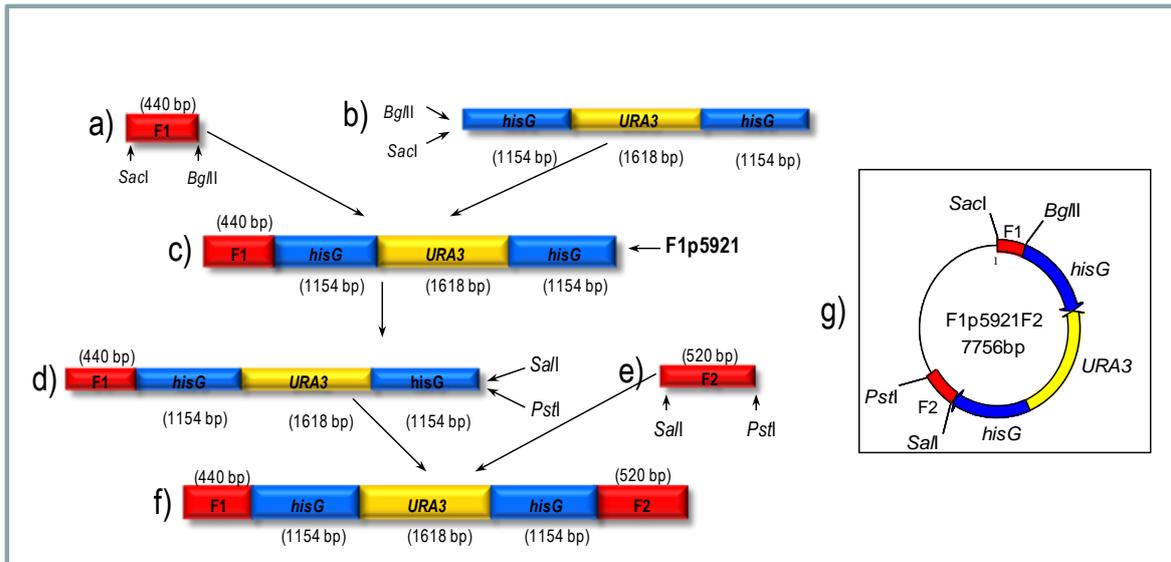
La primera etapa para la interrupción génica fue la construcción de un plásmido en el que el casete *hisG-URA-hisG* estuviera flanqueado por secuencias del gen *PGA26*. Estas secuencias permiten la recombinación con sus homólogas en el genoma de *C. albicans*, quedando el gen *URA3* con las secuencias *hisG* integrado en el locus del gen *PGA26*.

La construcción del casete se hizo en dos pasos. Primero, mediante PCR, usando los oligonucleótidos F1-5' y F1-3' (Tabla.II.5), se obtuvo el amplicón F1 de 440 pb que contenía los puntos de corte para *SacI* y *BglII*. El amplicón F1 se digirió con *SacI* y *BglII* y se subclonó en el plásmido p5921 (Figura III.2) que contiene el casete *hisG::URA3::hisG* (Fonzi y Irwin, 1993).



**Figura III.2. Plásmido p5921** que contiene el casete *hisG::URA3::hisG* (Fonzi y Irwin, 1993), utilizado para la construcción del casete de interrupción de *PGA26*.

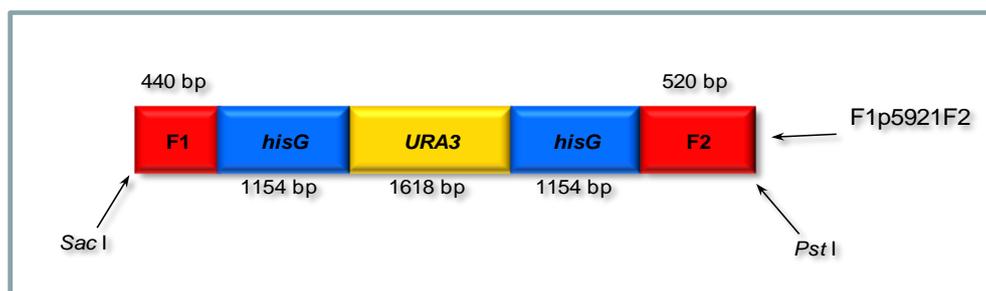
El plásmido resultante se llamó F1p5921 y contiene la región 5' del gen. En el segundo paso se obtuvo el amplicón F2 de 520 pb mediante el empleo de los oligonucleótidos F2-5' y F2-3' (Tabla II.5). El amplicón F2 y el plásmido F1p5921, se digirieron con *SalI* y *PstI* y se ligaron generándose el plásmido F1p5921F2 conteniendo el casete que se emplearía para la interrupción del gen *PGA26* (Figura III.3).



**Figura III.3. Diagrama de la construcción del casete de interrupción para el gen *PGA26*** a) amplicón F1 digerido con las enzimas *SacI* y *BgII*; b) plásmido p5921 digerido con *SacI* y *BgII*; c) plásmido F1p5921; d) F1p5921 digerido con *Sall* y *PstI*; e) amplicón F2 digerido con *Sall* y *PstI*; f) fragmento lineal F1p5921F2; g) Plásmido F1p5921F2.

#### III.4. Obtención del mutante homocigótico para el gen *PGA26*

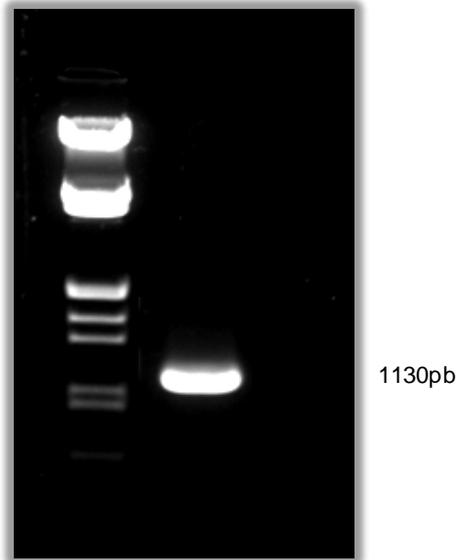
Una vez obtenido el casete de interrupción, se procedió a la transformación de la cepa CA14 de *C. albicans*, mediante el método de acetato de litio, empleando 10  $\mu$ g de ADN del plásmido F1p5921F2 digerido con *SacI* y *PstI*, enzimas que liberan el casete (Figura III.4). La selección de las cepas que habían incorporado el casete se llevó a cabo en medio YNB.



**Figura III.4. Plásmido F1p5921F2, digerido con *SacI* y *PstI*, enzimas que liberan el casete.**

Tras la primera transformación, se analizaron transformantes por PCR de colonias, utilizando los oligonucleótidos Ext-5' y HisG2-3' (Tabla II.5) que está fuera de la secuencia de integración, esperando fragmentos amplificadas de 1130

pb. Lo que indicaba que el casete estaba integrado en el locus *PGA26*. Los 8 transformantes analizados tenían el patrón esperado y se seleccionó uno que se llamó 26-1al (Figura III.5).



**Figura III.5. Análisis de transformantes por PCR** de colonias, utilizando los oligonucleótidos Ext-5' y HisG2-3', transformante 26-1al (1130 pb).

La recombinación espontánea de las secuencias *hisG* homólogas, se indujo con la finalidad de recuperar la auxotrofia para uridina. Para ello la cepa 26-1al se sembró en medio líquido YPD + uridina, incubándose durante 48 h a 28°C. En estas condiciones se produce la recombinación espontánea de las secuencias homólogas, pudiendo ser de dos formas:

- Intracromosómica, entre las secuencias *hisG*, quedando interrumpido el gen.
- Intercromosómica, entre zonas homólogas adyacentes al gen *PGA26*, recuperándose el fenotipo silvestre.

Los recombinantes se seleccionaron en medio YNB con uridina y ácido 5-fluororótico (5-FOA), en este medio sólo crecen las cepas que han perdido el gen *URA3*. Se analizaron varios transformantes de los cuales tres habían recombinado con la secuencia *hisG* produciéndose una recombinación intracromosómica. Se seleccionó un recombinante de los obtenidos, que corresponde al mutante heterocigótico en el gen *PGA26* al que se denominó *PGA26/pga26*.

Para interrumpir el segundo alelo, la cepa *PGA26/pga26* se transformó con el casete de interrupción. Se obtuvieron 12 transformantes, que se analizaron mediante PCR (de ADN genómico). De los 6 transformantes analizados, 2 habían integrado el casete en el alelo silvestre. Posteriormente, se seleccionó uno de los transformantes, al que se le llamo 26-2a. Esta cepa se sembró en medio líquido YPD + uridina, incubándose durante 48 h a 28°C, con la finalidad de inducir la recombinación homóloga y recuperar la auxotrofia para el uracilo. Los recombinantes se seleccionaron en medio YNB con uridina y 5-FOA. Se seleccionaron recombinantes para analizarlos mediante PCR de colonias, tras lo cual, dos de los recombinantes dieron las bandas del tamaño esperado. Se seleccionó uno de los recombinantes, al que se llamó *pga26/pga26* que era el mutante homocigótico en el gen *PGA26*.

En la figura III.6 se puede observar un diagrama explicativo, paso a paso, de la obtención del mutante homocigótico de *PGA26*.

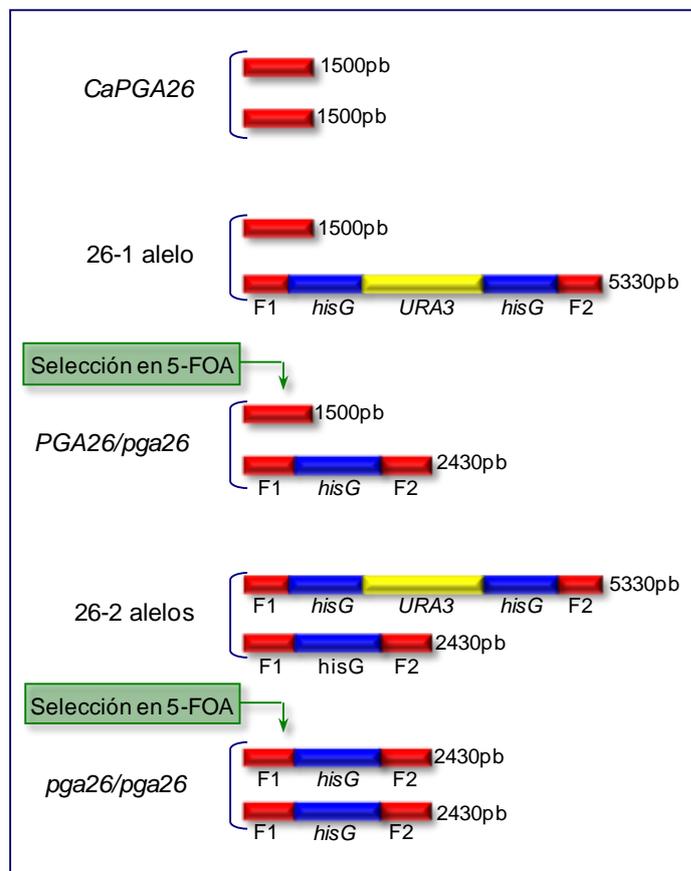
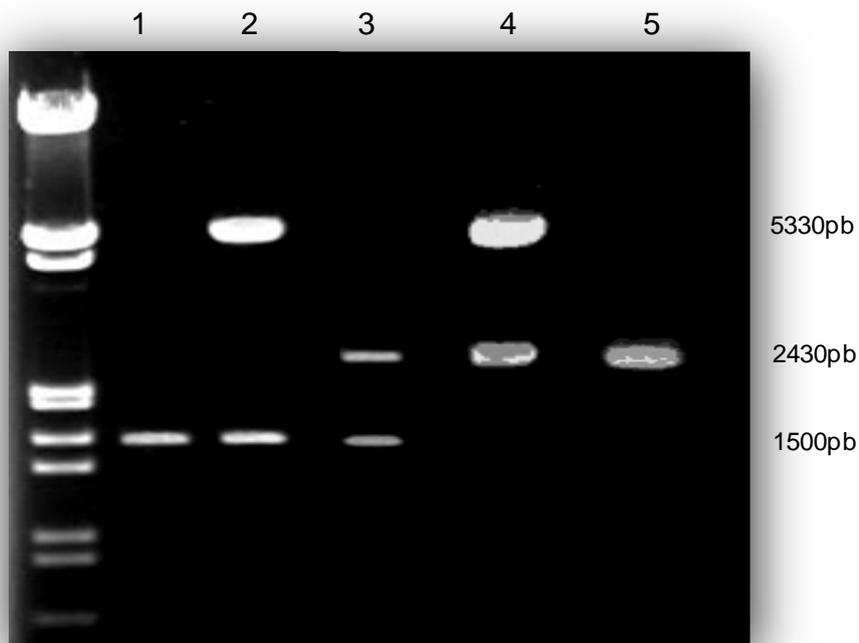


Figura III.6. Diagrama de la obtención del mutante heterocigótico (*PGA26/pgA26*) y del mutante nulo (*pga26/pgA26*) del gen *PGA26* mediante la transformación de la cepa parental CAI4 de *C. albicans*.

Las cepas obtenidas fueron analizadas mediante PCR de ADN genómico utilizándose los oligonucleótidos ext-5' y ext-3' (Tabla II.5). Los tamaños esperados fueron de 1500 pb para la cepa sin interrumpir CAI4 que se usó como control (Figura III.7, calle 1), y para la cepa 26-1al una banda de 5330 pb del alelo que ha integrado el casete de interrupción, y una de 1500 pb para el alelo silvestre (Figura III.7, calle 2). Para el mutante heterocigótico *PGA26/pga26* se esperaban bandas de 2460 pb para el alelo interrumpido que ha perdido el gen URA3 y 1500 pb para el alelo sin interrumpir (Figura III.7, calle 3); a su vez para la cepa 26-2al se esperaba una banda de 2460 pb del alelo ya interrumpido y pasado por FOA así como una banda de 5330 pb para el alelo que ha integrado el casete de interrupción (Figura III.7, calle 4) y finalmente para el mutante homocigótico *pga26/pga26* se esperaba una banda de 2460 pb que corresponde a los dos alelos interrumpidos que han perdido el gen URA3, del gen *PGA26* (Figura III.7, calle 5).

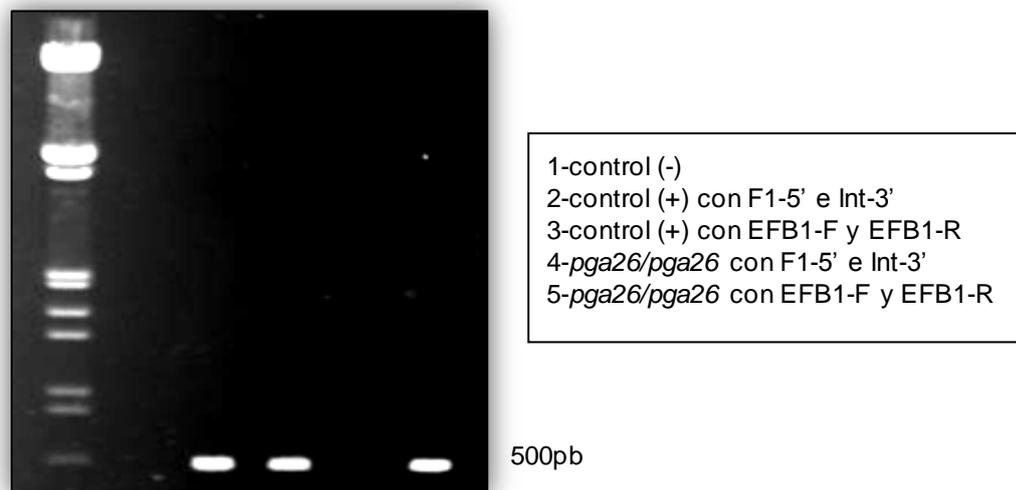


**Figura III.7. Análisis de transformantes por PCR**, con los oligonucleótidos ext-5' y ext-3'; 1 CAI4; 2 26-1al; 3- *PGA26/pgA26*; 4 26- 2al; 5 *pga26/pgA26*, visualizados mediante electroforesis en gel de agarosa.

La interrupción de los dos alelos de *PGA26* se recomprobó mediante RT-PCR. Para ello se obtuvo ARN total de la cepa *pga26/pgA26* crecida a 28°C en YPD

líquido, el ADNc se sintetizó a partir de 6 µg de ARN total obtenido. Una vez sintetizado, el ADNc se cuantificó y 1 µg de ADNc que se empleó como molde para la reacción de PCR. Se utilizaron los oligonucleótidos F1-5' e Int-3'. 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 por tanto, no habría ningún amplificado en la cepa mutante, mientras que en la cepa parental se esperaba un amplificado de aproximadamente 500 pb. Como control se utilizaron oligonucleótidos específicos del gen *EFB1* (EFB1F y EFB1R, tabla II.5), que amplificaban únicamente un fragmento de 500 pb en ausencia de contaminación con ADN genómico. Además, *EFB1* contiene un intrón lo que nos permitiría detectar contaminaciones de ADN genómico en el ARN utilizado, en caso de obtener amplificados.

El resultado mostró que en la cepa mutante *pga26/pga26* no existía ARNm del gen *PGA26*, y por tanto la célula no podría sintetizar la proteína correspondiente (Figura III.8, calle 4) a pesar de que la extracción de ARN total de esta había sido eficiente, ya que sí se encontró ARNm del gen *EFB1* (Figura III.8, calle 5) empleado como control. Con este experimento quedó demostrada la correcta disrupción del gen *PGA26* en el mutante nulo *pga26/pga26*.



**Figura.III.8. RT-PCR de los ADNc de las cepas de *C. albicans*.** Las cepas CA14 (calles 2 y 3) y *pga26/pga26* (calles 4 y 5) se crecieron en YPD a 28°C y se obtuvo ADNc. 1 µg de ADNc se utilizó de molde para la reacción de PCR utilizando los oligonucleótidos del gen *PGA26* F1-5' e Int-3' (calles 2 y 4) y del gen control *EFB1* EFB1-F y EFB1-R (calles 3 y 5) visualizados mediante electroforesis en gel de agarosa.

### **III.5. Reintegración de marcadores para la eliminación de la auxotrofia a uracilo**

Para restablecer la prototrofia por uracilo de las cepas de *C. albicans* utilizadas y eliminar así posibles efectos derivados de estas diferencias genéticas, se utilizó el plásmido Clp10 que contiene un gen *CaURA3* que codifica una proteína de síntesis de uracilo y que puede ser integrado en el *locus* del gen *CaRP10*, este plásmido se introdujo en la cepa parental CAI4 (ura-), mutante heterocigótico *PGA26/pga26* (ura-) y mutante homocigótico *pga26/pga26* (ura-).

Estas cepas se utilizaron para ciertos análisis fenotípicos que requieren la eliminación de auxotrofías. Además las cepas CAI4-URA, *PGA26 / pga26*-URA y *pga26/pga26*-URA son isogénicas para *CaURA3*, minimizando así los efectos que podría tener la localización de este gen en *locus* diferentes

### **III.6. Análisis fenotípico**

Con la finalidad de elucidar la posible función de la proteína Pga26, se llevó a cabo un análisis fenotípico de las cepas mutantes *PGA26/pga26*-URA y *pga26/pga26*-URA bajo distintas condiciones y los resultados se compararon con los de la cepa parental CAI4-URA que sirvió como control.

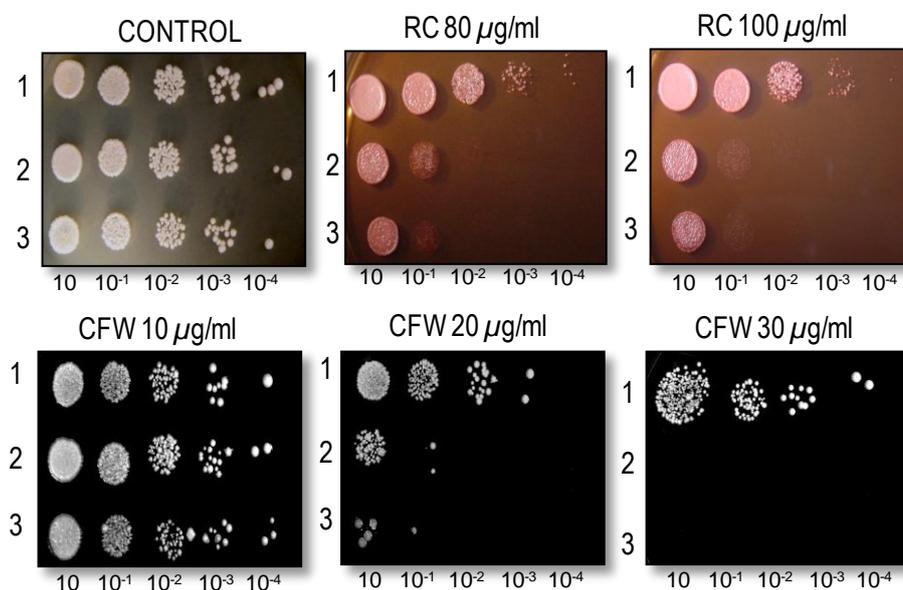
Los estudios realizados con el fin de encontrar diferencias fenotípicas entre las distintas cepas (CAI4-URA, *PGA26/pga26*-URA y *pga26/pga26*-URA), se detallan a continuación:

#### **III.6.1. Estudio de la integridad de la pared celular**

##### **III.6.1.1 Estudio de sensibilidad al rojo Congo y a calcofluor white**

Para estudiar el efecto producido por la interrupción del gen *PGA26* sobre la integridad de la pared celular, se analizó el efecto de sustancias como rojo Congo y calcofluor white que interfieren con la síntesis de la pared distorsionando el ensamblaje de los distintos componentes de la misma. El calcofluor white es una molécula bipolar que se intercala entre las cadenas de quitina de la pared celular

(Murgui *et al.*, 1985). El rojo Congo actúa de una manera similar, interfiriendo principalmente en la formación de las microfibrillas de  $\beta$ -1,3-glucano (Kopecka y Gabriel, 1992). Se realizaron diluciones decimales seriadas hasta  $10^{-4}$  de cada cultivo, depositándose 5  $\mu$ l en medio YPD que contenía calcofluor white a concentraciones de 10, 20 y 30  $\mu$ g/ml y placas a concentraciones de 80 y 100  $\mu$ g/ml de rojo Congo. El crecimiento resultó claramente disminuido en el caso de la cepa mutante *pga26/pga26-URA* y el mutante heterocigótico *PGA26/pga26-URA* en comparación con la cepa parental CAI4-URA, lo que indicaría que la falta de la proteína Pga26 deriva en una alteración de la arquitectura de la pared celular de *C. albicans* (Figura III.9).

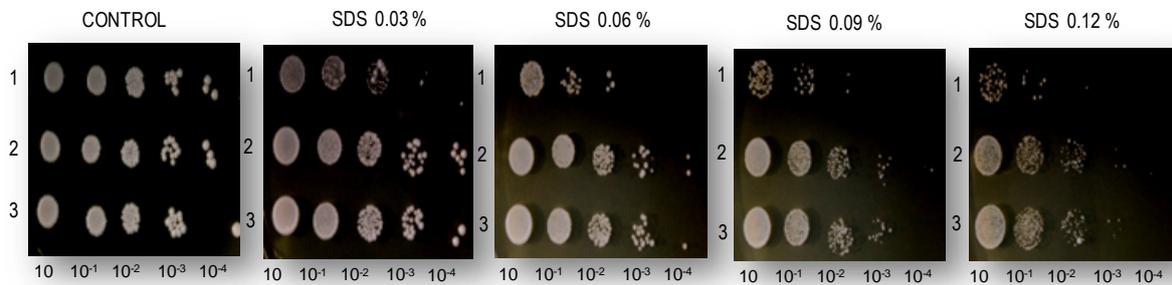


**Figura III.9. Sensibilidad a rojo Congo y calcofluor white.** Cultivos en la fase exponencial crecidos en YPD de las cepas CAI4-URA (1), *PGA26/pga26-URA* (2) y *pga26/pga26-URA* (3), fueron recogidos por centrifugación y ajustados a una  $D.O_{600nm} = 1$ . A continuación se hicieron diluciones decimales seriadas, tomándose 5  $\mu$ l de cada dilución y se sembraron en medio sólido YPD que contenían 80 y 100  $\mu$ g/ml de rojo Congo y 20 y 30  $\mu$ g/ml de calcofluor white.

### III.6.1.2 Estudio de sensibilidad al SDS

El SDS (dodecil sulfato sódico) es un detergente que distorsiona las membranas celulares afectando la estabilidad de las mismas y por lo tanto también la construcción de la pared celular. Se analizó la sensibilidad a SDS para estudiar el efecto producido por la interrupción del gen *PGA26* sobre la integridad de la pared celular. Se sembraron 5  $\mu$ l de cada dilución decimal en medio YPD que contenían

de 0,03 a 0,12% de SDS. Como se observa en la figura III.10, tanto en el mutante heterocigótico como en el mutante nulo de *PGA26*, el crecimiento resultó menos afectado por la presencia de SDS respecto al registrado en la cepa parental.



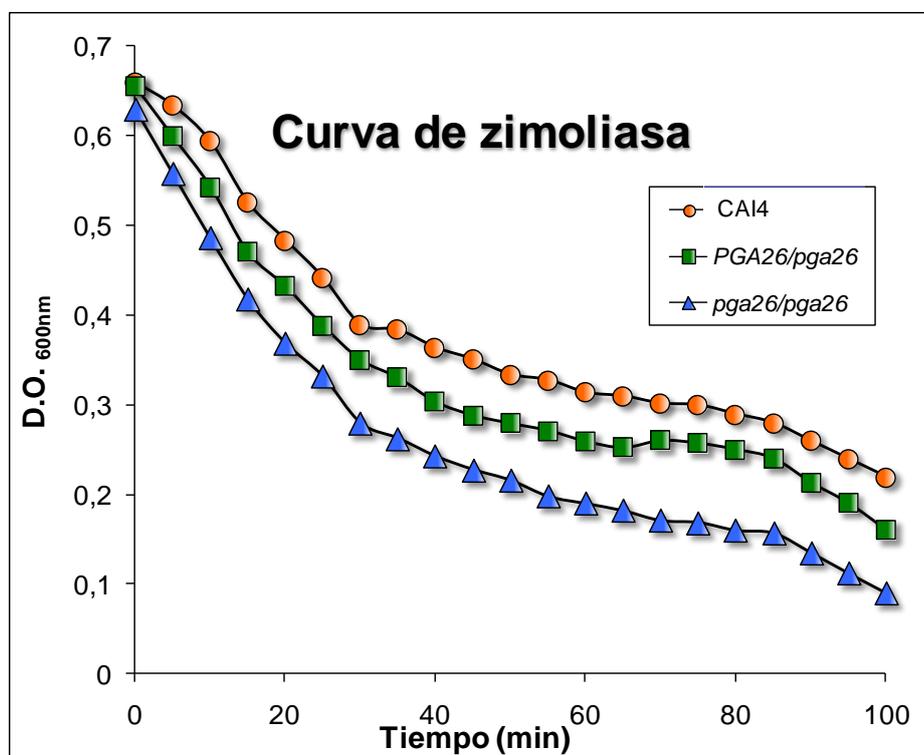
**Figura III.10. Sensibilidad a dodecil sulfato sódico (SDS).** Cultivos en la fase exponencial crecidos en YPD de las cepas CAI4-URA (1), *PGA26/pga26-URA* (2) y *pga26/pga26-URA* (3), fueron recogidos por centrifugación y ajustados a una  $D.O_{600nm} = 1$ . A continuación, se hicieron diluciones decimales seriadas, tomándose 5  $\mu$ l de cada dilución y se sembraron en medio sólido YPD que contenían 0,03-0,06-0,09 y 0,12% de SDS.

### III.6.1.3. Estudio de sensibilidad a zimoliasa

La zimoliasa es un complejo enzimático con actividad principalmente  $\beta$ -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 Vaar *et al.*, 1995). La observación de una menor o mayor accesibilidad de la glucanasa hacia el  $\beta$ -1,3-glucano, o una mayor sensibilidad de éste a la degradación, puede reflejar alteraciones en la estructura y composición de la pared. El ensayo se realizó siguiendo el protocolo descrito por Van der Vaart *et al.* (1995), registrándose las variaciones de densidad óptica durante 100 min. El ensayo se llevo a cabo en cultivos en fase exponencial de la cepa parental CAI4-URA, de la cepa heterocigótica *PGA26/pga26-URA* y de la cepa homocigótica *pga26/pga26-URA*.

Como se muestra en la figura III.11, la densidad óptica de *PGA26/pga26-URA* y *pga26/pga26-URA*, descienden más rápido que la cepa parental y por lo tanto, puede concluirse que en ambas cepas hay una alteración de la pared celular que facilita el acceso de la zimoliasa al  $\beta$ -1,3-glucano. La mayor sensibilidad de la cepa homocigótica frente a la heterocigótica sugiere un efecto dosis-dependiente,

ya que la cepa *PGA26/pga26*-URA queda en una situación intermedia entre el mutante nulo en *PGA26* y la cepa parental *CAI4*-URA.



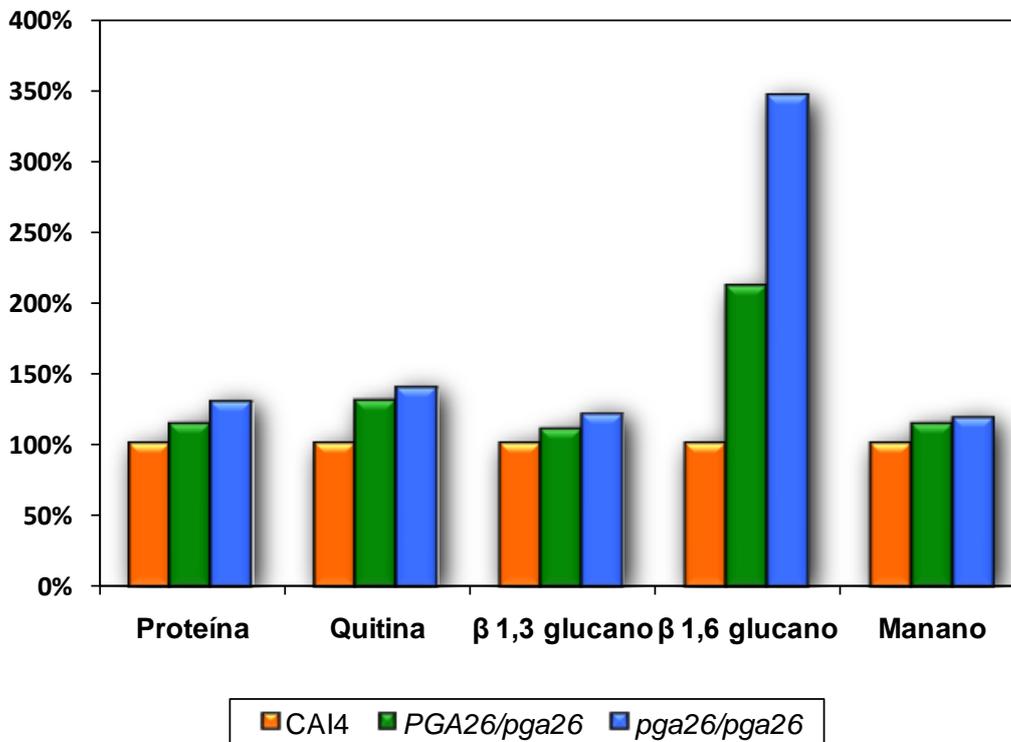
**Figura III.11. Sensibilidad a zimoliasa.** Cultivos en fase exponencial de crecimiento de las cepas *CAI4*-URA, *PGA26/pgA26*-URA y *pga26/pgA26*-URA fueron incubados en presencia de zimoliasa 20T (100  $\mu$ g/ml, en tampón Tris HCl 10 mM pH (7,5) y la variación D.O.<sub>600nm</sub> fue monitorizada durante 100 min.

### III.6.2. Estudio de composición de polímeros de pared

En vista de los resultados obtenidos en cuanto a la integridad de la pared celular, que indican una posible alteración en la estructura de la misma, y con el propósito de comprobar si existían diferencias apreciables en la composición de los polisacáridos y proteínas que conforman la arquitectura global de la pared entre de la cepa parental, el mutante heterocigótico y el mutante nulo en el gen *PGA26* (se utilizaron las cepas URA+), se procedió a llevar a cabo un análisis cuantitativo de la composición química de las paredes de estas cepas.

Se pudo observar que tanto el mutante heterocigótico como el mutante nulo presentaban una cantidad ligeramente mayor de proteína, quitina,  $\beta$ -1,3-glucano y

manano que la cepa parental, pero lo más significativo fue que el mutante nulo en *PGA26* contenía tres veces más  $\beta$ -1,6-glucano que la cepa parental CAI4 (Figura III.12).



**Figura III.12** Análisis de la composición de polímeros de la pared celular de las cepas; parental (CAI4-URA), mutante heterocigótica (*PGA26/pga26-URA*) y mutante homocigótica (*pga26/pgs26-URA*).

### III.6.3. Estudio del efecto de cafeína, sorbitol, etanol, glicerol y EDTA.

La cafeína es un inhibidor de la fosfodiesterasa que hidroliza el AMPc que actúa como segundo mensajero (Pearson *et al.*, 1988). En consecuencia, su adición aumenta los niveles intracelulares de AMP cíclico y activa la ruta de señalización PKA de proteína-quinasa dependiente de éste. Tanto el sorbitol, etanol y el glicerol o glicerina son azúcares alcoholes que pueden afectar la integridad de la pared celular al causar choque osmótico. El ácido etilendiaminotetraacético, o EDTA, es una sustancia utilizada como agente quelante que puede afectar la estructura de la pared celular.

En ninguno de los ensayos realizados en presencia de estos compuestos, se obtuvieron diferencias significativas en cuanto al crecimiento de los mutantes heterocigótico (*PGA26/pga26-URA*) y mutante nulo (*pga26/pga26-URA*) con respecto a la cepa parental CAI4-URA.

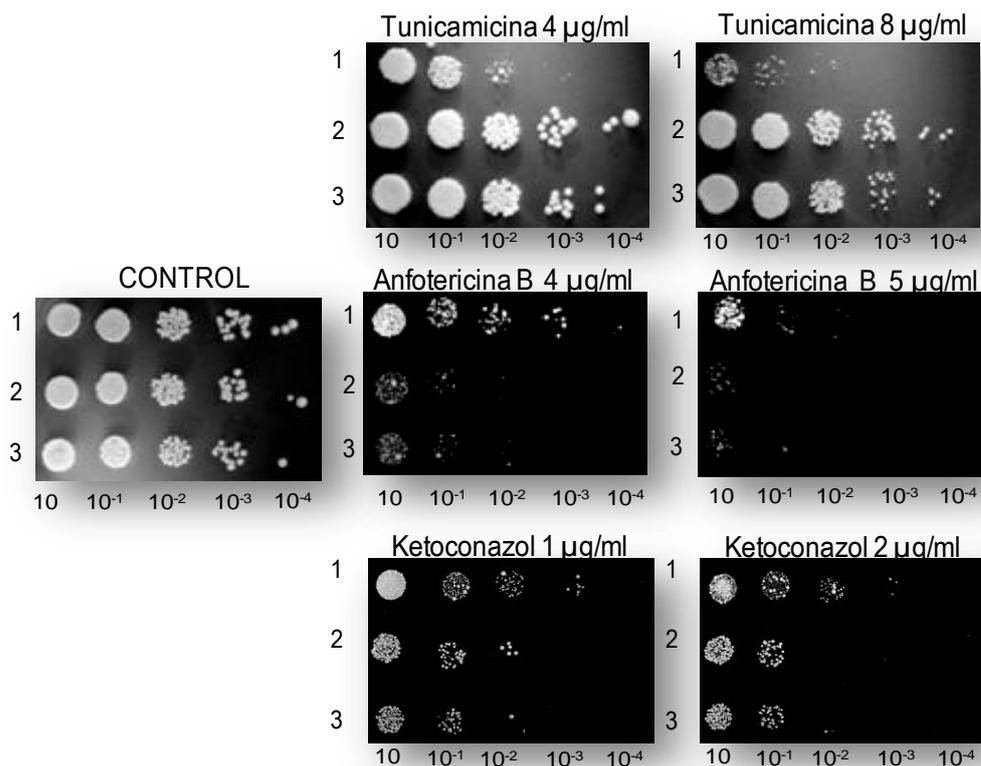
### III.7. Estudio de sensibilidad frente a drogas

Para dilucidar el grado de alteración en la estructura de la pared celular debido a la falta de la proteína Pga26, se comparó el comportamiento de la cepa parental y las mutantes en presencia de drogas que afectan diferentes compuestos y procesos celulares. Para ello se hicieron diluciones decimales hasta  $10^{-5}$  de las cepas mutantes y la cepa parental (las cepas URA+), tal y como se describió anteriormente (apartado III.6.1.1) y se dispensaron en gotas sobre placas que contenían:

- **Anfotericina B.** Es un antibiótico macrólido poliénico que actúa formando poros hidrofílicos en la membrana plasmática. La anfotericina B se une a los esteroides de las membranas celulares tanto de las células fúngicas como células de mamífero, deteriorando la integridad de las mismas. Esto se traduce en una pérdida de potasio y otros contenidos celulares. La mayor afinidad de la anfotericina B hacia el ergosterol, un esteroide encontrado primordialmente en las membranas de los hongos, es la clave de su acción antifúngica. Sin embargo, como el fármaco se une también al colesterol (esteroide preferente de las membranas de células humanas) la anfotericina B presenta algunos efectos tóxicos, en particular a nivel renal.
- **Bleomicina.** Un antibiótico antineoplásico que 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.
- **Quinidina.** Sustancia que bloquea los canales para iones  $Na^+$  y  $K^+$ .
- **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.

- **Tunicamicina.** Inhibe la N-glicosilación.
- **Cerulenina** Antibiótico inhibidor de la síntesis de ácidos grasos.
- **Higromicina B.** Antibiótico que bloquea la síntesis polipeptídica e inhibe la elongación.

Posteriormente las placas se incubaron durante 72 h a 28°C y se estudió la capacidad de crecimiento de cada cepa. No se observaron diferencias significativas de sensibilidad de los distintos mutantes a la acción de bleomicina, quinidina, cerulenina e higromicina B. En el caso de tunicamicina, las cepas *PGA26/pgs26-URA* y *pga26/pgs26-URA* resultaron tener una mayor resistencia a la droga en comparación con la cepa parental (CAI4-URA). En cuanto a anfotericina B y ketoconazol, el mutante heterocigótico y el mutante nulo de *PGA26* presentaron una mayor sensibilidad a estas drogas que la cepa parental reflejado en un menor crecimiento. (Figura III.13)



**Figura III.13. Sensibilidad a tunicamicina, anfotericina B y ketoconazol.** Cultivos en fase exponencial crecidos en YPD de las cepas CAI4-URA (1), *PGA26/pgs26-URA* (2) y *pga26/pgs26-URA* (3), fueron concentrados a una D.O.<sub>600nm</sub> = 1, se hicieron diluciones decimales seriadas, tomándose 5 µl de cada dilución y se depositaron en medio sólido YPD que contenían 4 y 8 µg/ml de tunicamicina, 4 y 5 µg/ml de anfotericina B y 1 y 2 µg/ml de ketoconazol.

### II.7.1. Estudio de concentración mínima inhibitoria (CMI) frente a drogas

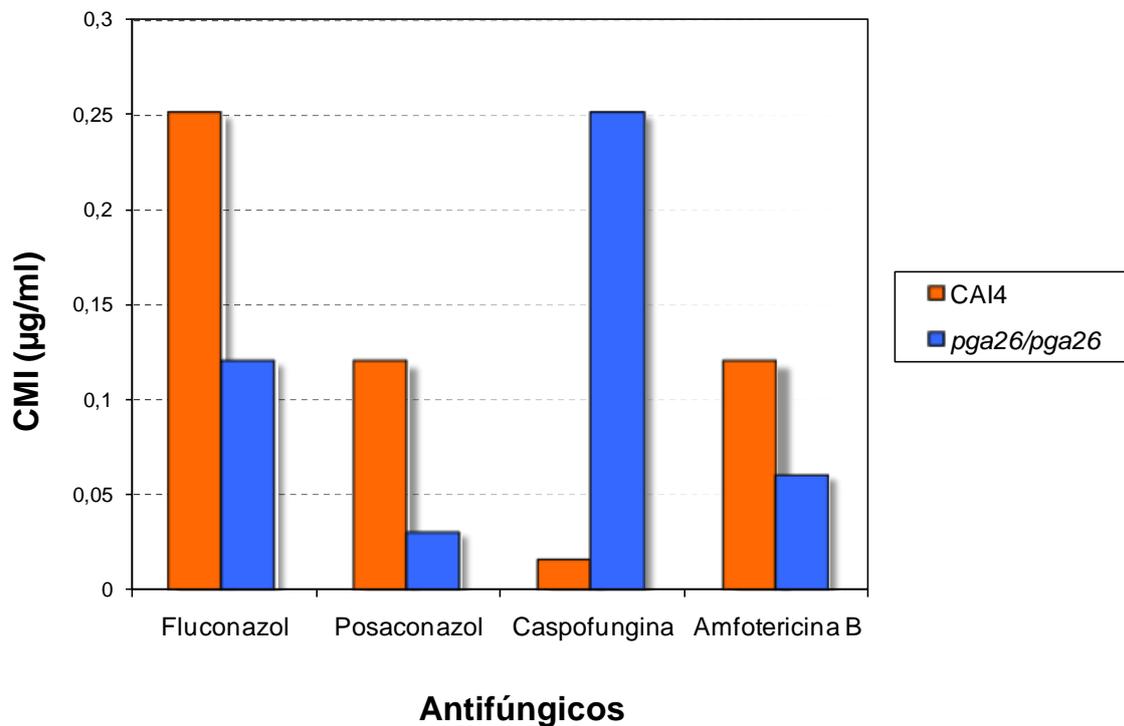
Los experimentos realizados sugieren la alteración de la pared celular debido a la ausencia de la proteína Pga26 funcional en *C. albicans*, por tanto, se comparó el comportamiento en cuanto a su CMI, de la cepa parental y las cepas mutantes para ello se utilizaron las cepas URA+ de drogas que afectan diferentes procesos celulares, tales como:

- **Fluconazol**, Es un antibiótico antifúngico perteneciente al grupo de los triazoles que inhibe el citocromo P450 fúngico, cofactor de la enzima lanosterol de la enzima 14 $\alpha$ -demetilasa. Esta inhibición previene la conversión de lanosterol a ergosterol, componente esencial de la membrana citoplasmática.
- **Posaconazol**, Es un fármaco antifúngico derivado del núcleo triazólico, y al igual que fluconazol, itraconazol o voriconazol, inhibe la síntesis del ergosterol fúngico actuando sobre la CYP51 (dificulta la 14-desmetilación), lo que lleva a una disminución del contenido de ergosterol en la membrana plasmática y, de forma secundaria, a un acumulo de esteroides anómalos (esteroides 14- $\alpha$ -metilados).
- **Caspofungina**, es una equinocandina cuyo mecanismo de acción consiste en la inhibición de la 1,3- $\beta$ -glucanosintetasa, enzima responsable de formar polímeros de glucano, esenciales para la estructura de la pared fúngica, esta inhibición lleva consigo una disminución de la síntesis del glucano, permitiendo que la célula fúngica entre en fase de inestabilidad osmótica y posterior muerte.
- **Anfotericina B**, (descrito en el apartado anterior).

Se observó que tanto en el caso de fluconazol como con el posaconazol y anfotericina la CMI de la cepa parental fue siempre más alta, por lo tanto, se puede señalar que el mutante nulo en el gen *PGA26* sería más sensible que la cepa parental a esas drogas, resultado que concuerda con el obtenido anteriormente para el caso de anfotericina (apartado III.7).

En el caso de caspofungina se observó el efecto contrario; necesitándose una mayor concentración de caspofungina para inhibir el crecimiento del mutante nulo en comparación con la cepa parental, en que la CMI es mucho más baja, por

tanto, se podría concluir que el mutante nulo es más resistente que la cepa parental a la acción de caspofungina (Figura III.14).

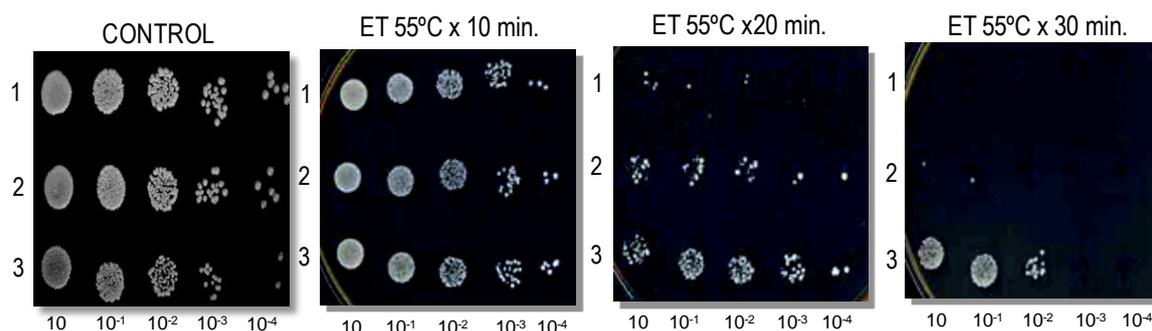


**Figura III.14. Concentración mínima inhibitoria (CMI) a fluconazol, posaconazol, caspofungina y anfotericina de las cepas parental (CAI4-URA), y el mutante nulo (*pga26/pgs26*-URA).**

### III.8. Estudio de la respuesta a estrés

#### III.8.1. Estudio de la sensibilidad a choque térmico

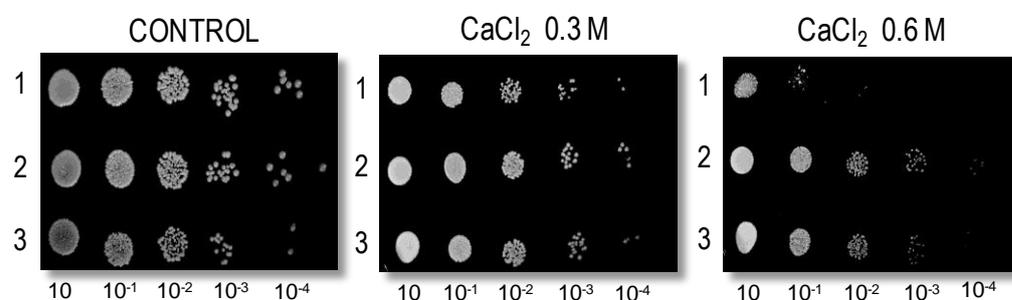
Con el fin de estudiar la integridad celular, se comparó la cepa parental URA+ y los respectivos mutantes *PGA26/pgs26*-URA y *pga26/pgs26*-URA. Para ello se sometieron cultivos en fase exponencial de crecimiento de las tres cepas, a un choque térmico de 55°C. Se tomaron muestras a distintos intervalos de tiempo: 5, 10, 15, 20 y 30 min, los cultivos se transfirieron de nuevo a 28°C, incubándose durante 2-3 días. Como puede observarse en la figura III.15, la ausencia de Pga26 confiere a las células mayor resistencia al choque térmico, ya que el crecimiento resultó menos afectado en el caso de las cepas heterocigótica y homocigótica, portadoras del marcador respecto a la cepa parental CAI4-URA.



**Figura III.15. Sensibilidad a choque térmico (55°C) a diferentes períodos de tiempo.** Cultivos en fase exponencial crecidos en YPD de las cepas CAI4-URA (1), *PGA26/pga26*-URA (2) y *pga26/pga26*-URA (3), fueron concentrados a una  $D.O._{600nm} = 1$ , se hicieron diluciones decimales seriadas, tomándose 5  $\mu$ l de cada dilución y se depositaron en medio sólido YPD, posteriormente se incubaron a 28°C 72 horas.

### III.8.2 Estudio de Sensibilidad a Choque Osmótico

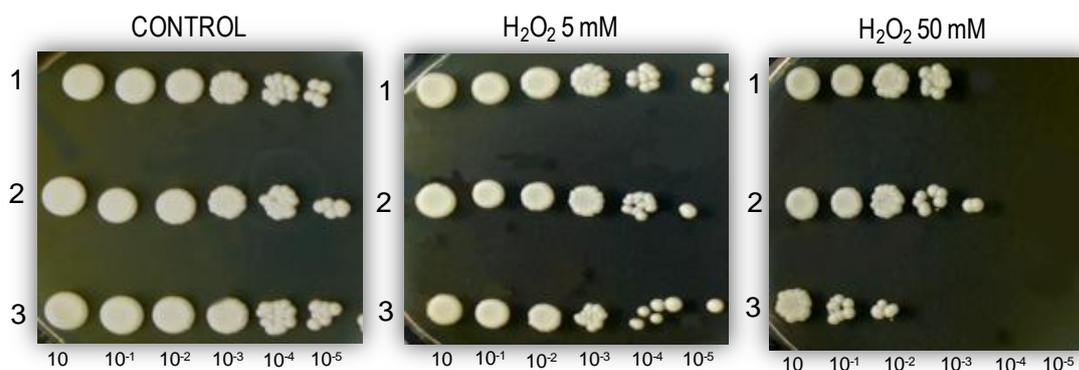
Los mutantes afectados en la pared, con frecuencia tienen una mayor sensibilidad a variaciones en la concentración osmótica exterior, pudiendo quedar seriamente dañada la integridad celular. Para analizar el comportamiento de las cepas mutantes frente al choque osmótico, se depositaron 5  $\mu$ l de cada dilución decimal de las cepas parental CAI4-URA, *PGA26/pga26*-URA y *pga26/pga26*-URA en medio hipertónico YPD conteniendo concentraciones de 0,8 M, 1 M y 1,2 M de NaCl; 0,1 M, 0,3 M y 0,5 M de LiCl; y 0,3 M y 0,6 M  $CaCl_2$ . En el caso de NaCl y LiCl, no se observaron diferencias, mientras que cuando se sometió a choque osmótico con  $CaCl_2$  resultaron más resistentes las cepas *PGA26/pga26*-URA y *pga26/pga26*-URA en comparación con la cepa parental CAI4-URA (Figura III.16).



**Figura III.16. Sensibilidad a choque osmótico.** Cultivos en fase exponencial crecidos en YPD de las cepas CAI4 (1), *PGA26/pga26* (2) y *pga26/pga26* (3), fueron concentrados a una  $D.O._{600nm} = 1$ , se hicieron diluciones decimales seriadas, tomándose 5  $\mu$ l de cada dilución y se depositaron en medio sólido YPD que contenía 0,3 y 0,6 M de  $CaCl_2$ .

### III.8.3. Estudio del efecto del estrés oxidativo sobre el crecimiento

Se estudió el efecto del estrés oxidativo exógeno ( $H_2O_2$ ) sobre las cepas *PGA26/pga26-URA* y *pga26/pga26-URA* respecto a la cepa parental CAI4-URA, mediante el análisis de la viabilidad celular en presencia de peróxido de hidrógeno debido a que mutantes afectados en la pared celular, con frecuencia, tienen una mayor sensibilidad a las situaciones de estrés. Para ello se prepararon placas de YPD conteniendo concentraciones de 5 mM y 50 mM de  $H_2O_2$ , y se inocularon con alícuotas de diluciones de cada una de las cepas. Las placas fueron incubadas a 28°C y se estudió la capacidad de crecimiento. Se observó que la cepa *pga26/pga26-URA* es más sensible al peróxido de hidrógeno de con respecto a la cepa parental CAI4-URA (Figura III.17).



**Figura III.17. Sensibilidad a estrés oxidativo.** Cultivos en fase exponencial crecidos en YPD de las cepas CAI4 (1), *PGA26/pg a26* (2) y *pga26/pg a26* (3), fueron concentrados a una  $D.O_{600nm}=1$ , se hicieron diluciones decimales seriadas, tomándose 5  $\mu$ l de cada dilución y se depositaron en medio sólido YPD que contenían 5 mM y 50 mM de  $H_2O_2$

### III.8.4. Contenido intracelular de trehalosa en respuesta a estrés oxidativo, térmico y salino

Debido a que la trehalosa tiene un papel protector de la integridad celular frente a estrés, en este experimento se valoró el nivel de síntesis intracelular de trehalosa. Cuando las cepas objeto de estudio fueron sometidas a condiciones de estrés como son: choque térmico (42°C), estrés oxidativo ( $H_2O_2$  a 5 y 50 mM) y estrés osmótico (1,2 M NaCl). Como se puede observar en la tabla III.3, cuando se compara el contenido endógeno de trehalosa obtenido tras los distintos

tratamientos de estrés, respecto al nivel basal del disacárido, se observa una gradación en función de la cepa considerada. El mutante heterocigótico fue el que tuvo un mayor incremento en la concentración de trehalosa endógena en prácticamente todas las condiciones, excepto para el estrés osmótico con NaCl, donde no se observaron variaciones significativas, que concuerda con los resultados previos de Pedreño *et al.*, 2007 que sugieren la ausencia de función protectora de la trehalosa en respuesta a estrés osmótico/salino.

**Tabla III.3. Contenido intracelular de trehalosa en respuesta a estrés oxidativo (5 mM y 50 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), térmico (42°C) y osmótico (1,2 M NaCl), en la cepa parental CAI4 y en ambos mutantes del gen *PGA26* de *Candida albicans*, en fase exponencial.** Los cultivos fueron incubados a 28°C en medio YPD, y se recogieron a D.O.<sub>600nm</sub> = 1,2, las cepas fueron sometidas durante una hora a los agentes de estrés, y posteriormente procesadas. (descrito en apartado Materiales y Métodos). Donde A es igual al número de veces que la cantidad de trehalosa aumentó en comparación con la cantidad de trehalosa inicial, al someter a las cepas a diferentes condiciones de estrés,

#### Trehalosa endógena (nmol trehalosa/mg peso húmedo)

| Trehalosa endógena<br>(nmol/mg peso húmedo) |         |                                       |            |  |             |      |     |      |             |               |     |
|---|---------|---------------------------------------|------------|--|-------------|------|-----|------|-------------|---------------|-----|
| Cepa  | Inicial | 5 mM<br>H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> | A          | 50 mM<br>H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> | A           | 37°C | A   | 42°C | A           | 1,2 M<br>NaCl | A   |
| CAI-4-URA                                   | 2,7     | 9,3                                   | 3,4        | 17,2                                   | 6,3         | 3,2  | 1,2 | 57,1 | 21,1        | 3,0           | 1,1 |
| <i>PGA 26/pg a 26-URA</i>                   | 1,5     | 13,3                                  | <b>8,9</b> | 27,2                                   | <b>18,1</b> | 2,6  | 1,7 | 62,7 | <b>41,8</b> | 1,7           | 1,1 |
| <i>pga 26/pg a 26-URA</i>                   | 4,9     | 15,7                                  | 3,2        | 38,7                                   | 7,9         | 3,9  | 0,8 | 48,5 | 9,9         | 3,2           | 0,6 |

### III.9. Crecimiento y morfología

Para estudiar si la falta de la proteína Pga26 afectaba a la velocidad de crecimiento del mutante, se realizaron curvas de crecimiento de la forma levaduriforme de las cepas parental (CAI4-URA), mutante heterocigótico (URA) y mutante homocigótico (URA) en diferentes condiciones:

- medios de cultivo YPD y SD
- distintas temperaturas de crecimiento: 28°C, 37°C y 42°C.

Se observó que la tasa de crecimiento era similar en todas las condiciones.

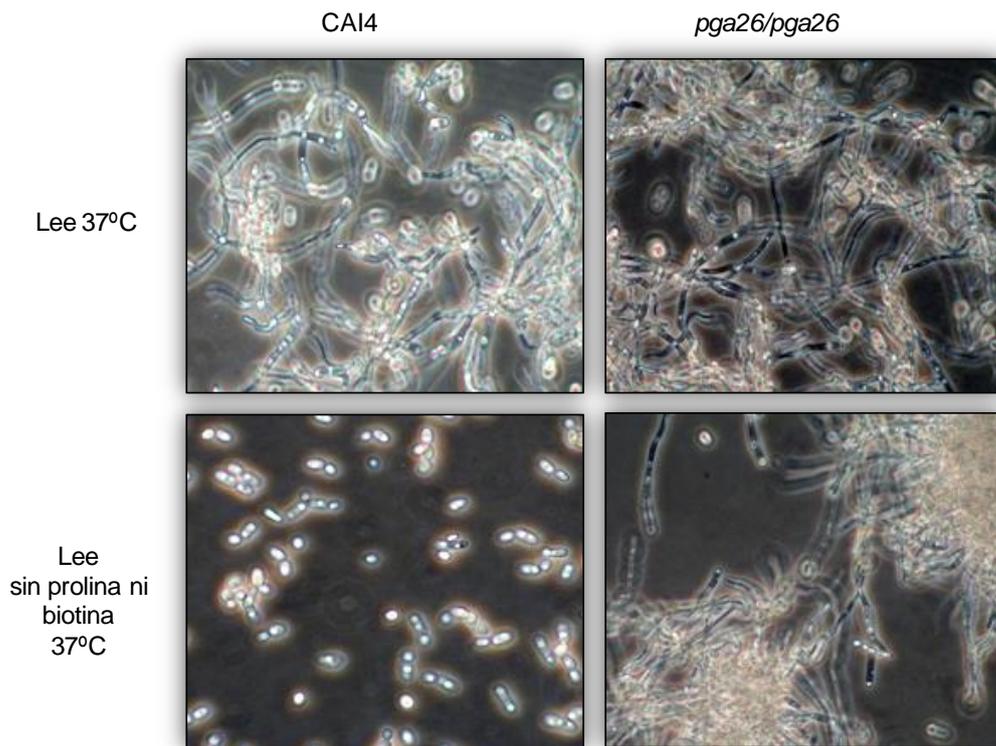
### III.9.1. Estudios de inducción de la transición dimórfica

En *C. albicans* la capacidad de cambiar su morfología es considerada un factor directamente relacionado con la virulencia. Como las hifas son invasivas, se supone que promueven la penetración en los tejidos durante las primeras etapas de infección, mientras que las levaduras podrían estar más adaptadas para la diseminación en los vasos sanguíneos. Según Ernst, (2000) el desarrollo hifal depende de dos factores: la naturaleza, número e intensidad de las señales ambientales y la actividad de las rutas de señalización incluyendo los factores de transcripción. En este estudio se evaluó la capacidad y velocidad de formación de tubo germinativo en varios medios líquidos que favorecen la filamentación como son: medio de Lee, medio RPMI-1640 y medio YNB suplementado con 10% de suero humano. En todas estas condiciones se observó una evidente mayor capacidad de emisión de hifas del mutante nulo en *PGA26* en comparación con la cepa parental.

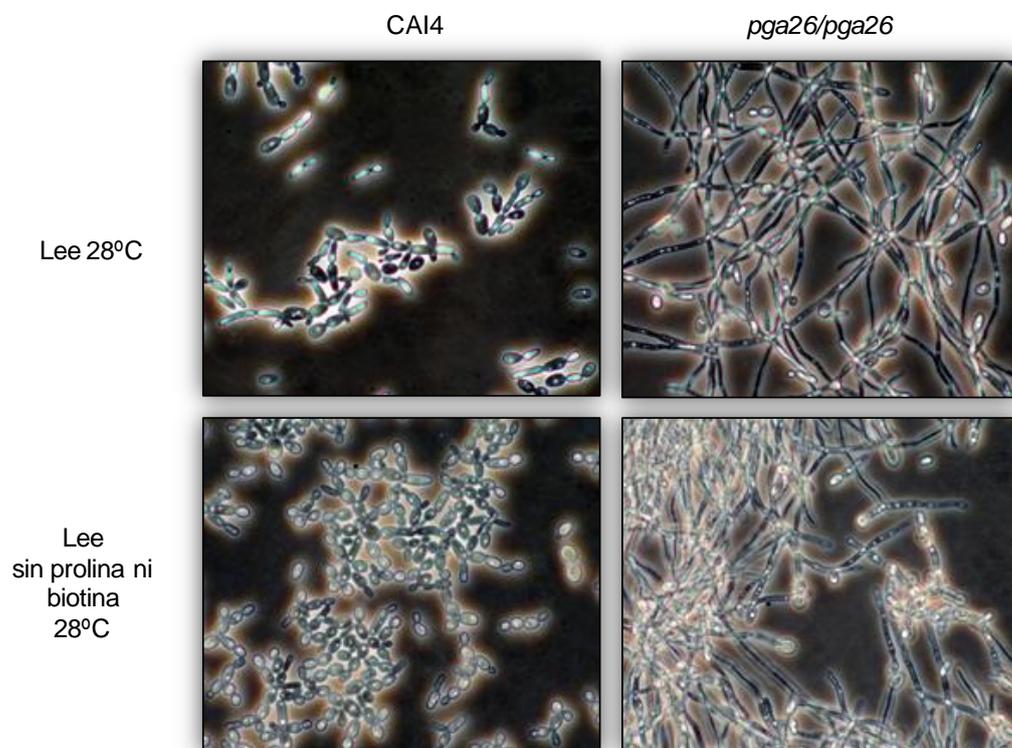
El método utilizado rutinariamente en nuestro laboratorio, para inducir la formación de tubos germinativos ha sido descrito por Elorza *et al.* (1985) (Materiales y Métodos), basado en la utilización del medio de Lee, en una primera etapa de este experimento se obtiene un preinóculo de células levaduriformes, luego las células una vez crecidas hasta fase estacionaria, se someten a reposo metabólico y a continuación se inoculan en medio de Lee, para la obtención de células miceliales.

Al realizar este experimento con los mutantes de *PGA26-URA* se obtuvieron células miceliales en el preinóculo en medio Lee a 28°C por lo cual no fue necesario someter a las blastosporas a reposo metabólico.

Se sometió al mutante a diferentes condiciones para inducir la miceliación. Observándose que los mutantes eran capaces de miceliar tanto a 37°C como a 28°C en medio de Lee, incluso, al preparar medio de Lee sin prolina ni biotina condiciones en las que la cepa parental CAI4 no forma micelio (Figuras III.19 y III.20).



**Figura III.18. Prueba de miceliación,** morfología celular de las cepas parental (CAI4), y homocigótica (*pga26/pga26*) incubadas a 37°C en medio de Lee, y en medio de Lee sin prolina ni biotina (aumento 40X).



**Figura III.19. Prueba de miceliación,** morfología celular de las cepas parental (CAI4), y homocigótica (*pga26/pga26*) incubadas a 28°C en medio de Lee, y en medio de Lee sin prolina ni biotina (aumento 40X).

### III.9.2. Inducción de la filamentación con suero humano

La formación de tubos germinativos *in vitro* mediante la incubación a 37°C de las cepas de *C. albicans* en medio YNB suplementado con 10% de suero humano puede ser un fiel reflejo de la transición levadura-micelio que ocurre en el interior del cuerpo humano durante un proceso infeccioso, por esta razón se utiliza esta técnica para inducir el cambio dimórfico. Se partió de cultivos con la misma densidad óptica utilizando la cepa parental CA14 como control y los mutantes (heterocigótico y homocigótico URA+) del gen *PGA26*.

Los cultivos iniciales se crecieron en YNB líquido a 28°C y fueron recogidos a una  $D.O_{.600nm}=0,2$ . Se tomaron muestras a 15, 30, 60, 90 y 120 min y se efectuaron los recuentos celulares en un Hemocitómetro Neubauer, utilizando el microscopio de contraste de fases. El porcentaje de dimorfismo se expresa como la relación entre las levaduras que emiten tubo germinativo respecto al número total de células. Se examinaron al menos 200 células por cada campo.

Como se observa en la tabla III.4, poco tiempo después de la inducción (15 min), ambos mutantes manifestaron un alto grado de desarrollo micelial expresado como porcentaje de tubos germinativos (54,5% para el mutante heterocigótico y 98,5% para el mutante homocigótico) comparados con la cepa parental (30,5%). Los recuentos microscópicos efectuados con el hemocitómetro revelaron que a los 30 minutos el mutante nulo había alcanzado una filamentación de prácticamente el 100%. Merece ser destacado el alto nivel de filamentación registrado cuando el crecimiento tuvo lugar sin la presencia de suero humano que es el inductor de la miceliación.

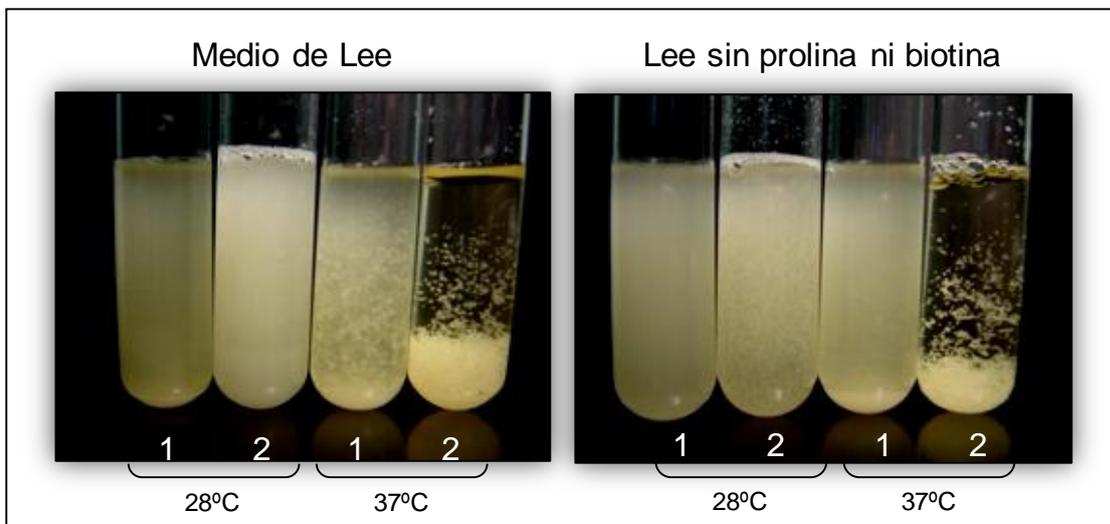
**Tabla III.4. Nivel de dimorfismo alcanzado por las cepas de *Candida albicans*, parental (CAI4) y mutantes heterocigótico (*PGA26/pga26*) y homocigótico (*pga26/pga26*), en cultivos exponenciales sometidos a las distintas condiciones de inducción. Transferencia a YNB precalentado a 37°C y adición de suero humano al 10%. Los cultivos se crecieron en YPD líquido a 28°C y recogidos a una D.O.<sub>600nm</sub>=0,2. Se tomaron muestras durante 15, 30, 60, 90 y 120 min.**

| CEPAS              |         | 28 °C   | 37 °C  |        |        |        |         |
|--------------------|---------|---------|--------|--------|--------|--------|---------|
|                    |         | Control | 15 min | 30 min | 60 min | 90 min | 120 min |
| CAI4               | c/suero | <5%     | 30,5%  | 89,75% | >95%   | >99%   | >99%    |
|                    | s/suero | <5%     | <5%    | 17,3%  | 32,7%  | 44,1%  | 56,4%   |
| <i>PGA26/pga26</i> | c/suero | <5%     | 54,5%  | 79,5%  | >95%   | >95%   | >99%    |
|                    | s/suero | <5%     | 1,4%   | 26,3%  | 43,8%  | 44,5%  | 67%     |
| <i>pga26/pga26</i> | c/suero | 11,5%   | 98,5%  | >99%   | >99%   | >99%   | >99%    |
|                    | s/suero | <5%     | <3%    | 41,5%  | >85%   | >95%   | >99%    |

### III.9.3. Estudios de floculación en medio líquido

Como consecuencia de los resultados observados, en los que tanto el mutante heterocigótico como el homocigótico en el gen *PGA26* presentan una mayor miceliación que la cepa parental, se analizó macroscópicamente la miceliación en medio líquido.

Se sembraron el mutante nulo de *PGA26* (*pga26/pga26-URA*) y la cepa parental (CAI4-URA) en medio de Lee completo y en el mismo medio sin prolina ni biotina, llevando a cabo la incubación tanto a 28°C como a 37°C. Como se puede observar en la figura III.20, cuando las cepas fueron crecidas en medio de Lee completo, el mutante nulo en *PGA26* presentó una mayor floculación que la cepa parental a 37°C. Esta diferencia se hizo incluso más patente cuando se incubaron las cepas en medio de Lee sin prolina ni biotina mientras las células CAI4-URA apenas manifestaron agregación, y el mutante *pga26/pga26-URA* presentó una elevada floculación cuando los cultivos fueron incubados a 37°C, e igualmente se registró un importante nivel de floculación, aunque en menor grado cuando se incubó a 28°C (Figura III.20).



**Figura III.20. Prueba de floculación en medio líquido** de las cepas; parental CAI4-URA (1), y homocigótica *pga26/pga26*-URA (2), incubadas a 28°C y a 37°C en medio de Lee, y en medio de Lee sin prolina ni biotina.

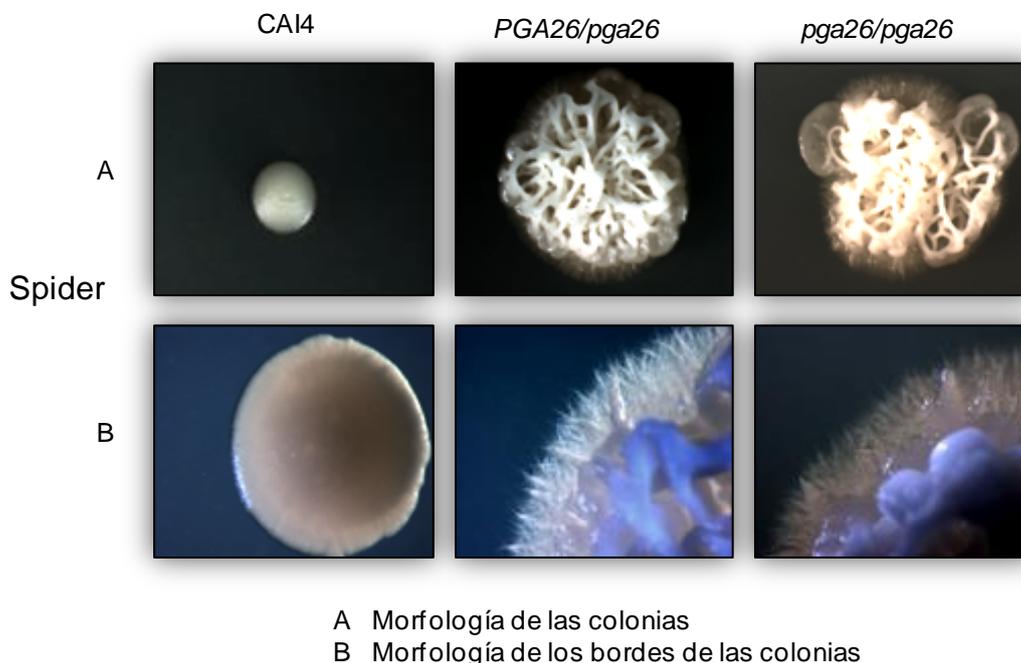
### III.10. Estudio de filamentación en medio sólido

La forma, color, textura y disposición de las colonias que presenta *C. albicans* se puede considerar como el reflejo de la morfología celular. Así, el aspecto visual que presentan las colonias de *C. albicans* en determinados medios ha sido considerado como prueba macroscópica de la capacidad de sus células para llevar a cabo el cambio morfogénico. Para estudiar el efecto de la interrupción del gen *PGA26* en la transición dimórfica en medios sólidos, se analizaron las colonias obtenidas tras 5 días de incubación a 37°C en distintos medios diseñados para el estudio de la filamentación. Se utilizaron las mismas cepas, portadoras del marcador URA, previamente empleadas en esta Memoria, evitándose la posibilidad de encontrar diferencias en la morfología de las colonias, que pudiera ser debida a las distintas auxotrofías que presentaban las cepas, se sembraron en diferentes medios de cultivo que inducen la formación de micelio, como es el medio Lee, Spider y YE Pro y también YNB con 10% de suero humano (tal como se describe en Materiales y Métodos).

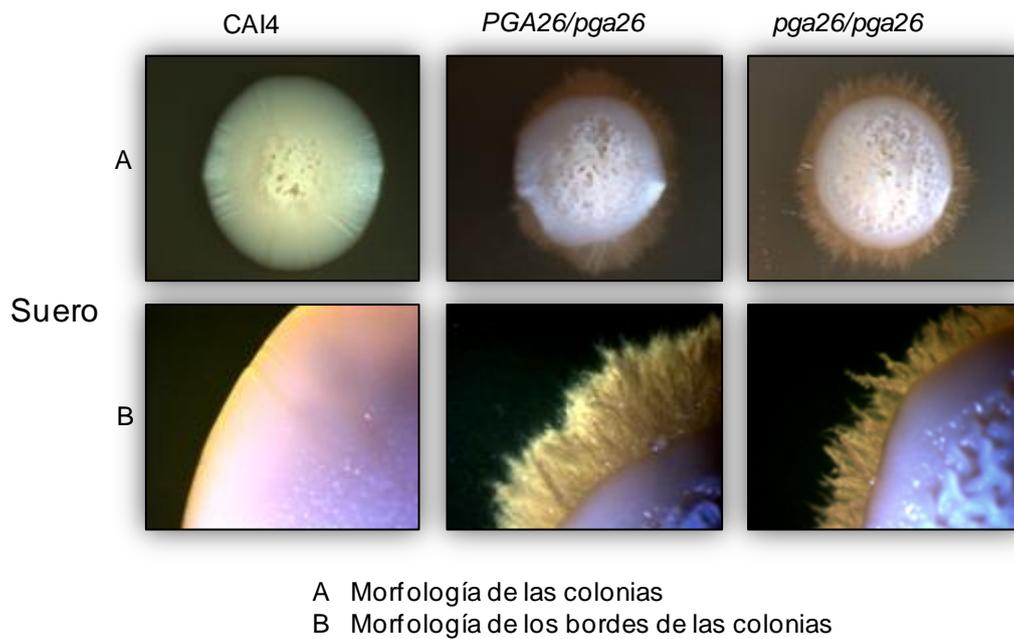
En los medios sólidos Spider, YE Pro e YNB con 10% de suero humano, la morfología, el tamaño de las colonias, y el grado o capacidad de filamentación de las cepas mutantes *PGA26/pga26*-URA y *pga26/pga26*-URA fue diferente a la

que presentaba su cepa parental CAI4-URA. En tanto, la capacidad de filamentación de estas cepas se ve aumentada con respecto de la cepa parental (Figuras III.21, III.22 y III.23).

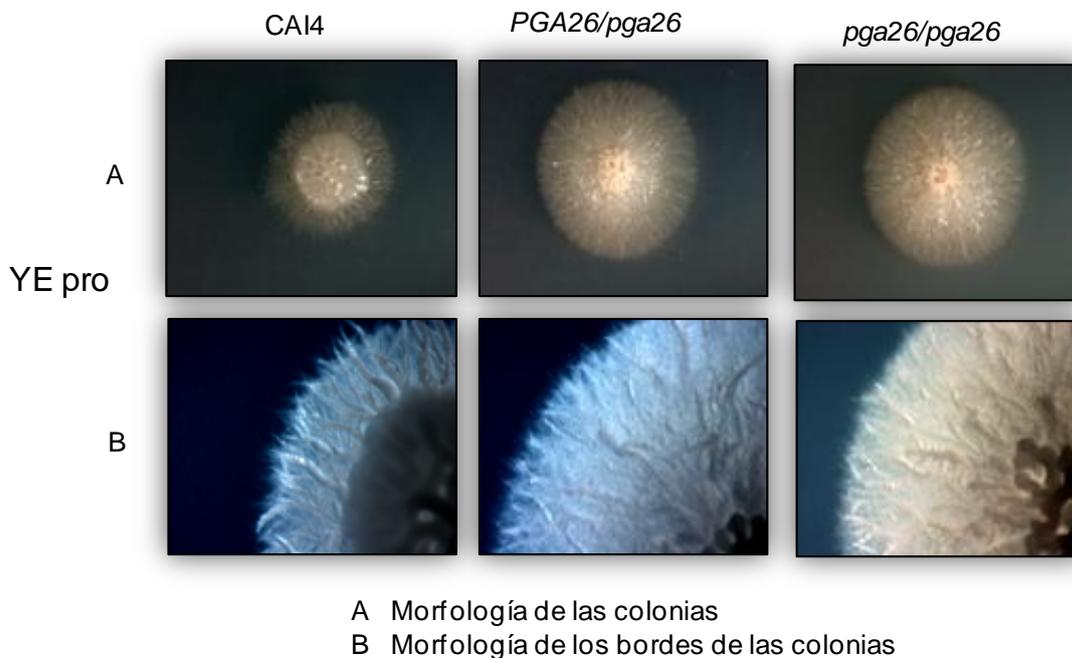
En medio de Lee sólido (Figura III.24), las diferencias fueron mas discretas, observándose diferencias en el tamaño de las colonias presentando las cepas mutantes *PGA26/pga26*-URA y *pga26/pga26*-URA colonias más pequeñas que la cepa parental CAI4-URA. Con respecto a la morfología, las colonias de las cepas mutantes son ligeramente más elevadas que la cepa parental y no se aprecian diferencias significativas en cuanto a la filamentación entre estas cepas, lo que resulta sorprendente, ya que en medio de Lee líquido se observan grandes diferencias de filamentación entre las cepas mutantes en el gen *PGA26* con respecto a la cepa parental (apartado III.9.1).



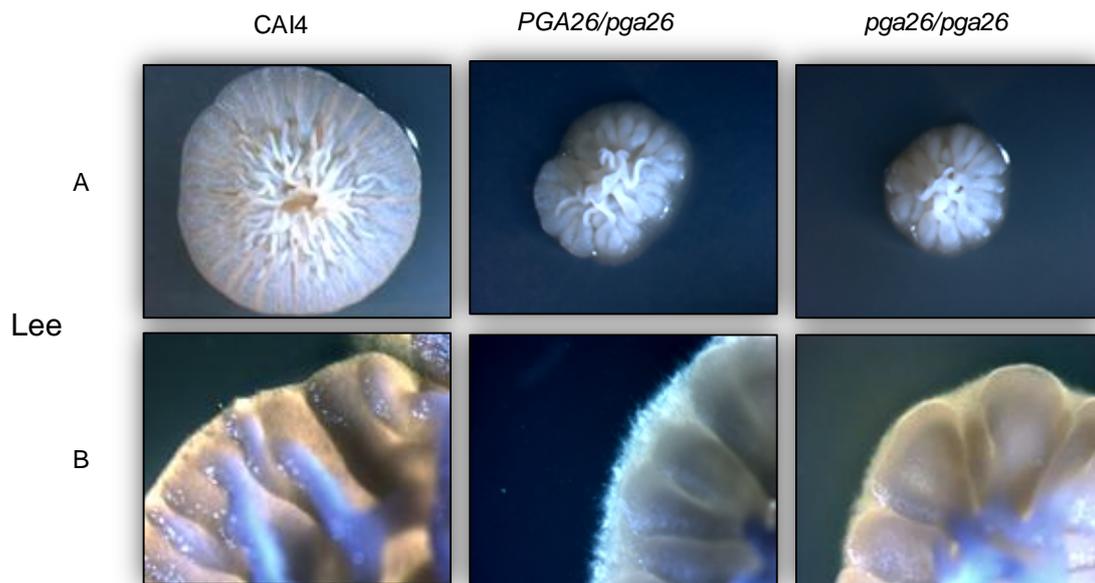
**Figura III.21. Morfología de colonias y de bordes de colonias en medio de Spider** de las cepas parental (CAI4), mutante heterocigótico (*PGA26/pga26*) y mutante homocigótico (*pga26/pga26*). Las placas se incubaron durante 5 días a 37°C.



**Figura III.22. Morfología de colonias y de bordes de colonias en medio YNB con suero humano (10%)** de las cepas parental (CAI4), mutante heterocigótico (*PGA26/pga26*) y mutante homocigótico (*pga26/pga26*). Las placas se incubaron durante 5 días a 37°C.



**Figura III.23. Morfología de colonias y de bordes de colonias en medio de extracto de levadura y prolina** de las cepas parental (CAI4), mutante heterocigótico (*PGA26/pga26*) y mutante homocigótico (*pga26/pga26*). Las placas se incubaron durante 5 días a 37°C.



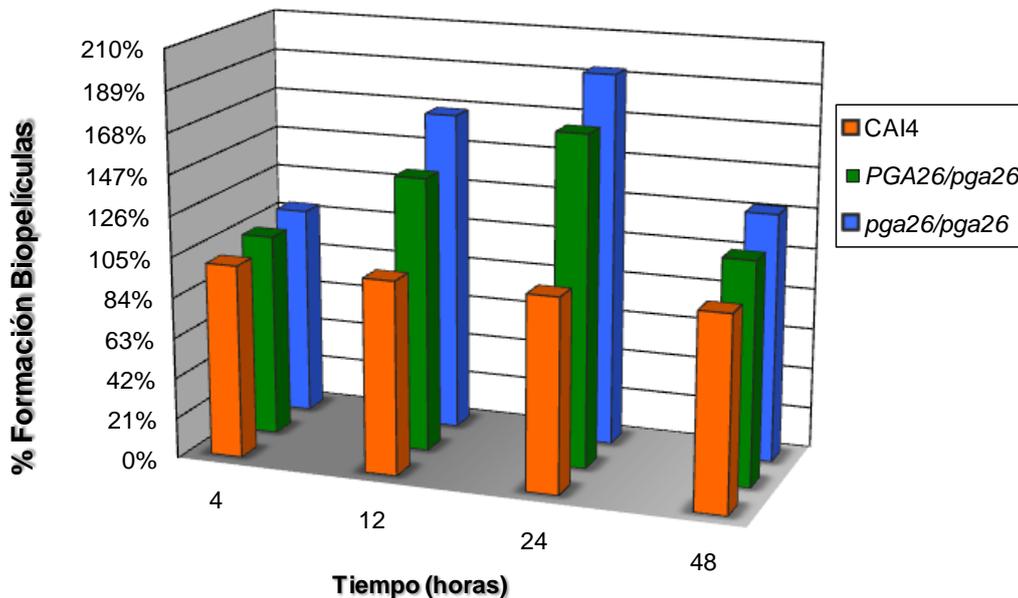
A Morfología de las colonias  
B Morfología de los bordes de las colonias

**Figura III.24. Morfología de colonias y de bordes de colonias en medio de Lee** de las cepas parental (CAI4), mutante heterocigótico (*PGA26/pgs26*) y mutante homocigótico (*pgs26/pgs26*). Las placas se incubaron durante 5 días a 37°C.

### III.11. Estudio de formación de biopelículas

Se estudió la capacidad de formación de biopelículas de la cepa parental y las cepas mutantes interrumpidas en uno o los dos alelos del gen *PGA26*, debido a que la capacidad de filamentación está ligada a la formación de biopelículas, y los mutantes en *PGA26* presentaron una elevada capacidad de emitir tubos germinativos. En consecuencia, se creyó conveniente estudiar como podía influir la ausencia de Pga26 en la formación de tales estructuras. En la figura III.25 se puede observar a capacidad de formación de biopelículas en las cepas estudiadas, a las 4 h de comenzado el proceso no se apreciaron diferencias significativas entre las mismas; en cambio a las 12 h la presencia de biopelículas dispuestas en capa fue nítidamente superior en los mutantes heterocigótico y homocigótico con respecto a la cepa parental, observándose un aumento del 126% de formación de biopelículas para *PGA26/pgs26-URA* y un 168% en el caso de *pgs26/pgs26-URA*, considerando el 100% para la cepa parental CAI4. Esta diferencia fue incluso más acentuada tras 24 h de iniciado el experimento,

donde la capacidad de constituir biopelículas estables es de (168%) para el mutante *PGA26/pgA26-URA*, y (189%) para *pga26/pgA26-URA*, en comparación con la cepa parental CAI4-URA (100%).



**Figura III.25. Porcentajes de formación de biopelículas** de las cepas parental (CAI4-URA), mutante heterocigótico (*PGA26/pgA26-URA*) y mutante homocigótico (*pga26/pgA26-URA*) medidas a diferentes períodos de tiempo.

### III.12. Estudio de virulencia en modelo murino.

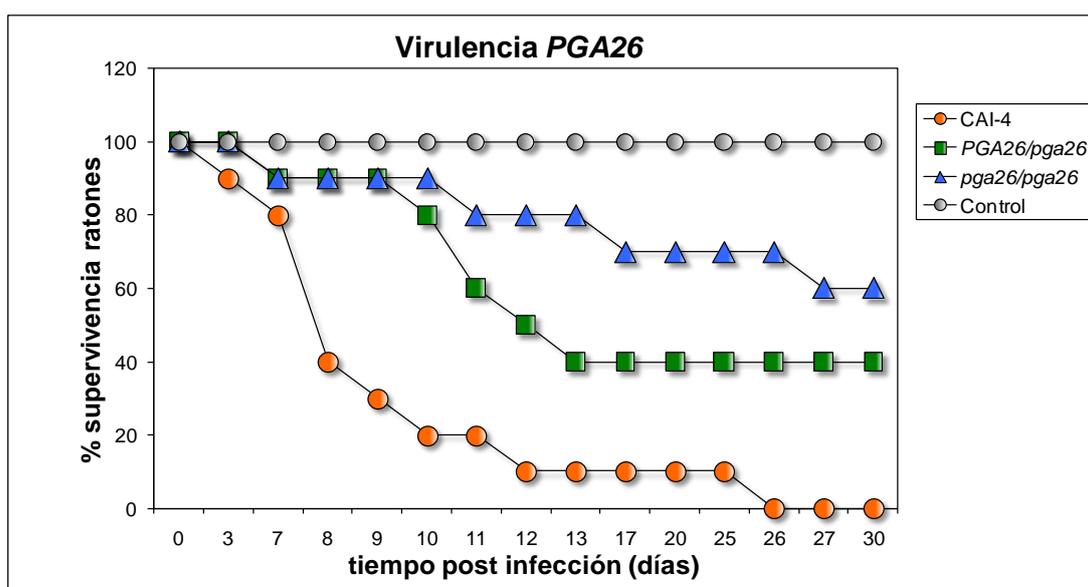
El dimorfismo en *C. albicans* ha sido considerado un requisito relevante para la virulencia (Saville *et al.*, 2003), y también juega un papel importante en el proceso infeccioso en la formación de biopelículas (Richard *et al.*, 2005), consideramos, al evaluar los resultados previos, que evidencian la mayor capacidad de los mutantes en el gen *PGA26* de formar micelio verdadero como mayor capacidad de formación de biopelículas con respecto a la cepa parental, el realizar un estudio dirigido a comprobar la implicación de Pga26 en la virulencia. Para ello se utilizaron ratones hembra CD Swiss-inmunocompetentes de 6 a 8 semanas de edad y con un peso aproximado de 20 g.

Las cepas objeto del análisis de infectividad fueron crecidas en medio de YPD a 28°C, recogidas, lavadas dos veces con agua y resuspendidas en buffer salino fisiológico para obtener un inóculo del  $1,5 \times 10^6$  ufc (unidades formadoras de

colonias) en un volumen de 150  $\mu$ l. Este inóculo fue inyectado a los ratones vía intravenosa en la vena lateral de la cola.

Se hicieron cuatro grupos de diez ratones cada uno. A uno de ellos se les inyectó suero salino fisiológico como grupo control, y los otros tres, fueron inyectados con la cepa parental CAI4-URA, mutante heterocigótico *PGA26/pga26*-URA y mutante homocigótico *pga26/pga26*-URA, respectivamente. Fueron inoculados en la vena lateral de la cola con cada una de las cepas y el porcentaje de supervivencia de los ratones fue supervisado cada día, durante un período de 30 días.

En la figura III.26 se puede observar que el mutante nulo en *PGA26* es menos virulento que la cepa parental, ya que a los treinta días de comenzado el experimento el porcentaje de supervivencia de ratones es superior al 60%, mientras que en el caso del grupo de ratones inoculado con la cepa parental la supervivencia fue 0%. En una situación intermedia quedó el mutante heterocigótico, con un porcentaje de supervivencia de un poco más del 40%, y, la supervivencia del grupo control fue del 100%. Estos resultados sugieren una relación dosis dependiente ya que al parecer al disponer únicamente de la mitad de proteína Pga26, el mutante heterocigótico tiene un comportamiento intermedio entre la cepa parental y el mutante nulo en *PGA26*.



**Figura III.26. Estudio de virulencia en modelo murino de la cepa parental CAI4-URA, del mutante heterocigótico (*PGA26/pgA26*-URA) y del mutante homocigótico (*pga26/pgA26*-URA) contabilizando el porcentaje de supervivencia de ratones a través del tiempo post-infección.**

### III.13. Reintegración del gen *PGA26* en el mutante nulo *pga26/pga26*

Con el objeto de evaluar si los efectos fenotípicos observados en el mutante nulo *pga26/pga26* eran debidos realmente a la carencia de la proteína Pga26 nativa en la célula, se procedió a reintroducir una copia del gen *PGA26* en la cepa mutante. Para ello se clonó la región codificante del gen *PGA26* en el plásmido pBI-1 (Stold *et al.*, 1997)

#### III.13.1. Construcción del plásmido pBI-PGA26

Para la expresión del gen *PGA26* se construyó un plásmido que incluía la región codificante del gen bajo el control de un promotor inducible, como es el promotor del gen *CaPCK1* (fosfoenolpiruvato carboxiquinasa), originando el plásmido pBI-PGA26. El promotor del gen *CaPCK1* se encuentra reprimido en presencia de glucosa y su expresión puede inducirse sustituyendo la glucosa del medio de cultivo por casaminoácidos.

El primer paso para la construcción del plásmido fue la clonación de la región codificante de *PGA26* por PCR utilizando los oligonucleótidos PBI26-3' y PBI26-5', que poseían las dianas de restricción *BstEII* (Tabla II.5). El fragmento obtenido se subclonó en el plásmido Ptz57R/T, originando el plásmido Ptz-PGA26, y la región codificante de este gen se liberó de éste plásmido por digestión con *BgIII*, para ser finalmente clonado en el plásmido pBI-1, digerido también con *BgIII*. La correcta orientación del gen en el plásmido obtenido (pBI-PGA26) se comprobó amplificando por PCR la región codificante de *PGA26*, con una pareja de oligonucleótidos, PCKp-stop y PBI26-3', que sólo producían el amplicón deseado cuando la orientación del gen en el plásmido era correcta.

Una representación del plásmido pBIPGA26, se muestra en la figura III.27.

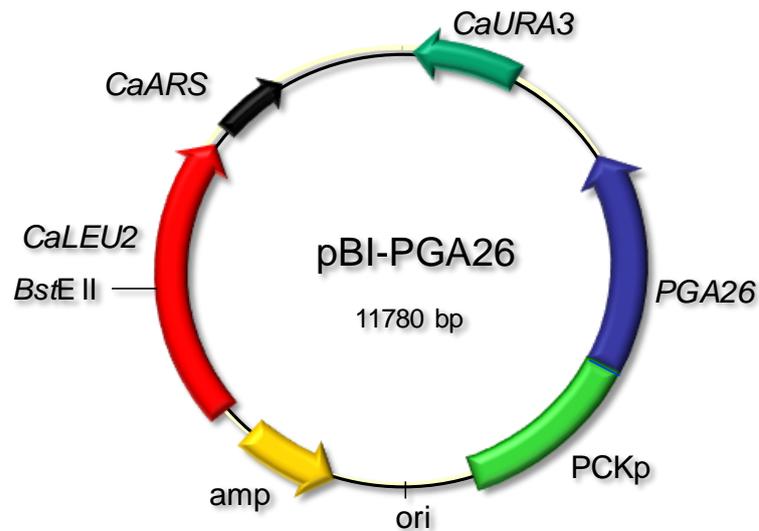


Figura III.27. Plásmido pBIPGA26.

### III.13.2. Introducción de pBI-PGA26 en el mutante nulo

El plásmido pBI-PGA26 se empleó para transformar el mutante nulo *pga26/pga26*. Se utilizó el sitio único de restricción *BstE* II del plásmido para linearizarlo e integrarlo por recombinación homóloga en uno de los alelos del *locus* natural *CaLEU2* de la cepa a transformar. Las cepas transformantes se seleccionaron por pérdida de la auxotrofia a uracilo de la cepa *pga26/pga26* que había introducido el plásmido. Se seleccionó uno de los transformantes para estudios posteriores al que se denominó *RBIPGA26*.

Como control de expresión del gen, se realizó el mismo proceso de transformación con el plásmido pBI-1, sin el inserto de *PGA26*. La cepa obtenida en este caso se denominó RBI.

### III.13.3. Expresión de *PGA26* en la cepa reintegrante

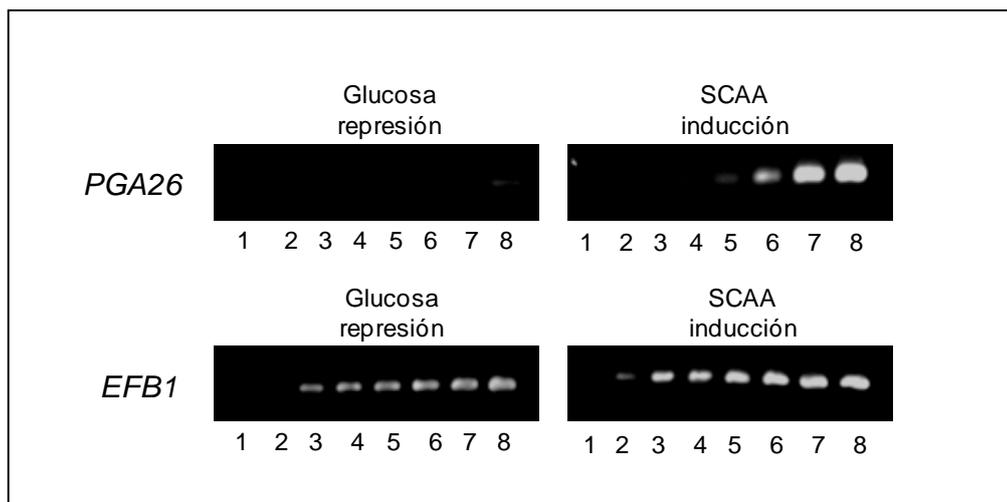
Antes de realizar los experimentos necesarios para corroborar la relación entre la interrupción de *PGA26* y el fenotipo observado en la cepa mutante, se realizó un estudio de expresión del gen *PGA26* reintroducido en la cepa reintegrante *RBIPGA26*.

Con este estudio se pretendía evaluar la calidad del promotor del gen *CaPCK1* y ver si existía una expresión basal de *PGA26* bajo este promotor, aún en condiciones de represión.

Células creciendo en un medio represor del promotor del gen *CaPCK1* (medio SD+glucosa 4%) las cuales fueron recogidas, lavadas con agua estéril y divididas en dos alícuotas. Se reservó una de ellas a 4°C, para su posterior obtención de ARN total, ya que corresponde a la muestra de represión del promotor, y la otra alícuota se inoculó en medio que produce la inducción del promotor *CaPCK1* (medio SCAA). Tras 30 min de incubación de las células creciendo a 30°C 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. La expresión de *CaPGA26* bajo el control del promotor *CaPCK1* se cuantificó por RT-PCR semicuantitativa, utilizando los oligonucleótidos PCKp-stop y PBI26-3', que amplifican un fragmento de *PGA26* de aproximadamente 500 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 la ausencia total de ARN mensajero de *PGA26* 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 *PGA26* (Figura III.28).



**Figura III.28. RT-PCR semicuantitativa de la expresión de *PGA26* bajo el promotor inducible del gen *CaPCK1*.** Se comprobó que la expresión basal de *PGA26* en el plásmido pBIPGA26 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 *PGA26* se indujo por inactivación del promotor *CaPCK1* en medio YNB +4% glucosa. La inducción de la expresión de *PGA26* se consiguió activando el promotor en medio YNB sin glucosa que contenía casaminoácidos como fuente de carbono alternativa. Los números 1-8 representan los ciclos de amplificación de PCR a los que las muestras fueron obtenidas (16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30).

#### III.13.4. Análisis fenotípico de la cepa reintegrante

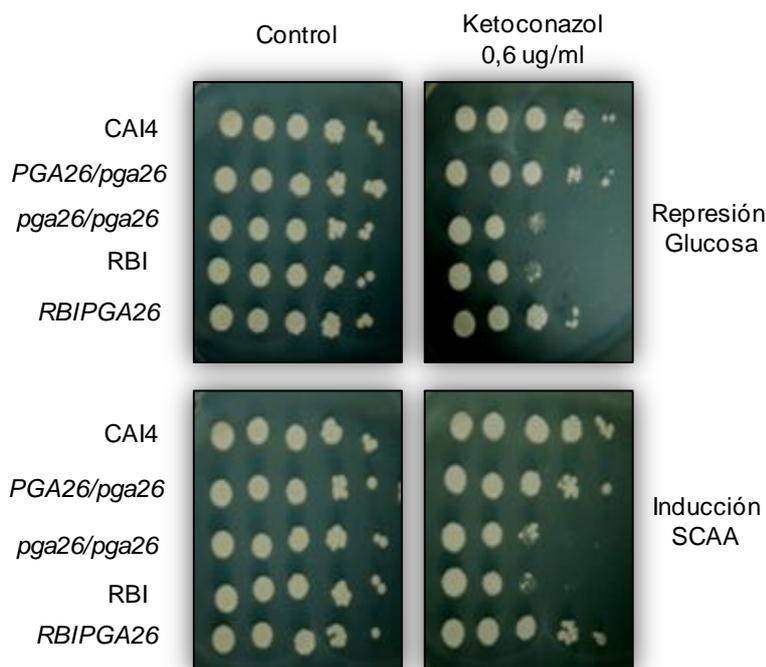
El análisis fenotípico del mutante nulo del gen *PGA26* ya había revelado, entre otras alteraciones, que dicha cepa presentaba mayor sensibilidad al antifúngico ketoconazol que la cepa parental. Esta característica se utilizó para estudiar el fenotipo de la cepa reintegrante *RBIPGA26*, que expresa el gen *PGA26* bajo el control del promotor de *CaPCK1*, y por tanto, debería perder la hipersensibilidad a estos compuestos en caso de que el fenotipo observado en el mutante nulo fuera debido exclusivamente a la delección de este gen.

Se realizaron pruebas de sensibilidad a ketoconazol. Puesto que las cepas RBI y RBIPGA26 no presentaban ninguna auxotrofia, la comparación se realizó con CAI4-URA, *PGA26/pga26*-URA y *pga26/pga26*-URA, para anular un posible efecto causado por las diferencias en el fondo genético de las cepas utilizadas. Cultivos creciendo en los medios de represión e inducción se ajustaron a  $D.O_{600nm}=1$ , y 3  $\mu$ l de diluciones seriadas, fueron depositadas en placas con los

medios de inducción (SCAA) y represión (SD + 4% glucosa) conteniendo ketoconazol (0,6 µg/ml).

La reintegración del gen *PGA26* en el mutante nulo produjo la pérdida de la hipersensibilidad observada anteriormente por ketoconazol ya que RBIPGA26 se comportó de la misma manera que la cepa parental (CAI4-URA) en presencia de éste antifúngico (Figura III.29).

Los resultados obtenidos con este experimento demostraron que los efectos fenotípicos observados tras delecionar uno o los dos alelos del gen *PGA26*, eran debidos a la ausencia de este gen y no a cualquier otro efecto producido en la célula, ya que la reintegración de *PGA26*, bajo el control del promotor del gen *CaPCK1* en el mutante nulo, produjo la recuperación del fenotipo original observado para la cepa parental (Figura III.29).



**Figura III.29. Análisis fenotípico de la cepa reintegrante de *PGA26*.** Se obtuvieron cultivos de las cepas: CAI4, *PGA26/pgs26*; *pgs26/pgs26*; RBI; *RBIPGA26* en condiciones de represión e inducción del promotor, se ajustaron a  $D.O_{600nm}=1$  y se realizaron diluciones decimales seriadas. Se gotearon 3 µl de cada dilución en placas de los medios correspondientes que contenían ketoconazol 0,6 µg/ml y se incubaron 72 h a 28°C. La reintegración de *PGA26* en la cepa mutante producía la recuperación del fenotipo original de la cepa parental.

### III.14 Análisis del perfil transcripcional del mutante nulo *pga26/pga26*

Tras evaluar las múltiples alteraciones que reveló el estudio fenotípico del mutante nulo en el gen *PGA26*, se realizó un estudio del transcriptoma de *pga26/pga26*-URA utilizando micromatrices de ADN específicas de *C. albicans* con el fin de estudiar la expresión global de los genes de *C. albicans* en respuesta a la interrupción del gen *PGA26*,

Las micromatrices de ADN fueron fabricadas por la empresa Eurogentec S.A. (Ivoz-Ramet, Belgium) en colaboración con el Consorcio Europeo Galar Fungail, proyecto en el cual participó 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, con 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 por triplicado, utilizando las cepas CAI4-URA y *pga26/pga26*-URA crecidas en medio YPD en fase exponencial de crecimiento ( $D.O_{600nm}=0,5$ ). Para cada experimento en forma adicional se efectuó 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 (sección II.18.4).

El análisis de las micromatrices de ADN mostró un total de 5 genes que modificaban su expresión en el mutante debido a la interrupción del gen *PGA26* (Figura III.30).

Uno de ellos, *TRX2* tendría una función por homología de tioredoxina, otro *HIK1.3EOC* con función de histidina quinasa y los tres restantes (*IPF2649*, *IPF198559* e *IFL4*) tienen función desconocida.

De estos genes; *TRX2* y *IPF2649* se ven sobreexpresados (1,99 y 1,54 respectivamente) y *HIK1.3EOC*, *IPF198559* e *IFL4* reprimidos (0,65; 0,60 y 0,57 respectivamente), de estos, *CaIFL4* es similar a *PIR3* de *S. cerevisiae*.

Se podría concluir que la falta de esta proteína no causa alteraciones especialmente relevantes en la expresión diferencial de otros genes bajo estas condiciones.

| Nombre sistemático | ORF 19.           | Nombre común     | Nivel de expresión | Función  |
|--------------------|-------------------|------------------|--------------------|--|
| CA0467             | <i>orf19.1976</i> | <i>TRX2</i>      | 1,99               | Tioredoxina (por homología)  |
| CA5706             | <i>orf19.7406</i> | <i>IPF2649</i>   | 1,54               | Función desconocida  |
| CA4415             | <i>orf6.6955</i>  | <i>HIK1.3EOC</i> | 0,65               | Histidina Quinasa  |
| CA0340             | <i>orf19.3375</i> | <i>IPF198559</i> | 0,60               | Función desconocida  |
| CA0803             | <i>orf19.3512</i> | <i>IFL4</i>      | 0,57               | Función desconocida<br>(Similar a <i>PIR3</i> de <i>S.cerevisiae</i> ) |

**Figura III.30. Estudio de micromatrices de ADN del mutante nulo *pga26/pga26* en el que 5 genes presentaron niveles de expresión diferencial con respecto a la cepa parental. Uno de ellos *IFL4* podría estar relacionado con la arquitectura de la pared celular.**

**DISCUSIÓN**



#### IV. DISCUSIÓN

En las últimas décadas, diferentes especies de hongos oportunistas han alcanzado una enorme relevancia clínica, como es el caso del género *Candida*, en especial, *C. albicans*. El estudio básico de su genoma, de su metabolismo y fisiología, resulta imprescindible para diseñar en el futuro protocolos diagnósticos seguros así como, hallar nuevas dianas para antifúngicos que permitan formular terapias más efectivas que generen mejores respuestas por parte del paciente. *C. albicans*, el patógeno oportunista más prevalente en humanos, causa varias formas de candidiasis: desde infecciones superficiales en la piel y mucosas hasta enfermedades sistémicas que ponen en riesgo la vida, principalmente en pacientes con el sistema inmune deprimido. *C. albicans*, se ha elegido como modelo de estudio para poder entender mejor las interacciones patógeno-hospedador, así como las condiciones que le permiten generar un cuadro infeccioso, impedido bajo condiciones normales de inmunidad. Los avances en el conocimiento básico y manipulación genética de este microorganismo, han permitido desarrollar herramientas que posibilitan su caracterización genotípica y su estudio molecular (Lehmann *et al.*, 1992).

Actualmente se conoce el genoma completo de *C. albicans*, en forma paralela se han desarrollado nuevas técnicas de identificación molecular basadas en el reconocimiento específico de ciertas secuencias por medio de técnicas como la PCR o los anticuerpos monoclonales. Una vez hayan sido identificadas y analizadas nuevas secuencias específicas, estaremos en condiciones de obtener sistemas de identificación más rápidos y seguros que harán posible realizar diagnósticos más precisos (García, 2008).

En levaduras y hongos filamentosos, la pared celular cumple una misión esencial en el mantenimiento de la integridad y morfología de las células. La rigidez de la pared no sólo protege a la célula de agresiones físicas externas, sino que también le confiere resistencia a la presión de turgencia del protoplasto y evita la lisis de la célula cuando ocurren descensos en la osmolaridad del medio. Así mismo, la pared celular actúa como barrera frente a sustancias potencialmente

dañinas del ambiente externo, impidiendo que las proteínas periplásmicas sean secretadas al medio; proporcionando a su vez una estructura estable donde las proteínas que conforman la arquitectura básica de la pared pueden ser ancladas. Además sirve de soporte para la exposición de proteínas (receptores) que juegan un papel importante en las interacciones célula-célula, ya sean de carácter sexual, infeccioso, inmunogénico o inmunomodulador (Calderone, *et al.*, 1991; Cassone, 1989; Chaffin *et al.*, 1998).

Dada la ausencia de pared en células animales, las moléculas ubicadas en esta estructura se han considerado como dianas de gran interés potencial para el desarrollo de nuevos compuestos con actividad antifúngica (Cassone, 2008). En consecuencia, el estudio de proteínas integrales de la pared tiene importancia tanto desde un punto de vista básico como aplicado.

Las glicoproteínas son componentes muy importantes de todas las células eucariotas, éstas poseen una estructura básica común, que consiste en una matriz proteica a la cual se unen covalentemente cadenas de carbohidrato. En los hongos, se denominan manoproteínas porque las cadenas de carbohidrato contienen mayoritariamente unidades de manosa, aunque frecuentemente también presentan pequeñas cantidades de otros azúcares y grupos fosfato (Peberdy, 1990; Ruiz-Herrera, 1992).

Las manoproteínas de la pared celular fúngica participan en múltiples procesos biológicos: contribuyen a la morfología celular, actúan como material cementante y participan en procesos de agregación celular (Ballou, 1976; 1982). Para entender el papel de estas moléculas y su función biológica, es imprescindible proceder a su identificación y caracterización. Las aproximaciones seguidas en la búsqueda de proteínas de pared, han sido principalmente tres: bioquímica, genética e *in silico*.

En el presente trabajo, hemos seleccionado como objeto de estudio la glicoproteína codificada por el gen *PGA26* de *C. albicans*, de función desconocida que contiene un anclaje putativo GPI. Este producto génico es también conocido como *orf19.2475*, *CA2885* e *IPF 7204*. La selección de *PGA26* se realizó en base a estudios previos realizados por nuestro grupo, que han demostrado una intensa sobreexpresión de *PGA26* durante la regeneración de la pared celular a partir de protoplastos (Castillo, *et al.*, 2006).

Un primer análisis *in silico* del gen *PGA26*, reveló que podría codificar una proteína de pared celular, ya que posee las características propias de este tipo de proteínas, es decir: la estructura primaria de Pga26 contiene 131 aminoácidos, con un peso molecular teórico deducido de su secuencia de 13,5 kDA y un punto isoeléctrico de 4,74. La secuencia aminoacídica muestra que Pga26 contiene un péptido señal hidrofóbico en posición N-terminal. Dispone de un 28,3% de serinas y treoninas, dos putativas señales de N-glicosilación y un motivo potencial de anclaje GPI (glicosilfosfatidilinositol) (Tabla III.1, figura III.1 y tabla III.2)

Para averiguar el posible papel fisiológico de *PGA26*, se realizó la disrupción de la región codificante del gen y se estudió, bajo diferentes condiciones, el comportamiento de los respectivos mutantes heterocigótico (*PGA26/pga26-URA*) y homocigótico (*pga26/pga26-URA*), comparando con el observado en la cepa parental (CAI4-URA), a fin de elucidar la posible implicación de la proteína Pga26 en la arquitectura y composición de la pared celular de *C. albicans*

La carencia de Pga26 se tradujo en un efecto pleiotrópico, siendo el rasgo más acusado la sensibilidad a drogas que afectan a la pared celular (Figuras III.9, III.10, III.11), lo que evidenciaba una posible alteración en la arquitectura y/o composición de esta estructura fundamental. Por el contrario, la interrupción de uno o los dos alelos de *PGA26*, no produjo diferencias significativas en la tasa de crecimiento de las células levaduriformes en comparación con la cepa parental.

Los compuestos que interfieren en el ensamblaje de los polímeros de la pared, como el calcofluor white y el rojo Congo (Elorza *et al.*, 1983; Kopecka y Gabriel, 1992) se han usado tradicionalmente en *S. cerevisiae* para detectar mutantes defectivos o alterados en la pared (Ram *et al.*, 1994; Van der Vaart *et al.*, 1995). En los mutantes para el gen *PGA26*, se observó un claro incremento en la sensibilidad a dichos compuestos respecto a la cepa parental, ya que estas sustancias producen cambios en el contenido y disposición de la quitina y  $\beta$ -glucanos en la superficie celular, estos resultados podrían sugerir un papel importante de *PGA26* en la arquitectura de la pared celular. (Figura III.9).

La concentración de la proteína Pga26 debe estar presente en un equilibrio armónico con respecto a otros componentes básicos de la pared; de modo que una desviación en los contenidos respectivos puede provocar una alteración inestable en la arquitectura general de la pared (Garcerá *et al.*, 2003, Martínez *et al.*, 2004). Resultados similares se han obtenido en *S. cerevisiae*, donde tanto la interrupción como la sobreexpresión de la proteína Icw1, aumenta la sensibilidad de las células a drogas que interfieren el ensamblaje de la pared celular, caso del calcofluor white y rojo Congo (empleados en este estudio) (Moukadiri *et al.*, 1997), y en *Yarrowia lipolytica*, en mutantes carentes de la proteína de pared Ywp1 (Ramón *et al.*, 1996).

Para caracterizar mejor el efecto de la delección de *PGA26* en la construcción de la pared celular, se cuantificó la sensibilidad de los mutantes a zimoliasa por el método descrito por Van der Vaart *et al.* (1995). La ausencia de Pga26 causó un significativo aumento de la sensibilidad a la zimoliasa (Figura III.11). Estos resultados sugieren que esta mayor susceptibilidad podría relacionarse con cambios en la estructura de la red de glucano o la disminución del grosor de la capa externa de la pared celular debido a la falta de esta proteína. Estas observaciones apuntan a que los diferentes componentes de la pared celular podrían estar en concentraciones alteradas en los correspondientes mutantes.

Por otra parte, se realizó un análisis comparativo de la composición de polímeros de pared celular, tanto en la cepa parental (CAI4-URA), como en los mutantes heterocigótico (*PGA26/pgs26*-URA) y homocigótico (*pgs26/pgs26*-URA). Los resultados obtenidos revelaron notables alteraciones en la composición de la pared. El mutante nulo tiene una mayor cantidad de  $\beta$ -1,6-glucano que la cepa parental (tres veces más) (Figura III.12). Este resultado sugiere que la carencia de Pgs26 ocasiona una profunda alteración en la composición global de la pared. Sin embargo, no se observaron diferencias en el contenido de  $\beta$ -1,3-glucano, quitina, proteína o manano (Figura III.12).

Los mutantes deficientes en el gen *PGA26* presentan importantes cambios en su nivel de sensibilidad y/o resistencia a algunas drogas. Cuando los cultivos exponenciales se crecieron en presencia de tunicamicina, que inhibe la glicosilación de las proteínas destinadas a la exportación, los dos mutantes fueron más resistentes a esta droga, que la cepa parental CAI4 (Figura III.13). Un estudio realizado por Pierce *et al.* (2008), relativo al efecto de tunicamicina sobre la formación de biopelículas, demostró que la adición de tunicamicina tiene efectos inhibitorios muy notables en el desarrollo y mantenimiento de las biopelículas, aunque no afectó el crecimiento celular o la morfología. No obstante, el efecto de la tunicamicina fue casi irrelevante en las biopelículas ya pre-formadas o maduras. Con ello, quedaría demostrada la importancia de la N-glicosilación en las etapas de formación y desarrollo de las biopelículas, representando una atractiva diana para prevenir la aparición de este tipo de formaciones de *C. albicans* en las superficies de catéteres, válvulas, implantes o tejidos del hospedador.

De modo preliminar, podemos concluir que la ausencia completa de proteína Pgs26 deriva en alteraciones importantes en la pared celular, que dan como resultado cambios en la sensibilidad a ciertas drogas, presentando una clara resistencia a caspofungina cuyo mecanismo de acción consiste en la inhibición de la enzima responsable de formar polímeros de glucano, esenciales para la estructura de la pared fúngica y a tunicamicina, que Inhibe la N-glicosilación.

(Figura III.13 y figura III.14). Las razones de este comportamiento pueden obedecer al hecho de que el mutante homocigótico contiene tres veces más de  $\beta$ -1,6-glucano que la cepa parental.

En cambio, los mutantes del gen *PGA26* son más sensibles que la cepa parental a ketoconazol, anfotericina B, fluconazol y posaconazol (Figura III.13 y figura III.14), estos antifúngicos tienen como diana el ergosterol presente en la membrana plasmática. Estos resultados pueden explicarse a partir de una alteración en alguno de los mecanismos de transporte de los antibióticos dentro de la célula o a defectos en la permeabilidad de la pared celular de los mutantes lo que quizás ayude a una mayor accesibilidad del fármaco a su diana en la membrana.

Las cepas heterocigóticas y homocigóticas fueron también sometidas a diferentes tipos de estrés: choque térmico, osmótico y oxidativo. Los mutantes para el gen *PGA26* presentaron una mayor resistencia al estrés ambiental de tipo térmico y osmótico que la cepa parental (CAI4), mientras que en el caso del estrés oxidativo, el mutante nulo fue ligeramente más sensible que la cepa parental (Figura III.17), lo que confirma la existencia de alteraciones importantes en la arquitectura y/o composición de la pared, ya que una de las funciones más importantes de la pared celular es la protección frente a agentes externos.

Durante el progreso de una infección *in vivo*, el microorganismo patógeno debe combatir o adaptarse a la situación de estrés impuesta por el sistema inmunitario del hospedador (Vázquez-Torres & Balish, 1997; Chauhan *et al.*, 2006). Por ejemplo en *C. albicans* después de la ingestión activa por macrófagos se encuentran altos niveles de formas reactivas del oxígeno (ROS). De hecho, esta levadura es relativamente resistente al estrés oxidativo (Sánchez-Fresneda, *et al.*, 2009) y ha desarrollado una respuesta antioxidante eficiente para sobrevivir después de la fagocitosis. (Vázquez-Torres & Balish, 1997; Chauhan *et al.*, 2006).

El disacárido no reductor trehalosa, actúa principalmente como fuente de energía y sistema de protección frente a estrés en levaduras y hongos (Thevelein, 1996; Argüelles, 2000; Elbein *et al.*, 2003). Donde el metabolismo de la trehalosa ha sido intensivamente estudiado en *C. albicans* en conexión con el dimorfismo de hongos, estrés oxidativo y protección, así como su posible implicación en la virulencia.

Debido a que la síntesis de trehalosa tiene un papel protector de la integridad celular frente a estrés, se ha valorado la concentración intracelular de trehalosa acumulada, cuando las cepas analizadas tanto los mutantes como el tipo parental, fueron sometidas a condiciones de estrés: choque térmico (42°C), estrés oxidativo (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a 5 y 50 mM) y estrés osmótico/salino (1,2 M NaCl) (Tabla III.3). Los cultivos del mutante interrumpido en un solo alelo del gen *PGA26* presentaron el mayor aumento en la cantidad de trehalosa endógena al ser sometidos a prácticamente todas las condiciones de estrés, excepto en el caso del estrés osmótico con NaCl, donde no se observaron diferencias significativas. Por el contrario, el tratamiento térmico a 42°C produjo el mayor aumento de la síntesis de este disacárido (Tabla III.3). El trabajo de Singer y Lindquist (1998), demuestra que la hidrólisis de trehalosa proporciona la energía necesaria para garantizar la recuperación del metabolismo celular después de un choque térmico agudo, formando parte de la denominada respuesta general frente a estrés; un mecanismo defensivo inducible en distinto grado dependiendo de cada tratamiento individual (González-Párraga *et al.*, 2008).

Por otra parte, se ha propuesto que la trehalosa podría actuar *in vivo* sinérgicamente con la familia de "Heat Shock Proteins" (HSPs) en la resistencia a choque térmico, y en cooperatividad positiva con las enzimas antioxidantes confiriendo protección de la integridad celular. (Craig *et al.*, 1993; Piper, 1993; Benaroudj *et al.*, 2001). Por consiguiente, en la investigación de nuevas dianas antifúngicas, las enzimas que participan en el metabolismo biosintético e hidrolítico de trehalosa han emergido como candidatas prometedoras, ya que este azúcar está presente en bacterias, hongos y plantas pero no en mamíferos. (Argüelles, 2000; Elbein *et al.*, 2003).

Se ha analizado la cinética de emisión de tubos germinativos bajo distintas condiciones experimentales de inducción, ya que este proceso en *C. albicans* está definido como un factor de virulencia. Debido a que el gen *PGA26* codifica una proteína putativa de pared, se consideró conveniente estudiar si la mutación de uno o los dos alelos de este gen podía afectar el cambio dimórfico. El programa de transición dimórfica levadura-micelio es inducible por una amplia variedad de condiciones ambientales; por ejemplo disponibilidad de nutrientes; factores físicos (pH, fuerza osmótica o temperatura) o por la adición de suero sanguíneo. El sistema de conversión blastoconidia-hifa comienza con la emisión de una estructura inicial denominada tubo germinativo y proporciona un modelo experimental muy sencillo y accesible para poder investigar cambios de desarrollo morfogenético (Niimi *et al.*, 1996).

El mutante nulo *pga26/pga26* presentó una mayor miceliación comparado con la cepa parental, y por ende una diferente morfología de colonias al crecer las células en medios que inducen miceliación (Figura III.21, figura III.22, figura III.23 y figura III.24). Los resultados obtenidos apuntan de modo preliminar, a una hipotética función de la proteína Pga26 como represor del proceso de filamentación. Cuando se procede a la interrupción de uno o los dos alelos del gen y sobre todo en el caso del mutante nulo, se registró un notable incremento en el porcentaje de blastoconidios capaces de emitir tubos germinativos dentro de un margen de tiempo relativamente corto (15 min ó 30 min) en relación con la cepa parental CAI4 (Tabla III.4). La mayoría de los genes implicados en la morfogénesis de hifas en *C. albicans* son homólogos a aquellos que participan en el crecimiento polarizado y pseudohifal en *S. cerevisiae*. Aunque hasta este momento no han sido identificados los sensores de señales ambientales, se ha demostrado que varias rutas de transducción de señales juegan un papel importante en la morfogénesis de *C. albicans* (Biswas *et al.*, 2007). Estas rutas de señalización intracelular forman una red compleja e interconectada que integra señales ambientales que controlan apropiadamente la morfogénesis y la transcripción (Figura I.8).

La inducción de hifas en el caso de las muestras transferidas a 37°C sin suero, manifestó un nivel muy bajo de desarrollo a lo largo del tiempo. No obstante, debemos señalar nuevamente la elevada capacidad de miceliación expresada por el mutante homocigótico. Según se muestra en el análisis comparativo en la tabla III.4, a las 2 h en ausencia de suero, el tipo parental CAI4 presentó un porcentaje de tubos germinativos en torno al 56%, siendo éste ligeramente superior en la estirpe heterocigótica con un 67%, mientras que el mutante nulo alcanzó prácticamente un 100% de filamentación en estas condiciones.

Otros procedimientos de inducción dimórfica han ofrecido resultados equivalentes (Figura III.18, figura III.19, figura III.20). Sin embargo, es preciso realizar estudios moleculares más precisos para esclarecer esta posible implicación de Pga26 en el programa morfogenético de *C. albicans*. Esta habilidad de cambiar su crecimiento de forma de levadura a micelio no sólo ha sido considerada un requisito importante para la virulencia (Saville *et al.*, 2003), si no que también juega un papel importante en la formación de biopelículas (Richard *et al.*, 2005); puesto que *C. albicans* al igual que otros patógenos, tiene la capacidad de adherirse y formar biopelículas en aparatos y prótesis implantadas en pacientes, especialmente catéteres intravasculares. Los microorganismos que forman biopelículas desarrollan una baja susceptibilidad a antifúngicos. (Nobile y Mitchell, 2006). En este trabajo el porcentaje de formación de biopelículas es mayor en el mutante homocigótico *pga26/pga26* con respecto a la cepa parental CAI4 (Figura III.25), este hecho podría estar en relación con la mayor capacidad de miceliación observada en estos mutantes.

A su vez, las formas miceliales de *C. albicans* expresan ciertas proteínas específicas de pared celular que pueden facilitar su adhesión a los tejidos de mamíferos, y son importantes durante el proceso de invasión de los mismos, así como para escapar de la fagocitosis por neutrófilos y macrófagos (Vázquez-Torres y Balish, 1997; Lorenz *et al.*, 2004; Enjalbert *et al.*, 2007). Aunque se ha considerado que la morfología miceliana es la predominante en la virulencia de *C. albicans*, la relación entre dimorfismo y patogenicidad no está clara (Lo *et al.*, 1997; Molero, *et al.*, 1998; Gow *et al.*, 2002). El análisis genético concluyente

demuestra que mutantes afectados en el proceso de filamentación son avirulentos (Köhler y Fink, 1996; Lo *et al.*, 1997). Sin embargo, en otros hongos dimórficos como *Histoplasma* o *Blastomyces*, las formas infectivas son predominantemente unicelulares (Cannon *et al.*, 1994). De hecho, la fase levaduriforme parece ser importante en la diseminación septicémica de *C. albicans* a través del sistema circulatorio (Berman y Sudbery, 2002).

En el caso del mutante nulo *pga26/pga26-URA*, se ha observado una menor virulencia que en CAI4-URA (Figura III.26), ya que presentó un porcentaje de supervivencia tras la infección experimental en ratones, de más del 60% (Figura III.26), mientras que en el caso del grupo de ratones inoculados con la cepa parental, dicho porcentaje de supervivencia es cero, quedando en una situación intermedia el mutante heterocigótico con un porcentaje de supervivencia de un poco más del 40% (Figura III.26), lo que corroboraría que la proteína Pga26 es importante para la virulencia de *C. albicans*, observándose además un efecto dosis-dependiente.

Para comprobar que el fenotipo observado en los mutantes era consecuencia directa de la disrupción de *PGA26*, una copia del gen fue reintegrada en el genoma de *C. albicans* en la cepa homocigótica *pga26/pga26* en el locus *LEU2*, utilizando el plásmido pBI-1 (Stoldt *et al.*, 1997). En este plásmido, el locus *PGA26* se encuentra bajo el control del promotor *PCK1*, que se reprime en presencia de glucosa. Como consecuencia de la reintegración del gen *PGA26*, la cepa reintegrante (RBIPGA26) se volvió más resistente a ketoconazol cuando el promotor fue inducido, comportándose de manera similar a la cepa parental (CAI4-URA) (Figura III.29). Los resultados obtenidos en este experimento, demostraron que los efectos fenotípicos observados tras deleccionar uno o los dos alelos de *PGA26*, serían consecuencia de la ausencia de este gen, y no a cualquier otro efecto producido en la célula, ya que la reintegración de *PGA26* bajo el control del promotor del gen *CaPCK1* en el mutante nulo, produjo la recuperación del fenotipo original observado para la cepa parental.

Con el fin de estudiar la expresión global de los genes de *C. albicans* en respuesta a la interrupción del gen *PGA26*, se realizó un estudio del transcriptoma del mutante nulo (cepa *pga26/pga26-URA*) utilizando micromatrices de ADN específicas de *C. albicans* (Figura III.30). A la vista de los resultados obtenidos, la interrupción completa del gen *PGA26* no altera la expresión diferencial de otros genes, ya que sólo 5 genes ven modificada su expresión en el mutante debido a la interrupción de *PGA26*: dos genes están sobreexpresados y tres genes reprimidos. De ellos, tres son de función desconocida, siendo uno de ellos *IFL4* similar a *PIR3* de *S. cerevisiae*. La falta de Pga26p en las condiciones estudiadas no causó cambios relevantes en el transcriptoma (Figura III.30), al contrario de lo que sucede con Cwt1p (Moreno *et al.*, 2007), 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. 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, puesto que controla la expresión de genes implicados en distintas funciones celulares (Moreno *et al.*, 2007) a pesar de que Cwt1 se ha relacionado con composición y arquitectura de pared, el gen *PGA26* no se ha visto modulado por Cwt1 en ninguna de las condiciones estudiadas, por lo que se considera que el factor de transcripción Cwt1 no regula la expresión de Pga26.



**CONCLUSIONES**



## V. CONCLUSIONES

1. El gen *PGA26* presenta dos alelos idénticos en el genoma de *C. albicans*. No es un gen esencial puesto que la interrupción del mismo no causa letalidad en este microorganismo, sin que se aprecien cambios significativos en el crecimiento.
2. Según los estudios *in silico*, Pga26 posee todas las características propias de una proteína de pared celular, tales como: presencia de péptido señal en la región N-terminal, un sitio teórico de anclaje glicofosfatidilinositol (GPI), un elevado porcentaje de serina y treonina y presencia de un sitio teórico de N-glicosilación.
3. La carencia de la proteína Pga26 funcional se manifestó en una serie de efectos pleiotrópicos, tales como una mayor sensibilidad a agentes que interfieren en la biogénesis de la pared celular, caso del calcofluor white, rojo Congo, SDS y también a la digestión con zimoliasa; lo que sugiere una posible alteración de la arquitectura y/o composición de la pared celular.
4. El análisis de la composición de polímeros de pared, reveló que el mutante nulo contiene tres veces más de  $\beta$ -1,6-glucano en su pared celular que la cepa parental. Este resultado sugiere que la carencia de Pga26 ocasiona una alteración en la composición de la pared celular.
5. El mutante homocigótico presenta diferencias muy notables en la sensibilidad y resistencia a algunas drogas, siendo más resistente a tunicamicina y caspofungina y más sensible a ketoconazol, anfotericina B, fluconazol y posaconazol que la cepa parental.
6. Tanto el mutante heterocigótico como el homocigótico en el gen *PGA26* muestran una mayor resistencia al estrés ambiental (térmico 55 °C y osmótico  $\text{CaCl}_2$ ), siendo ligeramente más sensibles al estrés oxidativo ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) en comparación con la cepa parental CAI4.

7. El mutante nulo *pga26/pga26-URA* desarrolla una rápida e intensa capacidad de miceliación respecto a la cepa parental y, en consecuencia, una morfología de colonias diferente, al crecer las células en medios que inducen formación de hifas, por lo que Pga26 podría actuar como represor del proceso.
8. El porcentaje de formación de biopelículas esta incrementado en los mutantes heterocigótico (*PGA26/pga26-URA*) y homocigótico (*pga26/pga26-URA*), en comparación a la cepa parental.
9. El mutante nulo *pga26/pga26-URA* presenta una menor virulencia que CA14-URA, una clara evidencia de que la presencia de Pga26 en la célula puede ser importante para la virulencia de *C. albicans*, quedando el mutante heterocigótico en una situación intermedia, lo que indicaría un efecto dosis dependiente.
10. Según el análisis del perfil transcripcional, la ausencia de Pga26 no altera significativamente la expresión de otros genes, bajo las condiciones estudiadas.

## **BIBLIOGRAFÍA**



- Adler-Moore, J., Proffitt, R.T.** 2002. AmBisome: liposomal formulation, structure, mechanism of action and pre-clinical experience. *J. Antimicrob. Chemother.*, **49**: 21-30.
- 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**: 541-545.
- Alarco, A., Raymond, M.** 1999. The bz1p transcription factor Cap1p is involved in multidrug resistance and oxidative stress response in *Candida albicans*. *J. Bacteriol.*, **181**: 700-708.
- Albertyn, J., Hohmann S., Thevelein, J., Prior, B.** 1994. GPD1, which encodes glycerol-3-Phosphate dehydrogenase, is essential for growth under osmotic stress in *Saccharomyces cerevisiae*, and its expression is regulated by the high-osmolarity glycerol response pathway. *Mol. & Cell. Biol.*, **14**: 4135-4144.
- Alonso-Monge, R., Navarro-Garcia, F., Roman, E., Negredo, A.I., Eximan, B., Nombela, C., Pla, J.** 2003. The Hog1 mitogen-activated kinase is essential in the oxidative stress response and chlamyospore formation in *Candida albicans*. *Eukaryot. Cell*, **2**: 351-361.
- Argüelles, J.C., Rodriguez, T., Álvarez-Peral, F.J.** 1999. Trehalose hydrolysis is not required for human serum-induced dimorphic transition in *Candida albicans*: evidence from a *tps1/tps1* mutant deficient in trehalosa síntesis. *Res. Microbiol.*, **150**: 521-529.
- Argüelles, J.C.** 2000. Physiological roles of trehalose in bacteria and yeast: a comparative analysis. *Arch. Microbiol.*, **174**: 217-224.
- Aubert, S., Cottier, F., Garcia-Sanchez, S., Goyard, S., Mateen F.** 2003. Formation de biofilms par *Candida albicans*. Activity Reports 2003 Institut Pasteur. Fungal Biology and Pathogenicity-INRA.
- Au-Yonung, J., Robbins, P.W.** 1990. Isolation of a chitin synthetase gene (*CHS1*) from *Candida albicans* by expression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Microbiol.*, **4**: 197-207.
- 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**: 1121-1129.
- Bacon, J.S.D., Farmer, V.C., Jones, D., Taylor, I.F.** 1969. The glucan components of the cell wall of baker's yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) considered in relation to its ultrastructure. *Biochem. J.*, **114**: 557-567.
- Ballou, C.E.** 1976. Structure and biosynthesis of the mannan component of the yeast cell envelope. *Ad. Microbiol. Physiol.*, **14**: 93.
- Ballou C.E.** 1982. Yeast cell wall and cell surface. In: Strathern, J.N., Jones, J.W., Broach, J.R. The molecular biology of the yeast *Saccharomyces*. Cold Spring Harbor, New York, 335-360.
- Ballou, C.E.** 1990. Isolation, characterization, and properties of *Saccharomyces cerevisiae mnn* mutants with non-conditional protein glycosylation defects. *Methods Enzymol.*, **185**: 440-470.
- Bartie, K.L., Williams, D.W., Wilson, M.J., Potts, A.J., Lewis, M.A.** 2001. PCR fingerprinting of *Candida albicans* associated with chronic

hyperplastic candidosis and other oral conditions. *J. Clin. Microbiol.*, **39**: 4066-4075.

**Benaroudj, N., Lee, D.H., Golberg, A.L.** 2001. Trehalose accumulation during cellular stress protects cells and cellular protein from damage by oxygen radicals. *J. Biol. Chem.*, **276**: 24261-24267.

**Bennett, D.E., McCreary, C.E., Coleman, D.C.** 1998. Genetic characterization of a phospholipase C gene from *Candida albicans*: presence of homologous sequences in *Candida* species other than *Candida albicans*. *Microbiology*, **144**: 55-72.

**Bennett, R.J., Johnson, A.D.** 2005. Mating in *Candida albicans* and the search for a sexual cycle. *Annu. Rev. Microbiol.*, **59**: 233-255.

**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**: 1335-1351.

**Berlett, B.S., Standtman, E.R.** 1997. Protein oxidation in aging, disease and oxidative stress. *J. Biol. Chem.*, **272**: 20313-20316.

**Berman, J., Sudbery, E.** 2002. *Candida albicans*: a molecular revolution built on lessons from budding yeast. *Nature Genetics*, **3**: 918-930.

**Bertram, G., Swoboda, R.K., Gooday, G.W., Gow, N.A., Brown, A.J.** 1996. Structure and regulation of the *Candida albicans* *ADH1* gene encoding an immunogenic alcohol deshydrogenase. *Yeast*, **12**: 115-127.

**Biely, P.** 1978. Changes in the rate of synthesis of wall polysaccharides

during the cell cycle of yeast. *Arch. Microbiol.*, **119**: 213-214.

**Biswas, S., Van Dijck, P., Datta, A.** 2007. Environmental sensing and signal transduction pathways regulating morphopathogenic determinants of *Candida albicans*. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, **71**: 348-376.

**Blázquez, M.A., Gancedo, J.M., Gancedo, C.** 1994. Use of *Yarrowia lipolytica* hexokinase for the quantitative determination of trehalose 6-phosphate. *FEMS Microbiol. Lett.*, **121**: 223-227.

**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**: 1833-1843.

**Borg-von-Zepellin, M., Beggah, S., Boggian, K., Sanglard, D., Monod, M.** 1998. The expression of the secreted aspartyl proteinases Sap4 to Sap6 from *Candida albicans* in murine macrophages. *Mol. Microbiol.*, **28**: 543-554.

**Bouali, A., Robert, R., Tronchin, G., Senet, J.M.** 1986. Binding of human fibrinogen to *Candida albicans* *in vitro*: a preliminary study. *J. Med. Vet. Mycol.*, **24**: 345-348.

**Bouchara, J.P., Tronchin, G., Annaix, V., Robert, R., Senet, J.M.** 1990. Laminin receptors on *Candida albicans* germ tubes. *Infect. Immun.*, **58**: 48-54.

**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**: 248-254.
- Braun, B.R., Johnson, A.D.** 1997. Control of filament formation in *Candida albicans* by the transcriptional repressor *TUP1*. *Science*, **277**: 105-109.
- 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**: 4753-4761.
- Brown, A.J.P.** 2002. Morphogenetic signalling pathways in *Candida albicans*. In: Calderone, R.A. (ed.). *Candida and Candidiasis*. Washington, D.C. American Society for Microbiology Press., 95-106.
- Brown, C.C., Baker, D.C., Barker, I.K.** 2007. Mycotic diseases of the gastrointestinal tract. In: M.G. Maxie, Editor, Jubb, Kennedy, and Palmer's Pathology of Domestic Animals, Elsevier, Philadelphia, 229-231.
- Buffo, J., Herman, M.A., Soll, D.R.** 1984. A characterization of pH-regulated dimorphism in *Candida albicans*. *Mycopathologia*, **85**: 21-30.
- Bulawa, C.E.** 1993. Genetics and molecular biology of chitin synthesis in fungi. *Ann. Rev. Microbiol.*, **47**: 505-534.
- Burnett, J.H.** 1979. Aspects of the structure and growth of hyphal walls. In: Burnett, J. H. Ad Trinci, A.P.J. (Eds) Fungal walls and hyphal growth. Cambridge University Press, Cambridge, 1-25.
- Cabib, E., Bowers, B.** 1971. Chitin and yeast budding: localization of chitin in yeast bud scars. *J. Biol. Chem.*, **246**: 152-159.
- Cabib, E., Roberts, R., Bowers, B.** 1982. Synthesis of the yeast cell wall and its regulation. *Annu. Rev. Biochem.*, **51**: 763.
- Cabib, E., Kang, M.S.** 1987. Fungal 1,3- $\beta$ -glucan synthase. *Methods Enzymol.*, **138**: 637-642.
- Cabib, E., Silverman, S.J., Shaw, J.A.** 1992. Chitinase and chitin synthase I: counter balancing activities in cell separation of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Gen. Microbiol.*, **133**: 97-102.
- Calderone, R.A., Braun, P.C.** 1991. Adherence and receptor relationships of *Candida albicans*. *Microbiol. Rev.*, **55**: 1-20.
- Calderone, R.A.** 1993. Recognition between *Candida albicans* and host cells. *Trends Microbiol.*, **1**: 55-58.
- Calderone, R.A., Diamond, R.D., Senet, J.M., Warmington, J., Filler, S., Edwards, J.E.J.** 1994. Host-cell fungal interactions. *J. Med. Vet. Mycol.*, **32**: 151-168.
- Cannon, R.D., Timberlake, W.E., Gow, N.A., Bailey, D., Brown, A., Goodway, G.W., Hune, B., Monod, M., Nombela, C., Navarro, F., Pérez, R., Sánchez, M., Pla, J.** 1994. Molecular biological and biochemical aspects of fungal dimorphism. *J. Med. Vet. Mycol. Rev.*, **32**: 53-64.
- Cao, Y., Wang, Y., Dai, B., Wang, B., Zhang, H., Zhu, Z., Xu, Y., Jiang, Y., Zhang, G.** 2008. Trehalose is an important mediator of Cap1p oxidative

stress response in *Candida albicans*. *Biol. Pharm. Bull.*, **31**: 421-425.

**Cappellaro, C., Hauser, K., Mrsa, V., Watzele, M., Warzele, G., Gruber, C., Tanner, W.** 1991. *Saccharomyces cerevisiae* a-agglutinin and  $\alpha$ -agglutinin. Characterization of their molecular interaction. *EMBO J.*, **10**: 4081-4088.

**Cappellaro, C., Mrsa, V., Taner, W.** 1998. New potential cell wall glucanases of *Saccharomyces cerevisiae* and their involvement in mating. *J. Bacteriol.*, **180**: 5030-5037.

**Caro, L., Tettelin, H., Vossen, J., Ram, A., Van den Ende, H., Klis, F.** 1997. *In silico* identification of glycosyl-fosfatidy linositol-anchored plasma membrane and cell wall proteins of *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*, **13**: 1477-1489.

**Cassone, A.** 1973. Improved visualization of wall ultrastructure in *Saccharomyces cerevisiae*. *Experientia*, **29**: 1303.

**Cassone, A., Sullivan, P.A., Shepherd, M.G.** 1984. N-acetyl-D-glucosamine induced morphogenesis in *Candida albicans*. *Microbiologica*, **18**: 77.

**Cassone, A.** 1989. Cell wall of *Candida albicans*: its functions and its impact on the host. *Curr. Top. Med. Mycol.*, **3**: 248-314.

**Cassone, A.** 2008. Fungal vaccines: real progress from real challenges. *The Lancet Infectious Diseases*, **8**: 114-124.

**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  $\beta$ -1,3-glucan. *Yeast*, **20**: 973-983.

**Castillo, L., Martínez, 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**: 124-134.

**Chaffin, W.L., Lopez-Ribot, J.L., Casanova, M., Gonzalbo, D., Martinez, J.P.** 1998. Cell wall and secreted proteins of *Candida albicans*: identification, function, and expresión. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, **62**: 130-180.

**Chandra, J., Kuhn, D.M., Mukherjee, P.K., Hoyer, L.L., McCormick, T., Ghannoum, M.A.** 2001. Biofilm formation by the fungal pathogen *Candida albicans*: development, architecture, and drug resistance. *J. Bacteriol.*, **183**: 5385-5394.

**Chang, H.C., Leaw, S.N., Huang, A.H., Wu, T.L., Chang, T.C.** 2001. Rapid identification of yeasts in positive blood cultures by a multiplex PCR method. *J. Clin. Microbiol.*, **39**: 3466-3471.

**Chang, A., Neofytos, D., Horn, D.** 2008. Candidemia in the 21st Century. *Future Microbiol.*, **3**: 463-472.

**Chattaway, F.W., Holmes, M.R., Barlow, A.J.E.** 1968. Cell wall composition of the mycelial and blastospore forms of *Candida albicans*. *J. Gen. Microbiol.*, **51**: 367.

**Chauhan N., Latje, J.P., Calderone, R.** 2006. Signalling and oxidant adaptation in *Candida albicans* and *Aspergillus fumigatus*. *Nat. Rev. Microbiol.*, **4**: 435-444.

- Chou, S., Lane, S., Liu, H.** 2006. Regulation of mating and filamentation genes by two distinct Ste12 complexes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.*, **26**: 4794-4805.
- Cid, V.J., Durán, A., Del Rey, F., Snyder, M.P., Nombela, C., Sanchez, M.** 1995. Molecular basis of cell integrity and morphogenesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol. Rev.*, **59**: 345-386.
- Colaço, C., Sen, S., Thangevalu, M., Prinder, S., Roser, B.** 1992. Extraordinary stability of enzymes dried in trehalose: simplified molecular biology. *Biotechnology*, **10**: 1007-1011.
- Collina, A.R., Aumont, F., Deslauriers, N., Belhumeur, P., De Repentigny, L.** 1996. Evidence for degradation of gastrointestinal mucin by *Candida albicans* secretory aspartyl proteinase. *Infect. Immun.*, **64**: 4514-4519.
- Craig, E., Gambill, B.D., Nelson, R.J.** 1993. Heat shock proteins: Molecular chaperones of protein biogenesis. *Microbiol. Rev.*, **57**: 402-414.
- Crowe, J.H., Crowe, L.M., Chapman.** 1984. Preservation of membranes in anhydrobiotic organisms. *Science*, **223**: 701-703.
- Crowe, J.H., Crowe, L.M., Oliver, A.E., Tsevetkova, N., Wolkers, W., Tablin, F.** 2001. The trehalose myth revisited: introduction to a symposium on stabilization of cells in the dry state. *Cryobiology*, **43**: 89-105.
- Crowe, J.H.** 2007. Trehalose as a "chemical chaperone": fact and fantasy. *Med. Biol.*, **594**: 143-158.
- Csank, C., Schroppel, K., Leberer, E., Harcus, 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**: 2713-2721.
- Cutler, J.E.** 1991. Putative virulence factors of *Candida albicans*. *Annu. Rev. Microbiol.*, **45**: 187-218.
- De Groot, P.W., Hellingwerf, K.J., Klis, F.M.** 2003. Genome-wide identification of fungal GPI proteins. *Yeast*, **20**: 781-796.
- 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**: 955-965.
- 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**: 491-499.
- De Nobel, J.G., Barnett, J.A.** 1991. Passage of molecules through yeast cell walls: a brief essay-review. *Yeast*, **7**: 313-323.
- De Nobel, J.G., Klis, F.M., Ram, A., Van Unen, H., Priem, J., Munnik, T., Van Den Ende, H.** 1991. Cyclic variations in the permeability of the cellwall of *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*, **7**: 589-598.
- De Nobel, H., Lipke, P.N.** 1994. Is there a role for GPIs in yeast cell-wall assembly? *Trends in Cell Biol.*, **4**: 41-45.
- DeMuri, G.P., Hostetter, M.K.** 1996. Evidence for beta 1 integrin

fibronectin receptor in *Candida tropicalis*. *J. Infect. Dis.*, **174**: 127-132.

**Díaz, S., Zinker, S., Ruiz-Herrera, J.** 1992. Alterations in the cell wall of *Saccharomyces cerevisiae* induced by the  $\alpha$  sex factor or a mutation in the cell cycle. *Antonie Leeuwenhoek.*, **61**: 269-276.

**Dijkgraaf, G.J., Brown, J.L., Bussey, H.** 1996. The *KNH1* gene of *Saccharomyces cerevisiae* is a functional homolog of *KRE9*. *Yeast*, **12**: 683-692.

**Dinubile, M.J., Lupinacci, R.J., Berman, R.S., Sable, C.A.** 2002. Response and relapse rates of candidal esophagitis in HIV-infected patients treated with caspofungin. *AIDS Res. Hum. Retroviruses.* **18**: 903-908.

**Dix, S.P., Andriole, V.T.** 2000. Lipid formulations of amphotericin B. *Curr. Clin. Top. Infect. Dis.*, **20**: 1-23.

**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**: 3167-3180.

**Douglas, C.M., Foor, F., Marrinan, J.A., Morin, N., Nielsen, J.B., Dahl, A.M., Mazur, P., Baginsky, W., Li, W., El-Sherbeini, M., Clemas, J.A., Mandale, S.M., Frommer, B. R., Kurtz, M.B.** 1994. The *S. cerevisiae* *FKS1* (*ETG1*) gene encodes an integral membrane protein which is a subunit of 1,3 - $\beta$ -D-glucan synthase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **91**: 12907-12911.

**Douglas, L.J.** 2003. *Candida* biofilms and their role in infection. *Trends Microbiol.*, **11**: 30-36.

**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**: 350-356.

**Drgonova, J., Drgon, T., Tunuka, K., Kollár, R., Chen, C.G., Ford, R.A., Chan, C.S., Takai, Y., Cabib, E.** 1996. Rho1p, a yeast protein at the interface between cell polarization and morphogenesis. *Science*, **272**: 277-279.

**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**: 11523-11529.

**Eckert, S.E., Heinz, W.J., Zakikhany, K., Thewes, S., Haynes, K., Hube, B., Mühlischlegel, F.A.** 2007. *PGA4*, a *GAS* homologue from *Candida albicans*, is up-regulated early in infection processes *Fung. Genet. and Biol.*, **44**: 368-377.

**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**: 243-253.

**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 chlamyospore formation in the fungal pathogen *Candida albicans*. *Eukaryot. Cell*, **5**: 347-358.

**Elbein, A.D., Pan, Y.T., Pastuszak, I., Carroll, D.** 2003. New insights on trehalosa: a multifunctional molecule. *Glycobiology*, **13**: 17-27.

**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**: 1577-1582

**Elorza, M.V., Murgui, A., Sentandreu, R.** 1985. Dimorphism in *Candida albicans*: contribution of the mannoproteins to the architecture of yeast and mycelial cell walls. *J. Gen. Microbiol.*, **131**: 2209-2216.

**Elorza, M.V., Marcilla, A., Sentandreu, R.** 1988. Wall mannoproteins of the yeast and mycelial cells of *Candida albicans*: nature of glycosidic bonds and the polydispersity of their mannan moieties. *J. Gen. Microbiol.*, **134**: 2393-2403.

**d'Enfert, C., Goyard, S., Rodríguez-Arnaveilhe, S., Frangeul, L., Jones, L., Tekaia, 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-D357.

**Eng, W., Faucette, L., McLaughlin, M.M., Cafferkey, R., Koltin, Y., Morris, R.A., Young, P.R., Johnson, R.K., Livi, G.P.** 1994. The yeast

*FKS1* gene encodes a novel membrane protein, mutations in which confer FK506 and cyclosporin A hypersensitivity and calcineurin dependent growth. *Gene*, **151**: 61-71.

**Enjalbert, B., Nantel, A., Whiteway, M.** 2003. Stress- induced gene expression in *candida albicans*: absence of a general stress response. *Mol. Biol. Cell.*, **14**: 1460-1467.

**Enjalbert, B., MacCallum, D.M., Odds, F.C., Brown, A.J.** 2007. Niche-specific activation of the oxidative stress response by the pathogenic fungus *Candida albicans*. *Infect. Immun.*, **75**: 2143-2151.

**Ernst, J.F.** 2000. Transcription factors in *Candida albicans*-environmental control of morphogenesis. *Microbiology*, **146**: 1763-1774.

**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**: 313-320.

**Estruch, F.** 2000. Stress controlled transcription factors, stress-induced genes and stress tolerance in budding yeast. *FEMS Microbiol.*, **24**: 469-486.

**Feng, Q., Summers, E., Guo, B., Fink, G.** 1999. Ras signaling is required for serum-induced hyphal differentiation in *Candida albicans*. *J. Bacteriol.*, **181**: 6339-6346.

**Fidel, P.L., Sobel, J.D.** 1996. Immunopathogenesis of recurrent vulvovaginal candidiasis. *Clin. Microbiol. Rev.*, **9**: 335-348.

**Fidel, P.L.Jr., Vazquez, J.A., Sobel, J.D.** 1999. *Candida glabrata*: review of epidemiology, pathogenesis, and clinical disease with comparison to *C. albicans*. *Clin. Microbiol. Rev.*, **12**: 80-96.

- Fleet, G.H., Manners, D.J.** 1976. Isolation and composition of an alkali-soluble glucan from the cell wall of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Gen. Microbiol.*, **94**: 180-192.
- Fleet, G.H., Manners, D.J.** 1977. The enzymatic degradation of an alkali-soluble glucan from the cell wall of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Gen. Microbiol.*, **98**: 315-327.
- Fleet, G.H.** 1991. Cell walls. In: Rose, A.H., Harrison, J.S. The yeasts, vol 4. Academic Press, Inc., London, 200-277.
- Fonzi, W.A., Irwin, M.Y.** 1993. Isogenic strain construction and gene mapping in *Candida albicans*. *Genetics*. **134**: 717-728.
- Fridkin, S.K.** 2005. The changing face of fungal infections in health care settings. *Clin. Infect. Dis.*, **41**: 1455-1460.
- Fujimura, H., Sakuma, Y.** 1993. Simplified isolation of chromosomal and plasmid DNA from yeasts. *Biotechniques*, **14**: 538-540.
- Fujita, S.I., Senda, Y., Nakaguchi, S., Hashimoto, T.** 2001. Multiplex PCR using internal transcribed spacer 1 and 2 regions for rapid detection and identification of yeast strains. *J. Clin. Microbiol.*, **39**: 3617-3622.
- Garcerá, 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**: 2137-2145.
- Garcerá, A., Castillo, L., Martínez, A., Elorza, M.V., Valentín, E., Sentandreu, R.** 2005. Anchorage of *Candida albicans* Ssr1 to the cell wall, and transcript profiling of the null mutant. *Res. Microbiol.*, **156**: 911-920.
- García, J.M.** 2008. Biotipado molecular de hongos con interés clínico y su aplicación en el diagnóstico y la epidemiología. Tesis doctoral, Universitat de Valencia.
- García-Sánchez, 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**: 2913-2925.
- Gattiker, A., Gasteiger, E., Bairoch, A.** 2002. SCANPROSITE: a reference implementation of a PROSITE scanning tool. *Appl. Bioinform.*, **1**: 107-108.
- Gaur, N.K., Klotz, S.A.** 1997. Expresión, clonación, and characterization of a *Candida albicans* gene *ALA1*, that confers adherence properties upon *Saccharomyces cerevisiae* for extracellular matrix proteins. *Infect. Immun.*, **65**: 5289-5294.
- Gentry, L.O., Price, M.F.** 1985. Urinary and genital *Candida* infections. In: Bodey, G.P. y Farstein, 5. eds., *Candidiasis*. Raven Press, New York. 169-179.
- 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.*, **25**: 1420-1425.
- Gimeno, C.J., Fink, G.R.** 1994. Induction of pseudohyphal growth by overexpression of *PHD1*, a *Saccharomyces cerevisiae* gene related to transcriptional regulators of fungal development. *Mol. Cell Biol.*, **14**: 2100-2112.

- Goldman, R.C., Sullivan, P.A., Zakula, D., Capobianco, J.O.** 1995. Kinetics of  $\beta$ -1,3glucan interaction at the donor and acceptor sites of the fungal glucosyltransferase encoded by the *BGL2* gene. *Eur. J. Biochem.*, **227**: 372-378.
- González-Párraga, P., Sanchez-Fresneda, R., Martinez-Esparza, M., Argüelles, J.C.** 2008. Stress responses in yeast: what rules apply?. *Arch. Microbiol.*, **189**: 293-296.
- Gooday, G.W., Trinci, A.P.J.** 1980. Wall structure and biosynthesis in fungi. *Sym. Soc. Gen. Microbiol.*, **30**: 207.
- Gopal, P., Shepherd, M.G., Sullivan, P.A.** 1984a. Analysis of wall glucans from yeast, hyphal and germ-tube forming cells of *Candida albicans*. *J. Gen. Microbiol.*, **130**: 3295.
- Gopal, P., Sullivan, P.A., Shepherd, M. G.** 1984b. Isolation and structure of glucan from regenerating spheroplasts of *Candida albicans*. *J. Gen. Microbiol.*, **130**: 1217.
- Gow, N.A.R., Gooday, G.W.** 1982. Vacuolation, branch production and linear growth of germ tubes in *Candida albicans*. *J. Gen. Microbiol.*, **128**: 2195-2198.
- 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**: 6216-6220.
- Gow, N.A.R.** 1995. Yeast-hyphal dimorphism. In: Gow, N.A.R., Gadd, G.M. eds. *The growing fungus*. Chapman and Hall, London, 403-422.
- Gow, N.A.R., Brown, A.J., Odds, F.C.** 2002. Fungal morphogenesis and host invasion. *Curr. Opin. Microbiol.*, **5**: 366-371.
- Greene, C.E., Chandler, F.W.** 2006. *Candidiasis* and rhodotorulosis. In: C.E. Greene, Editor. *Infectious Diseases of the Dog and Cat*, Elsevier, St. Louis, 627-633.
- Guhad, F.A., Csank, C., Jensen, H.E., Thomas, D.Y., Whiteway, M., Hau, J.** 1998. Reduced pathogenicity of a *Candida albicans* MAP kinase phosphatase (CPP1) mutant in the murine mastitis model. *APMIS*, **106**: 1049-1055.
- Gupta, A.K., Tomas, E.** 2003. New antifungal agents. *Dermatol. Clin.*, **21**: 565-576.
- Hamada, K., Fukuchi, S., Arisawa, M., Baba, M., 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*. In: Glover D.M, ed. *DNA cloning: a practical approach*. Oxford, IRL Press, 109-135.
- Hard, K., Bitter, W., Kamerling, J.P., Vliegthart, J.F.G.** 1989. O-Mannosylation of Recombinant Human Insulin-like Growth Factor I (IGFI) Produced in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett.*, **248**: 111-114.
- Hartland, R.P., Vermeulen, C.A., Klis, F.M., Sietsma, J.H., Wessels, J.G.H.** 1994. The linkage of (1,3)- $\beta$ -glucan to chitin during cell wall assembly in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*, **10**: 1591-1599.
- Hinnebusch, A.G.** 1990. Involvement of an initiation factor and protein phosphorylation in translational control

of GCN4 mRNA. *Trends Biochem. Sci.*, **15**: 148-152.

**Hohmann, S., Mager, W.H.** 2003. Yeast stress responses. *Topic. Curr. Genet.*, Springer. Berlin.

**Hottiger, T., Boller, T., Wiemken, A.** 1987. Rapid changes of heat and desiccation tolerance correlated with changes of trehalose content in *Saccharomyces cerevisiae* cells subjected to temperature shifts. *FEBS Lett.*, **220**: 113-115.

**Hottiger, T., Boller, T., Wiemken, A.** 1989. Correlation of trehalose content and heat resistance in yeast mutants altered in the RAS/adenylate cyclase pathway: is trehalose a thermoprotectant? *FEBS. Lett.*, **4**: 255-431.

**Hottiger, T., De Virgilio, C., Hall, M., Boller, T., Wiemken, A.** 1994. The role of trehalose synthesis for the acquisition of thermotolerance in yeast. II. Physiological concentrations of trehalose increase the thermal stability of proteins *in vitro*. *Eur. J. Biochem.*, **219**: 187-193.

**Hoyer, L.L., Scherer, S., Shtazman, 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**: 176-180.

**Hoyer, L.L., Green, C.B., Oh, S.H., Zhao, X.** 2008. Discovering the secrets of the *Candida albicans* agglutinin-like sequence (ALS) gene family - a sticky pursuit. *Med. Mycol.*, **46**: 1-15.

**Hube, B., Monod, M., Schofield, D.A., Brown, A.J., Gow, N.A.** 1994. Expression of seven members of the

gene family encoding secretory aspartyl proteinases in *Candida albicans*. *Mol. Microbiol.*, **14**: 87-99.

**Hube, B., Hess, D., Baker, C.A., Schaller, M., Schafer, W., Dolan, J.W.** 2001. The role and relevance of phospholipase D1 during growth and dimorphism of *Candida albicans*. *Microbiology*, **147**: 879-889.

**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., Bannno, Y., Cole, G.T., Kitajima, Y., Edwards, J.E.Jr., Nozawa, Y., Ghannoum, M.A.** 1995. Evidence implicating phospholipase as a virulent factor of *Candida albicans*. *Infect. Immun.*, **63**: 1993-1998.

**Inoue, S.B., Takewaki, N., Takasuka, T., Mio, T., Adachi, M., Fujii, J., Miyamoto, C., Arisawa, M., Furuichi, Y., Watanabe, T.** 1995. Characterization and gene cloning of 1,3- $\beta$ -D-glucan synthase from *Saccharomyces cerevisiae*. *Eur. J. Biochem.*, **321**: 845-854.

**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**: 429-435.

**Jorge, J.A., Polizeli, L.T., Thevelein, J.M., Terenzi, H.F.** 1997. Trehalases and trehalose hydrolysis in fungi. *FEMS Microbiol. Lett.*, **154**: 165-171.

**Kapteyn, J.C., Montijn, R.C., Vink, E., De La Cruz, J., Llobell, A., Douwes, J.E., Shimoi, H., Lipke, P.N., Klis, F.M.** 1996. Retention of *Saccharomyces cerevisiae* cell wall proteins through a phosphodiester-

- linked  $\beta$ -1,3 /  $\beta$ -1,6-glucan heteropolymer. *Glycobiol.*, **6**: 337-345.
- 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**: 601-611.
- Kartsonis, N.A., Nielsen, J., Douglas, C.M.** 2003. Caspofungin: the first in a new class of antifungal agents. *Drug Resist. Updat.*, **6**: 197-218.
- Katz, D., Rosemberg, R.F.** 1971. Hyphal wall synthesis in *Aspergillus nidulans*: effect of protein synthesis inhibition and osmotic shock on chitin insertion and morphogenesis. *J. Bacteriol.*, **108**: 184-190.
- Klebl, F., Tanner, W.** 1989. Molecular cloning of a cell wall exo- $\beta$ -1,3-glucanase from *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Bacteriol.*, **171**: 6279-6264.
- Klis, F.M.** 1994. Review: 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**: 239-256.
- Klis, F.M., Boorsma, A., De Groot, P.W.** 2006. Cell wall construction in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*, **23**: 185-202.
- Klotz, S.A., Drutz, D.J., Zajic, J.E.** 1985. Factors governing adherence of *Candida* species to plastic surfaces. *Infect. Immun.*, **50**: 97-101.
- Kobayashi, S.D., Cutler, J.E.** 1998. *Candida albicans* hyphal formation and virulence: is there a clearly defined role?. *Trends. Microbiol.*, **6**: 42-44.
- Köhler, J.R., Fink, G.R.** 1996. *Candida albicans*: strains heterozygous and homozygous for mutations in mitogen-activated protein kinase signalling components have defects in hyphal development. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **93**: 13223-13228.
- Kollár, 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**: 1170-1178.
- 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**: 17762-17775.
- Kontoyiannis, D.P., Vaziri, I., Hanna, H.A., Boktour, M., Thornby, J., Hachem, R., Bodey, G.P., Raad, I.I.** 2001. Risk factors for *Candida tropicalis* fungemia in patients with cancer. *Clin. Infect. Dis.*, **33**: 1676-1681.
- Kopecka, M., Phaff, H.J., Fleet, G.H.** 1974. Demonstration of a fibrillar component in the wall of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* and its chemical structure. *J. Cell. Bol.*, **62**: 66-76.
- 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**: 115-126.

**Kreger, D.R., Kopecka, M.** 1976. On the nature and formation of the fibrillar nets produced of protoplasts of *Saccharomyces cerevisiae* in liquid media: an electromicroscopic, x-ray diffraction and chemical study. *J. Gen. Microbiol.*, **92**: 207.

**Kumamoto, C.A.** 2002. *Candida* biofilms. *Curr. Opin. Microbiol.*, **5**: 608-611.

**Kumar, M.J., Jamaluddin, M.S., Natarajan, K., Kaur, D., Datta, A.** 2000. The inducible N-acetylglucosamine catabolic pathway gene cluster in *Candida albicans*: discrete N-acetylglucosamine-inducible factors interact at the promoter of *NAG1*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **97**: 14218-14223.

**Kurtzman, C.P.** 2000. Systematics and Taxonomy of Yeasts. In: J.F. Ernst, A. Schmidt (eds), Dimorphism in Human Pathogenic and Apathogenic Yeasts. Contributions to Microbiology. Basel, Karger, vol 5, 1-14.

**Lane, S., Birse, C., Zhou, S., Matson, R., Liu, H.** 2001. DNA array studies demonstrate convergent regulation of virulence factors by Cph1, Cph2, and Efg1 in *Candida albicans*. *J. Biol. Chem.*, **276**: 48988-48996.

**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. USA*, **93**: 13217-13222.

**Lee, K.L., Buckley, H.R., Campbell, C.** 1975. An aminoacid liquid synthetic medium for development of mycelial and yeast forms of *Candida albicans*. *Sabouradia*, **13**: 148-153.

**Lee, K.B., Loganathan, D., Merchant, Z.M., Linhardt, R.J.** 1990. A review. Carbohydrate Analysis of Glycoproteins. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, **23**: 53-79.

**Lehle, L., Roitsch, T., Strahl, S., Tanner, W.** 1991. Synthesis of mannoproteins in *Saccharomyces cerevisiae*. In: Fungal cell wall and immune response. Latgé, J.P., Buocias, D. (Eds). Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 69-80.

**Lehmann, P.F., Lin, D., Lasker, B.A.** 1992. Genotypic identification and characterization of species and strains within the genus *Candida* by using random amplified polymorphic DNA. *J. Clin. Microbiol.*, **30**: 3249-3254.

**Leibovitz, E.** 2002. Neonatal candidosis: clinical picture, management controversies and consensus, and new therapeutic options. *J. Antimicrob. Chemother*, **49**: 69-73.

**Lewis, K.** 2008. Multidrug tolerance of biofilms and persister cells. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.*, **322**: 107-131.

**Lillie, S.H., Pringle, J.R.** 1980. Reserve carbohydrate metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*: responses to nutrient limitations. *J. Bacteriol.*, **143**: 1384-1394.

**Lins, R.D., Pereira, C.S., Hünenberger, P.H.** 2004. Trehalose-protein interaction in aqueous solution. *Proteins*, **55**: 177-186.

**Liotta, L.A., Rao, N., Wewer, U.M.** 1986. Biochemical interactions of tumor cells with the basement

- membrane. *Ann. Rev. Biochem.*, **55**: 1037-1057.
- Lipke, P.N., Wojciechowicz, D., Kurjan, J.** 1989. AG alpha 1 is the structural gene for the *Saccharomyces cerevisiae* alpha-agglutinin, a cell surface glycoprotein involved in cell-cell interactions during mating. *Mol. Cell. Biol.*, **9**: 3155-3165.
- Liu, H., Styles, C.A., Fink, G.R.** 1993. Elements of the yeast pheromone response pathway required for filamentous growth of diploids. *Science*, **262**: 1741-1744.
- Liu, H., Kohler, J., Fink, G.R.** 1994. Suppression of hyphal formation in *Candida albicans* by mutation of a *STE12* homolog. *Science*, **266**: 1723-1726.
- 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**: 939-949.
- Lopez-Ribot, J.L., Casanova, M., Monteagudo, C., Sepúlveda, P., Martinez, J.P.** 1994. Evidence for the presence of a high-affinity laminin receptor-like molecule on the surface of *Candida albicans* yeast cells. *Infect. Immun.*, **62**: 742-746.
- Lorenz, M.C., Benser, J.A., Fink, G.R.** 2004. Transcriptional response of *Candida albicans* upon internalization by macrophages. *Eukaryot. Cell.*, **3**: 1076-1087.
- Lu, C.F., Kurjan, J., Lipke, P.N.** 1994. A pathway for cell wall anchorage of *Saccharomyces cerevisiae*  $\alpha$ -agglutinin. *Mol. Cell. Biol.*, **14**: 4825-4833.
- Madhani, H.D., Fink, G.R.** 1997. Combinatorial control required for the specificity of yeast MAPK signaling. *Science*, **275**: 1314-1317.
- Mager, W.H., Moradas-Ferreira, P.** 1993. Stress response of yeast. *Biochem. J.*, **290**: 1-13.
- Maneu, V., Cervera, A.M., Martínez, 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**: 157-162.
- Manners, D.J., Masson, A.J., Patterson, J.C.** 1973a. The structure of a  $\beta$ -1-3-glucan from yeast cell walls. *Biochem. J.*, **135**: 19-30.
- Manners, D.J., Masson, A.J., Patterson, J.C.** 1973b. The structure of a  $\beta$ -1-6-glucan from yeast cell walls. *Biochem. J.*, **135**: 31-36.
- Marcilla, A., Elorza, M.V., Mormeneo, S., Rico, H., Sentandreu, R.** 1991. *Candida albicans* mycelial wall structure: supramolecular complexes released by zymolase, chitinase and beta-mercaptoethanol. *Arch. Microbiol.*, **155**: 312-319.
- Marcilla, A., Pallotti, C., Gómez-Lobo, M., Caballero, P., Valentín, E., Sentandreu, R.** 1998. Cloning and characterization of the phenylalanyl-tRNA synthetase  $\beta$  subunit gene from *Candida albicans*. *FEMS Microbiol. Lett.*, **161**: 179-185.
- Marcilla, A., Monteagudo, C., Mormeneo, S., Sentandreu, R.** 1999. Monoclonal antibody 3H8: a useful tool in the diagnosis of candidiasis. *Microbiology*, **145**: 695-701.

- Martínez, J.P., Gil, M.L., Casanova, J.L., López-Ribot, J., García de Lomas, J., Sentandreu, R.** 1990. Wall mannoproteins in cells from colonial phenotypic variants of *Candida albicans*. *J. Gen. Microbiol.*, **136**: 2421-2432.
- Martínez-López, R., Monteoliva, L., Díez-Orejas, R., Nombela, C., Gil, C.** 2004. The GPI-anchored protein CaEcm33 is required for cell wall integrity, morphogenesis and virulence in *Candida albicans*. *Microbiology*, **150**: 3341-3354.
- Martínez, 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**: 3151-3161.
- Matthews, R.C.** 1996. Comparative assessment of the detection of candidal antigens as a diagnostic tool. *J. Med. Vet. Mycol.*, **34**: 1-10.
- Mathews, M.S., Samuel, P.R., Suresh, M.** 2001. Emergence of *Candida tropicalis* as the major cause of fungaemia in India. *Mycoses*, **44**: 278-280.
- Mattia, E., Carruba, G., Angiolella, L., Cassone, E.** 1982. Induction of germ-tube formation by N-acetyl-D-glucosamine in *Candida albicans*: uptake of inducer and germinative response. *J. Bacteriol.*, **152**: 555.
- McCarthy, P.J., Gull, K.J.** 1985. Mechanism of action of nikkomycin and the peptide transport system of *Candida albicans*. *Gen. Microbiol.*, **4**: 775-780.
- 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.
- 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**: 2416-2419.
- Mio, T., Adachi-Shimizu, M., Tachibana, Y., Tabuchi, H., Inoue, S.B., Yabe, T., Yamada-Okabe, T., Arisawa, M., Watanabe, T., Yamada-Okabe, H.** 1997. Cloning of the *Candida albicans* homolog of *Saccharomyces cerevisiae* GSC1/FKS1 and its involvement in beta-1,3-glucan synthesis. *J. Bacteriol.*, **179**: 4096-4105.
- Mitsutake, K., Miyazaki, T., Tashiro, T., Yamamoto, Y., Kayeka, H., Otsubo, T., Kawamura, S., Hossain, M.A., Noda, T., Hirakata, Y., Kohno, S.** 1996. Enolase antigen, Mannan antigen, Candtec antigen and  $\beta$ -glucan in patients with candidemia. *J. Clin. Microbiol.*, **34**: 1918-1921.
- Mol, P.C., Wessels, J.G.H.** 1987. Linkages between glucosaminoglycan and glucan determine alkali-insolubility of the glucan in walls of *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiol. Lett.*, **41**: 95-99.
- Mol, P.C., Park, H.M., Mullins, J.T., Cabib, E.** 1994. A GTP binding protein regulates the activity of (1-3)- $\beta$ -glucan synthase, and enzyme directly involved in yeast cell wall morphogenesis. *J. Biol. Chem.*, **269**: 31267-31274.
- Molano, J., Bowers, B., Cabib, E.** 1980. Distribution of chitin in the yeast cell wall. An ultrastructural and chemical study. *J. Cell. Biol.*, **85**: 199-212.
- Molero, G., Díez-Orejas, R., Navarro, F., Monteoliva, L., Pla, J., Gil, C., Sánchez-Pérez, M., Nombela, C.** 1998. *Candida albicans*:

- genetics, dimorphism and pathogenicity. *Int. Microbiol.*, **1**: 95-106.
- Molina, M., Gil, C., Pla, J., Arroyo, J., Nombela, C.** 2000. Protein localisation approaches for understanding yeast cell wall biogenesis. *Microsc. Res. Tech.*, **51**: 601-612.
- Monod, M., Togni, G., Hube, B., Sanglard, D.** 1994. Multiplicity of genes encoding secreted aspartic proteinases in *Candida* species. *Mol. Microbiol.*, **13**: 357-368.
- Monod, M., Hube, B., Hess, D., Sanglard, D.** 1998. Differential regulation of *SAP8* and *SAP9*, which encode two new members of the secreted aspartic proteinase family in *Candida albicans*. *Microbiology*, **144**: 2731-2737.
- Montijn, R.C., Van Rinsum, J., Van Schagen, F.A., Klis, F.M.** 1994. Glucomannoproteins in the cell wall of *Saccharomyces cerevisiae* contain a novel type of carbohydrate side chain. *J. Biol. Chem.*, **269**: 19338-19342.
- Moradas-Ferreira, P., Costa, V.** 2000. Adaptive response of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* to reactive oxygen species: defences, damage and death. *Redox. Report.*, **5**: 277-285.
- Moreno, I., Castillo, L., Sentandreu, R., Valentin, E.** 2007. Global transcriptional profiling of *Candida albicans cwt1* null mutant. *Yeast*, **24**: 357-370.
- Morrow, B., Srikantha, T., Soll, D.R.** 1992. Transcription of the gene for a pepsinogen, *PEP1*, is regulated by white-opaque switching in *Candida albicans*. *Mol. Cell Biol.*, **12**: 2997-3005.
- Moukadiri, I., Armero, J., Abad, A., Sentandreu, R., Zueco, J.** 1997. Identification of a mannoprotein present in the inner layer of the cell wall of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Bacteriol.*, **179**: 2154-2162.
- 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**: 4741-4745.
- 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**: 241-245.
- Moukadiri, I., Zueco, J.** 2001b. YJL159w does encode Pir2/Hsp150. *Yeast*, **18**: 323-324.
- Mrsa, V., Klebl, F., Tanner, W.** 1993. Purification and characterization of the *Saccharomyces cerevisiae BGL2* gene product, a cell wall endo- $\beta$ -1,3-glucanase. *J. Bacteriol.*, **175**: 386-394.
- Mrsa, V., Seidl, T., Gentzsch, 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**: 1145-1154.
- Muller, H., Furter, R., Zanher, H., Rast, D.M.** 1981. Metallic products of microorganism: inhibition of chitosomal chitin synthetase and growth of *Mucor rouxii* by nikkomycin Z, nikkomycin X and polyoxin A: a comparison. *Arch. Microbiol.*, **130**: 195-197.
- 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**: 1414-1426.

**Munro, C.A., Gow, N.A.** 2001. Chitin synthesis in human pathogenic fungi. *Med. Mycol.*, **39**: 41-53.

**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**: 146-158.

**Murad, A.M., D'Enfert, C., Gaillardin, C., Tournu, H.F., Tekaia, D., Talibi, D., Marechal, V., Marchais, J., Cottin, Brown, A. J.** 2001a. Transcript profiling in *Candida albicans* reveals new cellular functions for the transcriptional repressors CaTup1, CaMig1 and CaNrg1. *Mol. Microbiol.*, **42**: 981-993.

**Murad, A.M., Leng, P., Straffon, M.J., Wishart, S., Macaskill, D., MacCallum, N., Schnell, D., Talibi, D., Marechal, F., Tekaia, C. D'Enfert, C., Gaillardin, C., Odds, F., Brown, A.J.P.** 2001b. *NRG1* represses yeast-hypha morphogenesis and hypha-specific gene expression in *Candida albicans*. *EMBO J.*, **20**: 4742-4752.

**Murgui, A., Elorza, M.V., Sentandreu, R.** 1985. Tunicamycin and papulacandin B inhibit incorporation of specific mannoproteins into the wall of *Candida albicans* regenerating protoplast. *Biochem. Biophys. Acta*, **884**: 552-558.

**Nagasu, T., Shimma, Y.I., Nakanishi, Y., Kuromitsu, J., Iwama, K., Nakayama, K.I., Suzuki, K., Jigami, Y.** 1992. Isolation of new temperature-sensitive mutants of *Saccharomyces cerevisiae* deficient in

mannose outer chain elongation. *Yeast*, **8**: 525-547.

**Naglik, J.R., Challacombe, S.J., Hube, B.** 2003. *Candida albicans* Secreted Aspartyl Proteinases in Virulence and Pathogenesis. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, **67**: 400-428.

**Nakai K, Horton P.** 1999. PSORT: a program for detecting sorting signals in proteins and predicting their subcellular localization. *Trends Biochem. Sci.*, **24**: 34-36.

**Nett, J., Andes, D.** 2006. *Candida albicans* biofilm development, modeling a host-pathogen interaction *Curr. Opin. Microbiol.*, **9**: 340-345.

**Nielsen, H., Engelbrecht, J., Brunak, S., von Heijne, G.** 1997. A neural network method for identification of prokaryotic and eukaryotic signal peptides and prediction of their cleavage sites. *Int. J. Neural Syst.*, **8**: 581-599.

**Niimi, M., Shepherd, M.G., Monk, B.C.** 1996. Differential profiles of soluble proteins during the initiation of morphogenesis in *Candida albicans*. *Arch. Microbiol.*, **166**: 260-268.

**Nobile, C.J., Mitchell, A.P.** 2006. Genetics and genomics of *Candida albicans* biofilm formation. *Cell Microbiol.*, **8**: 1382-1391.

**Nombela, C., Gil, C., Chaffin, W.L.** 2006. Non-conventional protein secretion in yeast. *Trends Microbiol.*, **14**: 15-21.

**Nuoffer, C., Jenö, P., Conzelmann, A., Riezman, H.** 1991. Determinants for glycolipid anchoring of the *Saccharomyces cerevisiae* GAS1 protein to the plasma membrane. *Mol. Cell. Biol.*, **11**: 27-37.

**Odds, F.C.** 1988. *Candida* and Candidosis: a review and

bibliography. Baillière Tindall ed. London.

**Ono, F., Yasumoto, S.** 2009. Genital candidiasis. *Nippon Rinsho*, **67**: 157-161.

**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**: 6263-6266.

**Orlean, P., Kuranda, M.J., Albright, C.F.** 1991. Analysis of glycoproteins from *Saccharomyces cerevisiae*. *Methods Enzymol.*, **194**: 682-697.

**Ostrosky-Zeichner, L.** 2003. New approaches to the risk of *Candida* in the intensive care unit. *Curr. Opin. Infect. Dis.*, **16**: 533-537.

**Pammer, M., Briza, P., Ellinger, A., Schuster, T., Stucka, R., Feldmann, H., Breitenbach, M.** 1992. DIT101 (CSD2, CAL1), a cell cycle-regulated yeast gene required for synthesis of chitin in cell walls and chitosan in spore walls. *Yeast*, **8**: 1089-1099.

**Pan, X., Heitman, J.** 1999. Cyclic AMP-dependent protein kinase regulates pseudohyphal differentiation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.*, **19**: 4874-4887.

**Pappas, P.G., Rex, J.H., Lee, J., Hamill, R.J., Larsen, R.A., Powderly, W., Kauffman, C.A., Hyslop, N., Mangino, J.E., Chapman, S., Horowitz, H.W., Edwards, J.E., Dismukes, W.E.** 2003. A prospective observational study of candidemia: epidemiology, therapy, and influences on mortality in hospitalized adult and pediatric patients. *Clin. Infect. Dis.*, **37**: 634-643.

**Pardi, G., Cardozo, E.I.** 2002. Algunas consideraciones sobre *Candida albicans* como agente

etiológico de candidiasis bucal. *Acta odontol. Venez.*, **40**: 9-17.

**Parent, S.A., Nielsen, J.B., Morin, N., Chrebet, G., Ramadan, N., Dahl, A.M., Hsu, M., Bostian, K.A., Foor, F.** 1993. Calcineurin-dependant growth of an FK506- and CsA-Hypersensitive mutant of *S. cerevisiae*. *J. Gen. Microbiol.*, **139**: 2973-2984.

**Pastor, F.I.J., Valentín, E., Herrero, E., Sentandreu, R.** 1984. Structure of the *Saccharomyces cerevisiae* cell wall: mannoproteins released by zymolase and their contribution to wall architecture. *Biochem. Biophys. Acta*, **802**: 292-300.

**Pearson, W.R., Lipman, D.J.** 1988. Improved tools for biological sequences analysis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **85**: 2444-2448.

**Peberdy, J. F.** 1990. Fungal cell walls-a review. En *Biochemistry of cell walls and membranes in fungi*, Kuhn, P.J., Trinci, A.P.J., Jung, M.J., Goosey, M.W., and Copping, L.G. (Eds). Springer, Berlín Heidelberg New York, 5-30.

**Pedreño, Y., Maicas, S., Argüelles, 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**: 40852-40860.

**Pedreño, Y., González-Párraga, P., Martínez-Esparza, M., Sentandreu, R., Valentin, E., Argüelles, J.C.** 2007. Disruption of the *Candida albicans ATC1* gene encoding a cell-linked acid trehalase decreases hypha formation and infectivity without affecting resistance to oxidative stress. *Microbiology*, **153**: 1372-1381.

**Pfaller, M.A., Diekema, D.J.** 2007. Epidemiology of Invasive Candidiasis:

a Persistent Public Health Problem. *Clin. Microbiol. Rev.*, **20**: 133-163.

**Pierce, C.G., Thomas, D.P., López-Ribot, J.L.** 2009. Effect of tunicamycin on *Candida albicans* biofilm formation and maintenance. *J. Antimicrob. Chemother.*, **63**: 473-479.

**Piper P.W.** 1993. Molecular events associated with acquisition of heat tolerance by the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiol. Rev.*, **11**: 339-355.

**Pitarch, A., Sanchez, M., Nombela, C., Gil, C.** 2002. Sequential fractionation and two-dimensional gel analysis unravels the complexity of the dimorphic fungus *Candida albicans* cell wall proteome. *Mol. Cell. Proteomics*, **1**: 967-982.

**Popolo, L., Vai, M., Gatti, E., Porello, S., Bonfante, P., Balestrini, R., Alberghina, L.** 1993. Physiological analysis of mutants indicates involvement of the *Saccharomyces cerevisiae* GPI-anchored protein gp 115 in morphogenesis and cell separation. *J. Bacteriol.*, **175**: 1879-1885.

**Pringle, J. R.** 1991. Staining of bud scars and other cell wall chitin with calcofluor. *Methods Enzymol.*, **194**: 732-735.

**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 Rho1pGTPase as a regulatory subunit of 1,3- $\beta$ -glucan synthase. *Science*. **272**: 279-281.

**Ram, A.F.J., 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**: 1019-1030.

**Ram, A.F.J., Brekelmans, S.S.C., Oehlen, L.J.W.M., Klis, F.M.** 1995. Identification of two cell cycle regulated genes affecting the  $\beta$ 1,3-glucan content of cell walls in *S. cerevisiae*. *FEBS. Lett.*, **358**: 165-170.

**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., Martínez, J.P., López-Ribot, J.L.** 2006. *Candida* biofilms on implanted biomaterials: a clinically significant problem. *FEMS Yeast Res.*, **6**: 979-986.

**Ramón, A.M., Gil, R., Bungal, M., Sentandreu, R., Valentín, E.** 1996. A novel cell wall protein specific to the mycelial form of *Yarrowia lipolytica*. *Yeast*, **12**: 1535-1548.

**Reboli, A.C., Rotstein, C., Pappas, P.G., Chapman, S.W., Kett, D.H., Kumar, D., Betts, R., Wible, M., Goldstein, B.P., Schranz, J., Krause, D.S., Walsh, T.J.** 2007. Anidulafungin versus fluconazole for invasive candidiasis. *N. Engl. J. Med.*, **14**: 2472-2482.

**Rex, J.H., Walsh, T.J., Nettleman, M., Anaissie, E.J., Bennett, J.E., Bow, E.J., Carillo-Munoz, A.J., Chavanet, P., Cloud, G.A., Denning, D.W., de Pauw, B.E., Edwards, Jr. J.E., Hiemenz, J.W., Kauffman, C.A., Lopez-Berestein, G., Martino, P., Sobel, J.D., Stevens, D.A., Sylvester, R., Tollemar, J., Viscoli, C., Viviani, M.A., Wu, T.** 2001. Need for alternative trial designs and evaluation strategies for therapeutic studies of invasive mycoses. *Clin. Infect. Dis.*, **33**: 95-106.

- Richard, M.L., Nobile, C.J., Bruno, V.M., Mitchell, A.P.** 2005. *Candida albicans* biofilm-defective mutants. *Eukaryot. Cell*, **4**: 1493-1502.
- Richard, M.L., Plaine, A.** 2007. Comprehensive analysis of glycosyl phosphatidylinositol-anchored proteins in *Candida albicans*. *Eukaryot Cell*, **6**: 119-133.
- Robert, R., Mahaza, C., Marot Leblond, A., Tronchin, G., Senet, J.M.** 1991. Binding of mouse fibrinogen to *Candida albicans* *in vivo*. *FEMS Microbiol. Lett.*, **62**: 301-303.
- Roncero, C., Valdivieso, M.H., Ribas, J.C., Durán, A.** 1988a. Effect of Calcofluor white on chitin synthases from *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Bacteriol.*, **170**: 1945-1949.
- Roncero, C., Valdivieso, M.H., Ribas, J.C., Duran, A.** 1988b. Isolation and characterization of *Saccharomyces cerevisiae* mutants resistant to calcofluor white. *J. Bacteriol.*, **170**: 1950-1954.
- Rogers, P.D., Barker, K.S.** 2003. Genome-wide expression profile analysis reveals coordinately regulated genes associated with stepwise acquisition of azole resistance in *Candida albicans* clinical isolates. *Antimicrob. Agents Chemother*, **47**:1220-1227.
- Roy, A., Lu, C.F., Marykwas, D.L., Lipke, P.N., Kurjan, J.** 1991. The AGA1 product is involved in cell surface attachment of the *Saccharomyces cerevisiae* cell adhesion glycoprotein a-agglutinin. *Mol. Cell Biol.*, **11**: 4196-4206.
- Ruiz-Herrera, J.** 1967. Chemical composition of the cell wall of *Aspergillus* species. *Arch. Biochem. Biophys.*, **122**: 18-125.
- Ruiz-Herrera, J., Lopez-Romero, E., Bartricki-Garcia, S.** 1977. Properties of chitin synthetase in isolated chitosomes from yeast cells of *Mucor rouxii*. *J. Biol. Chem.*, **252**: 3338-3343.
- Ruiz-Herrera, J.** 1992. Fungal cell wall: structure, synthesis and assembly. CRC Press, Boca Raton Ann Arbor.
- Ruiz-Herrera, J., Elorza, MV., Valentín, 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. USA.*, **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**: 147-156.
- 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. USA.*, **86**: 6230-6234.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T.** 1989. Molecular cloning: a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.
- Sanchez-Fresneda, R., González-Párraga, P., Esteban, O., Laforet, L., Valentín, E., Argüelles, J.C.** 2009. On the biochemical classification of yeast trehalases: *Candida albicans* contains two enzymes with mixed features of neutral and acid trehalase

activities. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **383**: 98-102.

**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**: 3539-3546.

**San Miguel, P.F., Argüelles, J.C.** 1994. Differential changes in the activity of cytosolic and vacuolar trehalases along the growth cycle of *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochim. Biophys. Acta*, **1200**: 155-160.

**Santos, B., Durán, A.** 1992. Cloning of *CAL3*, a *Saccharomyces cerevisiae* gene involved in calcofluor sensitivity and chitin synthesis. *Yeast*, **8**: 5522.

**Saville, S.P., Lazzell, A.L., Monteagudo, C., Lopez-Ribot, J.L.** 2003 Engineered control of cell morphology *in vivo* reveals distinct roles for yeast and filamentous forms of *Candida albicans* during infection. *Eukaryot. Cell.*, **2**: 1053-1060.

**Schaller, M., Borelli, C., Korting, H.C., Hube, B.** 2005. Hydrolytic enzymes as virulence factors of *Candida albicans*. *Mycoses*, **48**: 365-377.

**Schweizer, A., Rupp, S., Taylor, B.N., Röllinghoff, M., Schröppel, K.** 2000. The TEA/ATTS transcription factor CaTec1p regulates hyphal development and virulence in *Candida albicans*. *Mol. Microbiol.*, **38**: 435-445.

**Schwesinger, G., Junghans, D., Schroder, G., Bernhardt, H., Knoke, M.** 2005 Candidosis and aspergillosis as autopsy findings from 1994 to 2003. *Mycoses*, **48**: 176-180.

**Sentandreu, M., Elorza, M.V., Valentín, E., Sentandreu, R., Gozalbo, D.** 1995. Cloning of cDNAs

coding for *Candida albicans* cell surface proteins. *J. Med. Vet. Mycol.*, **33**: 105-111.

**Sentandreu, R., Northcote, D.H.** 1969. Yeast cell-wall synthesis. *Biochem. J.*, **115**: 231-240.

**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.

**Shaw, J.A., Mol, P.C., Bowers, B., Silverman, S.J., Valdivieso, M.H., Durán, A., Cabib, E.** 1991. The function of chitin synthases 2 and 3 in the *Saccharomyces cerevisiae* cell cycle. *J. Cell. Biol.*, **114**: 111-123.

**Shematek, E.M., Braatz, J.A., Cabib, E.** 1980. Biosynthesis of the yeast cell wall. I. Preparation and properties of  $\beta$ - (1- $\rightarrow$ 3) glucan synthetase. *J. Biol. Chem.*, **255**: 888-894.

**Sherman, F., Fink, G.R., Hicks, J.B.** 1986. Methods in yeast genetics. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.

**Sherwood, J., Gow, N.A.R., Gooday, G.W., Gregory, D.W., Marshall, D.** 1992. Contact sensing in *Candida albicans*: a possible aid to epithelial penetration. *J. Med. Vet. Mycol.*, **30**: 461-469.

**Sigrist, C.J., Cerutti, L., Hulo, N., Gattiker, A., Falquet, L., Pagni, M., Bairoch, A., Bucher, P.** 2002. PROSITE: a documented database using patterns and profiles as motif descriptors. *Brief Bioinform.*, **3**: 265-274.

**Silva, T.M., Glee, P.M., Hazen, K.C.** 1995. Influence of cell surface hydrophobicity on attachment of *Candida albicans* to extracellular

matrix proteins. *J. Med. Vet. Mycol.*, **33**: 117-122.

**Singer, M.A., Lindquist, S.** 1998. Thermotolerance in *Saccharomyces cerevisiae*: the Yin and Yang of trehalose. *Trends Biotechnol.*, **16**: 460-468.

**Singh, P., Ghosh, S., Datta, A.** 2001. Attenuation of virulence and changes in morphology in *Candida albicans* by disruption of the *N*-acetylglucosamine catabolic pathway. *Infect. Immun.*, **69**: 7898-7903.

**Sipos, G., Puoti, A., Conzelmann, A.** 1995. Biosynthesis of the side chain of yeast glycosyl phosphatidylinositol anchors is operated by novel mannosyltransferases located in the endoplasmic reticulum and the Golgi apparatus. *J. Biol. Chem.*, **270**: 19709-19715.

**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.

**Soll, D. R.** 1992. "High-frequency switching in *Candida albicans*". *Clin. Microbiol. Rev.*, **5**: 183-203.

**Soll, D.R., Morrow, B., Strikantha, T.** 1993. High-frequency phenotypic switching in *Candida albicans*. *Trend Genet.*, **9**: 61-65.

**Soll, D.R.** 1997. Gene regulation during high-frequency switching in *Candida albicans*. *Microbiology*, **143**: 279-288.

**Sonneborn, A., Bockmuhl, D.P., Ernst, J.F.** 1999a. Chlamyospore formation in *Candida albicans* requires the Efg1p morphogenetic regulator. *Infect. Immun.*, **67**: 5514-5517.

**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**: 4655-4660.

**Stehr, F., Felk, A., Gácsér, A., Kretschmar, M., Mähneß, B., Neuber, K., Hube, B., Schäfer, W.** 2004. Expression analysis of the *Candida albicans* lipase gene family during experimental infections and in patient samples. *FEMS Yeast Research*, **4**: 401-408.

**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**: 1982-1991.

**Storz, G., Christman, M.F., Sies, H., Ames, B.N.** 1987. Spontaneous mutagenesis and oxidative damage to AND in *Salmonella typhimurium*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **84**: 8917-8921.

**Teunissen, A.W., Holub, E., Van der Hucht, J., Van den Berg, J.A., Steensma, H.Y.** 1993. Sequence of the open reading frame of the FLO1 gene from *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*, **4**: 423-427.

**Thevelein, J.M.** 1996. Regulation of trehalose metabolism and its relevance to cell growth and function. In: Brambl, R., Marzluf, G. A. (Eds). *The mycota*, **3**: 395-414. Springer Verlag Heilderberg.

**Thomas, J.R., Dwek, R.A., Rademacher, T.W.** 1990. Structure, biosynthesis, and function of glycosylphosphatidylinositols. *Biochemistry*, **29**: 5413-5422.

- 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**: 481-494.
- 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**: 317-322.
- Tsai, P.K., Frevert, J., Ballou, C.E.** 1984. Carbohydrate structure of *Saccharomyces cerevisiae mnn9*. *J. Biol.Chem.*, **259**: 3805-3811.
- Valdivieso, M.H., Mol, P.C., Shaw, J.A., Cabib, E., Duran, A.** 1991. *CAL1*, a gene required for activity of chitin synthase-3 in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Cell. Biol.*, **114**: 101-109.
- Valentín, E., Herrero, E., Pastor, F.I.J., Sentandreu, R.** 1984. Solubilization and analysis of mannoproteins from the cell wall of *Saccharomyces cerevisiae*. *J.Gen. Microbiol.*, **130**: 1419-1428.
- Valentín, E., Herrero, E., Rico, H., Miragall., 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; 138-150.
- Van Der Vaart, J.M., Caro, L.H.P., Chapman, J.W., Klis, F.M., Verrips, C.T.** 1995. Identification of three mannoproteins in the cell wall of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Bacteriol.*, **177**: 3104-3110.
- Van Risum, J., Klis, F.M., Van Den Ende, H.** 1991. Cell wall glucomannoproteins of *Saccharomyces cerevisiae mnn9*. *Yeast*, **7**: 717-726.
- Vazquez-Torres, A., Balish, E.** 1997. Macrophages in resistance to candidiasis. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, **61**: 170-192.
- Vazquez, J.A., Lynch, M., Boikov, D., Sobel, J.D.** 1997. In vitro activity of a new pneumocandin antifungal, L-743,872, against azole-susceptible and -resistant *Candida* species. *Antimicrob Agents Chemother*, **41**: 1612-1614.
- Verduyn Lunel, F.M., Meis, J.F., Voss, A.** 1999. Nosocomial fungal infections: candidemia. *Diagn Microbiol Infect Dis.*, **34**: 213-220.
- Von Heijne, G.** 1986. A new method for predicting signal sequence cleavage sites. *Nucleic Acids Res.*, **14**: 4683-4690.
- Ward, F.E., Vassilakos, A., Peterson, P.A., Jackson, M.R., Lehrman, M.A., Williams, D.B.** 1995. The molecular chaperone calnexin binds  $\text{Glc}_1\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$  oligosaccharide as an initial step in recognizing unfolded glycoproteins. *J. Biol. Chem.*, **270**: 4697-4704.
- Watts, H.J., Cheah, F.S., Hube, B., Sanglard, D., Gow, N.A.** 1998. Altered adherence in strains of *Candida albicans* harbouring null

mutations in secreted aspartic proteinase genes. *FEMS Microbiol Lett.*, **159**: 129-135.

**Weisburd S.** 1988. Death-defying dehydration. *Science News*, **133**: 107-110.

**Wey, S.B., Mori, M., Pfaller, M.A., Woolson, R.F., Wenzel, R.P.** 1988. Hospital-acquired candidemia. The attributable mortality and excess length of stay. *Arch. Intern. Med.*, **148**: 2642-2645.

**White, T.C., Miyasaki, S.H., Agabian, N.** 1993. Three distinct secreted aspartyl proteinases in *Candida albicans*. *J. Bacteriol.*, **175**: 6126-6133.

**White, T.C., Agabian, N.** 1995. *Candida albicans* secreted aspartyl proteinases: isoenzyme pattern is determined by cell type, and levels are determined by environmental factors. *J. Bacteriol.*, **177**: 5215-5221.

**Wiemken, A.** 1990. Trehalose in yeast, stress protectant rather than reserve carbohydrate. *Antonie Leeuwenhoek*, **58**: 9410-9414.

**Xu, K.D., McFeters, G.A., Stewart, P.S.** 2000. Biofilm resistance to antimicrobial agents. *Microbiology*, **146**: 547-549.

**Yamada, K.M., Akiyama, S.K., Hasegawa, T., Hasegawa, E., Humphries, M.J., Kennedy, D.W., Nagata, K., Urushihara, H., Olden, K., Chen, W.T.** 1985. Recent advances in research on fibronectin and other cell attachment proteins. *J. Cell. Biochem.*, **28**: 79-97.

**Yamada-Okabe, T., Sakamori, Y., Mio, T., Yamada-Okabe, H.** 2001. Identification and characterization of the genes for N-acetylglucosamine kinase and N-acetylglucosamine-phosphate deacetylase in the pathogenic fungus *Candida albicans*. *Eur. J. Biochem.*, **268**: 2498-2505.

**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**: 2947-2960.

**Zaugg, C., Borg-von-Zepellin, M., Reichard, U., Sanglard, D., Monod, M.** 2001. Secreted aspartic proteinase family of *Candida tropicalis*. *Infect. Immun.*, **69**: 405-412.

**Zueco, J., Mormeneo, S., Sentandreu, R.** 1986. Temporal aspects of the O-glycosylation of *Saccharomyces cerevisiae* proteins. *Biochim. Biophys. Acta*, **884**: 93-100.



**AGRADECIMIENTOS**



## ◆AGRADECIMIENTOS

Quisiera dar las gracias a todos los que de una manera u otra han colaborado en esta etapa...

A mis Directores, el Dr. Eulogio Valentín, por la confianza depositada en mí, su apoyo, su cariño y por hacer de un grupo de investigación una familia, al Dr. Rafael Sentandreu, por su contagioso amor por la ciencia y al Dr. Juan Carlos Argüelles por su cariño y por aportar a esta tesis un poquito de poesía.

Al Dr. Lucas del Castillo, al Dr. José Pedro Martínez y al Dr. Manuel Casanova del Departamento de Microbiología de la Facultad de Farmacia, por la buena disposición y simpatía. A la Dra. María Victoria Elorza, por su ayuda, por su cariño y por el mejor tiramisú del mundo.

A María Martínez-Esparza, de la Universidad de Murcia, por los ensayos de virulencia, realizados en su laboratorio.

A todos los compañeros; en los primeros tiempos de la tesis, a Verónica Veses por su amistad, a Ana Pérez, Genoveva Culebras, José María García, a Almudena Nieto y Sergi Maicas “los compis del chiringuito”, a Luis Castillo y a Samuel Gelis por toda la ayuda y la alegría compartida, a Ana Martínez por su amistad, su consejo y por llevarme de la mano los primeros meses, tu ayuda fue fundamental, a Inmaculada Moreno, gracias por todo, por ser la amiga más rolex que pude encontrar jamás y a mis compañeros de los últimos tiempos, Antonio Caminero por ser el amigo más lindo y sincero que siempre está a mi lado, a Miguel Micó “Mi gel” porque sin nuestra “historia de humor” mi vida no sería igual y porque Mikipedia siempre ha sido un gran aporte, ¡molas!, ya lo sabes, a Mapi, a Jihene, a Emira Noumi, “ma soeur”, por todo el cariño que nos trajo tu visita.

A Teresa Moscardó, Ruth Sánchez-Fresneda (a quien debo agradecer entre muchas otras cosas, su ayuda con las pruebas de trehalasa) y a Julia Platas, por su cariño, alegría, amistad y su colaboración en el día a día, ¡mola GMCA!

A Charito “la jefecita consorte” y “a las brujis” Almudena e Isabel por todo el cariño, la simpatía y el apoyo constante.

A Isabel Gabidia, Pedro Pérez-Bermúdez, a Fátima, Vera, Rosario, Khoubbane, Marian y Melisa por los buenos momentos, compartidos

A Belén Albertos y Ricardo Garilletti por ser los mejores amigos del mundo, por su apoyo constante, su cariño y porque en ellos siempre encuentro refugio, gracias por “ser y estar”... (extra de agradecimientos para ediciones Pocoyo, todo un aporte)

A mis jefes de la farmacia, Esther y Vicente, y a mis compañeras, especialmente a Pilar y Ana, por su amistad, apoyo, paciencia y comprensión.

A la familia Monteagudo-Monterde, mi familia española, “als pares”, Mimi y Miguel porque vuestro cariño me ha hecho sentir en casa “i a les germanetes”, Ana y Sara que han sabido compartir conmigo los mejores momentos y que en los no tan buenos nunca han soltado de mi mano.

A Patricio que has estado a mi lado en cada paso de este camino, porque sin tu constante ayuda habría sido todo muchísimo más difícil y porque muchas veces has tenido más fe en mí, que yo misma.

A los amigos de siempre, en especial a Eliette por su amistad incondicional, y a mi familia por su enorme amor, comprensión y paciencia, en especial a mis padres por todo su apoyo, su confianza y por estar tan cerca a pesar de la distancia, a mis hermanitas, por todo su cariño y por estar siempre dispuestas a ayudarme y a mis preciosos sobrinos por querer y comprender a esta tía que viene y va.

A todos los anteriormente mencionados y a los que no menciono pero que están en mi corazón, quiero dar mis más sentidas gracias, el hecho de haberlos conocido justifica en si mismo, toda esta aventura.

❖Muchas gracias a todos❖

El trabajo experimental contenido en esta tesis ha sido financiado, en parte con cargo a los proyectos BIO-BMC 06/01-0003 de la Dirección General de Investigación (Comunidad de Murcia, España) y BFU2006-08684/BMC (Ministerio de Educación y Ciencia, España).

*Nuestra recompensa se encuentra en el esfuerzo y no en el resultado.  
Un esfuerzo total es una victoria completa  
Mahatma Gandhi*



