



VNIVERSITATIS VALÈNCIAE

**FACULTAD DE FARMACIA  
DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA Y ECOLOGÍA**

**Función del gen *PIR32* en la construcción y  
biogénesis de la pared celular de  
*Candida albicans***

Trabajo de Tesis Doctoral presentado por  
**TERESA MOSCARDÓ POLOP**

Dirigida por el **Prof. Eulogio Valentín Gómez**  
Valencia, 2013





VNIVERSITAT  
ID VALÈNCIA



GMCA

Dr. Eulogio Valentín Gómez, Catedrático de Microbiología y Ecología de la Universidad de Valencia,

CERTIFICA: Que la Memoria de Tesis Doctoral titulada: “Función del gen *PIR32* en la construcción y biogénesis de la pared celular de *Candida albicans*.” realizada por la Licenciada en Farmacia Doña Teresa Moscardó Polop para aspirar al Grado de Doctora por la Universidad de Valencia, contiene fielmente el trabajo experimental realizado bajo mi dirección en los laboratorios de la Sección Departamental de Microbiología y Ecología de la Universidad de Valencia.

Examinado el contenido, considero que la Memoria reúne, a mi 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, expedo y firmo la presente certificación.

Valencia a 14 de Marzo de 2013

Fdo. Dr. Eulogio Valentín Gómez



Para la realización de la presente Tesis, la autora ha disfrutado de una beca de “La Caixa” en colaboración con el “Servicio Alemán de Intercambio Académico” (DAAD) para estudios de posgrado en Alemania durante el curso académico 2010-2011.





*A todos aquellos  
con los que he tenido la suerte  
de compartir este viaje*

*“Cuando llegues al final de lo que debes saber,  
estarás al principio de lo que debes sentir.”*

Khalil Gibran





°C	Grados Celsius	ml	Mililitros
φ	diámetro	μ	micras
aa	Aminoácidos	n°	número
AcJ2	Anticuerpo anti-Pir de conejo	ORF	Pauta abierta de lectura
ADN	Ácido Desoxirribonucleico	PAb	Anticuerpo policlonal
AMPc	Adenosín monofosfato cíclico	PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida
Amp <sup>R</sup>	Resistencia a Ampicilina	pb	Pares de bases
ARN	Ácido Ribonucleico	PBS	Tampón fosfato salino
BCIP®/NBT-Blue	5-bromo, 4-cloro, 3-indolylphosphate (BCIP)/Nitro-Blue Tetrazolium (NBT)	PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
β-ME	Beta-mercaptoetanol	PEG	Polietilenglicol
Br <sup>-</sup> Et	Bromuro de Etidio	pH	Logaritmo decimal negativo de la concentración de iones hidronio
BSA	Albúmina de suero bovino	pmoles	Picomoles (10 <sup>-12</sup> moles)
cDNA	DNA complementario	PMSF	Fluoruro de fenil-metil sulfonilo
Col	colonia	RNasa	Ribonucleasa
CSPD	Substrato quimioluminiscente	rpm	Revoluciones por minuto
CWP	Proteínas de pared celular	RT-PCR	Transcripción inversa-PCR
H <sub>2</sub> O <sub>dd</sub>	Agua bidestilada	SAT1	Gen para la Estreptotricina-acetil-transferasa
DEPC	Dietilpirocarbonato	SDS	Dodecil sulfato sódico
DIG	Digoxigenina	SSC	Saline sodium citrate
DMSO	Dimetilsulfóxido	seg	Segundos
dNTPs	desoxirribonucleótidos trifosfato	T <sup>a</sup>	Temperatura
D.O <sub>n</sub>	Densidad óptica a “n” nanómetros	TAE	Tris-acetato con EDTA
DTT	Ditiotreitol	TBS	Tampón tris salino
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético	TE buffer	Solución de Tris y EDTA
RE	Retículo endoplásmico	TEM	Microscopía Electrónica de Transmisión
EtOH	Etanol	TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylen-diamin
Fig.	Figura	Tris	2-Amino-2-(hidroximetil)-1,3-propanodiol
g	Gramo	TTBS	TBS con Tween-20
xg	Gravedades	U	Unidades
GPI	Glicosil fosfatidil inositol	V	Voltio
h	Horas	vol	Volumen
HiFi	High Fidelity (Alta Fidelidad)	XTT	[2,3-bis(2-metoxi-4-nitro-5-sulfofenil)-2H-tetrazolio-5-carboxanilida]
IgG	Inmunoglobulina G	YNB	Base nitrogenada de levaduras
kb	Kilobases	YPD	Yeast Extract Peptone Dextrose
kDa	Kilodaltons		
l	Litro		
LB	Medio de cultivo de Luria-Bertani		
M	Molar		
mA	Miliamperios		
mARN	ARN mensajero		
MCS	sitio de clonación múltiple		
min	Minutos		

## ABREVIATURAS

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

AMINOÁCIDO	3 LETRAS	1 LETRA
Ácido aspártico	Asp	D
Ácido glutámico	Glu	E
Alanina	Ala	A
Arginina	Arg	R
Asparagina	Asn	N
Cisteína	Cys	C
Fenilalanina	Phe	F
Glicina	Gly	G
Glutamina	Gln	Q
Histidina	His	H
Isoleucina	Ile	I
Leucina	Leu	L
Lisina	Lys	K
Metionina	Met	M
Prolina	Pro	P
Serina	Ser	S
Tirosina	Tyr	Y
Treonina	Thr	T
Triptófano	Trp	W
Valina	Val	V

		SEGUNDA BASE									
		U		C		A		G			
P R I M E R A B A S E	U	UUU	Phe	UCU	Ser	UAU	Tyr	UGU	Cys	U	T
		UUC	Phe	UCC	Ser	UAC	Tyr	UGC	Cys	C	E
		UUA	Leu	UCA	Ser	UAA	FIN	UGA	FIN	A	R
		UUG	Leu	UCG	Ser	UAG	FIN	UGG	Trp	G	C
	C	CUU	Leu	CCU	Pro	CUA	His	CGU	Arg	U	E
		CUC	Leu	CCC	Pro	CAC	His	CGC	Arg	C	R
		CUA	Leu	CCA	Pro	CAA	Gln	CGA	Arg	A	A
		CUG	Leu	CCG	Pro	CAG	Gln	CGG	Arg	G	B
	A	AUU	Ile	ACU	Thr	AAU	Asn	AGU	Ser	U	A
		AUC	Ile	ACC	Thr	AAC	Asn	AGC	Ser	C	S
		AUA	Ile	ACA	Thr	AAA	Lys	AGA	Arg	A	E
		AUG	Met	ACG	Thr	AAG	Lys	AGG	Arg	G	
	G	GUU	Val	GCU	Ala	GAU	Asp	GGU	Gly	U	
		GUC	Val	GCC	Ala	GAC	Asp	GGC	Gy	C	
		GUA	Val	GCA	Ala	GAA	Glu	GGA	Gly	A	
		GUG	Val	GCG	Ala	GAG	Glu	GGG	Gly	G	

# ÍNDICE



# ÍNDICE DE MATERIAS

<b>I. INTRODUCCIÓN</b> .....	1
<b>I. 1. ASPECTOS GENERALES y TAXONOMÍA DE <i>C. albicans</i></b> .....	3
<b>I. 2. PATOGENICIDAD DE <i>C. albicans</i></b> .....	6
<b>I. 3. TRATAMIENTO DE CANDIDIASIS</b> .....	9
<i>I. 3. 1. Tratamiento combinado</i> .....	10
<i>I. 3. 2. Vacunas</i> .....	11
<b>I. 4. INCIDENCIA DE <i>C. albicans</i></b> .....	12
<b>I. 5. FACTORES DE VIRULENCIA EN <i>C. albicans</i></b> .....	15
<i>I. 5. 1. Factores de adherencia</i> .....	17
<i>I. 5. 1. 1. Als (agglutinin-like sequence)</i> .....	18
<i>I. 5. 1. 2. Hwp1 (Hyphal wall protein)</i> .....	19
<i>I. 5. 2. Secreción de enzimas hidrolíticas</i> .....	19
<i>I. 5. 2. 1. Proteinasas aspárticas (SAP)</i> .....	20
<i>I. 5. 2. 2. Fosfolipasas</i> .....	20
<i>I. 5. 3. Morfogénesis</i> .....	21
<i>I. 5. 4. Cambio fenotípico (Phenotypic switching)</i> .....	23
<i>I. 5. 5. Biopelículas</i> .....	24
<i>I. 5. 6. Cambio morfológico por densidad celular (Quorum sensing)</i> .....	25
<i>I. 5. 7. Modulación de la respuesta inmune</i> .....	26
<b>I. 6. LA PARED CELULAR DE <i>C. albicans</i></b> .....	27

<b>I. 6. 1. Composición de la pared celular</b> .....	28
<b>I. 6. 1. 1. <math>\beta</math>-glucanos</b> .....	29
<i>I. 6. 1. 1. 1. <math>\beta</math>-1,3-glucano</i> .....	30
<i>I. 6. 1. 1. 2. <math>\beta</math>-1,6-glucano</i> .....	30
<b>I. 6. 1. 2. Quitina</b> .....	31
<b>I. 6. 1. 3. Manoproteínas</b> .....	31
<i>I. 6. 1. 3. 1. Clasificación de las manoproteínas</i> .....	33
<i>I. 6. 1. 3. 1. 1. Proteínas unidas por enlaces glicofosfatidilinositol (GPI-CWPs)</i> .....	38
<i>I. 6. 1. 3. 1. 2. Proteínas unidas por enlaces álcali-sensibles (ASL-CWPs)</i> .....	39
<b>I. 6. 2. Modificaciones post-traduccionales</b> .....	42
<b>I. 6. 2. 1 Señalización</b> .....	43
<b>I. 6. 2. 2. N-Glicosilación</b> .....	44
<b>I. 6. 2. 3. O-Glicosilación</b> .....	45
<b>I. 6. 2. 4. Anclaje GPI</b> .....	46
<b>I. 6. 2. 5. Procesamiento proteolítico</b> .....	47
<b>I. 7. OBJETIVOS Y JUSTIFICACIÓN DEL TRABAJO</b> .....	47
<b>II. MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	49
<b>II. 1. MICROORGANISMOS Y PLÁSMIDOS EMPLEADOS</b> .....	51
<b>II. 1. 1. Levaduras</b> .....	51
<b>II. 1. 2. Bacterias</b> .....	51
<b>II. 2. OLIGONUCLEOTIDOS Y PLÁSMIDOS EMPLEADOS</b> .....	52

<b>II. 2. 1. Oligonucleótidos</b> .....	52
<b>II. 2. 2. Plásmidos</b> .....	53
<b>II. 3. MEDIOS Y CONDICIONES DE CULTIVO</b> .....	54
<b>II. 3. 1. Cultivo de levaduras</b> .....	54
<b>II. 3. 2. Cultivo de bacterias</b> .....	57
<b>II. 4. TRANSFORMACIÓN DE CÉLULAS CON ADN EXÓGENO</b> .....	58
<b>II. 4. 1. Transformación en bacterias</b> .....	58
<b>II. 4. 1. 1. Obtención de células competentes con cloruro de calcio</b> .....	58
<b>II. 4. 1. 2. Transformación de las células competentes</b> .....	58
<b>II. 4. 2. Transformación en Levaduras</b> .....	59
<b>II. 5. RECUENTOS CELULARES</b> .....	60
<b>II. 6. OBTENCIÓN Y PURIFICACIÓN DEL ADN</b> .....	60
<b>II. 6. 1. Obtención de ADN plasmídico de Escherichia coli</b> .....	60
<b>II. 6. 2. Obtención de ADN genómico de C. albicans</b> .....	61
<b>II. 7. ELECTROFORESIS EN GEL DE AGAROSA</b> .....	62
<b>II. 8. PURIFICACIÓN DE LOS FRAGMENTOS DE ADN</b> .....	62
<b>II. 9. TRATAMIENTO ENZIMÁTICO DE ADN</b> .....	63
<b>II. 9. 1. Digestión con endonucleasas de restricción</b> .....	63
<b>II. 9. 2. Tratamiento con ligasa de T4</b> .....	63
<b>II.10. OBTENCIÓN Y PURIFICACIÓN DE ARN DE C. albicans</b> .....	64
<b>II.11. CUANTIFICACIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS</b> .....	65
<b>II. 12. REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR)</b> .....	66

<b>II. 12. 1. Diseño de oligonucleótidos</b> .....	66
<b>II. 12. 2. Condiciones de reacción de PCR</b> .....	66
<b>II. 12. 3. Transcripción inversa (RT-PCR)</b> .....	67
<b>II. 12. 4. RT-PCR semicuantitativa</b> .....	67
<b>II. 12. 5. Mutagénesis dirigida por PCR</b> .....	68
<b>II. 13. INTERRUPCIÓN GÉNICA EN <i>C. albicans</i></b> .....	68
<b>II.14. Secuenciación de ADN</b> .....	69
<b>II. 15. REINTEGRACIÓN DEL GEN <i>PIR32</i> EN LA CEPA DOBLE HOMOCIGÓTICA DE <i>C. albicans</i></b> .....	70
<b>II.16. DETECCIÓN DE SECUENCIAS ESPECÍFICAS DE ADN (SOUTHERN BLOT)</b> .....	71
<b>II. 16. 1. Marcaje no radioactivo de la sonda de ADN</b> .....	71
<b>II. 16. 2. Separación y transferencia de los fragmentos de ADN</b> .....	72
<b>II. 16. 3. Hibridación ADN/ADN</b> .....	72
<b>II. 16. 4. Detección de la unión ADN / sonda</b> .....	73
<b>II. 17. OBTENCIÓN DE PAREDES CELULARES.</b> .....	73
<b>II. 18. SOLUBILIZACIÓN DE COMPONENTES DE LAS PAREDES CELULARES AISLADAS</b> .....	74
<b>II. 18. 1. Tratamiento con dodecil sulfato sódico (SDS)</b> .....	74
<b>II. 18. 2. Tratamiento con <math>\beta</math>-mercaptoetanol (<math>\beta</math>-ME)</b> .....	75
<b>II. 18. 3. Tratamiento con soluciones alcalinas diluidas</b> .....	75
<b>II. 18. 4. Tratamiento con HF/Piridina</b> .....	75
<b>II. 19. DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN PROTEICA</b> .....	75



<b>II. 20. SEPARACIÓN DE PROTEÍNAS EN GELES DE SDS-POLIACRILAMIDA (SDS-PAGE)</b> .....	76
<b>II. 21. TRANSFERENCIA DE PROTEÍNAS A SOPORTES DE NITROCELULOSA Y DETECCIÓN (WESTERN-BLOT)</b> .....	76
<i>II. 21. 1. Transferencia a membranas de nitrocelulosa mediante la técnica de Western-blot</i> .....	76
<i>II. 21. 2. Adsorción de proteínas en soportes de nitrocelulosa mediante la técnica de Dot-blot</i> .....	77
<i>II. 21. 3. Inmunodetección</i> .....	77
<b>II. 22. ANÁLISIS FENOTÍPICO DE LAS CEPAS DISRUPTANTES</b> .....	78
<i>II. 22. 1. Curva de crecimiento</i> .....	78
<i>II. 22. 2. Sensibilidad a zimoliasa</i> .....	79
<i>II. 22. 3. Estudio del efecto del blanco de calcoflúor, rojo Congo y SDS</i> .....	79
<i>II. 22. 4. Estudio de la sensibilidad al estrés</i> .....	80
<b>II. 22. 4. 1. Estudio del efecto de un medio hipertónico sobre el crecimiento (efecto del choque osmótico)</b> .....	80
<b>II. 22. 4. 2. Estudio del efecto de la temperatura (efecto del choque térmico)</b> .....	80
<b>II. 22. 4. 3. Estudio del efecto de peróxido de hidrógeno sobre el crecimiento (estrés oxidativo)</b> .....	81
<i>II. 22. 5. Estudio del efecto de drogas</i> .....	81
<b>II. 22. 5. 1. Estudio de sensibilidad a cafeína</b> .....	81
<b>II. 22. 5. 2. Antifúngicos</b> .....	81
<b>II. 23. ESTUDIOS DE FLOCULACIÓN EN MEDIO LÍQUIDO</b> .....	82
<b>II. 24. ESTUDIOS DE CAMBIO DIMÓRFICO</b> .....	82

<b>II. 25. MICELIACIÓN EN MEDIO SÓLIDO</b> .....	83
<b>II. 26. HIDROFOBICIDAD Y ADHESIÓN</b> .....	83
<i>II. 26. 1. Hidrofobicidad de la superficie celular</i> .....	83
<i>II. 26. 2. Adhesión / formación de biopelículas</i> .....	84
<b>II. 27. MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE TRANSMISIÓN</b> .....	85
<b>II. 28. ESTUDIO DE LA VIRULENCIA EN MODELO MURINO</b> .....	85
<b>RESULTADOS</b> .....	87
<b>III. 1. SELECCIÓN IN SILICO DE Pir32p</b> .....	89
<b>III. 2. ANÁLISIS IN SILICO DE LA SECUENCIA AMINOACÍDICA DE LA PROTEÍNA Pir32</b> .....	91
<i>III. 2. 1. Hidrofobicidad de la proteína Pir32</i> .....	93
<i>III. 2. 2. Homología de Pir32p con otras proteínas</i> .....	94
<b>III. 3. CONSTRUCCIÓN DEL CASETE DE INTERRUPCIÓN PARA EL GEN PIR32</b> .....	96
<b>III. 4. INTERRUPCIÓN DEL GEN CaPIR32</b> .....	99
<b>III. 5. COMPROBACIÓN DE LOS MUTANTES</b> .....	102
<i>III. 5. 1. Selección de las colonias susceptibles de transformación mediante PCR</i> .....	102
<i>III. 5. 2 Comprobación de los mutantes mediante Southern-blot utilizando la enzima de restricción AflII (polimorfismo genético)</i> .....	104
<b>III. 6. ANÁLISIS FENOTÍPICO DE LAS CEPAS MUTANTES DEL GEN PIR32</b> .....	106
<i>III. 6. 1. Estudio del crecimiento celular</i> .....	106
<i>III. 6. 2. Análisis de la sensibilidad a la zimoliasa</i> .....	107

<i>III. 6. 3. Estudio de la sensibilidad a rojo Congo, al blanco de calcoflúor y al SDS</i> .....	108
<i>III. 6. 4. Estudio de la sensibilidad al estrés</i> .....	110
III. 6. 4. 1. Estudio de la sensibilidad al estrés osmótico mediante medio hipertónico .....	110
III. 6. 4. 2. Estudio de la sensibilidad al estrés térmico .....	110
III. 6. 4. 3. Estudio de la sensibilidad al estrés oxidativo .....	111
<i>III. 6. 5. Estudio del efecto de las drogas</i> .....	112
III. 6. 5. 1. Estudio de sensibilidad a cafeína .....	112
III. 6. 5. 2. Antifúngicos .....	112
<i>III. 6. 6. Estudios de inducción de cambio dimórfico</i> .....	113
<i>III. 6. 7. Estudio de la filamentación en medio sólido</i> .....	114
<i>III. 6. 8. Estudio de la virulencia en modelo murino</i> .....	117
<b>III. 7. ESTUDIO DE COMPLEMENTARIEDAD ENTRE PIR32 Y PIR1 POR RT-PCR</b> .....	118
<i>III. 7. 1. Obtención del ARN y comprobación de su purificación</i> .....	119
<i>III. 7. 2. RT- PCR semicuantitativa y análisis estadístico</i> .....	120
<b>III. 8. OBTENCIÓN DEL DOBLE MUTANTE PARA LOS GENES PIR1 Y PIR32 DE <i>C. albicans</i></b> .....	121
<i>III. 8. 1. Comprobación de los mutantes mediante Southern-blot utilizando la enzima de restricción MscI</i> .....	121
<b>III. 9. ANÁLISIS FENOTÍPICO DE LAS CEPAS MUTANTES EN LOS GENES PIR2 Y PIR32</b> .....	124
<i>III. 9. 1. Estudio del crecimiento celular</i> .....	124
<i>III. 9. 2. Análisis de la sensibilidad a la zimoliasa</i> .....	125
<i>III. 9. 3. Estudio de la sensibilidad al blanco de calcoflúor, al rojo Congo y al SDS.</i> .....	126

<b>III. 9. 4. Estudio de la sensibilidad al estrés</b> .....	127
<b>III. 9. 4. 1. Sensibilidad al estrés osmótico</b> .....	127
<b>III. 9. 4. 2. Sensibilidad al estrés oxidativo</b> .....	127
<b>III. 9. 4. 3. Estudio de la sensibilidad al estrés térmico</b> .....	128
<b>III. 9. 5. Estudio del efecto de las drogas</b> .....	129
<b>III. 9. 6. Estudios de inducción de cambio dimórfico</b> .....	129
<b>III. 9. 7. Estudio de miceliación en medio sólido</b> .....	131
<b>III. 9. 8. Estudio de la adhesión y la formación de biopelículas</b> .....	133
<b>III. 9. 9. Análisis de la hidrofobicidad</b> .....	135
<b>III. 9. 10. Análisis estructural mediante microscopía electrónica</b> .....	137
<b>III. 9.11. Estudio de la virulencia en modelo murino</b> .....	138
<b>III. 10. ANALISIS WESTERN DE LA PROTEINA Pir32</b> .....	140
<b>III. 11. OBTENCIÓN DEL REINTEGRANTE</b> .....	143
<b>III. 11. 1. Construcción del plásmido pEccMal-PIR32</b> .....	143
<b>III. 11. 2. Integración de pEccMalp-PIR32 en el mutante nulo</b> .....	146
<b>III. 11. 3. Comprobación de la cepa reintegrante RT32R</b> .....	145
<b>III. 12. ANÁLISIS FENOTÍPICO DEL REINTEGRANTE (RT32R)</b> .....	148
<b>III. 12. 1. Estudio del crecimiento celular</b> .....	148
<b>III. 12. 2. Estudio de la sensibilidad al SDS.</b> .....	149
<b>III. 12. 3. Estudio de la sensibilidad al estrés oxidativo</b> .....	150
<b>III. 12. 4. Estudio de la sensibilidad al estrés térmico</b> .....	151

<b>IV. DISCUSIÓN</b> .....	153
<b>V. CONCLUSIONES</b> .....	163
<b>VI. BIBLIOGRAFÍA</b> .....	167
<b>VII. AGRADECIMIENTOS</b> .....	185

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura I.1.</b> Porcentaje de aislamientos de las distintas especies de hongos del género <i>Candida</i> , según el estudio FUNGEMYCA realizado en España en el 2009. (Pemán y Salavert, 2012).	4
<b>Figura I.2.</b> Propuesta de tratamiento antifúngico de la infección fúngica invasiva en los diferentes escenarios clínicos.	11
<b>Figura I.3.</b> Distribución de las principales especies causales de candidemia en las unidades de cuidados intensivos de seis hospitales españoles durante 2009 (estudio FUNGEMYCA)	13
<b>Figura I.4.</b> Etapas de la infección por <i>C. albicans</i> y los mecanismos de virulencia que intervienen en cada etapa.	16
<b>Figura I.5.</b> Enzimas degradativas de <i>C. albicans</i> .	19
<b>Figura I.6.</b> Morfologías de <i>C. albicans</i> : (a) Levadura, (b) pseudohifa, (c) clamidospora y (d) micelio.	22
<b>Figura I.7.</b> Regulación del dimorfismo en <i>C. albicans</i> mediante múltiples vías de señalización (Biswas <i>et al.</i> , 2007).	23
<b>Figura I.8.</b> Esquema de las sucesivas etapas de la formación de las biopelículas (Finkel y Mitchell, 2011).	25
<b>Figura I.9.</b> Modelo propuestos para la arquitectura de la pared celular en levaduras. Modificado por Valentín <i>et al.</i> , 2000.	28
<b>Figura I.10.</b> Clasificación de las proteínas de pared celular.	33
<b>Figura I.11.</b> Esquema propuesto por el consorcio europeo Galar Fungail I para la pared celular de <i>C. albicans</i> .	36
<b>Figura I.12.</b> Dianas de los diferentes tratamientos para la extracción de los diferentes tipos de proteínas de la pared celular de <i>C. albicans</i> .	37

<b>Figura I.13.</b> Esquema general de una GPI-CWPs de proteínas de levaduras.....	38
<b>Figura I.14.</b> Esquema de una proteína Pir típica. ....	40
<b>Figura I.15.</b> Modificaciones postraduccionales; a) O-glicosilación y b) N-glicosilación de proteínas de pared celular en <i>C. albicans</i> .....	45
<b>Figura I.16.</b> Estructura del enlace glicosil fosfatidil inositol (GPI) de proteínas de levaduras.....	46
<b>Figura III.1.</b> Homología entre las secuencias aminoacídicas de Pir1p y Pir32p de <i>C. albicans</i> .....	90
<b>Figura III.2.</b> Análisis <i>in silico</i> de la secuencia aminoacídica de la proteína Pir32. ....	92
<b>Figura III.3.</b> Composición aminoacídica de la proteína Pir32. ....	92
<b>Figura III.4.</b> Predicción <i>in silico</i> del péptido señal de la región N-terminal de la proteína Pir32. ....	93
<b>Figura III.5.</b> Perfil hidrofóbico de la proteína Pir32.....	93
<b>Figura III.6.</b> A) Composición aminoacídica de Ser y Thr de la proteína Pir32. B) Composición aminoacídica de Asp, Glu, Gln e His de la proteína Pir32 (de Groot y Brandt, 2012).....	94
<b>Figura III.7.</b> Alineamiento de la secuencia de aminoácidos de las proteínas: Pir32 de <i>C. albicans</i> , Cd36 de <i>C. dubliniensis</i> y Mya-3404 de <i>C. tropicalis</i> .....	95
<b>Figura III.8.</b> Esquema del casete de interrupción del plásmido pSFS2.....	97
<b>Figura III.9.</b> Esquema del casete de interrupción del plásmido pSFS2, habiendo incorporado las secuencias homólogas para la recombinación selectiva e interrupción del gen <i>PIR32</i> . ....	97
<b>Figura III.10.</b> Esquema de la construcción del plásmido pT2 conteniendo el casete de interrupción para el gen <i>PIR32</i> .....	98
<b>Figura III.11.</b> Esquema de inserción del casete de interrupción mediante recombinación homóloga en uno de los dos alelos del gen <i>PIR32</i> . Denominado PIR32H <sup>R</sup> .....	99

<b>Figura III.12.</b> Esquema de la eliminación del casete y la consiguiente disrupción en un alelo en el gen <i>PIR32</i> , mediante la acción de la Flipasa que produce la recombinación sitio específica entre las dos FRTs. ....	100
<b>Figura III.13.</b> Esquema del gen <i>PIR32</i> con un alelo disrupcionado. Denominado <i>PIR32H<sup>S</sup></i> .....	100
<b>Figura III.14.</b> Placas resultantes de la transformación. A) transformantes con el gen <i>SAT1</i> integrado en el locus <i>PIR32</i> . B) transformantes sensibles a nurseotricina al haber perdido la resistencia a dicho antibiótico. C) comparativa entre las cepas resistentes y las sensibles. ....	101
<b>Figura III.15.</b> Esquema de disrupción del gen <i>PIR32</i> , segundo paso de transformación. ....	101
<b>Figura III.16.</b> Análisis de transformantes por PCR. A) visualizados mediante electroforesis en gel de agarosa utilizando los oligonucleótidos <i>PIR2-KpnI</i> y <i>PIR2-SacI</i> . B) Esquema de la disposición de los oligonucleótidos <i>PIR2-KpnI</i> y <i>PIR2-SacI</i> en el genoma de <i>C. albicans</i> . ....	103
<b>Figura III.17.</b> Análisis de transformantes por PCR. A) visualizados mediante electroforesis en gel de agarosa utilizando los oligonucleótidos <i>FSAT5</i> y <i>PIR32OutR</i> . B) Esquema de la disposición de los oligonucleótidos <i>FSAT5</i> y <i>PIR32OutR</i> en el genoma de <i>C. albicans</i> . ....	104
<b>Figura III.18.</b> Verificación del mutante nulo <i>pir32Δ/pir32Δ</i> en fondo genético SC5314, empleando la enzima de restricción <i>AflIII</i> . A) Representación esquemática del proceso. B) Análisis Southern del ADN genómico. ....	105
<b>Figura III.19.</b> Curva de crecimiento de las cepa parental y las cepas mutante heterocigótico ( <i>PIR32H<sup>S</sup></i> ) y mutante homocigótico ( <i>PIR32Ø<sup>S</sup></i> ). ....	107
<b>Figura III.20.</b> Curva de sensibilidad a la zimoliasa. ....	108
<b>Figura III.21.</b> Sensibilidad al CFW, al RC y al SDS en placas de YNB de las cepas: 1) SC5214, 2) <i>PIR32H<sup>S</sup></i> y 3) <i>PIR32Ø<sup>S</sup></i> . ....	109



<b>Figura III.22.</b> Sensibilidad al choque osmótico a distintas concentraciones de sales: NaCl (1,6 M), LiCl (300mM) y CaCl <sub>2</sub> (0,7 M), de las cepas: 1) SC5214, 2) PIR32H <sup>S</sup> y 3) PIR32Ø <sup>S</sup> .....	110
<b>Figura III.23.</b> Sensibilidad a la T <sup>a</sup> : 55°C durante 10, 15 y 30 min de las cepas: 1) SC5214, 2) PIR32H <sup>S</sup> y 3) PIR32Ø <sup>S</sup> .....	111
<b>Figura III.24.</b> Sensibilidad al H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> en concentración 10mM de las cepas: 1) SC5214, 2) PIR32H <sup>S</sup> y 3) PIR32Ø <sup>S</sup> .....	111
<b>Figura III.25.</b> Sensibilidad a la cafeína. Las cepas son: SC5314 (1), PIR32H <sup>S</sup> (2), PIR32Ø <sup>S</sup> (3).....	112
<b>Figura III.26.</b> Sensibilidad a la Anfotericina B (40 µg/ml) y a la Caspofungina (2,5 µg/ml). Las cepas son: SC5314 (1), PIR32H <sup>S</sup> (2), PIR32Ø <sup>S</sup> (3).....	113
<b>Figura III.27.</b> Ensayo de miceliación en medio líquido de las colonias de las cepas SC5314, PIR32H <sup>S</sup> y PIR32Ø <sup>S</sup> crecidas en medio enriquecido RPMI-1640 a 37 °C.....	114
<b>Figura III.28.</b> Morfología de las cepas SC5314, PIR32H <sup>S</sup> y PIR32Ø <sup>S</sup> crecidas en diferentes medios (Lee, Spider, Serum e YE-Pro). A) Bordes de las colonias. B) Colonias.....	116
<b>Figura III.29.</b> Estudio de virulencia en modelo murino de la cepa parental SC5314, del mutante heterocigótico PIR32H <sup>S</sup> y del mutante homocigótico PIR32Ø <sup>S</sup> contabilizando el porcentaje de supervivencia de ratones a través del tiempo post-infección. ....	118
<b>Figura III.30.</b> Comprobación de la ausencia de contaminación del ARN y del ADNc por ADN genómico. ....	119
<b>Figura III.31.</b> Estudio comparativo del patrón de expresión del gen <i>PIR1</i> en SC5314 y en PIR32Ø <sup>S</sup> .....	120
<b>Figura III.32.</b> Construcción y verificación del mutante nulo <i>pir32Δ/pir32Δ</i> en ambos fondos genéticos, SC5314 y <i>pir1Δ/pir1Δ</i> , empleando la enzima de restricción <i>MscI</i> . A) Representación esquemática del proceso. B) Análisis Southern del ADN genómico.....	123

<b>Figura III.33.</b> Curva de crecimiento a 28°C comparativa entre las cepas: parental (SC5314), mutante heterocigótico (PIR32H <sup>S</sup> ), mutante homocigótico (PIR32Ø <sup>S</sup> ), mutante heterocigótico bajo fondo genético <i>pir1Δ/pir1Δ</i> (PIR1Ø32H <sup>S</sup> ) y mutante homocigótico bajo fondo genético <i>pir1Δ/pir1Δ</i> (PIR1Ø32Ø <sup>S</sup> ).....	124
<b>Figura III.34.</b> Curva de crecimiento a 37°C comparativa entre las cepas: parental (SC5314), mutante heterocigótico (PIR32H <sup>S</sup> ), mutante homocigótico (PIR32Ø <sup>S</sup> ), mutante heterocigótico bajo fondo genético <i>pir1Δ/pir1Δ</i> (PIR1Ø32H <sup>S</sup> ) y mutante homocigótico bajo fondo genético <i>pir1Δ/pir1Δ</i> (PIR1Ø32Ø <sup>S</sup> ).....	125
<b>Figura III.35.</b> Curva de sensibilidad a la zimoliasa de todas las cepas obtenidas mutantes para el gen <i>PIR32</i> en comparación con la cepa silvestre. ....	126
<b>Figura III.36.</b> Sensibilidad al CFW y al SDS en placas de YNB de las cepas mutantes obtenidas, en comparación con la cepa parental SC5314.....	127
<b>Figura III.37.</b> Sensibilidad al H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> en placas de YNB de las cepas mutantes. ....	128
<b>Figura III.38.</b> Estudio de la sensibilidad al estrés térmico, 5 o 15 min a 65°C y luego crecimiento a 28°C o 37°C en medio YNB. ....	128
<b>Figura III.39.</b> Morfología hifal de las cepas mutantes para <i>PIR32</i> , referidas a la cepa silvestre SC5314, y de las cepas mutantes para <i>PIR1</i> y <i>PIR32</i> referidas a la cepa parental <i>PIR1</i> (aumento de 40x). A) Tras 1h de incubación en RPMI-1640 aumentos. B) Tras 4h de incubación en RPMI-1640.....	131
<b>Figura III.40.</b> Morfología de bordes de las cepas SC5314, PIR32H <sup>S</sup> , PIR32Ø <sup>S</sup> , PIR1Ø32H <sup>S</sup> , PIR1Ø32Ø <sup>S</sup> en los medios Lee, Spider, Suero humano e YE-Pro.....	132
<b>Figura III.41.</b> Morfología de las colonias de las cepas SC5314, PIR32H <sup>S</sup> , PIR32Ø <sup>S</sup> , PIR1Ø32H <sup>S</sup> , PIR1Ø32Ø <sup>S</sup> en los medios Lee, Spider, Suero humano e YE-Pro. ....	133
<b>Figura III.42.</b> Estudio de la formación de biopelículas, medición por cristal violeta. Valores promedios.....	134
<b>Figura III.43.</b> Estudio de la formación de biopelículas, medición por XTT. Valores promedios. ....	135

<b>Figura III.44.</b> Imágenes TEM en cortes transversales de las cepas desarrolladas en este trabajo. ....	138
<b>Figura III.45.</b> Estudio de virulencia en modelo murino de la cepa parental SC5314, y de los mutantes PIR32H <sup>S</sup> , PIR32Ø <sup>S</sup> , PIR1Ø32H <sup>S</sup> y PIR1Ø32Ø <sup>S</sup> , contabilizando el porcentaje de supervivencia de ratones a través del tiempo post-infección. ....	139
<b>Figura III.46.</b> Análisis Western-blot de la fracción de extracto de NaOH, detectado por el anticuerpo policlonal AcJ <sub>2</sub> . ....	142
<b>Figura III.47.</b> Análisis Western-blot de la fracción de extracto de β-ME, detectado por el anticuerpo policlonal AcJ <sub>2</sub> . ....	143
<b>Figura III.48.</b> Mapa del plásmido de integración en <i>C. albicans</i> , pEcc120. ....	144
<b>Figura III.49.</b> Mapa del plásmido de integración de un gen bajo promotor Maltosa en <i>C. albicans</i> . Utilizando como marcador de resistencia <i>CaSAT1</i> y como diana cromosomal el gen <i>RP10</i> . ....	144
<b>Figura III.50.</b> Mapa del plásmido de integración de un gen bajo promotor Maltosa en <i>C. albicans</i> . ....	146
<b>Figura III.51.</b> Esquema lineal del plásmido al ser cortado con <i>NcoI</i> . ....	146
<b>Figura III.52.</b> Comprobación de la cepa reintegrante RT32 <sup>R</sup> mediante PCR. ....	147
<b>Figura III.53.</b> Crecimiento de la cepa RT32 <sup>R</sup> en medio YPD NTC 200 µg/µl. ....	148
<b>Figura III.54.</b> Curva de crecimiento a 28°C comparativa entre las cepas: parental (SC5314), mutante heterocigótico (PIR32H <sup>S</sup> ), mutante homocigótico (PIR32Ø <sup>S</sup> ), mutante heterocigótico bajo fondo genético <i>pir1Δ/pir1Δ</i> (PIR1Ø32H <sup>S</sup> ), mutante homocigótico bajo fondo genético <i>pir1Δ/pir1Δ</i> (PIR1Ø32Ø <sup>S</sup> ), además del reintegrante del doble mutante (RT32 <sup>R</sup> ) y el mutante <i>pir1Δ/pir1Δ</i> (PIR1Ø <sup>S</sup> ). ....	149
<b>Figura III.55.</b> Sensibilidad al SDS en placas de YNB de las cepas mutantes obtenidas. ....	150
<b>Figura III. 56.</b> Sensibilidad al CFW en placas de YNB de las cepas mutantes. ....	150
<b>Figura III.57.</b> Estudio de la sensibilidad al estrés térmico. ....	151

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla I.1.</b> Clasificación taxonómica de <i>C. albicans</i> .....	5
<b>Tabla I. 2.</b> Clasificación de los diferentes tipos de candidiasis.....	8
<b>Tabla I.3.</b> Antifúngicos utilizados en el tratamiento de la candidiasis.....	9
<b>Tabla I.4.</b> Porcentajes en peso seco de los componentes de la pared celular.....	28
<b>Tabla II.1.</b> Cepas de <i>C. albicans</i> utilizadas en este trabajo.....	51
<b>Tabla II.2.</b> Cepas de <i>Escherichia coli</i> usadas en este trabajo.....	51
<b>Tabla II.3.</b> Oligonucleótidos utilizados en este trabajo.....	52
<b>Tabla II.4.</b> Plásmidos empleados y construidos en este trabajo.....	53
<b>Tabla III.1.</b> Comparación entre las secuencias aminoacídicas de la proteína Pir32 de <i>C. albicans</i> con sus ortólogos de las especies de <i>C. dubliniensis</i> y <i>C. tropicalis</i> . ....	95
<b>Tabla III. 2.</b> Ensayo hidrofóbico en presencia de Xileno o Ciclohexano. Los porcentajes representan la cantidad de células en la fase acuosa. ....	136
<b>Tabla III. 3.</b> Medidas obtenidas que determinan el espesor de la capa de glucano y de manano, su contenido en proteínas y quitina de la pared celular de cada una de las cepas. ....	137

# I. INTRODUCCIÓN



# I. INTRODUCCIÓN

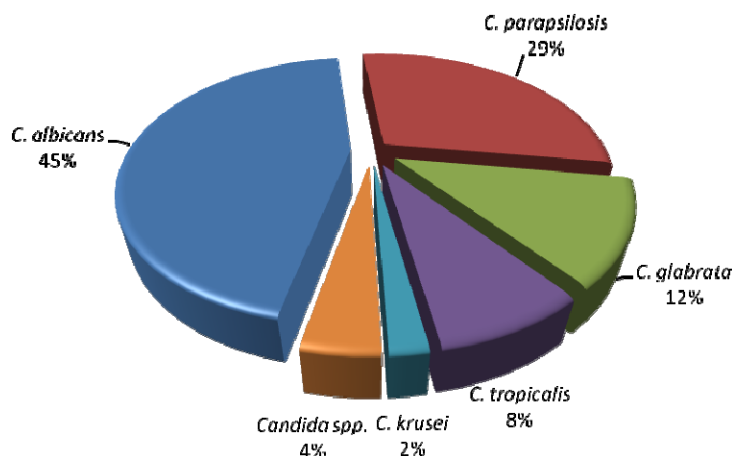
En la siguiente introducción se intenta dar una visión general de los conocimientos actuales en la biología de *C. albicans*, resaltando especialmente aquellos relacionados con la pared celular y la transición levadura-micelio, así como factores esenciales en la virulencia y el desencadenamiento de la enfermedad por esta levadura.

## I. 1. ASPECTOS GENERALES y TAXONOMÍA DE *C. albicans*

Alrededor de 500 especies de bacterias, así como hongos y otros organismos colonizan el tracto gastrointestinal de los humanos formando la microbiota. *Candida* es uno de los microorganismos comensales más comunes de las mucosas del ser humano, tales como: la piel, la cavidad oral, el tracto intestinal, el tracto urinario y los órganos sexuales.

El género *Candida* está constituido por 154 especies, siete de las cuales son aisladas frecuentemente como agentes causales de infecciones: *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. krusei* (*Issatchenkia orientalis*), *C. dubliniensis* y *C. lusitaniae* (*Clavispora lusitaniae*). Siendo *C. albicans* la más relevantes en términos de patogenicidad.

En el último estudio sobre la epidemiología de las candidemias realizado en España durante 2009 (Pemán *et al.*, 2011) participaron 43 centros hospitalarios y se incluyeron 1.377 aislamientos de hemocultivos pertenecientes a 1.357 episodios de fungemia (Pemán y Salavert, 2012). En este estudio, *C. albicans* fue la especie más frecuentemente aislada (44,7%), seguida de *C. parapsilosis* (29,1%), *C. glabrata* (11,5%), *C. tropicalis* (8,2%) y *C. krusei* (2%), como se puede ver representado en la figura I.1.



**Figura I.1. Porcentaje de aislamientos de las distintas especies de hongos del género *Candida*, según el estudio FUNGEMYCA realizado en España en el 2009. (Pemán y Salavert, 2012)**

*C. albicans* es un hongo pleomórfico que en función de las condiciones ambientales puede crecer como (Odds, 1994): levadura unicelular –también conocida como blastospora-, forma hifal (o micelio), forma pseudohifal (o pseudomicelio), y además también puede formar clamidosporas, es decir, esporas asexuales que aparecen en condiciones ambientales desfavorables. Esta capacidad de transición levadura-micelio ha sido asociada con la patogenicidad de este organismo (Kumamoto y Vines, 2005).

Desde un punto de vista genético *C. albicans* es un microorganismo diploide con un genoma de, aproximadamente, 14,5 Mb distribuidas en 8 cromosomas que albergan alrededor de 6.100 genes de un tamaño medio de 1.450 pb (Butler *et al.*, 2009). Es un hongo difícil de manipular genéticamente al carecer de un ciclo sexual conocido (Magee y Magee, 2000), y la lectura de su código genético se desvía del código genético universal, puesto que traduce el codón CUG como serina en lugar de leucina (Masey *et al.*, 2003). Uno de los hechos más interesantes del genoma de *C. albicans* es la concurrencia de reordenamientos cromosómicos, como medio de generar diversidad genética, dando longitudes de cromosomas con polimorfismos (contracción/expansión de repeticiones), translocaciones recíprocas, borrados cromosómicos y trisomía de cromosomas individuales. Estas alteraciones en el cariotipo generan cambios en el fenotipo, que convergen en una adaptación de esta levadura al medio en el que se encuentra (Butler *et al.*, 2009; Selmecki *et al.*, 2010). Estos mecanismos genéticos están pudiendo ser mejor interpretados gracias al análisis completo del genoma de *C. albicans*.



El genoma de *C. albicans* ha sido completamente secuenciado gracias a la colaboración internacional de distintos grupos de investigación (<http://www.Candidagenome.org>, <http://www-sequence.stanford.edu/group/Candida/>) así como la anotación de sus genes por el Consorcio Europeo Galar Fungail (<http://genolist.pasteur.fr/CandidaDB>), en el que participó nuestro grupo de investigación (d'Enfert *et al.*, 2005). El actual conocimiento del genoma completo de *C. albicans* y su anotación, supone una excelente fuente para los análisis funcionales del genoma.

Por otro lado, desde un punto de vista taxonómico, *C. albicans* se incluye dentro del *phylum Ascomycota* que constituye el 75% de los hongos descritos y donde se encuentran la mayoría de los hongos que no poseen evidencia de reproducción sexual. (Tabla I.1)

Antiguamente, puesto que la fase sexual de este tipo de hongos es desconocida, se los incluía en un *phylum* diferente llamado *Deuteromycota*, debido a que poseer ciclo sexual era necesario para su clasificación como ascomicetos. No obstante, la similitud en la secuencia de sus ácidos nucleicos, así como la semejanza fenotípica permitió la incorporación de *C. albicans* en el *phylum Ascomycota*. (Deacon, 2006.)

La clasificación taxonómica de *C. albicans* es la siguiente:

<b>Dominio</b>	<i>Eukarya</i>
<b>Reino</b>	<i>Fungi</i>
<b>Phylum</b>	<i>Ascomycota</i>
<b>Subphylum</b>	<i>Ascomycotina</i>
<b>Clase</b>	<i>Ascomycetes</i>
<b>Orden</b>	<i>Saccharomycetales</i>
<b>Familia</b>	<i>Saccharomycetaceae</i>
<b>Género</b>	<i>Candida</i>
<b>Especie</b>	<i>albicans</i>

Tabla I.1. Clasificación taxonómica de *C. albicans*.

### I. 2. PATOGENICIDAD DE *C. albicans*

Muchos de los hongos que producen infecciones en el ser humano son, en condiciones normales, comensales que viven en equilibrio con las defensas de su hospedador. Sin embargo, existen diferentes factores que pueden alterar este equilibrio de manera que el microorganismo puede invadir tejidos y producir enfermedad en el hospedador (Clemons *et al.*, 2000; Casadevall *et al.*, 2002).

Los hongos causantes de la mayor parte de las infecciones de este tipo pertenecen a los géneros *Candida*, *Aspergillus*, *Coccidioides*, *Cryptococcus*, *Histoplasma* y *Pneumocystis*, siendo *Candida* -y en concreto la especie *C. albicans*- una de las más importantes, llegando a ser causante del 70% de las infecciones por hongos (Lamagni *et al.*, 2001).

Por lo que se refiere a la patogenicidad de *C. albicans*, este hongo se aísla habitualmente a partir de la piel y tracto gastrointestinal, y, por lo tanto, supone en condiciones normales un microorganismo comensal inocuo. Sin embargo, en determinadas ocasiones, es capaz de producir infecciones tanto superficiales como sistémicas en el ser humano conocidas como candidiasis.

*C. albicans* tiene la capacidad de responder rápidamente a los cambios medio-ambientales, incluyendo a aquellos probables de ser encontrados *in vivo*, como estados de deficiencia inmunitaria en el hospedador. Esta flexibilidad permite al patógeno oportunista a aprovechar las condiciones de inmunosupresión para favorecer el establecimiento de la enfermedad (Haynes, 2001), que puede incluso suponer un grave peligro para la vida del paciente en los casos más críticos.

Normalmente los procesos infecciosos van asociados a situaciones en las que el hospedador tiene disminuidas sus defensas. Entre estas causas se encuentran factores fisiológicos como la gestación, la malnutrición, la infancia y la vejez, enfermedades degenerativas, alteraciones del sistema endocrino y las infecciones por virus (VIH). Así como múltiples tratamientos drásticos realizados en hospitales contra otras enfermedades, inmunosupresión con fármacos en trasplantes y tratamientos quimioterápicos en enfermos de cáncer que pueden originar estados neutropénicos, administración masiva de antibióticos e implantación de prótesis y catéteres que pueden facilitar la entrada del microorganismo.

Entre los pacientes con mayor riesgo para desarrollar una enfermedad fúngica invasiva, tanto en población adulta como pediátrica, caben destacar los pacientes inmunodeprimidos por quimioterapia de sus enfermedades neoplásicas (con o sin neutropenia), los que reciben trasplante de progenitores hematopoyéticos (TPH) o de órganos sólidos (TOS), los que emplean dosis altas y prolongadas de corticoides u otros inmunosupresores, los pacientes infectados por el VIH en situación avanzada sin tratamiento antirretroviral, los sometidos a tratamientos antibióticos intensivos, los intervenidos de cirugía mayor gastrointestinal, los pacientes con enfermedades inflamatorias crónicas autoinmunes que reciben nuevas terapias biológicas, los prematuros, los pacientes de edad más avanzada y los enfermos en situación crítica más graves que pueden beneficiarse de los avances en los cuidados médicos intensivos para mejorar su supervivencia. (Pemán y Salavert, 2012)

*C. albicans* está presente en el 50% de la población como comensal inocuo y produce diferentes tipos de infecciones cuando actúa como patógeno como se refleja en la tabla I.2. Comúnmente produce infecciones superficiales en piel o mucosas, a nivel oral en neonatos y vaginal en mujeres, que pueden ser de carácter agudo o crónico. Las candidiasis profundas invaden los tejidos del hospedador más allá de la membrana basal del epitelio, de esta manera afectan a uno o más órganos internos, y en muchos casos van acompañadas de septicemia, recibiendo el nombre de candidiasis sistémicas o diseminadas. Estas candidiasis por su gravedad clínica pueden poner en riesgo la vida del paciente. Diferenciamos pues dos tipos de candidiasis: candidiasis superficiales y candidiasis profundas, que a su vez se dividen en subcategorías. En el caso de las candidiasis superficiales las subcategorías se nombran dependiendo de la zona infectada y las cuales reciben su denominación en base a la zona del organismo en la que aparece. En el caso de las candidiasis profundas depende la denominación del órgano afectado, y en el caso de las candidiasis sistémicas además de en base al órgano afectado también puede depender de la población que se encuentra afectada o la correlación que se haya visto con algún tipo de enfermedad o alguna alimentación específica (Tabla I.2)

Candidiasis superficiales	Candidiasis profundas o sistémicas
<p>Candidiasis cutáneas</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Intertrigo</li> <li>- Foliculitis</li> </ul> <p>Candidiasis en mucosas</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Orofaringeas</li> <li>- Esofágicas</li> <li>- Vulvovaginitis</li> <li>- Del tracto urinario</li> </ul> <p>Candidiasis en uñas</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Onicomycosis</li> <li>- Paroniquia</li> </ul> <p>Otras candidiasis</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Queratitis candidiásica</li> <li>- Otitis externa</li> </ul>	<p>Candidiasis profundas</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Peritonitis</li> <li>- Esofagitis</li> <li>- Pielitis</li> </ul> <p>Candidiasis sistémicas</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Candidiasis hepatoesplénica</li> <li>- Asociada al abuso de drogas IV</li> <li>- Asociada a la alimentación parenteral</li> <li>- Neonatal</li> <li>- Endocarditis</li> </ul>

**Tabla I. 2. Clasificación de los diferentes tipos de candidiasis.**

Dentro de las candidiasis en mucosas una de las más frecuentes es el muguet que se caracteriza por desarrollar la infección en las mucosas de boca y faringe. Afecta principalmente a niños prematuros que se infectan de la madre en el momento del parto y a ancianos, en ambos casos cuando tienen problemas en el correcto funcionamiento del timo. También pueden sufrirla individuos en estado terminal de enfermedades inmunosupresoras como el SIDA.

La otra candidiasis en mucosas muy frecuente es la vulvovaginitis que puede ser recurrente, el 20% de las vaginitis están causadas por *C. albicans* (Gentry *et al.*, 1985). Aparece asociada al uso de anticonceptivos orales los cuales incrementan el nivel de estrógenos y tratamientos con antibióticos que disminuyen la microbiota bacteriana. El embarazo que disminuye el pH normal y la diabetes no controlada también predisponen a la infección.

La candidiasis cutánea más común es el intertrigo que aparece en las zonas de la piel sometidas a calor, humedad y roces.

Las candidiasis profundas producen lesiones agudas o crónicas, que afectan a uno o más órganos (cerebro, hígado, pulmón, corazón, riñón) y generalmente terminan en una septicemia, denominándose entonces candidiasis sistémicas o diseminadas. Este

tipo de candidiasis suele darse en pacientes inmunocomprometidos y son de pronóstico grave, asociándose con una mortalidad elevada, superior al 50%. Este fenómeno tal vez obedezca a la gravedad de las enfermedades subyacentes y, por lo tanto, es difícil establecer con precisión el verdadero papel de la infección por *Candida* sobre la mortalidad (Vazquez y Sobel, 2011).

### I. 3. TRATAMIENTO DE CANDIDIASIS

Desde la aparición de los primeros casos de infección por *Candida* hasta el presente, se han desarrollado distintas técnicas encaminadas al estudio de este microorganismo. Debido a que las células fúngicas y humanas poseen un gran número de características similares (ambas son células eucariotas), el diseño de antifúngicos está fundamentalmente enfocado a aquellas características diferenciales entre las células fúngicas y las células eucariotas humanas.

FÁRMACO	DIANA	ACCIÓN	REFERENCIA
<b>Antibióticos macrólidos poliénicos (Nistatina, Anfotericina B)</b>	Vía del Ergosterol	Formación de los poros hidrofílicos en la membrana plasmática	Ellis, 2002
<b>Alilaminas</b>	Vía del Ergosterol	Inhibición de la escualeno epoxidasa	Sander <i>et al.</i> , 2002
<b>Fenilmorfolinas</b>	Vía del Ergosterol	Inhibición de las enzimas D14 reductasa y D7-D8 isomerasa	Rigopoulos <i>et al.</i> , 2003
<b>Griseofulvina</b>	Microtúbulos	Interferencia en el ensamblaje de microtúbulos	Develoux, 2001
<b>Flucitosina</b>	ARN	Inhibición de la síntesis proteica	Pfaller <i>et al.</i> , 2002
<b>Azoles (Fluconazol, Miconazol, Voriconazol)</b>	Citocromo P-450	Alteración de la fluidez de la permeabilidad celular	Vanden Bossche, 2003; Porte <i>et al.</i> , 2012
<b>Equinocandinas y Pneumocandinas (Caspofungina, Anidulafungina)</b>	Vía de la $\beta$ -glucano sintasa	Inhibición de la síntesis del $\beta$ -1,3-glucano en la pared celular	Fortún, 2011; Zaragoza y Pemán, 2012
<b>Sordarinas</b>	Factor de elongación	Inhibición de la síntesis proteica	Domínguez y Martín, 2001
<b>Nikkomicinas y Polioxinas</b>	Quitina sintasas	Alteración de la pared celular	Kim <i>et al.</i> , 2002

**Tabla I.3. Antifúngicos utilizados en el tratamiento de la candidiasis.**

Con objeto de diseñar antifúngicos selectivos y eficientes en el tratamiento de estas enfermedades es necesario averiguar y estudiar las diferencias que existen entre las células fúngicas y las células eucariotas humanas (metabolismo, estructuras macromoleculares, ácidos nucleicos, síntesis de proteínas, etc.) para poder utilizarlas como diana terapéutica con toxicidad selectiva frente a las células fúngicas (Rex *et al.*, 2001). Los fármacos antifúngicos hoy en día disponibles, con sus dianas y su mecanismo de acción se detallan en la tabla I.3.

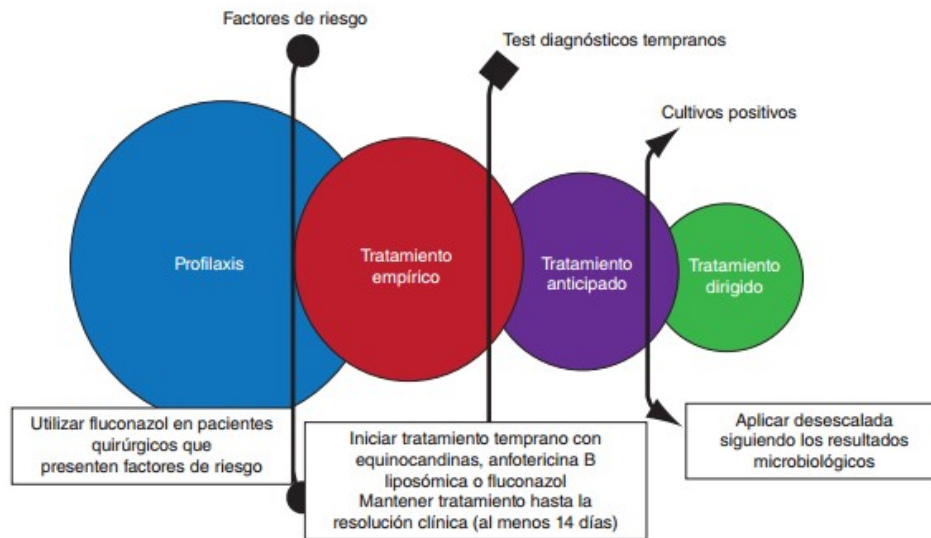
Una de las principales dianas utilizadas para el desarrollo de fármacos antifúngicos se encuentra a nivel del retículo endoplásmico, el metabolismo del ergosterol, componente esencial de la membrana de los hongos. Pese a que se la considera una diana bastante selectiva, la toxicidad colateral en las células del hospedador de algunos de estos fármacos como la anfotericina B y el elevado número de interacciones con otros fármacos han forzado la búsqueda de nuevos antifúngicos (Odds *et al.*, 2003).

Dada la importancia clínica de la candidiasis, se intenta encontrar nuevas dianas para desarrollar nuevos fármacos antifúngicos, y ofrecer mejores y más seguras alternativas terapéuticas (Casadevall *et al.*, 2004). La diferencia más acusada entre la célula del hospedador y la célula fúngica es la pared celular de los hongos, puesto que las células humanas carecen de ella. Es por ello, por lo que la pared celular supone una diana idónea para el diseño de nuevos antifúngicos.

### ***I. 3. 1. Tratamiento combinado***

La disponibilidad de nuevos antifúngicos, con nuevos y distintos mecanismos de acción y buena tolerancia clínica, han ampliado las posibilidades para el uso de tratamiento antifúngico combinado en las micosis oportunistas más graves (Figura I. 2.) Más aún, la sinergia descrita *in vitro* entre el voriconazol y las equinocandinas augura un potencial enorme para el uso de esta combinación. Aunque no hay ensayos de combinación en infecciones por *Candida spp.* en pacientes críticos, la alta mortalidad de estos episodios podría justificar su uso, si bien siguiendo las últimas guías españolas éstas se deberían reservar en casos de mala evolución, con candidemia persistente después de la retirada de un catéter venoso central, especialmente si el paciente está

neutropénico. Por tanto, es necesario desarrollar nuevos ensayos clínicos que corroboren este posible beneficio (Zaragoza y Pemán, 2012).



**Figura I. 2. Propuesta de tratamiento antifúngico de la infección fúngica invasiva en los diferentes escenarios clínicos.**

### **I. 3. 2. Vacunas**

A lo largo de los años ha habido numerosos intentos de desarrollar vacunas tanto para las infecciones oportunistas de los hongos como de las infecciones endémicas por hongos en los hombre y animales, y sobre todo la mayor parte del trabajo se ha centrado en una vacuna para infecciones humanas causadas por especies de *Candida*. Sin embargo y por el momento, a pesar de las extensas investigaciones de estas vacunas, ninguna ha sido aprobado por los EE.UU. Food and Drug Administration (FDA), ya bien sea para la inmunización activa o bien para la inmunidad pasiva en los seres humanos (Edwards, 2012).

En general, mientras que el diagnóstico y tratamiento de las candidiasis superficiales no suponen un problema sanitario destacable, no sucede lo mismo con las candidiasis sistémicas invasivas. A pesar del actual arsenal terapéutico de drogas antifúngicas, la mortalidad sigue siendo inaceptablemente elevada (Leroy *et al.*, 2009). En consecuencia, es imprescindible adoptar medidas profilácticas y estrategias terapéuticas para combatir la creciente incidencia de las candidiasis con riesgo vital para el paciente, así como el elevado número de fallos terapéuticos.

En la actualidad no hay ninguna vacuna para la prevención o tratamiento de la candidiasis aunque muchos grupos de investigación a nivel internacional están trabajando en la obtención de vacunas empleando componentes de la pared celular (Torosantucci *et al.*, 2009; Lin *et al.*, 2009), péptidos derivados de proteínas de la pared celular como inmunógenos (Xin *et al.*, 2008; Luo *et al.*, 2011) o enzimas glicolíticas, como la enolasa, presentes en la pared celular de *C. albicans* (Li *et al.*, 2011).

Puesto que la candidiasis sistémica es la cuarta infección hematológica más común en paciente hospitalizados, la vacunación podría ser una estrategia muy adecuada para la prevención de las infecciones fúngicas invasivas, estrategia cuya tecnología se encuentra en desarrollo activo (Deepe, 1997; Perruccio *et al.*, 2004; Feldmesser, 2005; Cutler *et al.*, 2007; Cassone, 2008; Ito *et al.*, 2009; Fidel y Cutler, 2011; Spellberg, 2011).

### I. 4. INCIDENCIA DE *C. albicans*

Las micosis invasoras siguen aumentando su incidencia en pacientes inmunodeprimidos u hospitalizados con graves enfermedades de base, a pesar de la mejora en los métodos diagnósticos y de la introducción y uso de nuevos antifúngicos en la última década, originando un incremento en las tasas de morbilidad y de mortalidad de 10 veces más en los últimos 20 años (Pappas *et al.*, 2009), siendo *Candida*, *Cryptococcus*, *Pneumocystis* y *Aspergillus* los patógenos más frecuentemente implicados. La distribución de los agentes causales varía en función de la geografía, condiciones de los pacientes y unidades de hospitalización.

Sin lugar a dudas, la candidemia es la enfermedad fúngica invasora más común en nuestro entorno y aunque hay descritas más de cien especies distintas de *Candida*, el 95-97% de todas estas enfermedades producidas por levaduras de este género están causadas por solo cinco especies: *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis* y *C. krusei*. El 3-5% restante se encuentra representado por un grupo de 15-18 especies diferentes entre las que destacan *C. guilliermondii*, *C. lusitaniae* y *C. rugosa* (Pemán y Salavert, 2012).

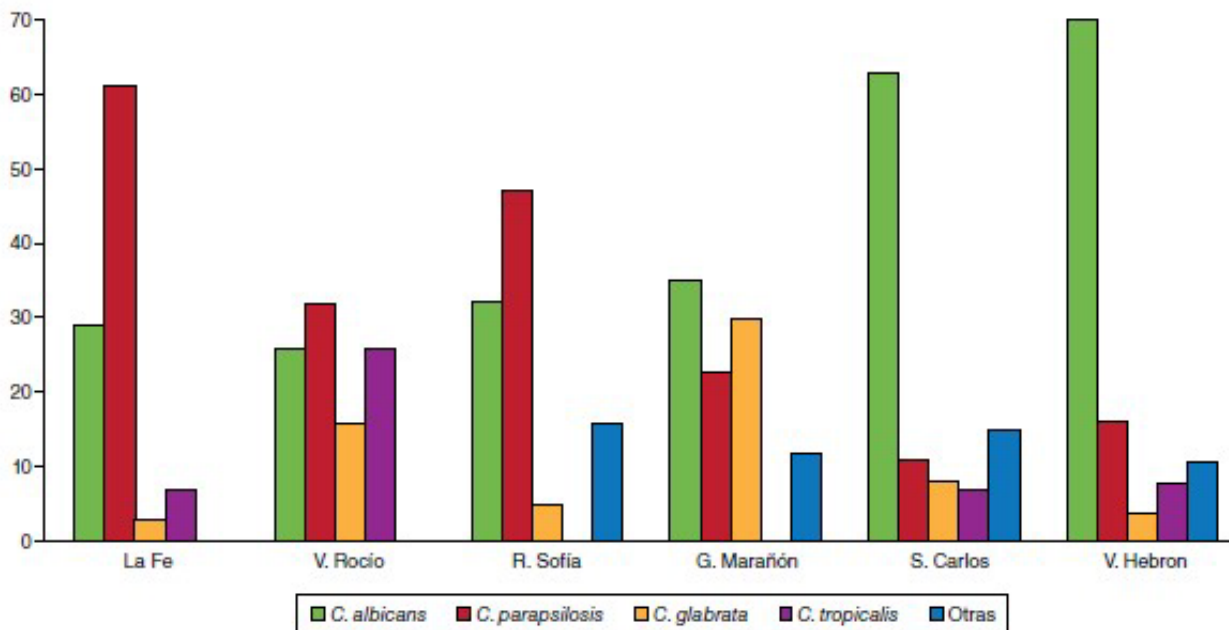
Al comparar los resultados obtenidos en el estudio realizado por Pemán y Salavert en el 2012 con los obtenidos en otro trabajo similar realizado por el mismo



grupo hace una década (Pemán *et al.*, 2002), se observa cómo el porcentaje global de incidencia de las principales especies causantes de fungemia en nuestro país apenas ha variado a pesar de la incorporación de los nuevos antifúngicos aparecidos desde entonces.

En el último estudio multicéntrico español donde participaron 43 centros hospitalarios y se incluyeron 1.377 aislamientos de hemocultivos pertenecientes a 1.357 episodios de fungemia (Pemán y Salavert, 2012), se observó que *C. albicans* fue la especie más frecuentemente aislada, seguida de *C. parapsilosis*, *C. glabrata*, *C. tropicalis* y *C. krusei*, a diferencia de otros estudios europeos o americanos donde *C. glabrata* continúa siendo la segunda especie aislada.

Sin embargo, en este estudio se observan notables diferencias en la distribución de las especies aisladas causantes, es decir, no fue completamente homogénea en toda España (Figura I.3.), observándose notables diferencias según la comunidad autónoma y/o el hospital estudiado.



**Figura I.3. Distribución de las principales especies causales de candidemia en las unidades de cuidados intensivos de seis hospitales españoles durante 2009 (estudio FUNGEMYCA).** Hospitales: La Fe (Valencia), Virgen del Rocío (Sevilla), Reina Sofía (Córdoba), Gregorio Marañón (Madrid), San Carlos (Madrid) y Vall d'Hebron (Barcelona).

La variabilidad geográfica en la distribución de las especies causantes de candidemia es un hecho ampliamente reconocido y, puesto que la sensibilidad de las mismas a los antifúngicos no es uniforme, antes de instaurar un tratamiento antifúngico empírico frente a estas graves infecciones es aconsejable conocer la realidad epidemiológica del entorno del paciente y del centro en que es asistido. De ahí, la importancia de la realización de estudios epidemiológicos periódicos que reflejen la realidad actual de las candidemias, tanto de la distribución de las especies causales como de su sensibilidad a los antifúngicos. Por lo tanto, es muy importante conocer la realidad epidemiológica de cada región o país (que tampoco suele ser globalmente uniforme) y las características propias de cada centro hospitalario con sus poblaciones especiales de pacientes y diferentes estrategias terapéuticas antifúngicas.

Actualmente se publican alrededor de mil artículos anuales referidos a este hongo, lo que hace que sea el tercer microorganismo más citado. El amplio número de grupos de investigación centrados en su estudio así como toda la información existente hace imposible una descripción detallada de todos los aspectos de su biología.

La principal fuente de infección para candidiasis en mucosas y cutáneas, así como diseminación hematógena por especies de *Candida*, es el mismo paciente. Es decir, que la mayoría de candidiasis provienen de infecciones endógenas en la que la microbiota comensal del hospedador normalmente aprovecha alguna condición de inmunosupresión del hospedador para causar la infección. La transmisión exógena de *Candida* también puede representar otra fuente de infección para ciertos tipos de candidiasis. Entre los ejemplos de vectores que pueden introducir el hongo en el hospedador humano se incluyen: el uso de soluciones de riego contaminada, fluidos de nutrición parenteral, transductores de presión y válvulas vasculares cardíacas y córneas. La transmisión de *Candida spp.* de sanitarios a pacientes, y de paciente a paciente, ha sido documentada extensamente, especialmente en el ámbito de la UCI. Las manos de los sanitarios sirven como potenciales reservorios para la transmisión nosocomial de las especies de *Candida* (Pfaller y Diekema, 2010).

Varios estudios han analizado la excesiva duración de las estancias así como los elevados costes hospitalarios atribuibles a la infección fúngica invasora por *Candida spp.* Se ha demostrado que los pacientes con candidemia permanecen entre 3 y 30 días más en el hospital que los pacientes no infectados por *Candida*, a igualdad de

condiciones de la enfermedad subyacente y gravedad de la enfermedad. Dada la prevalencia de las infecciones por *Candida* y su reconocido impacto sobre la mortalidad y la duración de la estancia hospitalaria, no es de extrañar que estas infecciones se asocien con importantes costes sanitarios. Los costes atribuibles a la candidemia oscilan entre el rango de 5.000 a 74.000 € por episodio infeccioso. Se estima que el 85% del encarecimiento de la asistencia para los pacientes que sufren de candidemia, es debido a la excesiva duración de la estancia. Puesto que cada caso de candidemia incrementa en decenas de miles de euros los gastos de hospitalización, los costes de atención sanitaria asociados con candidiasis hematológica diseminada es de alrededor de tres mil millones de euros al año en Europa (Pfaller y Diekema, 2010).

## I. 5. FACTORES DE VIRULENCIA EN *C. albicans*

*C. albicans* es capaz de invadir tejidos y evadir la respuesta inmune generada por el hospedador, y aunque el factor mayoritariamente determinante en las infecciones por *C. albicans* es la condición inmune del paciente, *C. albicans* posee una serie de factores intrínsecos cuya función es facilitar y promover la infección de los tejidos del hospedador. Al conjunto de esos factores se les denomina factores de virulencia (Calderone y Fonzi, 2001).

Los factores de virulencia de este patógeno oportunista incluyen su habilidad para sobrevivir como comensal, la adherencia a células del hospedador, la secreción de enzimas degradativas y el cambio de morfología. Estos factores de virulencia juegan un papel en cada etapa de la infección por *C. albicans*. La infección puede dividirse en cuatro etapas (De la Calle *et al.*, 2012):

1. Colonización: El primer paso para el desarrollo de un proceso infeccioso es el reconocimiento y posterior unión del agente patógeno a las células del hospedador, en la colonización participan la adhesión epitelial y adquisición de nutrientes por medio de la acción de adhesinas, además de la producción, por parte de *C. albicans*, de una serie de enzimas degradativas (hidrolíticas) que favorecen la infección, un inicio de formación de hifas para la invasión y, por tanto, cambio fenotípico. (Figura I. 4)

2. Infección superficial: en esta etapa es importante la penetración epitelial por medio de degradación de proteínas del hospedador por enzimas hidrolíticas y formación y desarrollo de hifas. (Figura I. 4)

3. Infección profunda: la penetración tisular, invasión vascular y evasión inmune se facilita por la transición levadura-micelio, por medio de enzimas hidrolíticas y la continua formación y desarrollo de hifas. (Figura I. 4)

4. Infección diseminada: la variabilidad fenotípica contribuye en gran medida a la plasticidad del microorganismo y a la posibilidad de evadir los mecanismos de defensa del hospedador, pudiendo expandirse a otros tejidos. *C. albicans* la realiza a través de la adherencia al endotelio, infección de tejidos del hospedador, activación del sistema de coagulación por intervención de adhesinas, enzimas hidrolíticas, formación de hifas nuevamente y cambio de fenotipo. (Figura I. 4)

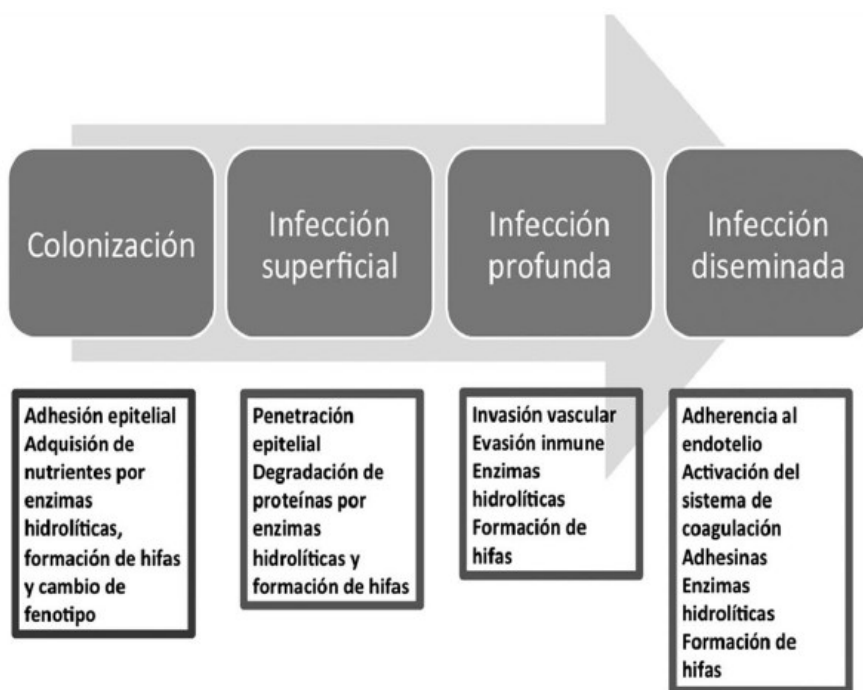


Figura I. 4. Etapas de la infección por *C. albicans* y los mecanismos de virulencia que intervienen en cada etapa.

La definición de virulencia conlleva la capacidad de un microorganismo para causar una enfermedad, y este proceso está determinado por muchos factores, entre los cuales los dependientes del agente infeccioso se denominan: factores de virulencia. Estos factores de virulencia se podrían definir como las aptitudes con las cuales los agentes patógenos producen en el ser humano: invasión, infección, modulación de la

respuesta inmune a su favor y dificultad en el tratamiento contra ellos. Esto sumado a características del hospedador, de las cuales toman ventaja, como la humedad en ciertas áreas del cuerpo, la inmunosupresión y la presencia de artefactos médicos invasivos, consiguen una invasión e infección eficaz en las células del hospedador.

Los factores de virulencia expresados o requeridos por *C. albicans* para causar infección pueden ser muy diversos en función del tipo de infección, estadio de la infección y la naturaleza de la respuesta del hospedador. Existen diversos factores potenciales de virulencia, como la morfología celular, la actividad enzimática extracelular, el cambio fenotípico, factores de adhesión, que favorecen la formación de biopelículas, entre otros. A continuación se describen, de manera independiente, cada uno de estos factores.

### ***I. 5. 1. Factores de adherencia***

En *C. albicans*, al igual que en otros microorganismos que se asocian con animales, el reconocimiento específico y la posterior adhesión a los tejidos del hospedador es un factor clave para la creación y el mantenimiento de los estados de comensal y de patógeno. Además, sirven para la colonización de las células epiteliales, endoteliales, factores solubles, matriz extracelular y materiales inertes implantados en el cuerpo del hospedador.

La primera etapa en el desarrollo de la infección es la interacción entre el microorganismo y las células del hospedador. Para ello moléculas específicas son expresadas con la intención de promover esta adherencia específica a las células del hospedador. Estas moléculas son proteínas fúngicas conocidas como adhesinas (Calderone, 1993; Hostetter, 1994; Chaffin *et al.*, 1998), que se localizan en la superficie de blastosporas e hifas y parecen tener naturaleza glicoproteica. Se cree que esta capacidad de *C. albicans* para adherirse a la superficie de la célula del hospedador está directamente correlacionada con su patogenicidad (Calderone *et al.*, 2000).

Se denominan ligandos o receptores a aquellos componentes de las células del hospedador que son reconocidos por las adhesinas. Estos ligandos son de naturaleza muy diversa, entre ellos se encuentran:

a) Carbohidratos, tales como polisacáridos, glicoproteínas y residuos de fructosa de estructura mínima como las que se encuentran en todos los grupos sanguíneos del sistema ABO.

b) Proteínas, hay componentes proteicos del tubo germinal que conforman una capa externa fibrilar y le confieren hidrofobicidad al hongo, además de funcionar como receptores para proteínas del hospedador, como el colágeno tipo I y IV, fibronectina, laminina, fibrinógeno, entactina y otras proteínas como componentes del sistema del complemento C3b, iC3b y C3d.

c) Moléculas de tipo lipídico.

En *C. albicans* se encuentran diferentes tipos de adhesinas. Estas son las pertenecientes a la familia Als, Hwp1p, Int1p y Mnt1p, aunque sólo describiremos las dos más importantes: Als y Hwp1.

### **I. 5. 1. 1. Als (*agglutinin-like sequence*)**

Los genes *ALS* reciben su nombre debido a la homología que presentaba el primero de estos genes descrito, *ALS1*, con dominios del gen de la  $\alpha$ -aglutinina de *S. cerevisiae* cuyo producto proteico media interacciones célula-célula durante el apareamiento (*mating*) de células haploides (Lipke *et al.*, 1989; Hoyer *et al.*, 1995).

Existe un grupo de adhesinas codificado por la familia de genes *ALS* (*Agglutinin-Like Sequence*) en *C. albicans* que transcriben ocho proteínas de la superficie celular ligados a glicosilfosfatidilinositol (GPI) y cuyos miembros median la adhesión del microorganismo a la superficie de las células del hospedador. Por ejemplo, las proteínas Als1, Als3 (expresada en las hifas) y Als5 fomentan la fusión a constituyentes de células epiteliales orales, mientras que las Als6 y Als9 no lo hacen. El sustrato de las proteínas Als2, Als4 y Als7 no ha sido determinado aún. Las proteínas Als actúan cooperativamente y forman agregados similares a amiloide a lo largo de la superficie celular, facilitando la aglutinación de las células fúngicas (Hoyer, 2001).

El conocimiento actual del genoma completo de *C. albicans* supone una excelente fuente para determinar la existencia de otros productos génicos que permitirán

conocer de manera más profunda cómo se realiza la interacción entre el microorganismo y el hospedador.

### I. 5. 1. 2. Hwp1 (*Hyphal wall protein*)

La proteína 1 de la pared de la hifa (Hwp1) es una manoproteína expresada en la superficie de las hifas de *C. albicans* y facilita su adherencia de forma covalente a las células epiteliales orales al mimetizar proteínas ricas en prolina, sustrato natural de las transglutaminasas asociadas a estas células (Castrillón Rivera *et al.*, 2005).

### I. 5. 2. *Secreción de enzimas hidrolíticas*

Las enzimas hidrolíticas pueden proponerse como determinantes de virulencia en *Candida*, ya que tienen la capacidad de romper polímeros que proporcionan nutrientes accesibles para el crecimiento de los hongos, así como de inactivar las moléculas útiles en la defensa del organismo.

Las principales enzimas extracelulares relacionadas con la patogénesis de *Candida* son proteasas, fosfolipasas y lipasas. Existen dos grandes familias de enzimas degradativas secretadas y algunos de sus miembros han sido asociados con invasión. Corresponden a las aspartil proteinasas (SAP, codificadas por 10 genes) y las fosfolipasas (PL) (Figura I. 5).

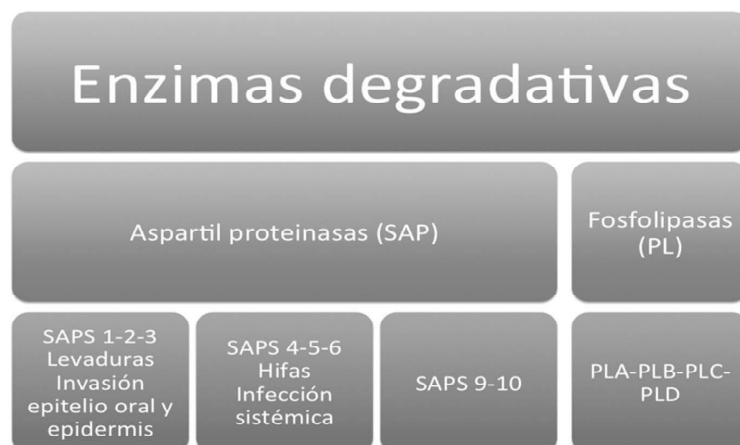


Figura I. 5. Enzimas degradativas de *C. albicans*.

### I. 5. 2. 1. Proteinasas aspárticas (SAP)

La actividad proteolítica extracelular juega un papel importante en la patogenicidad de *Candida spp.*, y se debe principalmente a las proteínas Sap (Secreted aspartyl proteinases). Estas proteínas pueden estar unidas o incorporadas en la pared celular o ser secretadas y sirven para que *C. albicans* hidrolice proteínas del hospedador como colágeno, laminina, fibronectina, mucina, lactoferrina e inmunoglobulinas. De esta forma puede introducirse entre las células epiteliales, nutrirse y evadir la respuesta inmune.

El hecho de que *C. albicans* codifique al menos 10 proteínas Sap, y sea capaz de colonizar diferentes medios sugiere que la expresión diferencial de estos genes se debe a una reacción específica frente a las condiciones ambientales (Monod *et al.*, 2002). Esta teoría ha sido demostrada mediante numerosos estudios de expresión tanto *in vitro* como *in vivo* en animales y humanos (Hube *et al.*, 1994; Monod *et al.*, 1998; Staib *et al.*, 2000 a, b; Hube, 2000; Felk *et al.*, 2002). Se ha demostrado que las proteínas Sap1, Sap2 y Sap3 son secretadas sólo por levaduras y contribuyen al daño tisular e invasión del epitelio oral y la epidermis. Además los genes *SAP4*, *SAP5* y *SAP6* son inducidos después de la internalización de células de levadura por macrófagos (Borg von Zepelin *et al.*, 1998) y que además *SAP4* y *SAP6* son genes de expresión mayoritaria en fase micelial de *C. albicans* (Felk *et al.*, 2002; Chen *et al.*, 2002; Korting *et al.*, 2003). También se demostró que las proteínas Sap9 y Sap10 están conectadas con la pared celular fúngica al poseer un sitio de unión GPI (Albrecht *et al.*, 2006).

Las proteínas Sap tienen diversas funciones durante el proceso infeccioso, que incluyen la digestión de moléculas para la adquisición de nutrientes, desorganización de membranas celulares del hospedador para facilitar la adhesión y la invasión de tejidos, así como moléculas del sistema inmunitario del hospedador para evitar o resistir la respuesta inmune (Naglik *et al.*, 2003).

### I. 5. 2. 2. Fosfolipasas

La producción de fosfolipasas está relacionada con la capacidad patógena de *C. albicans*, ya que se observa una correlación entre la virulencia y la actividad fosfolipásica (Ibrahim *et al.*, 1995).



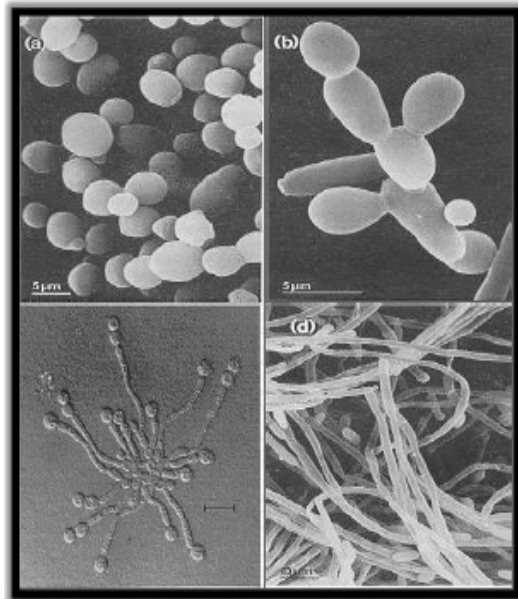
Se han identificado distintas fosfolipasas secretadas por *C. albicans* (fosfolipasa A, fosfolipasa B, fosfolipasa C, fosfolipasa D1, lisofosfolipasa y lisofosfolipasa transacilasa) que participan activamente en los procesos de respuesta ante señales de estrés. Por su acción enzimática son consideradas 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.

Ensayos de interrupción del gen de la fosfolipasa B de *C. albicans* (*CaPLB1*) han demostrado que esta proteína es necesaria para la virulencia e invasión ya que hidroliza las uniones de éster de glicerofosfolípidos de la membrana celular del hospedador. Así pues, las cepas que carecen del gen *PLB1* presentan una capacidad de penetración en células del hospedador mucho más reducida (Ghannoum, 2000), mientras que la reintroducción del gen provoca la recuperación plena de la virulencia (Mukherjee *et al.*, 2001).

### **I. 5. 3. Morfogénesis**

*C. albicans* puede existir en cuatro morfologías diferentes (Figura I.6): a) como levadura, también llamada blastospora o blastoconidia que corresponde a la fase unicelular del hongo y tiene apariencia elipsoidal; b) como pseudohifa, formada por células alargadas que permanecen unidas tras la gemación formando cadenas, pero que carecen de continuidad citoplasmática; y d) como micelio, o hifa verdadera de aspecto filamentoso, formado por varias células separadas por septos, pero que se mantienen comunicadas por poros de 25 nm de diámetro. Por último, c) las clamidosporas son células de forma más o menos esférica, de pared gruesa que se generan a partir de hifas en fase estacionaria, cuando se encuentran en condiciones desfavorables (estrés nutricional o cualquier otro tipo de estrés), por lo que es considerada una posible forma de resistencia (Odds, 1988).



**Figura I.6. Morfologías de *C. albicans*: (a) Levadura, (b) pseudohifa, (c) clamidospora y (d) micelio.**

El término morfogénesis en *C. albicans* se refiere a la transición reversible entre la forma unicelular levaduriforme y el crecimiento filamentosos o micelio. La forma de levadura es útil para facilitar la diseminación del hongo en el torrente sanguíneo al adherirse de forma significativa a las células endoteliales, mientras que la hifa es responsable de la invasión celular.

Durante años se ha intentado demostrar la relación entre la forma filamentosos y la virulencia (Calderone y Fonzi, 2001; Brown, 2002; Liu, 2002) pero aún hoy en día este punto no está demostrado de forma fehaciente ya que se han observado cepas atenuadas monomórficas tanto para la forma micelial como levaduriforme (Elorza *et al.*, 1994). Este dato está en consonancia con el hecho de que en la mayoría de las lesiones se encuentran ambas morfologías, sugiriendo que ambas juegan un papel importante en el desarrollo de la enfermedad.

Estudios recientes sugieren que la virulencia no depende de la forma morfológica *per se*, sino más bien de la facilidad de experimentar o realizar el cambio fenotípico, lo cual es un factor de virulencia (Saville *et al.*, 2003; Kruppa, 2009). Aunque el mecanismo exacto de esta morfogénesis aún no se comprende completamente, las vías de señalización que traducen señales del medio ambiente al cambio fenotípico han sido bien estudiadas (Figura I.7) (Lo *et al.*, 1997; Stoldt *et al.*, 1997; Lane *et al.*, 2001; Biswas *et al.*, 2007).

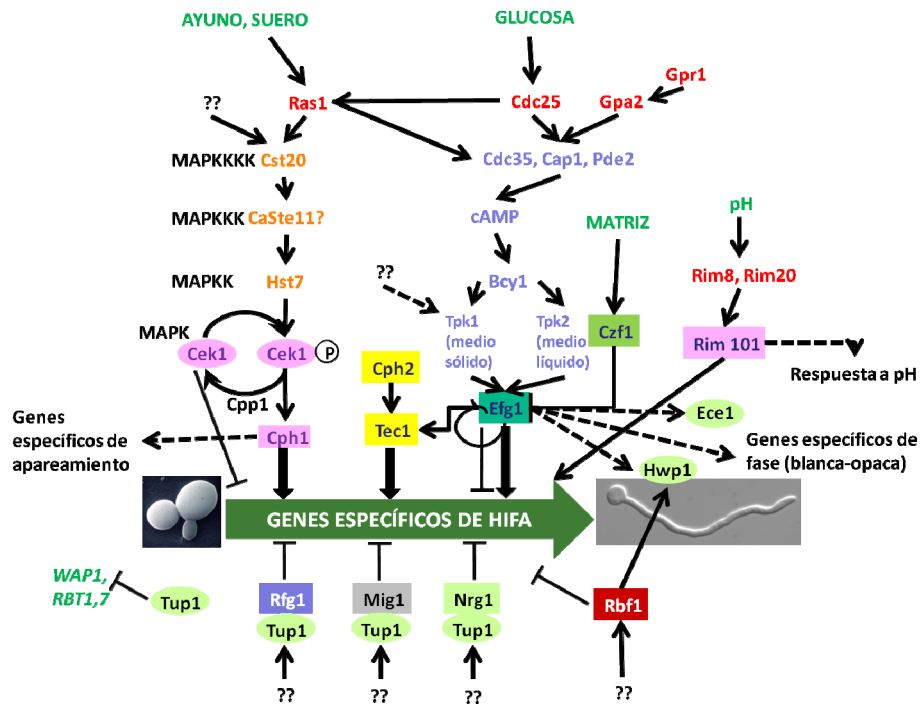


Figura I.7. Regulación del dimorfismo en *C. albicans* mediante múltiples vías de señalización (Biswas *et al.*, 2007).

#### I. 5. 4. Cambio fenotípico (*Phenotypic switching*)

La variación antigénica es un mecanismo de adaptación de numerosos agentes patógenos. *C. albicans* tiene la capacidad de cambiar espontáneamente, de forma reversible, y muy frecuentemente ( $10^{-4}$  a  $10^{-2}$ ) entre diferentes fenotipos. Hay diferencias en la morfología de las colonias tales como: suave, áspero, estrella, punteado, arrugas irregulares y/o difusos (Soll, 1997). Debido a que el cambio fenotípico puede afectar a la virulencia, se ha sugerido que desempeña un papel en la generación de la variabilidad para colonizar poblaciones como una forma de adaptación rápida a los cambios ambientales (Odds, 1997).

La cepa de *C. albicans* WO<sup>1</sup> cambia de forma espontánea entre una fase “blanca” y otra “opaca” (Soll, 1997). Este cambio ha servido como modelo para el estudio de los mecanismos moleculares del cambio fenotípico en otras cepas de *C. albicans*.

Estudios recientes indican que *C. albicans* utiliza las mismas rutas de transducción de señal para la regulación del dimorfismo, apareamiento y variación fenotípica. Mediante el empleo de chips de DNA se ha observado que cerca de 400

ORFs varían su nivel de expresión durante el cambio fenotípico blanco/opaco de WO<sup>1</sup> (Lan *et al.*, 2002). Se han encontrado genes específicos de la fase “blanca” como *WHII* y *EFG1* y de la fase “opaca”, como *OP4*, *SAP1*, *SAP3* y *CDR3*.

### **I. 5. 5. Biopelículas**

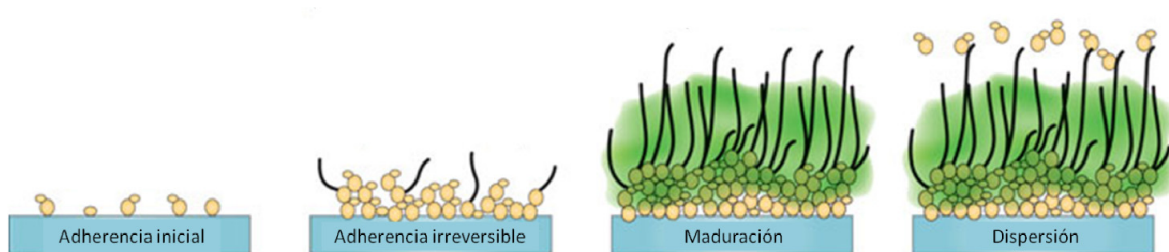
Las especies de *Candida* se reconocen como los principales agentes de infecciones adquiridas en el hospital. Los institutos nacionales de Salud de Estados Unidos estiman que el 80% de las infecciones en humanos son el resultado de biopelículas formadas por patógenos. (<http://grants.nih.gov/grants/guide/pa-files/PA-99-084.html>).

Su aparición como patógeno nosocomial es importante, ya que es un factor de riesgo asociado con los procedimientos médicos modernos, sobre todo con el uso de fármacos inmunosupresores o citotóxicos, de antibióticos potentes que suprimen la flora bacteriana normal y de los dispositivos implantados de varias clases. Casi siempre, los dispositivos, como catéteres intravasculares o urinarios y tubos endotraqueales, se asocian con infecciones y se detecta la formación de biopelículas en su superficie (Crump y Collignon, 2000). Otros dispositivos, como válvulas cardíacas, marcapasos y reemplazos de articulaciones (cadera o rodilla), son susceptibles de infección por *Candida*, generalmente durante el tiempo de su colocación. Clínicamente, las infecciones que cursan con la formación de biopelículas suponen un problema clínico muy grave pues en estas estructuras los microorganismos son más resistentes no sólo a los agentes antimicrobianos, sino también a las defensas del hospedador (Castrillón Rivera *et al.*, 2005). La mayor capacidad de *C. albicans* para formar biopelículas en estas superficies es la razón por la que esta especie es más patogénica que las que son menos capaces de formar estas estructuras, como *C. glabrata*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis* y *C. keyfr* (Nikawa, 1998).

Las biopelículas de *C. albicans* consisten en una estructura de levaduras e hifas en superficies bióticas o abióticas, embebidas en una matriz extracelular producida por sí misma, formando una estructura tridimensional compleja, que contribuyen a la dificultad en el tratamiento de pacientes con infecciones sistémicas. La formación de la biopelícula está regulada por el factor de transcripción Bcr1p. También contribuye a la

formación de biopelícula, la adhesina Hwp1, una de las adhesinas específicas de hifa (Naglik *et al.*, 2003).

Para su formación es necesario que las levaduras se unan a la superficie del látex, silicona o plástico por medio de adhesinas, como Eap1, empiecen a formar tubos germinales, se adhieran fuertemente a las células endoteliales y finalmente originen hifas, las cuales maduran dentro de una matriz extracelular, debido a la interacción entre Als1 y 3 con Hwp1 (Lim *et al.*, 2012; Kumamoto y Vines, 2005). La producción de farnesol, propicia la liberación de las levaduras recién formadas en la biopelícula para diseminarse y colonizar una nueva superficie (Brand, 2012) (Figura I.8).



**Figura I.8.** Esquema de los sucesivas etapas de la formación de las biopelículas (Finkel y Mitchell, 2011).

### ***I. 5. 6. Cambio morfológico por densidad celular (Quorum sensing)***

Recientemente se ha demostrado que *C. albicans* puede regular su cambio morfológico a través de cambios en la densidad celular. La base para este control de la morfogénesis dependiente de la densidad celular es similar a la que se observa con las células bacterianas, denominándose *Quorum sensing* (QS) (Kuppra, 2009).

En los últimos estudios realizados, la QS ha sido descrito como un fenómeno que contribuye al control morfogénico de *C. albicans*. Una de las condiciones que definen el cambio de levadura a hifa *in vitro* es la dependencia de la densidad celular para determinar la morfogénesis, lo que ha sido llamado el “efecto del tamaño del inóculo”. Este término ha sido asociado con la regulación por QS (Hornby *et al.*, 2001). El “efecto del tamaño del inóculo” se ejemplifica en el siguiente experimento: se observó que al ser inoculado a una densidad celular por debajo de  $10^6$  células/ml en condiciones que favorece la morfogénesis hifal (pH 7,5; 37 °C) como es de esperar las células de *C. albicans* germinan para formar hifas; sin embargo, si la densidad celular es

superior a  $10^6$  células/ml, no se favorece la germinación y, por tanto, las células permanecen en su mayor parte en forma de levadura (De la Calle-Rodríguez *et al.*, 2012).

Así pues el cambio morfológico por densidad celular se trata de un factor de virulencia que precede al cambio de morfología y a la producción de las proteínas Sap. Es un fenómeno que sirve para establecer una comunicación entre las células y el ambiente químico y físico de su entorno. Los sistemas regulados por QS permiten a *C. albicans* relacionarse entre sí, desarrollando un comportamiento de tipo cooperativo (Kruppa, 2009).

### ***I. 5. 7. Modulación de la respuesta inmune***

*C. albicans* puede modular la respuesta inmune del hospedador, evadiendo los mecanismos de defensa del mismo. Se sabe que *C. albicans* interactúa con el factor de complemento C3b (Heidenreich y Dierich, 1985). Las proteínas de *Candida* exhiben similitudes antigénicas y funcionales a los receptores de complemento 3 y 4. Estos receptores CR3 y CR4 son análogos de integrinas. Así, debido a que *Candida* tiene receptor para estos componentes del complemento, puede evadir la fagocitosis (Henriques *et al.*, 2006).

Como se ha podido constatar, *C. albicans* cuenta con una serie de atributos que le otorga virulencia e incluso letal para el ser humano. Estos factores son dianas útiles para el control de la infección por hongos y hay estudios en proceso para la elaboración de vacunas efectivas, como ya hemos visto anteriormente. El profundo conocimiento de estos mecanismos patogénicos ayudará a desarrollar mejores terapias en el futuro contra estos microorganismos.

Sin embargo, no hay que olvidar que la pared celular *C. albicans* es considerada un factor clave en la virulencia, dada la importancia que tienen sus componentes en la antigenicidad, adhesión, morfología, formación de biopelículas e invasión del hospedador, es una estructura esencial para su éxito como un patógeno.

## I. 6. LA PARED CELULAR DE *C. albicans*

La pared celular es una envoltura multi-estratificada situada externamente a la membrana plasmática y presente en células vegetales, bacterianas y fúngicas, estando ausente en las células de mamíferos. Por lo tanto, esta estructura constituye una diana ideal para el desarrollo de nuevas quimioterapias fúngicas selectivas. No obstante el éxito en este campo hasta el momento, ha sido bastante limitado (Reboli *et al.*, 2007; Cornely *et al.*, 2002).

La importancia de la pared celular radica en que es la estructura que se requiere para el crecimiento y la protección contra la agresión osmótica, y además es el sitio de contacto entre el organismo y su entorno. Los ligandos y receptores de la superficie celular de la pared promueven la colonización de las células y tejidos del hospedador, mientras que las enzimas proteolíticas están implicadas en la penetración al tejido del hospedador.

Entre sus principales funciones cabe destacar:

- Actúa como un exoesqueleto que determina la forma de la célula y ayuda a mantener su turgencia, siendo una defensa que permiten proteger a la célula de agresiones tanto químicas como mecánicas (Smith *et al.*, 2000) Además, debido a su rigidez y resistencia supone, también, una barrera frente a agresiones físicas y químicas (Klis *et al.*, 2001).

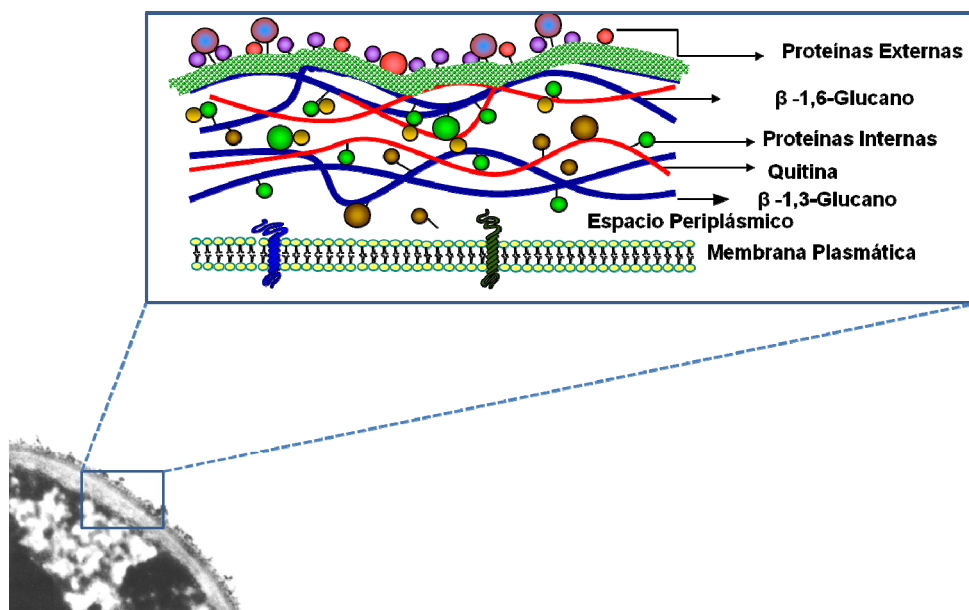
- La pared celular es un elemento fundamental en la interacción parásito-hospedador, habiéndose relacionado con ella numerosos determinantes antigénicos, receptores de adhesión y proteasas implicadas en virulencia y determina las características antigénicas del hongo, así como su hidrofobicidad.

- Es una estructura dinámica cuya composición varía en función del ciclo celular, de la transición morfológica y de la composición y características del medio de cultivo (Kapteyn *et al.*, 2001). Además de ser una estructura muy resistente, es a su vez, una estructura altamente elástica (Martínez de Marañón *et al.*, 1996). Cuando se transfieren células de levadura a una solución hipertónica, las células se encogen rápidamente perdiendo hasta el 60% de su volumen inicial, en un proceso que es reversible, recuperando las células su volumen normal en el momento en que son

transferidas de nuevo al medio de partida. Esta elasticidad se debe, probablemente, a las cualidades elásticas de las cadenas de  $\beta$ -1,3-glucano. La elasticidad de la pared es fundamental en los procesos de secreción de proteínas complejas a través de la pared.

### I. 6. 1. Composición de la pared celular

La pared celular de *C. albicans* está formada por una malla tridimensional constituida fundamentalmente cuatro clases de macromoléculas de naturaleza polisacáridica: manoproteínas (péptidos unidos covalentemente a polímeros de manano),  $\beta$ -1,3-glucano,  $\beta$ -1,6-glucano y quitina, tal como se representa en la figura I.9.



**Figura I.9. Modelo propuestos para la arquitectura de la pared celular en levaduras.** Modificado por Valentín *et al.*, 2000.

La pared celular de *C. albicans* constituye aproximadamente el 30% del peso seco de la célula. Los porcentajes en peso seco de cada uno de los distintos componentes mayoritarios se detallan en la tabla I.4. (Klis *et al.*, 2001). Además de estos componentes mayoritarios, presenta cantidades más pequeñas de otras sustancias: lípidos, sales, etc. Algunos de estos componentes minoritarios poseen propiedades antigénicas importantes como es el caso del fosfolipomanano (PLM) que reacciona frente a anticuerpos específicos para  $\beta$ -1,2-oligomanósidos (Trinel *et al.*, 1999).



Macromolécula	Peso seco
Manoproteínas	35-40 %
$\beta$ -1,6-glucano	5-10 %
$\beta$ -1,3-glucano	50 %
Quitina	1-2 %

**Tabla I.4. Porcentajes en peso seco de los componentes de la pared celular.**

Los componentes de la pared celular se pueden clasificar en dos tipos diferentes:

- Los componentes estructurales (quitina y glucanos) organizados formando microfibrillas que confieren resistencia a la estructura y forman el esqueleto de la pared.
- Los componentes amorfos, constituidos por las manoproteínas distribuidas principalmente en la capa externa de la pared celular, siendo responsables de la interacción con las células del hospedador.

La composición de la pared celular de *C. albicans* varía en función de diferentes parámetros como la morfología, el medio de cultivo o el pH (Klis *et al.*, 2001). Los diferentes polímeros que componen la pared celular interaccionan entre ellos formando un entramado que confiere una serie de características a las células que la poseen.

### I. 6. 1. 1. $\beta$ -glucanos

El glucano es el componente mayoritario de la pared celular de *C. albicans* y de otras levaduras como *S. cerevisiae*. Constituye alrededor del 50% del total del peso seco de la pared. El glucano de la pared celular de *C. albicans* está constituido por la unión de moléculas de D-glucosa en configuración  $\beta$ . Según el tipo de enlace predominante, se puede clasificar al  $\beta$ -glucano en dos tipos de polímeros diferentes: el  $\beta$ -1,3-glucano y el  $\beta$ -1,6-glucano.

### *1. 6. 1. 1. 1. $\beta$ -1,3-glucano*

Es el componente mayoritario de la pared celular y responsable de conferirle resistencia mecánica y elasticidad. Está constituido por moléculas de unos 1.500 residuos de glucosa, formando una cadena lineal principal con uniones  $\beta$ -1,3 con un 3% de ramificaciones unidas mediante enlaces  $\beta$ -1,6 (Manners *et al.*, 1973).

El  $\beta$ -1,3-glucano constituye una red tridimensional que envuelve a la célula, es el principal responsable de la resistencia mecánica de la pared y forma el esqueleto al que se van a anclar el resto de componentes (Smits *et al.*, 1999). Las moléculas de  $\beta$ -1,3-glucano maduro están ramificadas y poseen numerosos extremos no reductores que podrían actuar como sitios de unión para el resto de componentes (Kollar *et al.*, 1995; Kollar *et al.*, 1997).

Los genes que codifican la  $\beta$ -1,3-glucano sintetasa fueron identificados inicialmente en *Saccharomyces cerevisiae* y se denominan FKS1 y FKS2 (Douglas *et al.*, 1994; Qadota *et al.*, 1996). Actualmente se conoce análogos de estos genes en varias especies de *Candida*, *Aspergillus*, *Cryptococcus* y *Pneumocystis*. FKS1 codifica una proteína de la membrana citoplásmica de 215 kDa que es la subunidad principal de la glucano sintetasa. La disrupción de los genes FKS1 o FSK2 produce mutantes con un crecimiento lento y una pared defectuosa (Douglas *et al.*, 1994; Mazur *et al.*, 1995). Sin embargo, la eliminación simultánea de los dos genes es letal (Beauvais *et al.*, 1995). La actividad de la  $\beta$ -1,3-glucano sintetasa se encuentra regulada por el ciclo celular y está bajo el control del gen RHO1, que interactúa no sólo con las proteínas Fks sino con la proteína-quinasa C, un regulador de la cascada MAP (Mitogen-Activated Protein). Rho1p se activa por las proteínas Rom1 y Rom2 y esta última a su vez se activa por las glicoproteínas de la pared celular Wsc1 y Mid2. La disrupción del gen RHO1 es letal.

### *1. 6. 1. 1. 2. $\beta$ -1,6-glucano*

El  $\beta$ -1,6-glucano constituye aproximadamente el 5-10% del peso seco de la pared celular y juega un papel esencial en la interconexión del resto de componentes de la misma (Klis *et al.*, 2001).

El  $\beta$ -1,6-glucano es una molécula esencial en el anclaje de las manoproteínas a través del remanente del GPI (Kapteyn *et al.*, 1996; Shahinian y Bussey, 2000; Klis *et al.*, 2001) o bien a través de las cadenas N-glicosídicas (Shahinian *et al.*, 1998).

### I. 6. 1. 2. Quitina

Pese a que el porcentaje de quitina en la pared celular es minoritario (1-2%), tiene un papel muy importante pues es el componente responsable de mantener la rigidez de la pared celular, y además la adición de quitina a los nódulos que constituyen la estructura de la pared celular es esencial para la insolubilización de la misma.

Es considerada característica de las paredes celulares fúngicas, ya que no forma parte de esta estructura ni en bacterias ni en plantas. Se encuentra depositada en el espacio extracelular próximo a la membrana citoplásmica.

Se compone de moléculas de N-acetil-D-glucosamina unidas mediante enlaces  $\beta$  (1 $\rightarrow$  4) que se distribuye formando cadenas antiparalelas unidas por puentes de hidrógeno y denominadas microfibrillas. Las quitin-sintasas son proteínas integrales de membrana, con un número variable de regiones transmembrana en su extremo C-terminal y un dominio catalítico en la cara citoplasmática (Munro *et al.*, 2001). *C. albicans* posee cuatro factores reguladores de las quitin-sintasas (*CHS1*, *CHS2*, *CHS3*, *CHS8*) (Martínez y Gozalbo, 1994).

Dada su importancia en la estructura de la pared, la síntesis de la quitina es una buena diana para la acción de los antifúngicos. Aunque se han descubierto algunos agentes que interfieren con la síntesis de quitina (Nikomicinas y polioxinas) todavía no se ha comercializado ningún antifúngico que utilice este mecanismo de acción.

### I. 6. 1. 3. Manoproteínas

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. Las glicoproteínas de los hongos se denominan manoproteínas porque las cadenas de carbohidrato contienen mayoritariamente unidades de manosa. Las manoproteínas constituyen el 35-40 % del peso seco de la pared celular. La presencia de moléculas de un glicolípido,

fosfolipomanano, en la superficie celular favorece la adhesión de *C. albicans* a los tejidos (Poulain *et al.*, 2002).

Las manoproteínas se encuentran unidas a los polímeros estructurales de la pared celular (los glucanos y la quitina) y se distribuyen a lo largo de toda la estructura (Valentín *et al.*, 1987). Además presentan una serie de peculiaridades tales como: poseer en su extremo N-terminal una secuencia canónica para un péptido señal, ser ricas en los aminoácidos serina y treonina, susceptibles de ser O-glicosilados con hasta cinco restos de manosa, y asimismo ser susceptibles de modificarse por N-glicosilación (Valentín *et al.*, 2000). Se puede destacar las siguientes funciones de las manoproteínas (Chaffin, 2008; Klis *et al.*, 2009; González *et al.*, 2009):

- Una función estructural, colaborando en la arquitectura e integridad de la pared celular.
- Actúan como mediadoras en la adhesión a las células del hospedador, así como a dispositivos quirúrgicos (catéteres, prótesis, sondas urinarias, válvulas cardíacas, lentes intraoculares, etc.).
- Ejercen de promotoras en la invasión de células epiteliales del hospedador.
- Intervienen como mecanismo de defensa frente al sistema inmune del hospedador.
- Promueven la formación de biopelículas
- Participan en la economía celular, conduciendo al aprovechamiento de recursos regulatorios de funcionamiento celular.

Los tipos de unión entre la parte proteica y la azucarada son de dos tipos. El carbohidrato presente en las manoproteínas puede estar unido a través de:

A) un enlace N-glicosídico entre el manano ramificado de alto peso molecular y un residuo de asparagina de la cadena polipeptídica.

B) enlaces O-glicosídicos entre manosa o pequeños oligosacáridos y el grupo hidroxilo de los aminoácidos serina y/o treonina.

### I. 6. 1. 3. 1. Clasificación de las manoproteínas

Las manoproteínas pueden clasificarse según su funcionalidad en:

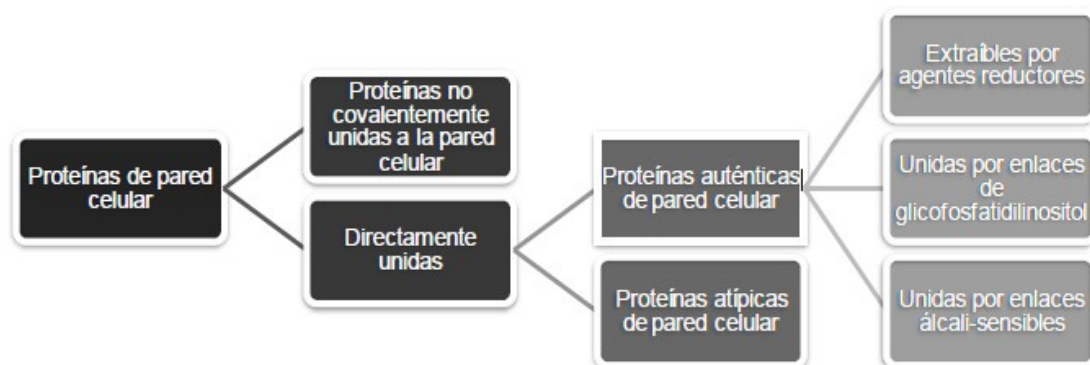
- Manoproteínas con actividad enzimática, como es el caso de las fosfolipasas (Ibrahim *et al.*, 1995; Ghannoum, 2000), proteinasas aspárticas (Sap) (Hube *et al.*, 1997) o trehalasa ácida (Pedreño *et al.*, 2004).

- Manoproteínas estructurales, que son componentes intrínsecos de la estructura de la pared: Hwp1 (Staab y Sundstrom, 1998), Rbt5 y Rbt1 (Braun *et al.*, 2000), Ssr1 (Garcerá *et al.*, 2003) y Pga13 (Gelís *et al.*, 2012).

- Manoproteínas implicadas en la adhesión, como las proteínas de la familia Als (Hoyer *et al.*, 2001).

Las manoproteínas se encuentran ampliamente distribuidas: secretadas, en el espacio periplásmico o como componentes de la pared celular, donde se expanden de una manera continua desde las capas más internas a las más externas predominando en las capas superficiales (Valentín *et al.*, 1987).

Las proteínas pueden estar ancladas a la estructura de la pared celular por diferentes tipos de enlaces esquematizadas en la figura I.10 y descritas a continuación:



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

- (i) A través de uniones débiles no covalentes, como enlaces del tipo puentes de hidrógeno y/o interacciones hidrofóbicas. Las proteínas unidas por este tipo de enlace son extraídas mediante tratamiento con SDS en caliente (Valentín *et al.*, 1984; Elorza *et al.*, 1988; Valentín *et al.*, 1989). La mayor parte de las proteínas extraídas mediante el tratamiento con un detergente no son verdaderas proteínas

de pared, sino que se trata de contaminaciones con fragmentos de membranas (Klis *et al.*, 2001). Recientes estudios del proteoma que constituye la pared celular de *C. albicans* han puesto en evidencia la presencia de un elevado número de enzimas glicolíticas tales como enolasa (Pitarch *et al.*, 2002), glicosiltransferasa Bgl2 (Sarchy *et al.*, 1997), gliceraldehido-3-fosfato-deshidrogenasa (Pitarch *et al.*, 2002; Crowe *et al.*, 2003), fosfoglicerato-mutasa, alcohol-deshidrogenasa (Crowe *et al.*, 2003), así como de otras proteínas que no poseen en principio características típicas de proteínas de secreción, tales como péptido señal procesable o motivo GPI. La mayor parte de estas proteínas “citosólicas” se han caracterizado como proteínas de unión a proteínas humanas (plasminógeno, laminina) (Crowe *et al.*, 2003) y son reactivas a sueros de ratón y humano infectados con *C. albicans*, lo que sugiere la presencia de estas proteínas en la superficie de las células. Aunque se desconoce si estas proteínas son intrínsecas de la pared celular o se trata de contaminantes, existen hipótesis que defienden la existencia de una ruta de secreción no convencional por la cual serían exportadas al exterior (Delgado *et al.*, 2001).

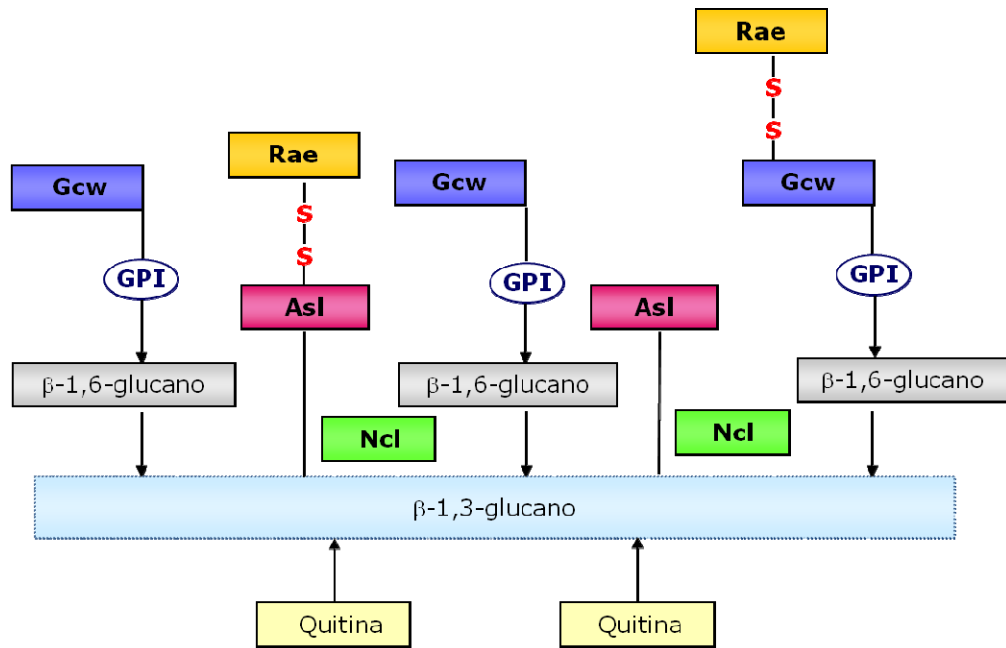
(ii) Mediante enlace covalente por puentes disulfuro (Castillo *et al.*, 2003). Entre las proteínas descritas en *S. cerevisiae* de este grupo se incluyen dos miembros de la familia Pir de esta levadura, Pir2 y Pir4, así como la proteasa Bar1 (Moukadiri *et al.*, 2001); Aga2, la subunidad activa del complejo de la aglutinina sexual en células MATa y algunas glucanasas de la pared celular como Sun4/Scw3, que en todos los casos son extraíbles de paredes aisladas por tratamiento con agentes reductores como el  $\beta$ -Mercaptoetanol, lo que indicaría que están unidas a través de puentes disulfuro a otras proteínas de pared celular (Casanova *et al.*, 1989). El marcaje radiactivo de las proteínas unidas mediante puentes disulfuro presenta un recambio muy bajo o nulo, indicando que no se trata de un paso intermedio en su incorporación a la pared celular sino de un anclaje estable y definitivo a otras proteínas de la pared (Ruiz-Herrera *et al.*, 2002). Sin embargo, se desconoce a qué proteínas se encuentran unidas estas proteínas liberadas mediante tratamientos reductores, pudiendo unirse a ellas mismas o a otras proteínas tipo Pir o GPI (Ramón *et al.*, 1999).

(iii) Unidas covalentemente a la estructura del glucano y liberadas por digestión enzimática del mismo (Valentín *et al.*, 1984; Elorza *et al.*, 1988; Kapteyn *et al.*,

1994; 2000; Garcerá *et al.*, 2003). De este grupo de manoproteínas podemos diferenciar dos subgrupos en función de a qué polímeros se encuentren unidas y ambos se describen con más detalle en los siguientes apartados:

- a) Manoproteínas unidas al  $\beta$ -1,3-glucano vía  $\beta$ -1,6-glucano. Este grupo de proteínas está constituido por manoproteínas que se encuentran modificadas post-traduccionalmente en su extremo C-terminal por una molécula de glicosilfosfatidilinositol (GPI) a través de la cual se unen al  $\beta$ -1,6-glucano que a su vez se une al  $\beta$ -1,3-glucano.
  - b) Manoproteínas unidas directamente al  $\beta$ -1,3-glucano. Entre estas proteínas de pared celular se encuentran las proteínas de la familia Pir.
- (iv) Nuevas técnicas, en particular la espectrometría de masas, ha revelado la presencia de proteínas no-glicosiladas en la pared celular fúngica, el papel de estas proteínas y su mecanismo de retención en la pared celular permanecen sin dilucidar (Pitarch *et al.*, 2002). Estas proteínas no tienen los rasgos característicos de las proteínas de la pared celular, y por lo general son consideradas proteínas citosólicas con funciones bien determinadas en este compartimento celular. Como su presencia en el tabique celular aún es desconocido, se les llama proteínas atípicas o *moonlighting* (Chaffin, 2008).

Recientemente ha sido elaborado un modelo de la arquitectura de la pared celular, remarcando las diferentes uniones que existen entre las proteínas de la pared celular y la red de glucanos. Este modelo está presentado en la figura I.11.



**Ncl:** Proteínas unidas no covalentemente  
**Rae:** Proteínas extraíbles por agentes reductores  
**Asl:** Proteínas unidas mediante enlaces sensibles a NaOH  
**Gcw:** Proteínas GPI  
**GPI:** Residuo glicosil fosfatidil inositol

**Figura I.11.** Esquema propuesto por el consorcio europeo Galar Fungail I para la pared celular de *C. albicans*. Está constituida por una red de  $\beta$ -1,6- y  $\beta$ -1,3-glucano y quitina. **NCL-CWP** (*non covalently linked protein*), extraíble con SDS. **RAE-CWP** (*reducing agent extractable*), extraídas con un tratamiento con  $\beta$ -mercaptoetanol. **ASL-CWP** (*alkali sensitive linkage cell wall proteins*), extraíbles con un tratamiento suave con álcali. **GPI-CWP** (*glycosylphosphatidylinostol cell wall proteins*), extraídas con un tratamiento con HF-piridina o por digestión con laminarinasa o zimoliasa.

La extracción de cada una de estas proteínas puede hacerse por diferentes tratamientos tanto enzimáticos como químicos, los cuales son (Figura I.12):

- Tratamiento con SDS para extraer las proteínas unidas no-covalentemente a la pared celular (Valentín *et al.*, 1984; Cappellaro *et al.*, 1998).
- Tratamiento con  $\beta$ - Mercaptoetanol para extraer las proteínas unidas covalentemente mediante puentes disulfuro a la pared celular (Popolo *et al.*, 2008)
- Tratamiento con endo  $\beta$ -1,3-glucanasa o NaOH para extraer las proteínas unidas covalentemente a la pared celular por enlaces sensibles al álcali (Ruiz-Herrera *et al.*, 2002; Garcerá *et al.*, 2003).



- Tratamiento con endo  $\beta$ -1,3-glucanasa o con endo  $\beta$ -1,6-glucanasa que rompen el  $\beta$ -1,3-glucano y el  $\beta$ -1,6-glucano respectivamente (Kapteyn et al., 2000).
- Tratamientos con ácido fluorhídrico-piridina (HF-piridina) acuoso o con fosfodiesterasas para extraer las proteínas unidas mediante un anclaje GPI (Kapteyn et al., 1994; Klis et al., 2001).
- Tratamiento con quitinasa que rompe la unión de la quitina con el  $\beta$ -1,6-glucano (Marcilla et al., 1991)
- Tratamiento con zimoliasa que desestabilizan toda la pared celular (Chaffin, 2008)

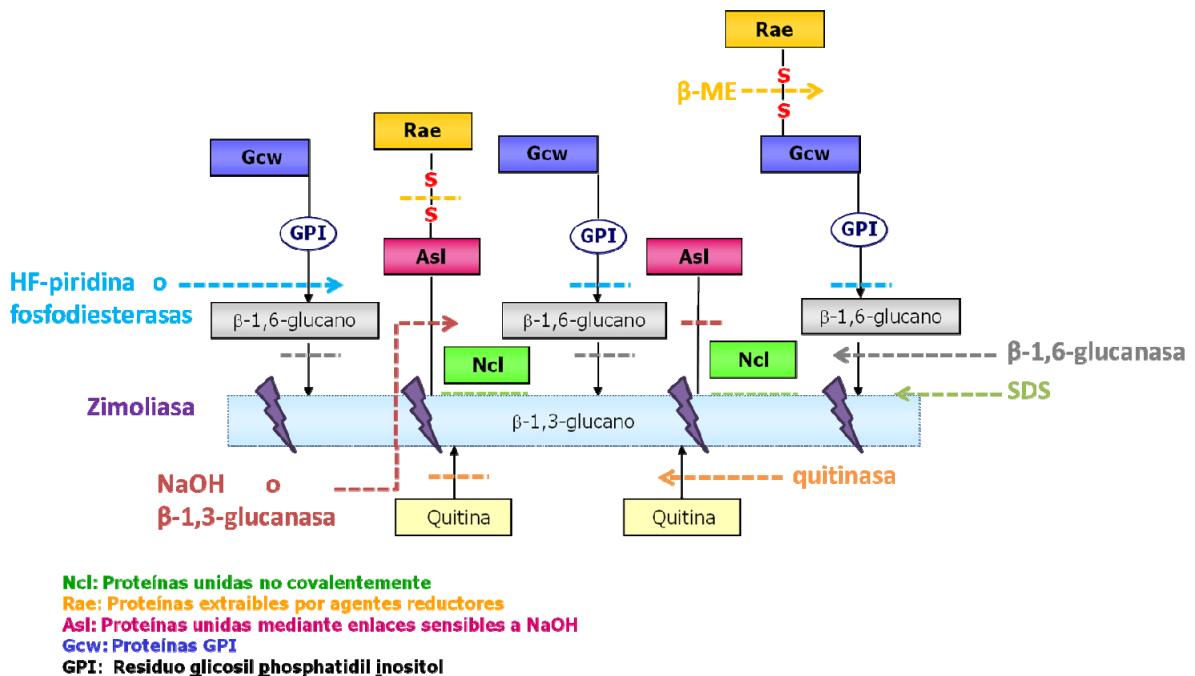
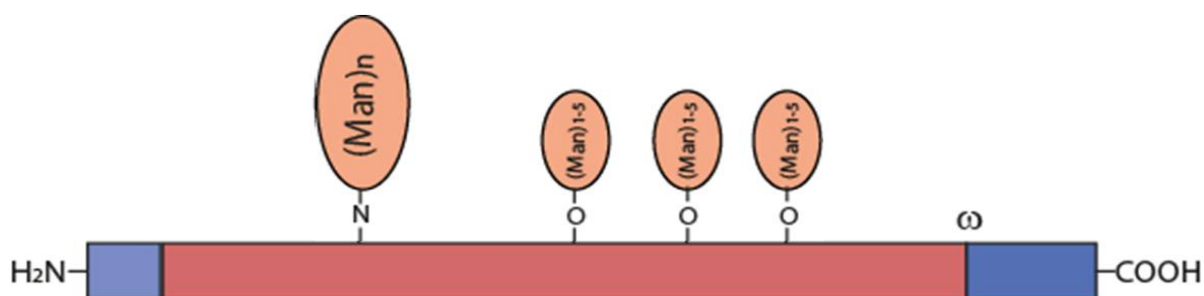


Figura I.12. Dianas de los diferentes tratamientos para la extracción de los diferentes tipos de proteínas de la pared celular de *C. albicans*. NaOH: Sosa cáustica. SDS: Dodecil sulfato de sodio.  $\beta$ -ME: beta-mercaptoetanol. HF- piridina: ácido fluorhídrico piridina acuoso.

También se han descrito otros tratamientos más complejos, como por ejemplo, con diferentes tipos de  $\beta$ -1,3-glucanasas con diferentes grados de pureza: zimoliasa (Valentín et al., 1984; Elorza et al., 1988), con actividad principalmente  $\beta$ -1,3-glucanasa pero con cierta actividad proteasa; o quantazyme (Kapteyn et al., 1994) enzima con actividad  $\beta$ -1,3-glucanasa, obtenida por recombinación heteróloga en bacterias, carente de otras actividades contaminantes.

*I. 6. 1. 3. 1. 1. Proteínas unidas por enlaces glicofosfatidilinositol (GPI-CWPs)*

Las proteínas unidas a través de un grupo GPI al  $\beta$ -1,6-glucano 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 que se muestran en la figura I.13 (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).



**Figura I.13. Esquema general de una GPI-CWPs de proteínas de levaduras.** Man: manosa; w: sitio de anclaje para enlace GPI.

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

La implicación del grupo GPI en el anclaje de la proteína a la pared ha quedado demostrada mediante diferentes estudios. El  $\beta$ -1,6-glucano, posee un papel interconector entre el resto de componentes. Y 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 secuenciación y posterior anotación del genoma completo de *C. albicans* ha permitido la determinación *in silico* de las potenciales proteínas unidas mediante anclaje de GPI a pared celular o membrana plasmática (De Groot *et al.*, 2003; Garcerá *et al.*, 2003). Se han identificado más de 100 proteínas putativas GPI (De Groot *et al.*, 2003),

algunas de las cuales presentan homologías significativas con proteínas de pared descritas en *S. cerevisiae* o se trata de proteínas ya caracterizadas: Csa1/Rbt5, Hwp1/Rbt1, Hyr1, Ssr1 y miembros de la familia Als.

#### *1.6.1.3.1.2. Proteínas unidas por enlaces álcali-sensibles (ASL-CWPs)*

Dentro de las proteínas de la pared celular unidas por enlaces álcali-sensibles, las proteínas más caracterizadas son una familia de proteínas con repeticiones internas conservadas, se denominan Pir-CWPs (**p**roteins with **i**nternal **r**epeats). Son proteínas altamente O-glicosiladas y están unidas directamente al  $\beta$ -1,3-glucano a través de un enlace sensible al álcali, sin interconexión con el  $\beta$ -1,6-glucano (Kapteyn *et al.*, 2000).

Estas proteínas fueron descritas inicialmente en *S. cerevisiae*, donde la familia Pir se compone de cuatro miembros: Pir1p (Toh-e *et al.*, 1993; Mrsă *et al.*, 1997), Pir2p/Hsp150 (Toh-e *et al.*, 1993; Moukadiri y Zueco, 2001), Pir3p (Toh-e *et al.*, 1993; Mrsă *et al.*, 1997) y Pir4p (Moukadiri *et al.*, 1999). Recientemente, un quinto miembro de esta familia, Pir5p, ha sido identificado (Ecker *et al.*, 2006).

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).

Todos los miembros de esta familia de proteínas presentan características comunes que se detallan a continuación (Figura I.14):

- a) Presencia de cuatro cisternas en el extremo C-terminal de la proteína en idéntica posición siguiendo la fórmula: -C-66aa-C-16aa-C-12aa-C-.
- b) Presencia de repeticiones internas en su secuencia aminoacídica, que concuerdan con la secuencia consenso Q[IV]XDGQ[IVP]Q, y que están presentes en un número variable de veces: desde una en Pir4 hasta 11 en Pir2 de *S. cerevisiae*.
- c) Son extraídas de la pared celular mediante tratamiento con  $\beta$ -1,3-glucanasas o con soluciones alcalinas diluidas, aunque pueden encontrarse en mayor o menor cantidad en otros extractos.

d) Algunos miembros de la familia Pir son secretados en mayor o menor medida al medio de cultivo como en el caso de Pir2 o Pir4 de *S. cerevisiae*.

e) Algunas proteínas Pir (Pir2 y Pir4 de *S. cerevisiae*) pueden liberarse de la pared celular mediante tratamientos con agentes reductores (Moukadiri y Zueco, 2001).

f) Son sintetizadas como preproteínas y son procesadas a nivel del aparato de Golgi por la proteasa Kex2p (Toh-e *et al.*, 1993), que corta en el extremo C-terminal en secuencias –Lys-Arg- o –Arg-Arg-.

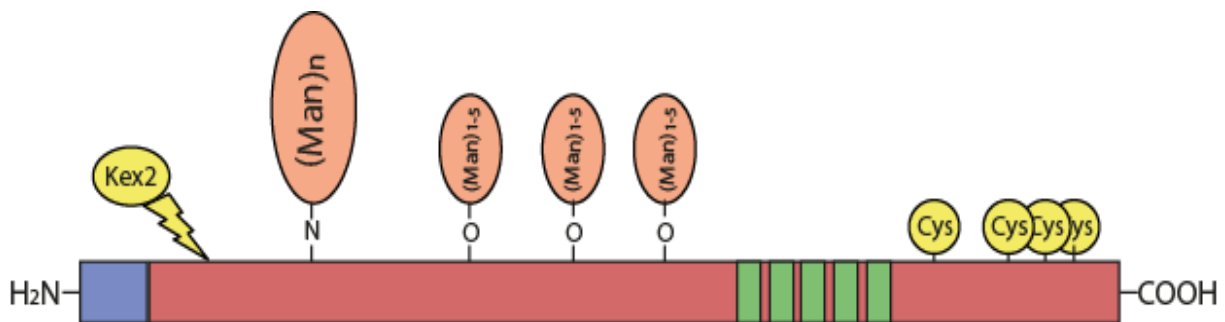


Figura I.14. Esquema de una proteína Pir típica.

Estudios llevados a cabo en nuestro grupo de investigación demuestran la importancia de la única repetición interna de Pir4 en la incorporación de la proteína al  $\beta$ -1,3-glucano, pues su delección provoca que no se incorpore a la pared celular y sea excretada al medio de cultivo (Castillo *et al.*, 2003). Esta delección no afecta a la incorporación de Pir4 mediante puentes disulfuro a otras proteínas. Estudios recientes proponen la participación de una transglutaminasa en la unión de las proteínas Pir al  $\beta$ -1,3-glucano mediante enlace sensible a álcali (Ecker *et al.*, 2006).

El papel de las proteínas Pir en la pared celular no está bien determinado, aunque la disrupción de los cuatro genes *PIR* en *S. cerevisiae* resulta en células de mayor tamaño que crecen ligeramente más lentas y que son más sensibles al blanco de calcoflúor y al rojo Congo, dos agentes que interfieren con la síntesis de la pared, lo que indica que la pared celular se encuentra alterada (Mrsá y Tanner, 1999). Las células disrupcionadas en dos genes *PIR* simultáneamente también muestran problemas para recuperarse de un choque térmico (Toh-e *et al.*, 1993) y la sobreexpresión de *PIR2* provoca una mayor resistencia a la proteína antifúngica vegetal osmotina, mientras que células disrupcionadas en *PIR1*, *PIR2* y *PIR3* son más sensibles (Ibeas *et al.*, 2001).

Esto se debería muy probablemente a que las Pir-CWPs hacen que la pared celular sea menos permeable a la osmotina y a otras proteínas. Además, la activación de la expresión de *MPK1/STL2*, gen que codifica la protein-quinasa Slt2 que al ser fosforilada produce la transcripción de genes implicados en la construcción de la pared celular como: *FKS1*, *KRE6*, *VAN2*, *CHS3*, *GAS1*, produce una mayor expresión de los cuatro miembros de la familia Pir de *S. cerevisiae*. Este dato sería indicativo que la activación de la ruta de integridad de la pared celular produce un incremento en la expresión de los genes *PIR*, como consecuencia de un estrés térmico u osmótico.

En estudios recientes algunos miembros de la familia Pir se han empleado para llevar determinadas proteínas a la pared celular de *S. cerevisiae*, mediante técnicas de ingeniería genética. Estas técnicas permiten crear cepas de *S. cerevisiae* que puedan sintetizar fácilmente proteínas de otros organismos, como es el caso de la proteína humana  $\alpha$ -1,3-fucosiltransferasa que se ha fusionado a Pir1 o Pir2 manteniendo su actividad al localizarse en la pared celular de la levadura.

Hasta este año, en *C. albicans*, sólo había sido descrito un miembro de esta familia, la proteína Pir1 (Kapteyn *et al.*, 2000; Martínez *et al.*, 2004). No obstante otra proteína similar a Pir ha sido encontrada mediante análisis *in silico* por nuestro grupo de investigación.

La proteína Pir1p de esta familia ha sido caracterizada en *C. albicans*, (Martínez *et al.*, 2004) en el estudio, ha sido analizado el papel de esta proteína de tipo Pir-CWP en la construcción de la pared celular de *C. albicans*. El gen *PIR1* presenta todas las características de la familia Pir, y además una variabilidad alélica, puesto que presenta dos alelos de diferente longitud que codifican proteínas con diferente número de repeticiones internas (Micó, comunicación personal).

La proteína Pir1 está unida a la pared celular mediante puentes disulfuro y unida de forma covalente al  $\beta$ -1,3-glucano, por lo que es susceptible de ser extraída por tratamientos con  $\beta$ -mercaptoetanol (rompe enlaces disulfuro) o mediante tratamiento con sosa (NaOH), donde aparecería la proteína en el extracto de sosa. (Martínez *et al.*, 2004).

Para el estudio en profundidad de esta proteína se procedió a la obtención de los mutantes heterocigóticos para cada alelo, pero dependiendo del fondo genético con el que se realizaran las interrupciones se obtuvieron resultados distintos. En primer lugar se realizó bajo el fondo genético CAI4 -que conlleva *per se* mutaciones en su genotipo como son *ura3Δ::imm434/ura3Δ::imm434*, por eso ante la incapacidad de la obtención del mutante nulo *pir1Δ/pir1Δ* se sugirió la esencialidad de este gen para la viabilidad celular de *C. albicans* (Martínez *et al.*, 2004). No obstante, con el fin de comprobarlo se propuso obtener el mutante homocigótico para este gen pero trabajando con el fondo genético SC5314, es decir, la cepa salvaje sin ninguna mutación previa, de esta forma sí que se pudo obtener el mutante homocigótico *pir1Δ/pir1Δ* con lo cual se demostró que el gen *PIR1* no es esencial para el organismo (Micó, comunicación personal).

Mediante un análisis *in silico* se ha identificado un homólogo a la proteína Pir1 de *C. albicans* que se ha denominado Pir32p, codificada por el gen *PIR32* (orf19.2783 y orf19.10299) y que es objeto de estudio en la presente Tesis Doctoral. La proteína Pir32 presenta un péptido señal, así como las características propias de las proteínas Pir como por ejemplo, las 4 Cys en la posición conservada, aunque presenta un solo motivo de la secuencia aminoacídica con elevada homología con la región repetida en esta familia de proteínas a semejanza de las repeticiones internas de las proteínas Pir. Estos datos indicaban que Pir32 podría ser un miembro de esta familia. Además se observó que se expresaba abundantemente en fagocitados por macrófagos (Bahnan *et al.*, 2012).

### **I. 6. 2. Modificaciones post-traduccionales**

Una vez las proteínas de la pared celular han sido sintetizadas, pueden suceder varios acontecimientos post-translacionales para hacerlas totalmente funcionales y conducir las a la superficie de célula donde serán ancladas para realizar su papel específico.

El proceso de secreción en células eucariotas ha sido estudiado exhaustivamente. La ruta secretora fue descrita por primera vez por Jamieson y Palade (1967) en células de secreción polarizada. Mediante experimentos de pulso y caza, estos investigadores establecieron la ruta de transporte de las proteínas de secreción tal como la conocemos hoy, desde el Retículo Endoplásmico (RE) a la superficie celular, pasando por el aparato de Golgi, del que se dirigen a la superficie celular en vesículas de secreción. Este

proceso quedó demostrado con el estudio de mutantes *sec*, que son mutantes defectuosos en los diferentes pasos del proceso de secreción en *S. cerevisiae* (Walworth y Novick, 1987). Estas vesículas se subdividen en dos poblaciones diferentes; unas que transportan glicoproteínas de la pared celular y de membrana, específicamente dirigidas a regiones de crecimiento activo y otras que transportan enzimas periplásmicos y proteínas secretadas al medio de cultivo, que no necesitan ser dirigidas de forma tan precisa. Una vez las vesículas llegan a la membrana plasmática se fusionan con ésta y vierten su contenido al exterior.

Entre las modificaciones post-traduccionales podemos destacar:

1. Señalización
2. N-glicosilación
3. O-glicosilación
4. Anclaje GPI
5. Procesamiento proteolítico

### **I. 6. 2. 1 Señalización**

Las proteínas que van a ser dirigidas a la superficie celular poseen en su secuencia un péptido señal que va a dirigir el ribosoma al RE y su entrada en la ruta de secreción.

El péptido señal, que será procesado posteriormente por la acción de una proteasa señal específica, se encuentra en el extremo N-terminal de la proteína y se caracteriza por la presencia de uno o más aminoácidos con carga, seguido de 6 a 12 aminoácidos hidrofóbicos (Mora-Montes *et al.*, 2008).

Una vez procesada, la proteína adopta una conformación compatible con la secreción mediada por una serie de proteínas llamadas carabinas, que impiden su agregación y evitan que proteínas mal plegadas abandonen el RE. (Ma y Hendershot, 2001).

La transferencia de polipéptidos de más de 100 aminoácidos al lumen del RE tiene lugar co-traduccionalmente, aportando la energía necesaria para la translocación del péptido (Ma y Hendershot, 2001).

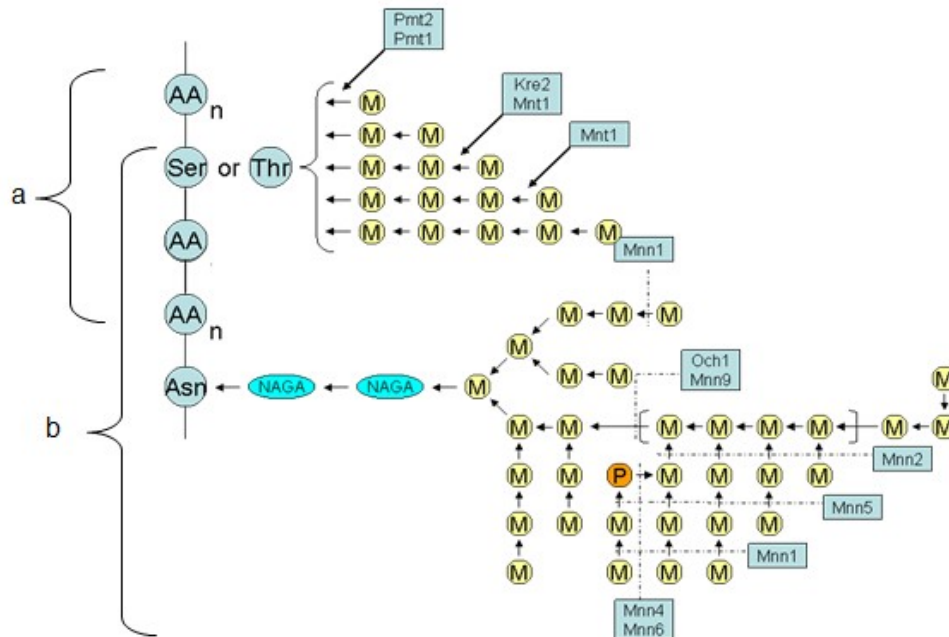
### I. 6. 2. 2. N-Glicosilación

La N-glicosilación de proteínas de secreción es una modificación covalente, indispensable y altamente conservada que sucede en todas las células eucariotas y algunas células procariotas. La pérdida por completa del proceso de N-glicosilación es letal para todos los organismos. El enlace por el cual sucede esta modificación consiste en la unión de una molécula de dos unidades de N-acetilglucosamina (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-X-Thr (Ser), donde X es cualquier aminoácido excepto Pro (Nilsson y von Heijne, 1993; Mellquist *et al.*, 1998). 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. b).

La importancia de este tipo de glicosilación para la viabilidad de las levaduras ha sido enfatizada con los mutantes *och*, los cuales son deficientes en la construcción de la cadena externa y de ahí su nombre “outer chain deficient” (Nagasu *et al.*, 1992), y además 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 *C. 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: fósforo.

### I. 6. 2. 3. O-Glicosilación

El proceso de O-glicosilación en levaduras tiene su inicio en el lumen del RE por acción de protein-manosiltransferasas (Pmt) (Girrbach *et al.*, 2000), que transfieren manosa desde dolicol-fosfato-manosa a residuos de serina y/o treonina. En el aparato de Golgi, se añaden de uno a seis residuos adicionales por acción de manosiltransferasas (Mnt) y manansintasas (Mnn), aunque normalmente sólo se añade un residuo mediante unión  $\alpha$  (1,2) (Lussier *et al.*, 1999).

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). 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 (Figura I.15. a).

I. 6. 2. 4. Anclaje GPI

Las proteínas GPI se encuentran ampliamente distribuidas entre los organismos eucariotas tanto inferiores como superiores. En hongos, las proteínas GPI pueden ser incorporadas covalentemente a la pared celular o bien permanecer unidas a la membrana plasmática. Estas proteínas participan en la biosíntesis de la pared celular, en su remodelación, pueden determinar su hidrofobicidad o su antigenicidad y algunas poseen un papel importante en adhesión y virulencia (Hoyer, 2001; Klis *et al.*, 2001; De Groot *et al.*, 2003). Se ha demostrado la unión del GPI (glicosilfosfatidilinositol) a la región carboxilo terminal de algunas proteínas de la pared celular (Liu *et al.*, 1994).

La región carboxilo terminal de la proteína de la pared celular 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 (Chaffin, 2008) (Figura I.13).

El núcleo estructural del GPI está altamente conservado en eucariotas y tiene la siguiente estructura: 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 (Figura I. 16). Mientras que la parte oligosacarídica 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).

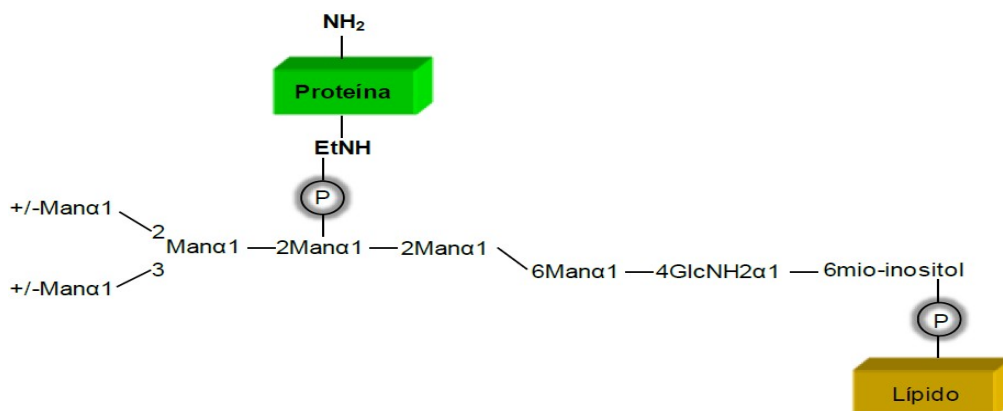


Figura I.16. Estructura del enlace glicosil fosfatidil inositol (GPI) de proteínas de levaduras. EtNH, etanolamina; (P), fosfato; Man, manosa. (Adaptado de Sipos *et al.*, 1995).

### I. 6. 2. 5. Procesamiento proteolítico

Existen una serie de proteínas que son sintetizadas en forma de pre-proteínas en el RE y posteriormente son procesadas a nivel del Golgi originando la proteína madura (Nilsson y von Heijne, 1993). En *S. cerevisiae* se han descrito tres proteasas implicadas en el procesamiento de proteínas de secreción: la endoproteinasa kex2 que actúa en el trans-Golgi cortando el extremo carboxi-terminal en secuencias –Lys-Arg- o –Arg-Arg-; Kex1 y Ste13 se encargan de recortar las regiones espaciadoras (Mora-Montes *et al.*, 2008).

En *C. albicans* sólo se ha descrito la presencia de un homólogo para kex2p, cuya ausencia produce una disminución en la virulencia (Newport *et al.*, 2003). Entre las proteínas de secreción de *S. cerevisiae* descritas como proteínas de la pared celular, los cuatro miembros conocidos de la familia Pir son procesados de esta manera (Moukadiri y Zueco, 2001).

## I. 7. 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 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 es la característica diferencial más importante entre las células eucariotas humanas y fúngicas, lo cual la convierte en diana ideal para el ataque selectivo con fármacos que produzcan una menor toxicidad para los pacientes (Cassone, 2008). Por tanto el conocimiento de la síntesis, ensamblaje y conformación final que adquieren los componentes de la pared celular de *C. albicans* es uno de los aspectos más interesantes en el estudio de este hongo. La pared celular fúngica es la estructura más externa de la célula, y por tanto la primera que interacciona con el hospedador. Asimismo es responsable de la impermeabilidad, rigidez y de morfología característica de la célula. La pared celular 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 es el organismo que nos ocupa,- la pared participa en el reconocimiento específico y adhesión a los tejidos del hospedador (Marcilla *et al.*, 1998; Ruiz- Herrera *et al.*, 2006). De esta manera el estudio de proteínas integrales de la pared en este sentido tiene una doble importancia: básico como modelo de diferenciación celular simple, y aplicado en la ampliación de tratamientos contra las infecciones por *C. albicans*. 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 interés inicial de las proteínas Pir radica en la importancia demostrada de esta familia en *S. cerevisiae*. En trabajos previos se observó que la disrupción conjunta de los cuatro genes pertenecientes a la familia Pir de *S. cerevisiae* producía células morfológicamente muy alteradas y poco viables, demostrando la esencialidad de esta familia de proteínas (Ecker *et al.*, 2006). Estudios realizados en nuestro grupo de investigación demostró la no esencialidad del gen *PIR1* en *C. albicans* (Micó, 2009), lo que podía indicar la presencia de otras proteínas Pir en este microorganismo.

Dada la relevancia de esta familia de proteínas Pir en *S. cerevisiae*, y como continuación de los estudios realizados por nuestro grupo de investigación en los últimos años, nos planteamos la búsqueda de nuevas proteínas Pir en *C. albicans*. El análisis *in silico* reveló la presencia del gen *PIR32*. En la presente Tesis Doctoral se ha procedido al estudio de la importancia de este gen en la biología de *C. albicans*. También nos planteamos como objetivo la localización y funcionalidad de la proteína Pir32p en la arquitectura e integridad de la pared celular.

La información que sea obtenida de los resultados derivados de esta Tesis Doctoral tiene como objetivo principal ayudar a mejorar la comprensión de los mecanismos moleculares implicados en la formación y composición de una estructura tan importante como es la pared celular de *C. albicans*, además de permitir conocer el papel de Pir32p en la virulencia de la célula y la detección de dianas potenciales para el desarrollo de nuevos compuestos antifúngicos y antígenos que podrían ser útiles en el desarrollo de técnicas inmunológicas para la detección precoz de la candidiasis.

## **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.

Cepa	Genotipo	Parental	Referencia
SC5314	Silvestre		Gillum <i>et al.</i> , 1984
PIR32H <sup>R</sup>	<i>PIR32/pir32Δ::SAT1-FLP</i>	SC5314	Este trabajo
PIR32H <sup>S</sup>	<i>PIR32/pir32Δ::FRT</i>	PIR32H <sup>R</sup>	Este trabajo
PIR32Ø <sup>R</sup>	<i>pir32Δ::SAT1-FLP/pir32Δ::FRT</i>	PIR32H <sup>S</sup>	Este trabajo
PIR32Ø <sup>S</sup>	<i>pir32Δ::FRT/pir32Δ::FRT</i>	PIR32Ø <sup>R</sup>	Este trabajo
PIR1Ø <sup>S</sup>	<i>pir1-15Δ::FRT/pir1-19Δ::FRT</i>	PIR1Ø <sup>R</sup>	Micó, 2009
PIR1Ø32H <sup>R</sup>	<i>pir1-15Δ::FRT/pir1-19Δ::FRT, PIR32/pir32Δ::SAT1-FLP</i>	PIR1Ø <sup>S</sup>	Este trabajo
PIR1Ø32H <sup>S</sup>	<i>pir1-15Δ::FRT/pir1-19Δ::FRT, PIR32/pir32Δ::FRT</i>	PIR1Ø32H <sup>R</sup>	Este trabajo
PIR1Ø32Ø <sup>R</sup>	<i>pir1-15Δ::FRT/pir1-19Δ::FRT, pir32Δ::SAT1-FLP/pir32Δ::FRT</i>	PIR1Ø32H <sup>S</sup>	Este trabajo
PIR1Ø32Ø <sup>S</sup>	<i>pir1-15Δ::FRT/pir1-19Δ::FRT, pir32Δ::FRT/pir32Δ::FRT</i>	PIR1Ø32Ø <sup>R</sup>	Este trabajo
RT32 <sup>R</sup>	<i>pir1-15Δ::FRT/pir1-19Δ::FRT, pir32Δ::FRT/pir32Δ::FRT, RP10/rp10::pEccMalp-32</i>	PIR1Ø32Ø <sup>S</sup>	Este trabajo

Tabla II.1. Cepas de *C. albicans* utilizadas en este trabajo.

### II. 1. 2. Bacterias

Las características de las cepas de *Escherichia coli* empleadas en este trabajo se detallan en la tabla II.2.

Cepa <i>E. Coli</i>	Genotipo	Referencia
DH5α	<i>F, φ80, lac4M15, recA1, endA1, gyrA96, thi-1, (rK, mK), supE44, relA1, deoR, Δ(lacZYA-argF)U169</i>	Hanahan, 1985

Tabla II.2. Cepas de *Escherichia coli* usadas en este trabajo.

## II. 2. OLIGONUCLEOTIDOS Y PLÁSMIDOS EMPLEADOS

### II. 2. 1. Oligonucleótidos

En la tabla II.3 se muestran los oligonucleótidos empleados en este trabajo, los nucleótidos subrayados corresponden a secuencias diseñadas para corte de endonucleasas de restricción seleccionadas. Y el nucleótido en negrita es la base añadida para mantener el marco de lectura.

OLIGO-NUCLEÓTIDO	SECUENCIA 5'-3'	SITIO DE RESTRICCIÓN DISEÑADO
PIR2-KpnI	CACAG <u>GT</u> ACC <sup><b>C</b></sup> CAAATGTCGCCATAGTAAGTTTCACG	<i>KpnI</i>
PIR2-XhoI	CACACTC <u>GAG</u> GTCCAATCATCACCATTGCTGG	<i>XhoI</i>
PIR2-NotI	CACAG <u>CGGCCG</u> C <sup><b>C</b></sup> TTATGCTGCTGGTTGGTCGG	<i>NotI</i>
PIR2-SacI	CACAG <u>AGCTC</u> TTGTGGAAGGATATGCTGTCGG	<i>SacI</i>
FSAT5	ATGAAAATTTCCGGTGATCCCTGAGC	-
RSAT3	TTAGGCGTCATCCTGTGCTCCCGAG	-
PIR32OutR	TGGTTATTACCTTGATCTGGGGTGG	-
RPIR32CFw	CACAC <u>CCGGG</u> TATGATTCATTATTTGATTTCCC	<i>SmaI</i>
RPIR32RvF	CACAG <u>CGGCCG</u> CAC <u>CGC</u> TTTGTGGAAGGATATGCTGTCGG	<i>NotI, MluI</i>
PIR32qPCRfw3	CACATTTGGTATTGTTGTTAACCC	
PIR32qPCRv3	TTGACCATCATGAATTTGAACA	
EFB1F	ATTGAACGAATTCTTGGCTGAC	
EFB1R	CATCTTCTTCAACAGCAGCTTG	
Pir1-RT5	TACTGCTGAAAATGTTGCTAAAGC	
Pir1-RT3	TTAACAGTTGACAAATTCAATG	
PIR32_238t/c	GTATCTAAAATTAACCAAGTTTAACGACAAC	
PIR32_238t/cRv	GTTGTCGTAAACTGGTTTAATTTAGATAC	
PIR32_1046c/t	GATTCTGATGATAGAATTGGTTGTATTGTATCG	
PIR32_1046c/tRv	CGATACAATACAACCAATTCTATCATCAGAATC	

**Tabla II.3. Oligonucleótidos utilizados en este trabajo.** Subrayado se muestran los puntos de reconocimiento para las endonucleasas de restricción.



## II. 2. 2. Plásmidos

En la tabla II.4 se detallan los plásmidos usados como herramientas de trabajo y vectores de clonación, así como también aquellos que se han construido en este trabajo para las diferentes etapas de interrupción y reintegración el gen *PIR32*.

Nombre	Descripción	Referencia
pGEM-T Easy™	Amp <sup>R</sup> , β-galactosidasa.	Promega®
pCloneJET™	Amp <sup>R</sup> .	Fermentas®
pGEM-F1	pGEM-T Easy™ con el fragmento de 745 pb de la región 5' del gen <i>PIR32</i> .	Este trabajo
pGEM-F2	pGEM-T Easy™ con el fragmento de 628 pb de la región 3' del gen <i>PIR32</i> .	Este trabajo
pGEM-PIR32	pGEM-T Easy conteniendo la secuencia exacta completa del gen <i>PIR32</i> .	Este trabajo
pSFS2	Clo <sup>R</sup> , con los genes <i>CaSAT1</i> y <i>CaFLP</i> y las secuencias FRT.	Reuss <i>et al.</i> , 2004
pT1	pSFS2 con el fragmento de 745 pb de la región 5' del gen <i>PIR32</i> .	Este trabajo
pT2	pSFS2 con el casete de interrupción compuesto por los genes <i>CaSAT1</i> y <i>CaFLP</i> , las secuencias FRT y los fragmentos de homología F1 y F2 del gen <i>PIR32</i>	Este trabajo
pEcc120	Amp <sup>R</sup> , incluye en gen <i>RP10</i> , y el gen <i>SAT1</i> como marcador de resistencia, numerosos sitios de clonación y carece de un origen de replicación para <i>C. albicans</i>	D'Enfert, 2009
pEcc120Malp	pEcc120 modificado, incluyendo el promotor del gen <i>CaMAL2</i> .	Micó, comunicación personal
pEccMalp-PIR32	pEcc120Mal2p conteniendo el gen <i>PIR32</i> .	Este trabajo

**Tabla II.4. Plásmidos empleados y construidos en este trabajo.**

## II. 3. MEDIOS Y CONDICIONES DE CULTIVO

### II. 3. 1. Cultivo de levaduras

Las cepas de *C. albicans* se mantuvieron mediante resiembras periódicas en YPD y/o medio mínimo YNB en placa. Ambos medios de cultivo, tanto en su versión líquida como sólida, se utilizaron para su manejo rutinario en el laboratorio.

Medio YPD (Yeast extract Peptone Dextrose): es un medio rico que contiene todos los nutrientes necesarios (sales minerales y vitaminas) para el crecimiento de levaduras. La composición del medio YPD es la siguiente:

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

Medio YPM (Yeast extract Peptone Maltose): Se usó medio en forma líquida en los pasos de transformación en que fue necesaria la pérdida del casete que contiene el gen marcador de sensibilidad a nurseotricina.

Peptona .....	2% (p/v)
Maltosa .....	2% (p/v)
Extracto de levadura .....	1% (p/v)

Medio SD o YNB (Synthetic Dextrose): medio mínimo sintético, se utiliza como medio selectivo, y por ello no permite el crecimiento de cepas auxotróficas para aminoácidos. Se utiliza para el crecimiento de transformantes que hayan incorporado el gen marcador que complementa la auxotrofia, bien mediante la integración de un plásmido o un casete de interrupción.

Glucosa .....	2% (p/v)
Base nitrogenada de levadura sin aminoácidos y sin sulfato amónico	0,17% (p/v)

Sulfato amónico ..... 0,5% (p/v)

Medio YNB Maltosa (Synthetic Dextrose Maltose): Se usó medio en forma sólida para las pruebas fenotípicas de susceptibilidad frente a diferentes estreses.

Maltosa ..... 2% (p/v)

Base nitrogenada de levadura sin aminoácidos y sin sulfato amónico 0,17% (p/v)

Sulfato amónico .....0,5% (p/v)

En los ensayos de inducción de la miceliación en medio sólido se emplearon distintos medios: Spider (Liu *et al.*, 1994), YNB suplementado con suero humano, YE-Pro y Lee. La composición en % (p/v) 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)

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

Medio YE-Pro:

Extracto de levadura ..... 0,1% (p/v)

Prolina..... 0,01% (p/v)

Agar ..... 2% (p/v)

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

(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> .....	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 a 6,8 con una solución de NaOH 1M.

Todos los medios sólidos contienen agar al 2% (p/v). Todos los cultivos en medio líquido descritos fueron preparados en agua destilada en matraces de Erlenmeyer de vidrio con un volumen medio de cultivo no superior a un tercio del volumen total, y esterilizados en autoclave a 121 °C durante 20 min. La incubación se realizó a 28 °C y a 150 rpm en un agitador orbital (Orbi-Safe, SANYO<sup>®</sup>), salvo en los casos en los que se quiso inducir la morfología de micelio, en los que las células fueron incubadas a 37 °C.

La selección de las cepas transformantes se llevó a cabo en el mismo medio de cultivo adicionando nurseotricina hasta una concentración de 200 µg/ml (YPD-NTC<sub>200</sub>). Para la selección de las cepas sensibles tras el primer paso de transformación se añadió nurseotricina a distintas concentraciones, desde 5 hasta 25 µg/ml (YPD-NTC).

Medio RPMI-1640 (Sigma<sup>®</sup>): medio de cultivo comercial, es una mezcla de sales enriquecida con aminoácidos y otros componentes esenciales para el crecimiento celular. Se empleó para ensayos de miceliación, así como para la formación de biopelículas de las cepas de *C. albicans* en medio líquido.

El medio RPMI-1640 en polvo es extremadamente higroscópico y debe ser protegido del medio ambiente. No se recomiendan preparaciones de concentraciones

mayores a las especificadas (en nuestro caso 16,4 g/l), debido a la gran posibilidad de formación de precipitados. El pH final se ajusta a 7,2 con NaOH 1M.

Este medio no se puede esterilizar mediante autoclave, puesto que contiene compuesto termosensibles. Así pues se esteriliza por filtración al vacío con filtros estériles Millipore® de 0,22 µm.

### **II. 3. 2. Cultivo de bacterias**

Los medios utilizados para el crecimiento de *E. coli* fueron descritos por Sambrook y Rusell (2001). Los medios se prepararon con agua destilada en matraces de Erlenmeyer de vidrio con un volumen final de cultivo no superior a un tercio del volumen total y fueron esterilizados en autoclave.

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

Tripticasa peptona..... 1% (p/v)

Extracto de levadura ..... 0,5% (p/v)

NaCl..... 1% (p/v)

El pH final se ajustó a 7,4 con una solución de HCl 1M. Para los medios sólidos se añadió agar al 2%. Los cultivos de las cepas de *E. coli* se incubaron a 37 °C en un agitador orbital (Orbi-Safe, SANYO®) a 200 rpm.

La selección de transformantes se llevó a cabo en el mismo medio adicionado de cloramfenicol a 30 µg/ml (LB-Clo) o ampicilina a 50 µg/ml (LB-Amp) según el vector utilizado para la transformación.

## II. 4. TRANSFORMACIÓN DE CÉLULAS CON ADN EXÓGENO

### II. 4. 1. Transformación en bacterias

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

#### II. 4. 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 µl de un cultivo en fase estacionaria, y se incubaron a 37 °C hasta alcanzar una  $DO_{600nm} = 0.6$  medido en un espectrofotómetro Graphicord (Shimadzu®). 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 6000 xg durante 5 min a 4 °C, se resuspendieron en 5 ml de la solución anterior fría y se adicionaron 940 µl de glicerol estéril al 80% para su conservación a -80 °C en alícuotas de 100 a 500 µl.

#### II. 4. 1. 2. Transformación de las células competentes

En la realización de este proceso las células competentes se descongelaron, suavemente, manteniéndolas en hielo durante 10 min. Una vez descongeladas, se añadieron 100 µl de las células competentes al tubo eppendorf con el ADN transformante a 4 °C y se mantuvieron en hielo durante 30 min. Pasado este tiempo, las células se sometieron a un choque térmico (2 min a 42 °C para *E. coli* DH5α), 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 LB al tubo con las células transformadas y la mezcla se incubó a 37 °C durante una hora, con objeto de que las células transformadas expresaran el marcador de selección con la resistencia al antibiótico correspondiente. Tras este tiempo, las bacterias se recogieron por centrifugación (5000 xg, 5 min) y se resuspendieron en 1 ml de LB fresco. La selección de los transformantes se llevó a cabo

sembrando la suspensión bacteriana en placas de medio LB con el antibiótico correspondiente. Las placas se incubaron a 37°C hasta la aparición de colonias (24 h).

#### **II. 4. 2. Transformación en levaduras**

Para la transformación integrativa en *C. albicans* se utilizó el método descrito por Reuss *et al.* (2004), que consiste en lo siguiente:

A partir de un pre-cultivo crecido toda la noche en YPD de la cepa de *C. albicans* a transformar se tomaron 50 µl y se inocularon en 50 ml de medio YPD fresco incubándose a 28 °C hasta una  $DO_{600nm} = 1.6-2.2$ , medida en un espectrofotómetro Graphicord (Shimadzu®). Se recogieron las células por centrifugación a 2000 xg durante 5 min y se resuspendieron en 8 ml de agua estéril. Se añadió a la suspensión celular 1 ml de tampón TE 10X (Tris-HCl 100mM, EDTA 10mM, pH 7,5) y 1 ml de acetato de litio 1 M. La suspensión fue incubada con agitación a 30 °C durante 1 h a 150 rpm. Posteriormente se añadieron 250 µl de ditioneitol (DTT) y se incubó durante 30 min más en las mismas condiciones. Después las células se lavaron dos veces con agua fría y se recogieron por centrifugación a 2000 xg a 4 °C durante 5 min. Se hizo un lavado con 5 ml de sorbitol 1 M frío. Seguidamente se recogieron las células electrocompetentes y se resuspendieron con 50 µl de sorbitol frío 1M, manteniéndose las células en hielo.

Se tomaron 40 µl de la suspensión de células y se añadieron a un tubo eppendorf con el DNA transformante. El ADN a integrar estaba a una concentración de 1,5 µg/µl. Finalmente se procedió al proceso de electroporación, mediante el empleo de una cubeta de 0,2 cm (BioRad®) y a 1.8 kV, en un electroporador modelo GenePulser de BioRad®. Después de la electroporación, las células fueron lavadas con 1 ml de sorbitol 1 M y resuspendidas en 1 ml de YPD. Se incubaron durante 4 h a 28 °C en agitación suave. Las células fueron sembradas, a continuación, en placas de YPD conteniendo 200 µg/ml de nurseotricina e incubadas a 28°C hasta la aparición de colonias (72 h).

## II. 5. RECuentos Celulares

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

$$N \text{ (millones de levaduras / mL)} = \frac{X \text{ levaduras}}{Y \text{ cuadrados}} \times \frac{n^\circ \text{ cuadros cámara}}{V \text{ cámara}} \times \frac{1.000 \text{ mm}^3}{1 \text{ cm}^3 \text{ (o 1 mL)}} \times D$$

Siendo:

X  $\Rightarrow$  Número total de partículas contadas.

Nº cuadros cámara = 400  $\Rightarrow$  Cuadro grande central formado por 400 cuadros pequeños.

Y = 16  $\Rightarrow$  Número de cuadrados empleados en los recuentos.

V = 0,1 mm<sup>3</sup>  $\Rightarrow$  Volumen útil de la cámara “Neubauer improved”.

D  $\Rightarrow$  dilución empleada.

## II. 6. OBTENCIÓN Y PURIFICACIÓN DEL ADN

### II. 6. 1. Obtención de ADN plasmídico de *Escherichia coli*

Para el aislamiento del ADN plasmídico de *E. coli* a pequeña escala se inocularon 5 ml de medio LB con la cepa de la cual se tenía la intención de obtener el plásmido y se añadió ampicilina o cloranfenicol según el marcador de resistencia albergado por el vector (ver tabla II.4). Tras dejarlo incubar toda la noche, se recogieron las células por centrifugación (5000 xg, 5 min) y se obtuvo el ADN plasmídico mediante el empleo del High pure plasmid isolation Kit (Roche<sup>®</sup>) siguiendo las instrucciones del fabricante.



La extracción de plásmidos a gran escala (a partir de 50 ml de cultivo) se realizó empleando el QIAGEN Plasmid midi-Kits (Qiagen®) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. El ADN plasmídico eluido fue utilizado para análisis de restricción, transformaciones o empleados directamente para secuenciación de ADN.

### **II. 6. 2. Obtención de ADN genómico de *C. albicans***

El ADN cromosómico de *C. albicans* fue aislado mediante el método de Sherman *et al.*, (1986) ligeramente modificado.

Las células fueron inoculadas en 5 ml de YPD, e incubadas toda la noche a 30 °C y 110 rpm. Posteriormente se recogieron y lavaron con 5 ml de agua destilada. El sedimento celular obtenido fue resuspendido en 400 µl de la solución SCE/DTT/Zimoliasa (1 M sorbitol, citrato de sodio 0,1 M, EDTA 10 mM, 5 mM de 1,4-ditiotreitol, 88 µg/ml de zimoliasa (100T), pH 5, 8), y posteriormente incubado durante 1 hora a 37 °C. A continuación se centrifugó (5 min, 3000 xg), se resuspendieron en 500 µl de EDTA 50 mM (pH 8,0) junto con 50 µl de SDS al 10% y el conjunto incubado durante 30 min a 65 °C. A continuación la suspensión fue enfriada a temperatura ambiente y se añadieron 100 µl de KAc 5 M (pH 6,0) manteniéndose de 30 a 90 min en hielo. Tras una centrifugación (15 min, 15000 xg, 4 °C) al sobrenadante, conteniendo el ADN, le fueron añadidos 900 µl EtOH absoluto frío, fue mezclado y centrifugado (15 min, 15000 xg, 4 °C) obteniendo en el sedimento los ácidos nucleicos. El sedimento de ADN se resuspendió en 400 µl de solución ARNasa (150 mM de NaAc, pH 5,9; 200 µg / ml de ARNasa A; 10 mM Tris / HCl pH 7,5; 1 mM EDTA pH 8,0) e incubado durante 30 min a 37 °C. Como último paso para la purificación del ADN, un volumen de fenol-cloroformo (400 µl) fue añadido a la muestra y la mezcla resultante se agitó. Después de 3 min de centrifugación a 15000 xg, la fase acuosa superior fue recuperada y 900 µl EtOH absoluto fueron añadidos para precipitar el ADN, a -20 °C durante al menos 12h. Transcurrido este tiempo las muestras fueron centrifugadas durante 20 min a 15000 xg (4 °C). El sedimento resultante de ADN fue secado y resuspendido en 60 - 120 µl de tampón TE (10 mM Tris-HCl pH 7,5; 1 mM EDTA pH 8,0).

## II. 7. ELECTROFORESIS EN GEL DE AGAROSA

Los fragmentos de ADN obtenidos por digestión con endonucleasas de restricción y por PCR pueden separarse mediante electroforesis en geles de agarosa ya que debido a su carga negativa, migran hacia el ánodo (polo positivo). La movilidad de los fragmentos lineales de ADN depende de su tamaño, siendo independiente de la composición en bases. 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 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 en una cubeta horizontal con el gel sumergido en el tampón correspondiente y a un voltaje constante de entre 70 y 90V.

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 de ADN del fago  $\lambda$  gt11 digerido con los enzimas de restricción *EcoRI* y *HindIII* (Fermentas®).

Terminada la electroforesis el ADN era visualizado, tras una tinción de 10 min en bromuro de etidio (BrEt, 10  $\mu$ g/ml), en un transiluminador de luz ultravioleta Spectroline® (360 nm). Las fotografías de los geles se tomaron con un equipo GelPrinter Plus®. Otro método de visualización del ADN empleado fue la adición en la preparación del gel del fluoróforo SYBR-Safe (InvitroGen®) a una dilución de 1:20000. La observación del gel se realizó en un transiluminador de luz UV y se tomaron unas fotografías en el equipo GelPrinter Plus®.

## II. 8. PURIFICACIÓN DE LOS FRAGMENTOS DE ADN

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

Tras la electroforesis y la identificación de los fragmentos a la luz UV (en transiluminador Spectroline®), las bandas de interés fueron cortadas del gel lo más

rápidamente posible para evitar alteraciones por la luz UV. Posteriormente se eluyeron utilizando el sistema Agarose Gel ADN Extraction Kit (Roche<sup>®</sup>) o Band Preparation Kit (GE Healthcare<sup>®</sup>) siguiendo las instrucciones del fabricante.

## II. 9. TRATAMIENTO ENZIMÁTICO DE ADN

### II. 9. 1. Digestión con endonucleasas de restricción

Las condiciones empleadas para el uso de las enzimas de restricción fueron las recomendadas por las distintas casas comerciales proveedoras (Roche<sup>®</sup>, Fermentas<sup>®</sup> y GE Health Care<sup>®</sup>). Siempre se utilizó como tampón de reacción el suministrado por el proveedor y para el caso de una reacción de digestión con dos endonucleasas de restricción, se usó el más adecuado según el fabricante o tampones “universales” como el tampón Tango (Fermentas<sup>®</sup>) o el “one for all” (GE Healthcare<sup>®</sup>).

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.

Si se debía realizar una reacción de digestión con dos endonucleasas de restricción la temperatura variaba entre los dos enzimas no eran compatibles, primero se realizaba la digestión con el enzima y su correspondiente tampón de menor temperatura requerida, y a continuación, tras la purificación del producto de digestión, una nueva digestión con el segundo enzima y su correspondiente tampón a la temperatura necesaria.

### II. 9. 2. Tratamiento con ligasa de T4

Las reacciones de ligación se realizaron principalmente para subclonar fragmentos de ADN en plásmidos. Los fragmentos de ADN digeridos con enzimas de restricción se mezclaron en una proporción molar vector:inserto de 1:10. El volumen total de reacción fue 20 µl que se completaron con agua estéril y se llevaron a tubos de T4 DNA Ligase Ready-to-Go<sup>™</sup> (GE Healthcare<sup>®</sup>) que incluían liofilizadas las cantidades de tampón y enzima T4 ligasa necesarias para la reacción. Las reacciones se incubaron a temperatura ambiente durante 60 min.

## II.10. OBTENCIÓN Y PURIFICACIÓN DE ARN DE *C. albicans*

Para la extracción de ARN total de las diferentes cepas de *C. albicans*, éstas se sembraron en 50 ml de YPD durante toda la noche a 28 °C. Después de recogerlos por centrifugación (5 min, 4000 xg), el sobrenadante fue desechado y el sedimento de células resuspendido en el sobrenadante residual. La suspensión celular fue lentamente goteada en nitrógeno líquido, formándose gránulos congelados de células. Para evitar la descongelación de los mismos, a medida que se fueron originando, se almacenaron a -80 °C hasta su ulterior utilización. Para la disgregación celular se procedió a un mecanismo mecánico donde los gránulos de células congeladas de cada muestra se incorporaron juntos con una bola de carburo ( $\phi$  7 mm) en recipientes de teflón -ambos previamente lavados en una solución de bentonita, enjuagados en agua DEPC y enfriados en nitrógeno líquido- fueron colocados en un micro-desmembrador (B. Braun Biotech International GmbH, Melsungen<sup>®</sup>) durante 2 min a 2600 rpm. El polvo celular obtenido fue resuspendido rápidamente en 1 ml de Trizol (Invitrogen<sup>®</sup>). A continuación la suspensión se transfirió a un tubo de 2 ml y se agitó vigorosamente durante 1 min. Para la disociación de los complejos nucleoproteicos fue imprescindible la incubación durante 5 minutos a temperatura ambiente. Después de una centrifugación (10 min, 15000 xg), el sobrenadante fue transferido a un nuevo tubo eppendorf y fue mezclado con 0,4 volúmenes de cloroformo. Las muestras se agitaron durante 15 segundos manualmente, para posteriormente incubarse 5 - 10 min a T<sup>a</sup> ambiente. Tras este periodo, se centrifugó de nuevo (5 min, 15000 xg) y la fase nítida superior se transfirió a un tubo eppendorf de 1,5 ml. El ARN entonces fue precipitado mediante la adición de 0,5 volúmenes de isopropanol incubándose durante 15 min a T<sup>a</sup> ambiente. Después de la consiguiente centrifugación (10 min, 15000 xg), el sedimento de ARN fue lavado con 1 ml de EtOH al 70% frío (diluido con agua DEPC), y de nuevo centrifugado (10 minutos, 15000 xg). El sobrenadante fue eliminado y el sedimento secado al aire. Entonces se resuspendió en 500  $\mu$ l agua DEPC (0,1% DEPC) y mediante la adición de 500  $\mu$ l de la solución tampón de LiCl (LiCl 4M, EDTA 10 mM, Tris-HCl 20 mM, pH 7,4) el RNA fue precipitado durante una noche a -20 °C. Pasado este tiempo se procedió a la descongelación de la muestra de ARN y su posterior centrifugación (30 min, 15000 xg). El sedimento fue lavado primeramente con 1 ml EtOH al 70% frío (diluido con agua DEPC) y posteriormente con 500  $\mu$ l de la misma solución (tras cada lavado una

centrifugación de 10 min, 15000 xg). Finalmente, el sedimento de ARN fue secado al aire durante 15 min y resuspendido entre 80 y 100 µl de agua DEPC.

Una vez obtenido el ARN se procedió a la purificación del mismo, y aunque el protocolo para aislar el ARN, es muy específico, las muestras se trataron con DNasa I para eliminar restos de DNA que pudieran interferir en las pruebas a realizar. Así pues se tomaron 8 µg de RNA y se añadió 1 µl Turbo DNase I (2U/µl) (Ambion®) en un volumen final de 20 µl. La reacción se incubó durante 30 min a 37 °C. A continuación se lavó la mezcla utilizando el RNA Clean-Up Kit-5™ (Zymoresearch®), se añadieron a la mezcla 80 µl del tampón de unión y la muestra fue transferida a la columna Zymo-Spin™ (Zymoresearch®). Tras centrifugar durante 1 min fue desechado el líquido y se pipetearon 200 µl de tampón de lavado en la columna. Después de centrifugar de nuevo las muestras para eliminar restos de tampón de lavado, el ARN fue eluido con 20 µl de agua DEPC.

## II.11. CUANTIFICACIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS

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

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

El factor de conversión 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 A260/ A280. Muestras puras de ADN y ARN tienen valores cercanos a 1,8 y 2 respectivamente.

## II. 12. REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR)

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

### II. 12. 1. Diseño de oligonucleótidos

Para el diseño de oligonucleótidos específicos se siguieron las recomendaciones de Saiki (1989). Básicamente se tomaron secuencias de más de 20 nucleótidos, con un contenido mínimo del 50 % en C y G. Se evitaron secuencias palindrómicas, y se procuró que el oligonucleótido sintetizado tuviera en el extremo 3' la secuencia CC, GG, CG o GC. La secuencia de los oligonucleótidos ya diseñados se introdujo en el programa informático on-line "Oligo Calc: Oligonucleotide Properties Calculator" (<http://www.basic.northwestern.edu/biotools/oligocalc.html>) para estudiar sus características y confirmar que cumplía con los requisitos citados.

### II. 12. 2. Condiciones de reacción de PCR

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se realizó en un termociclador Minicycler (MJ Research®). El contenido de cada tubo eppendorf fue el siguiente: 0.25 unidades de la ADN polimerasa EcoTaq Plus (Ecogen®) con el tampón suministrado en el kit, 0.25 mM de la mezcla de dNTPs, 0.4 µM de cada oligonucleótido cebador y entre 10 y 100 ng del ADN molde. El volumen final de reacción fue de 25 µl ó 50 µl en función del experimento.

El programa usado en el termociclador consiste en un primer paso de desnaturalización del ADN a 94 °C durante 2-5 min. Seguidamente se pasa a una repetición de 30 ciclos con un paso de desnaturalización a 94 °C durante 30 s seguido de un paso de hibridación de 30 s a la temperatura seleccionada para este fin y un último paso de elongación a 72 °C durante un tiempo de 1 min por cada 1 kb. Se seleccionó la temperatura de fusión (T<sub>m</sub>) indicada por el fabricante como temperatura de hibridación del oligonucleótido cebador, o bien se calculó mediante la fórmula:

$$T^a \text{ fusión} = 2x (A/T) + 4x (C/G) \quad \text{donde: } T^a \text{ hibridación} = T^a \text{ fusión} - 5 \text{ } ^\circ\text{C}.$$

### II. 12. 3. Transcripción inversa (RT-PCR)

La transcripción inversa es una reacción que permite sintetizar ADN complementario (ADNc) a partir de ARN mensajero mediante una enzima ADNpolimerasa ARN-dependiente. Para ello se utilizaron tanto el RETROscript<sup>®</sup> First Strand yntesis Kit for RT-PCR, Ambion (Ambion<sup>®</sup>) como el AffinityScript<sup>™</sup> QPCR cDNA Synthesis Kit (Stratagene<sup>®</sup>). Para la síntesis de la cadena de ADNc, se partió de 8 µg de ARN total y se emplearon los kits nombrados según las indicaciones del fabricante.

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 *EFBI* (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.12. En la reacción de amplificación se utilizó 1 µg de ADNc como molde para la reacción de PCR. Las secuencias de los oligonucleótidos empleados para la amplificación parcial del gen *PIRI* (Pir1-RT5 y Pir1-RT3), se detallan en la tabla II.3. Como control se emplearon oligonucleótidos que amplifican el gen *EFBI* (EFB1F y EFB1R), 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. 12. 4. RT-PCR semicuantitativa

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

Para ello, el ADNc obtenido tras la reacción de retrotranscripción se sometió a amplificación por PCR con oligonucleótidos específicos del gen a estudiar y como control, el mismo procedimiento se llevó a cabo utilizando como cebadores específicos de un gen de expresión constitutiva, en este caso, el *EFBI*. Durante la reacción de PCR

para sintetizar los fragmentos de ADN se tomaron muestras tras distintos ciclos de amplificación, y la abundancia de ADN obtenido en los amplicones del gen de interés y del gen control se compararon, permitiendo una cuantificación relativa. La obtención de amplicones por PCR a partir de ARN total de levadura se llevó a cabo como se describe en el apartado anterior II.12.3. En la tabla II.3 se especifican los oligonucleótidos utilizados para las reacciones de RT-PCR semicuantitativa.

### **II. 12. 5. Mutagénesis dirigida por PCR**

El intercambio dirigido de bases individuales y deleciones de la secuencia fue realizado con el kit QuikChange Site-Directed Mutagenesis (Stratagene®) siguiendo las instrucciones del fabricante. El tiempo de elongación depende del tamaño del plásmido. Tras la amplificación, fueron añadidas 10 U del enzima *DpnI* a la mezcla de reacción y se incubó a 37 °C durante 1h. De ese modo el molde de ADN metilado se degrada selectivamente. Posteriormente se tomaron entre 4 y 12 µl del producto de mutagénesis para transformar células competentes de *E. coli*. Se extrajo el ADN de las colonias resultantes y se mandaron a secuenciar para así observar el transformante que ha incorporado la mutación deseada.

## **II. 13. INTERRUPCIÓN GÉNICA EN *C. albicans***

El método de interrupción génica empleado en este trabajo para la transformación integrativa en *C. albicans* se ha basado en el método descrito por Reuss *et al.* (2004).

De este modo, la interrupción secuencial de los dos alelos del gen de *C. albicans* se lleva a cabo haciendo uso de un casete de interrupción que lleva los genes *CaSAT1* (que codifica para la Estreptotricin Acetil Transferasa 1, un gen de resistencia a antibióticos del tipo estreptomycin) y *CaFLP* (que codifica para una Flipasa). A este casete se le añadió a cada flanco, una secuencia de homología de la zona 5' y 3', respectivamente, del gen a interrumpir. Una vez obtenido el casete de interrupción se digirió con las enzimas de restricción adecuadas con el fin de conseguir un fragmento de ADN lineal. Aproximadamente 5 µg de casete digerido se utilizaron para transformar la



cepa de *C. albicans* SC5314 según el protocolo descrito por Reuss *et al.* (2004) tal y como se indica en el apartado II.4.2.

Los transformantes obtenidos de cada una de las interrupciones secuenciales se seleccionaron en placas de medio YPD con nurseotricina en una concentración de 200 µg/ml, se extrajo su ADN genómico y se comprobaron por PCR.

Tras esta transformación, las cepas identificadas por PCR como mutantes se sembraron en medio YPM para que se expresara el gen *CaFLP* que se encuentra en el casete de disrupción. De esta manera mediante la acción de las flipasas se procede a la eliminación del casete. Una alícuota del medio YPM inoculado con las cepas disruptantes se sembró en placas de YPD conteniendo una concentración de nurseotricina de 10 µg/ml en las que pudieron aislarse colonias sensibles al crecer más lentamente en estos medios, es decir, se pudo aislar cepas con el gen de interés interrumpido y sensible a la nurseotricina.

## II.14. SECUENCIACIÓN DE ADN

Las reacciones de secuenciación fueron encargadas al Servicio de Secuenciación de la empresa GATC Biotech AG (Konstanz<sup>®</sup>), a la sede establecida en Düsseldorf, Alemania.

Para la secuenciación se enviaron los plásmidos a secuenciar en una concentración de 30 a 100 ng/µl, en un Volumen total de 30 µl. Como cebadores se emplearon o bien oligonucleótidos comerciales seleccionados desde su página web (<http://www.gatc-biotech.com/de/sanger-services/single-read-sequenzierung.html>) o bien oligonucleótidos específicos, los cuales se mandaron junto con los plásmidos en una concentración de 10 pmoles/µl, volumen total de 30 µl.

Los resultados fueron enviados telemáticamente y visualizados en el programa GATCViewer<sup>™</sup> ([http://www.gatc\\_biotech.com/de/textbausteine/downloadsundntzliche/nks.html](http://www.gatc_biotech.com/de/textbausteine/downloadsundntzliche/nks.html)).

## II. 15. REINTEGRACIÓN DEL GEN *PIR32* EN LA CEPA DOBLE HOMOCIGÓTICA DE *C. albicans*

Este tipo de controles son fundamentales en un microorganismo como *C. albicans*, ya que algunos pasos del método de interrupción génica son muy agresivos para la levadura lo cual provocarían errores en la interpretación de los resultados obtenidos.

La reintegración del gen deleccionado, en nuestro caso, *PIR32*, en un *locus* de expresión adecuado (Brand *et al.*, 2004) como puede ser *RP10*, puede contrarrestar la mayoría de los cambios fenotípicos debidos a los métodos de interrupción génica. De esta manera se haría patente si las variaciones fenotípicas observadas se deberían exclusivamente a la interrupción del gen en proceso de estudio.

El método empleado en el presente trabajo se basa en el utilizado por Brand *et al.*, 2004, pero modificando el plásmido CIPSAT2. (D'Enfert, 2009). El vector modificado fue nombrado pEcc120Malp, este plásmido contiene el *locus* del gen *RP10*, numerosos sitios de clonación donde insertaremos el gen a reintegrar, bajo el promotor maltosa, el marcador de resistencia para la nurseotricina (gen *SAT1*), resistencia a la ampicilina, y además carece de un origen de replicación para *C. albicans*.

Para la reintegración de *PIR32* fue necesario amplificar el marco abierto de lectura con los oligonucleótidos RPIR32CFw y RPIR32RvF, secuenciarlo completamente, para comprobar la ausencia de errores -empleando mutagénesis dirigida en caso de necesitar corregir alguna- y tras ser digeridos tanto el inserto con las enzimas de restricción *SmaI* y *MluI*, y el vector con las enzimas de restricción *EcoRV* y *MluI*, introducirlo en el plásmido autorreplicativo pEcc120Malp de *C. albicans* con el marcador de selección *SAT1*. La construcción obtenida (pEcc120Malp-*PIR32*) se empleó para integrar *PIR32* en el *locus* *RP10* en la cepa PIR1Ø32Ø<sup>S</sup> (*pir1Δ/pir1Δ*; *pir32Δ/pir32Δ*), usando el sitio de restricción *NcoI*. La cepa obtenida fue denominada RT32<sup>R</sup>. La razón por la cual no se realizó la reintegración del gen *PIR32* en el mutante PIR32Ø<sup>S</sup>, fue debida a la ausencia observada en las pruebas fenotípicas de variaciones significativas en la morfología y fisiología entre este mutante y la cepa parental. De esta manera la cepa PIR1Ø32Ø<sup>S</sup> resultaba idónea para este experimento.

La reintegración correcta en el genoma se comprobó por PCR usando los oligonucleótidos RPIR32CFw y PIR32qPCRv3. De manera que sólo aparecería una banda si el vector con el gen *PIR32* se hubiera integrado correctamente en el *locus* correspondiente.

## II.16. DETECCIÓN DE SECUENCIAS ESPECÍFICAS DE ADN (SOUTHERN BLOT)

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

### II. 16. 1. Marcaje no radioactivo de la sonda de ADN

El marcaje de las sondas de ADN se realizó utilizando el DIG DNA Labeling and Detection Kit (Roche®) que incorpora digoxigenina-11-dUTP en una reacción catalizada por la subunidad Klenow de la DNA polimerasa de *E. coli*, de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

Por cada mezcla de reacción se desnaturalizaron aproximadamente 500 ng de ADN durante 10 min a 95 °C, enfriándolas después en hielo. A continuación se adicionó al ADN desnaturalizado: 2µl de la mezcla de hexanucleótidos, 2µl de mezcla de dNTPs de marcaje y 1µl del enzima Klenow hasta un volumen total de 20µl. La incubación a 37°C durante 20 horas permitió un buen marcaje. Para detener la reacción transcurrido el tiempo requerido, se añadió 2µl de EDTA 0,5 M.

Después al ADN marcado se le añadió LiCl en proporción 1/4 del volumen final de la mezcla, junto con 2,5 volúmenes de EtOH absoluto y se precipitó durante al menos 30 min a -70 °C o también o/n a -20°C. Posteriormente el ADN se secó al aire y se redisolvió en 20µl de tampón TE (10 mM Tris/HCl pH 7,5; 1 mM EDTA pH 8,0).

La concentración de la sonda, (es decir, la calidad de marcaje) se estimó previamente a la hibridación, mediante la comparación de una serie de diluciones de la sonda creada con otra serie de diluciones de un ADN marcado control.

## **II. 16. 2. Separación y transferencia de los fragmentos de ADN**

El ADN de la levadura en concentración adecuada (entre 12 µg y 20 µg para una buena detección) fue digerido por enzimas de restricción adecuadas, en este caso por *Afl*III o bien *Msc*I, durante 30-48h; posteriormente el ADN fue precipitado y tras resuspenderlo en 20 µl de TE buffer, se separaron los fragmentos resultantes de acuerdo a su tamaño en un gel de agarosa al 2% en TAE. Una vez teñido el gel con BrEt y visto que las digestiones y la separación se habían realizado con éxito, el gel se lavó dos veces durante 15 min con HCl 0,25 M para realizar una despurinación parcial y así facilitar su transferencia a la membrana. Después se desnaturalizó con NaOH 0,5 M/ NaCl 1,5 M durante 30 min y se incubó en tampón neutralizante (NaAc 3 M, NaCl 1,5 M, Tris-HCl 0,5 M, pH 5,5) durante 30 min. Por último se realizó un lavado en el tampón 5xSSC (NaCl 1 M, Citrato sódico 0,1 M, pH 7,0).

La transferencia del ADN una membrana de nylon Hybond-N (Amersham®) se realizó por capilaridad durante al menos 12h en 20x SSC (3 M NaCl, citrato de sodio 0,3 M / pH 7,0) a Tª ambiente. Transcurrido este tiempo la membrana fue lavada 10 min en 5xSSC para eliminar posibles restos de agarosa. Por último, para fijar el ADN a la membrana, tras dejarla secar durante 3 min, se le irradió con luz UV durante 3 min (312 nm).

## **II. 16. 3. Hibridación ADN/ADN**

La hibridación de las membranas se realizó mediante el empleo de sondas marcadas no radiactivamente como se ha descrito en el apartado II.16.1.

Para saturar los sitios de unión no específicos de la membrana de nylon Hybond-N (Amersham®) fue incubada primero durante 1-3 h en 45 ml de solución de prehibridación (5x SSC, 50% formamida desionizada, 0,02% SDS, 1% reactivo de bloqueo (Roche®), 0,1% N-laurilsarcosina, pH 7,0) a 68 °C. Mientras tanto, se desnaturalizó la sonda de ADN marcada con DIG durante 10 min a 95 °C, posteriormente fue enfriada brevemente en hielo y añadida a 5 ml de solución de prehibridación.

Pasado este tiempo se retiró la solución de prehibridación y se llevó a cabo la hibridación de la membrana añadiendo al tubo la sonda marcada desnaturalizada,

durante 16 h en un baño de agua a 68 °C. A continuación la membrana fue lavada dos veces durante 5 min con el tampón NRW1 (2x SSC 0,1% SDS) a T<sup>a</sup> ambiente, seguido de dos lavados de 15 min con tampón NRW2 (0,1 x SSC, 0,1% SDS) a 68°C, para eliminar el exceso de sonda así como la sonda unida de forma no específica. Con la intención de bloquear los sitios de unión inespecíficos, la membrana fue lavada brevemente con tampón NRB1 (100 mM de ácido maleico, 150 mM NaCl, pH 7,6) e incubada durante 60 min en tampón NRB2 (1% (w/v) de reactivo de bloqueo (Roche<sup>®</sup>) en tampón NRB1, pH 9,5) a T<sup>a</sup> ambiente. Este paso fue seguido de una incubación con 4 µl del anticuerpo anti-DIG conjugado con fosfatasa alcalina (Roche<sup>®</sup>) en 20 ml de la solución NRB2 durante 45 min a T<sup>a</sup> ambiente. Tras dos etapas de lavado con tampón NRB1 de 15 min, se procedió a la equilibración de la membrana en NRB3 (10 mM NaCl, 50 mM MgCl<sub>2</sub>) durante 1 ó 2 minutos para la posterior detección.

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

#### **II. 16. 4. Detección de la unión ADN / sonda**

La detección de la sonda unida al ADN se realizó mediante NBT (Roche<sup>®</sup>), un método defosforilante y oxidante para dar un color azul oscuro (añil) en la misma membrana, como un producto de oxidación. Se emplearon 10 ml del buffer NRB3 junto con 200 µl del kit NBT/BCIP (Roche<sup>®</sup>). La membrana fue puesta en oscuridad hasta la aparición de señales, en un tiempo máximo de 4h. Para parar la reacción simplemente se lavó la membrana con agua.

### **II. 17. OBTENCIÓN DE PAREDES CELULARES.**

Para la obtención y purificación de paredes celulares se siguió el método descrito por Pastor *et al.* (1984) y Valentín *et al.* (1984) para *Saccharomyces cerevisiae*. Las células de *C. albicans* crecidas como levadura se recogieron por centrifugación (2000 xg, 10 min) y se lavaron con agua destilada estéril conteniendo 1 mM fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF), un inhibidor de actividades proteolíticas. A continuación, se procedió a su rotura adicionando perlas de vidrio de diámetro de 425-600 micras (Sigma) y se sometieron a agitaciones repetidas de 60 segundos en vórtex, con

intervalos iguales de reposo en hielo. Si el volumen de células era mayor se procedió a su rotura en un homogenizador de células Braun modelo MSK (Braun®). Para ello las células resuspendidas en el mínimo volumen de solución de PMSF se transfirieron a botellas de vidrio de 30 ml de capacidad y se mezclaron con un volumen equivalente de perlas de vidrio. Dentro de la cámara del homogenizador, las botellas se agitaron durante 2 ó 3 periodos de 30 segundos por medio de un motor a la vez que circulaba CO<sub>2</sub> para mantener la temperatura próxima a los 0 °C, evitándose así en lo posible la acción de las proteasas. En estas condiciones el rendimiento de rotura fue prácticamente del 100%, analizándose el proceso mediante observaciones periódicas al microscopio de contraste de fases. Una vez rotas las células, las paredes celulares se recogieron por centrifugación del homogeneizado celular a 2000 xg durante 10 min y se lavaron varias veces con solución de PMSF 1mM hasta que la solución de lavado aparecía limpia.

## II. 18. SOLUBILIZACIÓN DE COMPONENTES DE LAS PAREDES CELULARES AISLADAS

### II. 18. 1. Tratamiento con dodecil sulfato sódico (SDS)

Se siguió el protocolo descrito por Valentín *et al.*, 1984.

Las paredes celulares aisladas se trataron con SDS al 2 % en PMFS 1 mM, a razón de 500 µl por cada 100 mg de paredes (peso húmedo), a 100 °C durante 10-15 min. Seguidamente se separaron las paredes del material solubilizado por centrifugación (2000 xg, 10 min). Este tratamiento se realizó dos veces más con la finalidad de eliminar posibles contaminaciones de proteínas unidas no covalentemente a otros componentes de la pared en posteriores extractos.

Las paredes así tratadas se lavaron exhaustivamente con PMSF 1 mM para eliminar el exceso de detergente y ser sometidas a otros tratamientos.

### ***II. 18. 2. Tratamiento con $\beta$ -Mercaptoetanol ( $\beta$ -ME)***

Las paredes celulares aisladas y previamente extraídas con SDS se resuspendieron en una solución de  $\beta$ -Mercaptoetanol al 2% (v/v) en tampón acetato amónico 10 mM, pH 6,3, (5 ml/g de paredes, peso húmedo), durante 3h a 30°C en agitación suave. Una vez finalizado el tratamiento, las paredes se separaron por centrifugación durante 10 min a 2000 xg y se lavaron con solución de PMSF 1 mM para eliminar los restos de  $\beta$ -Mercaptoetanol.

### ***II. 18. 3. Tratamiento con soluciones alcalinas diluidas***

Las paredes celulares previamente tratadas con  $\beta$ -Mercaptoetanol se extrajeron toda la noche en una solución 30 mM de NaOH (100 mg paredes peso húmedo / ml NaOH) a 4°C. Posteriormente se paró la reacción con 100  $\mu$ l de ácido acético durante 5 min. Las paredes se separaron por centrifugación durante 10 min a 2000 xg. El sobrenadante obtenido se dializó frente a agua destilada con cambios periódicos, para ser finalmente liofilizado.

### ***II. 18. 4. Tratamiento con HF/Piridina***

Las paredes liofilizadas se resuspendieron en una solución de HF/piridina (Sigma<sup>®</sup>) en una proporción de 75  $\mu$ l/mg pared (peso seco) en tubo de plástico. Se mantuvo en hielo durante 3 h con agitaciones suaves periódicas. Finalmente se paró la reacción añadiendo el doble de volumen de agua. Se dializó el sobrenadante frente a agua destilada durante 72 h con cambios periódicos y se liofilizó.

## **II. 19. DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN PROTEICA**

La cuantificación de la proteína obtenida se realizó siguiendo el método Bradford (Bradford, 1976). A un determinado volumen de material que contenía la proteína a cuantificar se le adicionó el volumen necesario de agua para finalmente tener 800  $\mu$ l. A la mezcla anterior se le adicionaron 200  $\mu$ l del reactivo Bradford. Pasados 10 min se determinó la D.O<sub>595nm</sub> de las muestras y los resultados se interpolaron en una curva patrón de cantidades conocidas de BSA (0-100  $\mu$ g).

## II. 20. SEPARACIÓN DE PROTEÍNAS EN GELES DE SDS-POLIACRILAMIDA (SDS-PAGE)

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

Para ello se emplearon geles separadores de poliácridamida al 10% (relación de acrilamida:bisacrilamida de 30:0,2) preparados en tampón separador (Tris-HCl 0,37 M, SDS 2%, pH 8,8). Los geles de empaquetamiento se prepararon en tampón empaquetador (Tris-HCl 0.75 M, SDS 2%, pH 6,8) y a una concentración de acrilamida del 6 %. A las muestras a analizar (10-20 µg de proteína en un volumen de 10 µl) se les adicionaron 7 µl de una solución solubilizadora que contenía glicerol al 40 %, SDS al 8%, β-Mercaptoetanol al 20 % y azul de bromofenol al 0,001 % en tampón Tris HCl 0,25, pH 6,8. Antes de ser cargadas en el gel fueron desnaturalizadas por calentamiento 10 min a 100° C.

Las muestras se empaquetaron a un voltaje constante de 120 V, realizándose el resto del proceso a 160-180 V.

Como patrón de peso molecular en la separación de especies proteicas por SDS-PAGE se empleó PageRuler™ Prestained Protein Ladder (Fermentas®) que consiste en 10 proteínas de pesos moleculares aparentes entre 10 y 190 kDa.

## II. 21. TRANSFERENCIA DE PROTEÍNAS A SOPORTES DE NITROCELULOSA Y DETECCIÓN (WESTERN-BLOT)

### *II. 21. 1. Transferencia a membranas de nitrocelulosa mediante la técnica de Western-blot*

Las proteínas separadas mediante SDS-PAGE fueron transferidas y retenidas en membranas de nitrocelulosa (Hybond C extra, Amersham Pharmacia Biotech®). Para ello los geles y las membranas fueron sumergidos 10 min en el tampón de transferencia (Glicina 192 mM, Tris-HCl 0,025 M, pH 8,3; SDS 0,1% (p/v); MeOH 20%). Los geles



se pusieron en contacto con los soportes de nitrocelulosa y se introdujeron en una cubeta de Cleaver Scientific® con sistema de transferencia de proteínas en proceso semiseco, donde se realizó la transferencia aplicando una corriente constante de 100 V durante 1 h a 4°C.

## ***II. 21. 2. Adsorción de proteínas en soportes de nitrocelulosa mediante la técnica de Dot-blot***

Esta técnica se basa en fijar directamente proteínas a soportes de nitrocelulosa sin necesidad de transferirlas desde un gel de poliacrilamida. Las proteínas en forma soluble se aplicaron directamente sobre el soporte mediante adsorción por vacío, utilizando un aparato Dot-blot de Millipore®, siguiendo las instrucciones del fabricante. Las muestras, una vez fijadas, se procedieron a inmunodetectarlas como se describe en el apartado II.21.3.

## ***II. 21. 3. Inmunodetección***

El primer paso en la detección fue el bloqueo de las membranas con leche desnatada en polvo al 5 % en tampón TTBS (10% NaCl, 0,1% Tween-20, Tris-HCl 10 mM, pH 7,2), a 37 °C, durante 1 h y en agitación suave. Tras esta etapa se realizaron dos lavados de 10 min con tampón TTBS y un lavado de 10 min con el tampón TBS (10% NaCl, Tris-HCl 10 mM, pH 7,2).

A continuación las membranas con las proteínas fijadas fueron incubadas con el anticuerpo adecuado, en la dilución adecuada en tampón TTBS conteniendo leche en polvo desnatada al 2%, durante 12 horas a 4°C.

Después las membranas se lavaron 30 min con TTBS y se incubaron 20 min a temperatura ambiente en TBS con leche en polvo al 2 % con una dilución 1/10000 del segundo anticuerpo (IgG de cabra anti-inmunoglobulina de conejo acoplada a peroxidasa, Bio-Rad®). Posteriormente las membranas se lavaron dos veces con TTBS 10 min., y una vez con TBS de nuevo 10 min., procediéndose a continuación al revelado.

El método de revelado empleado fue la quimioluminiscencia, se utilizó la técnica de ECL (Lumi-light western blotting substrate, Roche<sup>®</sup>) que está basada en la oxidación del luminol por acción de la peroxidasa en presencia de un potenciador (fenol) capaz de aumentar hasta 1000 veces la luz emitida por el luminol oxidado. Las proteínas son detectadas por su unión a anticuerpos conjugados directa o indirectamente a peroxidasa. Se eliminó el exceso de tampón TBS de la membrana y se incubó entre dos plásticos transparentes 1 min con los líquidos de revelado 1 y 2 del kit comercial Lumi-light western blotting substrate (Roche<sup>®</sup>) en una relación 1:1.

Posteriormente se eliminó el exceso de líquido de la membrana y se expuso un tiempo variable sobre una película de autorradiografías MXB Film (Kodak<sup>®</sup>). Finalmente, se reveló la película que mostró las bandas del antígeno reconocido por el anticuerpo en un equipo Curix 60 (AGFA<sup>®</sup>).

## II. 22. ANÁLISIS FENOTÍPICO DE LAS CEPAS DISRUPTANTES

### *II. 22. 1. Curva de crecimiento*

La cinética del crecimiento de una levadura puede ser evidenciada en un medio de cultivo que proporcione todos los requerimientos nutricionales para el microorganismo, además de poseer las condiciones óptimas de temperatura, pH, aireación y agitación (Graham y Horman, 1990). Las fases conocidas de una curva de crecimiento típica de una levadura incluyen la fase de latencia, fase de crecimiento exponencial, fase estacionaria y fase de muerte celular.

Para la realización de este ensayo, se partió de un cultivo crecido durante toda la noche, del cual se tomó la cantidad de células necesarias para obtener una  $D.O_{600} = 0,5$  en 25 ml de medio YPD o bien medio YNB. El cultivo fue incubado en agitación (200 rpm) a 28 °C durante 24 h, tomando alícuotas cada hora para medir la variación de densidad óptica a 600 nm.

## II. 22. 2. Sensibilidad a zimoliasa

El ensayo fue realizado siguiendo el protocolo descrito por Van Der Vaart *et al.* (1995) modificado para *C. albicans* (Garcerá *et al.*, 2003). Cultivos de las cepas objeto de estudio en fase exponencial de crecimiento se centrifugaron a 2000  $\times g$  durante 10 min y se ajustaron a una  $DO_{600nm}$  aproximada de 0,6 en tampón Tris-HCl 10mM pH 7,5 conteniendo zimoliasa 20T a una concentración de 100  $\mu g/ml$ . Las variaciones de  $DO_{600nm}$  fueron seguidas durante 90 min en un espectrofotómetro Graphicord (Shimadzu<sup>®</sup>).

## II. 22. 3. Estudio del efecto del blanco de calcoflúor, rojo Congo y SDS

Para ello, se ajustó la densidad óptica de cultivos en fase exponencial a  $DO_{600nm} = 1$  en un espectrofotómetro Graphicord (Shimadzu<sup>®</sup>) y se hicieron diluciones decimales hasta  $10^{-5}$ . A continuación se gotearon 3  $\mu l$  de cada dilución en placas que contenían:

- Placas SD: \* Blanco de calcoflúor: 10 - 200 $\mu g/ml$ .
- \* Rojo Congo: 10 - 500 $\mu g/ml$
- \* SDS: 50 - 500  $\mu g/ml$
  
- Placas YPD: \* Blanco de calcoflúor: 60 - 100  $\mu g/ml$
- \* Rojo Congo: 20 - 300  $\mu g/ml$
- \* SDS: 100 - 2000  $\mu g/ml$

Posteriormente se incubaron durante 48 h a 28 °C y se estudiaron los efectos sobre el crecimiento.

## **II. 22. 4. Estudio de la sensibilidad al estrés**

### **II. 22. 4. 1. Estudio del efecto de un medio hipertónico sobre el crecimiento (efecto del choque osmótico)**

Células en fase exponencial de crecimiento se ajustaron a una D.O.<sub>600nm</sub> de 1 en un espectrofotómetro Graphicord (Shimadzu®), se hicieron diluciones decimales hasta  $10^{-5}$  y se goteó 3  $\mu$ l de cada dilución en las placas con diferentes concentraciones salinas. Se prepararon placas de YPD e YNB conteniendo concentraciones de sales de:

- Placas de YPD: \* NaCl: 1.2 - 2 M
  - \* LiCl: 200 - 300 mM
  - \* CaCl<sub>2</sub>: 0.5 – 0.7 M
- Placas de YNB: \* NaCl: 1 – 2.5 M
  - \* LiCl: 350 - 500 mM

Las placas fueron incubadas a 28°C durante 2-3 días y se estudió la sensibilidad de las mismas.

### **II. 22. 4. 2. Estudio del efecto de la temperatura (efecto del choque térmico)**

De la misma manera que en el estudio de choque osmótico, se hicieron diferentes diluciones decimales a partir de un cultivo de cada cepa, en fase exponencial de crecimiento, en YPD cuya D.O.<sub>600nm</sub> se había ajustado a 1 en un espectrofotómetro Graphicord (Shimadzu®). Se hicieron diluciones decimales hasta  $10^{-6}$ . Se incubaron 3  $\mu$ l de cada dilución y de cada cepa en placas de YPD, YPM o YNB por duplicado y se introdujeron todas a tiempo 0 en una estufa a 65 °C. Tras periodos de tiempo de 30, 45, 60, 75 y 90 min se pasaron la mitad a una estufa de 28 °C y la otra mitad a una estufa a 37 °C incubándose a continuación durante 2-3 días.

### **II. 22. 4. 3. 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, 8 mM , 10 mM y 20 mM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, procediéndose a continuación como en las pruebas anteriores, donde fueron sembradas gotas en placas de YNB e YPD con las distintas diluciones de las cepas a estudiar.

### **II. 22. 5. Estudio del efecto de drogas**

#### **II. 22. 5. 1. Estudio de sensibilidad a cafeína**

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-quinasas dependiente de éste. Diferencias de sensibilidad a cafeína ponen de manifiesto la implicación de un producto génico en la ruta de las MAP-quinasas dependientes de AMPc (Navarro-García *et al.*, 1995).

Se estudió el efecto de la cafeína sobre el crecimiento de las cepas, para lo que se prepararon placas de YNB que contenían concentraciones crecientes de cafeína desde 8 mM hasta 20 mM.

#### **II. 22. 5. 2. Antifúngicos**

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

- Anfotericina B: 0 - 50 µg/ml
- Caspogungina: 0 - 10 µg/ml
- Cicloheximida: 0 - 0.2 µg/ml
- Higromicina B: 0 - 200 µg/ml

- Ketoconazol: 0 - 1.5  $\mu\text{g/ml}$
- Tunicamicina: 0 - 6  $\mu\text{g/ml}$
- Cafeína: 3 - 20 mM

Las placas fueron incubadas a 28°C durante 2-3 días y se estudió sensibilidad de las mismas.

## II. 23. ESTUDIOS DE FLOCULACIÓN EN MEDIO LÍQUIDO

Para el estudio de las diferentes cepas en relación con la transición dimórfica y la capacidad de floculación, se recogieron las células crecidas durante toda la noche en YPD y tras lavarse dos veces con agua estéril, se resuspendieron en medio RPMI (previamente filtrado y atemperado) a una  $D.O_{600\text{nm}} = 0,1$ . Se incubaron durante 4h a 37°C. Tomándose muestras a las 1h, 2h, 3h y 4h, y observándose al microscopio para verificar la presencia o ausencia de tubos germinales y la longitud de los mismos. Transcurridas 4h se ajustaron a  $D.O_{600\text{nm}}$  a 1 en tubos de hemólisis, los cuales fueron agitados durante un minuto y dejados en reposo. Cada cierto tiempo -hasta el tiempo máximo de una hora- fueron observados para comprobar la precipitación en cada tubo.

## II. 24. ESTUDIOS DE CAMBIO DIMÓRFICO

Se incubaron durante toda la noche cultivos de células de las diferentes cepas de estudio en YPD a 28 °C. Al día siguiente se recogieron las células y se ajustaron a una  $D.O_{600\text{nm}}$  de 0,3. Entonces fueron inoculadas en matraces de Erlenmeyer y en tubos de vidrio, los primeros conteniendo 20 ml del medio enriquecido RPMI (previamente filtrado y calentado) y en los tubos de vidrio 5 ml del mismo medio. Se procedió a la incubación con agitación a 37 °C, que favorece la transición dimórfica. Cada media hora se tomaron muestras de los tubos de vidrio, que se observaron al microscopio.

Al mismo tiempo cada media hora se pipetearon 1 ml de cada cepa presente en los matraces de Erlenmeyer y se incorporaron a tubos eppendorf Los cuales se centrifugaron a 5000  $\times g$  durante 10 min, se lavaron en PBS (NaCl 8 g/l, KCl 0,2 g/l,

$\text{Na}_2\text{HPO}_4$  1,44 g/l,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0,24 g/l, pH 7,4), y se fijaron al resuspenderse en formaldehído al 2% disuelto en PBS 1x. Mantener en nevera a 4 °C.

Para la tinción de las células fijadas fue empleado el blanco de calcoflúor a una concentración del 0,1% en Tris-HCl pH 7,0. Las células fijadas con formaldehído se centrifugaron a 15000 xg durante 1 min, a continuación se lavaron dos veces con PBS, y tras eliminar el sobrenadante se pipetearon a las muestras 100 µl de la solución de blanco de calcoflúor al 0,1%. Se mantuvieron durante 10 min a T<sup>a</sup> ambiente para asegurar la tinción de las células. Transcurrido este tiempo fueron lavadas dos veces con PBS y finalmente resuspendidas en 100 µl de agua destilada.

Las diferentes morfologías de las cepas fueron observadas con un microscopio Nikon Eclipse E800<sup>®</sup>, con el objetivo Plan Fluor<sup>®</sup> 40x/0.75, y las fotografías tomadas con una Nikon Digital Sight DS-L1<sup>®</sup>.

## II. 25. MICELIACIÓN EN MEDIO SÓLIDO

Cultivos de las cepas obtenidas fueron recogidos a 3500 xg durante 10 min y su  $\text{DO}_{600\text{nm}}$  se ajustó a 1. Se hicieron diluciones decimales seriadas hasta  $10^{-6}$  y se plaquearon 100 µl de las diluciones  $10^{-5}$  y  $10^{-6}$  (alrededor de 100 células) en placas de los medios de micelación: Lee, YE-Pro, YNB-suero y Spider (ver apartado II. 4. 1.). Las placas se incubaron 7 días a 37°C. Las colonias fueron observadas con un microscopio de lupa, Nikon 5MZ 1500<sup>®</sup>, y las fotografías tomadas con una Niko Digital SIGHT DS-Fi<sup>®</sup>.

## II. 26. HIDROFOBICIDAD Y ADHESIÓN

### II. 26. 1. Hidrofobicidad de la superficie celular

La hidrofobicidad de *C. albicans* se mide como se describe por Rosenberg *et al.*, 1983. Básicamente consiste en la medición de la adherencia de la levadura a los hidrocarburos, tales como ciclohexano o xileno.

Las cepas fueron cultivadas o/n en 5 ml de YPD o YNB a 28 °C. Posteriormente fueron lavadas con PBS y concentradas hasta obtener una  $\text{D.O}_{600\text{nm}} = 1$ . Para los

ensayos de adhesión, fueron mezclados 3 ml de la suspensión de células con 150µl de ciclohexano o xileno en un tubo de vidrio lavado previamente con ácido crómico. La muestra se mezcló con vórtex vigorosamente durante 1 min. Después de 20-60 min a temperatura ambiente, se midió la absorbancia a 600 nm de la fase acuosa (A1) y se compara con el obtenido antes del procedimiento de mezcla (A<sub>0</sub>). El porcentaje de células en la capa de ciclohexano/xileno se utilizó para estimar la hidrofobicidad.

### ***II. 26. 2. Adhesión / formación de biopelículas***

El método utilizado se basa en la utilización de placas de adhesión de poliestireno de 96 pocillos. En primer lugar las células de un cultivo incubado o/n se recogieron (10 min, 5000 xg) y se lavaron 3 veces con PBS estéril. A continuación las células se resuspendieron en RPMI hasta una D.O<sub>600nm</sub> = 1. A continuación de cada cepa se pusieron 200µl en los pocillos (por triplicado), la placa de poliestireno fue sellada herméticamente con parafilm y se incubaron a 37 °C en atmósfera húmeda. La capacidad de fijarse a la placa fue revisada en diferentes momentos (30 min, 1h, 2h, 4h y 24h).

La cuantificación de las biopelículas se realizó mediante dos métodos:

- El primero consiste en la tinción con cristal violeta (CV). En esta técnica, inicialmente el medio de los pocillos fue desechado por inversión y la placa secada a 37 °C. Posteriormente 100µl de una solución al 0,5% de cristal violeta fue añadida en cada pocillo y se dejó incubando a 37 °C durante 20 min. El exceso de colorante fue eliminado mediante inversión, y los pocillos se lavaron cuidadosamente con agua hasta que el agua vertida fuera incolora. Las células de la biopelícula se resuspendieron en 200µl de EtOH 95% y se transfirieron a una nueva placa de 96 pocillos para su lectura. La lectura de las absorbancias fue realizado a 570-580nm por un lector de ELISA (Labsystems Multiskan MS<sup>®</sup>)
- Para el otro método fue empleado el XTT [2,3-bis (2-methoxy-4-nitro-5-sulfo-phenyl)-2H-tetrazolium-5-carboxanilide] en una concentración de 0,5 mg/ml en PBS, esterilizado por filtro y alícuoteado. A la alícuota a emplear le fue añadido menadiona 10 mM (disuelto en acetona) hasta una



concentración final de la solución de 1  $\mu$ M. De esta mezcla XTT-Mediona, se añadieron 100  $\mu$ l a cada pocillo con muestra, además de los controles y fue incubado en oscuridad durante 2h a 37 °C. Una vez transcurrido este tiempo se observó en las muestras un color anaranjado y se procedió a la lectura de la absorbancia a 490 nm por un lector de ELISA (Labsystems Multiskan MS<sup>®</sup>).

La intensidad del color medida se relaciona así con la cantidad de biopelícula presente en cada pocillo. Así pues, la comparación de la absorbancia entre cepas nos indica la capacidad de fijación de las diferentes cepas a las placas de poliestireno, además de comprobar su capacidad de formar biopelículas.

## II. 27. MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE TRANSMISIÓN

Las células en fase exponencial de crecimiento fueron recogidas por centrifugación, fijadas con glutaraldehído al 2,5% y lavadas con agua destilada. Las células fueron fijadas posteriormente con tetróxido de osmio al 2% y deshidratadas en concentraciones crecientes de etanol. La incrustación se realizó con resina LR-White a 60 ° C durante 24-48 h. Las secciones ultradelgadas fueron contrastadas con acetato de uranilo al 2% y observadas en un microscopio electrónico JEM 1010 TEM (JEOL<sup>®</sup>) a 60 kV. Los valores de la anchura de la capa exterior de manoproteínas consiste en el promedio de cinco celdas, cada una medida en dos lugares diferentes de la pared celular lateral.

## II. 28. ESTUDIO DE LA 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.

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. 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.

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 distintas cepas. El porcentaje de supervivencia de los ratones fue supervisado cada día, durante un período de 30 días.

### **III. RESULTADOS**



### III. 1. SELECCIÓN *IN SILICO* DE Pir32p

La secuenciación del genoma completo de *C. albicans*, por la Universidad de Standford (<http://www.candidagenome.org>), 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://genolist.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*.

Las proteínas Pir fueron descritas por primera vez en *S. cerevisiae* (Toh-e *et al.*, 1993). En *S. cerevisiae*, se han constatado cuatro genes de familia Pir, cuya ausencia provocaba que las células estuvieran fisiológicamente muy alteradas y fueran osmóticamente muy sensibles (Mazán *et al.*, 2008). Los laboratorios del Dr. Klis (Kapteyn *et al.*, 2000) y la Dra. Chaffin (Kandasamy *et al.*, 2000) informaron simultáneamente de la presencia de esta clase de proteínas en la pared celular de *C. albicans* en la cepa CAI4 (que deriva de la cepa SC5314) y en la cepa NCPF3153, respectivamente.

La presencia de Pir1p en la pared celular de *C. albicans* fue confirmado por inmunodetección (Martínez *et al.*, 2004; Micó, 2009; Valentín 2013).

La importancia de los cuatro miembros de la familia Pir en *S. cerevisiae*, junto con el resultado obtenido de la no esenciabilidad del único miembro conocido en ese momento de esta familia proteica en *C. albicans* (Micó, 2009), llevó a la búsqueda *in silico* mediante un análisis BLAST (Altschul *et al.*, 1997) en las bases de datos disponibles utilizando la proteína Pir1 como referencia, encontrándose un posible miembro de la familia Pir que en la base de datos aparece nombrado como Pir32p.

La comparativa entre las secuencias aminoacídicas de las dos proteínas de la familia Pir mencionadas originó los resultados que se exponen en la figura III.1.

## RESULTADOS

```

PIR32      MIHYLIFFPILLIFFQIIKSSGYYPANGDDWTILKPPSCKNKLPGQYIDSLPFTEGIVVN 60
PIR1      ----MKYSTLVSIAAFISTSLAATVPDEHYSTLSPS---AKIPSGASTDFSGTFGIQV- 51
          : . . * : : : * . : * . . . . . : * . * . * : * . . . . * * * * *

PIR32      PYILNEDGDYEKPIVSKI KPSLTTTTTFFVTSI IITTSTATAPGSKPTKTKDI IVQIHGQVQ 120
PIR1      -----VTVESASALSTDTATSTLTRNDNKKEATPVAQITDGQVQ 90
          : * . : : : * : * : * . . . . * : * * * * * * * * *

PIR32      KMKHKHDYSSGGGDDDDDDDEDCFDEKNIDMAAKRDYQDMNTQEQANEDSGQVLAESDSH 180
PIR1      -----HQTGGVSAIKQISDGQ 107
          . * : . . . : * * . :

PIR32      QQVVDQNRQINEEEEEETQEQQMQEENNTNEIEDNNAQEFETIEEIIYDDIDNNE SRPNN 240
PIR1      IQHQTTVQPVQAQISDGQIQHQ TAKATATPVQQIGDGGQIQHQTTVQPVQAQISDGQ--IQHQ 165
          * : : : . : : * . * : . . . : * . * . * : * : : : * . : : :

PIR32      SKKYHKKRPHNNYENKHHGKDYHEDHHHNRHYKDHENGHEEDDHKWNKPKPMPEQEEQEQ 300
PIR1      TVKASATPVQQIGDGGIQHQTTAAAATTASAVKQINDGQ--IQHQTTAENVAKAQSDGQ 223
          : * . : : : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : *

PIR32      EQEQKPKHEKSEGYESEFVSPVYSVACYTNSTLKMTLTDGILRSDDRIGCIVSGHQFQF 360
PIR1      AIATGSPSSNSTLSDDDDSSSTIPKACSSANNLEMTLHDSVLKDTHERWGAIIVANHQFQF 283
          . : * : : * . . * * : . : * : * * * * * : * : * : * : * : * * * * *

PIR32      DGPTPQHGAIIYAAGWSVTKQGQLALGDSTKIFYQCASGDFYNLYDEPIAFQCHPVTLDVVE 420
PIR1      DGPIPQAGTIYSAGWSIK-DGYLYLGD SNIFYQCLSGDFYNLYDENVAKQCSAVKLSVIE 342
          * * * * * : * : * : * * * : . : * * * * * . * * * * * * * * * * * * * * *

PIR32      LIEC 424
PIR1      FVNC 346
          : : : *

```

Figura III.1. Homología entre las secuencias aminoacídicas de Pir1p y Pir32p de *C. albicans*.

En este primer análisis *in silico*, se comprobó que ambas proteínas presentan las características típicas de la familia Pir, ya que contienen las 4 Cys en la posición conservada del extremo carboxi-terminal, y además de una secuencia aminoacídica a modo de pseudorepetición, a semejanza de las repeticiones internas de Pir1p, propias de esta familia de proteínas. La comparación de las secuencias aminoacídicas de ambas proteínas reveló una homología del 26% a lo largo de toda la secuencia. Pir1p presenta repeticiones conservadas, pero en Pir32p sólo se encontró una pseudorepetición a semejanza de las repeticiones internas de Pir1p.

### III. 2. ANÁLISIS *IN SILICO* DE LA SECUENCIA AMINOACÍDICA DE LA PROTEÍNA Pir32

El gen *PIR32* codifica una proteína de 424 aminoácidos, con un peso molecular teórico deducido de su secuencia de 48,7 kDa y un punto isoelectrico de 4,66. El análisis de la secuencia de aminoácidos de la proteína Pir32 se detalla a continuación y se resume en la figura III.2. Como se puede observar, Pir32p cumple las características comunes a las proteínas de la familia Pir:

- a) El análisis *in silico* de la secuencia aminoacídica de Pir32p indicó la presencia de una señal hidrofóbica N-terminal correspondiente a un péptido señal putativo entre los aminoácidos 21 y 22 (Figura III.4). La secuencia se analizó mediante el programa SignalIP 3.0 (Mao *et al.*, 2008).
- b) Presencia de cuatro cisteínas en el extremo C-terminal de la proteína en idéntica posición siguiendo el patrón: -C-66aminoácidos-C-16aminoácidos-C-12 aminoácidos-COOH.
- c) Presencia de pseudorepeticiones internas en su secuencia aminoacídica, que concuerdan con la secuencia consenso Q[IV]XDGQ[IVP]Q.
- d) De los 424 aminoácidos correspondientes a la proteína sin el péptido señal, el 11,3% de éstos corresponden a residuos de Ser (6,1%) y Thr (5,9%), localizados en la parte central, susceptibles de ser O-glicosiladas (Figura III.3).
- e) Presencia de 4 sitios putativos de N-glicosilación (N-X-S/T), que se determinaron mediante el programa NetNGlyc (Esmaeili y Mohabatkar, 2008), y han sido señalados en la figura III.2.
- f) También presentan unas zonas en la región intermedia ricas en Asp y Glu, cuyos grupos reactivos de residuos ácidos originan una elevada hidrofilia (Figura III.3)

MIHYLIFPILLIFFQIIKSSGY YVPANGDDWT I LKPP SCKNKLPGQY IDS  
 LPFTFGI VVNPYILNEDGDYEKPIVSKIKPSLTTTTFVTSII TTSTATAP  
 GSKP TKTKD IIVQIHGDGQVQKMKHKHDYSSGGDDDDDDDEDCEKNI D  
 MAAKRDYQDMNTQE QANEDSGQVLAESDSHQQVVDQNRQ INEEEEETQE  
 QQMQEEN NNTNE IE DNNAQEFETIEEI YDDIDN NESRPNNSKKYHKKRPH  
 NNYE NKHGKDYHE DHHHNHRYKDHENGHEEDDHKWNKPKPMPEQEEQE Q  
 EQEQKPKHEKSEGYESEFVSPVYSVACYTNSTLKM TLTGILRD SDDRIG  
 C I VSGHQFQFDGPTPQHGA IYAAGWSVTKQGQLALGDSTKFYQCASGDFY  
 NLYDEPIAFQCHPV TLDVVELIEC

**Proteína Pir32**, (424 aa)  
 Peso molecular teórico: 48,7 kDa,  
 Punto isoelectrico: 4,66

T → Treonina  
 S → Serina  
 D → Aspártico  
 E → Glutámico

Q[IV]XDGQ[IV]P[Q] → Pseudorepeticiones internas

■ Péptido señal  
 ■ Sitio probable de N-glicosilación

Figura III.2. Análisis *in silico* de la secuencia aminoacídica de la proteína Pir32.

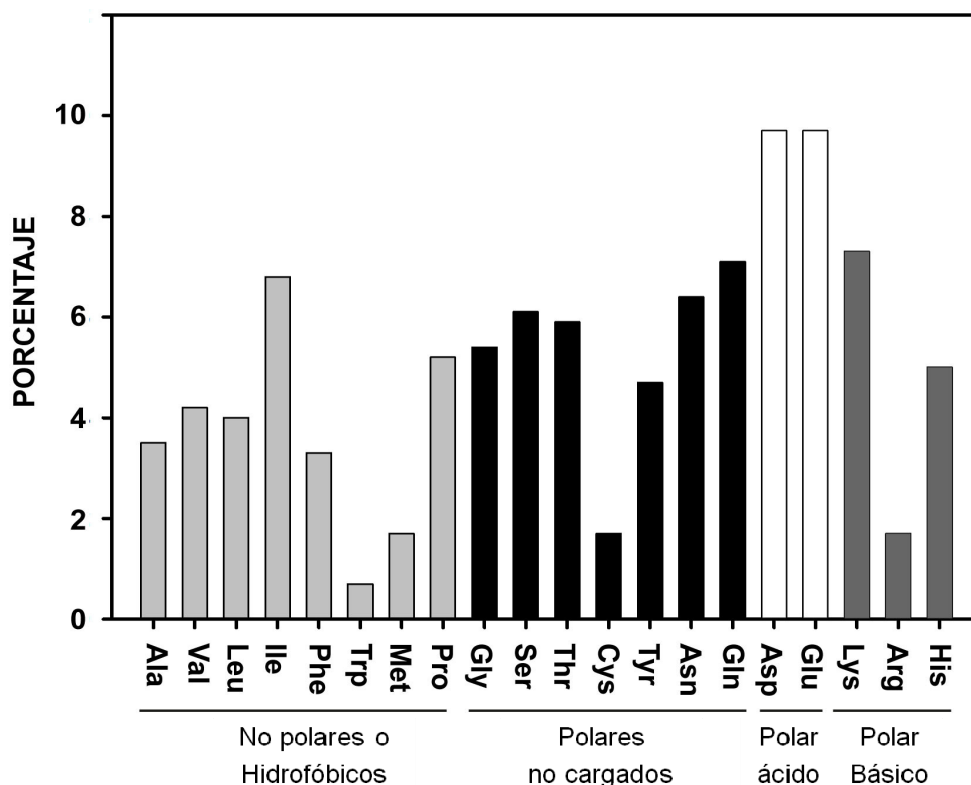


Figura III.3. Composición aminoacídica de la proteína Pir32.



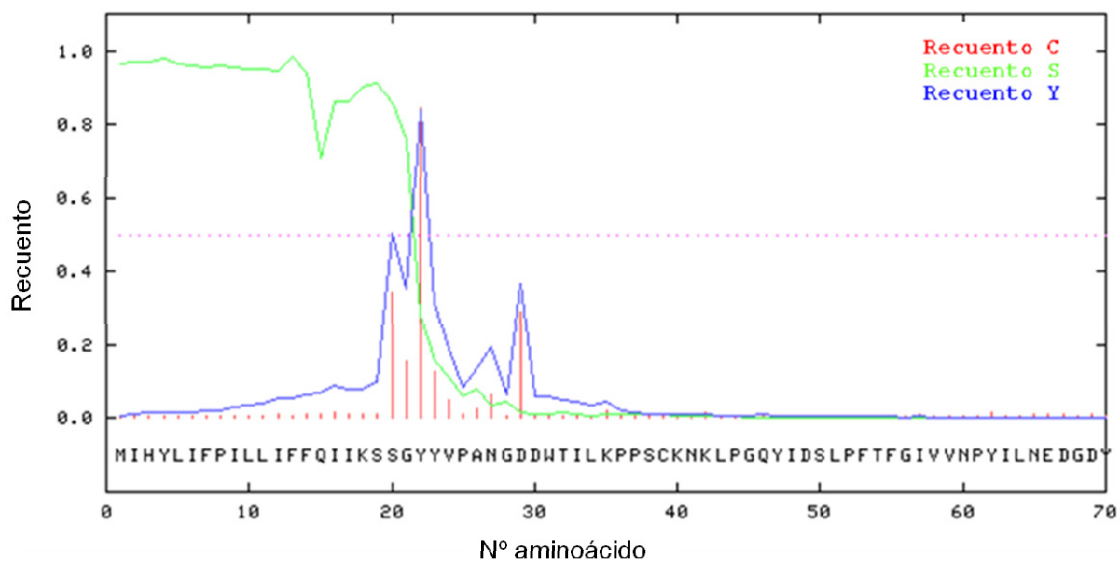


Figura III.4. Predicción *in silico* del péptido señal de la región N-terminal de la proteína Pir32.

### III. 2. 1. Hidrofobicidad de la proteína Pir32

El análisis hidrofóbico (Kyte y Doolittle, 1982) de la secuencia de aminoácidos muestra, que la señal hidrofóbica del péptido señal correspondiente a los primeros 21 aminoácidos, es seguida por una región hidrofílica que representa la proteína madura. El extremo C-terminal encarna una zona neutra acabando con una región hidrófoba (Figura III.5).

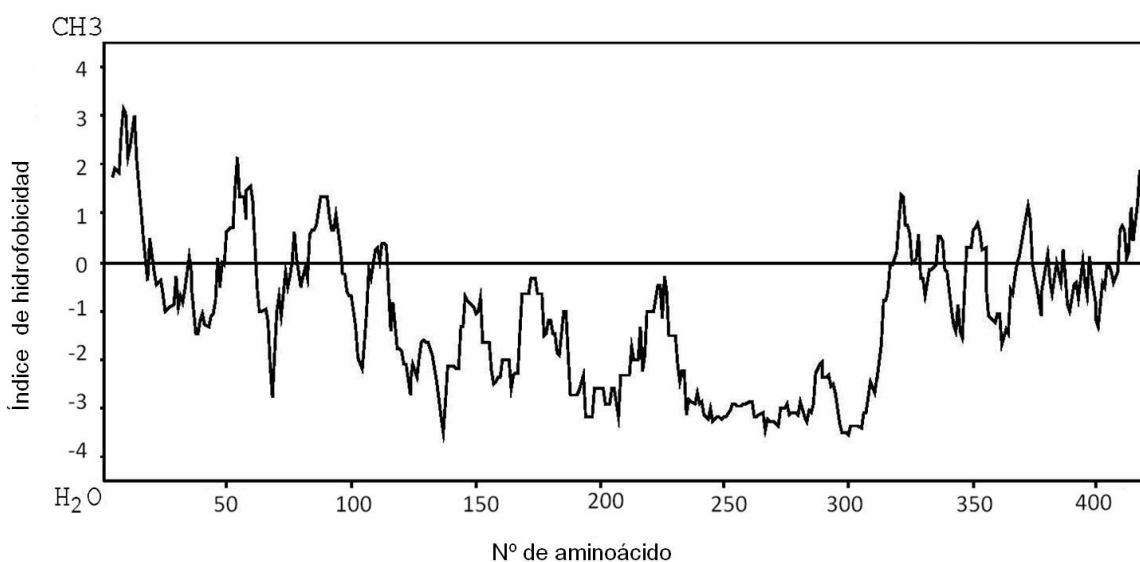


Figura III.5. Perfil hidrofóbico de la proteína Pir32. Los valores por encima de la línea horizontal indican las regiones hidrofóbicas y los valores por debajo de la línea representan las regiones hidrofílicas.

Si comparamos por una parte los datos obtenidos del perfil hidrofóbico con la composición de Ser y Thr de la proteína Pir32, observamos que la zona hidrófoba correspondiente a los primeros 110 aminoácidos, coincide con la mayor concentración de estos aminoácidos susceptibles de ser O-glicosilados en la proteína. (Figura III. 6A) Y por otro lado la zona con más residuos de Asp, Glu, Gln e His de la proteína Pir32 - entre los 100 y los 330 aminoácidos- corresponden con una alta hidrofilia en el perfil hidrofóbico (Figura III.6B).

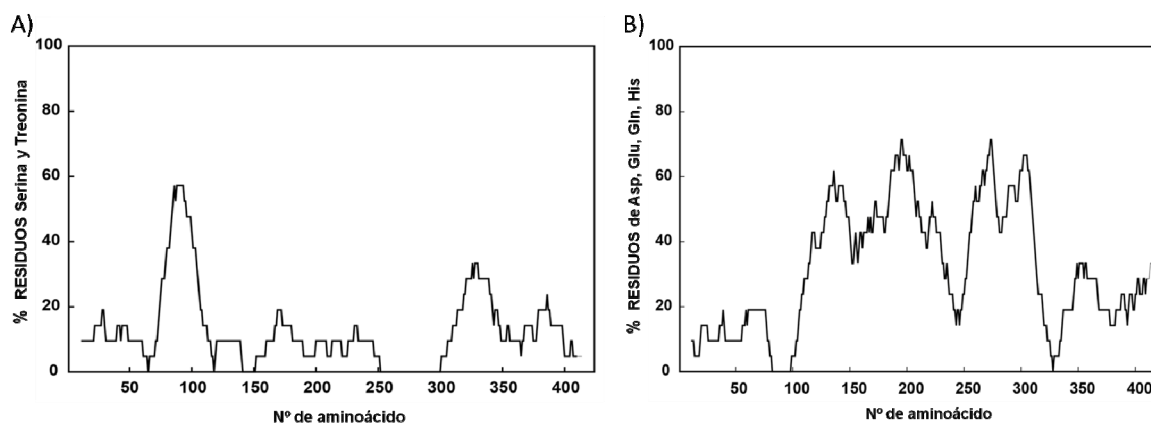


Figura III.6. A) Composición aminoácídica de Ser y Thr de la proteína Pir32. B) Composición aminoácídica de Asp, Glu, Gln e His de la proteína Pir32 (de Groot y Brandt, 2012).

### III. 2. 2. Homología de Pir32p con otras proteínas

La secuencia de aminoácidos deducida del gen *PIR32* se comparó con secuencias de proteínas en distintas bases de datos de diferentes organismos –no sólo *Candida*-, utilizando el programa BLAST y FASTA (Altschul *et al.*, 1997). El análisis reveló un grado de homología importante de Pir32p con la proteína Cd36 de *C. dubliniensis* (ref|XP\_002417367.1|) y la proteína Mya-3404 de *C. tropicalis* (ref|XP\_002549875.1|).

En la figura III.7 se muestra el alineamiento de la secuencia de Pir32p con estas dos proteínas homólogas, realizado mediante el programa CLUSTALW (Pitschi, 2010). Se puede observar que la parte más conservada al comparar las tres proteínas es la región carboxilo del extremo C-terminal. También coinciden en las tres secuencias proteicas las 4 cisteínas conservadas y las pseudorepeticiones con la secuencia conservada QIHDGQVQ, muy semejante a las repeticiones internas de las proteínas de

la familia Pir. Se puede determinar pues, que en estas dos especies existen secuencias ortólogas de Pir32.

```

Pir32      MIHYLIFPILLIFFQIIKSSGGYVPANGDDWTILKPPSCKNKLPQQYIDSLPFTFGIVVN 60
Cd36      MINYLIISILLIS-HIIKSSGGYVPANGDDWTILIPPSCNKNSPDQYFDLPLFAFGIVVN 59
Mya-3404  -MLQLIF-ILSIFNNIFPIDAYVVPANGEDWTILKP-DCQ-KLQG-SFESLPTFGIVVN 55
          : **: * * * :*: ..*****:***** * .*: * . :*:*****

Pir32      PYILNEDGDYEKPIVSKIKPSLTTTTFVTSIITTSTATAPGSKPTKTKDIIVQIHDGQVQ 120
Cd36      PYILNEDGDYEKPIVSKIKPSLTTTTFVTSIITTSTATAPNSKPTKTKDIIVQIHDGQVQ 119
Mya-3404  PYVINDEGDYEKPVVSKIERTITTS-FVTSVVT----AAP--KPTKTRDIIVQIHDGQVQ 108
          **:;*:*:***:*:***: :*: * * * :* * * * * :** * * * * :*****

Pir32      KMKHKHDYSSGGGDDDDDDDED-----CFDEKNIDMAAKRDYQDMN-TQE 164
Cd36      KMKPKHDYSS-----EDEED-----CFDKKNINIAAKRDYQDMNPQQQ 157
Mya-3404  KVASGYDWKNEEKHKDWDHHDHDDHDDHDDHDDHDDHDDHDDHDDHDDHDDHDDHDDH 168
          *: :*:. . :*:. . ..*..* . :*: * : :

Pir32      QANEDSGQ-VLAESDSHQQVVD--QNRQINEEEEEETQEQQMQEENNTNEIEDNNAQEF 221
Cd36      ETNDDSGQVVVAESDSQLPGLENDQNQLINEEAEAEVESTPQEQQK----EENNSQEF 212
Mya-3404  DKHHKDKQYDDDKDDYYKHKRSDVDDVLMPTTKRRKRNNQETGEQVEKLADDEAEGQGV 228
          : :... * :.* . : : : : . . : : : : * .

Pir32      ETIEEIIY-DDIDN-NESRPNNKSKYHKKRPHNN-YENKHHGKDYH-EDHHHNHRYKDHEN 277
Cd36      ETIEEIIYDDIDNDNESRPNNGKKYHKKRPHN--YENKHHGKDYHHEDHHHNHRYKDEHEH 270
Mya-34    ETVEEVY-EDIGKDHGYEKDQGYNQDLDFGKGRDYDREHDKDHDHDKHDDHDDYDDGDDK 287
          **:;*:*:***: : . : : . . . . . * : : * . * * . * : * : : . . : :

Pir32      GHEED-----DHKWNKPKMPPEQEEQEQEQEKPKHEKSEGYESEFVSPVYSVACYT 329
Cd36      DHEHDNEHDNNGGDHKWNKPKQTPKEKEESEQEQE-----ETEFISPVYSVACYT 322
Mya-3404  HHKNKDDHENKHHGKDYNEEHKRYKDDWKHEEPSRDYDYD----DDQFVSPVYVACYT 343
          * : . . . . : : * : : : : : * : . . : : * : * * * * *

Pir32      NSTLKMTLTDGILRDSDDRIGCIVSGHQFQFDGPTPQHGAIIYAAGWSVTKQGQLALGDST 389
Cd36      NSTLKMTLNDGILRDSDDRIGCIVSGHQFQFDGPTPQHGAIIYAAGWSVTKQGQLALGDST 382
Mya-3404  NATLRMTLNNGILRDSNRIGCIVSGHQFQFDGPTPQHGAIIYAAGWSVTKEGQLALGDST 403
          * : * : * * . : * * * * * : * * * * * : * * * * * : * * * * *

Pir32      KFYQCASGDFYNLYDEPIAFQCHPVTLDVVELIEC 424
Cd36      KFYQCASGDFYNLYDEPIAFQCHPVTLDVVELIEC 417
Mya-3404  KFYQCASGNFYNLYDEPIAFQCHPVTLDVVELIEC 438
          *****:*****
    
```

Figura III.7. Alineamiento de la secuencia de aminoácidos de las proteínas: Pir32 de *C. albicans*, Cd36 de *C. dubliniensis* y Mya-3404 de *C. tropicalis*.

En la tabla III.1 se presentan las homologías en % de las diferentes especies. Siendo la más destacada la homología entre *C. albicans* y *C. dubliniensis* que es del 78 %. La homología con *C. tropicalis* es del 45 %.

Espece a comparar	Nº de aminoácidos en su secuencia	Homología respecto a <i>C. albicans</i>
<i>Candida dubliniensis</i>	417	78%
<i>Candida tropicalis</i>	438	45%

Tabla III.1. Comparación entre las secuencias aminoacídicas de la proteína Pir32 de *C. albicans* con sus ortólogos de las especies de *C. dubliniensis* y *C. tropicalis*.

El hecho de que aún comparando en diferentes organismos, sólo en *Candida* hayan aparecido proteínas homólogas, nos plantea la hipótesis de si esta proteína pudiera ser específica del género *Candida*.

Como conclusión de estos resultados obtenidos *in silico* sobre la proteína Pir32, se podría decir que esta proteína cumple las características de la familia de las proteínas Pir, destacando que Pir32p mantiene el péptido señal, las 4 cisteínas conservadas propias de la familia Pir y posee un motivo que posee una elevada homología con las secuencias de repeticiones internas que aparecen en las proteínas Pir descritas. Estos resultados apuntaban a la pertenencia de Pir32 a la familia de proteínas Pir. Por ello se seleccionó este gen para estudios más detallados.

### III. 3. CONSTRUCCIÓN DEL CASETE DE INTERRUPCIÓN PARA EL GEN *PIR32*

En la interrupción de genes en levaduras ha sido ampliamente utilizada la técnica del “Ura-blaster”, originalmente usada para la disrupción génica en *Saccharomyces cerevisiae* (Alani *et al.*, 1987). Este método desarrollado para *C. albicans* por Fonzi e Irwin (1993) permite la delección secuencial de los dos alelos de un gen en *C. albicans*, utilizando como único marcador el gen *URA3*, que es recuperado después de cada transformación. Para la realización de esta técnica es necesario el empleo de una cepa de laboratorio, la CAI4, que presenta una auxotrofia (*ura3/ura3*) que le impide el crecimiento en medios pobres sin uridina. De esta manera es posible seleccionar fácilmente los transformantes en este medio. Sin embargo, esta cepa presenta otras mutaciones en otros dos genes, así como en niveles de numerosas proteínas, como consecuencia del proceso de disrupción del gen *URA3*, lo que la hace una cepa con un fondo genético alterado (Brand *et al.*, 2004).

Para el estudio de genes por interrupción de los mismos en el genoma, es importante poder trabajar con una cepa con un fondo genético no modificado en laboratorio, es decir, una cepa silvestre procedente de un aislado clínico como por ejemplo la cepa SC5314, ampliamente usada en laboratorio, y de la cual se ha hecho la secuenciación de su genoma. Por todo ello se ha tomado como cepa silvestre parental de referencia para la realización de este trabajo.

Reuss *et al.* (2004) han desarrollado una técnica basada en el uso de un gen de resistencia a antibióticos del tipo estreptotricina como gen marcador, el cual puede ser usado en esta cepa salvaje. El método consiste en el empleo del plásmido pSFS2, que alberga un casete que contiene el gen marcador dominante de resistencia a adaptado a *C. albicans* (*CaSAT1*) (Streptotricin Acetil Transferasa) bajo el promotor constitutivo del gen *ACT1*, para la selección de transformantes, y el gen *CaFLP* (gen que codifica para la flipasa F1p), también adaptado a *C. albicans*, que codifica una recombinasa bajo el promotor inducible del gen *MAL1*, que permitirá la subsiguiente escisión del casete mediante recombinación sitio-específica entre las dos FRTs (sitio de recombinación específico de la recombinasa FLP) (Figura III.8).

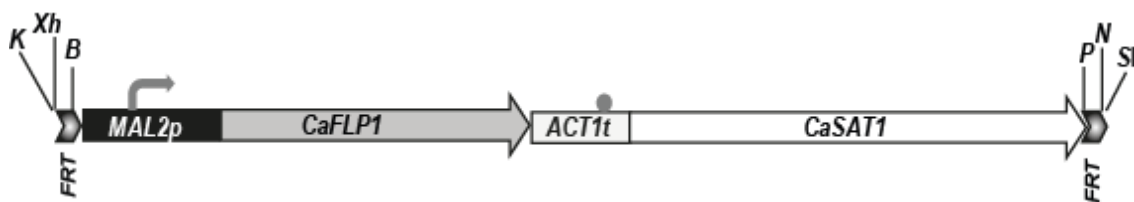


Figura III.8. Esquema del casete de interrupción del plásmido pSFS2.

Para la interrupción génica era necesaria la construcción de un plásmido en el que el casete pSFS2, estuviera flanqueado por secuencias del gen *PIR32*, correspondientes a las regiones nucleotídicas 5' y 3' del mismo (Figura III.9). Estas regiones nucleotídicas permiten la recombinación con sus homólogas en el genoma de *C. albicans*, quedando el gen *SAT1* integrado en el locus del gen *PIR32* e interrumpiendo de esta manera el gen selectivamente.

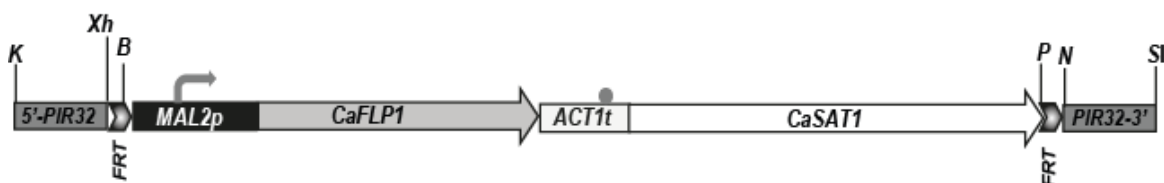


Figura III.9. Esquema del casete de interrupción del plásmido pSFS2, habiendo incorporado las secuencias homólogas para la recombinación selectiva e interrupción del gen *PIR32*.

La construcción del casete se hizo en dos pasos. Primero, mediante PCR, usando los oligonucleótidos PIR2-KpnI y PIR2-XhoI (ver tabla II.3 de Materiales y Métodos), se obtuvo el amplicón F1 de 745 pb que contenía los puntos de corte para *KpnI* y *XhoI*. El amplicón F1 y el plásmido pSFS2 se digirieron con estas enzimas de restricción y se subclonó el amplicón F1 en el plásmido pSFS2 (Figura III.10), que contiene el gen

*SAT1* (Reuss *et al.*, 2004). El plásmido resultante se denominó pT1 y contiene la región 5' del gen *PIR32*.

En el segundo paso se elaboró el amplicón F2 de 628 pb mediante el empleo de los oligonucleótidos PIR2-NotI y PIR2-SacI (ver tabla III.3 de Materiales y Métodos). El amplicón F2 y el plásmido pT1, se digirieron con *NotI* y *SacI* y se ligaron generándose el plásmido pT2 conteniendo el casete empleado para la interrupción del gen *PIR32* (Figura III.10).

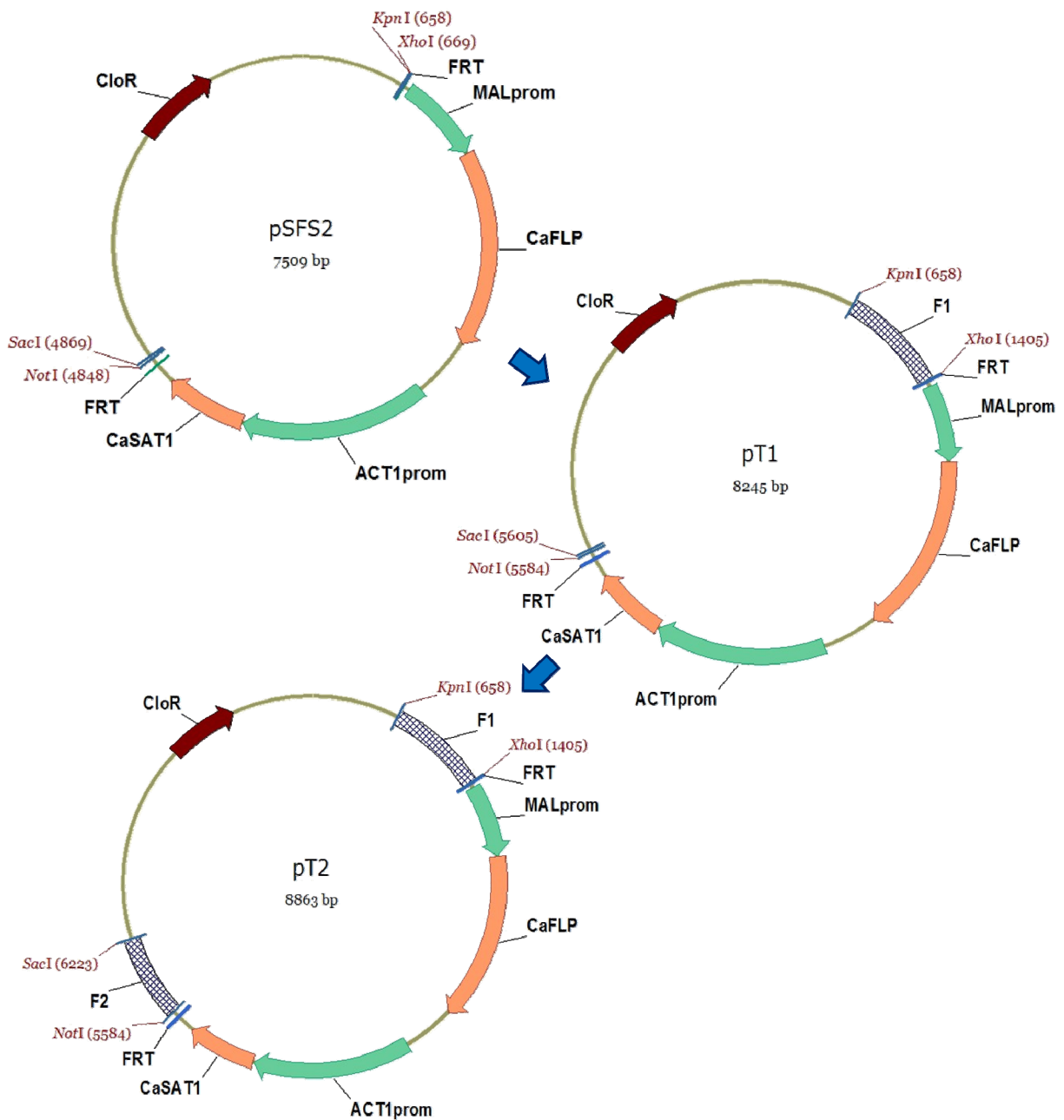


Figura III.10. Esquema de la construcción del plásmido pT2 conteniendo el casete de interrupción para el gen *PIR32*.

### III. 4. INTERRUPCIÓN DEL GEN *CaPIR32*

Una vez obtenido el casete de interrupción, se procedió a la transformación de la cepa SC5314 de *C. albicans*, mediante el método de Reuss *et al.* (2004), explicado en el apartado II.4.2 de Materiales y Métodos, para la interrupción del gen *PIR32*. Se emplearon de 3 a 5  $\mu\text{g}$  de ADN plásmídico del vector pT2, digerido durante toda la noche con *KpnI* y *SacI*, enzimas que liberan el casete (Figura III.10). De esta forma se permite la integración por recombinación homóloga del casete que contiene el gen *SAT1* en el locus correspondiente del gen *PIR32* (Figura III.11).

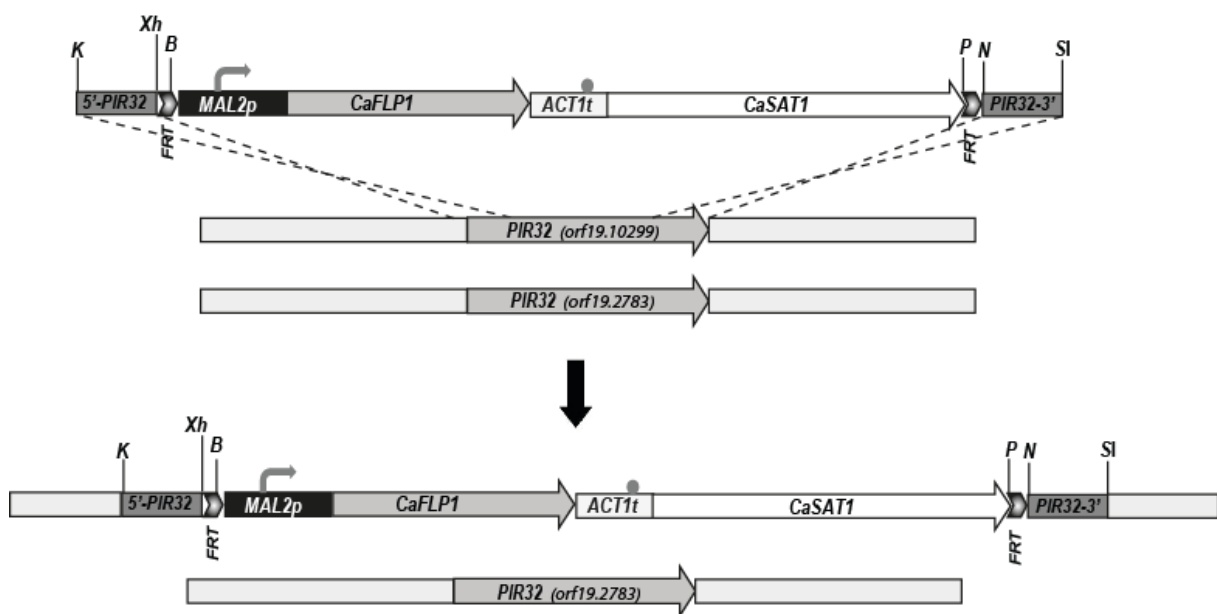
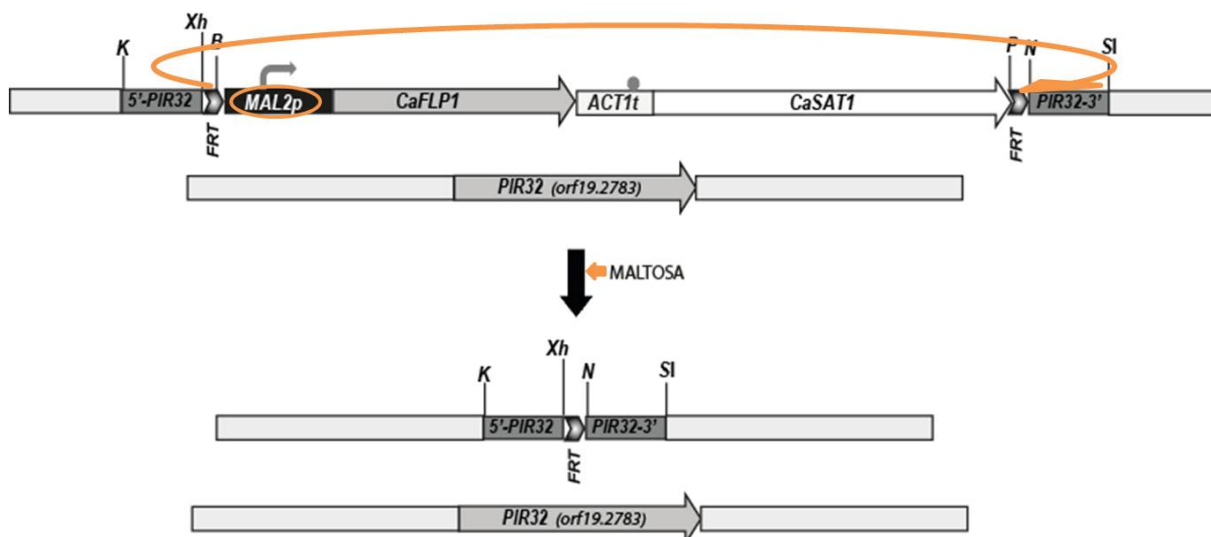


Figura III.11. Esquema de inserción del casete de interrupción mediante recombinación homóloga en uno de los dos alelos del gen *PIR32*. Denominado *PIR32H<sup>R</sup>*.

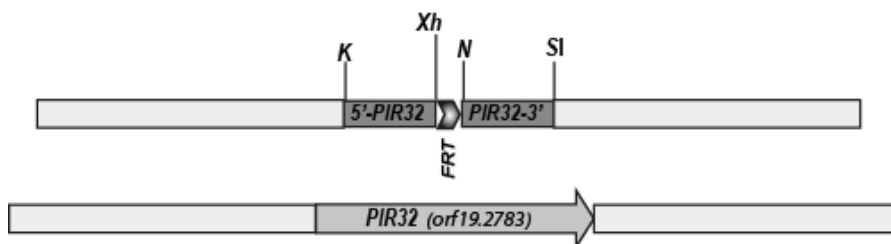
La selección de los transformantes se realizó en placas de YPD conteniendo 200  $\mu\text{g}/\text{ml}$  de nurseotricina (Figura III.14). Las cepas identificadas por PCR como mutantes en uno de los dos alelos de *PIR32* se nombraron *PIR32H<sup>R</sup>*.

Tras esta transformación, las cepas identificadas como *PIR32H<sup>R</sup>* se sembraron en medio YPM para promover la expresión del gen *CaFLP*, que se encuentra en el casete de interrupción ahora integrado en el *locus* del gen *PIR32*. De esta manera, mediante la acción de las flipasas se procede a la eliminación del casete mediante recombinación sitio-específica entre las dos FRTs, perdiendo así la resistencia a nurseotricina (Figura III.12).



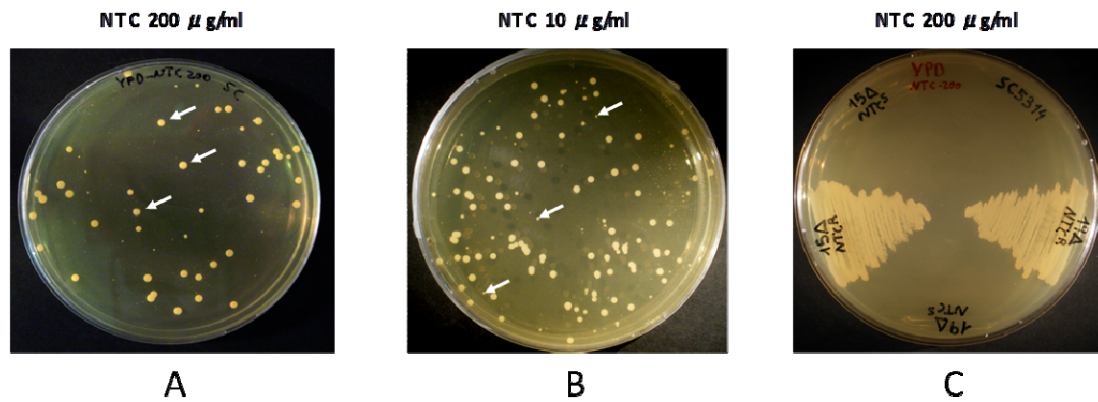
**Figura III.12.** Esquema de la eliminación del casete y la consiguiente disrupción en un alelo en el gen *PIR32*, mediante la acción de la Flipasa que produce la recombinación sitio específica entre las dos FRTs.

Seguidamente se procedió a la selección de aquellas células que habían perdido la resistencia a este antibiótico mediante la siembra en YPD sólido conteniendo distintas concentraciones de nurseotricina (entre 5 y 25  $\mu\text{g/ml}$ ). Aprovechando que las cepas sensibles a nurseotricina crecen más lentamente que las resistentes al antibiótico en medios con baja concentración de la droga, se seleccionaron aquellas colonias que fueron más pequeñas (Figura III.14), que eran los transformantes sensibles nombrados *PIR32H<sup>S</sup>* (Figura III.13). De esta forma se consiguió la interrupción de un alelo.



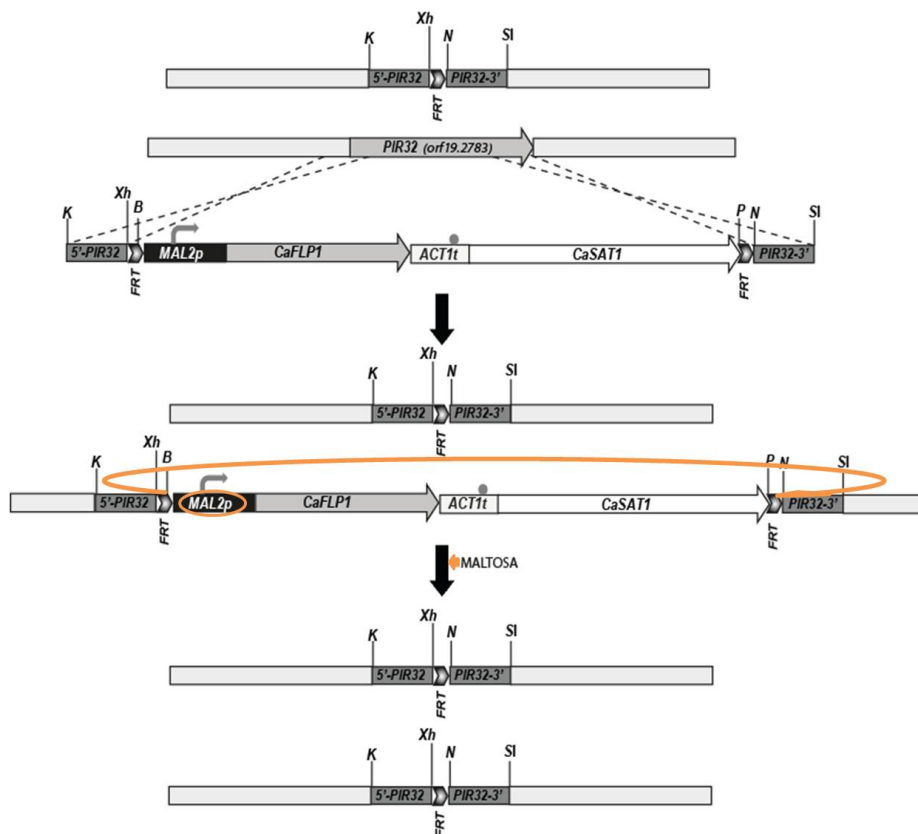
**Figura III.13.** Esquema del gen *PIR32* con un alelo disrupcionado. Denominado *PIR32H<sup>S</sup>*.





**Figura III.14. Placas resultantes de la transformación.** A) transformantes con el gen *SAT1* integrado en el locus *PIR32*. B) transformantes sensibles a nurseotricina al haber perdido la resistencia a dicho antibiótico. C) comparativa entre las cepas resistentes y las sensibles.

A partir de la cepa heterocigótica *PIR32H<sup>S</sup>* se repite el mismo proceso de transformación empleando el casete de disrupción descrito, y así se consigue interrumpir el segundo alelo para obtener la cepa mutante homocigótica correspondiente del gen *PIR32* (Figura III.15). También se analizaron los transformantes mediante PCR. La cepa identificada como mutante nulo con el casete integrado se nombró como *PIR32<sup>ØR</sup>* y tras el cultivo en medio YPM se aisló la cepa sensible a nurseotricina *PIR32<sup>ØS</sup>*.



**Figura III.15. Esquema de disrupción del gen *PIR32*, segundo paso de transformación.**

## III. 5. COMPROBACIÓN DE LOS MUTANTES

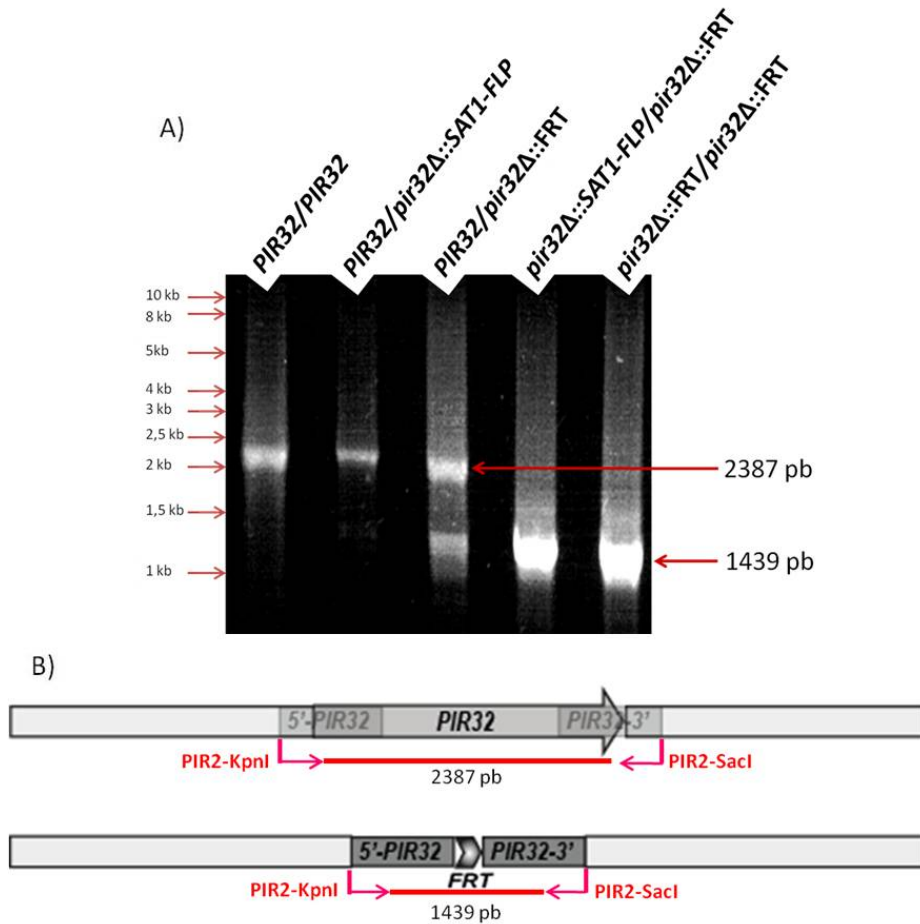
### III. 5. 1. Selección de las colonias susceptibles de transformación mediante PCR

Todas las colonias obtenidas del proceso de transformación fueron analizadas inicialmente mediante PCR de ADN genómico utilizándose diferentes oligonucleótidos (ver tabla II.3 de Materiales y Métodos):

- Por un lado los oligonucleótidos PIR2-KpnI y PIR2-SacI para una primera selección de colonias presuntamente transformadas. Las bandas generadas por estos alelos son: una banda de 2.387 pb correspondiente al alelo silvestre y una banda de 1.439 pb para el alelo en el que se ha eliminado el casete. (Figura III.16).

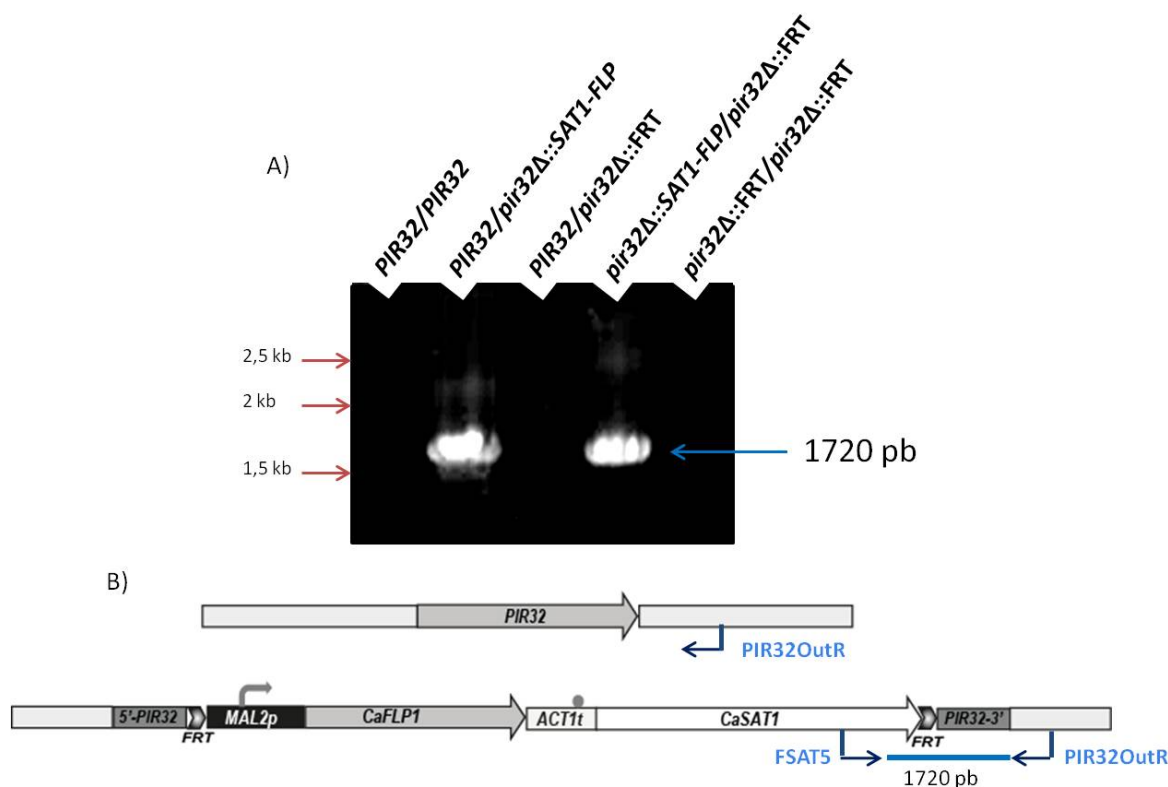
- Por otro lado, para comprobar la correcta integración del casete se emplearon como cebadores: un oligonucleótido de dentro del casete, el FSAT5, y otro PIR32OutR flanqueante al sitio correcto de integración que se encuentra en el genoma, obteniendo una banda de 1.720 pb. Si no se encuentra integrado en el *locus* correspondiente, no habrá amplificación (Figura III.17)

Como se puede apreciar en la figura III.16, el tamaño obtenido para la cepa silvestre SC5314 fue de 2.387 pb, que se usó como control positivo (Figura III.16A, calle 1). En la siguiente calle aparece de nuevo la banda de 2.387 pb correspondiente al alelo silvestre para la cepa PIR32H<sup>R</sup> (Figura III.16A, calle 2). A continuación, para el mutante heterocigótico *pir32Δ/PIR32* (cepa PIR32H<sup>S</sup>) se observan amplicones de 1.439 pb correspondientes al alelo interrumpido que ha perdido el casete con el gen *SAT1*, y de 2.387 pb correspondiente al alelo sin interrumpir (Figura III.16A, calle 3). En la calle 4 aparece de nuevo la banda de 1.439 pb correspondiente al alelo interrumpido para la cepa PIR32Ø<sup>R</sup> (Figura III.16A, calle 4). Finalmente para el mutante homocigótico *pir32Δ/pir32Δ* (PIR32Ø<sup>S</sup>) se observa un amplicón de 1.439 pb correspondiente al los dos alelos de gen *PIR32* interrumpidos que han perdido el gen *SAT1* de resistencia al antibiótico (Figura III.16A, calle 5).



**Figura III.16. Análisis de transformantes por PCR.** A) visualizados mediante electroforesis en gel de agarosa utilizando los oligonucleótidos PIR2-KpnI y PIR2-SacI. B) Esquema de la disposición de los oligonucleótidos PIR2-KpnI y PIR2-SacI en el genoma de *C. albicans*.

En la figura III. 17 se puede observar que no aparecen bandas para las cepas: SC5314 (cepa sin interrumpir); PIR32<sup>S</sup> (mutante heterocigótico sensible a NTC) y tampoco en PIR32<sup>S</sup> (mutante homocigótico sensible a NTC). Solamente aparecen amplicones en los mutantes PIR32H<sup>R</sup> y PIR32<sup>R</sup>, que son las cepas que contienen el casete de resistencia a la nurseotricina en su genoma, por ello al utilizar los oligonucleótidos FSAT5 y PIR32OutR, aparecen bandas de 1.720 pb, correspondientes a la amplificación desde el interior del casete hasta un sitio flaqueante al sitio correcto de integración, lo que comprueba que la inserción del casete ha sido realizada eficazmente y en el *locus* correspondiente.



**Figura III.17. Análisis de transformantes por PCR.** A) visualizados mediante electroforesis en gel de agarosa utilizando los oligonucleótidos FSAT5 y PIR32OutR. B) Esquema de la disposición de los oligonucleótidos FSAT5 y PIR32OutR en el genoma de *C. albicans*.

Tras esta primera comprobación, las colonias susceptibles de haber sido transformadas, y por tanto, disruptonadas en los dos alelos del gen *PIR32*, fueron seleccionadas para la comprobación concluyente mediante análisis Southern-blot.

### III. 5. 2 Comprobación de los mutantes mediante Southern-blot utilizando la enzima de restricción *AflIII* (polimorfismo genético)

Las distintas etapas de la interrupción del gen *PIR32* fueron comprobadas mediante Southern-blot. Para ello se tuvo en cuenta que, en el análisis *in silico* del gen *PIR32* de *C. albicans*, se detectó que este gen presenta un polimorfismo genético para la enzima de restricción *AflIII* fuera de la zona codificante.

El polimorfismo genético consiste en que dos alelos del mismo gen difieren por la presencia de un sitio de restricción variable en cada uno de los alelos, resultando en diferentes patrones de restricción (Forsche *et al.*, 2004). La hibridación con la sonda permite discernir ambos alelos polimórficos y por eso aparecen diferentes bandas según

el alelo que se observe. En el caso del gen *PIR32*, sus alelos son denominados *orf19.10299* y *orf19.2783*, apareciendo en este último un sitio de restricción adicional para *AflII*, como se observa en la figura III.18A.

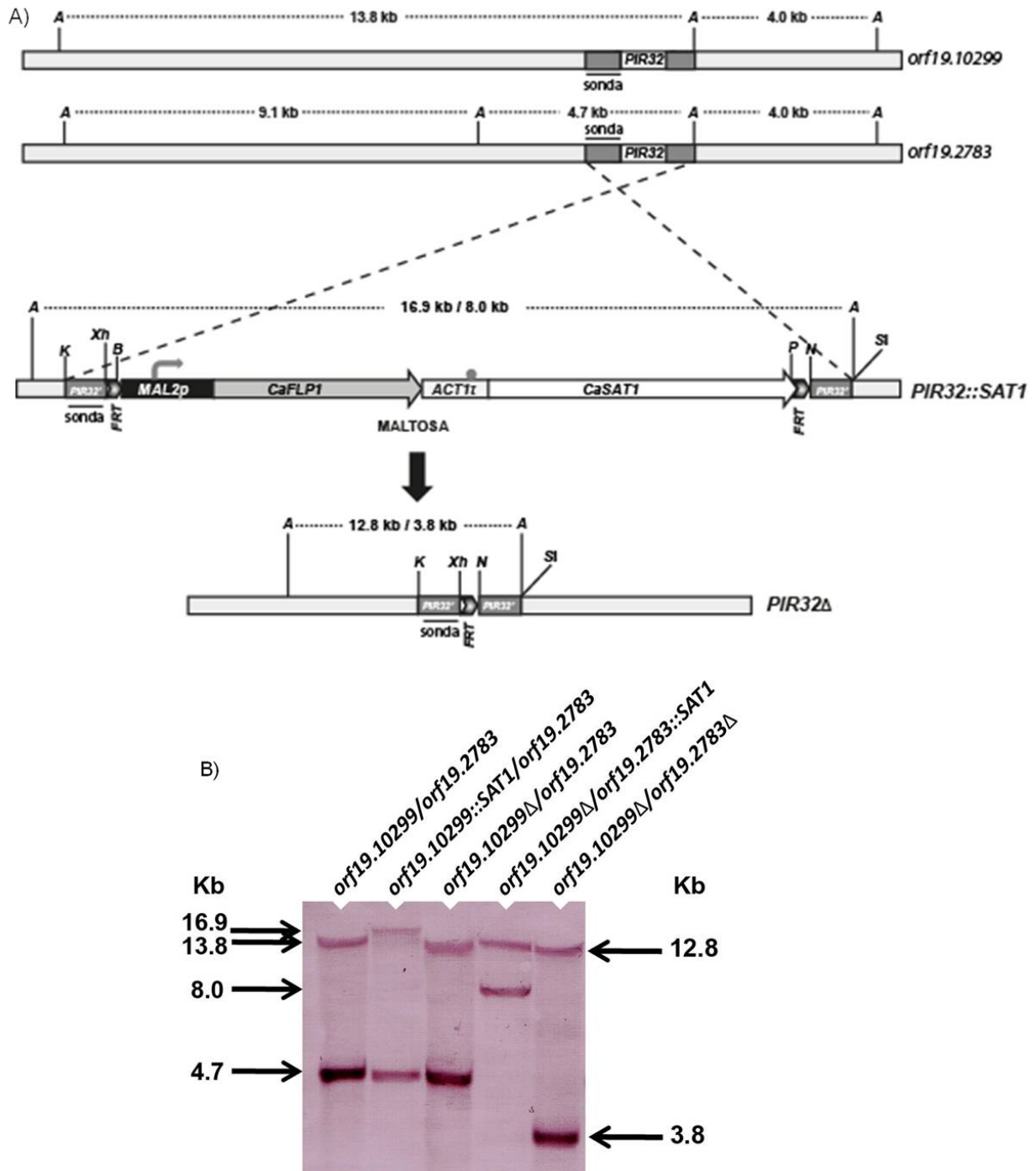


Figura III. 18. Verificación del mutante nulo *pir32 $\Delta$ /pir32 $\Delta$*  en fondo genético SC5314, empleando la enzima de restricción *AflII*. A) Representación esquemática del proceso. B) Análisis Southern del ADN genómico.

Como se puede apreciar en la imagen (Figura III.18B), en la primera calle aparecen las bandas correspondientes a ambos alelos salvajes de la cepa SC5314, que se usó como control para vincularse con los alelos silvestres, donde la *orf19.10299* muestra una banda de 13,8 Kb y la *orf19.2783* una banda de 4,7 Kb. En la segunda calle (PIR32H<sup>R</sup>) aparece de nuevo la banda de 4,7 Kb correspondiente al alelo silvestre *orf19.2783* para la cepa PIR32H<sup>R</sup> y para el alelo complementario *orf19.10299::SAT1* se muestra una señal de 16,9 Kb, puesto que está integrado el casete en este alelo. A continuación, en la tercera calle, para el mutante heterocigótico sensible (PIR32H<sup>S</sup>) se observan una banda de 12,8 Kb correspondientes al alelo interrumpido que ha perdido el casete (*orf19.10299Δ*), y nuevamente otra de 4,7 Kb, correspondiente al alelo sin interrumpir. En la cuarta calle se mantiene la banda del alelo interrumpido de 12,8 Kb, y para el alelo complementario aparece la señal en los 8 Kb, puesto que este segundo alelo contiene el casete *orf19.2783::SAT1* (PIR32Ø<sup>R</sup>). Finalmente, en la quinta calle, aparecen dos bandas para el mutante homocigótico, PIR32Ø<sup>S</sup>, una como ya hemos dicho de 12,8 Kb del *orf19.10299Δ*, y otra de 3,8 Kb que corresponde a la interrupción del segundo alelo, *orf19.2783Δ*.

El hecho de haber podido obtener el mutante para el gen *PIR32*, demuestra la no esencialidad de ese gen.

### III. 6. ANÁLISIS FENOTÍPICO DE LAS CEPAS MUTANTES DEL GEN *PIR32*

Tras la obtención de los mutantes *pir32Δ/PIR32* (PIR32H<sup>S</sup>) y *pir32Δ/pir32Δ* (PIR32Ø<sup>S</sup>) se procedió a su análisis fenotípico para intentar determinar el papel de la proteína Pir32 en la biología de *C. albicans*.

#### III. 6. 1. Estudio del crecimiento celular

Para estudiar si la falta de la proteína Pir32 afectaba a la velocidad de crecimiento se realizaron curvas de crecimiento en medio YPD líquido a 28 °C de las cepas parental (SC5314), mutante heterocigótico (PIR32H<sup>S</sup>) y mutante homocigótico (PIR32Ø<sup>S</sup>).

Partiendo de una  $D.O_{600}$  inicial de 0,5 se fueron tomando muestras del cultivo en agitación cada hora para medir la variación de densidad óptica a 600 nm.

Se observó que la tasa de crecimiento era similar en todas las condiciones y no se encontraron diferencias morfológicas entre las distintas cepas en las condiciones de cultivo empleadas (Figura III.19).

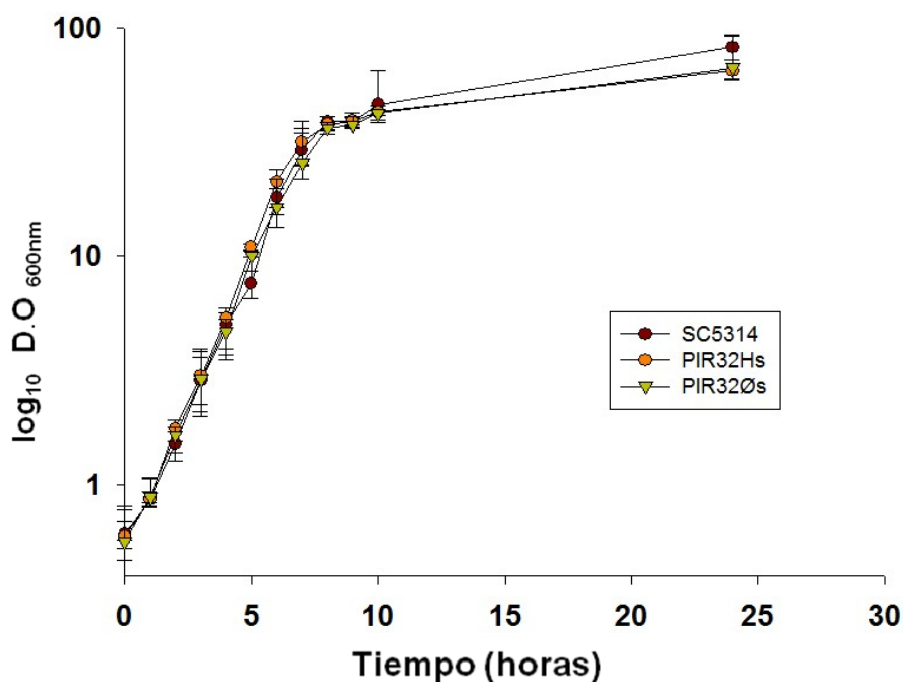


Figura III.19. Curva de crecimiento de la cepa parental y las cepas mutante heterocigótico (PIR32H<sup>S</sup>) y mutante homocigótico (PIR32Ø<sup>S</sup>).

### III. 6. 2. Análisis de la sensibilidad a la 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 aparece en estudios iniciales en *S. cerevisiae* (De Nobel *et al.*, 1990; Ram *et al.*, 1994; Van der Vaart *et al.*, 1995). La observación de una mayor o menor sensibilidad de las células a la degradación enzimática del  $\beta$ -1,3-glucano puede reflejar alteraciones en la estructura de la pared derivadas de la ausencia o de la sobreexpresión de la proteína estudiada o de otros componentes.

El ensayo fue realizado siguiendo el protocolo descrito por Van Der Vaart *et al.* (1995) modificado para *C. albicans* (Garcerá *et al.*, 2003). El estudio se realizó

utilizando cultivos de las cepas parental y mutantes heterocigótico y homocigótico en fase exponencial de crecimiento. Las células fueron recogidas y se ajustaron a una  $DO_{600nm}$  aproximada de 1 en tampón Tris-HCl 10mM pH7.5 conteniendo zimoliasa 20T a una concentración de 100  $\mu\text{g/ml}$ . Las variaciones de  $DO_{600nm}$  fueron monitorizadas durante 70 min en un espectrofotómetro Graphicord (Shimadzu<sup>®</sup>).

Se observó un ligero avance en la lisis de ambas cepas mutantes, un poco más pronunciado en el caso de la cepa PIR32<sup>Ø</sup><sub>S</sub>, lo cual significaría que el mutante nulo es un poco más sensible a la zimoliasa. Este dato se podría interpretar como una pequeña modificación en la arquitectura y/o composición de la pared, pero no supone una diferencia significativa (Figura III.20).

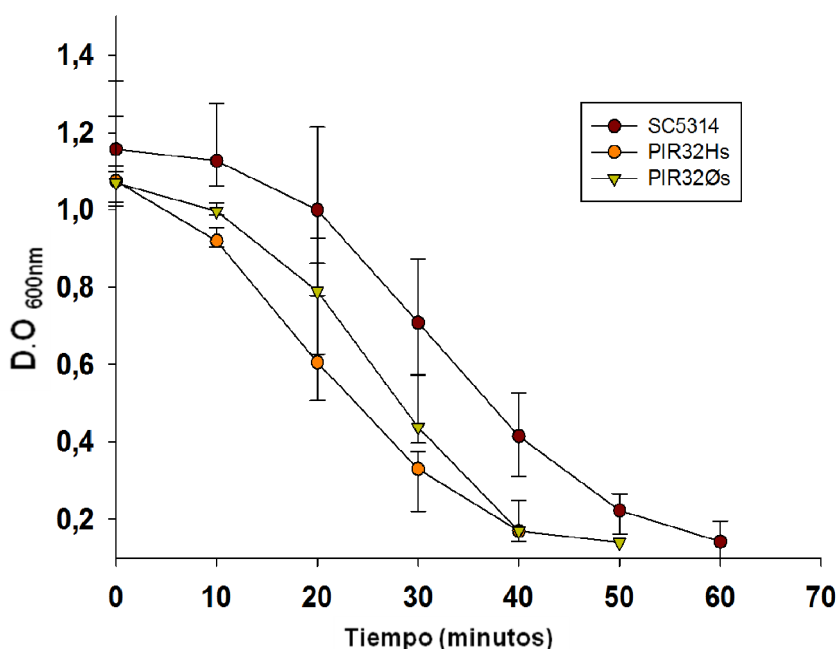


Figura III.20. Curva de sensibilidad a la zimoliasa.

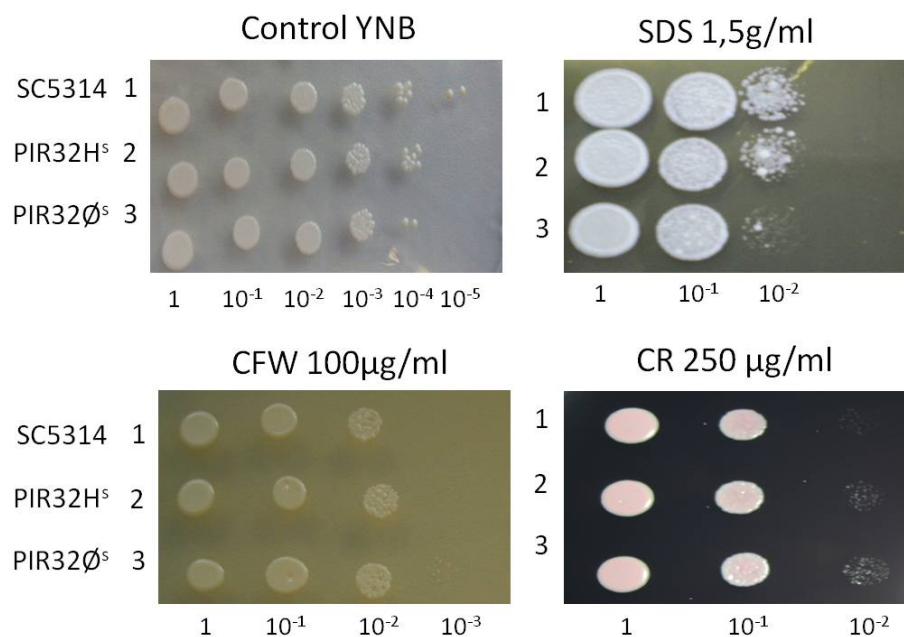
### III. 6. 3. Estudio de la sensibilidad a rojo Congo, al blanco de calcoflúor y al SDS

Para determinar el efecto producido por la interrupción del gen *PIR32* en la síntesis y ensamblaje de los componentes de la pared celular se realizaron pruebas de sensibilidad a sustancias que alteran el correcto ensamblaje de los mismos. Se estudió la sensibilidad a:



- Blanco de calcoflúor o calcofluor white (CFW): molécula bipolar que distorsiona el ensamblaje de los diferentes componentes de la pared celular por unión a la quitina (Ram *et al.*, 1994).
- 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).
- Dodecil sulfato sódico (SDS): detergente que afecta la estabilidad de la membrana plasmática y por tanto también a la construcción de la pared celular.

No se observaron diferencias significativas entre las cepas mutantes hetero- y homocigótica de *PIR32* comparadas con la cepa parental, en cuanto al comportamiento en los diferentes medios y concentraciones (Figura III.21). Tal vez apuntar que frente al detergente SDS hay ligeras diferencias en el crecimiento de los mutantes del gen *PIR32*, que como se ha indicado anteriormente, afecta la estabilidad de la membrana plasmática, y por lo tanto la construcción de la pared celular está ligeramente alterada.



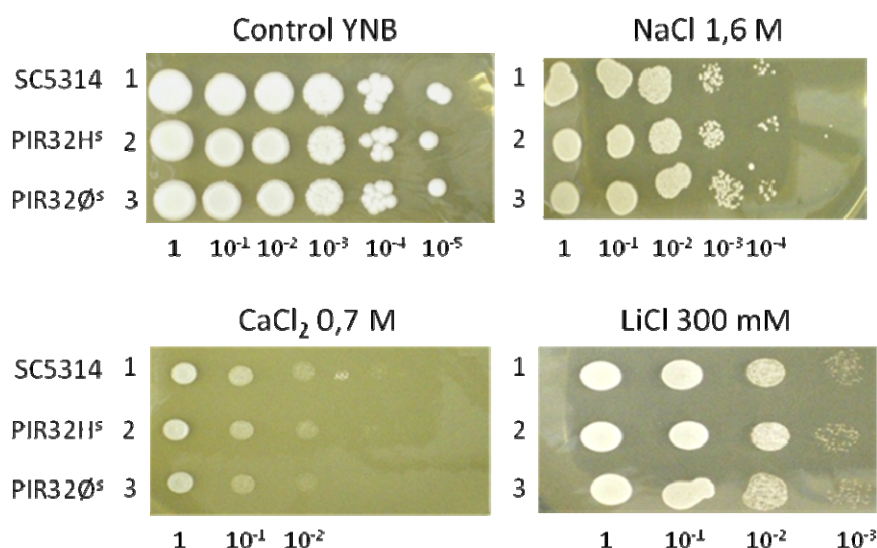
**Figura III.21.** Sensibilidad al CFW, al RC y al SDS en placas de YNB de las cepas: 1) SC5214, 2) PIR32H<sup>s</sup> y 3) PIR32∅<sup>s</sup>.

### III. 6. 4. Estudio de la sensibilidad al estrés

Para determinar el papel de Pir32p en la integridad celular, se realizó un estudio de sensibilidad de los mutantes *pir32Δ/pir32Δ* a estrés provocado por choques osmótico, térmico u oxidativos (ver Materiales y Métodos II.22.4).

#### III. 6. 4. 1. Estudio de la sensibilidad al estrés osmótico mediante medio hipertónico

Tampoco se observaron diferencias en el choque osmótico (Figura III.22). El comportamiento de las distintas cepas no varió en medios hipertónicos mediante adición de NaCl (YPD: 0-2 M; YNB: 0-2,5 M), CaCl<sub>2</sub> (YPD: 0-0,7 M) y LiCl (YPD: 0-300 mM; YNB: 350-500 mM).



**Figura III.22.** Sensibilidad al choque osmótico a distintas concentraciones de sales: NaCl (1,6 M), LiCl (300mM) y CaCl<sub>2</sub> (0,7 M), de las cepas: 1) SC5214, 2) PIR32H<sup>S</sup> y 3) PIR32Ø<sup>S</sup>.

#### III. 6. 4. 2. Estudio de la sensibilidad al estrés térmico

No se observaron diferencias significativas en la sensibilidad al choque térmico (incubación a 65°C durante períodos de 0, 15, 30 y 60 min en placas de YNB por duplicado, y posterior incubación a 28 y 37°C) de las cepas SC5314, PIR32H<sup>S</sup> y PIR32Ø<sup>S</sup> de *C. albicans* (Figura III.23)

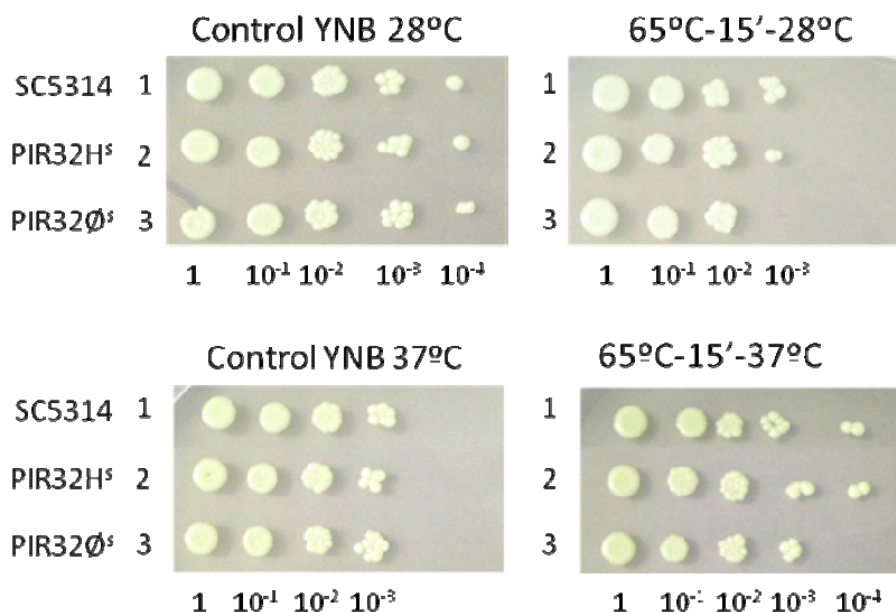


Figura III.23. Sensibilidad a la T<sup>a</sup>: 55°C durante 10, 15 y 30 min de las cepas: 1) SC5214, 2) PIR32H<sup>S</sup> y 3) PIR32Ø<sup>S</sup>.

### III. 6. 4. 3. Estudio de la sensibilidad al estrés oxidativo

Para analizar el efecto de un agente oxidante se estudió el efecto del peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) sobre las distintas cepas, mediante el análisis de la viabilidad celular 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 a 25 mM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 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 (Figura III.24).

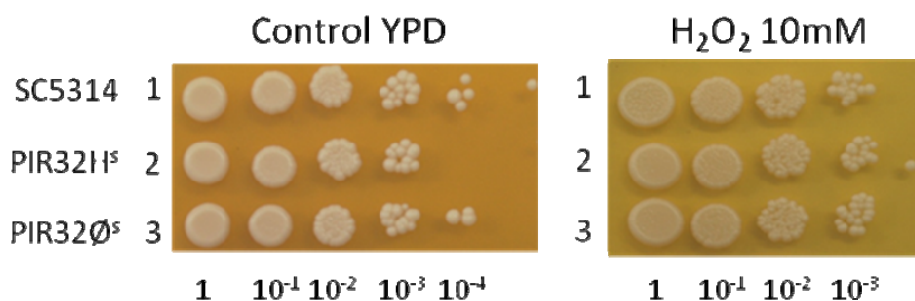


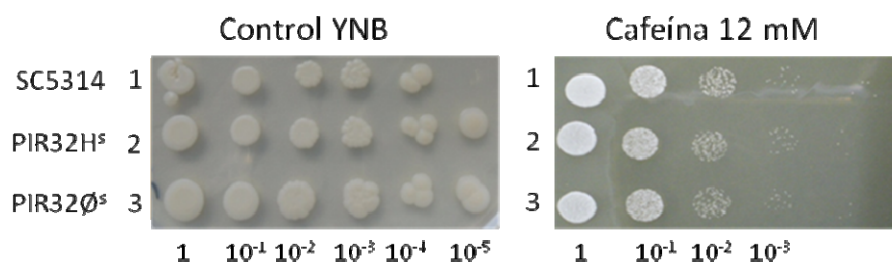
Figura III.24. Sensibilidad al H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en concentración 10mM de las cepas: 1) SC5214, 2) PIR32H<sup>S</sup> y 3) PIR32Ø<sup>S</sup>.

### III. 6. 5. Estudio del efecto de las drogas

#### III. 6. 5. 1. Estudio de sensibilidad a cafeína

Se estudió el efecto de la cafeína sobre las distintas cepas. El efecto de este compuesto es interesante ya que es un inhibidor de la fosfodiesterasa dependiente de AMPcíclico, que aumenta los niveles intracelulares de AMPc y activa proteínas quinasas dependientes de éste.

En este experimento no se observaron diferencias significativas en la sensibilidad a cafeína de los mutantes hetero- y homocigótico respecto de la cepa parental (Figura III.25).



**Figura III.25. Sensibilidad a la cafeína.** Las cepas son: SC5314 (1), PIR32H<sup>S</sup> (2), PIR32Ø<sup>S</sup> (3).

#### III. 6. 5. 2. Antifúngicos

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

- Anfotericina B: es un macrólido poliénico que actúa formando poros hidrofílicos en la membrana plasmática.
- Caspofungina: es una equinocandina cuyo mecanismo de acción consiste en la inhibición de la 1,3-β-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.
- Cicloheximida: antibiótico inhibidor de la síntesis de proteínas.

- Higromicina B: antibiótico que inhibe la síntesis de proteínas.
- Ketoconazol: antifúngico de la familia de los azoles que actúa sobre el citocromo P-450 en la ruta de síntesis de ergosterol, alterando así la permeabilidad de la membrana plasmática.
- Tunicamicina: inhibidor de la N-glicosilación.

No se observaron diferencias de sensibilidad significativas de los distintos mutantes a la acción de la anfotericina B, caspofungina, cicloheximida, higromicina B, ketoconazol y tunicamicina con respecto a la cepa parental (Figura III.26).

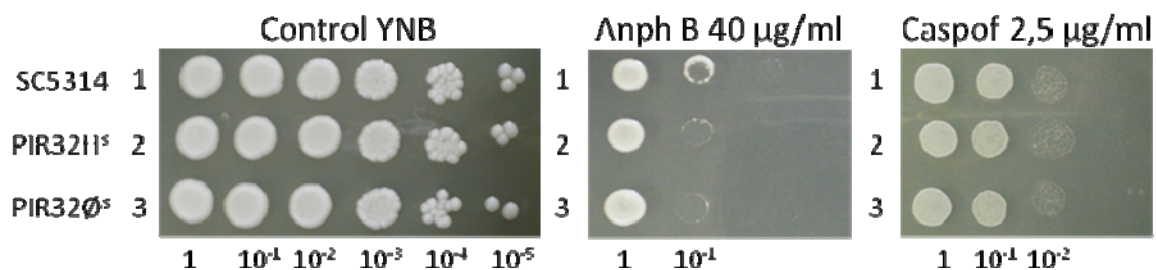


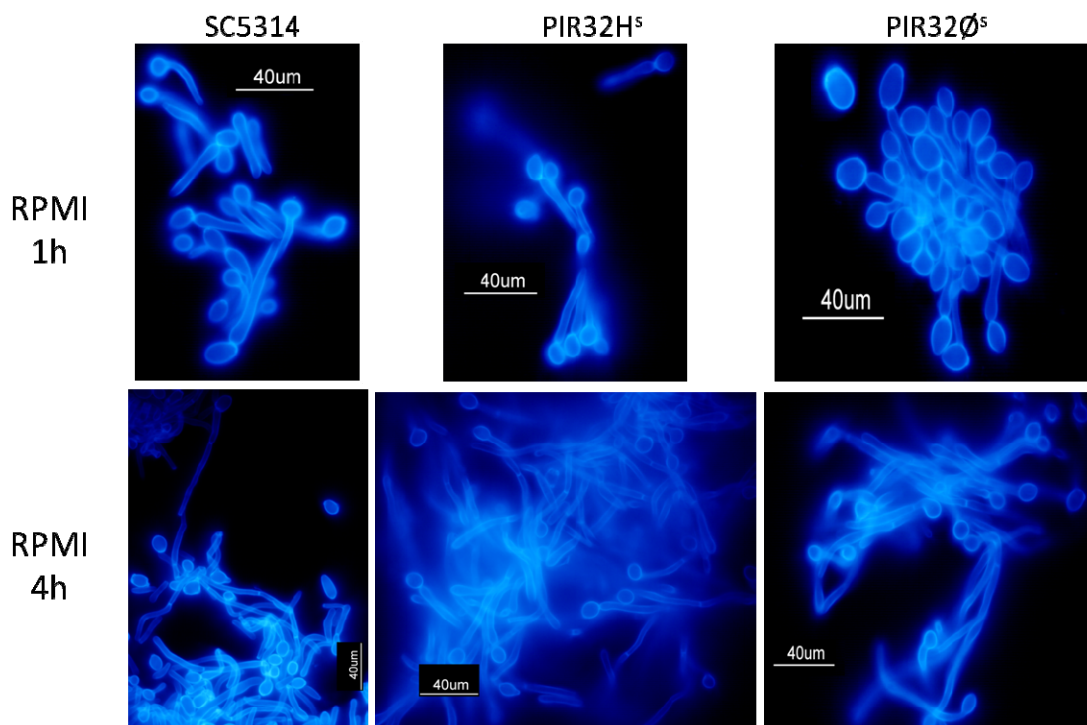
Figura III.26. Sensibilidad a la Anfotericina B (40 µg/ml) y a la Caspofungina (2,5 µg/ml). Las cepas son: SC5314 (1), PIR32H<sup>S</sup> (2), PIR32Ø<sup>S</sup> (3).

### III. 6. 6. Estudios de inducción de cambio dimórfico

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. Debido a que el gen *PIR32* codifica una proteína de la pared celular, se consideró conveniente estudiar si la mutación de uno o los dos alelos de este gen podía afectar el cambio dimórfico. En este estudio se evaluó la capacidad y velocidad de formación de tubo germinativo en un medio líquido que favorece la filamentación, como es el medio RPMI-1640.

En las condiciones de cultivo empleadas se evidenció una disminuida capacidad de filamentación por parte de los mutantes respecto a la parental, lo cual sería indicativo

de una menor capacidad de virulencia (Figura III.27). Aunque conforme transcurre el tiempo se va recuperando la capacidad de emisión de hifas, como se puede ver en la figura, y tras 4h no se puede diferenciar entre la longitud de los micelios de las cepas mutantes y la parental. Resulta asimismo destacable la gran capacidad de floculación del mutante PIR32 $\emptyset^S$  tras 1h observada en la figura, comparado con las demás cepas.

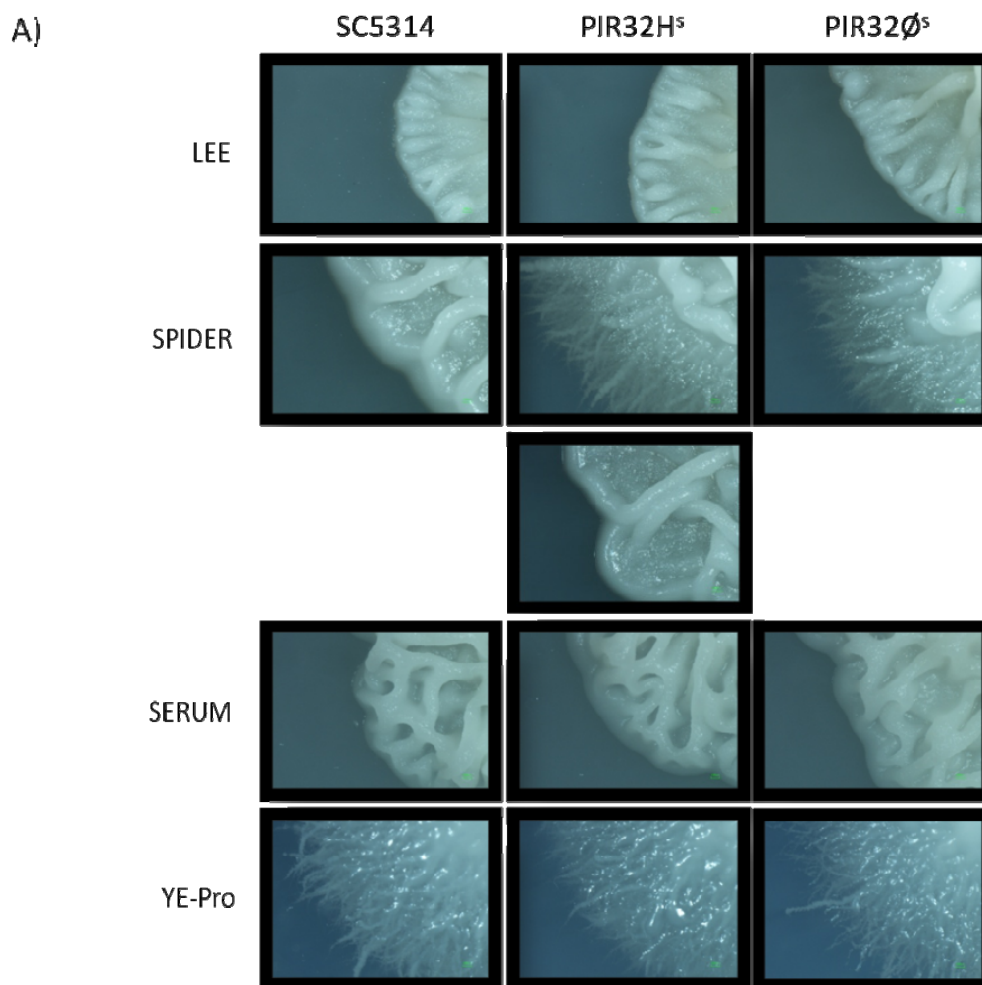


**Figura III.27.** Ensayo de miceliación en medio líquido de las colonias de las cepas SC5314, PIR32H<sup>S</sup> y PIR32 $\emptyset^S$  crecidas en medio enriquecido RPMI-1640 a 37 °C.

### III. 6. 7. Estudio de la filamentación en medio sólido

La morfología colonial que presenta *C. albicans* se puede considerar como el reflejo de la morfología celular. Así, la morfología que presentan las colonias de *C. albicans* en determinados medios ha sido considerada como prueba macroscópica de la capacidad de sus células para llevar a cabo la transición dimórfica. Para estudiar el efecto de la interrupción del gen *PIR32* en la transición dimórfica se analizaron las colonias obtenidas tras 7 días de incubación a 37°C en distintos medios para el estudio de la filamentación (Figura III.28). Las cepas que se utilizaron para los ensayos de filamentación fueron la parental SC5314 y las mutantes PIR32H<sup>S</sup> y PIR32 $\emptyset^S$ .

La morfología colonial y el tamaño de las colonias de las cepas SC5314, PIR32H<sup>S</sup> y PIR32Ø<sup>S</sup> fue similar en el medio Lee (Figura 28A y B). En los medios YE-Pro y suero humano se vio afectada el tamaño de las colonias y el grado o capacidad de filamentación. Puesto que como se puede diferenciar en la figura (Figura III.28B), en el medio YE-Pro la cepa PIR32H<sup>S</sup> presenta unos filamentos de mayor longitud, y en cambio, los de la cepa PIR32Ø<sup>S</sup> parecen acortarse, dando la impresión de que la colonia es de menor tamaño, tomando siempre como referencia la cepa parental SC5314. Asimismo, ligeras diferencias pueden apreciarse en la morfología de las colonias crecidas en suero humano: en ambas cepas mutantes se vislumbra un conglomerado central y fusionamiento de las ramificaciones que no se observa en la cepa silvestre (Figura III.28A). Además en este medio la cepa PIR32H<sup>S</sup> aparentemente resulta un poco más diminuta comparándola con la parental y la mutante homocigótica (Figura III.28B).



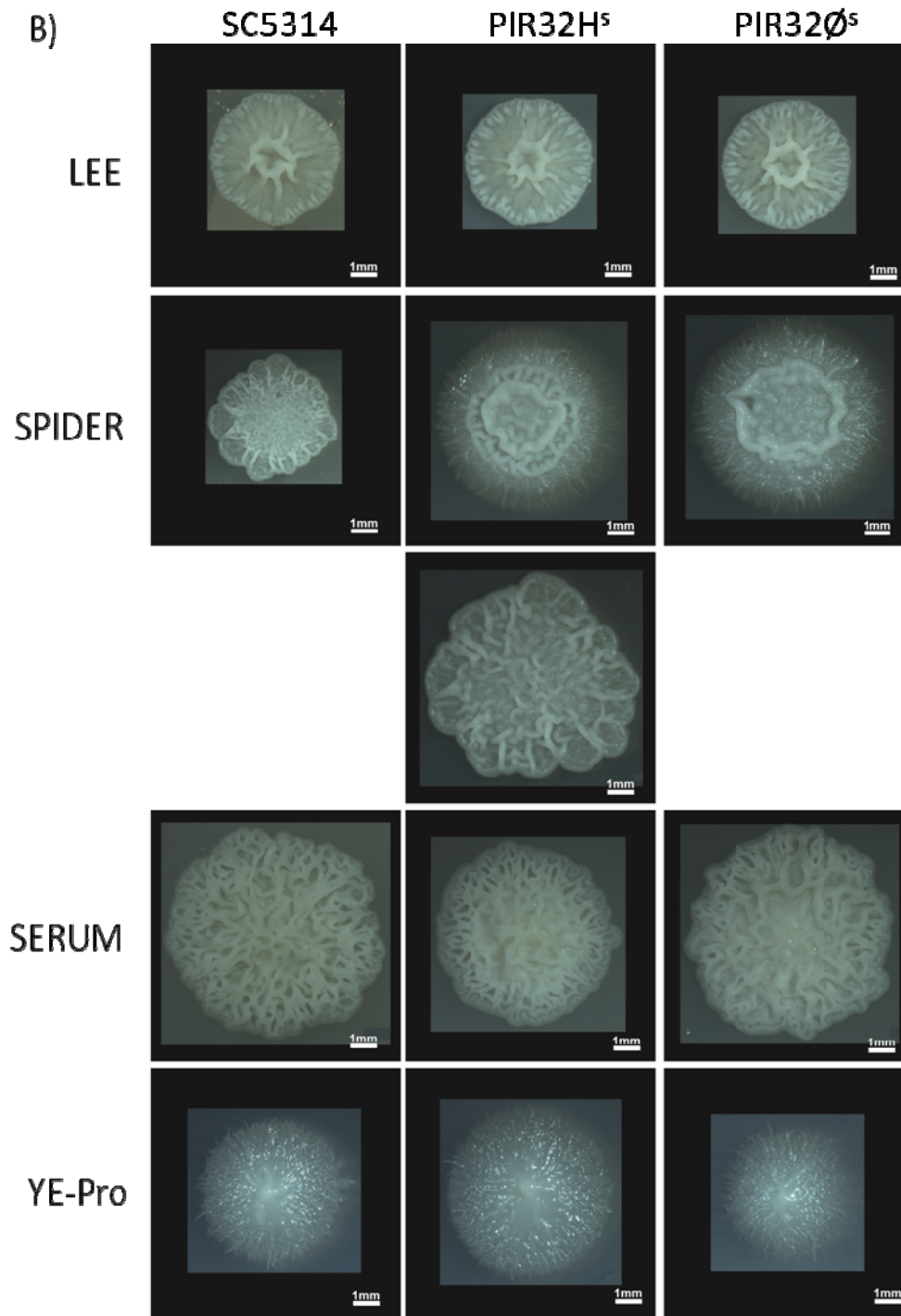


Figura III.28. Morfología de las cepas SC5314, PIR32H<sup>S</sup> y PIR32Ø<sup>S</sup> crecidas en diferentes medios (Lee, Spider, Serum e YE-Pro). A) Bordes de las colonias. B) Colonias.



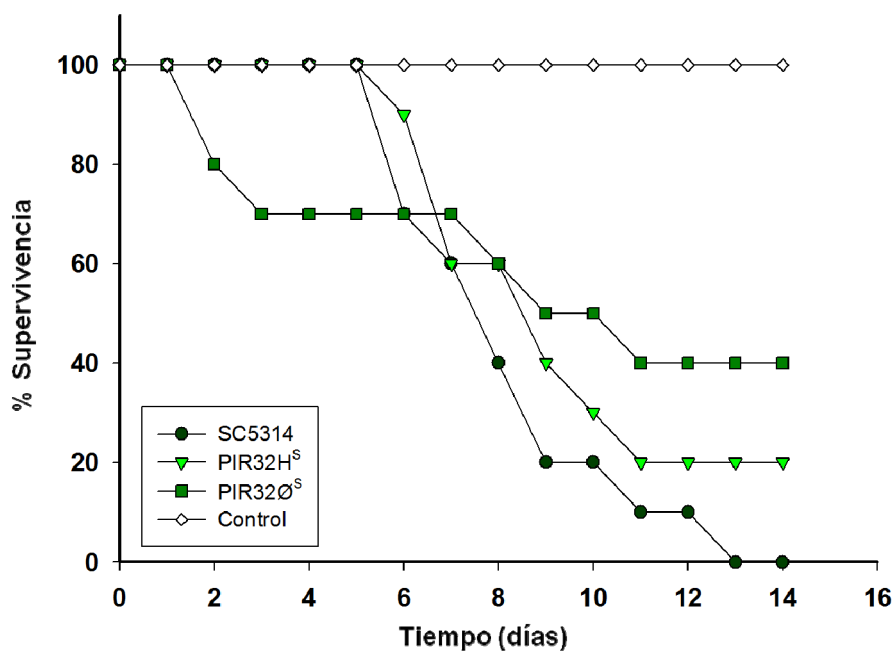
Los cambios morfológicos más diferenciables fueron observados en el medio sólido Spider. En primer lugar, en cuanto a la capacidad de filamentación en este medio, se pudo percatar que la extensa filamentación de las cepas mutantes PIR32H<sup>S</sup> y PIR32Ø<sup>S</sup> es inexistente en la cepa parental (Figura III.28A y B). Además el hecho de que PIR32H<sup>S</sup> presente dos morfologías (en proporción 3:2), una más cercana la cepa parental sin micelios, y otra morfología un poco más abundante que aún sin ser igual a la mutante homocigótica puesto es de menor tamaño y muestra en su superficie dos circunferencias superpuestas, cuando el mutante homocigótico solamente muestra una, es un claro indicativo de la existencia de una alteración en la morfología celular.

### **III. 6. 8. Estudio de la virulencia en modelo murino**

El ensayo de virulencia se realizó tal y como se ha descrito en el apartado II. 28 de Materiales y Métodos.

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 SC5314, el mutante heterocigótico PIR32H<sup>S</sup> y el mutante homocigótico PIR32Ø<sup>S</sup>. El porcentaje de supervivencia de los ratones fue supervisado cada día, durante un período de 15 días.

En la figura III.29 se puede observar que, tal y como se esperaba por el ensayo de miceliación, las cepas mutantes para el gen *PIR32* sí que resultan menos virulentas que la cepa parental, ya que a los trece días de comenzado el experimento no sobrevive ningún ratón inoculado con la cepa parental, y sin embargo el porcentaje de supervivencia de ratones inoculados con la cepa PIR32H<sup>S</sup> es de un poco más del 20% y los inoculados con la cepa PIR32Ø<sup>S</sup> es de más del 40%. Lo cual es indicativo de que la mutación en el gen *PIR32* produce cepas más avirulentas. La supervivencia del grupo control fue del 100%.



**Figura III.29.** Estudio de virulencia en modelo murino de la cepa parental SC5314, del mutante heterocigótico PIR32H<sup>S</sup> y del mutante homocigótico PIR32Ø<sup>S</sup> contabilizando el porcentaje de supervivencia de ratones a través del tiempo post-infección.

### III. 7. ESTUDIO DE COMPLEMENTARIEDAD ENTRE *PIR32* Y *PIR1* POR RT-PCR

La pared celular es una estructura dinámica y como consecuencia, la síntesis, secreción e interacción entre sus diferentes componentes mantienen un equilibrio constante. Se sabe que perturbaciones en la composición de la pared celular accionan diversos mecanismos de reparación de la estructura molecular con el fin de preservar la integridad de la célula.

Teniendo estos hechos en cuenta y a la vista de los resultados obtenidos en las pruebas fenotípicas de los mutantes hetero- y homocigóticos para el gen *PIR32*, donde no habían diferencias marcadas en el comportamiento o morfología de las cepas con este alelo parcial o totalmente interrumpido en comparación con la cepa parental SC5314, fue formulada la hipótesis sobre la existencia de una posible complementariedad entre las proteínas Pir1 y Pir32.

Basándonos en el análisis de proteínas Pir de la pared celular descrito en *S. cerevisiae* (Mazañ *et al.*, 2008), por el cual se indicaba que estas proteínas han demostrado ser relevantes para la viabilidad y virulencia, pero solamente cuando se

producía la delección de los 4 miembros de la familia Pir que posee provoca alteraciones fisiológicas significativas para la célula, y puesto que no se encontró otro candidato de la familia Pir en *C. albicans*, se pensó que tal vez *PIR32* y *PIR1* podrían complementarse. De manera que en ausencia del gen *PIR32*, habría una sobreexpresión del gen *PIR1*. Por lo que se procedió al estudio del patrón de expresión del gen *PIR32* en el mutante *pir1Δ/pir1Δ*, e igualmente el estudio del gen *PIR1* en el mutante *pir32Δ/pir32Δ*. Los niveles de transcripción de ambos genes fueron analizados en tiempo real mediante RT-PCR semicuantitativa.

### III. 7. 1. Obtención del ARN y comprobación de su purificación

La obtención del ARN fue realizada como se describe en la sección II. 10 de Materiales y Métodos. Los cultivos crecidos a 28 °C, fueron recogidos y tratados para extraer de las células el ARNm. Tras cuantificarlo se purificaron 8 µg, que fueron los empleados en la Transcripción Inversa para sintetizar el ADNc (ver apartado II. 12. 3 de Materiales y Métodos). La inexistencia de contaminación de ADN genómico fue comprobada mediante PCR amplificando con los oligonucleótidos que van a ser empleados en el ensayo de RT-PCR semicuantitativa:

- Cebadores para el gen *PIR32*: PIR32qPCFw3 y PIR32qPCRv3. Se unen a mitad del gen, amplifican una banda de 426 pb (Figura III. 30)
- Cebadores para el gen *EFB1*: EFB1F y EFB1R. Amplifican una banda de 526 pb (correspondiente al intrón sin exones del ADNc). Si existe contaminación de ADN estos oligonucleótidos amplificarían una banda de 890 pb, debido al ADN genómico que contiene exones (Figura III. 30).

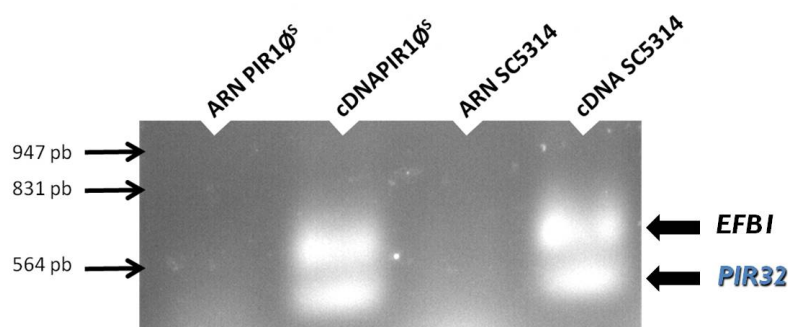


Figura III.30. Comprobación de la ausencia de contaminación del ARN y del ADNc por ADN genómico.

### III. 7. 2. RT- PCR semicuantitativa y análisis estadístico

Una vez comprobada la calidad y purificación del ADNc, se realizó una RT-PCR semicuantitativa para estudiar los niveles de expresión del mensajero del gen *PIR1* en las cepas SC5314 y PIR32 $\emptyset^S$ , y así verificar la hipótesis de la complementariedad entre la expresión de las proteínas Pir1 y Pir32.

Fueron usados los oligonucleótidos Pir1-RT5 y Pir1-RT3, que amplifican 412 pb del la zona final del gen *PIR1*. Como control se utilizaron oligonucleótidos específicos del gen *EFB1* (EFB1F y EFB1R), los cuales amplifican un fragmento específico de 526 pb (Maneu *et al.*, 1996). *CaEFB1* tiene una expresión constitutiva a lo largo del ciclo celular. Además posee un intrón, lo cual supone de mucha utilidad como control para comprobar que no hubiera contaminación de ADN genómico en las muestras, ya que en este caso aparecería un amplificado tendría un tamaño de 890 pb. Cada reacción contenía 1  $\mu$ g de ADNc, y se sometieron a 30 ciclos de amplificación. Los amplificados obtenidos se corrieron en un gel de agarosa al 2%.

En la imagen del gel de la figura III. 31, se encuentra sobreexpresado el gen *PIR1* en alrededor de un 50% en la cepa *pir32 $\Delta$ /pir32 $\Delta$* , comparando con los niveles de transcripción de la cepa parental silvestre (SC5314). Se deduce de que en el caso de la cepa parental, la expresión del gen *PIR1* empieza a ser visible a partir del ciclo 20, en cambio en la cepa mutante PIR32 $\emptyset^S$  a partir del ciclo 16 se hace patente la amplificación. Esto indica que las células mutantes producen mayor cantidad de proteína Pir1, para intentar compensar las deficiencias en la integridad de la pared producidas por la falta de Pir32p.

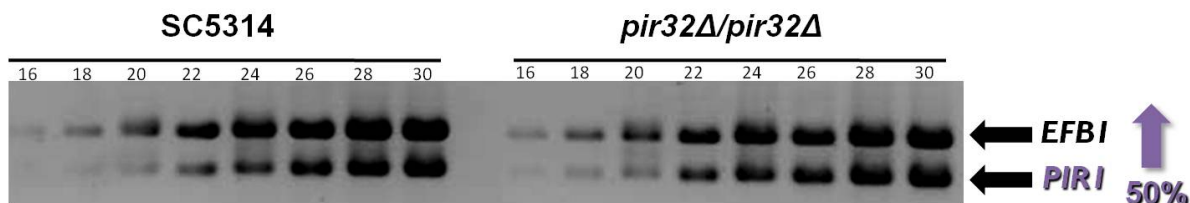


Figura III.31. Estudio comparativo del patrón de expresión del gen *PIR1* en SC5314 y en PIR32 $\emptyset^S$ .

### III. 8. OBTENCIÓN DEL DOBLE MUTANTE PARA LOS GENES *PIR1* Y *PIR32* DE *C. albicans*

La ausencia de *PIR32* no producía ningún efecto fenotípico apreciable en el mutante homocigótico nulo *pir32Δ/pir32Δ*. Este hecho, unido al aumento de expresión de los genes *PIR*, uno en ausencia del otro, hizo que se optara, a semejanza con el estudio de las proteínas Pir de *S. cerevisiae*, a la obtención del mutante del gen *PIR32* en un fondo genético *pir1Δ/pir1Δ*. Esta cepa ( $PIR1\emptyset^S$ ) es proveniente de la SC5314, y fue construida en nuestro laboratorio. El procedimiento de disrupción fue el mismo que el anteriormente descrito en el apartado II. 13. de Materiales y Métodos.

Así pues, partiendo de la cepa  $PIR1\emptyset^S$  se procedió a la disrupción del gen *PIR32*, obteniendo así la cepa doble mutante para ambos genes. Estas fueron denominadas:

- $PIR1\emptyset32H^R$  (*pir1Δ::FRT/pir1Δ::FRT, pir32Δ::SAT1-FLP/PIR32*);
- $PIR1\emptyset32H^S$  (*pir1Δ::FRT/pir1Δ::FRT, pir32Δ::FRT/PIR32*);
- $PIR1\emptyset32\emptyset^R$  (*pir1Δ::FRT/pir1Δ::FRT, pir32Δ::FRT/pir32Δ::SAT1-FLP*);
- $PIR1\emptyset32\emptyset^S$  (*pir1Δ::FRT/pir1Δ::FRT, pir32Δ::FRT/pir32Δ::FRT*) o doble mutante.

#### III. 8. 1. Comprobación de los mutantes mediante Southern-blot utilizando la enzima de restricción *MscI*

Al igual que se había realizado previamente, las distintas etapas de la interrupción del gen *PIR32* fueron comprobadas mediante Southern-blot. No obstante y dado que las diferencias entre las bandas del *orf19.10299* no resultan claramente perceptibles tras la digestión con *AflIII*, se optó por digerir el ADN genómico extraído de las diferentes cepas de *C. albicans* con la enzima de restricción *MscI*, donde se había comprobado *in silico* que los tamaños de bandas detectados por la sonda obtenida para cada uno de los alelos de *PIR32* digeridos con *MscI* resultaban prácticamente idénticos. Por lo que dependiendo del tipo de cepa (salvaje, interrumpida con casete, interrumpida

sin casete) las bandas son claramente diferenciables, permitiendo una correcta identificación de cada una de las etapas de la interrupción alélica.

Así pues examinando la figura III.32 en la primera calle aparece la banda de 6,3 Kb correspondiente a ambos alelos salvajes de la cepa SC5314 (*orf19.10299* y *orf19.2783*). La segunda calle representa la integración del casete de disrupción en uno de los alelos (PIR32H<sup>R</sup>) y da una banda de 2,8 Kb, y el alelo complementario que no ha sido alterado y por lo tanto sigue siendo salvaje presentando la banda de 6,3 Kb. En la tercera calle se observan una banda de 5,3 Kb para el mutante heterocigótico sensible (PIR32H<sup>S</sup>) correspondientes al alelo interrumpido que ha perdido el casete, y nuevamente una banda de 6,3 Kb, perteneciente al alelo sin interrumpir. A continuación, en la cuarta calle se mantiene la banda del alelo interrumpido de 5,3 Kb, y en el alelo complementario aparece la señal en los 2,8 Kb, ya que el casete se ha integrado en el segundo alelo, disrupcionándolo (PIR32Ø<sup>R</sup>). Finalmente, en la quinta calle, aparece de nuevo una sola banda de 5,3 Kb para el mutante homocigótico, PIR32Ø<sup>S</sup>, indicador de que ambos alelos se encuentran interrumpidos y que además han eliminado el casete. Las calles 6, 7, 8 y 9, concuerdan respectivamente con las calles 2, 3, 4 y 5, pero bajo el fondo genético *pir1Δ/pir1Δ*. De esta manera las bandas de la calle 6 pertenecen a PIR1Ø32H<sup>R</sup>, las de la calle 7 con PIR1Ø32H<sup>S</sup>, en la calle 8 corresponden con PIR1Ø32Ø<sup>R</sup>, y por último la banda de la calle 9 coinciden con la cepa PIR1Ø32Ø<sup>S</sup>. (Fig. III.32).

El hecho de haber podido obtener el doble mutante para los genes *PIR1* y *PIR32*, nos demuestra que el efecto sinérgico de ambas mutaciones no es suficiente para que la célula sea inviable, por lo tanto ninguno de los dos genes, ni siquiera ambos genes simultáneamente son esenciales para la célula fúngica de *C. albicans*.

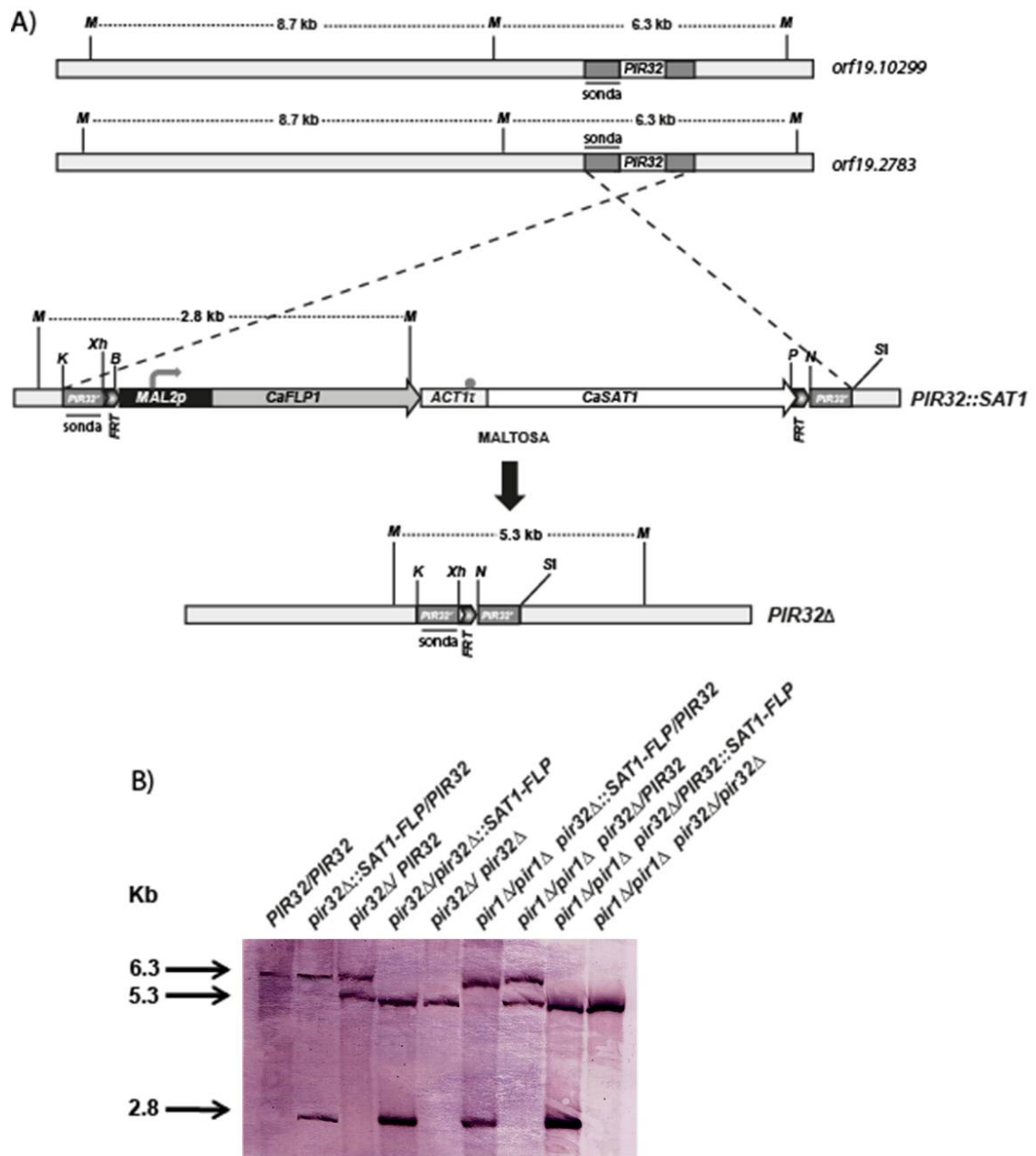


Figura III. 32. Construcción y verificación del mutante nulo *pir32Δ/pir32Δ* en ambos fondos genéticos, SC5314 y *pir1Δ/pir1Δ*, empleando la enzima de restricción *MscI*. A) Representación esquemática del proceso. B) Análisis Southern del ADN genómico.

### III. 9. ANÁLISIS FENOTÍPICO DE LAS CEPAS MUTANTES EN LOS GENES *PIR2* Y *PIR32*

Tras la obtención de los dobles mutantes  $PIR1\emptyset32H^S$  y  $PIR1\emptyset32\emptyset^S$  se procedió a valorar la magnitud del efecto producido en *C. albicans* por esta doble mutación mediante las pruebas fenotípicas que se detallan a continuación.

#### III. 9. 1. Estudio del crecimiento celular

Para estudiar si la falta de la proteína Pir32 afectaba a la velocidad de crecimiento del mutante se realizaron curvas de crecimiento en medio YPD líquido a 28°C y a 37°C de las cepas parental (SC5314), mutante heterocigótico ( $PIR32H^S$ ), mutante homocigótico ( $PIR32\emptyset^S$ ), mutante homocigótico para *pir1* $\Delta$ /*pir1* $\Delta$  ( $PIR1\emptyset^S$ ) y heterocigótico para *pir32* $\Delta$ /*pir32* $\Delta$  ( $PIR1\emptyset32H^S$ ) y por último mutante homocigótico para *pir1* $\Delta$ /*pir1* $\Delta$ ; *pir32* $\Delta$ /*pir32* $\Delta$  ( $PIR1\emptyset32\emptyset^S$ ).

Se observó que la tasa de crecimiento era similar en todas las condiciones y no se encontraron diferencias morfológicas significativas entre las distintas cepas en las condiciones de cultivo empleadas (Figura III.33 y III.34).

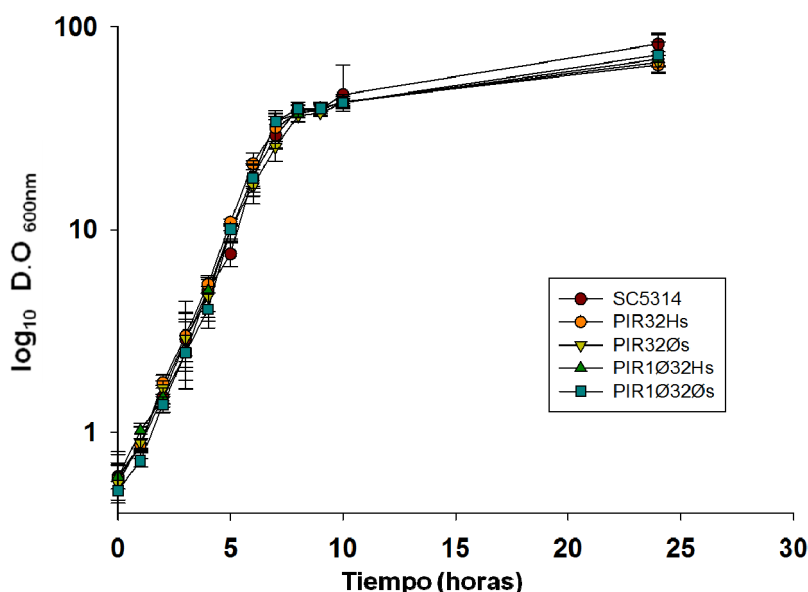


Figura III.33. Curva de crecimiento a 28°C comparativa entre las cepas: parental (SC5314), mutante heterocigótico ( $PIR32H^S$ ), mutante homocigótico ( $PIR32\emptyset^S$ ), mutante heterocigótico bajo fondo genético *pir1* $\Delta$ /*pir1* $\Delta$  ( $PIR1\emptyset32H^S$ ) y mutante homocigótico bajo fondo genético *pir1* $\Delta$ /*pir1* $\Delta$  ( $PIR1\emptyset32\emptyset^S$ ).



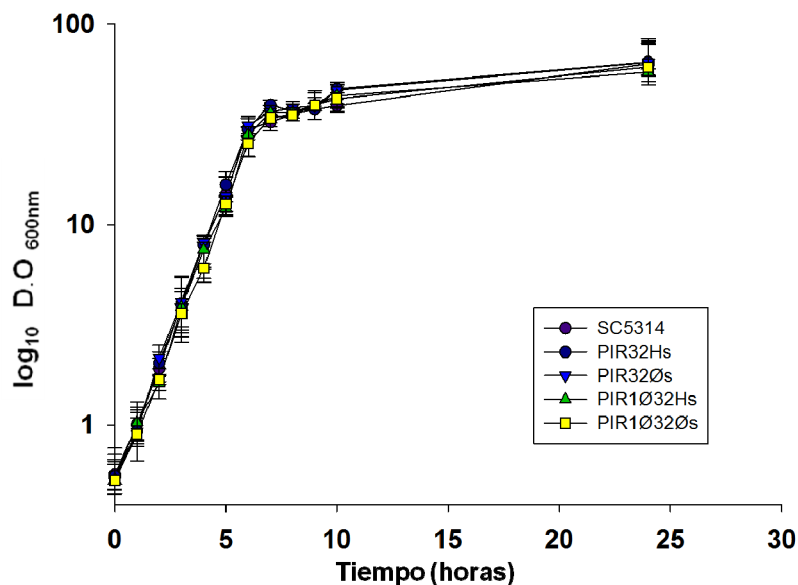


Figura III.34. Curva de crecimiento a 37°C comparativa entre las cepas: parental (SC5314), mutante heterocigótico (PIR32H<sup>S</sup>), mutante homocigótico (PIR32Ø<sup>S</sup>), mutante heterocigótico bajo fondo genético *pir1Δ/pir1Δ* (PIR1Ø32H<sup>S</sup>) y mutante homocigótico bajo fondo genético *pir1Δ/pir1Δ* (PIR1Ø32Ø<sup>S</sup>).

### III. 9. 2. Análisis de la sensibilidad a la zimoliasa

El ensayo se realizó utilizando el mismo método que en el apartado II. 22. 2 de Materiales y Métodos.

Como se puede observar en la figura III.35, sí que aparecen diferencias significativas en la sensibilidad a la zimoliasa de las cepas mutantes. De manera que si anteriormente ya se había percibido un ligero avance en la lisis de la cepa PIR32Ø<sup>S</sup> (Figura III.20), el efecto sinérgico de la interrupción de los genes *PIR1* y *PIR32*, se manifiesta en una recuperación de la resistencia a la lisis celular por la acción de la zimoliasa en la cepa PIR1Ø32H<sup>S</sup>, en comparación con el resto de cepas mutantes para el gen *PIR32*, y una recuperación más pronunciada en el doble mutante (PIR1Ø32Ø<sup>S</sup>), comparable entonces a la resistencia presentada por la cepa silvestre.

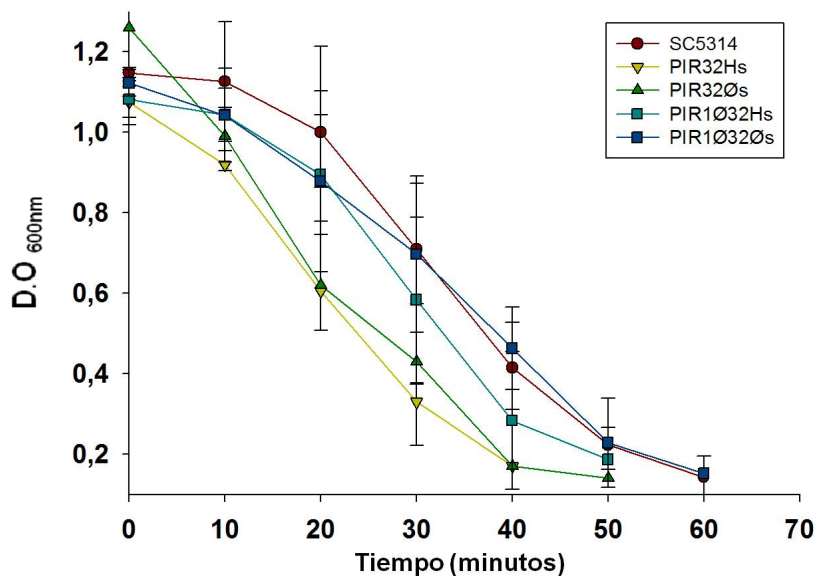


Figura III.35. Curva de sensibilidad a la zimoliasa de todas las cepas obtenidas mutantes para el gen *PIR32* en comparación con la cepa silvestre.

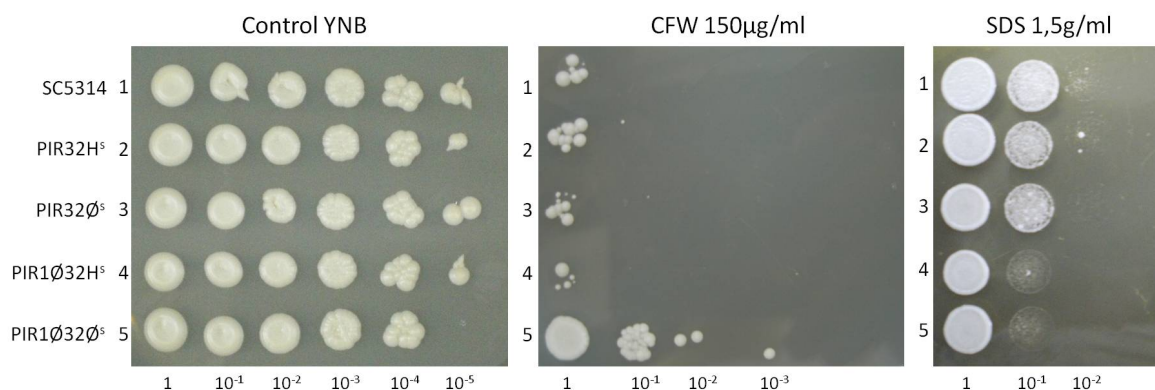
### III. 9. 3. Estudio de la sensibilidad al blanco de calcoflúor, al rojo Congo y al SDS.

La sensibilidad a compuestos que interfieren en la arquitectura de la pared celular de *C. albicans* tal como el blanco de calcoflúor (Elorza *et al.*, 1983; Ram *et al.*, 1994), el rojo Congo (Kopecká y Gabriel, 1992) y el SDS (Valentín *et al.*, 1984), se han utilizado para determinar los cambios en la composición de la pared celular de las levaduras.

Siguiendo el procedimiento descrito en Materiales y Métodos (II.22.3) se sembraron gotas de distintas diluciones de los mutantes obtenidos y la cepa parental a modo de control en placas de blanco de calcoflúor (CFW), rojo Congo (RC) y SDS, a diversas concentraciones de estos compuestos.

Al hacer el ensayo con el doble mutante, en rojo Congo tampoco se apreciaron diferencias en la sensibilidad con respecto a la cepa parental. Sin embargo en CFW se observaron diferencias significativas en cuanto a la sensibilidad de las distintas cepas dentro del rango de concentraciones de 100-200  $\mu\text{g/mL}$ , donde el doble mutante mostraba ser mucho más resistente. Y en cuanto al SDS, la pequeña diferencia que se había observado en el mutante PIR32Ø<sup>S</sup> (Figura III.21) lo cual indicaba que la

relevante. Como se muestra en la figura III. 36. Los mutantes bajo el fondo genético alterado *pir1Δ/pir1Δ* se manifiestan más sensibles al SDS que la cepa salvaje, y un poco más sensibles que los mutantes bajo fondo genético sin mutaciones inducidas.



**Figura III.36. Sensibilidad al CFW y al SDS en placas de YNB de las cepas mutantes obtenidas, en comparación con la cepa parental SC5314.**

### III. 9. 4. Estudio de la sensibilidad al estrés

De la misma manera que se realizaron pruebas fenotípicas de sensibilidades a diferentes estreses para los mutantes *pir32Δ/pir32Δ* (ver III. 6. 4 de Resultados), se realizaron asimismo para las cepas del doble mutante, hetero- y homocigótico (PIR1Ø32H<sup>S</sup> y PIR1Ø32Ø<sup>S</sup>).

#### III. 9. 4. 1. Sensibilidad al estrés osmótico

En cuanto al estudio de la sensibilidad al estrés osmótico mediante medio hipertónico, empleando las sales NaCl, CaCl<sub>2</sub> y LiCl. No se observaron diferencias morfológicas y/o fisiológicas en ninguna de las cepas estudiadas comparándolas entre sí (Datos no presentados).

#### III. 9. 4. 2. Sensibilidad al estrés oxidativo

Las pruebas con peróxido de hidrógeno se llevaron a cabo tal y como está descrito por Bahnan *et al.*, 2012. Sin embargo a la concentración de 10mM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, no fue apreciado ningún cambio fenotípico entre las colonias de las diferentes cepas.

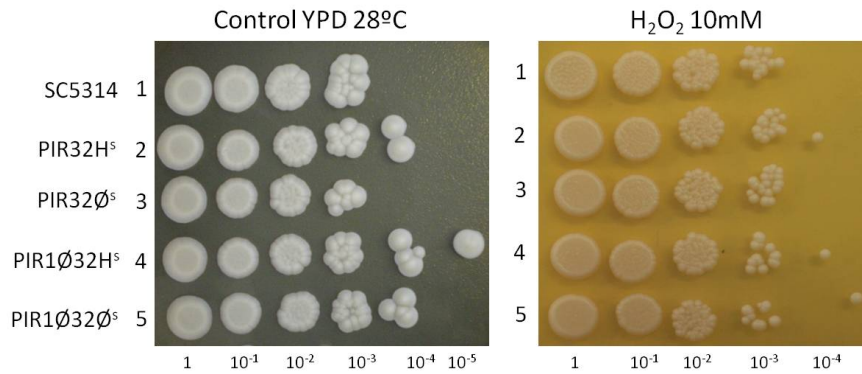


Figura III.37. Sensibilidad al H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en placas de YNB de las cepas mutantes.

### III. 9. 4. 3. Estudio de la sensibilidad al estrés térmico

Este estudio en el que previamente no habían aparecido diferencias apreciables (Resultados III. 6. 4. 3), al incorporar las cepas doblemente mutantes, mostró diferencias significativas. Se emplearon placas de YNB por duplicado que fueron incubadas a 65°C durante períodos de 0, 15, 30, 60, 75 y 90 min y posterior incubación a 28 y 37°C. Las cepas a estudiar fueron: SC5314, PIR1∅<sup>S</sup>, PIR32H<sup>S</sup>, PIR32∅<sup>S</sup>, PIR1∅32H<sup>S</sup> y PIR1∅32∅<sup>S</sup> de *C. albicans*.

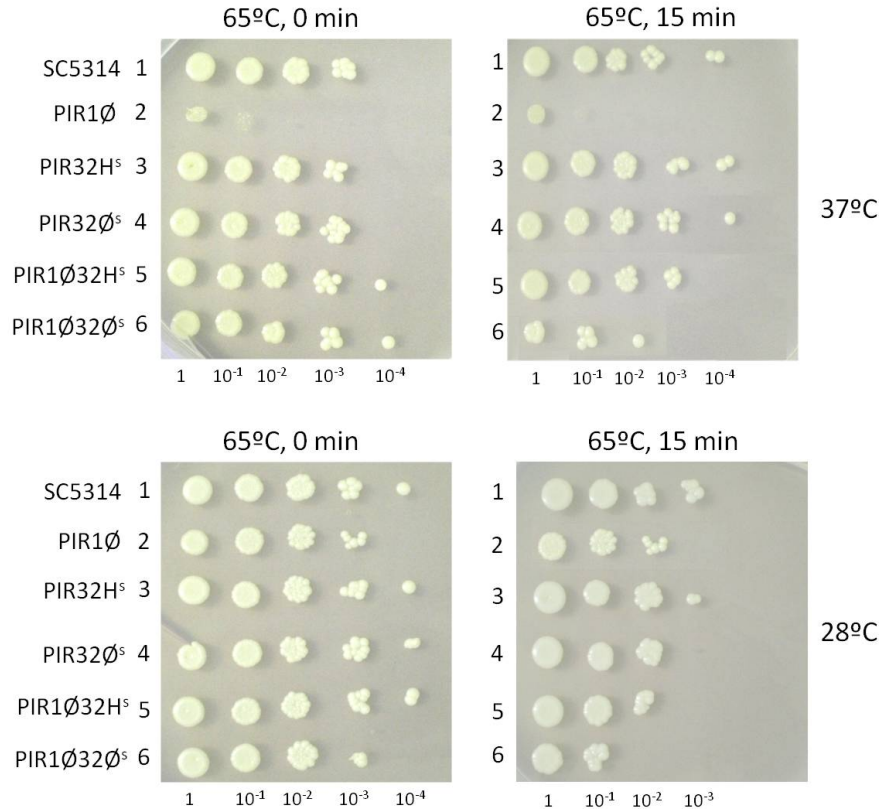


Figura III.38. Estudio de la sensibilidad al estrés térmico, 5 o 15 min a 65°C y luego crecimiento a 28°C o 37°C en medio YNB.

Como se deduce de la figura III. 40, las cepas que contienen mutaciones en ambos genes, resulta en una mayor sensibilidad a la exposición térmica, siendo el doble mutante (PIR1Ø32Ø<sup>S</sup>) la más afectada por la exposición a una elevada temperatura, sobre todo si tras el choque térmico se sucede la incubación a 37°C en comparación con la cepa silvestre SC5314. Puesto que como se puede apreciar en la imagen, el crecimiento de las colonias está muy disminuido.

La cepa PIR1Ø<sup>S</sup> (*pir1Δ/pir1Δ*) fue incorporada al ensayo debido a su termosensibilidad descrita (Valentín, 2013; Martínez *et al.*, 2004). Con la intención de averiguar si las cepas doble mutantes se comportaban de manera similar al PIR1Ø<sup>S</sup>. Y aunque también son afectadas por la temperatura, la cepa PIR1Ø<sup>S</sup> presenta una sensibilidad más acusada. De manera que las cepas PIR1Ø32H<sup>S</sup> y PIR1Ø32Ø<sup>S</sup> se comportan de una manera intermedia entre el mutante para el gen *PIR1* y el mutante para el gen *PIR32* o la cepa silvestre.

### **III. 9. 5. Estudio del efecto de las drogas**

Este apartado se encuentra estrechamente relacionado con el apartado III. 6. 5. de Resultados. Para ello se emplearon las mismas condiciones descritas, utilizando las cepas SC5314, PIR32H<sup>S</sup>, PIR32Ø<sup>S</sup>, PIR1Ø32H<sup>S</sup> y PIR1Ø32Ø<sup>S</sup>.

En dichas cepas, tanto en relación con el estudio de sensibilidad a la cafeína como en el estudio de la acción de diversos antifúngicos (anfotericina B, caspofungina, cicloheximida, higromicina B, ketoconazol y tunicamicina), no aparecieron diferencias de sensibilidad significativas de los distintos mutantes entre ellos ni con respecto a la cepa parental (Datos no presentados).

### **III. 9. 6. Estudios de inducción de cambio dimórfico**

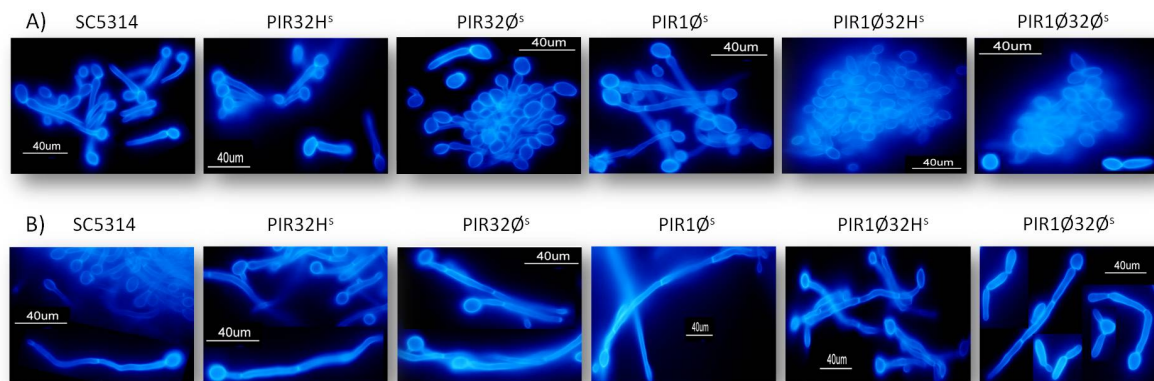
El dimorfismo en *C. albicans* ha sido considerado un requisito importante para la virulencia (Saville *et al.*, 2003), y también juega un papel destacado en el proceso infeccioso en la formación de biopelículas que (Richard *et al.*, 2005),

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. El programa de transición dimórfica levadura-

micelio es inducible por una amplia variedad de condiciones, en este trabajo se evaluó la capacidad y velocidad de formación de tubo germinativo en un medio líquido que favorece la filamentación, como es el medio RPMI-1640.

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 morfológico (Niimi *et al.*, 1996).

Anteriormente en el apartado III. 6. 6 de Resultados, se había determinado la menor capacidad inicial de formación de hifas de los mutantes tanto en la alteración de uno o ambos alelos para el gen *PIR32*. En este ensayo se incluyen además las cepas alteradas asimismo en el gen *PIR1*. De las figuras III.39, podemos concluir que el doble mutante heterocigótico y el homocigótico (*PIR1Ø32H<sup>S</sup>* y *PIR1Ø32Ø<sup>S</sup>*) presentan una capacidad de miceliación bastante disminuida, de hecho se registró un notable incremento en el porcentaje de blastoconidios en comparación con la cepa silvestre y la diferencia es más acusada cuando se compara con la cepa parental (*PIR1Ø<sup>S</sup>*) puesto que en ausencia de Pir1p, las blastosporas son capaces de emitir tubos germinativos dentro de un margen de tiempo relativamente corto, por ello hay un crecimiento exhaustivo de hifas, el cual se encuentra inhibido al disruptor conjuntamente el gen *PIR32*. De modo preliminar estos resultados apuntarían hacia una hipotética función de la proteína Pir32 como represor del proceso de formación de hifas. Si bien a medida que transcurre el tiempo la capacidad de formación de micelio por parte de todos los mutantes de Pir32 va aumentando hasta alcanzar aproximadamente el mismo desarrollo que la cepa silvestre. No es así con el mutante *pir1Δ/pir1Δ*, puesto que la longitud de sus hifas excede con creces a todas las demás cepas. En el doble mutante se apreciaron también la aparición de pseudohifas. (Figura III. 39).



**Figura III.39.** Morfología hifal de las cepas mutantes para *PIR32*, referidas a la cepa silvestre SC5314, y de las cepas mutantes para *PIR1* y *PIR32* referidas a la cepa parental *PIR1* (aumento de 40x). A) Tras 1h de incubación en RPMI-1640 aumentos. B) Tras 4h de incubación en RPMI-1640.

### III. 9. 7. Estudio de miceliación en medio sólido

En este ensayo se intenta comparar la morfología colonial, el tamaño de las colonias y el grado o capacidad de filamentación entre las diferentes cepas. Para ello alrededor de 100 células fueron distribuidas en placas con diferentes medios que favorecen la miceliación, como son: Lee, Spider, suero humano e YE-Pro. Las placas se incubaron a 37°C durante 7 días. Una vez crecidas, se observaron al microscopio y se fotografiaron tanto los bordes como las colonias enteras.

Ya había sido descrito anteriormente que existían diferencias en la morfología colonial en los mutantes del gen *PIR32*, sobre todo en cuanto al crecimiento en medio Spider. (Resultados III. 6. 7). Al comparar a su vez con las cepas PIR1∅32H<sup>S</sup> y PIR1∅32∅<sup>S</sup> se observó que en medio Lee no se apreciaban diferencias marcables, salvo tal vez, un aumento de tamaño del doble mutante. En medio con suero humano vuelven a aparecer el conglomerado central, sin embargo al observar los bordes, se podría decir que la morfología en el doble mutante PIR1∅32∅<sup>S</sup> se revierte asemejándose más a la cepa salvaje. Puesto que el borde no aparece fusionado, sino que es posible distinguir los entrecruzamientos. En el medio Ye-Pro varía el tamaño de las colonias, de manera que las colonias de PIR32H<sup>S</sup> y PIR1∅32∅<sup>S</sup> son de mayor tamaño que el resto, también cabe destacar que al observar los bordes de las colonias crecidas en este medio, los micelios de las cepas mutantes se encuentran menos compactos que en la cepa parental SC5314, siendo más destacado en las cepas con modificaciones en los dos genes (Figura III. 41). En el medio Spider, un medio limitante que induce

fuertemente la formación de tubos germinales y hifas (filamentación) y por tanto la transición de levadura a micelio en ausencia de inhibidores (Brown *et al.*, 2006). El examen microscópico indicó que las diferencias entre los mutantes PIR32H<sup>S</sup> y PIR32Ø<sup>S</sup> eran más acusadas respecto a la cepa parental. Sin embargo resulta llamativo al contemplar en las figuras III. 40 y 41, cómo la colonia PIR1Ø32H<sup>S</sup> recupera en parte la morfología de la cepa parental al no presentar casi ningún micelio en su borde; y en el doble mutante PIR1Ø32Ø<sup>S</sup> aparecen de nuevo dos morfologías claramente diferentes (al igual que en la cepa PIR32H<sup>S</sup>), donde una de ellas produce micelios de longitud similar a las cepas mutantes del gen *PIR32*, y la otra morfología muestra una inexistencia casi completa de micelios, haciéndola semejar tanto a PIR1Ø32H<sup>S</sup> como a la cepa SC5314. Parece que al modificar los genes *PIR1* y *PIR32*, resulta en una reversión de las diferencias morfológicas y fisiológicas producidas por la interrupción de tan sólo el gen *PIR32*.

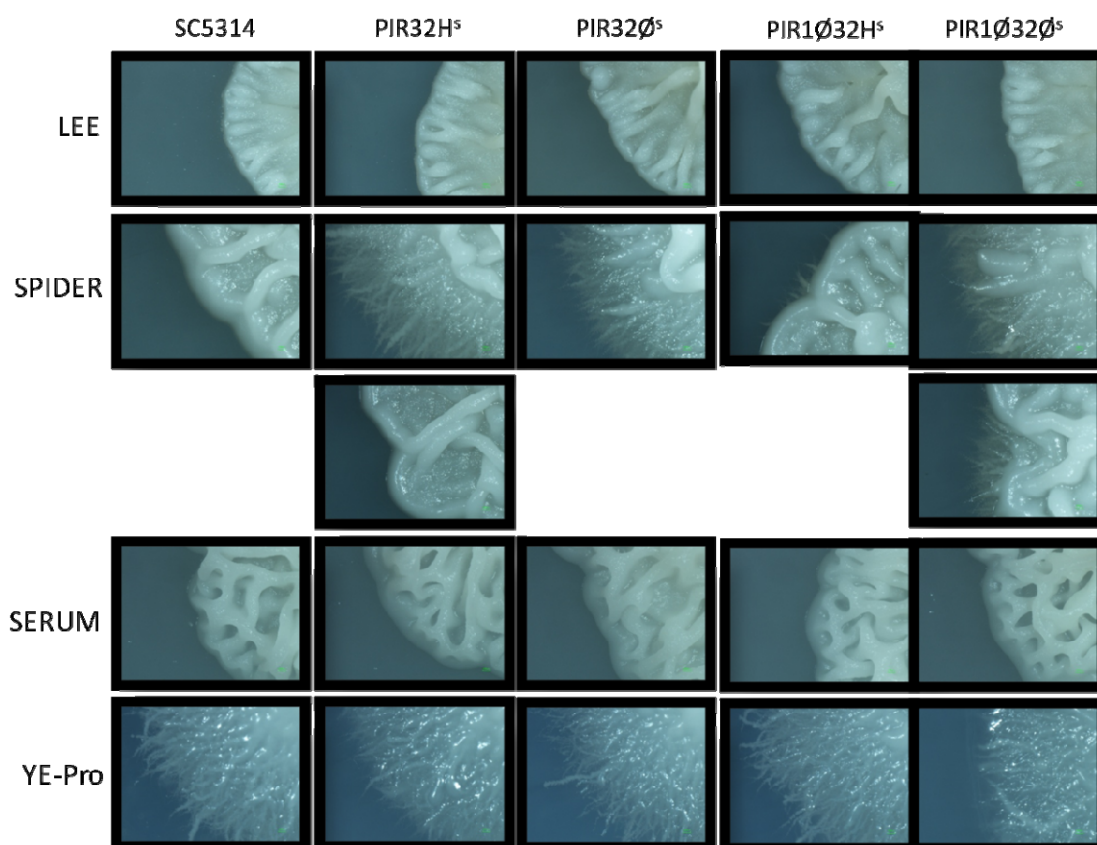


Figura III.40. Morfología de bordes de las cepas SC5314, PIR32H<sup>S</sup>, PIR32Ø<sup>S</sup>, PIR1Ø32H<sup>S</sup>, PIR1Ø32Ø<sup>S</sup> en los medios Lee, Spider, Suero humano e YE-Pro.



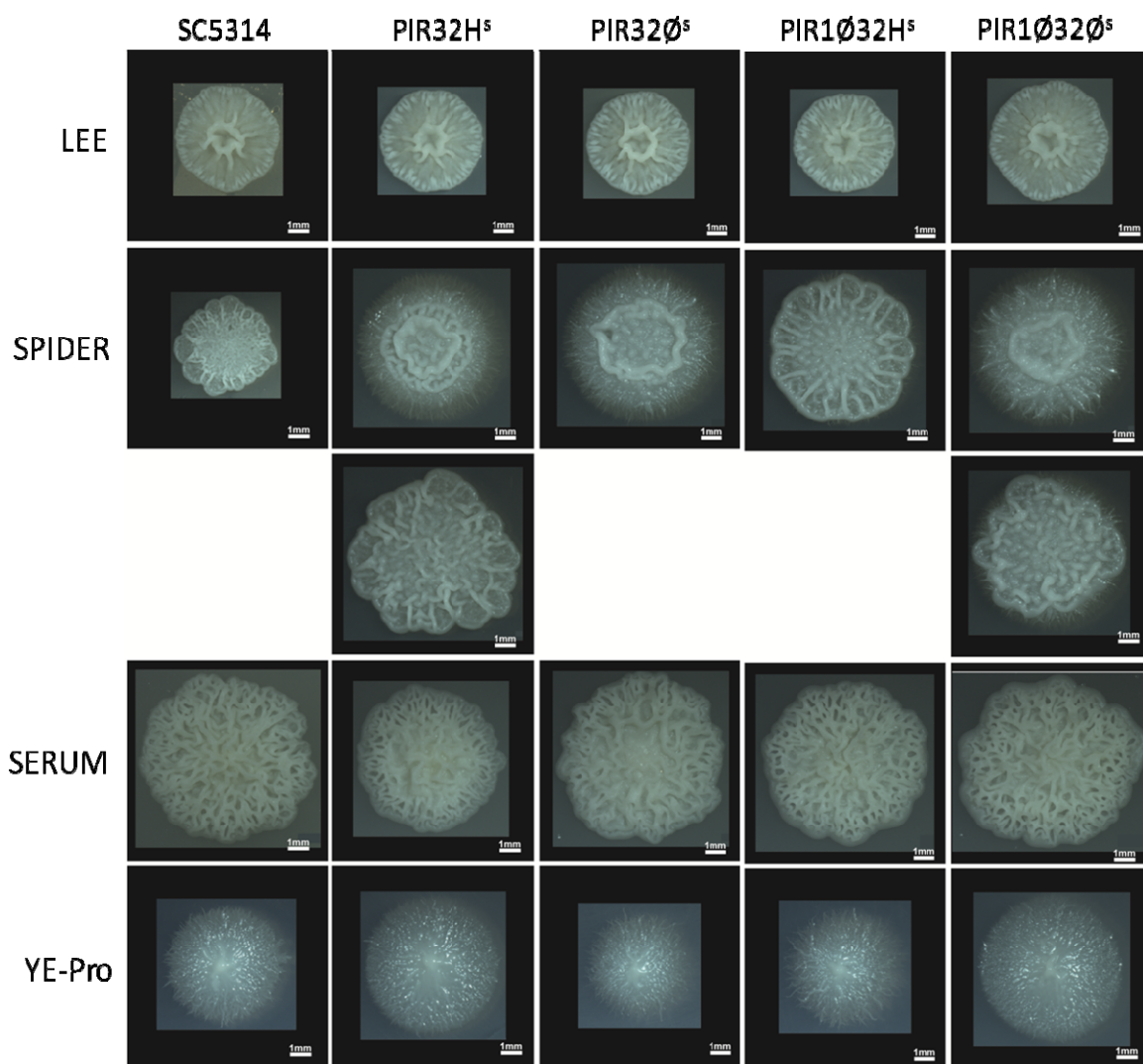


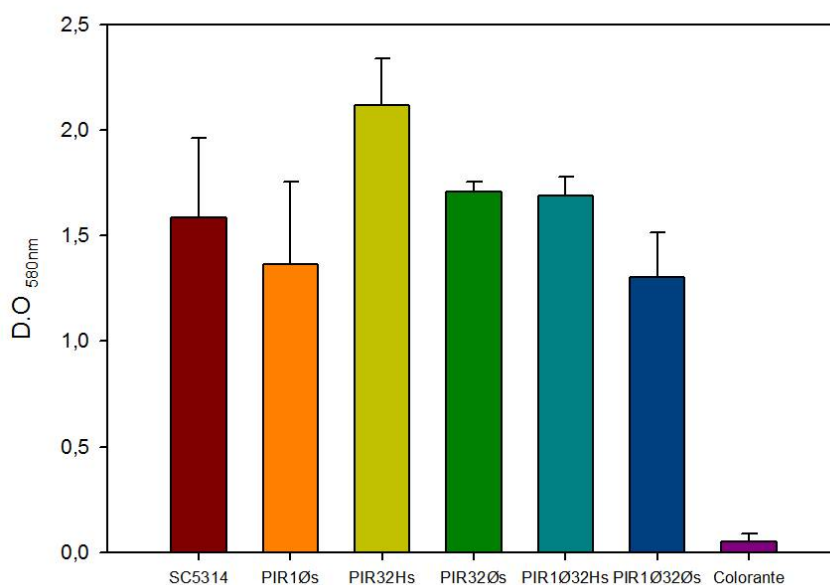
Figura III.41. Morfología de las colonias de las cepas SC5314, PIR32H<sup>S</sup>, PIR32Ø<sup>S</sup>, PIR1Ø32H<sup>S</sup>, PIR1Ø32Ø<sup>S</sup> en los medios Lee, Spider, Suero humano e YE-Pro.

### III. 9. 8. Estudio de la adhesión y la formación de biopelículas

Como se ha comentado anteriormente, la capacidad de *C. albicans* de cambiar su morfología de levadura a micelio juega un papel importante en en la virulencia y, por lo tanto, la formación de biopelículas es un factor clave (Richard *et al.*, 2005). Dado 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. Además los microorganismos que forman biopelículas desarrollan una baja susceptibilidad a antifúngicos, hecho que dificulta su tratamiento (Nobile y Mitchell, 2006).

Para determinar si la ausencia de la proteína Pir32 tenía algún efecto sobre la capacidad de formación de biopelículas, se midió indirectamente y de forma semicuantitativa utilizando dos ensayos: el método de cristal violeta para valorar la formación de biopelículas, y la técnica colorimétrica con XTT para determinar la viabilidad celular en la biopelícula (Materiales y Métodos II. 26. 2).

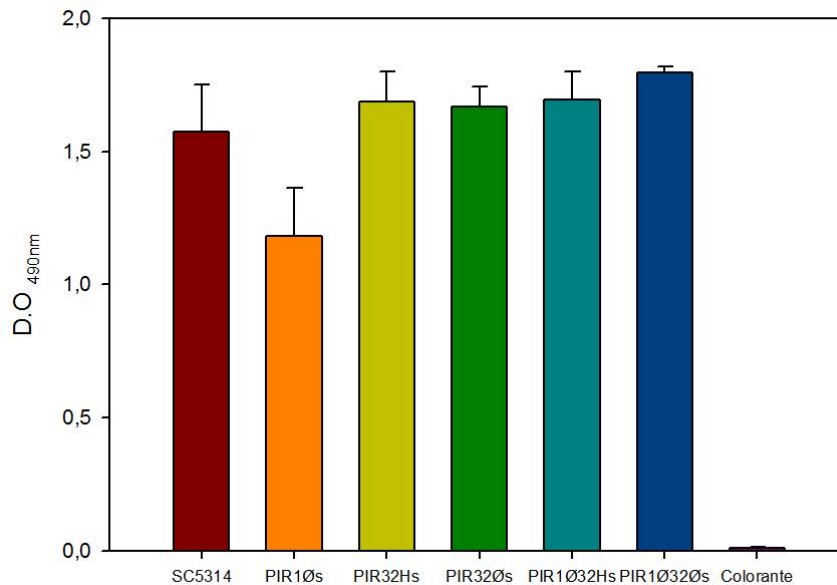
La formación de biopelículas *in vitro* se cuantificó mediante la adhesión a placas de poliestireno de 96 pocillos incubados a 37°C durante dos días. En el caso del método de cristal violeta, la biopelícula producida fue teñida con cristal violeta, seguido de una elución con alcohol/acetona y posterior cuantificación espectrofotométrica para determinar la D.O.<sub>580 nm</sub>. (Figura III.42).



**Figura III. 42. Estudio de la formación de biopelículas, medición por cristal violeta. Valores promedios.**

Los resultados obtenidos por el método del cristal violeta para valorar la formación de biopelículas indicaron una mayor capacidad de formación de biopelícula por parte de la cepa 32H<sup>S</sup>, seguido por las cepas mutante PIR32Ø<sup>S</sup> y PIR1Ø32H<sup>S</sup>. Los mutantes para el gen *PIR1* y para ambos genes (PIR1Ø32Ø<sup>S</sup>), son los que presentan menos formación de biopelícula.

En el caso de la técnica colorimétrica con XTT, se determinó la actividad metabólica de las células en la biopelícula por medio de la reducción enzimática con una sal de tetrazolio (XTT) a través de los cambios colorimétricos que fueron medidos a 490 nm.



**Figura III. 43. Estudio de la formación de biopelículas, medición por XTT. Valores promedios.**

Al medir los cambios colorimétricos en el ensayo de reducción de la sal XTT se adquirieron datos sobre la viabilidad celular en la biopelícula (Figura III.43) En los resultados obtenidos se ve un aumento de la viabilidad en la biopelícula de todas las células mutantes salvo en el *pir1Δ/pir1Δ*, con respecto a la parental. La mayor viabilidad celular corresponde con la cepa PIR1Ø32Ø<sup>S</sup>. Como se puede observar estas mutaciones en el genoma se manifiestan en un cambio en la morfología celular y por tanto afecta a procesos del microorganismo como la formación de biopelículas y su viabilidad.

### III. 9. 9. Análisis de la hidrofobicidad

La hidrofobicidad de la superficie celular tiene un papel central en la patogénesis de *C. albicans*. Las células hidrófobas, en comparación con las células hidrófilas, presentan una mayor adherencia a las células epiteliales y endoteliales, y a las proteínas

de la matriz extracelular, además parecen ser más resistentes a la fagocitosis, y son más virulentas en ratones (Singleton *et al.*, 2001).

Por las mutaciones provocadas en las células pueden aparecer cambios en la composición de la pared celular que afecten a las propiedades hidrófobas de las células. Estas propiedades se pueden evaluar usando la capacidad de las células para ser retenidas por reactivos orgánicos tales como el ciclohexano o el xileno. El experimento consiste en mezclar vigorosamente las células de la cepa problema con alguno de los hidrocarburos líquidos de elección, dejar que las fases se vuelvan a separar tras 1h a T<sup>a</sup> ambiente. La cuantificación se realiza midiendo la absorbancia a 600nm de la fase acuosa posterior a la mezcla con la sustancia hidrofóbica (A<sub>1</sub>) y se compara con la absorbancia obtenida previamente antes de la incorporación de la mezcla (A<sub>0</sub>). La hidrofobicidad de la superficie celular se calculó como el porcentaje de reducción de la turbidez de la fase acuosa inicial, al quedar las células hidrofóbicas retenidas en el xileno o ciclohexano. Por lo que el porcentaje de células en la capa de hidrocarburo (donde se encuentran las células de mayor adherencia puesto que son más hidrófobas) se utilizó para estimar la hidrofobicidad, mediante la siguiente fórmula:

$$\text{Porcentaje de la adhesión celular} = (A_1/A_0) \times 100$$

Todas las pruebas fueron realizadas por duplicado. Los resultados mostrados representan la media de dos experimentos consecutivos (Tabla III.2)

Cepa	Xileno	Ciclohexano
SC5314	65,8% ±7,80	44,5% ±9,83
PIR1Ø <sup>S</sup>	70,2% ±16,87	81,0% ±19,68
PIR32H <sup>S</sup>	86,6% ±17,64	82,0% ±13,02
PIR32Ø <sup>S</sup>	79,6% ±24,29	66,7% ±10,04
PIR1Ø32H <sup>S</sup>	77,4% ±4,53	62,8% ±27,47
PIR1Ø32Ø <sup>S</sup>	71,0% ±12,53	56,8% ±6,54

**Tabla III. 2. Ensayo hidrofóbico en presencia de Xileno o Ciclohexano. Los porcentajes representan la cantidad de células en la fase acuosa.**

De la tabla III. 2, cabe remarcar que la tendencia de los mutantes es de presentar mayor hidrofobicidad que la cepa silvestre, con una excepción, el doble mutante en ambos casos presenta una hidrofobicidad similar a la presentada por la SC5314.

### III. 9. 10. Análisis estructural mediante microscopía electrónica

A la luz de los resultados obtenidos en cuanto a la implicación de la proteína Pir32 y la acción conjunta de las proteínas Pir1 y Pir32 en la composición de la pared celular, se procedió a realizar un análisis de las paredes de estas cepas mediante la técnica de Microscopía Electrónica de Transmisión (ver Materiales y Métodos II. 27). Los valores de la anchura de la capa exterior de manoproteínas consiste en el promedio de cinco celdas, cada una medida en dos lugares diferentes de la pared celular lateral.

De los datos de la tabla III.3, así como de los resultados obtenidos en la imagen de la figura III.44, con relación con la capa de polímeros de glucosa y la composición de proteínas y quitinas de la pared celular, podemos concluir tres aspectos fundamentales. En primer lugar, en ausencia de la proteína Pir1 existe una mayor zona densa a los electrones así como un aumento de la zona menos densa respecto a la cepa salvaje. En segundo lugar, la ausencia de la proteína Pir32 se manifiesta en una disminución de la zona densa a los electrones además de una reducción del grosor de la capa de  $\beta$ -glucano respecto a la cepa salvaje. Por último, la ausencia de ambas proteínas deriva en una compensación del grosor de  $\beta$ -glucano asemejándose al de la cepa salvaje. Sin embargo las medidas de concentración de polímeros (glucosa, manosa, proteína y quitina) en los diferentes mutante no presentaron diferencias significativas.

CEPA DE ESTUDIO	Promedio Proteína %	Promedio Quitina %	Promedio relación glucosa/manosa
SC5314	4,36 $\pm$ 0,30	3,61 $\pm$ 0,31	2,11 $\pm$ 0,031
PIR1 $\emptyset$ <sup>S</sup>	4,02 $\pm$ 0,2	3,04 $\pm$ 0,59	2,23 $\pm$ 0,018
PIR32H <sup>S</sup>	4,20 $\pm$ 0,34	3,07 $\pm$ 0,22	2,18 $\pm$ 0,045
PIR32 $\emptyset$ <sup>S</sup>	3,93 $\pm$ 0,11	2,99 $\pm$ 0,55	2,21 $\pm$ 0,015
PIR1 $\emptyset$ 32H <sup>S</sup>	3,70 $\pm$ 0,26	2,86 $\pm$ 0,50	2,22 $\pm$ 0,061
PIR1 $\emptyset$ 32 $\emptyset$ <sup>S</sup>	3,91 $\pm$ 0,52	3,20 $\pm$ 0,41	2,12 $\pm$ 0,019

Tabla III. 3 Medidas obtenidas que determinan el espesor de la capa de glucano y de manano, su contenido en proteínas y quitina de la pared celular de cada una de las cepas.

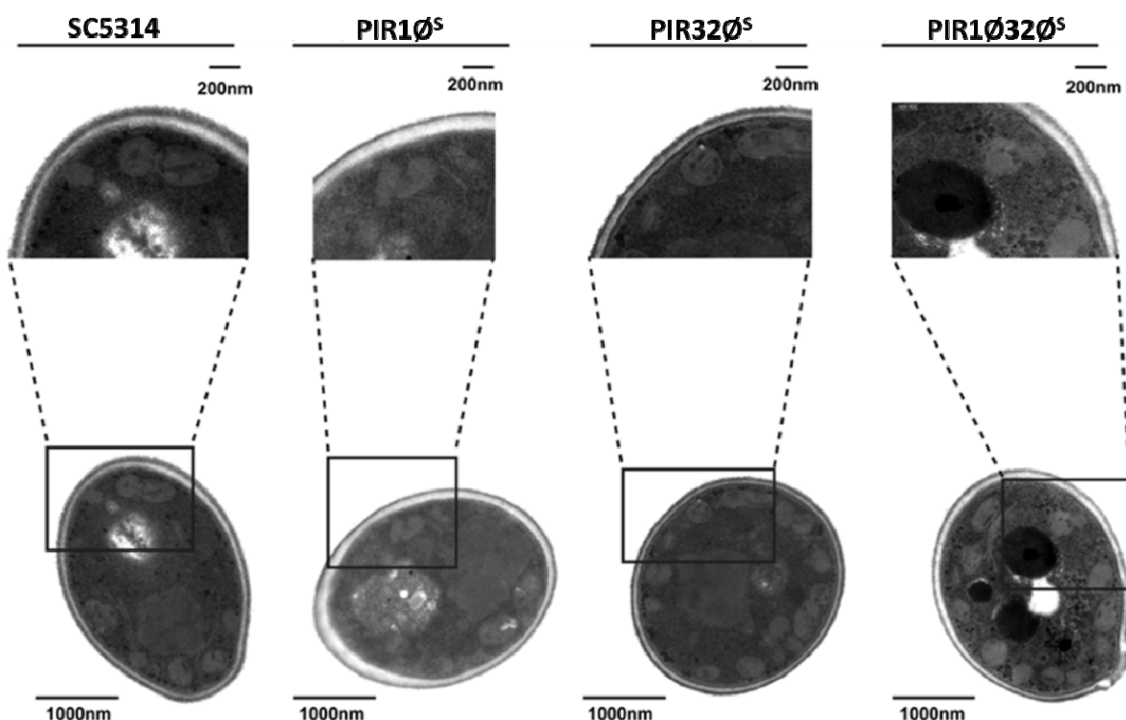


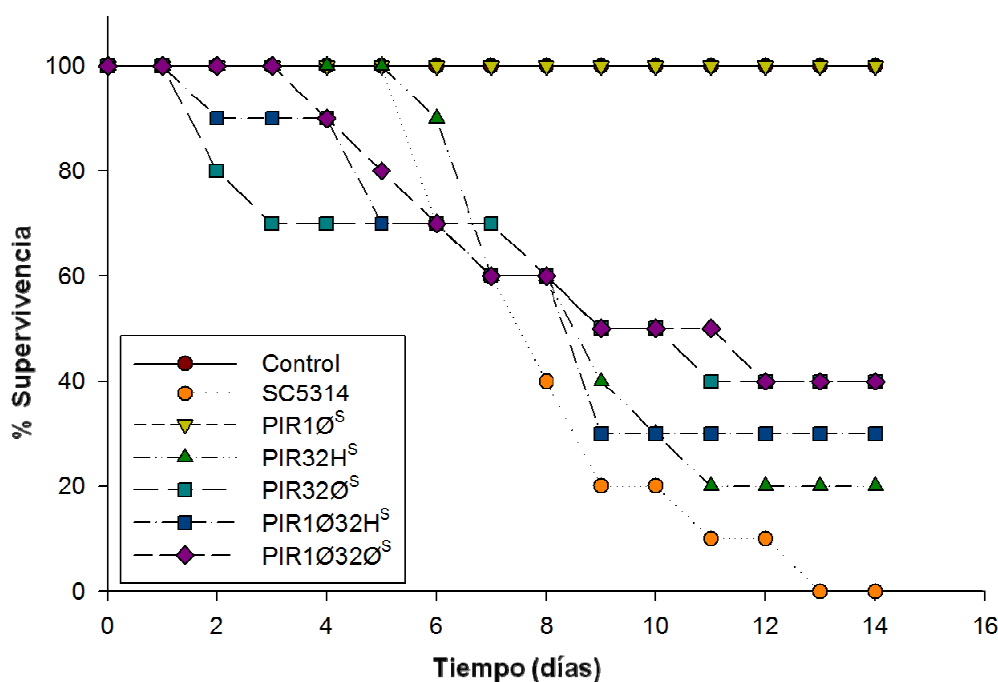
Figura III. 44. Imágenes TEM en cortes transversales de las cepas desarrolladas en este trabajo.

### III. 9.11. Estudio de la virulencia en modelo murino

Al evaluar los resultados previos, que evidencian la mayor capacidad de miceliación por parte de las colonias mutantes en el gen *PIR1* y *PIR32* así como mayor viabilidad en la formación de biopelículas con respecto a la cepa parental -ambos procesos que han sido descritos como fundamentales a la hora de infectar y colonizar el hospedador (Richard *et al.*, 2005; Saville *et al.*, 2003)-, se consideró pues necesario la realización de un estudio dirigido a comprobar la implicación de estos genes en la virulencia. Previamente, en el apartado de Resultados III. 6. 8, se indicaba cómo la interrupción del gen *PIR32* afectaba a la virulencia de *C. albicans*, aumentando la supervivencia de los ratones y por tanto demostrando que las cepas mutantes fueron menos virulentas.

El método para este segundo ensayo de virulencia fue el mismo que para el anterior pero más amplio debido al mayor número de cepas que estudiar. Se emplearon siete 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 las siguientes cepas de *C. albicans*: parental SC5314, PIR1 $\Delta$ <sup>S</sup>, PIR32<sup>H</sup><sup>S</sup>, PIR32 $\Delta$ <sup>S</sup>, PIR1 $\Delta$ 32<sup>H</sup><sup>S</sup> y

PIR1Ø32Ø<sup>S</sup>. El porcentaje de supervivencia de los ratones fue supervisado cada día, durante un período de 15 días.



**Figura III. 45. Estudio de virulencia en modelo murino de la cepa parental SC5314, y de los mutantes PIR32H<sup>S</sup>, PIR32Ø<sup>S</sup>, PIR1Ø32H<sup>S</sup> y PIR1Ø32Ø<sup>S</sup>, contabilizando el porcentaje de supervivencia de ratones a través del tiempo post-infección.**

Los datos compilados del estudio se muestran en la figura III.45. Tanto la cepa parental como el mutante *pir1Δ/pir1Δ*, presentan la virulencia esperada (Hube *et al.*, 1997; Micó, 2009): Así pues la SC5314 resulta la cepa más virulenta, pereciendo todos los ratones a los 13 días tras la infección. Por el contrario los ratones infectados con la cepa PIR1Ø<sup>S</sup> sobrevivieron el 100%, como en el grupo control. De la misma forma la supervivencia para los roedores infectados con los mutantes hetero- y homocigóticos del *PIR32* son del 20% y el 30%, respectivamente, es decir, que como se había visto anteriormente, la falta de este gen disminuye la virulencia.

En cuanto a las cepas con dobles mutaciones, se podría esperar que tanto la cepa PIR1Ø32H<sup>S</sup> como la PIR1Ø32Ø<sup>S</sup>, al no contener en su genoma el gen *PIR1* fueran avirulentos, al igual que su parental, y más aún teniendo en cuenta que se modifican dos genes que disminuyen la virulencia, la ausencia de uno de los cuales suprime completamente la virulencia en *C. albicans* (Micó, comunicación personal). No obstante, contrario a lo esperado, la ausencia de ambos genes incita a la célula a realizar

una serie de compensaciones que aún sin llegar a recuperar por completo la virulencia de la cepa silvestre, ni la virulencia producida por la ausencia de Pir32p, sí que produce una mortalidad en los ratones del 50% aproximadamente.

### III. 10. ANALISIS WESTERN DE LA PROTEINA Pir32

Considerando la importancia de las proteínas en la estructura y función de la pared celular de *C. albicans*, en este apartado se intenta realizar un estudio de su localización, función y ensamblaje, prestando especial interés en la proteína Pir32, mediante la técnica inmunológica de Western-Blot.

Para la realización del Western-Blot, primeramente se obtuvieron paredes celulares en diferentes fracciones (extracto de SDS, extracto de  $\beta$ -ME, extracto de NaOH y extracto de HF-piridina) de las siguientes cepas: SC5314, PIR1 $\emptyset^S$ , PIR32 $\emptyset^S$ , PIR1 $\emptyset$ 32 $\emptyset^S$ , mediante el procedimiento detallado en el apartado II. 21. de Materiales y Métodos. Posteriormente se procedió a la separación de los extractos proteicos mediante electroforesis en geles de SDS-poliacrilamida al 8%. La cantidad de proteína cargada fue en todos los casos de 10  $\mu$ g de proteína total por calle. Tras la transferencia a membranas Hybond P (Amersham<sup>®</sup>) se realizó la detección de las proteínas Pir utilizando anticuerpos policlonales anti-Pir de *S. cerevisiae* (AcJ<sub>2</sub>). Debido a la carencia de un anticuerpo específico para la proteína Pir32, fue empleado el anticuerpo AcJ<sub>2</sub>, obtenido frente a las proteínas Pir de las paredes celulares de *S. cerevisiae*, previamente habiendo comprobado que las proteínas Pir de *C. albicans* poseían los determinantes antigénicos para dicho anticuerpo, con la intención de poder observar diferencias en los perfiles electroforéticos que nos pudiesen indicar de una manera indirecta la localización de la proteína Pir32.

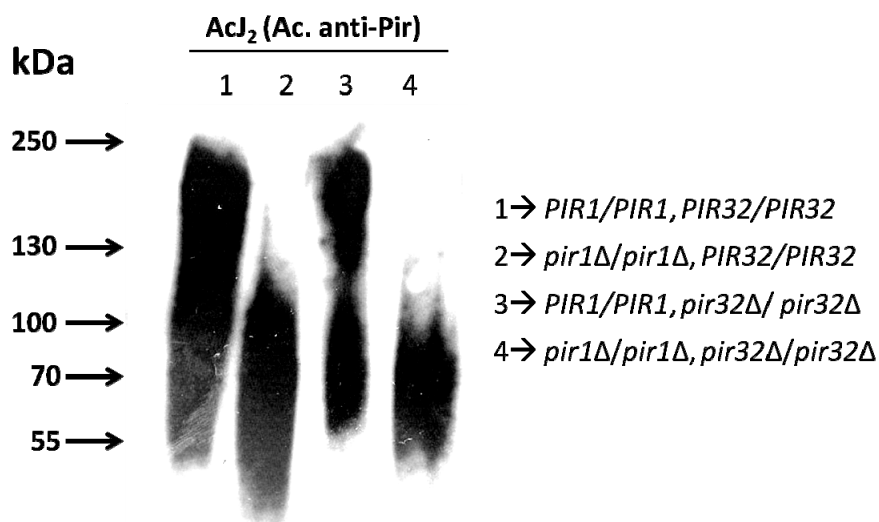
De todas las fracciones separadas, transferidas y reveladas, solamente en el perfil proteico de la fracción extraída por efecto del NaOH aparecieron diferencias cualitativas apreciables. En esta aproximación se utilizó el anticuerpo policlonal de conejo (AcJ<sub>2</sub>) como primer anticuerpo a una dilución 1:1000 en incubación a 4 °C durante toda la noche, para la detección fue empleado como segundo anticuerpo un anticuerpo policlonal anti-IgG de cabra acoplada a peroxidasa (Bio-Rad<sup>®</sup>) en dilución 1:10.000 a 37 °C durante 1h. Tras el revelado por quimioluminiscencia durante 10 min sobre una



película fotosensible, se obtuvo una imagen de la emisión de luz por parte de la membrana.

En la Figura III. 46. se pueden observar la inmunodetección de las proteínas Pir de las diferentes cepas del extracto de NaOH. A primera vista se determina que los perfiles proteicos obtenidos son cualitativamente distintos. En la primera calle, correspondiente a la cepa parental, SC5314, se aprecia un material polidisperso de entre 70 y 250 kDa. Dado que esta cepa no presenta ninguna mutación, este material proteico pertenece en principio sólo a la detección de estas dos proteínas Pir de *C. albicans*. Aunque dado que el anticuerpo no es propiamente específico de proteínas Pir de *C. albicans*, puede ser que existan reconocimientos inespecíficos de proteínas similares a aquellas de la familia Pir. En la calle 2, correspondiente a la extracción proteica de la cepa PIR1Ø<sup>S</sup>, desaparece el material polidisperso por encima de 130 KDa que probablemente pertenece a Pir1p. En un estudio previo de glicosilación de la proteína Pir1 (Micó, 2009), fue comprobado el alto grado de glicosilación de esta manoproteína de pared celular. Por ello la proteína Pir1 suele aparecer a un peso molecular más elevado. Así pues, resulta de esperar que al interrumpir el gen codificante de esta proteína, desaparezca la zona superior que aparecía en la cepa parental, como indicativo de que esta proteína no ha sido sintetizada por el mutante. Entonces en principio, puesto que *C. albicans* sólo contiene dos miembros de la familia Pir hasta ahora descritos, se podría sugerir que el material polidisperso de la segunda calle, de entre 70 y 115 KDa, pertenece al material proteico de Pir32. El peso molecular teórico de esta proteína es de 48,7 kDa, pero puede presentarse glicosilada, lo cual haría que aumentara el peso molecular, al igual que en Pir1. En la calle 3, donde está presente el material proteico extraído de la cepa PIR32Ø<sup>S</sup>, aparece el material proteico en la zona superior referido a la proteína Pir1, pero asimismo aparece una delgada señal en la zona inferior que podría tomarse como detecciones de proteínas inespecíficas, puesto que en esta cepa el gen para la proteína Pir32 está interrumpido. Para esclarecer dudas, proteínas de pared celular del doble mutante, PIR1Ø32Ø<sup>S</sup>, fueron extraídas y tratadas como las anteriores cepas. La inmunodetección del material proteico de esta cepa tratado con NaOH se puede examinar en la calle 4 de la figura III. 46. Como era de esperar la banda superior perteneciente a Pir1 no aparece. Sin embargo, las detecciones inespecíficas de proteínas se muestran en materiales proteicos presente entre los 55 y los 100 kDa.

A causa de estas inespecificidades no podemos expresar con certeza que la proteína Pir32 se encuentra unido directamente al  $\beta$ -1,3-glucano aunque tenga todas las características propias de las proteínas de la familia Pir. En el caso de estar unida al  $\beta$ -1,3-glucano sería una especie inferior a 130 KDa.



**Figura III. 46.** Análisis Western-blot de la fracción de extracto de NaOH, detectado por el anticuerpo policlonal AcJ<sub>2</sub>. Cepas de *C. albicans*: 1) SC5314; 2) PIR1 $\Delta$ , 3) PIR32 $\Delta$ , 4) PIR1 $\Delta$ 32 $\Delta$ .

La aparición de las proteínas Pir en el extracto de sosa era de suponer, puesto que según el esquema de uniones de las proteínas a la pared celular, son proteínas unidas directamente al  $\beta$ - 1,3- glucano, y por tanto son extraídas con tratamientos alcalinos suaves, como por ejemplo el tratamiento con NaOH. Sin embargo se debe apuntar que en los demás extractos también aparecía alguna señal, sobre todo en la fracción proteica de  $\beta$ -ME (Figura III. 47), donde se observaron perfiles proteicos bastante definidas pero prácticamente indiferenciables entre las diferentes cepas, ya que se muestran a la misma altura de peso molecular y presentes en todas las calles por lo que no resulta de ayuda a la hora de fijar la localización de la proteína Pir32.

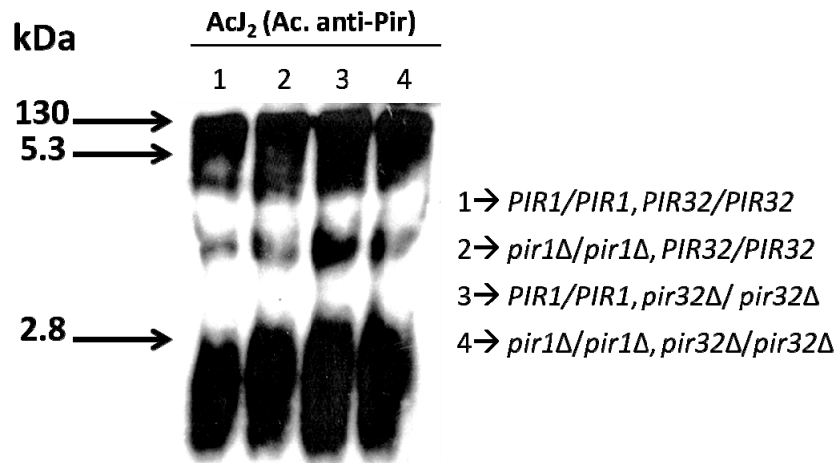


Figura III. 47. Análisis Western-blot de la fracción de extracto de  $\beta$ -ME, detectado por el anticuerpo policlonal AcJ<sub>2</sub>. Cepas de *C. albicans*: 1) SC5314; 2) PIR1 $\Delta$ , 3) PIR32 $\Delta$ , 4) PIR1 $\Delta$ 32 $\Delta$ .

### III. 11. OBTENCIÓN DEL REINTEGRANTE

Con el objeto de evaluar si los efectos fenotípicos observados en el doble mutante nulo (*pir1 $\Delta$ /pir1 $\Delta$ ; pir32 $\Delta$ /pir32 $\Delta$* ) eran debidos realmente a la carencia de la proteína Pir32 funcional en la célula, se procedió a reintroducir una copia del gen *PIR32* en la cepa doble mutante (PIR1 $\Delta$ 32 $\Delta$ ). Para ello se clonó la región codificante del gen *PIR32* en el plásmido pEcc120Malp. Este experimento no fue realizado con el mutante PIR32 $\Delta$ , por la ausencia de variaciones significativas en la morfología y fisiología entre este mutante y la cepa parental.

#### III. 11. 1. Construcción del plásmido pEccMal-PIR32

Para la expresión del gen *PIR32* se obtuvo un plásmido a partir del pEcc120 (D'Enfert., 2009) (Figura III. 48). Este plásmido contiene el marcador CaSAT1, el gen *RPI0* que codifica para la proteína ribosomal 10, proveyendo homología con la diana de integración cromosomal. Además de numerosos y convenientes sitios de clonación, y carece de un origen de replicación para *C. albicans*.

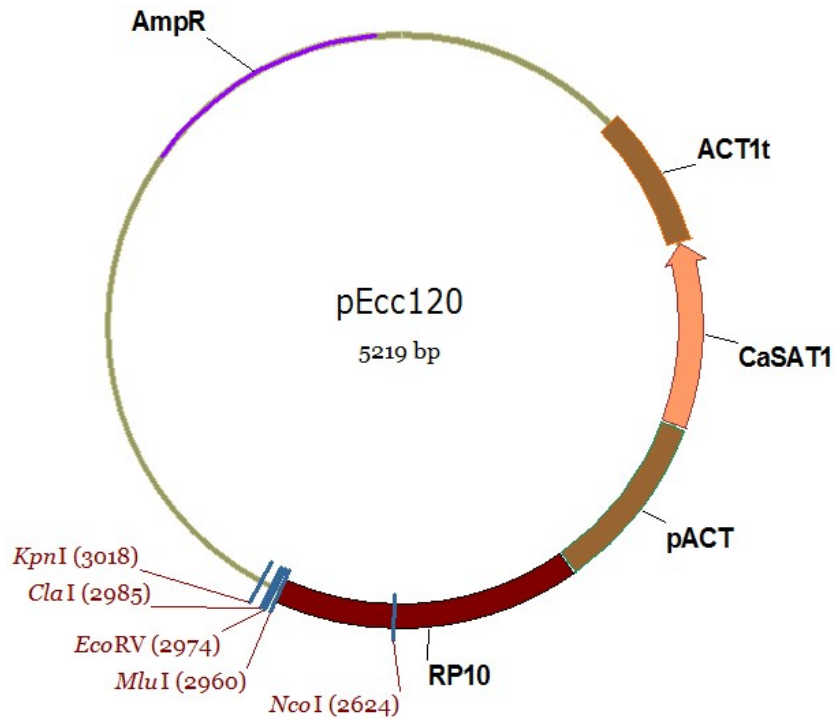


Figura III. 48. Mapa del plásmido de integración en *C. albicans*, pEcc120. (D'Enfert *et al.*, 2009).

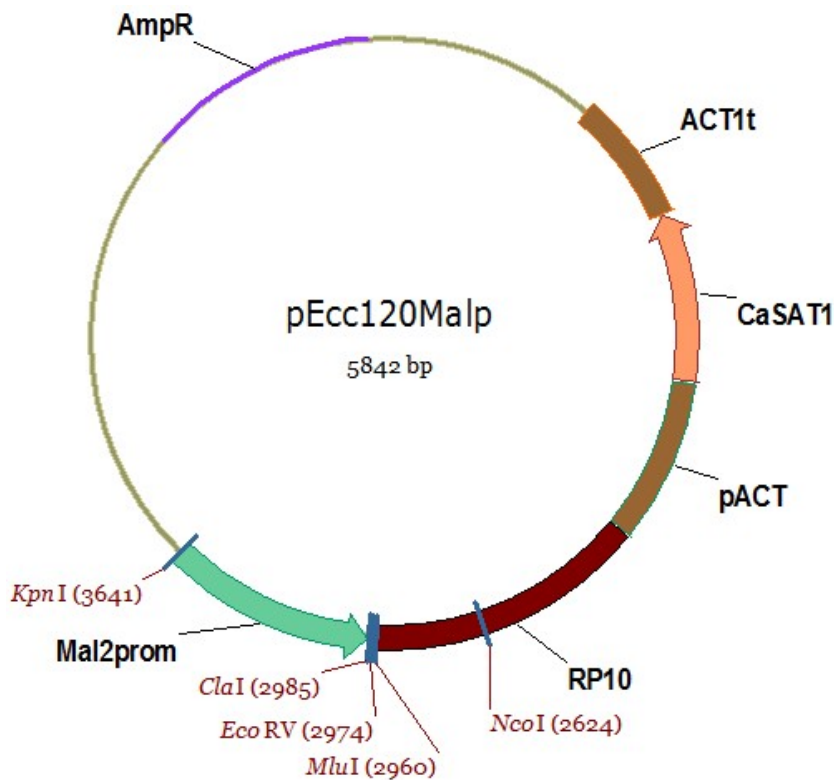


Figura III. 49. Mapa del plásmido de integración de un gen bajo promotor Maltosa en *C. albicans*. Utilizando como marcador de resistencia *CaSAT1* y como diana cromosomal el gen *RP10*.

El plásmido pEcc120 conteniendo el promotor de Maltosa (*MAL2*) fue construido en nuestro laboratorio (Micó *et al.*, comunicación personal). Los puntos de corte utilizados para la integración del promotor de maltosa en nuestra construcción fueron *KpnI* y *ClaI*. De esta manera se obtuvo el plásmido pEcc120Malp (Figura IV 49). A partir del cual fue creado el pEccMalp-PIR32, que incluía la región codificante del gen *PIR32* bajo el control de un promotor altamente expresado e inducible como es el Mal2p (Backen *et al.*, 2000).

El primer paso para la construcción del plásmido fue la clonación de la región codificante de *PIR32* por PCR utilizando los oligonucleótidos RPIR32CFw y RPIR32RvF, que poseían las dianas de restricción *MluI* y *SmaI* (ver Materiales y Métodos Tabla II.3). El amplicón obtenido fue subclonado en el plásmido pGEM-T Easy™ (Promega®), originando el plásmido pGEM-PIR32, que fue llevado a secuenciar. Tras comprobar las diferentes colonias, se seleccionó aquella que sólo contenía dos errores en su secuencia nucleotídica. Y mediante mutagénesis dirigida por PCR (ver Materiales y Métodos II. 12. 5.) fueron corregidos dichos errores obteniendo una secuencia perfecta del gen *PIR32*. Los oligonucleótidos empleados para la mutagénesis dirigida fueron PIR32\_238t/c y PIR32\_238t/cRv, para cambiar un nucleótido de timina por una citosina en la posición 238 de la secuencia. Y PIR32\_1046c/t junto con PIR32\_1046c/tRv para cambiar un nucleótido de citosina por una timina en la posición 1046 de la secuencia (ver Materiales y Métodos Tabla II.3).

A continuación el plásmido pGEM-PIR32 con la secuencia perfecta fue digerido con las enzimas de restricción *MluI* y *SmaI* para liberar la región codificante del gen. Al mismo tiempo el vector pEcc120Malp se digirió con *MluI* y *EcoRV*, abriendo el plásmido y creando de esta manera, tanto en inserto como en vector, un extremo cohesivo con el *MluI* y otro romo con *SmaI* y *EcoRV*, para asegurar la inserción del fragmento con el gen *PIR32* en la orientación correcta. Tras una ligación Ready-To-Go™ T4 DNA Ligase (GE Healthcare®) entre vector e insertos digeridos, la selección de plásmidos conteniendo el inserto fue comprobada por PCR con los oligonucleótidos RPIR32CFw y PIR32qPCRv3 (Figura III. 50).

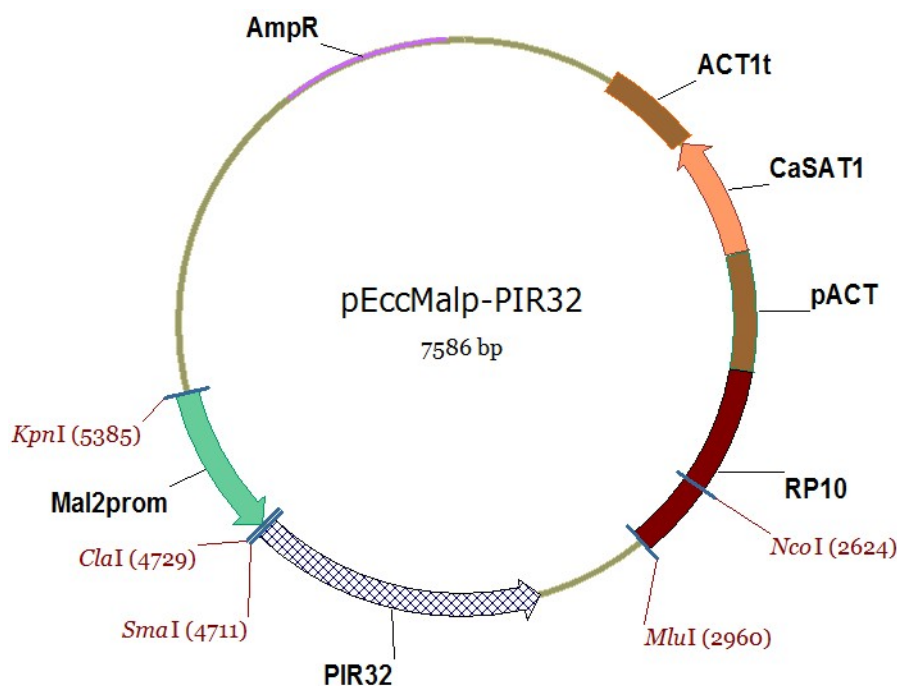


Figura III. 50. Mapa del plásmido de integración de un gen bajo promotor Maltosa en *C. albicans*. Utilizando como marcador de resistencia *CaSAT1* y como diana cromosomal el gen *RP10*.

### III. 11. 2. Integración de pEccMalp-PIR32 en el mutante *nulo*

Una vez obtenido el plásmido pEccMalp-PIR32, fue digerido con la enzima de restricción *NcoI*. La única diana de restricción para esta enzima se encuentra, como se observa en la imagen anterior (Figura III.50), cercano a la mitad de la secuencia nucleotídica del gen *RP10*. Esta digestión permitió no sólo la linealización del casete, sino además la integración dirigida por recombinación homóloga en el genoma de *C. albicans*, en concreto en el del gen *RP10* (Figura III. 51).

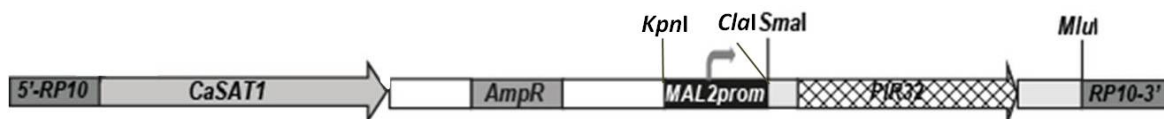
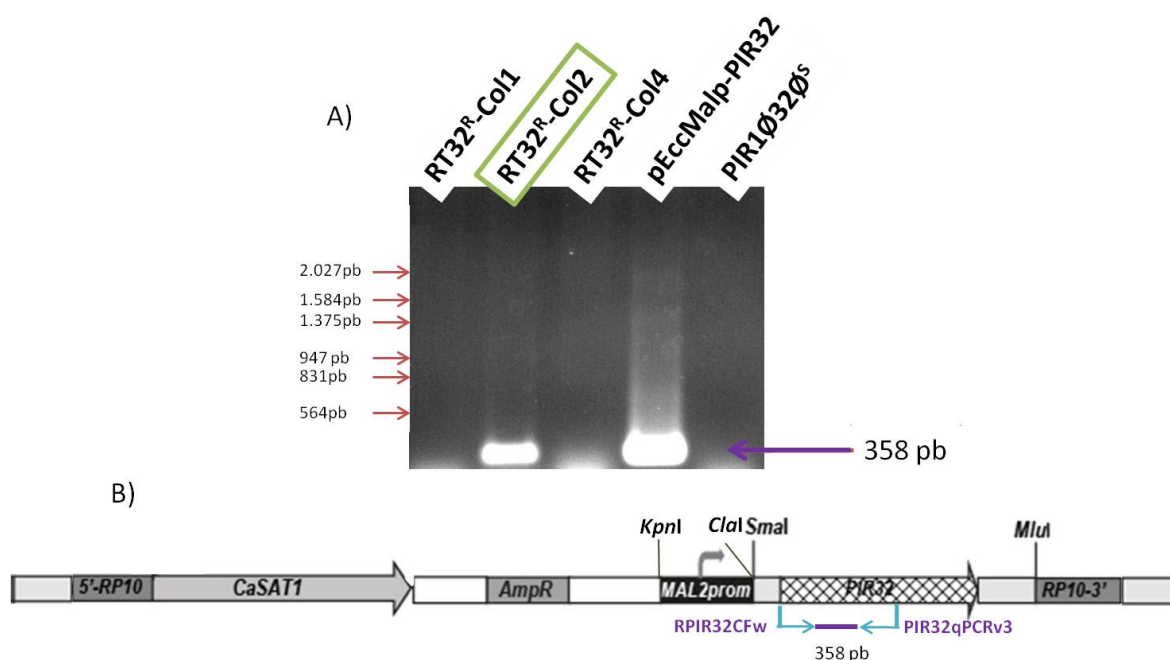


Figura III. 51. Esquema lineal del plásmido pEccMalp-PIR32 al ser cortado con *NcoI*.

La transformación empleando el plásmido pEccMalp-PIR32 linealizado en la cepa mutante PIR1Ø32Ø<sup>S</sup> para la obtención del reintegrante, fue realizada siguiendo el protocolo de Reuss *et al.*, 2004. La cepa obtenida fue denominada RT32<sup>R</sup> (*pir1Δ/pir1Δ; pir32Δ/pir32Δ/pir32::SAT1*).

### III. 11. 3. Comprobación de la cepa reintegrante RT32<sup>R</sup>

La reintegración correcta en el genoma se comprobó por PCR usando los oligonucleótidos RPIR32CFw, que hibrida en la parte inicial del gen *PIR32*, y PIR32qPCRv3, que hibrida en la zona central del gen *PIR32*. La banda de 358 pb que se amplifica, solo aparecería si el vector con el gen *PIR32* (pEccMalp-PIR32) se hubiera integrado correctamente en el *locus* correspondiente (Figura III. 52).



**Figura III. 52. Comprobación de la cepa reintegrante RT32<sup>R</sup> mediante PCR.** A) visualización del amplicón correspondiente a la reintegración de *PIR32* en el genoma de *C. albicans* mediante electroforesis en gel de agarosa utilizando los oligonucleótidos PIR2-KpnI y PIR2-SacI. B) Esquema de la disposición de los oligonucleótidos PIR2-KpnI y PIR2-SacI en el genoma de *C. albicans*.

Otra comprobación más visual es el simple hecho de sembrar en medio de cultivo YPD conteniendo una concentración de 200 µg/µl de NTC. Solamente las cepas que contengan el casete con el gen *SATI*, como es el caso del RT32<sup>R</sup>, serán capaces de crecer en dicho medio (Figura III. 53).



**Figura III. 53. Crecimiento de la cepa RT32<sup>R</sup> en medio YPD NTC 200 µg/µl (derecha de la figura).** Comprobando así la correcta integración del casete en el genoma de dicha cepa. La cepa control positivo es (arriba) la PR4 (reintegrante para PIR1<sup>ØS</sup>). Y el control negativo es (izquierda) la SC5314, cepa parental y por tanto no crece en presencia de nurseotricina.

### III. 12. ANÁLISIS FENOTÍPICO DEL REINTEGRANTE (RT32<sup>R</sup>)

El análisis fenotípico del doble mutante nulo de los genes *PIR32* y *PIR1* había revelado diversas alteraciones, procedentes de modificaciones en la integridad y/o arquitectura de su pared celular, en principio, debidas a las mutaciones inducidas en este trabajo. Para asegurarse de que el fenotipo observado en el doble mutante nulo fuera debido exclusivamente a la delección de estos genes se procedió a realizar las mismas pruebas fenotípicas pero esta vez incluyendo el reintegrante RT32<sup>R</sup>.

#### III. 12. 1. Estudio del crecimiento celular

Hasta el momento ninguna de las cepas de estudio había presentado ninguna variación en la velocidad de crecimiento respecto a la parental. No obstante, el reintegrante presentaba una disminución en la velocidad del crecimiento, que resultaba incluso más acusada si se añadía nurseotricina al medio de cultivo. De esta manera se procedió a realizar una curva de crecimiento para comparar las diferentes capacidades de crecimiento. Y puesto que la cepa PIR1<sup>ØS</sup> estaba ya descrito que presentaba un retraso en su crecimiento (Valentín, 2013; Micó, 2009), fue incorporada al estudio.



Los resultados fueron relevantes (Figura III. 54) ya que el reintegrante se comportaba muy similar al mutante para *pir1Δ/pir1Δ* en cuanto a la velocidad de crecimiento celular. Ambas (RT32<sup>R</sup> y PIR1Ø<sup>S</sup>) presentaban un crecimiento mucho más enlentecido que el resto de cepas.

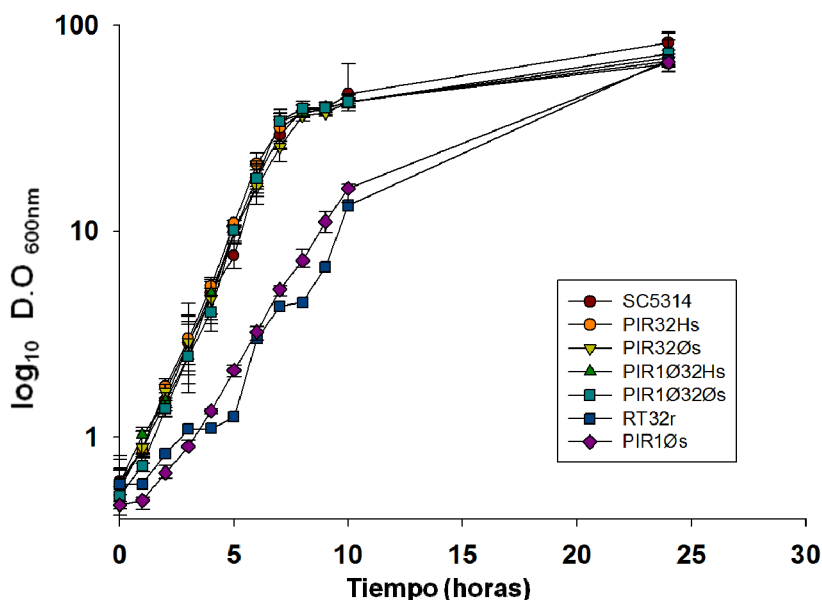
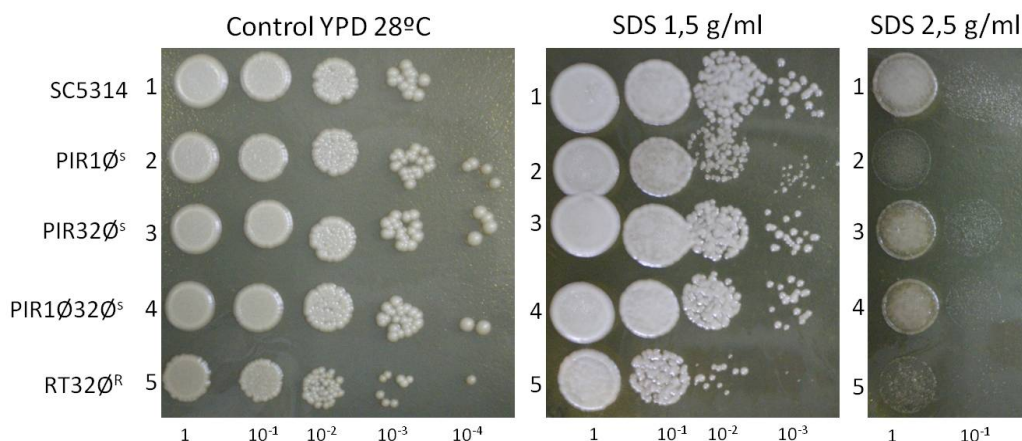


Figura III. 54. Curva de crecimiento a 28°C comparativa entre las cepas: parental (SC5314), mutante heterocigótico (PIR32H<sup>S</sup>), mutante homocigótico (PIR32Ø<sup>S</sup>), mutante heterocigótico bajo fondo genético *pir1Δ/pir1Δ* (PIR1Ø32H<sup>S</sup>), mutante homocigótico bajo fondo genético *pir1Δ/pir1Δ* (PIR1Ø32Ø<sup>S</sup>), además del reintegrante del doble mutante (RT32<sup>R</sup>) y el mutante *pir1Δ/pir1Δ* (PIR1Ø<sup>S</sup>).

### III. 12. 2. Estudio de la sensibilidad al SDS.

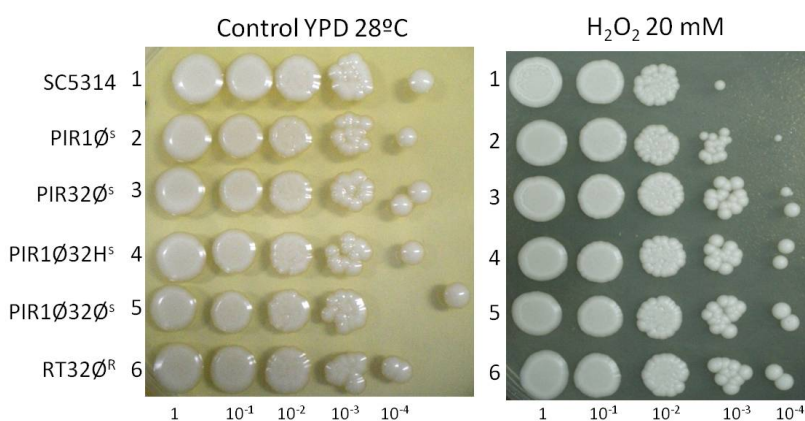
Anteriormente se había destacado una mayor sensibilidad al SDS por parte de los mutantes (ver Figura III.36). Al repetir el experimento introduciendo las cepas RT32<sup>R</sup> y PIR1Ø<sup>S</sup>, tal y como se muestra en la figura III. 55, de nuevo se manifestaron las cepas con mutaciones inducidas, más sensibles al SDS que la cepa parental. Y nuevamente el comportamiento del reintegrante es más cercano al del mutante *pir1Δ/pir1Δ*. De tal forma que a la concentración de 2,5 g/ml de SDS, casi no aparece crecimiento en las colonias de estas cepas. Las colonias de los mutantes PIR23Ø<sup>S</sup> y PIR1Ø32Ø<sup>S</sup> a esta concentración también se muestran menos crecidas que la SC5314 tal y como se había observado anteriormente.



**Figura III.55.** Sensibilidad al SDS en placas de YNB de las cepas mutantes homocigóticas obtenidas incorporando la cepa PIR1 $\Delta^S$  y la cepa reintegrante RT32 $\Delta^R$  al ensayo, y comparando con la cepa parental SC5314.

### III. 12. 3. Estudio de la sensibilidad al estrés oxidativo

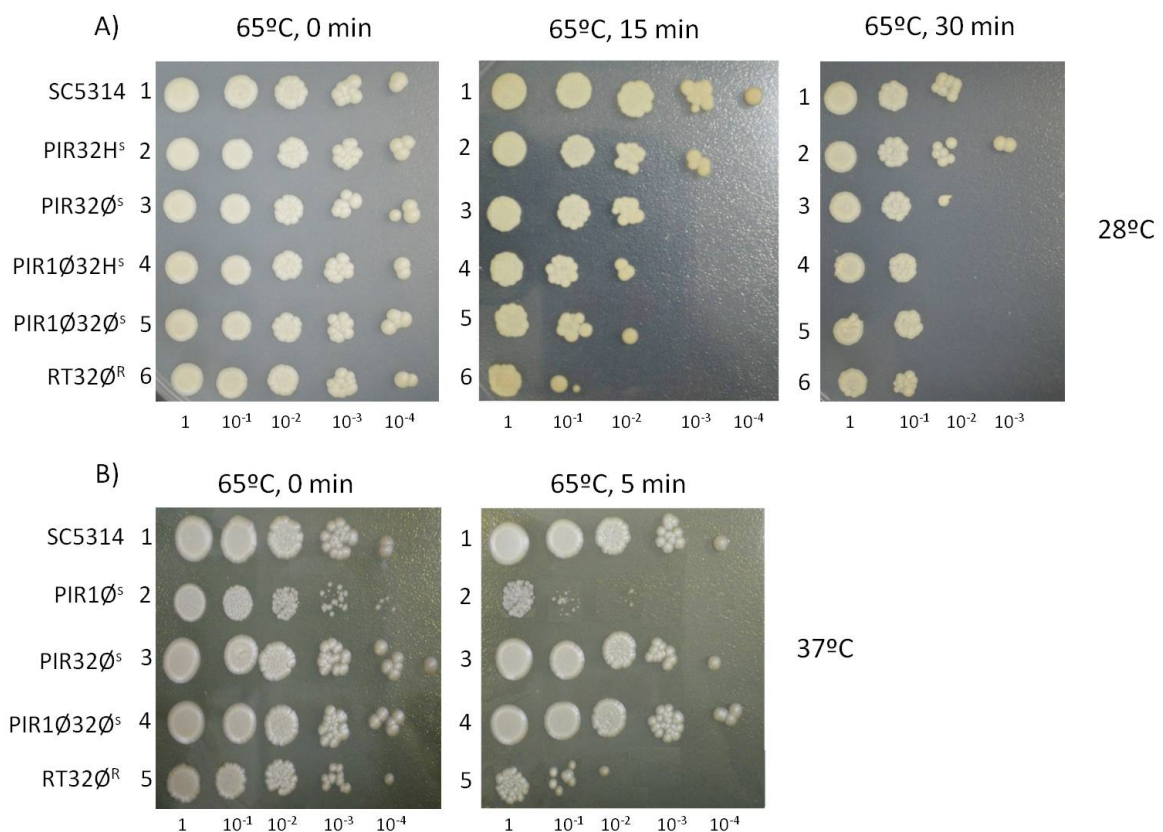
Asimismo se realizó de nuevo el estudio de sensibilidad al estrés oxidativo para el cual se empleó H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, observándose en este caso ligeras diferencias en el crecimiento. Como se aprecia en la figura III.56, se presenta una resistencia progresiva por parte de los mutantes al estrés oxidativo. De todas formas son pequeñas variaciones, y que previamente, no había dado lugar a pensar en una mayor resistencia por parte de los mutantes. Por lo que determinamos que en este ensayo, la cepa RT32 $\Delta^R$  se comporta de la misma manera que el resto de cepa, incluyendo la parental.



**Figura III. 56.** Sensibilidad al CFW en placas de YNB de las cepas mutantes homocigóticas obtenidas incorporando la cepa PIR1 $\Delta^S$  y la cepa reintegrante RT32 $\Delta^R$  al ensayo, y comparando con la cepa parental SC5314.

### III. 12. 4. Estudio de la sensibilidad al estrés térmico

Otro de los ensayos realizados para la comprobación de que las mutaciones eran las causantes de las variaciones en el comportamiento del doble mutante fue el de choque térmico. Previamente se había comprobado que los mutantes presentaban una sensibilidad creciente a la  $T^a$  que aumentaba en correlación con el número de mutaciones en su genoma. Al incorporar el reintegrante (RT32<sup>R</sup>) en el ensayo se puede determinar que su sensibilidad es más acentuada que en el resto de cepas, siendo -junto con el PIR1 $\emptyset^S$ - las más afectadas por la exposición a una elevada temperatura (Figura III.57). De hecho al comparar con todos los mutantes del gen *PIR32* a 28°C, el reintegrante demostraba una sensibilidad un poco más al estrés térmico (Figura III.57A). Por eso se realizó de nuevo el ensayo, incluyendo la cepa PIR1 $\emptyset^S$  (Figura III.57B), demostrándose como se ha observado en anteriores pruebas fenotípicas, la similitud entre el comportamiento del reintegrante con esta cepa.



**Figura III.57. Estudio de la sensibilidad al estrés térmico.** A) 15 min o 30 min a 65°C y luego crecimiento a 28°C en medio YNB. Cepas: salvaje, mutantes para *PIR32*, mutante para *PIR32* y *PIR1* y reintegrante para *PIR32*. B) 5 min a 65°C y luego crecimiento a 37°C en medio YNB. Cepas: parentales (SC5314 y PIR1 $\emptyset^S$ ), mutantes homocigóticos (PIR32<sup>S</sup> y PIR1 $\emptyset$ 32<sup>S</sup>) y reintegrante RT32<sup>R</sup>.



## **IV. DISCUSIÓN**



## IV. DISCUSIÓN

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 potenciales de gran interés 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).

Dentro de las manoproteínas de la pared celular de *C. albicans* unidas covalentemente a la estructura del glucano, se encuentran las ASL-CWP, es decir, las proteínas unidas por enlaces álcali-sensibles. Y dentro de este grupo, la familia Pir es la única descrita hasta la fecha.

Las proteínas de la familia Pir (**protein with internal repeats**) fueron descritas por primera vez en *S. cerevisiae* por Toh-e y colaboradores (1993). Estas proteínas se caracterizan por presentar un número variable de secuencias repetidas en la zona central, cuatro residuos de cisteínas en posiciones específicas en su extremo C-terminal y ser procesadas por la proteasa Kex2. En *S. cerevisiae*, se han descrito cuatro genes de familia Pir, cuya ausencia provocaba que las células estuvieran fisiológicamente muy alteradas y fueran osmóticamente muy sensibles (Mazán *et al.*, 2008). La importancia de la familia de las proteínas Pir en *S. cerevisiae* ha llevado a nuestro grupo de investigación al estudio de las mismas en *C. albicans*.

Martínez y colaboradores (2004) estudiaron el gen *PIR1* de *C. albicans* bajo fondo genético CAI4. Se observó que los dos alelos que codifican para el gen *PIR1*, no eran idénticos, sino que un alelo poseía dos repeticiones internas más que el otro alelo del mismo gen. Las cepas heterocigóticas obtenidas con la disrupción de uno u otro alelo del *PIR1*, crecían lentamente y mostraban anomalías en la morfología, así como una tendencia a flocular y alta sensibilidad al blanco de calcoflúor y al rojo Congo, en comparación con la parental CAI4. Esta observación sugirió una contribución de esta proteína a la arquitectura de la pared celular. Además la imposibilidad de obtener una delección homocigótica indicaba una aparente esencialidad del gen *PIR1*. No obstante, Micó (2009), trabajando bajo un fondo genético distinto (cepa salvaje SC5314), en el que no habían mutaciones inducidas, como sucede en la cepa CAI4, obtuvo el mutante homocigótico *pir1Δ/pir1Δ* demostrando la no esencialidad del gen.

A semejanza de *S. cerevisiae*, que posee 4 miembros de la familia Pir, se pensó que también podrían haber otros miembros de la familia de proteínas Pir, además de la proteína Pir1, en *C. albicans*. Por ello se realizó una búsqueda *in silico* de posibles candidatos. Al realizar un BLAST (Altschul *et al.*, 1997) de la proteína Pir1 frente a la base de datos de *C. albicans* se encontró la proteína Pir32. Esta proteína objeto de estudio del presente trabajo, aparecía en la base de datos, indicando que el gen *PIR32* que codifica para esta proteína se expresa abundantemente en células de *C. albicans* fagocitadas por macrófagos, comparando con organismos no digeridos (Fernández-Arenas *et al.*, 2007). Hasta ese momento esta proteína no había sido aislada de las paredes celulares.



Un primer análisis *in silico* del gen *PIR32*, reveló que podría codificar una proteína de pared celular de la familia Pir ya que contiene las 4 Cys en la posición conservada además de una secuencia aminoacídica con elevada homología con la región repetida en esta familia de proteínas. Esto indicaba que Pir32 podría ser un miembro de esta familia.

La secuencia aminoacídica muestra que Pir32p contiene en posición N-terminal una señal hidrofóbica correspondiente al péptido señal; dispone de un 11,3 % de serinas y treoninas localizadas en la parte central, susceptibles de ser O-glicosiladas; cuatro sitios putativos de N-glicosilación; y una zona central hidrofílica debido al elevado número de residuos aminoacídicos de carácter hidrofílico con grupos reactivos como glutámico y aspártico. Con estos datos se podría determinar que esta proteína, al replegarse sobre sí misma en la estructura terciaria de la proteína, dejaría en la superficie una oquedad correspondiente a los aminoácidos de la zona central (hidrófilos) como centro activo para la unión con el ligando, quedando pues la zona hidrófoba dispuesta hacia el interior teniendo como misión mantener la forma y la estructura que se precisa para que el centro activo se encuentre en la posición correcta.

Además fue llevada a cabo una búsqueda de homólogos de la secuencia aminoacídica de Pir32 en distintas bases de datos de diferentes especies, géneros y organismos utilizando el programa BLAST y FASTA (Altschul *et al.*, 1997). Los resultados del análisis revelaron dos proteínas ortólogas: la proteína Cd36 de *C. dubliniensis* y la proteína Mya-3404 de *C. tropicalis*. Las homologías más acusada al comparar las tres proteínas fueron en las 4 cisteínas conservadas, en los motivos repetidos con la secuencia conservada QIHDGQVQ, y en la región carboxilo del extremo C-terminal. El hecho de que aún comparando en diferentes organismos, sólo en *Candida* hayan aparecido proteínas homólogas, nos plantea la hipótesis de si esta proteína pudiera ser específica del género *Candida*.

Para determinar la importancia y el papel de esta proteína dentro de la estructura celular se obtuvieron los mutantes correspondientes mediante el método descrito por Reuss y colaboradores (2004), en la que se empleó como cepa parental *C. albicans* SC5314 que no poseía ninguna mutación en su genoma que pudiese alterar los resultados obtenidos. La obtención del mutante homocigótico *pir32Δ/pir32Δ* demostró la no esencialidad de este gen.

No sólo resultó el gen *PIR32* no esencial para la célula, sino que además los posteriores análisis fenotípicos realizados en los mutantes obtenidos no muestran prácticamente ninguna diferencia significativa en el comportamiento de los mutantes *PIR32H<sup>S</sup>* y *PIR32Ø<sup>S</sup>* comparándolo con la cepa silvestre SC5314. La ausencia de susceptibilidad a agentes perturbadores de la pared celular fue bastante inesperado, puesto que de la disrupción de una proteína integral de la pared celular se esperaría que resultara en un aumento de la susceptibilidad, al igual que en el caso de la proteína Pir1 de *C. albicans* y la familia de proteínas Pir de *S. cerevisiae* (Bahnan, 2012).

Para una mejor caracterización del efecto de la delección de *PIR32* en la construcción de la pared celular se realizaron diferentes pruebas fenotípicas. De las mismas se pudo extraer que las cepas *PIR32H<sup>S</sup>* y *PIR32Ø<sup>S</sup>* se muestran ligeramente más sensibles a la zimoliasa, la cual es una sustancia que altera específicamente la integridad de la pared celular al degradarla enzimáticamente, principalmente por su actividad  $\beta$ -1,3 glucanasa (Bermejo *et al.*, 2008). También las cepas mutantes son capaces de filantar en medio sólido Spider, a diferencia de la parental. Asimismo aparece en las cepas mutantes una disminución de la mortalidad de alrededor de la mitad que la cepa parental. Los resultados nos muestran que la disrupción del gen ha provocado ligeras modificaciones en la composición de la pared celular pero no acusadas ya que la cepa sigue manteniendo la misma sensibilidad a las drogas que la cepa parental (MacPherson *et al.*, 2005).

Al comparar estos resultados con el estudio de Bahnan y colaboradores (2012) realizado sobre la misma proteína, Pir32 pero bajo fondo genético alterado (CAI4), se observan discrepancias entre ambos estudios. De manera que se observan diferencias significativas en los resultados de las pruebas fenotípicas, mostrándose el mutante *pir32Δ/pir32Δ* hiperfilamentoso, con mayor resistencia frente a sustancias como SDS, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y NaCl, y más virulenta en un modelo murino. Hay que tener en cuenta que para la obtención de los mutantes así como para la realización de las pruebas fenotípicas descritas por Bahnan y colaboradores (2012) fue utilizado como fondo genético de partida la cepa modificada CAI4, en vez de un fondo genético limpio, como la SC5314, cepa parental del presente estudio. Cabe añadir que en el estudio de Bahnan y colaboradores (2012) no se realizaron estudios con el gen reintegrado, lo cual lleva a cuestionarse si las diferencias encontradas son debidas a la ausencia del gen o efectos pleiotrópicos adicionales a las mutaciones que presenta la cepa CAI4. Esta diferencia

entre ambas conclusiones, nos demuestra la importancia de utilizar cepas silvestres a la hora de realizar estudios de interrupción génica (Ahmad *et al.*, 2008).

A la vista de los resultados obtenidos de las pruebas fenotípicas referentes a los mutantes para el gen *PIR32*, que indicaban mínimas diferencias en el comportamiento y morfología de las cepas en comparación con la cepa parental, se sugirió la posibilidad de un mecanismo compensatorio, el cual permitiría a la célula suplir la carencia de la proteína Pir32. Puesto que la proteína Pir1 es el otro miembro de la familia Pir de *C. albicans*, se hipotetizó que la célula alterada podría producir una sobreexpresión del gen *PIR1* codificante de esta proteína, para compensar la delección de *PIR32*. Efectivamente en el mutante *pir32Δ/pir32Δ* se encontró una sobreexpresión de un 50% del gen *PIR1*, al igual que en el mutante *pir1Δ/pir1Δ* se encontró una sobreexpresión del gen *PIR32*. Ello podría indicar la complementariedad entre ambas proteínas para mantener la estructura de la pared celular.

En *S. cerevisiae* la ausencia de las cuatro proteínas Pir causan alteraciones muy importantes en la célula (Mazán *et al.*, 2008). Sin embargo, en *C. albicans* la ausencia de ambas proteínas no producía alteraciones significativas, el doble mutante se asemejaba más su comportamiento a la más a la cepa silvestre que al mutante *pir1Δ/pir1Δ*. Ello podría indicar una interregulación entre Pir1 y Pir32 de *C. albicans*.

La primera diferencia evidente se observó frente al blanco de calcoflúor, en cuyo ensayo se hace patente una mayor resistencia del doble mutante (*PIR10320<sup>S</sup>*) a concentraciones entre 100 y 200 µg/ml. Este resultado podría indicar la activación de una ruta compensatoria de la integridad celular en respuesta a daños sobre la pared de la levadura, producidos por una alteración en los componentes de la pared celular de *C. albicans*. La mayoría de las mutaciones en la pared celular conducen a la formación de una pared celular alterada susceptibles a drogas, estrés oxidativo y agentes antifúngicos (Dib *et al.*, 2008; Chaffin *et al.*, 1998). No obstante, recientemente se ha demostrado que en muchos casos la célula presenta una mayor resistencia a agentes perturbadores de la pared celular como pueden ser la caspofungina o el blanco de calcoflúor. Esto es debido a que la célula compensa la ausencia de la proteína en su pared celular mediante el engrosamiento de la pared, principalmente a través del aumento de la deposición de quitina (Plaine *et al.*, 2008), hecho que nosotros no observamos en ninguno de los mutantes obtenidos.

Otras diferencias de sensibilidad en cuanto a las cepas mutadas en los dos genes *PIR* se observaron frente a SDS, estrés térmico y zimoliasa. De manera que las cepas carentes de Pir1 y -de manera parcial o total- de Pir32, se mostraban ligeramente más sensibles a SDS. En cuanto a la susceptibilidad al estrés térmico, las cepas con ambos genes *PIR1* y *PIR32* interrumpidos presentaron mayores dificultades para adaptarse a elevadas temperaturas, sobre todo  $PIR1\Delta 32\Delta^S$ , lo cual podría indicar una alteración en la vía de señalización de las chaperonas y proteínas de estrés térmico, siendo incapaz el microorganismo de responder de forma efectiva a este cambio (Russo *et al.*, 1992). La siguiente diferencia se observa en la sensibilidad a la zimoliasa. En los resultados se muestran en las curvas de lisis celular por la acción de la zimoliasa una recuperación del fenotipo silvestre por parte de los dobles mutantes hetero- y homocigótico en comparación con los mutantes sólo para el gen *PIR32*. Si se tiene en cuenta que la acción de la zimoliasa al degradar el  $\beta$ -1,3 glucano activa la vía de señalización de la Slt2p MAP quinasa (Ketela *et al.*, 1999; De Nobel *et al.*, 2000), se podría interpretar que la cinética de la respuesta compensatoria en el caso del doble mutante origina una respuesta que logra contrarrestar las deficiencias producidas por ambas proteínas. 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 las dos proteínas conjuntamente. Estas observaciones confirman 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 y apuntan a que los diferentes componentes de la pared celular podrían estar en concentraciones alteradas en los correspondientes mutantes.

Las alteraciones observadas hizo que se propusieran -como ensayos necesarios para la determinación de la alteración de la pared celular de dichos mutantes- estudios de inducción de cambio dimórfico y de miceliación en medio sólido. El estudio de inducción de cambio dimórfico proporciona un modelo experimental muy sencillo y accesible para poder investigar cambios de desarrollo morfogénico (Niimi *et al.*, 1996), se basa en el sistema de conversión blastospora-hifa comienza con la emisión de una estructura inicial denominada tubo germinativo. Del estudio de inducción de cambio dimórfico, sólo cabe señalar la presencia de una nueva morfología en el medio en el cual se encuentra presente la cepa del doble mutante, donde las formas de

levaduras de esta cepa adoptan morfología de pseudohifa e incluso aparecen varios tubos germinativos de una misma blastocondia, que podrían considerarse gemaciones secundarios o reversiones de hifa a levadura (Soll *et al.*, 2003). Respecto al estudio de miceliación en medio sólido, en medio Spider en todas las cepas mutantes aparecían hifas periféricas. Este dato indicaría una relación entre la proteína Pir32 y la miceliación en medios sólidos.

Se realizaron estudios de Microscopía Electrónica de Transmisión que pusieron en evidencia cambios en la estructura de la pared celular en las cepas mutantes. Este estudio nos confirmaban los resultados obtenidos previamente en los que la cepa doble mutante presentaba una estructura de la pared celular más parecida a la cepa silvestre que a la mutante *pir32Δ/pir32Δ*. Esta alteración es muy patente en el caso del mutante de *pir1Δ/pir1Δ* (Micó, comunicación personal). Mientras que a nivel de microscopía sí que se observaron diferencias entre el mutante *pir1Δ/pir1Δ* y el resto de mutantes, estas diferencias no se reflejaron en la composición de polímeros de la pared.

Con la intención de poder localizar la proteína Pir32 en la pared celular, y así conocer no sólo su unión a la pared, sino averiguar más sobre su función en la célula, se llevaron a cabo análisis cualitativos del patrón de proteínas de las paredes celulares aisladas mediante Western-blot, tanto de la cepa parental como de las cepas mutantes: PIR1 $\emptyset^S$ , PIR32 $\emptyset^S$  y PIR1 $\emptyset$ 32 $\emptyset^S$ . Solamente en el perfil proteico tratado con NaOH se detectaron algunas diferencias, pero que no resultan determinantes a la hora de localizar a la proteína. De los resultados obtenidos se podría interpretar que la proteína Pir32 a nivel de la pared celular interacciona con Pir1p, de manera que cuando falta la proteína Pir1 el perfil proteico de Pir32 aparece a un peso molecular más bajo, puesto que el perfil proteico del doble mutante PIR1 $\emptyset$ 32 $\emptyset^S$  es prácticamente idéntico al del PIR1 $\emptyset^S$ . Así pues podríamos exponer que la proteína Pir32 puede estar unida al  $\beta$ -1,3-glucano y al mismo tiempo a la Pir1p. De manera que cuando no se codifica la proteína Pir1, la proteína Pir32 o no aparece directamente o se podría encontrar unida solamente al  $\beta$ -1,3-glucano y podría ser una especie proteica con un tamaño inferior a 130 KDa. No podemos concluir experimentalmente que la proteína Pir32 se encuentre unida directamente al  $\beta$ -1,3-glucano; sin embargo, por el análisis *in silico* de su secuencia aminoacídica sí que podemos concluir tal tipo de unión al tener una región repetitiva interna conservada, en la que la glutamina presente puede participar en el enlace (Ecker, 2006).

En diversos trabajos realizados tanto en *S. cerevisiae* (Ecker, 2006) como en *C. albicans* (Moreno-Ruíz, 2009) las mutaciones aditivas en genes de pared celular resultaban en células fisiológicamente muy alteradas. Mientras que la mutación de cada uno de los genes por separado no tenía una alteración fenotípica acusada, cuando se disrupcionaban dos o más genes fisiológicamente relacionados, ello se traducía en una alteración fenotípica importante. En nuestro caso, mientras que la ausencia de Pir1 se manifestaba en una ausencia total de virulencia (Micó, comunicación personal) y en el caso del *PIR32* su ausencia no se manifestaba en cambios fenotípicos apreciables, cuando estaban ausentes ambos genes, el efecto fenotípico de la mutación *PIR1* era revertido a un efecto similar al de la cepa silvestre. Esto podría indicar una dominancia de la mutación en el gen *PIR32* frente a la mutación en el gen *PIR1*. El mecanismo por el cual actuaría esta dominancia lo desconocemos actualmente y sería objeto de estudio en el futuro.

Los efectos fenotípicos observados en el mutante  $PIR1\Delta PIR32\Delta^S$  fueron comprobados que eran debidos exclusivamente a las interrupciones de los genes *PIR1* y *PIR32* puesto que la cepa reintegrante RT32<sup>R</sup> se comportó más como la cepa mutante *pir1Δ/pir1Δ* que como el doble mutante. Como habíamos mencionado anteriormente la supuesta dominancia de la mutación sobre el gen *PIR32* sobre la mutación en el gen *PIR1*, conllevaría que en el momento en el que se reintegra una copia del gen *PIR32* la célula recupera en parte el fenotipo de la cepa  $PIR1\Delta^S$ , es decir recupera el fenotipo de la cepa parental empleada para el mutante en ambos genes. Como se extrae de los resultados de curvas de crecimiento celular, sensibilidad térmica y al SDS, la cepa reintegrante se comporta de forma más análoga al mutante *pir1Δ/pir1Δ* que al mutante correspondiente a una sola copia de dicho gen *PIR32*, perteneciente a la cepa  $PIR1\Delta PIR32\Delta^S$ . No se consideró oportuna realizar la reintegración del gen *PIR32* en el mutante *pir32Δ/pir32Δ*, puesto que las diferencias fenotípicas eran mínimas respecto a la cepa parental.

## **V. CONCLUSIONES**





## V. CONCLUSIONES

1. El análisis *in silico* de la base de datos de *C. albicans* ha permitido identificar un nuevo miembro de la familia Pir, llamado Pir32, que posee todas las características de esta familia de proteínas.
2. La proteína Pir32 presenta un elevado grado de homología con otras proteínas pertenecientes a *C. dubliniensis* y a *C. tropicalis*. El no estar presente en otros géneros podría indicar la especificidad para el género *Candida*.
3. El gen *PIR32* no es un gen esencial.
4. No se observaron diferencias fenotípicas significativas en los mutantes para el gen *PIR32*.
5. En un fondo genético *pir32Δ/pir32Δ* el gen *PIR1* se encuentra sobreexpresado, lo que apuntaría a que el aumento de esta proteína complementa la ausencia de Pir32.
6. La ausencia conjunta de los genes *PIR1* y *PIR32* no es letal para la célula.
7. El mutante nulo *pir32Δ/pir32Δ* y el doble mutante nulo *pir1Δ/pir1Δ, pir32Δ/pir32Δ* presentan una menor virulencia que la cepa parental. La proteína Pir32 es importante en la virulencia de *C. albicans*.
8. El doble mutante *PIR1* y *PIR32* es más resistente al blanco de calcoflúor y más sensible al SDS y a la temperatura.
9. En los resultados obtenidos relacionados con la morfología de colonias en medio sólido Spider, todas las cepas mutantes para el gen *PIR32* desarrollan micelios, no así la cepa parental. Por tanto indicaría que la proteína *pir32* está implicada en este proceso.
10. La mutación *pir32Δ/pir32Δ* es dominante sobre la mutación *pir1Δ/pir1Δ*.



## **VI. BIBLIOGRAFÍA**



## VI. BIBLIOGRAFÍA

- Ahmad, A., Kabir, M.A., Kravets, A., Andaluz, E., Larriba, G., Rustchenko, E.** 2008. Chromosome instability and unusual features of some widely used strains of *Candida albicans*. *Yeast*. **25(6)**:433-48.
- 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 bzip 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 highosmolarity glycerol response pathway. *Mol. & Cell. Biol.* **14**: 4135-4144.
- Albrecht, A., Felk, A., Pichova, I., Naglik, J.R., Schaller, M., de Groot, P., Maccallum, D., Odds, F.C., Schäfer, W., Klis, F., Monod, M. & Hube, B.** 2006. Glycosylphosphatidylinositol-anchored proteases of *Candida albicans* target proteins necessary for both cellular processes and host-pathogen interactions. *J Biol Chem.* **281(2)**:688-94.
- Altschul, S.F., Madden, T.L., Schäffer, A.A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W. & Lipman, D.J.** 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.* **25(17)**:3389-402.
- Argüelles, J.C.** 2000. Physiological roles of trehalose in bacteria and yeast: a comparative analysis. *Arch. Microbiol.* **174**: 217-224.
- Backen, A.C., Broadbent, I.D., Fetherston, R.W., Rosamond, J.D.C., Schnell, N.F. & Stark, M.J.R.** 2000. Evaluation of the *CaMAL2* promoter for regulated expression of genes in *Candida albicans*. *Yeast*. **16**:1121-29.
- Bahnan, W., Koussa, J., Younes, S., Abi Rizk, M., Khalil, B., El Sitt, S., Hanna, S., El-Sibai, M. & Khalaf, R.A.** 2012. Deletion of the *Candida albicans* *PIR32* results in increased virulence, stress response, and upregulation of cell wall chitin deposition. *Mycopathologia*. **174(2)**:107-19.
- Ballou, C.E.** 1990. Isolation, characterization, and properties of *Saccharomyces cerevisiae* *mn* mutants with non-conditional protein glycosylation defects. *Methods Enzymol.* **185**: 440-470.
- Beauvais, A., Bruneau, J.M., Mol, P.C., Buitrago, M.J., Legrand, R. & Latge, J.P.** 2000. The glucan synthase complex of *Aspergillus fumigatus*. *J Bacteriol.* **83**: 2273-2279.
- Benaroudj, N., Lee, D.H. & Golgberg, 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.
- Berlett, B.S. & Standtman, E.R.** 1997. Protein oxidation in aging, disease and oxidative stress. *J. Biol. Chem.* **272**: 20313-20316.
- Bermejo, C., Rodríguez, E., García, R., Rodríguez-Peña, J.M., Rodríguez de la Concepción, M.L., Rivas, C., Arias, P., Nombela, C., Posas, F. & Arroyo, J.** 2008. The sequential activation of the yeast *HOG* and *SLT2* pathways is required for cell survival to cell wall stress. *Mol Biol Cell.* **19(3)**:1113-24.

- 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(2)**:348-76.
- Borg von Zepelin, M., Beggah, S., Boggian, K., Sanglard, D. & Monod, M.** 1998. The expression of the secreted aspartyl proteinase Sap4 to Sap6 from *Candida albicans* in murinemacrophages. *Mol Microbiol.* **28**:543-554.
- 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.
- Brand, A.** 2012. Hyphal growth in human fungal pathogens and its role in virulence. *Int J Microbiol.* **2012**:517529.
- Brand, A., MacCallum, D. M., Brown, A. J. P., Gow, N. A. R. & Odds, F. C.** 2004. Ectopic expression of *URA3* can influence the virulence phenotypes and proteome of *Candida albicans* but can be overcome by targeted reintegration of *URA3* at the *RPS10* locus. *Eukaryotic cell.* **3 (4)**: 900–909
- Braun, B.R. & Johnson, A.D.** 2000. *TUP1*, *CPH1* and *EFG1* make independent contributions to filamentation in *Candida albicans*. *Genetics.* **155**:57-67.
- Brown, A.J.P.** 2002. Morphogenetic signalling pathways in *Candida albicans*. In R.A. Calderone (ed), *Candida and candidiasis*. p95-106.
- Brown, V., Sexton, J.A. & Johnston, M.** 2006. A glucose sensor in *Candida albicans*. *Eukaryot Cell.* **5(10)**:1726-37.
- Butler, G., Rasmussen, M.D., Lin, M.F., Santos, M.A., Sakthikumar, S., Munro, C.A., Rheinbay, E., Grabherr, M., Forche, A., Reedy, J.L., Agrafioti, I., Arnaud, M.B., Bates, S., Brown, A.J., Brunke, S., Costanzo, M.C., Fitzpatrick, D.A., de Groot, P.W., Harris, D., Hoyer, L.L., Hube, B., Klis, F.M., Kodira, C., Lennard, N., Logue, M.E., Martin, R., Neiman, A.M., Nikolaou, E., Quail, M.A., Quinn, J., Santos, M.C., Schmitzberger, F.F., Sherlock, G., Shah, P., Silverstein, K.A., Skrzypek, M.S., Soll, D., Staggs, R., Stansfield, I., Stumpf, M.P., Sudbery, P.E., Srikantha, T., Zeng, Q., Berman, J., Berriman, M., Heitman, J., Gow, N.A., Lorenz, M.C., Birren, B.W., Kellis, M. & Cuomo, C.A.** 2009. Evolution of pathogenicity and sexual reproduction in eight *Candida* genomes. *Nature.* **459(7247)**:657-62.
- Calderone, R., Suzuki, S., Cannon, R., Cho, T., Boyd, D., Calera, J., Chibana, H., Herman, D., Holmes, A., Jeng, H.W., Kaminishi, H., Matsumoto, T., Mikami, T., O'Sullivan, J.M., Sudoh, M., Suzuki, M., Nakashima, Y., Tanaka, T., Tompkins, G.R. & Watanabe, T.** 2000. *Candida albicans*: adherence, signaling and virulence. *ed Mycol.* **38(Suppl 1)**:125-37.
- Calderone, R.A. & Braun, P.C.** 1991. Adherence and receptor relationships of *Candida albicans*. *Microbiol Rev.* **55(1)**:1-20.
- Calderone, R.A. & Fonzi, W.A.** 2001. Virulence factors of *Candida albicans*. *Trends Microbiol.* **9**:327-335.
- Calderone, R.A.** 1993. Recognition between *Candida albicans* and host cells. *Trends Microbiol.* **1(2)**:55-8.
- 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., Mrs̃a, V. & Tanner, 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**:1477-89.

- Casadevall, A., Dadachova, E. & Pirofski, L. 2004. Passive antibody therapy for infectious diseases. *Nature Rev Microbiol.* **2**: 695-703.
- Casadevall, A., Feldmesser & M., Pirofski, L.A. 2002. Induced humoral immunity and vaccination against major human fungal pathogens. *Curr Opin Microbiol.* **5(4)**:386-91.
- Casanova, M. & Chaffin, W.L. 1991. Cell wall glycoproteins of *Candida albicans* as released by different methods. *J Gen Microbiol.* **137(5)**:1045-51.
- Casanova, M., Gil, M.L., Cardenoso, L., Martinez, J.P. & Sentandreu, R. 1989. Identification of wall-specific antigens synthesized during germ tube formation by *Candida albicans*. *Infect Immun.* **57**:262-271.
- 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., Martinez, A.I., Garcera, A., Elorza, M.V., Valentin, 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.
- Castrillón Rivera, L.E., Palma Ramos, A. & Padilla Desgarenes, C. 2005. Factores de virulencia en *Candida spp.* *Dermatología Rev Mex.* **49**:12-27.
- Chaffin, W.L. 2008. *Candida albicans* cell wall proteins. *Microbiol Mol Biol Rev.* **72(3)**:495-544.
- Chaffin, W.L., Lopez-Ribot, J.L., Casanova, M., Gozalbo, D. & Martínez, J.P. 1998. Cell wall and secreted proteins of *Candida albicans*: identification, function and expresión. *Microbiol Mol Biol Rev.* **62(1)**:130-80.
- Chen, Y.C., Wu, C.C., Chung, W.L. & Lee, F.J. 2002. Differential secretion of Sap4-6 proteins in *Candida albicans* during hyphae formation. *Microbiology.* **148**:3743-3754.
- Clemons, K.V., Calich, V.L., Burger, E., Filler, S.G., Graziutti, M., Murphy, J., Roilides, E., Campa, A., Dias, M.R., Edwards, J.E. Jr, Fu, Y., Fernandes-Bordignon, G., Ibrahim, A., Katsifa, H., Lamaignere, C.G., Meloni-Bruneri, L.H., Rex, J., Savary C.A. & Xidieh, C. 2000. Pathogenesis I: interactions of host cells and fungi. *Med Mycol.* **38** Suppl **1**:99-111.
- 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.
- Cornely, O. A., Ullmann, A. J. & Karthaus, M. 2001. Antimykotische Prophylaxe neutropenischer Patienten. *Wien Med Wochenschr.* **151(3-4)**:73-9.
- Craig, E., Gambill, B. D. & Nelson, R. J. 1993. Heat shock proteins: Molecular chaperones of protein biogenesis. *Microbiol.* **57**:402-414.
- Crowe, J.D., Sievwright, I.K., Auld, G.C., Moore, N.R., Gow, N.A. & Booth, N.A. 2003. *Candida albicans* binds human plasminogen: identification of eight plasminogen-binding proteins. *Mol Microbiol.* **47(6)**:1637-51.
- Crowe, J.H. 2007. Trehalose as a “chemical chaperone”: fact and fantasy. *Med. Biol.* **594**:143-158.
- Crowe, J.H., Crowe, L.M. & Chapman, D. 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.
- Crump, J.A. & Collignon, P.J. 2000. Intravascular catheter-associated infections. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* **19(1)**:1-8.

- Cutler, J.E., Deepe, G.S. Jr., & Klein, B.S. 2007. Advances in combating fungal diseases: vaccines on the threshold. *Nat Rev Microbiol.* **5(1)**:13-28.
- d'Enfert, C., Goyard, S., Rodríguez-Arnaveilhe, S., Frangeul, L., Jones, L., Tekaiia, F., Bader, D., Antje Albrecht., Castillo, L., Domínguez, A., Ernst, J.F., Fradin, C., Gaillardin, C., García-Sánchez, S., de Groot, P., Hube, B., Klis, F.M., Krishnamurthy, S., Kunze, D., Lopez, M.C., Mavor, A., Martin, N., Moszer, I., Onésime, D., Perez Martin, J., Sentandreu, R., Valentin, E. & Brown, A.J.P. 2005. Candida DB: a genome database for *Candida albicans* pathogenomics. *Nucleic. Acids. Res.*, **33**:D353-D357.
- de Groot, P.W. & Brandt, B.W. 2012. ProFASTA: a pipeline web server for fungal protein scanning with integration of cell surface prediction software. *Fungal Genet Biol.* **49(2)**:173-9.
- de Groot, P.W.J., Hellingwerf, K.J. & Klis, F.M. 2003. Genome-wide identification of fungal GPI proteins. *Yeast.* **20**:781-796.
- De la Calle-Rodríguez, N., Santa-Vélez, C. & Cardona-Castro, N. 2012. Factores de virulencia para la infección de tejidos queratinizados por *Candida albicans* y hongos dermatofitos. *Rev CES Med.* **26(1)**:43-55
- de Nobel, H., Ruiz, C., Martin, H., Morris, W., Brul, S., Molina, M. & Klis, F.M. 2000. Cell wall perturbation in yeast results in dual phosphorylation of the Slt2/Mpk1 MAP kinase and in an Slt2-mediated increase in FKS2-lacZ expression, glucanase resistance and thermotolerance. *Microbiology.* **146 (Pt 9)**:2121-2132.
- 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., Priem, J., Munnik, T. & Van den Ende, H. 1990. The glucanase-soluble mannoproteins limit cell wall porosity in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast.* **6**: 491-499.
- Deacon, J. W. 2006. FUNGAL BIOLOGY 4<sup>th</sup> Edition. En: Blackwell Publishing Ltd. The diversity of fungi and fungus-like organisms (pp. 16-47).
- Deepe, G.S. Jr. 1997. Prospects for the development of fungal vaccines. *Clin Microbiol Rev.* **10(4)**:585-96.
- Delgado, M.L., O'Connor, J.E., Azorín, I., Renau-Piqueras, J., Gil, M.L. & Gozalbo, D. 2001. The glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase polypeptides encoded by the *Saccharomyces cerevisiae* TDH1, TDH2 and TDH3 genes are also cell wall proteins. *Microbiology.* **147**:411-417.
- d'Enfert, C. 2009. Hidden killers: persistence of opportunistic fungal pathogens in the human host. *Curr Opin Microbiol.* **12(4)**:358-64.
- Develoux, M. 2001. Griseofulvin. *Ann Dermatol Venereol.* **128**:1317-1325.
- Dib, L., Hayek, P., Beyrouthy, B. & Khalaf, R. 2008. The *C. albicans* Ddr48 protein is essential for filamentation, stress response and confers partial antifungal drug resistance. *Med Sci Monit.* **14**:113-21.
- Domínguez, J.M. & Martín, J.J. 2001. Identification of a putative sordarin binding site in *Candida albicans* elongation factor 2 by photoaffinity labeling. *J Biol Chem.* **276(33)**:31402-7.
- Donelli, G., Bayston, R., Costerton, W.B. & Shirtliff, M.E. 2010. The first European congress on microbial biofilms: EUROBIOFILMS. *FEMS Immunol Med Microbiol.* **59**:223-226.
- 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., Mandala, S.M., Frommer, B.R. & Kurtz, M.B. 1994. The *Saccharomyces cerevisiae* FKS1 (*ETGI*) gene encodes an integral membrane protein which is a subunit of  $\beta$ -1,3-D-glucan synthase. *Proc Natl Acad Sci USA.* **91**:12907-12911



- Ecker, M., Deutzmann, R., Lehle, L., Mřsă, 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.
- Edwards, J.E. Jr.** 2012. Fungal cell wall vaccines: an update. *J Med Microbiol.* **61**(Pt 7):895-903.
- Elbein, A.D., Pan, Y.T., Pastuszak, I. & Carroll, D.** 2003. New insights on trehalosa: a multifunctional molecule. *Glycobiology*, **13**:17-27.
- Ellis, D.** 2002. Amphotericin B: spectrum and resistance. *J Antimicrob Chemother.* **1**:7-10.
- Elorza M.V., Sentandreu R. & Ruiz-Herrera J.** 1994. Isolation and characterization of yeast monomorphic mutants of *Candida albicans*. *J Bacteriol.* **176**(8):2318-25.
- Elorza, M.V., Marcilla, A. & Sentandreu, R.** 1988. Wall mannoproteins of the yeast and mycelial cells of *Candida albicans*: nature of the glycosidic bounds and polydispersity of their manann moieties. *J Gen Microbiol.* **131**:2209-2216.
- 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.
- 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.
- Ernst, J.F.** 2000. Transcription factors in *Candida albicans*-environmental control of morphogenesis. *Microbiology.* **146**: 1763-74.
- Esmacili, M.J. & Mohabatkar, H.** 2008. Computational prediction of nuclear localization signals and structural characteristics of 91 types of HPV E6 proteins. *Asian Pac J Cancer Prev.* **9**(4):631-6.
- Estruch, F.** 2000. Stress-controlled transcription factors, stress induced genes and stress tolerance in budding yeast. *FEMS Microbiol Rev.* **24**:469-86.
- Feldmesser, M.** 2005. Prospects of vaccines for invasive aspergillosis. *Med Mycol.* **43**(7):571-87.
- Felk, A., Kretschmar, M., Albrecht, A., Schaller, M., Beinhauer, S., Nichterlein, T., Sanglard, D., Korting, H.C., Schafer, W. & Hube, B.** 2002. *Candida albicans* hyphal formation and the expression of the Efg1-regulated proteinases Sap4 and Sap6 are required for the invasion of parenchymal organs. *Infect Immun.* **70**:3689-3700.
- Fernández-Arenas, E., Cabezón, V., Bermejo, C., Arroyo, J., Nombela, C., Diez-Orejas, R. & Gil, C.** 2007. Integrated proteomics and genomics strategies bring new insight into *Candida albicans* response upon macrophage interaction. *Mol. Cell. Proteomics.* **6**:460-478.
- Fidel, P.L. Jr. & Cutler, J.E.** 2011. Prospects for development of a vaccine to prevent and control vaginal candidiasis. *Curr Infect Dis Rep.* **13**(1):102-7.
- Finkel, J.S. & Mitchell, A.P.** 2011. Genetic control of *Candida albicans* biofilm development. *Nat Rev Microbiol.* **9**(2):109-18.
- Fonzi, W.A. & Irwin, M.Y.** 1993. Isogenic strain construction and genemapping in *Candida albicans*. *Genetics.* **134**: 717-728.
- Forche, A., Magee, P.T., Magee, B.B. & May, G.** 2004. Genome-wide single-nucleotide polymorphism map for *Candida albicans*. *Eukaryot Cell.* **3**(3):705-14.
- Fortún, J.** 2011. Actualización en terapia antifúngica: nuevos fármacos e indicaciones. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 29 Suppl **5**:38-44.
- Garcerá, A., Martínez, A.I., Castillo, L., Elorza, M.V., Sentandreu, R. & Valentin, E.** 2003. Identification and study of a *Candida albicans* protein homologous to *Saccharomyces cerevisiae* Ssr1p, an internal cell-wall protein. *Microbiology.* **149**:2137-2145.

- García, R., Bermejo, C., Grau, C., Pérez, R., Rodríguez-Peña, J.M., Francois, J., Nombela, C. & Arroyo, J.** 2004. The global transcriptional response to transient cell wall damage in *Saccharomyces cerevisiae* and its regulation by the cell integrity signaling pathway. *J Biol Chem.* **279(15)**:15183-15195.
- Gelis, S., de Groot, P.W., Castillo, L., Moragues, M.D., Sentandreu, R., Gómez, M.M. & Valentín, E.** 2012. Pga13 in *Candida albicans* is localized in the cell wall and influences cell surface properties, morphogenesis and virulence. *Fungal Genet Biol.* **49(4)**:322-31.
- Gentry, L.O., & Price, M.F.** 1985. Urinary and genital *Candida* infections. En: Candidiasis. Bodey, G.P. y Farstein, V. (eds.) Raven Press, New Cork. 169.
- Ghannoum, M.A.** 2000. Potential role of phospholipases in virulence and fungal pathogenesis. *Clin Microbiol Rev.* **13**:122-143.
- Gillum, A. M., Tsay, E. Y. & Kirsch, D. R.** 1984. Isolation of the *Candida albicans* gene for orotidine-59-phosphate decarboxylase by complementation of *S. cerevisiae* *ura3* and *E. coli* *pyrF* mutations. *MolGen Genet.* **198**:179–182.
- Girrbach, V., Zeller, T., Priesmeier, M. & Strahl-Bolsinger, S.** 2000. Structure-function análisis of the dolichyl phosphate-mannose: protein O-mannosyltransferase ScPmt1p. *J Biol Chem.* **275(25)**:19288-96.
- Gonzalez, M., Lipke, P. N. & Ovalle, R.** 2009. GPI Proteins in Biogenesis and structure of yeast cell walls. En: The Enzymes vol 26. Menon, Kinoshita, Orlean and Tamanoi (eds), *Glycosylphosphatidylinositol (GPI) anchoring of proteins.* (pp. 321-355). Academic Press/Elsevier.
- Gonzalez, M., P.W.J. de Groot, F.M. Klis, & P.N. Lipke.** 2009. Glycoconjugate Structure and Function in Fungal Cell Walls. En A. Moran, P. Brennan, O. Holst and F. von Itzstein (Eds.) *Microbial Glycobiology: Structures, Relevance, and Applications* (pp. 169-183). Elsevier.
- Graham & Horman.** 1990. Techniques for transformation of *Escherichia coli*. En: Glover D. M (Ed.) *DNA cloning: a practical approach*, (pp. 109). Oxford, IRL Press.
- Hard, K., Bitter, W., Kamerling, J.P. & Vliegthart, J.F.G.** 1989. OMannosylation of Recombiant Human Insulin-like Growth Factor I (IGFI) Produced in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett.*, **248**: 111-114.
- Haynes, K.** 2001. Virulence in *Candida* species. *Trends Microbiol.* **9**:591-6.
- Heidenreich, F. & Dierich, M.P.** 1985. *Candida albicans* and *Candida stellatoidea*, in contrast to other *Candida* species, bind iC3b and C3d but not C3b. *Infect Immun.* **50(2)**:598-600.
- Henriques, M., Azeredo, J. & Oliveira, R.** 2006. *Candida* species adhesion to oral epithelium: factors involved and experimental methodology used. *Crit Rev Microbiol.* **32(4)**:217–26
- Hohmann, S. & Mager, W.H.** 2003. Yeast stress responses. *Topic. Curr. Genet.* Springer. Berlin.
- Hornby, J.M., Jensen, E.C., Lisec, A.D., Tasto, J.J., Jahnke, B., Shoemaker, R., Dussault, P. & Nickerson, K.W.** 2001. Quorum sensing in the dimorphic fungus *Candida albicans* is mediated by farnesol. *Appl Environ Microbiol.* **67**:2982–92.
- Hostetter, M.K.,** 1994. Adhesins and ligands involved in the interaction of *Candida* spp. with epithelial and endothelial surfaces. *Clin Microbiol Rev.* **7(1)**:29-42.
- Hottiger, T., Boller, T. & Wiemken, A.** 1987. Rapid changes of heat and dessication 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.** 2001. The ALS gene family of *Candida albicans*. *Trends Microbiol.* **9**:176-180.
- Hoyer, L.L., Scherer, S., Shatzman, A.R. & Livi, G.P.** 1995 *Candida albicans ALS1*: domains related to a *Saccharomyces cerevisiae* sexual agglutinin separated by a repeating motif. *Mol Microbiol.* **15**:39-54.
- Hube, B.** 2000. Extracellular proteinases of human pathogenic fungi. *Contrib Microbiol.* **5**:126-37.
- Hube, B., Monod, M., Schofield, D.a., Brown, A.J. & Gow, N.A.** 1994. Expresión of seven members of the gene family encoding secretory aspartyl proteinases in *Candida albicans*. *Mol Microbiol.* **14**(1):87-99.
- Hube, B., Sanglard, D., Odds, F.C., Hess, D., Monod, M., Schäfer, W., Brown, A.J. & Gow, N.A.** 1997. Disruption of each of the secreted aspartyl proteinase genes *SAP1*, *SAP2*, and *SAP3* of *Candida albicans* attenuates virulence. *Infect Immun.* **65**(9):3529-38.
- Ibeas, J.I., Yun, D.J., Damsz, B., Narasimhan, M.L., Uesono, Y., Ribas, J.C., Lee, H., Hasegawa, P.M., Bressan, R.A. & Pardo, J.M.** 2001. Resistance to the plant PR-5 protein osmotin in the model fungus *Saccharomyces cerevisiae* is mediated by the regulatory effects of *SSDI* on the cell wall composition. *Plant J.* **25**:271-280.
- Ibrahim, A.S., Mirbod, F., Filler, S.G., Banno, Y., Cole, G.T., Kitajima, Y., Edwards, J.E. Jr, Nozawa, Y. & Ghannoum, M.A.** 1995. Evidence implicating phospholipase as a virulence factor of *Candida albicans*. *Infect Immun.* **63**:1993-1998.
- Ito, J.I., Lyons, J.M., Diaz-Arevalo, D., Hong, T.B. & Kalkum, M.** 2009. Vaccine progress. *Med Mycol.* **47**(Suppl 1):S394-400.
- Jamieson, J.D. & Palade, G.E.** 1967. Intracellular transport of secretory proteins in the pancreatic exocrine cell. I. Role of the peripheral elements of the Golgi complex. *J Cell Biol.* **34**(2):577-96.
- Kandasamy, R., Vedyappan, G. & Chaffin, W.L.** 2000. Evidence for the presence of pir-like proteins in *Candida albicans*. *FEMS Microbiol Lett.* **186**:239-243.
- 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.
- Kapteyn, J.C., Montijn, R.C., Dijkgraaf, G.J. & Klis, F.M.** 1994. Identification of beta-1,6-glucosylated cell wall proteins in yeast and hyphal forms of *Candida albicans*. *Eur J Cell Biol.* **65**:402-407.
- 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., ter Riet, B., vink, E., Blas, S., De Nobel, H., Van Den Ende, H. & Klis, F.M.** 2001. Low external pH induces *HOG1*-dependent changes in the organization of the *Saccharomyces cerevisiae* cell wall. *Mol Microbiol.* **39**(2):469-79.
- Ketela, T., Green, R., & Bussey, H.** 1999. *Saccharomyces cerevisiae* mid2p is a potential cell wall stress sensor and upstream activator of the PKC1-MPK1 cell integrity pathway. *J. Bacteriol.* **181**(11): 3330–3340
- Kim, J. & Sudbery, P.** 2011. *Candida albicans*, a major human fungal pathogen. *J Microbiol.* **49**(2):171-7.
- Kim, M.K., Park, H.S., Kim, C.H., Park, H.M. & Choi, W.** 2002. Inhibitory effect of nikkomycin Z on chitin synthases in *Candida albicans*. *Yeast.* **19**: 341-9.

- Kim, S.W., Joo, Y.J. & Kim, J.** 2010. Asc1p, a ribosomal protein, plays a pivotal role in cellular adhesion and virulence in *Candida albicans*. *J Microbiol.* **48(6)**:842-8.
- 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., Sosinska, G.J., de Groot & P.W., Brul, S.** 2009. Covalently linked cell wall proteins of *Candida albicans* and their role in fitness and virulence. *FEMS Yeast Res.* **9(7)**:1013-28.
- Kollar, R., Petrakova, E., Ashwell, G., Robbins, P.W. & Cabib, E.** 1995. Architecture of the yeast cell wall. The linkages 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.
- Kopecká, M. & Gabriel, M.** 1992. The influence of Congo red on the cell wall and (1-3)-beta-D-glucan microfibril biogenesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Arch Microbiol.* **158**:115-26.
- Korting, H.C., Hube, B., Oberhauer, S., Januschke, E., Hamm, G., Albrecht, A. & Borelli, C.** 2003. Reduced expression of the hyphal-independent *Candida albicans* proteinase genes *SAP1* and *SAP3* in the *efg* mutant is associated with attenuated virulence during infection of oral epithelium. *J Med Microbiol.* **52**:623-632.
- Kuhn, D.M., Balkis, M., Chandra, J., Mukherjee, P.K. & Ghannoum, M.A.** 2003. Uses and limitations of the XTT assay in studies of *Candida* growth and metabolism. *J Clin Microbiol.* **41**:506-8.
- Kumamoto, C.A. & Vines, M.D.** 2005. Contributions of hyphae and hyphae-co-regulated genes to *Candida albicans* virulence. *Cell Microbiol.* **7**:1546-54.
- Kuppra, M.** 2009. Quorum sensing and *Candida albicans*. *Mycoses.* **52(1)**:1-10.
- Kyte, J. & Doolittle, R.F.** 1982. A simple method for displaying the hydrophobic character of a protein. *J Mol Biol.* **157(1)**:105-32.
- Laemmli, U. K.** 1970. Structural proteins during the head assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* **227**:680-85.
- Lamagni, T.L., Evans, B.G., Shigematsu, M. & Johnson, E.M.** 2001. Emerging trends in the epidemiology of invasive mycoses in England and Wales (1990-1999). *Epidemiol Infect.* **126**:397-414.
- Lan, C.Y., Newport, G., Murillo, I.A., Jones, T., Scherer, S., Davis, R.W. & Agobian, N.** 2002. Metabolic specialization associated with phenotypic switching in *Candida albicans*. *Proc Natl Acad Sci USA.* **99(23)**:14907-12.
- 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.
- Lee, K.L., Buckley, H. R. & Campbell, C.** 1975. An aminoacid liquid synthetic medium for the development of the mycelial and yeast forms of *Candida albicans*. *Sabouradia.* **13**:148-53.
- Lehle, L., Roitsch, T., Strahl, S. & Tanner, W.** 1991. Fungal cell wall and immune response. En: Latgé, J.P., Buocias, D. (Eds). *Synthesis of mannoproteins in Saccharomyces cerevisiae* (pp. 69-80). Springer-Verlag Berlin Heidelberg.
- Leroy, O., Gangneux, J.P., Montravers, P., Mira, J.P., Gouin, F., Sollet, J.P., Carlet, J., Reynes, J., Rosenheim, M., Regnier, B., Lortholary, O.; AmarCand Study Group.** 2009. Epidemiology, management, and risk factors for death of invasive *Candida* infections in critical care: a multicenter, prospective,

- observational study in France (2005-2006). *Crit Care Med.* **37(5)**:1612-8.
- Li, Wq., Hu, Xc., Zhang, X., Ge, Y., Zhao, S., Hu, Y. & Ashman, R.B.** 2011. Immunisation with the glycolytic enzyme enolase confers effective protection against *Candida albicans* infection in mice. *Vaccine.* **29(33)**:5526-33
- Lillie, S.H. & Pringle, J.R.** 1980. Reserve carbohydrate metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*: responses to nutrient limitations. *J. Bacteriol.* **143**: 1384-1394.
- Lim, C.S., Rosli, R., Seow, H.F. & Chong, P.P.** 2012. *Candida* and invasive candidiasis: back to basics. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* **31(1)**:21-31.
- Lin, L., Ibrahim, A.S., Baquir, B., Avanesian, V., Fu, Y. & Spellberg, B.** 2009. Immunological surrogate marker of rAls3p-N vaccine-induced protection against *Staphylococcus aureus*. *FEMS Immunol Med Microbiol.* **55(3)**:293-5.
- Lins, R.D., Pereira, C.S. & Hünenberger, P.H.** 2004. Trehaloseprotein interaction in aqueous solution. *Proteins.* **55**: 177-186.
- 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**:3155-65.
- Liu, H.** 2002. Co-regulation of pathogenesis with dimorphism and phenotypic switching in *Candida albicans*, a comensal and a pathogen. *Int J Med microbiol.* **292**:299-311.
- 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, X., Nie, X., Ding, Y. & Chen, J.** 2010. Asc1, a WD-repeat protein, is required for hyphal development and virulence in *Candida albicans*. *Biochim Biophys Sin.* **42(11)**:793-800.
- Lo, H.J., Köhler, J.R., DiDomenico, B., Loebenberg, D., Cacciapuoti, A. & Fink, G.** 1997. Non-filamentous *C. albicans* mutants are avirulent. *Cell.* **90**:939-949.
- Luo, G., Ibrahim, A.S., French, S.W., Edwards, J.E. Jr. & Fu, Y.** 2011. Active and passive immunization with rHyr1p-N protects mice against hematogenously disseminated candidiasis. *PLoS One.* **6(10)**:e25909.
- Lussier, M., Sdicu, A.M. & Bussey, H.** 1999. The KTR and MNN1 mannosyltransferase families of *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochim Biophys Acta.* **1426(2)**:323-34.
- Ma, Y. & Hendershot, L.M.** 2001. The unfolding tale of the unfolded protein response. *Cell.* **107(7)**:827-30.
- MacPherson, S., Akache, B., Weber, S., De Deken, X., Raymond, M. & Turcotte, B.** 2005. *Candida albicans* zinc cluster protein Upc2p confers resistance to antifungal drugs and is an activator of ergosterol biosynthetic genes. *Antimicrob Agents Chemother.* **49**:1745-52.
- Magee, B.B. & Magee, P.T.** 2000. Induction of mating in *Candida albicans* by construction of *MTLa* and *MTLa* strains. *Science.* **289**:310-313.
- 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.** 1973. The structure of a beta-1,3-D-glucan from yeast cell walls. *Biochem J.* **135(1)**:19-30.
- Mao, Y., Fan, H. & Lu, C.** 2008. Immunoproteomic assay of extracellular proteins in *Streptococcus equi* ssp. *zooepidemicus*. *FEMS Microbiol Lett.* **286(1)**:103-9.
- Marcilla, A., Elorza, M.V., Mormeneo, S., Rico, H. & Sentandreu, R.** 1991. *Candida albicans* mycelial wall structure: supramolecular complexes released by

zymoliase, chitinase and beta-mercaptoethanol. *Arch Microbiol.* **155**:312-319.

**Martínez de Marañón, I., Marechal, P.A. & Gervais, P.** 1996. Passive response of *Saccharomyces cerevisiae* to osmotic shifts: cell volume variation depending on physiological state. *Biochem Biophys Res Commun.* **227**:519-523.

**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.

**Martínez, J.P. & Gozalbo, D.** 1994. Chitin synthetases in *Candida albicans*: a review on their subcellular distribution and biological function. *Microbiologia.* **10(3)**:239-48.

**Massey, S.E., Moura, G., Beltrão, P., Almeida, R., Garey, J.R., Tuite, M.F. & Santos, M.A.** 2003. Comparative Evolutionary Genomics Unveils the Molecular Mechanism of Reassignment of the CTG Codon in *Candida* spp. *Genome Res.* **13(4)**:544-57

**Mazán, M., Mazánová, K. & Farkas, V.** 2008. Phenotype analysis of *Saccharomyces cerevisiae* mutants with deletions in Pir cell wall glycoproteins. *Antonie Van Leeuwenhoek.* **94(2)**:335-42.

**Mazur, P., Morin, N., Baginsky, W., El-Sherbeini, M., Clemas, J.A., Nielsen, J.B. & Foor, F.** 1995. Differential expression and function of two homologous subunits of yeast  $\beta$ 1,3-D-glucan synthase. *Mol Cell Biol.* **15**:5671-5681.

**Mellquist, J.L., Kasturi, L., Spitalnik, S.L. & Shakin-Eshleman, S.H.** 1998. The amino acid following an asn-X-Ser/Thr sequon is an important determinant of N-linked core glycosylation efficiency. *Biochemistry.* **37(19)**:6833-7.

**Micó, M.** 2009. Estudio del gen *PIR1* en *Candida albicans*. DEA. Universitat de València.

**Molero, G., Díez-Orejas, R., Navarro, F., Monteoliva, L., Pla, J., Gil, C., Sanchez-Perez, M. & Nombela, C.** 1998. *Candida albicans*: genetics, dimorphism and pathogenicity. *Int. Microbiol.* **1**: 95-106.

**Monod, M., Capoccia, S., Lechenne, B., Zaugg, C., Holdom, M. & Jousson, O.** 2002. Secreted proteases from pathogenic fungi. *Int J Med Microbiol.* **292(5-6)**:405-19.

**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.

**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.

**Mora-Montes, H.M., Bader, O., López-Romero, E., Zinker, S., Ponce-Noyola, P., Hube, B., Gow, N.A. & Flores-Carreón, A.** 2008. Kex2 protease converts the endoplasmic reticulum alpha1,2-mannosidase of *Candida albicans* into a soluble cytosolic form. *Microbiology.* **154(Pt 12)**:3782-94.

**Moreno-Ruiz, E., Ortu, G., de Groot, P.W., Cottier, F., Loussert, C., Prévost, M.C., de Koster, C., Klis, F.M., Goyard, S., d'Enfert, C.** 2009. The GPI-modified proteins Pga59 and Pga62 of *Candida albicans* are required for cell wall integrity. *Microbiology.* **155(6)**:2004-20.

**Morschhäuser, J.** 2010. Regulation of white-opaque switching in *Candida albicans*. *J. Med Microbiol Immunol.* **199(3)**:165-72

**Moscardó, T.** 2010. Estudio de un nuevo miembro de la familia Pir en *Candida albicans*: Pir32. DEA. Universitat de València.

**Moukadiri, I. & Zueco, J.** 2001. Evidence for the attachment of Hsp150/Pir2 to the cell wall of *Saccharomyces cerevisiae* through disulfide bridges. *FEMS Yeast Res.* **1**:241-245.

**Moukadiri, I., Jaafar, L. & Zueco, J.** 1999. Identification of two mannoproteins released from cell walls of a *Saccharomyces cerevisiae*

- mn1 mn9 double mutant by reducing agents. *J. Bacteriol.* **181**:4741-4745.
- Mrsá, V. & Tanner, W.** 1999. Role of NaOH-extractable cell wall proteins Ccw5p, Ccw6p, Ccw7p and Ccw8p (members of the Pir protein family) in stability of the *Saccharomyces cerevisiae* cell wall. *Yeast.* **15**:813-820.
- Mrsá, V., Seidl, T., Gentsch, M. & Tanner, W.** 1997. Specific labelling of cell wall proteins by biotinylation. Identification of four covalently linked O-mannosylated proteins of *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast.* **13**:1145-1154.
- Mukherjee, P.K., Seshan, K.R., Leidich, S.D., Chandra, j., Cole, G.T. & Ghannoum, M.A.** 2001. Reintroduction of the *PLB1* gene into *Candida albicans* restores virulence *in vivo*. *Microbiology.* **147(9)**:2585-97.
- Munro, C.A., Winter, K., Buchan, A., Henry, 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.
- Murad, A.M.A., Lee, P.L., Broadbent, I.D., Barelle, C.J. & Brown, A.J.P.** 2000. Clp10, an efficient and convenient integrating vector for *Candida albicans*. *Yeast.* **16**:325-7.
- 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 aspartic proteinases in virulence and pathogenesis. *Microbiol Mol Biol Rev.* **67**:400-428.
- Navarro-García, F., Sanchez, M., Pla, J. & Nombela, C.** 1995. Functional characterization of the *MKCl* gene of *Candida albicans*, which encodes a mitogen-activated protein kinase homolog related to cell integrity. *Mol Cell Biol.* **15**:2197-206.
- Newport G., Kuo A., Flattery A., Gill C., Blake J.J., Kurtz M.B., Abruzzo G.K. & Agabian N.** 2003. Inactivation of Kex2p diminishes the virulence of *Candida albicans*. *J Biol Chem.* **278(3)**:1713-20.
- 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.
- Nikawa, H., Mikihiro, S., Egusa, H., Fukushima, H., Kawabata, R., Hamada, T. & Yatani, H.** 2005. [*Candida* adherence and biofilm formation on oral surfaces] [Article in Japanese]. *Nihon Ishinkin Gakkai Zasshi.* **46(4)**:233-42.
- Nilsson, I.M. & von Heijne, G.** 1993. Determination of the distance between the oligosaccharyltransferase active site and the endoplasmic reticulum membrane. *J Biol Chem.* **268(8)**:5798-801.
- Nobile, C.J. & Mitchell, A.P.** 2005. Regulation of cell surface genes and biofilm formation by the *C. albicans* transcription factor Bcr1p. *Curr Biol.* **15**:1150-5.
- Nobile, C.J. & Mitchell, A.P.** 2006. Genetics and genomics of *Candida albicans* biofilm formation. *Cell Microbiol.* **8**: 1382-91.
- Odds, F.C.** 1988. *Candida* and Candidosis: A review and bibliography. 2nd. Ed, London. pp. x + 468pp.
- Odds, F.C.** 1994. *Candida* species and virulence. *Am. Soc. Microbiol. News.* **60**, 313-8.
- Odds, F.C., Brown A.J.P. & Gow, N.A.R.** 2003. Antifungal agents: mechanism of action. *Trends Microbiol.* **11(6)**:272-9.
- Odds, F.C., Rinaldi, M.G., Cooper, C.R. Jr., Fothergill, A., Pasarell, L. & McGinnis, M.R.** 1997. *Candida* and Torulopsis: a blinded evaluation of use of pseudohypha formation as basis for identification of medically important yeasts. *J Clin Microbiol.* **35(1)**:313-6.
- Pappas, P.G., Silveira, F.P.; AST Infectious Diseases Community of Practice.** 2009.

*Candida* in solid organ transplant recipients. *Am J Transplant.* **9**(Suppl 4):S173-9.

**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.* **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: Kuhn, P.J., Trinci, A.P.J., Jung, M.J., Goosey, M.W. and Copping, L.G. (Eds.) *Biochemistry of cell walls and membranes in fungi* (pp. 5-30) Springer, Berlín Heidelberg New York.

**Pedreño, Y., Maicas, S., Argüelles, J.C., Sentandreu, R. & Valentín, E.** 2004. The *ATCI* gene encodes a cell wall-linked acid trehalase required for growth on trehalose in *Candida albicans*. *J. Biol. Chem.* **279**:40852-40860.

**Pemán, J. & Salavert, M.** 2012. Epidemiología general de la enfermedad fúngica invasora. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* **30**(2):90-98

**Pemán, J., Cantón, E., Camarena, J.J., Miñana, J.J., Alcoba, J., Florez, J.A., Echeverría, J., Navarro Ortega, D., Martínez Alarcón, J., Fontanals, D., Gomila Sard, B., Buendía Moreno, B., Torroba, L., Ayats, J., Bratos Pérez, M.A., Álvarez Fernández, M., Sánchez Reus, F., Fernández Natal, I., Royo García, G., Ezpeleta, G., Martín-Mazuelos, E., Iglesias, I., Rezusta, A., Ramírez de Ocariz, I., Gómez Nieto, A. y el Grupo de Estudio FUNGEMYCA.** 2011. Variación de la epidemiología de las fungemias y de la sensibilidad a fluconazol de los aislamientos de hemocultivos en los últimos 10 años en España: resultados del estudio FUNGEMYCA. *Rev Iberoam Micol.* **28**:91-9.

**Pemán, J., Cantón, E., Orero, A., Viudes, A., Frasquet, J., Gobernado, M., y los participantes españoles del Estudio**

**Multicéntrico Epidemiological Survey of Candidemia in Europe patrocinado por la Confederación Europea de Micología Médica (ECCM).** 2002. Estudio multicéntrico sobre la epidemiología de las candidemias en España. *Rev Iberoam Micol.* **19**(1):30-35.

**Perruccio, K., Bozza, S., Montagnoli, C., Bellocchio, S., Aversa, F., Martelli, M., Bistoni, F., Velardi, A. & Romani, L.** 2004. Prospects for dendritic cell vaccination against fungal infections in hematopoietic transplantation. *Blood Cells Mol. Dis.* **33**, 248-255.

**Pfaller, M.A. & Diekema, D.J.** 2002a. Role of sentinel surveillance of candidemia: Trends in species distribution and antifungal susceptibility. *J Clin Microbiol.* **40**:3551-3557.

**Pfaller, M.A. & Diekema, D.J.** 2010. Epidemiology of invasive mycoses in North America. *Crit Rev Microbiol.* **36**(1):1-53.

**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.

**Pitschi, F., Devauchelle, C. & Corel, E.** 2010. Automatic detection of anchor points for multiple sequence alignment. *BMC Bioinformatics.* **11**(1):445.

**Plaine, A., Walker, L., Da Costa, G., Mora-Montes, H.M., McKinnon, A., Gow, N.A., Gaillardin, C., Munro, C.A. & Richard ML.** 2008. Functional analysis of *Candida albicans* GPI-anchored proteins: roles in cell wall integrity and caspofungin sensitivity. *Fungal Genet Biol.* **45**:1404-1414.

**Popolo, L., Ragni, E., Carotti, C., Palomares, O., Aardema, R., Back, J. W., Dekker, H. L., de Koning, L. J., de Jong, L. & de Koster, C. G.** 2008. Disulfide bond structure and domain



- organization of yeast b(1,3)-glucanotransferases involved in cell wall biogenesis. *J Biol Chem.* **283**: 18553–18565.
- Porte, L., León, P., Gárate, C., Guzmán, A.M., Labarca, J. & García, P.** 2012. Susceptibilidad a azoles y anfotericina B de aislados de *Candida spp*: Experiencia de una red de salud universitaria, entre 2004 y 2010. *Rev. chil. infectol.* **29(2)**:149-55.
- Poulain, D., Slomianny, C., Jouault, T., Gomez, J.M. & Trinel, P.A.** 2002. Contribution of phospholipomannan to the surface expression of beta-1,2-oligomannosides in *Candida albicans* and its presence in cell wall extracts. *Infect Immun.* **70(8)**:4323-8.
- Qadota, H., Python, C.P., Inoue, S.B., Arisawa, M., Anraku, Y., Zheng, Y., Watanabe, T., Levin, D.E. & Ohya, Y.** 1996. Identification of yeast Rho1p GTPase as a regulatory subunit of  $\beta$ 1,3-glucan synthase. *Science.* **272**:279-281
- Ram, A.F., Wolters, A., Ten Hoopen, R. & Klis, F.M.** 1994. A new approach for isolating cell wall mutants in *Saccharomyces cerevisiae* by screening for hypersensitivity to calcofluor white. *Yeast.* **10**:1019-30.
- Ramón, A.M., Montero, M., Sentandreu, R & Valentín, E.** 1999. *Yarrowia lipolytica* cell wall architecture: interaction of Ywp1, a mycelial protein, with other wall components and the effect of its depletion. *Res Microbiol.* **150**:95-103.
- 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.; Anidulafungin Study Group.** 2007. Anidulafungin versus fluconazole for invasive candidiasis. *N Engl J Med.* **356(24)**:2472-82.
- Reuss, O., Vik, A., Kolter, R. & Morschhäuser, J.** 2004. The SAT1 flipper, an optimized tool for gene disruption in *Candida albicans*. *Gene.* **341**:119-27.
- Rex, J.H., Walsh, T.J., Nettleson, 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. & Plaine, A.** 2007. Comprehensive analysis of glycosylphosphatidylinositol-anchored proteins in *Candida albicans*. *Eukariot Cell.* **6**:119-133.
- Rigopoulos, D., Katoulis, A.C., Ioannides, D., Georgala, S., Kalogeromitros, D., Bolbasi, I., Karistinou, A., Christofidou, E., Polydorou, D., Balkou, P., Fragouli, E. & Katsambas, A.D.** 2003. A randomized trial of amorolfine 5% solution nail lacquer in association with itraconazole pulse therapy compared with itraconazole alone in treatment of *Candida* fingernail onychomycosis. *Br J Dermatol.* **149**:151-156.
- Rosenberg, M., Judes, H. & Weiss, E.** 1983. Cell surface hydrophobicity of dental plaque microorganisms in situ. *Infect Immun.* **42**:831-834.
- Ruiz-Herrera, J.** 1992. Fungal cell wall, structure, synthesis and assembly. *CRC Press, Boca Raton Ann Arbor London.*
- Ruiz-Herrera, J., Gonzales-Prieto, J.M. & Ruiz-Medrano, R.** 2002. Evolution and phylogenetic relationships of chitin synthase from yeasts and fungi. *FEMS Yeast Res.* **1**:247-256.
- Russo, P., Kalkkinen, N., Sareneva, H., Paakkola, J. & Makarow, M.** 1992. A heat shock gene from *Saccharomyces cerevisiae* encoding a secretory glycoprotein. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **89**:8857.
- Saiki, R.K., Walsh, P.S., Levenson, C.H. & Erlich, H.A.** 1989. Genetic analysis of amplified DNA with immobilized sequence-specific oligonucleotide probes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **86**:6230-4.

- Sambrook, J. & Russell, D. W.** 2001. Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 3<sup>rd</sup> ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, USA
- Sambrook, J., Fritsch, E. F. & Maniatis, T.** 1989. Molecular cloning: a laboratory manual. 2nd ed. Cold Spring Harbor, N.Y. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- 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.
- Sander, C.S., Hipler, U.C., Wollina, U. & Elsner, P.** 2002. Inhibitory effect of terbinafine on reactive oxygen species (ROS) generation by *Candida albicans*. *Mycoses*. **45(5-6)**:152-5.
- Sarthy, A. V., McGonigal, T., Coen, M., Frost, D. J., Meulbroek, J. A. & Goldman, R. C.** 1997. Phenotype in *Candida albicans* of a disruption of the *BGL2* gene encoding a 1,3-beta-glucosyltransferase. *Microbiology* **143**:367-376.
- 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
- Selmecki, A., Forche, A. & Berman, J.** 2010. Genomic plasticity of the human fungal pathogen *Candida albicans*. *Eukaryot Cell*. **9(7)**:991-1008.
- Sentandreu, R. & Northcote, D.H.** 1969. Yeast cell-wall synthesis. *Biochem J*. **115(2)**:231-40.
- Shahinian, S. & Bussey, H.** 2000.  $\beta$ -1,6-glucan synthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Microbiol*. **35**:477-489.
- Shahinian, S., Dijkgraaf, G.J., Sdiou, A.M., Thomas, D.Y., Jakob, C.A., Aebi, M. & Bussey, H.** 1998. Involvement of protein N-glycoyl chain glucosylation and processing in the biosynthesis of cell wall  $\beta$ -1,6-glucan of *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*. **149**:843-856.
- Sherman, F., Fink, G.R. & Hicks, J.B.** 1986. Methods in yeast genetics. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.
- Singer, M.A. & Lindquist, S.** 1998. Thermotolerance in *Saccharomyces cerevisiae*: the Yin and Yang of trehalose. *Trends Biotechnol*. **16**: 460-468
- Singleton, D.R., Masuoka, J. & Hazen, K.C.** 2001. Cloning and analysis of a *Candida albicans* gene that affects cell surface hydrophobicity. *J Bacteriol*. **183(12)**:3582-8.
- Sipos, G., Puoti, A. & Conzelmann, A.** 1995. Biosynthesis of the side chain of yeast glycosylphosphatidylinositol anchors is operated by novel mannosyltransferases located in the endoplasmic reticulum and the Golgi apparatus. *J Biol Chem*. **270**:19709-15.
- Smith, A.E., Zhang, Z., Thomas, C.R., Moxham, K.E. & Middelberg, A.P.** 2000. The mechanical properties of *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc Natl Acad Sci USA*. **97**:9871-4.
- Smits, G.J., Kapteyn, J.C., van den Ende, H. & Klis, F.M.** 1999. Cell wall dynamics in yeast. *Curr Opin Microbiol*. **2**:348-352.
- Soll, D.R.** 1997. Gene regulation during high frequency switching in *Candida albicans*. *Microbiology*. **143**:279-88.
- Soll, D.R., Lockhart, S.R. & Zhao, R.** 2003. Relationship between switching and mating in *Candida albicans*. *Eukaryot Cell*. **2(3)**:390-7. Review.
- Southern, E. M.** 1975. Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J Mol Biol*. **98**:503-17.
- Spellberg, B.** 2011. Vaccines for invasive fungal infections. *F1000 Med Rep*. **3**:13.
- Staab, J.F., Ferrer, C.A. & Sundstrom, P.** 1996. Developmental expression of a tandemly repeated, proline and glutamine-rich amino acid motif on hyphal surfaces on *Candida albicans*. *J Biol Chem*. **271**:6298-6305.

- Staib, P., Kretschmar, M., Nichterlein, T., Kohler, G. & Morschhauser, J.** 2000a. Expresión of virulence genes in *Candida albicans*. *Adv Exp Med Biol.* **485**:167-76.
- Staib, P., Kretschmar, M., Nichterlein, T., Hof, H. & Morschhauser, J.** 2000b. Diferencial activation of a *Candida albicans* virulence gene family during infection. *Proc Natl Acad Sci USA.* **97**(11):6102-7.
- 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.
- Thevelein, J.M.** 1996. Regulation of trehalose metabolism and its relevance to cell growth and function. En: 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.
- Torosantucci, A., Chiani, P., Bromuro, C., De Bernardis, F., Palma, A.S., Liu, Y., Mignogna, G., Maras, B., Colone, M., Stringaro, A., Zamboni, S., Feizi, T. & Cassone, A.** 2009. Protection by anti-beta-glucan antibodies is associated with restricted beta-1,3 glucan binding specificity and inhibition of fungal growth and adherence. *PLoS One.* **4**(4):e5392.
- Trinel, P.A., Plancke, Y., Gerold, P., Jouault, T., Delplace, F., Schwarz, R.T., Strecker, G. & Poulain, D.** 1999. The *Candida albicans* phospholipomannan is a family of glycolipids presenting phosphoinositolmannosides with long linear chains of beta-1,2-linked mannose residues. *J Biol Chem.* **274**(43):30520-6.
- Valentín, E., Herrero, E., Pastor, F.I.J. & Sentandreu, R.** 1984. Solubilization and analysis of mannoproteins molecules from the cell wall of *Saccharomyces cerevisiae*. *J Gen Microb.* **130**:1419-1428.
- Valentín, E., Herrero, E., Rico, H., Miragall, F. & Sentandreu, R.** 1989. Cell wall mannoproteins during the population growth in *Saccharomyces cerevisiae*. *Arch Microbiol.* **148**:88-94.
- Valentin, E., Herrero, E., Rico, H., Miragall, F. & Sentandreu, R.** 1987. Cell wall mannoproteins during the population growth phases in *Saccharomyces cerevisiae*. *Arch Microbiol.* **148**:88-94.
- Valentín, E., Mormeneo, S. & Sentandreu, R.** 2000. The cell surface of *Candida albicans* during morphogenesis. *Contrib Microbiol.* **5**:138-50.
- Van der Vaart, J.M., Caro, L.H., Chapman, J.W., Klis, F.M. & Verrips, C.T.** 1995. Identification of three mannoproteins in the cell wall of *Saccharomyces cerevisiae*. *J Bacteriol.* **177**:3104-10.
- Vanden Bossche, H., Engelen, M. & Rochette, F.** 2003. Antifungal agents of use in animal health-chemical, biochemical and pharmacological aspects. *J Vet Pharmacol Ther.* **26**:5-29.
- Vazquez, J.A., & Sobel, J.D.** 2011. Candidiasis. En: Kauffman, C.A., Pappas, P.G., Sobel, J.D., Dismukes, E. (eds.) *Essentials of Clinical Mycology* (pp. 167-206) Second Edition. Springer.
- Walworth, N.C. & Novick, P.J.** 1987. Purification and characterization of constitutive secretory vesicles from yeast. *J Cell Biol.* **105**:163-74.

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

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

**Xin, H., Dziadek, S., Bundle, D.R. & Cutler, J.E.** 2008. Synthetic glycopeptide vaccines combining beta-mannan and peptide epitopes induce protection against candidiasis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **105(36)**:13526-31.

**Zaragoza, R. & Pemán, J.** 2012 Opciones terapéuticas para el tratamiento antifúngico en el paciente crítico. *Rev Iberoam Micol*. **29(2)**:108-113.

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

**VII. AGRADECIMIENTOS/  
ACKNOWLEDGMENTS/  
DANKSAGUNG**



## VII. AGRADECIMIENTOS

Aprovecho estas últimas líneas para dar las gracias a todas aquellas personas de mi entorno que en mayor o menor medida han compartido conmigo esta etapa de mi formación, tanto a nivel profesional como personal.

En primer lugar me gustaría agradecer al Prof. Eulogio Valentín, director de la presente tesis, por brindarme la oportunidad de realizar este proyecto de investigación bajo su tutela, por el compromiso y su mediación que han hecho posible esta tesis.

Asimismo reconocer a los profesores del Departamento y de la Universidad como Prof. Rafael Sentandreu, Prof. Lucas del Castillo, Prof. Jesús Zueco, Prof. Amelia Murgui, por los agradables ratos compartidos en el laboratorio y la ayuda en cualquier situación que lo requiriera.

A los grandes soportes de la investigación que normalmente están “entre bastidores”, a nuestra técnica y amiga Estela siempre dispuesta a echar una mano, a nuestra secretaria Esther por su buena predisposición y sus extenso conocimiento informático, a la técnico del departamento de Bioquímica Pilar por conseguirme xileno recorriendo media facultad, y al secretario del departamento de Microbiología Vicente por su eficacia y agilización de los papeleos.

A mis amigos del laboratorio: Antonio (*Antoine*), Leslie (*Lissy*☺), Ruth (*Candida murcianicum*), Samuel (*Sam-sensei*), Miguel (*Migel*), Mapi (*Supermami*) Julia, Emira y Jihène, con ellos aprender ha sido un placer y me alegro de haber podido disfrutar de su compañía todos estos años.

Anschließend an dieser Stelle möchte ich natürlich Herrn Prof. Dr. J. F. Ernst herzlich danken. Sie haben mir die Möglichkeit angeboten, einen Bestandteil Ihres Labors während ein ganzes Jahr zu sein. Vielen Dank auch für die Gelegenheit, eine Betreuung bei Ihre Master übernehmen und viele interessante Meetings besuchen zu können. Ich wollte selbstverständlich an das gesamte Institut vielmals danken: Pilar, Maya, Isabel, Alida, Joanna, Julia, Yasemin, Eva, Thérèse, Jacqueline, Dagmar, Dana, Carlos, Prashant, Quentin, Marc, Christoph, Eugen, Paul, Lasse, Steffen, Michaella, Agnes, Karl, Thomas, Evelyn, Sebastian und süße Anna. Es war eine wunderschöne

Zeit bei euch, nicht nur für die schöne Arbeitsatmosphäre, sondern auch für diverse Freizeitaktivitäten: Karneval, Grillen, Rudern, Kirmes, Altstadtbesuche, Weinachtmarkt, Fußball, Eurovision und so so weiter! Ich hatte das Gefühl, dass ich zu Hause war. ☺

A mis amigos de siempre: Silvi, Tito Xavi & Bea, M<sup>a</sup>José (& conejos), Antonio/Toni & Ceci, Estefanía, Bea, Nieves & Rafal (& Daniel), Laura & Pepo, Ernesto, Manuel, Elena & David “catalufis”, Crispu, Crismo, Esther, Mire, Fer, Elena y David “Vlc”, Pedri & Bea, Mariano, Carmen & Sergio, Eusebio, Ana, Begoña y Guadalupe, por su inestimable apoyo, comprensión y paciencia con “mis bichitos”, por hacerme desconectar, por escucharme, por consolarme los días que no ha salido “una banda” aunque no entendieran muy bien lo que significaba, por hacerme reír, recordar, olvidar, compartir penas y alegrías. Que podamos disfrutar de muchos más buenos recuerdos por muchos años.

Special thanks to my friends who I met abroad on my summer courses trips, or during my stay in Düsseldorf. To Anja, who is the reason my stay in Düsseldorf was so unforgettable. To Ewa and Víctor, my sweet friends from Göttingen, we went through so many adventures and hope to see you again soon! To Jordi, who since that summer in Cork, has backup me for so many years I’ve lost count. ☺

A la familia, por momentos de relax, de cocinitas y de comilonas, de no hacer nada en un finde o intentar hacer de todo, por las distracciones, los consejos y las grandes ocasiones.

Como no podía faltar, agradecer a las personas más importantes de mi vida, mis padres y mi hermano. Por estar a mi lado siempre, por poner todos los medios a mi alcance para que tuviera lo mejor y todas las puertas del futuro abiertas, por buscar siempre lo mejor para mí. Por ser simplemente ellos.

A todos los doctorandos de todas las partes del mundo, conocidos o no, por la ilusión, la constancia y la paciencia a la hora de investigar. Para darles ánimos porque hay luz al final del túnel y siempre vale la pena el esfuerzo.



