



VNIVERSITATIS VALÈNCIA

FACULTAD DE FARMACIA

DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA Y ECOLOGÍA

**“Identificación, caracterización y ensamblaje de nuevos  
componentes manoproteicos de la pared celular de  
*Candida albicans*.”**

Memoria presentada por:

D. Antonio Caminero Rodríguez de Lamo  
para optar al grado de Doctor.

Valencia, 2013.



**Dr. Rafael Sentandreu Ramón y Dr. Eulogio Valentín Gómez**, Catedráticos de Microbiología de la Universidad de Valencia

CERTIFICAN: Que la Memoria de Tesis Doctoral titulada **“Identificación, caracterización y ensamblaje de nuevos componentes manoproteicos de la pared celular de *Candida albicans*”**, realizada por el Licenciado **D. Antonio Caminero Rodríguez de Lamo** para aspirar al Grado de Doctor, contiene fielmente el trabajo experimental realizado bajo nuestra dirección en los laboratorios de la Sección Departamental de Microbiología de la Universidad de Valencia.

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

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

Fdo. Rafael Sentandreu Ramón

Fdo. Eulogio Valentín Gómez

VNIVERSITAT  
DE VALÈNCIA  
Valencia, 2013.



A mis padres  
y a mi familia

“La ciencia se compone de errores, que a su vez son los pasos hacia la verdad”

Julio Verne.



Artículos enviados para su publicación.

- Artículo enviado a *Fungal Genetics and Biology*.

**“Proteomic identification of *Candida albicans* wall mannoproteins covalently linked by disulfide bridges and/or to the  $\beta$ -1,3-glucan”.**

Antonio Caminero, Enrique Calvo, Eulogio Valentín, José Ruiz-Herrera, Juan A. López and Rafael Sentandreu.

- Artículo enviado a *Microbiology*.

**“Alterations in the synthesis of  $\beta$ -1,6-glucan-bound GPI proteins by stress conditions and wall protein mutation in *Candida albicans*”.**

Antonio Caminero, Enrique Calvo, Juan A. López, Eulogio Valentín, José Ruiz-Herrera and Rafael Sentandreu.

- Artículo enviado a *FEMS Yeast Research*.

**“The *GCA1* gene encodes a glycosidase like protein in the cell wall of *Candida albicans*”.**

Antonio Caminero, Sergi Maicas, Rafael Sentandreu and Eulogio Valentín.



## ABREVIATURAS.

ADN	ácido desoxirribonucleico	HF-piridina	ácido fluorhídrico-piridina
Als	agglutinin-like sequence	HOG	High Osmolarity Glicerol
AMPc	adenosín monofosfato cíclico	IgG	Inmunoglobulina G
Amp <sup>R</sup>	resistencia a ampicilina	IPFs	Individual Protein Files
ARN	ácido ribonucleico	kb	kilobase
BrEt	bromuro de etidio	kDa	kilodaltons
BSA	albúmina de suero bovino	l	litro
Chs	quitina sintetasa	LB	medio de cultivo Luria-Bertani
Clo <sup>R</sup>	resistencia a cloramfenicol	Lip	lipasa
cm	centímetro	M	molar
CWP	proteína de pared celular	MAB	anticuerpo monoclonal
DMP	dimetilo de dihidroclorhidrato y pimelidato	MAPK	mitogen activated protein kinases
D.O.	densidad óptica	min	minuto
dNTPs	desoxirribonucleótidos trifosfato	ml	mililitro
DTT	ditiotreitól	mm	milímetro
EDTA	ácido etilendiaminotetraacético	mM	milimolar
g	gramo	Mnn	manansintasas
GlcNAc	N-acetilglucosamina	Mnt	manosiltransferasas
GPI	glicosil fosfatidil inositol	ng	nanogramo
GTP	guanosín trifosfato	NH <sub>4</sub> Ac	acetato amónico
h	hora	nm	nanómetro
H <sub>2</sub> O	agua	n°	número
		°C	grados celsius
		ORFs	pautas abiertas de lectura
		PAb	anticuerpo policlonal

PAbL	anticuerpo policlonal anti levadura	SVG	Sterile Vegetative Growth
pb	pares de bases	T <sup>a</sup>	temperatura
PBS	tampón fosfato salino	TAE	tris-acetato con EDTA
PCR	reacción en cadena de la polimerasa	tampón TE	solución de Tris y EDTA
PEG	polietilenglicol	TBS	tampón tris salino
pH	logaritmo decimal negativo de la concentración de iones hidronio	TEMED	N,N,N',N'-tetrametiletilenodiamina
PKC	Protein Kinase C	TFMS	ácido trifluorometanosulfónico
Plb	fosfolipasa	Tris	2-amino-2-(hidroximetil)-1,3-propanodiol
PLM	fosfolipomanano	TTBS	TBS con Tween-20
PM	peso molecular	U	unidades
PMSF	fluoruro de fenilmetilsulfonilo	UDP	Uridín difosfato
Pmt	proteín-manosiltransferasa	UDP-GlcNAc	Uridín difosfato-N-acetilglucosamina
pNPG	4-nitrofenil-β-D-glucopiranosido	V	voltios
PPM	fosfopeptidomanano	v/v	volumen/volumen
RE	retículo endoplásmico	xg	gravedades
rpm	revoluciones por minuto	YE-Pro	Yeast extract Proline
s	segundo	YNB	Yeast Nitrogen Base
Sap	proteinasas aspárticas	YPD	Yeast extract Peptone Dextrose
<i>SAT1</i>	gen para la estreptotricina-acetiltransferasa	YPM	Yeast extract Peptone Maltose
SD	Synthetic Dextrose	β-ME	β-mercaptoetanol
SDS	dodecil sulfato sódico	μg	microgramo
SDS-PAGE	electroforesis en gel de poliacrilamida	μl	microlitro
		μm	micra o micrómetro

## **ÍNDICE**



**ÍNDICE DE MATERIAS.**

**I. INTRODUCCIÓN**

I.1. GENERALIDADES Y TAXONOMÍA DE <i>Candida albicans</i> .....	1
I.2. PATOGENICIDAD DE <i>C. albicans</i> .....	2
I.3. CLASIFICACIÓN DE LAS CANDIDIASIS Y SU DIAGNÓSTICO .....	5
I.3.1. Tratamiento de las candidiasis .....	6
I.3.1.1. Tratamiento combinado.....	8
I.3.1.2. Vacunas .....	9
I.4. FACTORES DE VIRULENCIA .....	9
I.4.1. Adhesinas .....	10
I.4.1.1. Adhesinas en <i>C. albicans</i> .....	11
I.4.1.1.1. Als (agglutinin-like sequence).....	11
I.4.1.1.2. Hwp1 .....	12
I.4.1.1.3. Int1 .....	13
I.4.1.1.4. Mnt1 .....	13
I.4.1.1.5. Eap1 .....	13
I.4.1.1.6. Ywp1 .....	14
I.4.1.1.7. Ecm33.....	14
I.4.1.1.8. Mp65.....	14
I.4.2. Enzimas degradativas.....	15
I.4.2.1. Proteinasas aspárticas (Sap) .....	15
I.4.2.2. Fosfolipasas .....	16
I.4.2.3. Lipasas.....	16
I.4.3. Biopelículas.....	17
I.4.4. Variaciones fenotípicas .....	18
I.4.5. Morfogénesis.....	18
I.4.5.1. Bases moleculares del dimorfismo.....	20
I.4.5.2. Rutas de señalización .....	21
I.4.5.2.1. Ruta de las MAP quinasas .....	22
I.4.5.2.2. Ruta de la proteína quinasa A dependiente de AMP cíclico .....	26
I.4.5.2.3. Ruta de respuesta al pH por Rim101 .....	26
I.4.5.2.4. Ruta catabólica N-acetilglucosamina (GlcNAc) de <i>C. albicans</i> .....	27

I.4.5.2.5. Factores de represión .....	27
I.5. LA PARED CELULAR DE <i>C. albicans</i> .....	28
I.5.1. Composición química de la pared celular .....	30
I.5.1.1. Quitina .....	30
I.5.1.1.1. Quitina sintetadas en <i>C. albicans</i> .....	31
I.5.1.2. $\beta$ -glucanos .....	33
I.5.1.2.1. $\beta$ -1,3-glucano .....	33
I.5.1.2.2. $\beta$ -1,6-glucano .....	35
I.5.1.3. Manoproteínas .....	36
I.5.1.3.1. Clasificación de las manoproteínas .....	37
I.5.1.3.1.1. Proteínas retenidas no covalentemente a la pared celular .....	37
I.5.1.3.1.2. Proteínas extraíbles por agentes reductores .....	38
I.5.1.3.1.3. Proteínas unidas por enlaces álcali-sensibles .....	38
I.5.1.3.1.4. Proteínas unidas por enlaces glicosil fosfatidil inositol .....	39
I.5.1.3.1.5. Proteínas atípicas de pared celular .....	41
I.6. MODIFICACIONES POSTRADUCCIONALES .....	42
I.6.1. Señalización .....	43
I.6.2. O-glicosilación .....	43
I.6.3. N-glicosilación .....	44
I.6.4. Adición y modificación del resto GPI .....	46
I.7. OBJETIVOS Y JUSTIFICACIÓN DEL TRABAJO .....	47
<b>II. MATERIALES Y MÉTODOS</b>	
II.1. MICROORGANISMOS Y PLÁSMIDOS EMPLEADOS .....	51
II.1.1. Levaduras .....	51
II.1.2. Bacterias .....	53
II.1.3. Plásmidos .....	53
II.2. MEDIOS Y CONDICIONES DE CULTIVO .....	54
II.2.1. Cultivo de levaduras .....	54
II.2.2. Cultivo de bacterias .....	56
II.3. TRANSFORMACIÓN DE CÉLULAS CON ADN EXÓGENO .....	57
II.3.1. Transformación de bacterias .....	57
II.3.1.1. Obtención de células competentes con cloruro de calcio .....	57

II.3.1.2. Transformación de células competentes de <i>E. coli</i> .....	58
II.3.2. Transformación de levaduras.....	58
II.4. OBTENCIÓN Y PURIFICACIÓN DE ADN.....	59
II.4.1. Obtención de ADN plasmídico de <i>E. coli</i> .....	59
II.4.2. Obtención de ADN genómico de <i>C. albicans</i> .....	59
II.5. TRATAMIENTO ENZIMÁTICO DE ADN.....	60
II.5.1. Digestión con endonucleasas de restricción.....	60
II.5.2. Ligación de ADN con ligasa de T4.....	61
II.6. REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR).....	61
II.6.1. Diseño de oligonucleótidos.....	61
II.6.2. Condiciones de reacción.....	62
II.7. ELECTROFORESIS DE ADN EN GELES DE AGAROSA.....	62
II.8. PURIFICACIÓN DE FRAGMENTOS DE ADN EN GELES DE AGAROSA.....	63
II.9. CUANTIFICACIÓN DE ADN.....	64
II.10. INTERRUPCIÓN GÉNICA EN <i>C. albicans</i> .....	64
II.11. ANÁLISIS DE LAS CEPAS DISRUPTANTES.....	65
II.11.1. Estudio del efecto del blanco de calcoflúor, rojo congo y SDS.....	65
II.11.2. Estudio de la sensibilidad a choque térmico.....	65
II.11.3. Estudio del efecto de estrés osmótico sobre el crecimiento.....	66
II.11.4. Estudio del efecto de estrés oxidativo sobre el crecimiento.....	66
II.11.5. Estudio del efecto de la cafeína.....	66
II.11.6. Estudio de sensibilidad a drogas antifúngicas o antibióticas.....	66
II.12. MICELIACIÓN EN MEDIO SÓLIDO.....	66
II.13. OBTENCIÓN Y REGENERACIÓN DE PROTOPLASTOS.....	67
II.14. OBTENCIÓN DE FRACCIONES SUBCELULARES.....	67
II.14.1. Paredes celulares.....	67
II.14.2. Citosol y fracción mixta de membranas.....	68
II.15. SOLUBILIZACIÓN DE COMPONENTES DE LA PARED CELULAR.....	69
II.15.1. Tratamiento con dodecil sulfato sódico (SDS).....	69
II.15.2. Tratamiento con $\beta$ -mercaptoetanol ( $\beta$ -ME).....	69
II.15.3. Tratamiento con soluciones alcalinas diluidas.....	69
II.15.4. Tratamiento con ácido fluorhídrico-piridina.....	69
II.15.5. Tratamiento con zimoliasa.....	70

II.16. CUANTIFICACIÓN DE MACROMOLÉCULAS .....	70
II.16.1. Determinación de proteína total .....	70
II.16.2. Determinación de azúcares no reductores .....	70
II.17. DESGLICOSILACIÓN DE MANOPROTEÍNAS .....	71
II.17.1. Tratamiento con meta-periodato.....	71
II.17.2. Tratamiento con endo- $\beta$ -N-acetilglucosaminidasa H.....	71
II.17.3. Tratamiento con ácido trifluorometanosulfónico .....	71
II.18. SEPARACIÓN DE PROTEÍNAS EN GELES DE SDS-POLIACRILAMIDA (SDS-PAGE).....	72
II.19. TINCIÓN DE PROTEÍNAS EN GELES DE SDS-POLIACRILAMIDA.....	73
II.20. TRANSFERENCIA Y DETECCIÓN DE PROTEÍNAS EN SOPORTES DE NITROCELULOSA (Western-blot).....	73
II.20.1. Transferencia a membranas de nitrocelulosa por “Western-blot” .....	73
II.20.2. Adsorción de proteínas en soportes de nitrocelulosa por “Dot-blot” .....	73
II.20.3. Detección de las proteínas en soportes de nitrocelulosa.....	74
II.20.3.1. Tinción con colorante Ponceau .....	74
II.20.3.2. Tinción con concanavalina A.....	74
II.20.3.3. Tinción con coomassie blue R-250 staining .....	75
II.20.3.4. Inmunodetección de proteínas en soportes de nitrocelulosa.....	75
II.21. IDENTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS MEDIANTE ESPECTROMETRÍA DE MASAS. ....	76
II.22. INMUNOFLUORESCENCIA INDIRECTA .....	76
II.23. MODELIZACIÓN DE LA PROTEÍNA Gca1 de <i>C. albicans</i> .....	77
II.24. CROMATOGRAFÍAS .....	77
II.24.1. Cromatografía de afinidad con concanavalina A sepharosa 4B .....	77
II.24.2. Cromatografía de filtración molecular con sepharosa CL-6B.....	78
II.24.3. Cromatografía de afinidad con proteína G sepharosa .....	78
II.24.4. Cromatografía de afinidad con NHS-activated sepharose 4 fast flow® .....	79
II.24.5. Cromatografía de afinidad con proteína A sepharosa en presencia de alta concentración salina .....	80

**III. RESULTADOS**

**III.A. IDENTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS**

III.A.1. IDENTIFICACIÓN POR ESPECTROMETRÍA DE MASAS DE PROTEÍNAS UNIDAS COVALENTEMENTE A LA PARED CELULAR DE *C. albicans* (SC5314) Y EN EL SOBRENADANTE DE PROTOPLASTOS ..... 87

    III.A.1.1. Identificación de proteínas en el sobrenadante de protoplastos de *C. albicans* ..... 87

    III.A.1.2. Identificación de proteínas presentes en paredes celulares de *C. albicans* ..... 89

    III.A.1.3. Identificación de proteínas en el material solubilizado por  $\beta$ -ME.... 91

    III.A.1.4. Identificación de proteínas en el material solubilizado por NaOH.... 93

    III.A.1.5. Identificación de proteínas en bandas de electroforesis obtenidas mediante SDS-PAGE del material solubilizado de paredes celulares por  $\beta$ -ME y NaOH..... 95

    III.A.1.6. Identificación de proteínas en el material solubilizado por  $\beta$ -ME y NaOH desglucosilado químicamente con TFMS ..... 100

III.A.2. IDENTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS EN PAREDES CELULARES DE MUTANTES: *pga13*; *pga26*; *pga31*; *pir1/PIR1*; *pmt1/pmt6* ..... 106

    III.A.2.1. Identificación de proteínas en paredes celulares del mutante *pga13* 106

    III.A.2.2. Identificación de proteínas en paredes celulares del mutante *pga26* 106

    III.A.2.3. Identificación de proteínas en paredes celulares del mutante *pga31*. 108

    III.A.2.4. Identificación de proteínas en paredes celulares del mutante *PIR1/pir1* ..... 109

    III.A.2.5. Identificación de proteínas en paredes celulares del doble mutante *pmt1/pmt6* ..... 109

III.A.3. IDENTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS EN PAREDES CELULARES DE LA CEPA SC5314 SOMETIDA A CONDICIONES DE ESTRÉS QUÍMICO Y/O OSMÓTICO ..... 111

    III.A.3.1. Control ..... 111

    III.A.3.2. Sensibilidad a NaCl ..... 113

    III.A.3.3. Sensibilidad a sorbitol ..... 115

    III.A.3.4. Sensibilidad a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ..... 117

    III.A.3.5. Sensibilidad a blanco de calcoflúor ..... 119

    III.A.3.6. Sensibilidad a rojo congo..... 121

**III.B. CARACTERIZACIÓN DEL ANTÍGENO RECONOCIDO POR EL ANTICUERPO MONOCLONAL 3H8**

III.B.1. CARACTERÍSTICAS BIOQUÍMICAS DEL ANTÍGENO 3H8 PRESENTE EN LA PARED CELULAR DE <i>C. ALBICANS</i> .....	129
III.B.2. ESTUDIOS DE ESTABILIDAD DEL ANTÍGENO A DISTINTAS CONDICIONES.....	130
III.B.2.1. Estabilidad a la temperatura.....	130
III.B.2.2. Estabilidad frente agentes caotrópicos.....	131
III.B.2.2.1. Estabilidad a SDS y temperatura.....	131
III.B.2.2.2. Estabilidad a persulfato amónico .....	132
III.B.2.3. Estabilidad a tripsina.....	132
III.B.3. ANÁLISIS ELECTROFORÉTICO DE LA FRACCIÓN MIXTA DE MEMBRANAS .....	133
III.B.4. DETERMINACIÓN DEL PESO MOLECULAR DEL ANTÍGENO .....	134
III.B.5. SOLUBILIZACIÓN DEL ANTÍGENO 3H8 EN PRESENCIA DE ÁCIDO IODOACÉTICO.....	135
III.B.6. DESGLICOSILACIÓN QUÍMICA Y ENZIMÁTICA .....	136
III.B.6.1. Desglicosilación química con meta-periodato .....	136
III.B.6.2. Desglicosilación química con ácido trifluormetanosulfónico.....	136
III.B.6.3. $\beta$ -eliminación .....	137
III.B.6.4. Desglicosilación enzimática con Endo H .....	138
III.B.7. ANÁLISIS POR CROMATOGRAFÍA DE AFINIDAD DE LAS MANOPROTEÍNAS SOLUBILIZADAS DE LA PARED CELULAR.....	139
III.B.7.1. Cromatografía de afinidad en Concanavalina A-Sepharose 4B <sup>®</sup> .....	139
III.B.7.2. Cromatografía de afinidad con proteína G sepharose.....	140
III.B.7.3. Cromatografía de afinidad con NHS-activated sepharose 4 fast flow <sup>®</sup> .....	142
III.B.7.4. Cromatografía de afinidad con proteína A en condiciones de alta salinidad.....	145
III.B.8. DOT-BLOT DEL MATERIAL SOLUBILIZADO DE LAS PAREDES CELULARES DE MUTANTES HOMOCIGÓTICOS .....	146
III.B.8.1. Estudio de mutantes deficientes en N- y O-glicosilación .....	146
III.B.8.2. Estudio de mutantes deficientes en O-glicosilación .....	149
III.B.8.3. Estudio de mutantes cuyos genes codifican proteínas con características bioquímicas semejantes a la proteína objeto de ser identificada .....	151

**III.C. ESTUDIO DE LA PROTEÍNA Gca1**

III.C.1. SELECCIÓN *IN SILICO* DE Gca1, UNA PROTEINA POTENCIAL DE PARED..... 157

III.C.2. ANÁLISIS DE LA REGIÓN CODIFICANTE ..... 160

    III.C.2.1. Composición de bases..... 160

    III.C.2.2. Frecuencia del uso de codones..... 160

    III.C.2.3. Análisis de la secuencia de aminoácidos ..... 161

    III.C.2.4. Hidrofobicidad de la proteína Gca1 ..... 163

III.C.3. MODELO DE HOMOLOGÍA DE Gca1 ..... 164

III.C.4. CONSTRUCCIÓN DEL CASETE DE INTERRUPCIÓN PARA EL GEN *GCA1*..... 165

III.C.5. OBTENCIÓN DEL MUTANTE HOMOCIGÓTICO PARA EL GEN *GCA1*..... 168

III.C.6. COMPROBACIÓN DE LOS MUTANTES ..... 171

    III.C.6.1. Selección de las colonias susceptibles de transformación mediante PCR..... 171

III.C.7. ANÁLISIS FENOTÍPICO DE LAS CEPAS MUTANTES DEL GEN *GCA1*..... 172

    III.C.7.1. Estudio de la integridad de la pared celular ..... 173

        III.C.7.1.1. Estudio de sensibilidad a zimoliasa..... 173

        III.C.7.1.2. Estudio de sensibilidad a rojo congo y al blanco de calcoflúor .. 174

        III.C.7.1.3. Estudio de sensibilidad a SDS..... 175

    III.C.7.2. Estudio del efecto de cafeína, sorbitol, etanol, glicerol y EDTA ..... 175

    III.C.7.3. Estudio de sensibilidad frente a drogas..... 176

    III.C.7.4. Estudio de la respuesta a estrés ..... 178

        III.C.7.4.1. Estudio de sensibilidad a choque térmico ..... 178

        III.C.7.4.2. Estudio de sensibilidad a choque osmótico..... 178

        III.C.7.4.3. Estudio del efecto del estrés oxidativo sobre el crecimiento ..... 179

    III.C.7.5. Estudio de filamentación en medio sólido ..... 180

    III.C.7.6. Ensayo enzimático ..... 182

<b>IV. DISCUSIÓN .....</b>	<b>185</b>
IV. 1. IDENTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS.....	186
IV.2. CARACTERIZACIÓN DEL ANTÍGENO RECONOCIDO POR EL ANTICUERPO MONOCLONAL 3H8.....	188
IV.3. ESTUDIO DE LA PROTEÍNA Gca1 .....	190
<b>V. CONCLUSIONES .....</b>	<b>195</b>
<b>VI. BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>199</b>
<b>VII. AGRADECIMIENTOS .....</b>	<b>237</b>

ÍNDICE DE FIGURAS.

<b>Figura I.1.</b> Distribución de especies del género <i>Candida</i> identificadas en infecciones fúngicas invasivas.....	5
<b>Figura I.2.</b> Esquema de la estructura de las proteínas de la familia Als.....	12
<b>Figura I.3.</b> Micrografía de barrido de una biopelícula de <i>C. albicans</i> .....	17
<b>Figura I.4.</b> Micrografías con las distintas morfologías de <i>C. albicans</i> .....	20
<b>Figura I.5.</b> Cambio fenotípico blanco-opaco en <i>C. albicans</i> .....	21
<b>Figura I.6.</b> Esquema general de una ruta de MAPK.....	23
<b>Figura I.7.</b> Principales elementos de las rutas de transducción de señales mediadas por quinasas tipo MAP en <i>C. albicans</i> .....	25
<b>Figura I.8.</b> Modelo propuesto para la arquitectura de la pared celular de <i>C. albicans</i> . 29	
<b>Figura I.9.</b> Estructura química de quitina.....	30
<b>Figura I.10.</b> Estructura química de $\beta$ -1,3/ $\beta$ -1,6-glucano .....	33
<b>Figura I.11.</b> Clasificación de las proteínas de pared celular.....	37
<b>Figura I.12.</b> Esquema general de una proteína Pir .....	38
<b>Figura I.13.</b> Esquema general de una GPI-CWP de levaduras .....	40
<b>Figura I.14.</b> Esquema propuesto por el consorcio europeo Galar Fungail I para la pared celular de <i>C. albicans</i> .....	41
<b>Figura I.15.</b> Modificaciones postraduccionales: A) O-glicosilación y B) N-glicosilación de proteínas de pared celular en <i>Candida albicans</i> .....	45
<b>Figura I.16.</b> Estructura del enlace glicosil fosfatidil inositol (GPI) de proteínas de levaduras.....	47
<b>Figura III.1.</b> Proteínas identificadas en bandas de electroforesis, obtenidas mediante SDS-PAGE del material solubilizado de paredes celulares por $\beta$ -ME y NaOH.....	99
<b>Figura III.2.</b> Proteínas identificadas en el material solubilizado por $\beta$ -ME y NaOH desglucosilado químicamente con TFMS en comparación con las proteínas identificadas en el material sin desglucosilar.....	101

<b>Figura III.3.</b> Distribución en porcentaje según su función de las proteínas GPI identificadas en los experimentos correspondientes al apartado III.A.1 .....	104
<b>Figura III.4.</b> Sensibilidad a NaCl .....	113
<b>Figura III.5.</b> Sensibilidad a sorbitol .....	115
<b>Figura III.6.</b> Sensibilidad a H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> .....	117
<b>Figura III.7.</b> Sensibilidad a blanco de calcoflúor .....	119
<b>Figura III.8.</b> Sensibilidad a rojo congo .....	122
<b>Figura III.9.</b> Representación de la interrelación de proteínas con los experimentos realizados .....	124
<b>Figura III.10.</b> Número de experimentos en el que son identificadas las proteínas citadas en el capítulo de Resultados III.A .....	124
<b>Figura III.11.</b> Western-blot del material solubilizado de paredes celulares de <i>C. albicans</i> .....	129
<b>Figura III.12.</b> Estabilidad a -20°C del antígeno 3H8 .....	130
<b>Figura III.13.</b> Estabilidad a 100°C del antígeno 3H8 .....	130
<b>Figura III.14.</b> Estabilidad a SDS y temperatura del antígeno 3H8 .....	131
<b>Figura III.15.</b> Estabilidad a persulfato amónico del antígeno 3H8 .....	132
<b>Figura III.16.</b> Estabilidad a tripsina del antígeno 3H8 .....	133
<b>Figura III.17.</b> Western-blot de vesículas .....	133
<b>Figura III.18.</b> Determinación del peso molecular del antígeno 3H8 .....	134
<b>Figura III.19.</b> Extracción de paredes celulares en presencia de ácido iodoacético .....	135
<b>Figura III.20.</b> Western-blot del material solubilizado con β-ME de paredes celulares previamente tratadas con SDS 2% .....	136
<b>Figura III.21.</b> Desglicosilación química con TFMS .....	137
<b>Figura III.22.</b> β-eliminación del material solubilizado con β-ME .....	137
<b>Figura III.23.</b> Desglicosilación enzimática con Endo H .....	138
<b>Figura III.24.</b> Dot-blot del material eluído por cromatografía de afinidad en Concanavalina A-Sepharose 4B .....	140

<b>Figura III.25.</b> Dot-blot del material eluído por cromatografía de afinidad con proteína G-sepharose .....	142
<b>Figura III.26.</b> Dot-blot del material eluído de la cromatografía de afinidad NHS-activated sepharose 4 fast flow <sup>®</sup> .....	144
<b>Figura III.27.</b> Dot-blot del material eluído de la cromatografía de afinidad NHS-activated sepharose 4 fast flow <sup>®</sup> .....	144
<b>Figura III.28.</b> Dot-blot del material eluído de la cromatografía de afinidad con proteína A en condiciones de alta salinidad .....	145
<b>Figura III.29.</b> Dot-blot del material eluído de la cromatografía de afinidad con proteína A en condiciones de alta salinidad .....	146
<b>Figura III.30.</b> Estructura del N-manano (incluyendo fosfomanano) y O-manano de <i>C. albicans</i> .....	147
<b>Figura III.31.</b> Dot-blot del material solubilizado por $\beta$ -mercaptoetanol de paredes de mutantes homocigóticos deficientes en N- y O- glicosilación .....	148
<b>Figura III.32.</b> Inmunofluorescencia indirecta con células levaduriformes de mutantes homocigóticos deficientes en N- y O- glicosilación.....	149
<b>Figura III.33.</b> Dot-blot del material solubilizado por $\beta$ -ME de paredes celulares de mutantes homocigóticos deficientes en O- glicosilación .....	150
<b>Figura III.34.</b> Inmunofluorescencia indirecta con células de mutantes homocigóticos deficientes en O-glicosilación .....	150
<b>Figura III.35.</b> Western-blot del material solubilizado por $\beta$ -ME y NaOH de paredes celulares de la cepa SC5314 y de <i>pmt1/pmt6-URA3</i> .....	151
<b>Figura III.36.</b> Dot-blot del material solubilizado por $\beta$ -ME de paredes celulares de mutantes homocigóticos disruptados en genes que codifican proteínas con características bioquímicas semejantes a la proteína objeto de ser identificada .....	152
<b>Figura III.37.</b> Dot-blot del material solubilizado por $\beta$ -ME de mutantes homocigóticos .....	153
<b>Figura III.38.</b> Homología entre Gca1 y Gca2 de <i>C. albicans</i> .....	158

<b>Figura III.39.</b> Alineamiento de la proteína Gca1 de <i>C. albicans</i> y las proteínas Mya 3404 de <i>Candida tropicalis</i> , Nrr1 y-27907 de <i>Spathaspora passalidarum</i> , $\alpha$ -glucosidasa de <i>Debaryomyces occidentalis</i> y $\alpha$ -glucosidasa de <i>Saccharomycopsis fibuligera</i> .....	159
<b>Figura III.40.</b> Composición en aminoácidos de la proteína Gca1 .....	161
<b>Figura III.41.</b> Predicción teórica de la existencia de péptido señal mediante el empleo del programa SignalP 4.0 Server .....	162
<b>Figura III.42.</b> Secuencia aminoacídica de la proteína Gca1 .....	163
<b>Figura III.43.</b> Perfil hidrofóbico de la proteína Gca1 .....	163
<b>Figura III.44.</b> Representación esquemática de la estructura de la proteína Gca1 de <i>C. albicans</i> .....	165
<b>Figura III.45.</b> Esquema del casete de interrupción del plásmido pSFS2.....	166
<b>Figura III.46.</b> Plásmido pSFS2 que contiene el gen <i>SAT1</i> .....	166
<b>Figura III.47.</b> Esquema de la construcción del plásmido pADG (F1/pSFS2A/F2) conteniendo el casete de interrupción para el gen <i>GCAI</i> .....	167
<b>Figura III.48.</b> Esquema de inserción del casete de interrupción en un alelo de <i>GCAI</i> .....	168
<b>Figura III.49.</b> Esquema de inserción del casete de interrupción en un alelo del gen <i>GCAI</i> mediante recombinación homóloga.....	169
<b>Figura III.50.</b> Placas resultantes de la transformación.....	169
<b>Figura III.51.</b> Esquema de interrupción del gen <i>GCAI</i> , segundo paso de transformación .....	170
<b>Figura III.52.</b> Análisis de transformantes por PCR visualizados mediante electroforesis en gel de agarosa.....	172
<b>Figura III.53.</b> Curva de sensibilidad a zimoliasa .....	173
<b>Figura III.54.</b> Sensibilidad a rojo congo y blanco de calcoflúor .....	174
<b>Figura III.55.</b> Sensibilidad a dodecil sulfato sódico (SDS) .....	175
<b>Figura III.56.</b> Sensibilidad a cafeína con o sin sorbitol 0.5 M.....	176
<b>Figura III.57.</b> Sensibilidad a anfotericina B, ketoconazol y tunicamicina.....	177
<b>Figura III.58.</b> Sensibilidad a choque térmico (55°C) a diferentes períodos de tiempo .....	178

<b>Figura III.59.</b> Sensibilidad a choque osmótico .....	179
<b>Figura III.60.</b> Sensibilidad a estrés oxidativo .....	180
<b>Figura III.61.</b> Morfología de colonias y de bordes de colonias en medio de Lee.....	180
<b>Figura III.62.</b> Morfología de colonias y de bordes de colonias en medio de Spider..	181
<b>Figura III.63.</b> Morfología de colonias y de bordes de colonias en medio de extracto de levadura y prolina .....	181
<b>Figura III.64.</b> Determinación de la actividad glicídica .....	182

**ÍNDICE DE TABLAS.**

<b>Tabla I.1.</b> Clasificación taxonómica de <i>Candida albicans</i> .....	1
<b>Tabla I.2.</b> Distribución porcentual de invasiones fúngicas según el servicio clínico y/o las condiciones del paciente .....	3
<b>Tabla I.3.</b> Clasificación de las candidiasis .....	6
<b>Tabla I.4.</b> Principales drogas antifúngicas.....	8
<b>Tabla I.5.</b> Proteínas Als de <i>Candida albicans</i> .....	12
<b>Tabla II.1.</b> Cepas de <i>C. albicans</i> .....	51-53
<b>Tabla II.2.</b> Cepa de <i>E. coli</i> empleada .....	53
<b>Tabla II.3.</b> Plásmidos utilizados y construidos en este trabajo .....	54
<b>Tabla II.4.</b> Oligonucleótidos utilizados en este trabajo.....	62
<b>Tabla III.1.</b> Proteínas identificadas en el sobrenadante de protoplastos regenerados durante 5 horas .....	88
<b>Tabla III.2.</b> Proteínas identificadas en paredes celulares .....	89-90
<b>Tabla III.3.</b> Proteínas identificadas en el material solubilizado por $\beta$ -ME .....	91-92
<b>Tabla III.4.</b> Proteínas identificadas en el material solubilizado por NaOH .....	94
<b>Tabla III.5.</b> Proteínas identificadas en la banda de 250 kDa. ....	95-96
<b>Tabla III.6.</b> Proteínas identificadas en la banda de 75 kDa. ....	96-97
<b>Tabla III.7.</b> Proteínas identificadas en la banda de 36 kDa. ....	98
<b>Tabla III.8.</b> Proteínas identificadas en el material solubilizado por $\beta$ -ME y NaOH desglucosilado químicamente con TFMS .....	100
<b>Tabla III.9.</b> Clasificación según su función de las proteínas “atípicas” identificadas.	105
<b>Tabla III.10.</b> Identificación de proteínas en paredes celulares del mutante <i>pga13</i> .....	106
<b>Tabla III.11.</b> Identificación de proteínas en paredes celulares del mutante <i>pga26</i> .....	107
<b>Tabla III.12.</b> Identificación de proteínas en paredes celulares del mutante <i>pga31</i> .....	108
<b>Tabla III.13.</b> Identificación de proteínas en paredes celulares del mutante <i>PIR1/pir1</i> . .....	109

<b>Tabla III.14.</b> Identificación de proteínas en paredes celulares del doble mutante <i>pmt1/pmt6</i> .	109-110
<b>Tabla III.15.</b> Identificación de proteínas en paredes celulares de la cepa SC5314 de <i>C. albicans</i> crecida en medio YPD en fase exponencial tardía	111-113
<b>Tabla III.16.</b> Identificación de proteínas en paredes celulares de la cepa SC5314 de <i>C. albicans</i> crecida en medio YPD con NaCl 0.4 M	114
<b>Tabla III.17.</b> Identificación de proteínas en paredes celulares de la cepa SC5314 de <i>C. albicans</i> crecida en medio YPD con sorbitol 1 M	115-117
<b>Tabla III.18.</b> Identificación de proteínas en paredes celulares de la cepa SC5314 de <i>C. albicans</i> crecida en medio YPD con H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 3.5 mM	118-119
<b>Tabla III.19.</b> Identificación de proteínas en paredes celulares de la cepa SC5314 de <i>C. albicans</i> crecida en medio YPD con blanco de calcoflúor 20 µg/ml	120-121
<b>Tabla III.20.</b> Identificación de proteínas en paredes celulares de la cepa SC5314 de <i>C. albicans</i> crecida en medio YPD con rojo congo 20 µg/ml	122-123
<b>Tabla III.21.</b> Especificidad de la proteína A y proteína G	141
<b>Tabla III.22.</b> Características de NHS-activated Sepharose 4 fast flow <sup>®</sup>	143
<b>Tabla III.23.</b> Características de las proteínas estudiadas	153
<b>Tabla III.24.</b> Comparación del porcentaje de homología de la proteína Gca1 de <i>C. albicans</i> y las proteínas Mya 3404 de <i>Candida tropicalis</i> , Nrr1 y-27907 de <i>Spathaspora passalidarum</i> , α-glucosidasa de <i>Debaryomyces occidentalis</i> y α-glucosidasa de <i>Saccharomycopsis fibuligera</i>	160
<b>Tabla III.25.</b> Uso de codones en el gen <i>GCAI</i>	161



## **I. INTRODUCCIÓN**



## I.1. GENERALIDADES Y TAXONOMÍA DE *Candida albicans*.

La levadura *Candida albicans* se define como un hongo imperfecto, que por carecer de ciclo sexual definido fue agrupado inicialmente en la clase *Deuteromycetes*. La similitud en la secuencia de sus ácidos nucleicos, así como una evidente semejanza fisiológica y fenotípica con los hongos pertenecientes a la clase *Ascomycetes*, ha permitido su posterior incorporación a este grupo. Su definición taxonómica comprende células vegetativas con gemación multilateral, carentes de reproducción sexual y por tanto, diploides permanentes.

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

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

<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 *Candida albicans*.**

En la actualidad, y gracias a la secuenciación del genoma de *C. albicans*, se ha demostrado que muchos de los genes implicados en el ciclo sexual de *Saccharomyces cerevisiae* se encuentran en *C. albicans* (Hull *et al.*, 1999; Magee *et al.*, 2002).

De hecho, parece poseer homólogos de todos los elementos que conforman la ruta de respuesta a feromonas, involucrados en el apareamiento de *S. cerevisiae*, aunque

no posee genes homólogos para todos los genes implicados en la meiosis (Tzung *et al.*, 2001).

El género *Candida* comprende aproximadamente 154 especies, entre ellas *C. dubliniensis*, *C. glabrata*, *C. guilliermondi*, *C. kefyr*, *C. krusei*, *C. lusitaniae*, *C. milleri*, *C. oleophila*, *C. parapsilopsis*, *C. tropicalis*, *C. utilis* etc... siendo *C. albicans* la más relevante en términos de patogenicidad.

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

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

Las infecciones producidas por *C. albicans* reciben el nombre de candidiasis. La candidiasis es una infección común en la piel, esófago, cavidad oral, tracto gastrointestinal, sistema vascular y vagina. La mayoría de estas infecciones tienen lugar en pacientes inmunocomprometidos o en estados de debilidad: post-operatorio, estrés, personas sometidas a tratamientos prolongados con antibióticos de amplio espectro, corticoides, quimioterapia, SIDA y diabetes entre otros. Como consecuencia de esta debilidad del hospedador, el microorganismo infecta distintos tejidos mediante la expresión de numerosos factores de virulencia que contribuyen en la patogénesis.

En respuesta a su necesidad de unión a diferentes superficies, las células fúngicas son capaces de formar estructuras tridimensionales irreversibles compuestas por células (tanto en forma levaduriforme como micelial) englobadas en matrices exopoliméricas denominadas biopelículas (Kumamoto, 2002; Douglas, 2003). La composición, morfología y contenido de la matriz están influenciados por las condiciones en que se formen. La formación de biopelículas supone un serio problema de salud pública debido al incremento de resistencias a diferentes antibióticos (Kumamoto, 2002).

Una revisión epidemiológica de micosis invasivas realizada en norte América por el departamento de Patología y Medicina de la Universidad de Iowa, demostró que el número de casos anuales de sepsis causadas por hongos aumentó un 207% entre 1979 y 2003 (Martín *et al.*, 2003). Los agentes que con más frecuencia causan micosis oportunistas son *Candida* spp, *Cryptococcus neoformans*, *Pneumocystis jirovecii* y *Aspergillus fumigatus*, entre otros (Tabla I.2) (Fishman *et al.*, 2008; Pfaller *et al.*, 2006; Pfaller *et al.*, 2004; Procop *et al.*, 2004; Tellez *et al.*, 2008; Zilberberg *et al.*, 2008). De hecho, la incidencia anual estimada de casos de micosis invasivas debido a estos patógenos varía de 72 a 290 infecciones por millón de población por *Candida* spp, 30 a 66 infecciones por millón por *C. neoformans* y de 12 a 34 infecciones por millón de población por *Aspergillus* spp. (Hajjeh *et al.*, 2004; Pfaller *et al.*, 2007); Rees *et al.*, 1998; Wilson *et al.*, 2002; Zaoutis *et al.*, 2005; Zilberberg *et al.*, 2008).

Patógeno	M.G	HEM.	T.C.M	VIH	U.C.I.N	T.ORG.	ONCOLOG.	CIRUG.
	% INFECCIONES EN SERVICIOS CLÍNICOS.							
<i>Candida</i> spp.	81,7	42,6	31,6	32,7	96,3	57,2	89,2	91,2
<i>Aspergillus</i> spp	8,3	33,8	50,7	4,9	1,9	26	4,9	3,4
<i>Cryptococcus</i> spp	4	2,1	0	48,7	0	6,4	1,6	1
Otras levaduras*	1,2	3,3	2,7	3,4	0	6,4	1,6	1
Zygomycetes	1,1	5,2	6,4	1,1	1,9	1,7	0	0,6

**Tabla I.2. Distribución porcentual de invasiones fúngicas según el servicio clínico y/o las condiciones del paciente.** Datos recopilados de Horn *et al.*, 2007; Horn *et al.*, 2009 y Neofytos *et al.*, 2009. **M.G.**, medicina general; **HEM.**, hematología; **T.C.M.**, transplante de células madre; **VIH** virus de inmunodeficiencia humana; **U.C.I.N.**, unidad de cuidados intensivos de neonatos; **T.ORG.**, transplante de órganos; **ONCOLOG.**, servicio de oncología; **CIRUG.**, servicio de cirugía (no transplantados). \*Otras levaduras incluye 6 casos de *Malassezia* spp., 26 de *Pneumocystis* spp, 12 de *Rhodotorula* spp, 21 de *Saccharomyces* spp, y 6 de *Trichosporon* spp.

Aunque el rango de patógenos para provocar infecciones fúngicas invasivas es muy diverso, la mayoría de estas infecciones son debidas a *Candida* spp. (Perlroth *et al.*, 2007). La fuente principal de infección por *Candida* spp. en micosis superficiales y profundas es el paciente.

En el caso de la infección endógena, la microbiota del hospedador aprovecha la “oportunidad” de inmunodepresión para causar infección (Pfaller, 1996). En la transmisión exógena existen múltiples vehículos que pueden introducir *Candida* spp. en el hospedador tales como soluciones de irrigación contaminadas, fluidos de nutrición parenteral, válvulas cardiacas, e incluso las manos del servicio de asistencia sanitaria

pueden llegar a ser un reservorio de transmisión nosocomial. (Pappas, 2006; Asmundsdottir *et al.*, 2008; Blis *et al.*, 2008; Mean *et al.*, 2008).

Más de 100 especies diferentes de *Candida* han sido descritas pero solo unas pocas se encuentran implicadas en infecciones clínicas. *Candida albicans* es la especie más comúnmente aislada de material clínico y generalmente responsable de más del 90% de infecciones en mucosas y de 40-70% de episodios de candidemia, aunque puede variar en función del servicio clínico donde el paciente se encuentre hospitalizado (Hachem *et al.*, 2008).

Aproximadamente del 95-97% de todas las infecciones fúngicas invasivas asociadas a *Candida* spp. son causadas por: *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis* y *C. krusei*; *C. glabrata* y *C. krusei* pueden ser consideradas causantes de infecciones fúngicas invasivas debido a su intrínseca y adquirida resistencia a azoles y otros agentes antifúngicos (Hachem *et al.*, 2008).

Horn *et al.* (2009) llevaron a cabo un estudio con una población formada por 2019 pacientes (niños y adultos) procedentes de diversos centros sanitarios de Norte América que habían sido diagnosticados con infección fúngica invasiva desde el 1 de julio de 2004 hasta el 5 de marzo de 2008. La media de edad de los pacientes seleccionados era de 53,5 años (rango de 0 a 96,4 años) siendo un 53,7% hombres. La mayoría de los pacientes eran de raza blanca (62,6%) seguida de raza negra (21,7%).

El diagnóstico de candidemia fue basado en el cultivo de muestras sanguíneas y en la aparición de signos y síntomas clínicos relevantes. De hecho, el 43% de los pacientes había recibido terapia antifúngica como profilaxis 30 días previos al diagnóstico de candidemia. En el estudio, se descartaron todos aquellos pacientes en cuyos cultivos se identificaron más de una especie diferente de *Candida*. De manera que la distribución de especies aisladas de *Candida* se detalla en la figura I.1, siendo *C. albicans* la especie más comúnmente identificada (47%). Las otras especies aisladas fueron *C. glabrata* (26%), *C. parapsilosis* (16%) *C. tropicalis* (8%) y *C. krusei* (3%).

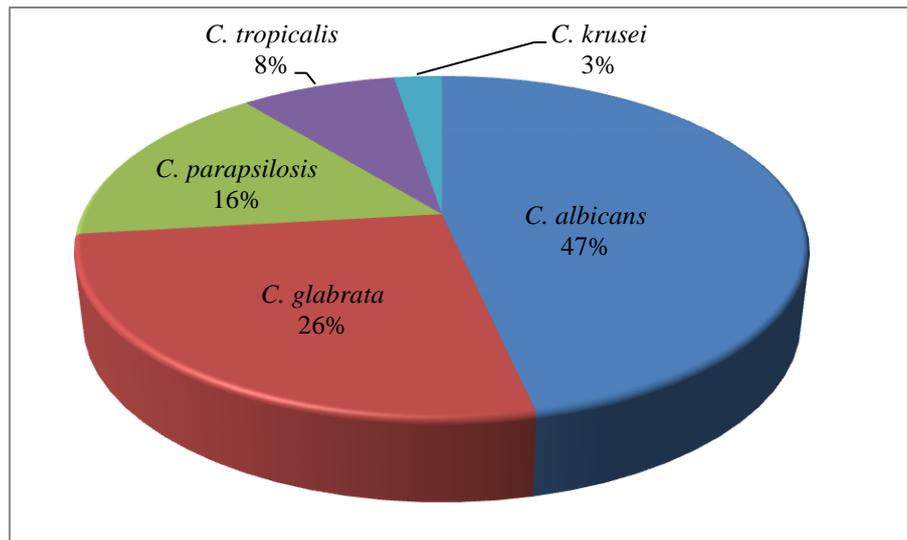


Figura I.1. Distribución de especies del género *Candida* identificadas en infecciones fúngicas invasivas. Datos de Horn *et al.*, 2009.

### I.3. CLASIFICACIÓN DE LAS CANDIDIASIS Y SU DIAGNÓSTICO.

Las infecciones producidas por especies del género *Candida* se dividen en dos grandes grupos: superficiales y profundas (Tabla I.3).

Las **candidiasis superficiales** afectan principalmente a la piel y mucosas oral y genital, y pueden ser de carácter agudo o crónico. La candidiasis oral se puede presentar en varias formas clínicas, siendo la más común la pseudomembranosa o muguet, que afecta a la mucosa de boca y faringe, y suele producirse en recién nacidos y en ancianos o inmunodeprimidos. La candidiasis genital ocurre principalmente en las mujeres y se denomina candidiasis vulvovaginal que representa alrededor del 20% de los casos de vaginitis y si no se tratan adecuadamente pueden ser recurrentes. También se puede producir balanitis candidiásica en el varón (Ono y Yasumoto, 2009).

Las **candidiasis profundas** producen lesiones agudas o crónicas que afectan a uno o más órganos vitales, y generalmente desembocan en una septicemia, denominándose entonces candidiasis sistémicas o diseminadas. Se diagnostican principalmente en pacientes inmunocomprometidos y suelen ser de pronóstico grave. La mortalidad puede alcanzar el 50%, aunque hay que tener en cuenta que casi siempre

aparece como complicación secundaria de una enfermedad grave (por ejemplo pacientes con VIH), con lo que el índice de mortalidad aumenta (Mc Neil *et al.*, 2001).

CANDIDIASIS SUPERFICIALES	CANDIDIASIS PROFUNDAS
<ul style="list-style-type: none"><li>• <b>Candidiasis cutáneas</b><ul style="list-style-type: none"><li>-Intértrigo</li><li>-Foliculitis</li></ul></li><li>• <b>Candidiasis en mucosas</b><ul style="list-style-type: none"><li>-Orofaringeas</li><li>-Vulvovaginal</li><li>-Esofágica</li><li>-Tracto urinario</li></ul></li><li>• <b>Candidiasis ungueales</b><ul style="list-style-type: none"><li>-Onicomycosis</li><li>-Paroniquia</li></ul></li><li>• <b>Otras</b><ul style="list-style-type: none"><li>-Otitis externa</li><li>-Queratitis</li></ul></li></ul>	<ul style="list-style-type: none"><li>• <b>Candidiasis localizadas</b><ul style="list-style-type: none"><li>-Peritonitis</li><li>-Esofagitis</li><li>-Pielitis</li></ul></li><li>• <b>Candidiasis sistémicas</b><ul style="list-style-type: none"><li>-Endocarditis</li><li>-Síndrome abuso de drogas</li><li>-Hepatoesplénica</li><li>-Asociada a nutrición parenteral</li><li>-Neonatal</li></ul></li></ul>

**Tabla I.3. Clasificación de las candidiasis.**

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

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

### **I.3.1. Tratamiento de las candidiasis.**

Las candidiasis superficiales son controladas mediante los antifúngicos actuales, aunque el nivel de recurrencias es muy elevado. En cambio, el tratamiento de las candidiasis sistémicas presenta mayores complicaciones, dado que los antifúngicos disponibles son muy tóxicos y su aplicación terapéutica requiere de grandes dosis, pudiendo desencadenar una depresión en la función hematopoyética medular que agrava los estados de inmunosupresión en la mayoría de los pacientes tratados (Sobel y Rex, 2001).

La búsqueda de nuevos antifúngicos se ha centrado en la actuación de éstos sobre dianas presentes en los hongos y ausentes en células de mamíferos. Una de estas diferencias es la presencia de ergosterol en la membrana plasmática de las células fúngicas, en lugar de colesterol presente en las células animales.

Actualmente, los principales agentes antifúngicos empleados en el tratamiento de las candidiasis se agrupan en tres grupos terapéuticos: antibióticos macrólidos poliénicos, azoles y equinocandinas (Tabla I.4).

- Los antibióticos macrólidos poliénicos son moléculas circulares que consisten en una región hidrófoba y otra hidrófila lo que facilita que sean moléculas anfóteras. Fármacos tales como anfotericina B y similares actúan sobre el ergosterol, formando poros hidrofílicos en la membrana plasmática y teniendo un amplio espectro de acción, pero causan toxicidad en las células de mamíferos.
- Los azoles inhiben la citocromo P450 14 $\alpha$ -desmetilasa que convierte el lanosterol en ergosterol, el cual es un componente de la membrana celular. Entre los azoles, el fluconazol ha demostrado tener una gran eficacia en el tratamiento de la candidiasis en pacientes neutropénicos, y debido al uso de este antifúngico en profilaxis se ha disminuido considerablemente la incidencia de candidiasis invasivas. Además, el fluconazol tiene a favor su bajo coste, baja toxicidad y su biodisponibilidad vía oral e intravenosa, pero tiene reducida su actividad en *C. glabrata* (Fortún, 2011). Sin embargo, voriconazol aporta pocos beneficios respecto al uso de fluconazol en candidiasis invasivas, dado que comparte resistencia cruzada con éste en cepas de *C. glabrata*, se asocia con mayor número de interacciones farmacológicas y presenta diferencias individuales farmacocinéticas que hacen recomendable la monitorización de concentraciones (Hope *et al.*, 2008).
- Las equinocandinas son metabolitos secundarios de ciertos hongos que consisten en un hexapéptido cíclico con una cadena lipídica responsable de la actividad antifúngica. Las equinocandinas se unen a la enzima Fks1 localizada en la membrana plasmática que participa en la síntesis de  $\beta$ -1,3-glucano (componente de la pared celular). Así es como anidulafungina, una nueva equinocandina, ha demostrado ser eficaz en el tratamiento de la candidiasis invasiva, con una

efectividad similar a fluconazol. Son caras, pero comparadas con los azoles presentan menos interacciones, menor número de efectos secundarios y son muy activas frente a cepas resistentes a azoles.

Además de los tres grupos terapéuticos principales citados anteriormente, existen otros fármacos antifúngicos que interfieren en el ensamblaje de los microtúbulos, en la síntesis de proteínas o en la actividad de la quitina sintetasa, tal como se detalla en la tabla I.4.

ANTIFÚNGICOS	DIANA	MECANISMO DE ACCIÓN
<b>Antibióticos</b> <b>Macrólidos poliénicos</b> (nistatina, anfotericina B)	Ergosterol	Formación de poros hidrofílicos en la membrana plasmática.
<b>Azoles</b> (ketoconazol, fluconazol, itraconazol, voriconazol)	Citocromo P450	Alteración de la permeabilidad celular.
<b>Equinocandinas</b> (anidulafungina) <b>Pneumocandinas</b>	$\beta$ -glucano sintasa	Inhibición de la síntesis del $\beta$ -1,3-glucano en la pared celular.
<b>Nikomicinas y Polioxinas</b>	Quitina sintetasa	Alteración de la pared celular.
<b>Sordarinas</b>	Factor de elongación	Inhiben la síntesis proteica.
<b>Griseofulvina</b>	Microtúbulos	Interfieren en el ensamblaje de los microtúbulos.
<b>Flucitosina</b>	ARN	Inhibición de la síntesis proteica.
<b>Ciclopiroxolamina</b>	Transmembrana ATPasa	Inhiben el transporte $\text{Na}^+\text{K}^+$ en la membrana.
<b>Fenilmorfolinas</b>	Ergosterol	Inhiben las enzimas D14 reductasa y D7-D8 isomerasa.
<b>Alilaminas</b>	Ergosterol	Inhiben la escualeno epoxidasa.

Tabla I.4. Principales drogas antifúngicas.

### I.3.1.1. Tratamiento combinado.

La disponibilidad de nuevos antifúngicos, con 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. 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, se debería reservar el uso combinado en casos de mala evolución, con candidemia persistente después de la retirada del catéter venoso central, especialmente si el paciente es neutropénico. Por tanto, es necesario desarrollar nuevos ensayos clínicos que corroboren este posible beneficio (Zaragoza y Pemán, 2012).

### **I.3.1.2. Vacunas.**

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

Puesto que la candidiasis sistémica es la cuarta infección hematológica más común en pacientes 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. FACTORES DE VIRULENCIA.**

*C. albicans* posee una serie de factores intrínsecos cuya misión 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).

La capacidad patógena del género *Candida* depende principalmente del estado inmunológico del hospedador. Sin embargo, algunas características del hongo hacen de él un patógeno potencial y son las responsables de que se comporte como tal en determinadas circunstancias.

En primer lugar para el desarrollo de un proceso infeccioso es necesario el reconocimiento y posterior unión del parásito a las células del hospedador, además de la producción, por parte de *C. albicans*, de una serie de enzimas degradativas que favorecen la infección. Por otro lado, la invasión de los tejidos se facilita por la transición levadura-micelio (morfogénesis). Finalmente, la variabilidad fenotípica contribuye en gran medida a la plasticidad del microorganismo y a la posibilidad de evadir los mecanismos de defensa del hospedador.

Los factores de virulencia más característicos del género *Candida* se pueden englobar en cuatro grandes grupos: (i) factores de adhesión o adhesinas, (ii) enzimas degradativas (proteinasas aspárticas secretadas (SAP) y fosfolipasas (PL)), (iii) morfogénesis y (iv) “switching” o cambio fenotípico.

### **I.4.1. Adhesinas.**

La primera etapa de la colonización se basa en la adhesión de los microorganismos a la superficie de células hospedadoras, y es un factor crucial para que la infección se desarrolle con éxito. Las proteínas fúngicas implicadas en este proceso se denominan adhesinas (Chaffin *et al.*, 1998) y reconocen componentes específicos de las células del hospedador (ligandos o receptores) de distinta naturaleza:

- Carbohidratos, (polisacáridos, glicoproteínas y residuos de fructosa que aparecen en todos los grupos sanguíneos del sistema ABO).
- Proteínas (colágeno tipo I y IV, fibronectina, laminina, fibrinógeno, entactina y componentes del sistema del complemento C3b).

La fibronectina es una proteína dimérica que circula en forma soluble en el plasma y se encuentra en abundancia en tejido conectivo y membrana basal. Se han identificado numerosos receptores en *C. albicans* para esta proteína, que parecen estar relacionados con integrinas de mamífero. La laminina es una glicoproteína multifuncional de elevado peso molecular, capaz de unirse a una gran cantidad de los componentes de la matriz extracelular como colágeno tipo IV, heparina, proteoglicano y entactina, lo cual le confiere un importante papel en la arquitectura de la membrana basal. Interviene, además,

en adhesión y diseminación celular, desarrollo de neuronas, morfogénesis y movilidad celular.

- Lípidos.

#### **I.4.1.1. Adhesinas en *C. albicans*.**

##### **I.4.1.1.1. Als (agglutinin-like sequence).**

En *C. albicans* han sido clonados varios genes que codifican posibles adhesinas. El hecho de que células de *Saccharomyces cerevisiae* se adhieran a una variedad de superficies significativamente menor que *C. albicans* ha motivado la realización de estudios conducentes a la identificación de ocho miembros de una familia de genes relacionados.

Los genes de la familia *ALS* de *C. albicans* (“agglutinin-like sequence”) codifican glicoproteínas de superficie celular como Als1, Als2, Als3, Als4, Als5, Als6, Als7 y Als9, implicadas en la adhesión del microorganismo a las células del hospedador, y están relacionados con genes de aglutininas en *S. cerevisiae* que median interacciones célula-célula durante el apareamiento (“*mating*”) de células haploides (Hoyer *et al.*, 2008).

Entre las características comunes de las proteínas de la familia Als podemos destacar la presencia de tres dominios (Figura I.2). El primero está altamente conservado, se encuentra en el extremo N-terminal de la proteína y está formado por 433-436 aminoácidos. El dominio central es de tamaño variable y posee repeticiones en tándem de 36 aminoácidos que pueden variar en número según los genes y alelos permitiendo la clasificación en tres subgrupos: *ALS1*, *ALS2*, *ALS3* y *ALS4* se encuentran en el primer subgrupo, *ALS5*, *ALS6* y *ALS7* en un segundo subgrupo, mientras que *ALS9* no está en ninguno de esos subgrupos. El dominio C-terminal, también de tamaño variable, presenta una región de la proteína rica en serinas y treoninas. Todas las proteínas pertenecientes a esta familia poseen características típicas de proteínas de secreción como es la existencia de un péptido señal y un extremo carboxilo terminal hidrofóbico, lo que indica una posible unión a la superficie celular mediante anclaje a GPI (glicosil fosfatidil inositol).



**Figura I.2. Esquema de la estructura de las proteínas de la familia Als (Hoyer., L. 2001).**

La expresión de los genes *ALS* se puede ver afectada por el estado de crecimiento de la célula así como por la morfología. Por ejemplo, Als3 es una glicoproteína de pared cuya expresión está regulada por las condiciones ambientales y aumentada en filamentación, que media la adhesión a tejidos del hospedador pudiendo verse implicada en invasión y en adquisición de hierro (Liu y Filler, 2011). Als1 y Als4 son importantes para la construcción de la pared celular tal como fue descrito por Castillo *et al.*, 2006 (Tabla I.5).

Proteína	Función	Referencias
<b>Als1</b>	Adhesión, colonización. Organización de la pared celular.	Kamai <i>et al.</i> , 2002. Castillo <i>et al.</i> , 2006.
<b>Als2</b>	Formación de biofilm y micelio. Adhesión a células endoteliales.	Zhao <i>et al.</i> , 2005.
<b>Als3</b>	Formación de biofilm. Adhesión.	Nobile y Mitchell, 2006.
<b>Als4</b>	Organización de la pared celular. Formación de micelio y adhesión.	Castillo <i>et al.</i> , 2006. Zhao <i>et al.</i> , 2005.
<b>Als5</b>	Adhesión.	Klotz <i>et al.</i> , 2004.
<b>Als6</b>	Adhesión.	Hoyer y Hecht, 2000.
<b>Als7</b>	Adhesión.	Hoyer y Hecht, 2000.
<b>Als9</b>	Adhesión.	Zhao <i>et al.</i> , 2003.

**Tabla I.5. Proteínas Als de *Candida albicans*.**

#### **I.4.1.1.2. Hwp1.**

Hwp1 es una adhesina expresada en la superficie de la hifa y se une covalentemente a células del hospedador (Sundstrom *et al.*, 2002). *HWPI* codifica una manoproteína GPI cuya expresión es regulada por factores transcripcionales que controlan la morfogénesis. Esta manoproteína se encuentra orientada con su dominio N-terminal hacia la superficie y el extremo C-terminal unido covalentemente al  $\beta$ -glucano de la pared celular. La secuencia amino terminal de la proteína (rica en prolina y glutamina) puede servir de sustrato a transglutaminasas (Staab *et al.*, 1999)

con lo que la unión del micelio producido por *C. albicans* a las células del epitelio bucal sería estable y covalente.

#### **I.4.1.1.3. Int1.**

*C. albicans* se une a diferentes ligandos de la matriz extracelular, tales como fibrinógeno, laminina y colágeno (tipo I y IV) (Crowe *et al.*, 2003).

Esta actividad se debe a la presencia de proteínas de tipo integrina. *C. albicans* expresa una proteína de tipo integrina, Int1 que posee un dominio con una homología del 18% con la integrina humana  $\alpha$ -M que participa en la coordinación de cationes divalentes. Además presenta una homología del 25% con una proteína de *Staphylococcus aureus* que se une al fibrinógeno.

#### **I.4.1.1.4. Mnt1.**

La hidrofobicidad de la pared celular de *C. albicans* es una propiedad que depende del nivel de glicosilación de las proteínas. Diferentes estudios han demostrado que cambios en los niveles de glicosilación de las proteínas de pared afectan la ultraestructura de la superficie celular y el fenotipo de *C. albicans*.

La proteína Mnt1 (Thomson *et al.*, 2000) es una proteína de membrana tipo II, con actividad  $\alpha$ -1,2-manosiltransferasa, necesaria para los procesos de N- y O-glicosilación en hongos, cuya delección disminuye la adherencia y la virulencia.

#### **I.4.1.1.5. Eap1.**

*EAPI* es regulado por el factor transcripcional Efg1, un regulador de la morfología celular. Eap1, como las proteínas Als, es una proteína GPI y corresponde a uno de los genes de floculación en levaduras (revisado por Verstrepen y Klis, 2006). Un ensayo de inmunofluorescencia indirecta demostró, utilizando la proteína Eap1 marcada con un epítipo de hemaglutinina, que ésta se encuentra localizada en la superficie celular (Li *et al.*, 2007).

En cuanto a la adherencia, ésta es dependiente de Efg1, debido a que en la cepa mutante *efg1* se había reducido la adherencia en comparación con la cepa salvaje y la

adherencia se restauró con la expresión de *EAPI* bajo el promotor de actina en la cepa mutante *efg1* (Li y Palecek, 2003).

### **I.4.1.1.6. Ywp1.**

Ywp1 es una manoproteína GPI cuya localización es mayor en la superficie celular de levadura inmediatamente después del final del crecimiento exponencial (Granger *et al.*, 2005). No se encontró ni en hifa ni pseudohifa. La cepa *ywp1* puede formar biopelículas y se adhiere más a poliestireno y otras superficies, a diferencia de la cepa parental (Lan *et al.*, 2003). En condiciones que favorecen la formación de hifas, se ha visto menor efecto, debido a que Ywp1 no se encuentra en la superficie de las hifas.

### **I.4.1.1.7. Ecm33.**

Ecm33 es una manoproteína GPI, cuyo gen codificante es un miembro de una familia de dos genes que incluyen *ECM331* y *ECM33*. Estos genes se encuentran implicados en la respiración mitocondrial y están clasificados como genes con intrones (Mitrovich *et al.*, 2007). Se ha demostrado que en células de la cepa *ecm33*, la filamentación se encuentra retrasada en medio YPD con suero y poca formación de hifas, aunque éstas llegaron a ser más grandes que en la cepa parental (Martínez-López *et al.*, 2006).

### **I.4.1.1.8. Mp65.**

Es una manoproteína de 65 kDa que se encuentra presente tanto en la pared celular como en el sobrenadante del cultivo de *C. albicans* en condiciones normales. No se han demostrado diferencias tanto en células de la cepa mutante *mp65* y parental en cuanto al tiempo de regeneración, pero sí en la formación de micelio que no puede formarse en células de la cepa mutante. Además, el mutante presenta menor adhesión al poliestireno que la parental (Sandini *et al.*, 2007). Esta observación sugiere que la pérdida de la proteína Mp65 provoca una falta de formación de micelio y por tanto una reducción en la adhesión al plástico.

## I.4.2. Enzimas degradativas.

### I.4.2.1. Proteinasas aspárticas (Sap).

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

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

Los productos génicos de la familia *SAP* se sintetizan como proenzimas que sufren un procesamiento a nivel del RE y del aparato de Golgi, antes de ser transportados hacia la superficie celular para su secreción o anclaje mediante un resto GPI a la pared celular. Modelos experimentales apuntan que Sap1 y Sap3 son las

proteasas más importantes en infecciones superficiales (Schaller *et al.*, 2000). Sin embargo, en modelos de infecciones sistémicas son Sap4 y Sap6, las proteasas predominantes correlacionadas con la enfermedad (Staib *et al.*, 2000). Se ha demostrado que los genes *SAP4*, *SAP5* y *SAP6* se inducen después de la internalización de células de levadura por macrófagos, mientras que *SAP4* y *SAP6* son genes de expresión mayoritaria en fase micelial (Felk *et al.*, 2002; Chen *et al.*, 2002; Korting *et al.*, 2003).

### **I.4.2.2. Fosfolipasas.**

La secreción de fosfolipasas es otro de los factores que confiere virulencia a *C. albicans*. Las fosfolipasas conforman un grupo heterogéneo de enzimas capaces de hidrolizar una o más uniones éster de los fosfoglicéridos. Las membranas biológicas, al estar constituidas por lípidos y proteínas, constituyen una diana principal para el ataque de proteasas y fosfolipasas. La acción de las fosfolipasas tiende a provocar la disgregación de las membranas biológicas (Ibrahim *et al.*, 1995).

Se ha identificado un amplio grupo de fosfolipasas secretadas por *C. albicans* (fosfolipasa A, fosfolipasa B, fosfolipasa C, fosfolipasa D1, lisofosfolipasa y lisofosfolipasa transacilasa). Plb1 es una glicoproteína de 84 kDa con una actividad hidrolasa y lisofosfolipasa-transacilasa, probablemente secretada, cuya actividad se ha localizado en la parte apical de la hifa en crecimiento (Ghannoum, 2000).

Ensayos de interrupción del gen de la fosfolipasa B de *C. albicans* (*CaPLB1*) han demostrado que las cepas que carecen de este gen no tienen alterada la adherencia pero 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).

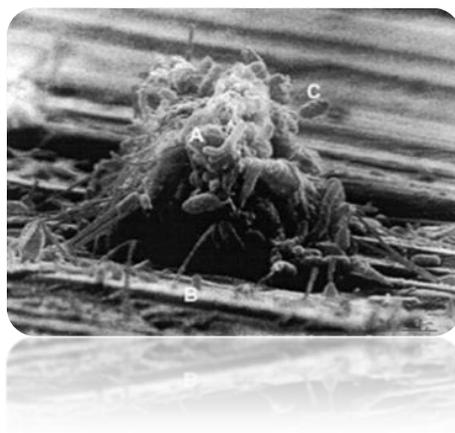
### **I.4.2.3. Lipasas.**

Las lipasas catalizan la hidrólisis de esteres de mono-, di-, y triacilgliceroles. En *C. albicans* estas funciones son llevadas a cabo por una familia formada por 10 proteínas muy similares (Lip1-10) (Schaller *et al.*, 2005). Aunque el papel de cada gen *LIP* no ha sido elucidado, estos genes podrían indicar una contribución importante a la virulencia de este patógeno oportunista en mamíferos. La secuencia de estas proteínas es similar en más de un 80% de los aminoácidos.

### I.4.3. Biopelículas.

*C. albicans* es un organismo polimórfico, es decir, experimenta transiciones morfológicas reversibles entre formas de crecimiento de levadura, micelio, pseudomicelio y clamidospora. Esta habilidad de cambiar su patrón de crecimiento ha sido considerada un requisito importante para la virulencia (Saville *et al.*, 2003), pero también juega un papel muy importante la formación de biopelículas (Richard *et al.*, 2005).

Las biopelículas constituyen, probablemente, la forma de crecimiento habitual para la mayoría de microorganismos, formando asociaciones complejas de células, productos extracelulares y detritus atrapados en la estructura de la biopelícula o liberados por las células que se lisan a medida que la biopelícula envejece. Son comunidades celulares altamente organizadas con una compleja estructura tridimensional, adheridas a un sustrato sólido (biológico o no biológico) (Donlan, 2002) (Figura I.3).



**Figura I.3. Micrografía de barrido de una biopelícula de *C. albicans*.**

(A) Biopelícula desarrollada, (B) Sustrato, (C) Célula adherida (Donlan *et al.*, 2002).

El mecanismo de resistencia de los microorganismos en las biopelículas a los agentes antimicrobianos todavía no es del todo comprendido. Entre las posibles explicaciones propuestas se incluyen: (i) Penetración restringida de las drogas a través de la matriz de la biopelícula (ii) Cambios fenotípicos a causa de la disminución en la tasa de crecimiento o por la limitación de nutrientes (iii) Expresión de genes de resistencia inducida por el contacto de las células con la superficie.

Aunque la organización de las biopelículas en hongos no es tan bien conocida como en bacterias, las características estructurales básicas y las propiedades en

*C. albicans* han sido establecidas. La composición química de la matriz exopolimérica que envuelve a las microcolonias, así como la ruta de señalización célula-célula que intervienen durante su formación, constituyen un campo de investigación interesante en el desarrollo de nuevas drogas contra la biopelícula (Douglas, 2003).

### **I.4.4. Variaciones fenotípicas.**

La gran variabilidad adaptativa que presentan las especies del género *Candida*, en especial *C. albicans*, obedece a un mecanismo desarrollado por el hongo para sobrevivir a las difíciles condiciones ambientales que en el desarrollo de una infección le permite evadir los sistemas de defensa del hospedador. Algunas cepas de *C. albicans* tienen la habilidad de cambiar de forma espontánea y reversible, y con elevada frecuencia (entre  $10^{-4}$  y  $10^{-5}$ ) entre una fase “blanca” y otra “opaca” (Soll, 1997). En la fase blanca las colonias son blancas, redondas y con forma de cúpula, mientras que en la fase opaca las colonias son más oscuras, alargadas y planas en agar sólido (Bennet y Johnson, 2005).

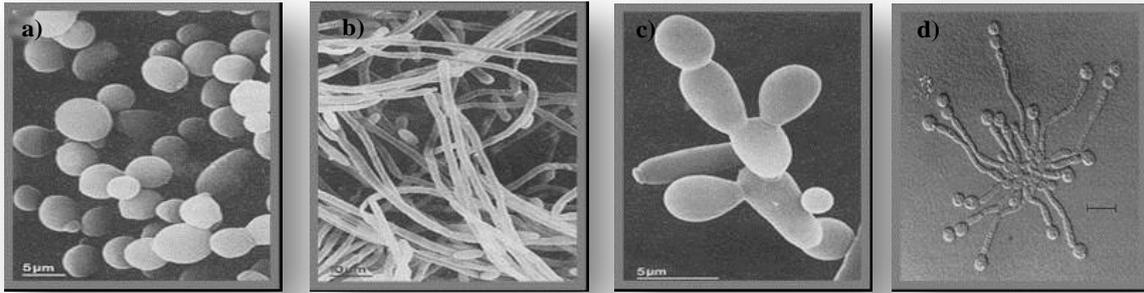
El cambio fenotípico entre colonias blancas-opacas se ha relacionado con el descubrimiento del apareamiento en *C. albicans*. Las células opacas tienen una mayor eficiencia de apareamiento que las blancas, lo que sugiere que el fenotipo opaco es una forma competente de *C. albicans* para el apareamiento (Lockhart *et al.*, 2003). Parece que el fenómeno del apareamiento en *C. albicans* ha persistido, porque está estrechamente vinculado al cambio fenotípico que facilita la vida comensal de este hongo (Magee y Magee, 2004). Se han encontrado genes específicos de la fase blanca como *WHI1* y *EFG1* y de la fase opaca, como *OP4*, *SAP1*, *SAP3* y *CDR3*. Estudios recientes indican que *C. albicans* utiliza las mismas rutas de transducción de señales para la regulación del dimorfismo, apareamiento y variación fenotípica (Berman y Sudbery, 2002).

### **I.4.5. Morfogénesis.**

El término morfogénesis en *C. albicans* se refiere a la transición reversible entre la forma unicelular levaduriforme y el crecimiento filamentoso o micelio. En realidad, la definición de *C. albicans* como un hongo dimórfico es una gran simplificación que enmascara los distintos cambios morfológicos que puede experimentar este hongo dependiendo de factores nutritivos y ambientales concretos.

La morfogénesis constituye un punto crítico en la investigación de *C. albicans*, debido a que la habilidad de experimentar cambios entre las morfologías de levadura e hifa, se considera un factor contributivo a la virulencia. Como criterio general, se pueden distinguir los siguientes tipos celulares:

- **Levaduras:** También denominadas blastoconodios o blastosporas. Se reproducen asexualmente por gemación multilateral, y corresponden a la fase unicelular del hongo. Cuando la yema alcanza su tamaño óptimo, se produce la división celular y se forma una cicatriz de gemación entre la célula madre y la hija. Se presentan como levaduras ligeramente pleomórficas, desde ovoideas hasta esféricas.
- **Hifas:** También conocidos como micelios. Son células que han sufrido un crecimiento apical continuo, cuya elongación va seguida de tabicación interna por septos a intervalos regulares, y conservan una comunicación citoplasmática a través de poros en sus septos de división. Pueden generar yemas laterales o ramificaciones que continúan siendo mononucleadas.
- **Pseudohifas:** También llamados pseudomicelios. Están constituidos por células que han quedado unidas a la madre, dando como resultado agrupaciones de células elongadas unidas, de forma variable, en cadenas y racimos, pero sin continuidad citoplasmática a diferencia de los micelios. Algunas veces muestran una apariencia miceliar.
- **Clamidosporas:** Son células de forma más o menos esférica (aproximadamente 10  $\mu\text{m}$  de diámetro), cubiertas por una pared gruesa y muy refringentes, que se generan a partir de hifas o pseudohifas en estado estacionario. Básicamente son el producto del crecimiento en ausencia de nutrientes, o promovido por otros tipos de estrés, siendo consideradas como estructuras aletargadas o de resistencia.



**Figura I.4. Micrografías con las distintas morfologías de *C. albicans*:** a) Levaduras; b) Hifas; c) Pseudohifas; d) Clamidosporas; (Odss, 1988).

### **I.4.5.1. Bases moleculares del dimorfismo.**

La transición dimórfica se considera un factor de virulencia muy importante en muchos hongos patógenos. Dentro del ciclo celular de los hongos dimórficos las morfologías básicas observadas son levadura (forma unicelular) y micelio (forma pluricelular).

Numerosos factores nutricionales y ambientales, incluyendo temperatura, aminoácidos, cambios de pH y suero pueden inducir la transición de levadura también denominada blastospora o blastoconidia, a micelio en *C. albicans* (Eckert *et al.*, 2007). Estas señales externas son detectadas en la célula mediante receptores superficiales a partir de los cuales el estímulo va a ser transmitido al interior de la célula mediante un sistema de transmisión de señales que producirá una expresión génica diferencial, responsable de cambios en el citoesqueleto y en la pared celular que van a provocar el crecimiento de *C. albicans* en forma micelial. Los inductores son muy variados por lo que se postula que existe más de un sistema de transmisión de señales.

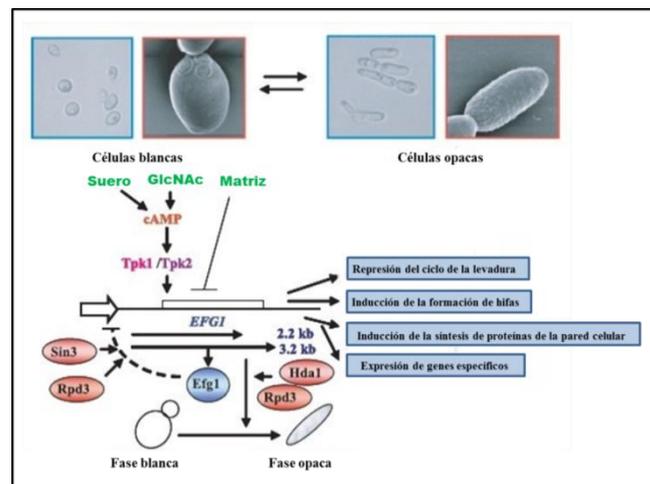
Los mecanismos por los que señales físico-químicas y bioquímicas se van a traducir en respuestas intracelulares específicas implican la participación de segundos mensajeros como el calcio o el adenosin monofosfato cíclico (AMPC). La mayoría de rutas de transmisión de señales consisten en una serie de proteínas de unión a guanósín trifosfato (GTP), proteinquinasas y proteínas reguladoras como los factores de transcripción.

### I.4.5.2. Rutas de señalización.

Las rutas de señalización que transducen señales ambientales en cambios morfológicos han sido profundamente estudiadas. Estas rutas de transducción forman una red compleja e interconectada que integra señales ambientales que controlan apropiadamente la morfogénesis y la transcripción.

Un ejemplo de la existencia de integración entre estas redes es el factor de transcripción Efg1 (Figura I.5), que recibe información a través de múltiples rutas y está implicado en diferentes procesos tales como desarrollo de hifas, formación de clamidosporas, cambio fenotípico “blanco-opaco” y formación de biopelículas (Biswas *et al.*, 2007).

Aunque la transición “blanco-opaco” tiene cierta relevancia desde el punto de vista de patogenicidad su papel principal parece ser el mediar el apareamiento de células diploides (Hull *et al.*, 2000; Magee y Magee, 2000) al ser la forma opaca la competente en dicho proceso (Miller y Johnson, 2002).



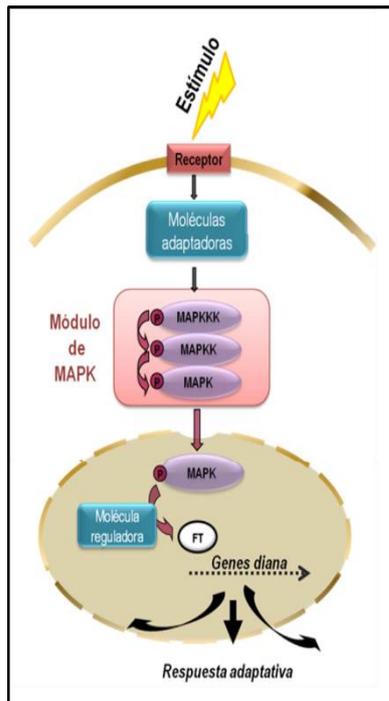
**Figura I.5. Cambio fenotípico blanco-opaco en *C. albicans*.** (Arriba) Se muestra una fotografía en microscopio electrónico de barrido a 1000 aumentos. (Abajo) Modelo de regulación morfogénica por Efg1. En la inducción de la formación de hifas (ejemplo., suero, GlcNAc) el gen *EFG1* se expresa y en condiciones de microaerofilia, sin embargo es reprimido. Efg1 es activado (por las isoformas de PKA, Tpk1 y Tpk2) iniciando la formación de hifas por la expresión de genes implicados. Efg1 también induce la síntesis de proteínas de la pared celular que están implicadas en adhesión. Los genes específicos de la transición de células de fase blanca a opaca y viceversa también son regulados por Efg1. De hecho, Efg1, junto con el complejo diacetilasa Sin3-Rpd3 reprime la actividad del promotor *EFG1* (Terbath *et al.*, 2003). El complejo diacetilasa Hda1-Rpd3 regula la transición de blanco a opaco y viceversa, así como la represión de *EFG1* (Srikantha *et al.*, 2001). (Adaptado de Biswas *et al.*, 2007).

### **I.4.5.2.1. Ruta de las MAP quinasas.**

Uno de los sistemas de señalización mejor caracterizados y más conservados son las rutas mediadas por proteínas quinasas activadas por mitógenos o proteínas quinasas de tipo MAP (MAPK, Mitogen Activated Protein Kinases) (Pearson *et al.*, 2001; Cowan y Storey, 2003). El principal componente de estas rutas lo constituye el módulo de quinasas MAP formado por tres proteínas: la quinasa de tipo MAP (MAPK o ERK), la quinasa de tipo MAPK (MAPKK o MEK) y la quinasa de tipo MAPKK (MAPKKK o MEKK). La activación secuencial por fosforilación de estos elementos permite la transmisión de la señal desde el exterior al interior celular (Figura I.6). El estímulo desencadenante de la activación de la cascada de quinasas MAP es percibido por un receptor y la señal es transmitida a continuación al módulo central a través de proteínas intermediarias o moléculas adaptadoras, generalmente de tipo GTPasa (también denominadas proteínas G) o proteínas quinasas (Widmann *et al.*, 1999).

El mecanismo por el cual las MAPKKK son activadas aún no se conoce totalmente y cada MAPKK puede ser activada por más de una MAPKKK, siendo por fosforilación en residuos de serina o treonina localizados en el subdominio catalítico VIII de estas proteínas. Por último, la MAPKK fosforila a la MAPK en dos residuos específicos de treonina y tirosina, localizados en el motivo de activación TXY (donde X representa ácido glutámico, prolina o glicocola, dependiendo del tipo de MAPK) que se encuentra en el subdominio VIII. Resulta necesaria la fosforilación de ambos residuos para la activación de la MAPK y la desfosforilación de uno de ellos basta para inactivarla. Tras su fosforilación, la MAPK se transloca al núcleo celular activando sus correspondientes dianas entre las que se encuentran los factores de transcripción u otras moléculas que determinan un patrón de transcripción génica adecuado y específico para que se origine la respuesta necesaria y se posibilite la adaptación a las nuevas condiciones externas.

Tras el desencadenamiento de la respuesta, la presencia de mecanismos de retroalimentación, entre los que se encuentran fosfatasas específicas, permite recuperar los niveles basales de activación de la ruta.



**Figura I.6. Esquema general de una ruta de MAPK.**

La célula recibe un estímulo a través de receptores o sensores específicos situados en la membrana plasmática. La señal es posteriormente transferida a través de distintas moléculas adaptadoras tipo PAK o GTPasas hacia el módulo principal de la cascada de transducción, compuesto por las proteínas MAPKKK, MAPKK y MAPK. Tras la fosforilación, la MAPK puede ser translocada al núcleo, donde fosforila un factor de transcripción (que puede formar parte de un complejo de transcripción -FT-) o una molécula reguladora (represor). Debido a ello, la expresión de gen/es diana se activa o reprime permitiendo una respuesta adaptativa. Esta activación es transitoria debido a mecanismos de retroalimentación que desactivan la ruta y recuperan la situación basal inicial. (Adaptado de Román *et al.*, 2007).

En *C. albicans*, cuatro MAP-quinasas han sido identificadas: Mkc1, homólogo de la proteína Slt2 de *S. cerevisiae* (Navarro-García *et al.*, 1995); Cek1, homólogo de Kss1 (Csank *et al.*, 1998); Cek2, homólogo de Fus3 (Chen *et al.*, 2002) y Hog1, homólogo de la MAP quinasa Hog1 (San José *et al.*, 1996). Mkc1 participa en la biogénesis de la pared celular e incluso en la formación de biopelículas y virulencia (Díez-Orejas *et al.*, 1997; Kumamoto, 2005; Navarro-García *et al.*, 2005, 1998, 1995). Cek1 se encuentra implicado en la formación de hifas, en la respuesta a feromonas de apareamiento, en la construcción de la pared celular y en la virulencia en modelo murino (Chen *et al.*, 2002; Csank *et al.*, 1998; Román *et al.*, 2009a,b, 2005). Finalmente la quinasa Hog1 responde a diferentes tipos de estrés tales como oxidativo, osmótico y presencia de metales, etc. (Alonso-Monge *et al.*, 2003; Smith *et al.*, 2004). Además Hog1 participa también en la transición dimórfica, biogénesis de la pared celular, metabolismo oxidativo y virulencia (Alonso-Monge *et al.*, 2009; 1999; San José *et al.*, 1996).

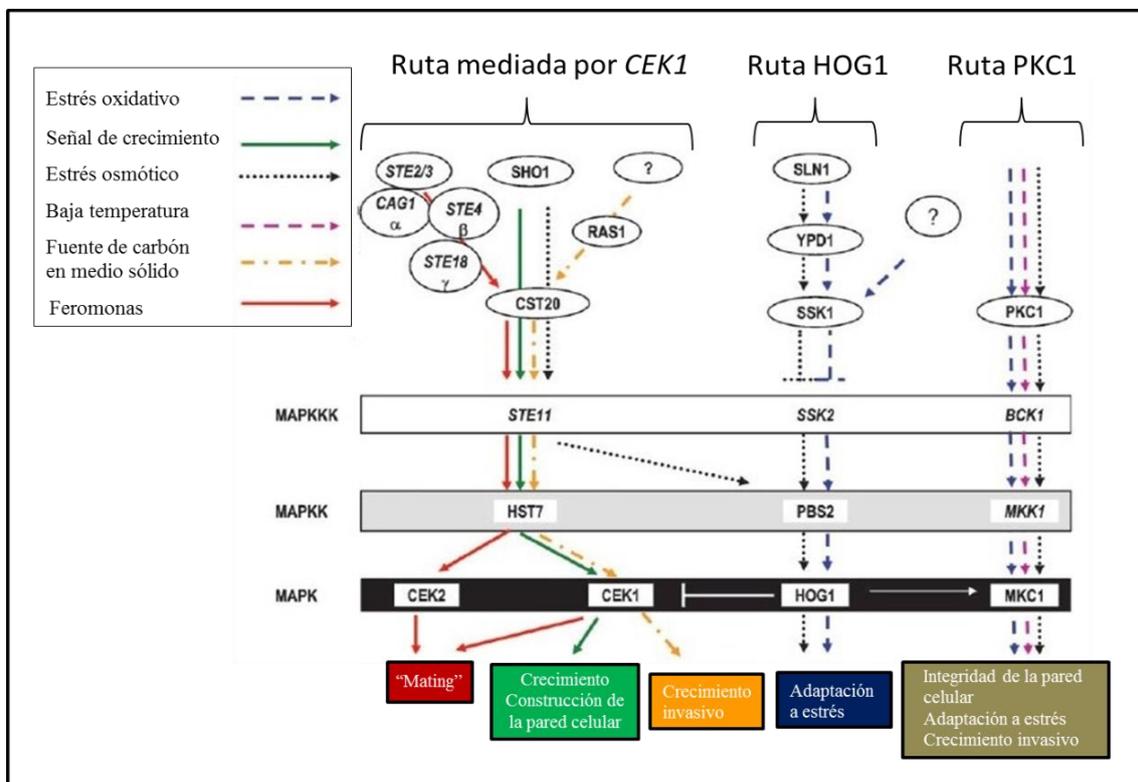
Hasta el momento se han descrito en *C. albicans*, tres rutas (Figura I.7) mediadas por quinasas de tipo MAP que se detallan a continuación:

- La ruta HOG (*High osmolarity glycerol*) es responsable de generar una respuesta adaptativa a medios altamente osmóticos y con un papel importante en la morfogénesis y formación de la pared celular. De hecho mutantes *hog1* y *pbs2*

son muy sensibles tanto a estrés osmótico iónico y no iónico (San José *et al.*, 1996; Arana *et al.*, 2005). Los mutantes *hog1* son más sensibles a oxidantes *in vitro* (Alonso-Monge *et al.*, 2003) sugiriendo que la disminución de la virulencia es el resultado a la mayor susceptibilidad por los mecanismos oxidativos de fagocitosis de macrófagos, neutrófilos y línea mielocítica HL-60 (Arana *et al.*, 2005). Además, la ausencia de Hog1 aumenta la sensibilidad de *C. albicans* frente a inhibidores de la cadena respiratoria (Alonso-Monge *et al.*, 2009). En esta ruta tienen un papel principal en la señalización de Pbs2-Hog1, las proteínas Sln1, Ypd1, Ssk1 y Ssk2 (Cheetham *et al.*, 2007). También mutantes *ssk1* demostraron una mayor susceptibilidad a neutrófilos polimorfonucleares (Du *et al.*, 2005).

- La ruta de crecimiento vegetativo o SVG (*Sterile Vegetative Growth*) (Lee y Elion, 1999; Román *et al.*, 2005) finaliza con la fosforilación de Cek1, participando las proteínas Sho1, Msb2 y Ste11. Se ha demostrado que esta ruta junto con la ruta de la proteína quinasa A dependiente de AMPc contribuyen a la formación de micelio debido a que los mutantes *efg1* y *chp1* son incapaces de formar micelio *in vitro* y son avirulentos en modelos de infección sistémica (Lo *et al.*, 1997) pero son capaces de proliferar en los riñones en vez de ser eliminados por el sistema inmune (Chen *et al.*, 2006). La ruta SVG descrita en *S. cerevisiae*, presenta mucha similitud con la ruta de *C. albicans* y se encarga del mantenimiento de la integridad de la pared celular durante el crecimiento vegetativo, actuando en paralelo con la ruta de integridad celular en la que participa la MAP quinasa Slt2 (Lee y Elion, 1999). Además, en *C. albicans* ha sido identificada y caracterizada una proteína transmembranal denominada Opy2, requerida para desencadenar la fosforilación de Cek1 por diferentes estímulos tales como volver a crecer en fase estacionaria o frente a diversos agentes que distorsionan la pared celular como son la zimoliasa y tunicamicina (Herrero de Dios *et al.*, 2013).
- La ruta PKC (*Protein Kinase C*) finaliza con la fosforilación de la proteína Mkc1 en respuesta a estrés oxidativo, estrés osmótico, drogas antifúngicas y choques de temperatura (Navarro-García *et al.*, 2005) siendo una ruta parcialmente dependiente de la ruta HOG

(Arana *et al.*, 2005; Navarro-García *et al.*, 2005). Los mutantes *mkc1* han demostrado que son menos virulentos en infección sistémica en modelo murino y no colonizan órganos aunque aquellos animales que han sido infectados muestran una respuesta antiinflamatoria alterada (Díez-Orejas *et al.*, 1997). En *S. cerevisiae*, la ruta homóloga mediada por Pkc1, está implicada en el mantenimiento de la integridad celular mediante el control de la síntesis de la pared celular dependiente del ciclo celular. Al igual que en *C. albicans*, la ruta de *S. cerevisiae* responde a diversos estímulos como son la hipoosmolaridad externa, compuestos que alteran la pared celular y la limitación de nutrientes, e incluso a feromonas y, al contrario que en *C. albicans* al elevar la temperatura de crecimiento (Harrison *et al.*, 2004; revisado en Levin, 2005).



**Figura I.7. Principales elementos de las rutas de transducción de señales mediadas por quinasas tipo MAP en *C. albicans*.** Los genes son representados en caracteres normales donde la delección y/o caracterización fenotípica de la cepa correspondiente se ha llevado a cabo en *C. albicans*, o alternativamente, en cursiva donde su posición y presunta función se ha basado en el modelo propuesto de *S. cerevisiae*. La existencia de elementos adicionales que pueden tener un papel en la activación de la MAPK correspondiente se muestra en interrogación. Los estímulos que provocan una activación se muestran con flecha continua y los que realizan una inhibición en flecha discontinua. Aunque las flechas no indican si la interacción tiene lugar a través de un mecanismo directo o indirecto (Adaptado de Alonso-Monge *et al.*, 2006).

Por otra parte, defectos en O-manosilación en mutantes *pmt* se ha visto ligado con la activación de la fosforilación de Cek1, proporcionando una gran respuesta en mutantes *pmt1* y menor en mutantes *pmt4*. La adición de tunicamicina como inhibidor de la N-glicosilación a cepas *pmt1* no consiguió provocar la fosforilación de Cek1; sin embargo, la tunicamicina tenía un gran efecto estimulante en mutantes *pmt4*, *pmt5* y *pmt6* (Cantero *et al.*, 2011). Además, un déficit de N- y O-glicosilación en cepas mutantes *Pmt4*, *Pmt5* y *Pmt6* provocó una fuerte estimulación en la fosforilación de Cek1 y sin embargo, no hubo activación de Mkc1, indicando que en *C. albicans*, la fosforilación de Cek1 es muy susceptible a cambios en N- y O- glicosilación (Ernst y Pla, 2011).

### **I.4.5.2.2. Ruta de la proteína quinasa A dependiente de AMP cíclico.**

Esta ruta juega un papel importante en la filamentación de *S. cerevisiae*, *C. albicans* y otros hongos (Lengeler *et al.*, 2000). La proteína quinasa A es una holoenzima que comprende subunidades reguladoras y catalíticas altamente conservadas. Niveles bajos de AMP cíclico (AMPC) mantienen las subunidades inactivas, mientras que concentraciones superiores de este segundo mensajero permiten su unión a las subunidades reguladoras disociando el complejo y liberando las subunidades catalíticas activas las cuales desencadenan la respuesta. En *C. albicans* la activación de la proteína quinasa A por disociación de las subunidades catalíticas Tpk<sub>s</sub> resulta en una fosforilación del principal regulador transcripcional implicado, Efg1 (Stoldt *et al.*, 1997; Bockmuhl y Ernst, 2001).

Efg1 pertenece a la familia de las proteínas APSES, una clase conservada de reguladores transcripcionales de hongos (Doedt *et al.*, 2004). Este factor transcripcional juega un papel importante en morfogénesis, ya que la disrupción de *EFG1* causa un bloqueo completo de la formación de hifas bajo condiciones de inducción y la sobreexpresión de dicho gen induce crecimiento pseudofilamentoso en *S. cerevisiae*, crecimiento miceliar en *C. albicans* (Stoldt *et al.*, 1997) y alteraciones en la formación de biopelículas (Ramage *et al.*, 2002).

### **I.4.5.2.3. Ruta de respuesta al pH por Rim101.**

La ruta de respuesta al pH regulada por Rim101 es requerida para la adaptación a condiciones medioambientales neutras y/o alcalinas. La respuesta al pH

medioambiental está ligada a la capacidad del propio hongo para provocar enfermedad (Davis, 2003). Esta ruta regulada por el factor transcripcional Rim101, a su vez es regulada por Rim8 (Davis *et al.*, 2000) y Rim20 (Xu y Mitchell, 2001). En células de la cepa mutante *efg1* se ha demostrado que el cambio fenotípico blanco-opaco se ha regulado por las condiciones de pH medioambientales, teniendo forma opaca a pH 6.8 y blanca a pH 4.5 (Nie *et al.*, 2010).

#### **I.4.5.2.4. Ruta catabólica N-acetilglucosamina (GlcNAc) de *C. albicans*.**

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

Cuando los genes *NAG1*, *DAC1* y *HXK1* son delecionados individualmente, la virulencia en modelo murino de candidiasis sistémica se ve afectada de manera variable en cada uno de los mutantes, con una mayor atenuación para el mutante *hxk1* seguido de los mutantes *dac1* y *nag1* (Singh *et al.*, 2001, Yamada-Okabe *et al.*, 2001). En mutantes *dac1* y *nag1*, el patrón de crecimiento se ve disminuido en presencia de galactosa; sin embargo, el triple mutante *hxk1/nag1/dac1* se ha caracterizado en presencia de GlcNAc por mayor formación de hifas (Naseem *et al.*, 2011). Estos tres genes están implicados, no solo en el metabolismo de GlcNAc, sino también en el cambio dimórfico y la virulencia.

#### **I.4.5.2.5. Factores de represión del cambio dimórfico.**

Han sido identificados como represores de la formación de hifas algunos factores de transcripción como Tup1, Nrg1 y Rbf1 (Braun y Johnson, 1997; Braun *et al.*, 2001; Ishii *et al.*, 1997), aunque el mecanismo o las rutas de funcionamiento aún no son bien conocidas.

El mutante *tup1* presenta un fenotipo pleiotrópico: floculación, sensibilidad a la temperatura, y en *S. cerevisiae*, incapacidad de esporular, siendo necesario para el mantenimiento de la diploidía. La expresión de *TUP1* de *C. albicans* en *S. cerevisiae* suprime estos defectos, en cambio su eliminación en *C. albicans* produce micelio constitutivo en todas las condiciones probadas (Braun y Johnson, 2000). En *C. albicans*, el efecto represor de Tup1 en la transición dimórfica se ha visto antagonizado por Swi1 debido a que el comportamiento fenotípico de mutantes *tup1* y *swi1* en cuanto a la formación de micelio era contrario (Mao *et al.*, 2008).

Con respecto al factor Nrg1, uno de los genes que puede llegar a reprimir es *BRG1* aunque se ha visto que la sobreexpresión de dicho gen es suficiente para poder superar la represión y por tanto promover la transición levadura-hifa, incluso en ausencia de estímulos ambientales (Cleary *et al.*, 2012). Además, células del mutante *nrg1* son predominantemente filamentosas bajo condiciones que no inducen la filamentación y presentan virulencia atenuada (Biswas *et al.*, 2007).

Rbf1 se encuentra implicado en la regulación de la transición levadura-micelio (Ishii *et al.*, 1997) siendo el mutante *rbf1* constitutivamente filamentoso y las hifas formadas son más características de pseudohifas que de hifas verdaderas. La virulencia del mutante *rbf1* en modelo murino está significativamente atenuada (Biswas *et al.*, 2007).

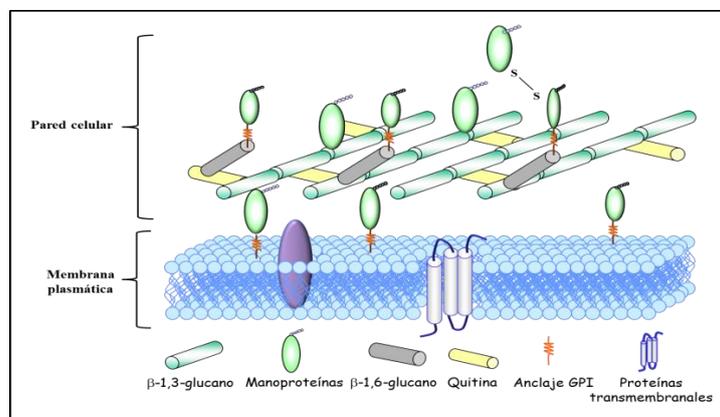
Otro factor transcripcional represor de los genes *ECE1* y *HWPI* implicados en la transición dimórfica es Sko1, el cual está relacionado con la respuesta a estrés oxidativo y se ha demostrado también que mutantes *sko1* aumentan la sensibilidad de hog1 a la línea celular mielomonocítica HL-60 (Alonso-Monge *et al.*, 2010).

### **I.5. LA PARED CELULAR DE *C. albicans*.**

La pared celular de los hongos es una estructura multiestratificada situada en la parte externa de la membrana plasmática. Aunque la pared celular se ha considerado como una estructura casi inerte que proporciona rigidez y protección a las células, actualmente se considera como una estructura compleja y dinámica que cambia según las necesidades de la célula siendo esencial en la biología y la patogenicidad de *C. albicans* (Gow y Hube, 2012).

La rigidez de la pared no solo protege a la célula de agresiones físicas externas sino que también resiste la presión de turgencia del protoplasto y evita la lisis de la célula cuando ocurren descensos en la osmolaridad del medio. También actúa como barrera frente a sustancias potencialmente dañinas del medio ambiente y evita que proteínas periplásmicas sean excretadas al exterior, proporcionando a su vez, una estructura donde las proteínas integrales de la pared pueden ser ancladas. Además sirve de sustrato para la exposición de proteínas que juegan un papel importante en interacciones célula-célula, ya sean de carácter sexual, inmunogénico o inmunomodulador.

La pared celular es una estructura presente en células fúngicas, plantas, algas y bacterias y ausente en células de mamífero, siendo por tanto una excelente diana en el estudio y desarrollo de nuevas drogas antifúngicas. Dicha estructura representa el 15-30% del peso seco de la célula, siendo su composición principalmente de carácter polisacárido (90%) y proteico (10%). Presenta una disposición en multicapa, en la que los carbohidratos mayoritarios son tres:  $\beta$ -glucano (polímeros de D-glucosa con enlaces tanto  $\beta$ -1,3 como  $\beta$ -1,6); manano, tanto en su forma mayoritaria de fosfopeptidomano (PPM, proteínas O- y/o N-glicosiladas) como minoritarias de fosfolipomano (PLM); y quitina (polímero de N-acetilglucosamina unido por enlaces  $\beta$ -1,4) (Arana *et al.*, 2009). Los distintos constituyentes de la pared son sintetizados tanto en la membrana plasmática (quitina y  $\beta$ -1,3-glucano), como a través de pasos sucesivos durante la ruta de secreción (proteínas de la pared celular y posiblemente  $\beta$ -1,6-glucano) y se disponen espacialmente formando una red tridimensional como se puede observar en el modelo propuesto en la figura I.8.



**Figura I.8. Modelo propuesto para la arquitectura de la pared celular de *C. albicans*.**

(Adaptado de Molina *et al.*, 2000).

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

La pared celular de *C. albicans* es una entidad bioquímica compleja, siendo la quitina (1-2% del peso seco de la pared) y el  $\beta$ -1,3-glucano (50-60%) los polisacáridos estructurales, localizados en capas internas de la pared, que confieren forma y rigidez. Ancladas a estas moléculas se encuentran las manoproteínas (35-40%) que establecen hacia el exterior una capa menos estructurada determinando, en buena medida, la porosidad de la pared celular. En general, los polímeros de manosa están unidos a las proteínas mediante enlace N-glicosídico (N-manano) y/u O-glicosídicos (O-manano). El primero consiste en la unión a asparragina de una cadena central lineal de manosa unida por enlaces  $\alpha$ -1,6 con ramificaciones mediante enlaces  $\alpha$ -1,2 y  $\alpha$ -1,3. El O-manano se forma por unión de pequeñas cadenas de  $\alpha$ -1,2 o  $\alpha$ -1,3-manosa a residuos de serina y/o treonina (Poulain y Jouault, 2004).

#### I.5.1.1. Quitina.

La quitina es un homopolímero lineal de  $\beta$ -1,4-N-acetil-D-glucosamina que supone solo un pequeño porcentaje del peso seco total en células con crecimiento vegetativo. La estructura encontrada en los hongos es de  $\alpha$ -quitina, donde las cadenas de azúcar adoptan una posición antiparalela (Figura I.9). La presencia de puentes de hidrógeno conlleva la formación de una serie de estructuras similares a una cinta, lo que hace que la quitina sea insoluble (Ruiz-Herrera, 1992; Shaw *et al.*, 1991).

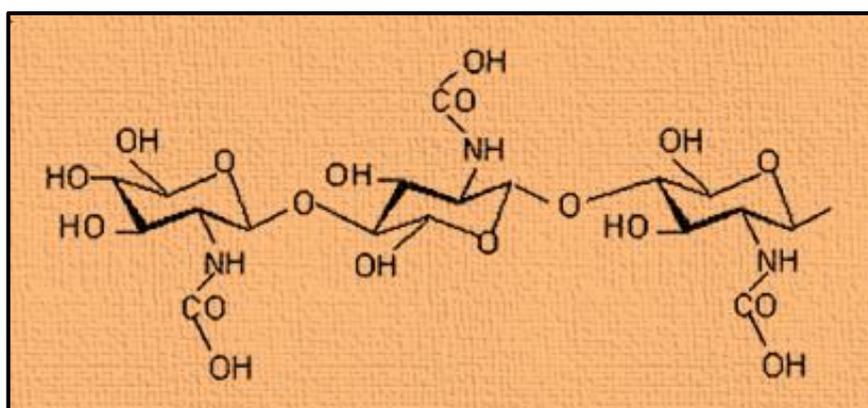


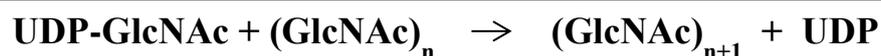
Figura I.9. Estructura química de quitina (Ruiz-Herrera *et al.*, 2006).

En *C. albicans*, el papel de la quitina es de gran importancia en el mantenimiento de la estructura de la pared y en la transición morfogénica del hongo,

siendo la cantidad de quitina presente en hongos tal como fue confirmado en 1968 por *Chattaway et al.*, tres veces más abundante en la pared micelial que en la levaduriforme.

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

La síntesis de quitina es una reacción de transglicosilación de residuos de N-acetilglucosamina (GlcNAc) procedentes del sustrato UDP-N-acetilglucosamina a la cadena polisacáridica. La reacción es catalizada por las enzimas denominadas *quitina sintetasas* (Chs), que requieren de un metal divalente, generalmente  $Mg^{2+}$  (Ruiz-Herrera *et al.*, 2004).



#### I.5.1.1.1. Quitina sintetasas en *C. albicans*.

Estudios realizados en *S. cerevisiae* revelaron que contiene más de una quitina sintetasa, una propiedad que posteriormente se encontró en todos los hongos. De hecho, se ha demostrado que hongos del phylum *Zigomycota* contienen un número bastante elevado de genes que codifican quitina sintetasas, alrededor de 20 genes, a diferencia de los phylum *Ascomycota* y *Basidiomycota* que presentan menor cantidad de genes (Ma *et al.*, 2009). Esta característica probablemente representa un mecanismo que permite su adaptación a diferentes medios ambientales y protege a la célula en caso de pérdida de una quitina sintetasa.

Estas enzimas se encuentran en el citosol del hongo, en microvesículas denominadas quitosomas, responsables de la transferencia del enzima del lugar de síntesis al lugar de acción (Ruiz-Herrera *et al.*, 2004).

*C. albicans* posee cuatro quitina sintetasas codificadas por cuatro genes (*CHS1*, *CHS2*, *CHS3*, *CHS8*) (Munro *et al.*, 2007):

- *CHS1*, la disrupción de este gen es letal. Chs1 es una enzima esencial en la síntesis del septo primario y de la integridad de la pared celular (Munro *et al.*, 2001).
- *CHS2*, este gen no es necesario para el crecimiento normal, la morfogénesis y la virulencia de las células (Gow *et al.*, 1994) aunque el mutante presenta un menor contenido en quitina en la pared celular del micelio. *CHS2* está expresado preferentemente durante la formación de micelio y codifica una proteína que tiene la mayor actividad quitina sintetasa *in vitro*. Estos resultados ponen de manifiesto que no existe una relación obligada entre la actividad *in vitro* y la importancia de su actividad en crecimiento, viabilidad y morfogénesis (Munro y Gow, 2001).
- *CHS3*, alcanza su máximo nivel de expresión durante la inducción de micelio, aunque Chs3 es responsable de la mayor parte de síntesis de quitina *in vivo* tanto en levadura como en micelio (Mio *et al.*, 1996). En el mutante nulo, la actividad quitina sintetasa decrecía sobre un 60% en células levaduriformes con respecto a la cepa parental (Selvaggini *et al.*, 2004).
- *CHS8*, codifica una proteína quitina sintetasa con similitud a Chs2. El mutante *chs8* no posee un fenotipo marcado ni una reducción en la cantidad de quitina de la pared celular, si bien la actividad quitina sintetasa presenta una reducción del 25% y el doble mutante *chs2 chs8* posee menos del 3% de la actividad quitina sintetasa de la cepa parental *in vitro* aunque tiene una tasa de crecimiento y morfología normal (Munro *et al.*, 2003).

Además la pérdida de *CHS2* y *CHS3* demostró una ligera disminución en la actividad quitina sintetasa (Selvaggini *et al.*, 2004). *C. albicans*, en presencia de concentraciones subinhibitorias de equinocandinas, conocidas como inhibidores de la biosíntesis del  $\beta$ -1,3-glucano, estimularon la biosíntesis de quitina realizado a tres niveles: estimulación de la transcripción de los genes *CHS1*, *CHS2* y *CHS8*, actividad de las enzimas codificadas por dichos genes y contenido en quitina de la célula (Walker *et al.*, 2008).

### I.5.1.2. $\beta$ -glucanos.

*C. albicans* no contiene  $\alpha$ -glucano. El glucano de su pared celular 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: el  $\beta$ -1,3-glucano y el  $\beta$ -1,6-glucano (Figura I.10). El glucano presenta un peso molecular de  $10^6$  Da en células levaduriformes, mientras que en micelio es ligeramente más alto. Surarit *et al.*, (1988) demostraron la existencia de una unión covalente establecida entre el  $\beta$ -1,6-glucano y la quitina en posición 1 de glucosa y 6 de N-acetilglucosamina.

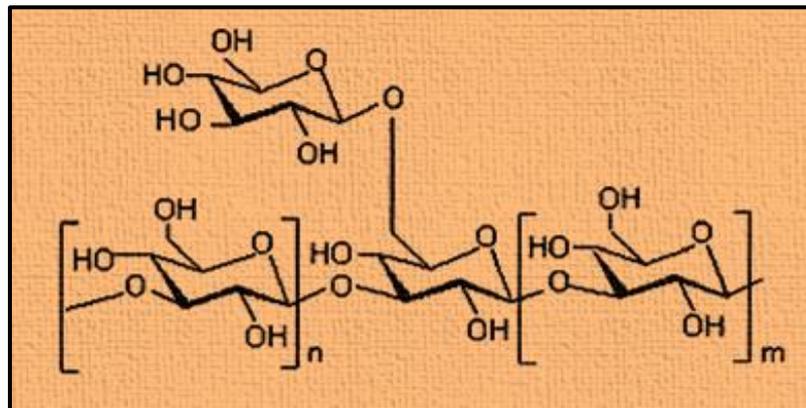


Figura I.10. Estructura química de  $\beta$ -1,3/ $\beta$ -1,6-glucano (Ruiz-Herrera *et al.*, 2006).

#### I.5.1.2.1. $\beta$ -1,3-glucano.

Es el componente más abundante (80% del total del  $\beta$ -glucano), constituido aproximadamente por 1500 residuos de glucosa por molécula, que forman una cadena lineal con uniones  $\beta$ -1,3 y con un 3% aproximadamente de ramificaciones unidas mediante enlaces  $\beta$ -1,6 (Manners *et al.*, 1973).

Inicialmente, el  $\beta$ -1,3-glucano fue clasificado en  $\beta$ -1,3-glucano álcali soluble y álcali insoluble. Posteriormente, se ha demostrado que esta diferencia en la solubilidad del  $\beta$ -1,3-glucano es debida a su unión con la quitina, haciéndolo insoluble al álcali (Kollár *et al.*, 1995). Las diferencias en solubilidad del glucano estudiadas ampliamente en especies pertenecientes al phylum *Ascomycota* como es el caso de *C. albicans*, no es específico de dicho phylum debido a que en *Basidiomycota* también se han encontrado. Un ejemplo claro es el caso de *Ustilago maydis*, un hongo patógeno del maíz, que presenta glucano álcali-soluble formado por residuos de glucosa solamente unidos por

enlaces  $\beta$ -1,3 y glucano álcali-insoluble que contiene residuos de glucosa unidos tanto por enlaces  $\beta$ -1,3 y  $\beta$ -1,6 (Fonseca-García, 2010).

En cuanto a las funciones celulares, la fracción de  $\beta$ -1,3-glucano unida a quitina (fracción álcali insoluble) tiene un papel directo en el mantenimiento de la rigidez y morfología de la pared celular, ya que la forma de la célula permanece inalterada después de haber realizado una extracción del manano y del glucano álcali soluble (Fleet y Manners, 1976; Kopecka *et al.*, 1974). Al margen de la función estructural del glucano, se ha demostrado que presenta un papel importante en la virulencia. Es conocido el hecho de encontrar fragmentos de glucano o complejos con manano en sangre de pacientes infectados por *C. albicans*. En modelo murino, estos compuestos han provocado shock anafiláctico y arteritis coronaria. Además, el glucano juega un papel importante en el desarrollo de candidiasis, reduciendo la actividad de monocitos y linfocitos T indirectamente, hipótesis apoyada por la observación de que anticuerpos anti- $\beta$ -glucano participan en la respuesta inmune, reconociendo *C. albicans* y otros patógenos fúngicos (Ishibashi *et al.*, 2005).

La síntesis del  $\beta$ -1,3-glucano se realiza a nivel de la membrana plasmática mediante una reacción de transglucosilación, por un complejo enzimático que requiere UDP-glucosa como sustrato (Shematek *et al.*, 1980) tal como se detalla:



El complejo enzimático está formado, al menos, por dos subunidades, una con acción catalítica unida a membrana (Fks1 y Fks2) y otra soluble con acción reguladora (Rho1) (GTP dependiente) (Cabib y Kang, 1987; Mol *et al.*, 1994). La subunidad reguladora está codificada por *RHO1* (Kondoh *et al.*, 1997), gen que codifica una proteína de pequeño tamaño que une GTP y posee actividad GTPasa perteneciente a la familia de proteínas Rho/Rac de la superfamilia Ras y asociada de manera más débil a la membrana plasmática. Originalmente, se describieron los genes que codificaban proteínas homólogas a Rho1 en *S. cerevisiae* (Qadota *et al.*, 1996) y se ha demostrado que Rho1 de *C. albicans* presenta una homología de 82.9% a la de *S. cerevisiae*. Además de su intervención en la síntesis de  $\beta$ -1,3-glucano, Rho1 se une y activa la protein-quinasa C (Pkc1), el primer miembro de la cascada de quinasas implicadas en la

ruta de integridad de la pared celular (Nonaka *et al.*, 1995; Kamada *et al.*, 1996). Rho1 es esencial en *C. albicans*, debido a que mutantes que carecen de esta proteína tanto en forma levaduriforme como en micelio han tenido problemas de agregación, muerte y lisis celular, e incluso son avirulentos en modelo murino (Smith *et al.*, 2002). Por tanto no es de extrañar que Rho1 estuviera implicada en varias funciones esenciales de la célula: síntesis e integridad de la pared celular, exocitosis, organización de septina, ensamblaje de la actina, organización de los microtúbulos, autofagia, citokinesis y en general morfogénesis y polaridad celular (Arellano *et al.*, 1999; Drees *et al.*, 2001; Guo, 2001; Pham *et al.*, 2009; Schmidt *et al.*, 2002).

#### **I.5.1.2.2. $\beta$ -1,6-glucano.**

El  $\beta$ -1,6-glucano constituye aproximadamente el 5% 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 se encuentra también en las fracciones álcali soluble y álcali insoluble de la pared celular. Puede ser parcialmente purificado de la fracción álcali insoluble de la pared celular como una molécula muy ramificada que consiste principalmente en residuos de glucosa unidos mediante enlaces  $\beta$ -1,6 con una pequeña proporción de residuos unidos mediante enlaces  $\beta$ -1,3. También ha sido detectado en la fracción álcali soluble como un heteropolímero  $\beta$ -1,3/ $\beta$ -1,6-glucano (Fleet y Manners, 1977).

Al menos diez genes se encuentran implicados en la síntesis de  $\beta$ -1,6-glucano en *S. cerevisiae*: *KRE1*, *KRE5*, *KRE6*, *KRE9*, *KRE11*, *CNE1*, *CWH41/GLS1*, *KNH1*, *ROT2/GSL2* y *SKN1* (Shahinian y Bussey, 2000). En el genoma de *C. albicans*, se han identificado homólogos de *KRE1*, *KRE5*, *CNE1*, *CWH41/GLS1*, *ROT2/GSL2* y *SKN1*. Los genes *KRE5*, *KRE6* y *SKN1* en *C. albicans* son necesarios en los primeros estadios de la síntesis de  $\beta$ -1,6-glucano. De hecho, se ha demostrado que el mutante *kre5* presentaba una disminución de los niveles de  $\beta$ -1,6-glucano y defectos significativos en la pared celular (Herrero *et al.*, 2004) y la interrupción de un alelo en el gen *KRE6* produce una reducción del 80% del contenido de  $\beta$ -1,6-glucano de la pared celular, no siendo posible obtener el mutante nulo (Mio *et al.*, 1997).

Estudios genéticos y estructurales sugieren que la síntesis del  $\beta$ -1,6-glucano ocurre en la superficie celular, aunque existen proteínas implicadas en tal proceso que tienen una localización intracelular. Kre5 y Cwh41 se encuentran en el RE, mientras que Kre6 y Skn1 son proteínas transmembranales del aparato de Golgi (Shahinian y Bussey, 2000).

El  $\beta$ -1,6-glucano es una molécula esencial en el anclaje de las manoproteínas a través del remanente GPI (Shahinian y Bussey, 2000; Klis *et al.*, 2001) o bien a través de las cadenas N-glicosídicas cuya unión podría ser directa o a través de una estructura desconocida. Sin embargo, este tipo de enlace parece ser secundario debido a que todas las proteínas GPI están N-glicosiladas y a la ausencia de alteraciones fenotípicas en mutantes deficientes en N-glicosilación (Shahinian *et al.*, 1998).

### **I.5.1.3. Manoproteínas.**

Las glicoproteínas son componentes muy importantes de todas las células eucariotas, poseen una estructura básica común, que consiste en una matriz proteica a la cual se unen covalentemente cadenas de carbohidratos. En algunos hongos microscópicos como *C. albicans* y *S. cerevisiae*, se denominan manoproteínas porque las cadenas de carbohidratos contienen mayoritariamente unidades de manosa, aunque otros hongos frecuentemente presentan otros azúcares y grupos fosfato (Ruiz-Herrera, 1992).

Las manoproteínas pueden clasificarse según su actividad biológica en:

- **Manoproteínas con actividad enzimática**, como es el caso de las fosfolipasas (Ibrahim *et al.*, 1995; Ghannoum, 2000), proteínas Sap (Naglik *et al.*, 2003), transglicosidasas Crh (Pardini *et al.*, 2006) y Atc1 (Pedreño *et al.*, 2004).
- **Manoproteínas estructurales**, que son componentes intrínsecos de la estructura de la pared: Hwp1 (Sharkey *et al.*, 1999), Ssr1 (Garcerá *et al.*, 2003), Pga13 (Gelís *et al.*, 2012) o Pga26 (Laforet *et al.*, 2011).
- **Manoproteínas implicadas en la adhesión**, como las proteínas de la familia Als (Hoyer *et al.*, 2008).

Las manoproteínas se encuentran ampliamente distribuidas, pudiendo estar presentes a nivel del espacio periplásmico, ser secretadas al medio o formar parte estructural de la pared celular (Valentín *et al.*, 1987).

### I.5.1.3.1. Clasificación de las manoproteínas.

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

Un esquema de los diferentes tipos de proteínas de pared celular se detalla en la figura I.11.

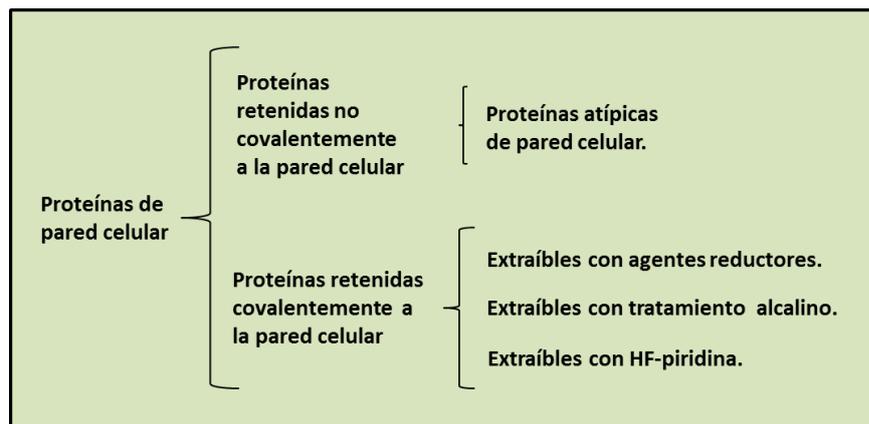


Figura I.11. Clasificación de las proteínas de pared celular.

#### I.5.1.3.1.1. Proteínas retenidas no covalentemente a la pared celular.

Las proteínas de este grupo se caracterizan por encontrarse retenidas no covalentemente a la pared (Non-Covalently Linked Cell Wall Proteins, NCL-CWP) mediante uniones débiles, de manera que pueden ser extraídas utilizando detergentes iónicos como SDS (Valentín *et al.*, 1984) o agentes caotrópicos como la urea. La mayor parte de las proteínas extraídas mediante el tratamiento con un detergente no son verdaderas proteínas de pared, sino que se trata de contaminantes con fragmentos de membranas (Klis *et al.*, 2001), si bien existen excepciones como es el caso de la transglucosidasa Bgl2 (Sharthy *et al.*, 1997).

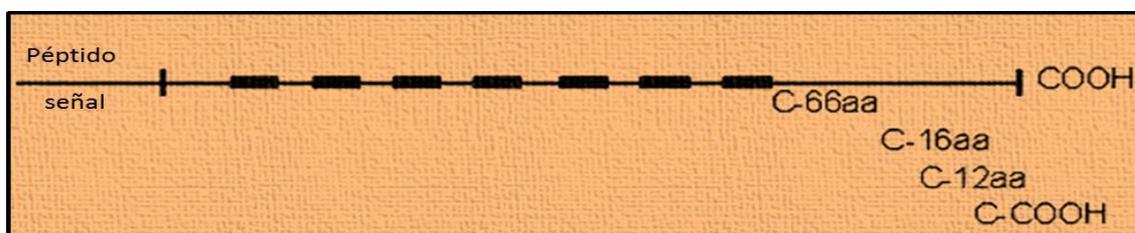
Aunque se desconoce si estas proteínas son intrínsecas de la pared celular o se trata de contaminantes, existen hipótesis que defienden la existencia de una ruta de secreción no convencional por la cual serían exportadas al exterior (Delgado *et al.*, 2001).

### I.5.1.3.1.2. Proteínas extraíbles por agentes reductores.

Este grupo corresponde a las proteínas denominadas en inglés Reducing Agent Extractable-Cell Wall Proteins, (RAE-CWP) que establecen puentes disulfuro con otras proteínas y consecuentemente pueden extraerse por agentes reductores como  $\beta$ -mercaptoetanol ( $\beta$ -ME) o ditioneitol (DTT) (Moukadiri y Zueco, 2001). Aparentemente, estas proteínas no tienen una estructura, propiedades o función determinada y la naturaleza de las proteínas con las que se encuentran asociadas es desconocida, pero se cree que estas proteínas pueden unirse a la pared por otros tipos de uniones covalentes (Ramón *et al.*, 1997).

### I.5.1.3.1.3. Proteínas unidas por enlaces álcali-sensibles.

Las proteínas de este grupo se denominan en inglés Alcali-Sensitive Linkage Cell Wall Proteins (ASL-CWP) y se encuentran directamente unidas al  $\beta$ -1,3-glucano mediante enlaces covalentes sensibles al tratamiento alcalino. Las proteínas Pir (proteínas con repeticiones internas) son algunas de las más importantes dentro de este grupo, las cuales presentan un alto porcentaje de O-glicosilación y repeticiones internas del patrón Q[IV]XDGQ[IVP]Q (Figura I.12).



**Figura I.12. Esquema general de una proteína Pir.** En *C. albicans*, Pir1 presenta cuatro cisteínas en el C-terminal de la proteína (-C-66aa-C-16aa-C-12aa-C-COOH) y tiene nueve (IPF15363) o siete (IPF19968) repeticiones internas con la estructura [-(A/K/Q)-Q-I-(S/T/G/N)-D-G-Q-I-Q-H-Q-T-]. Además, un sitio potencial de N-glicosilación tanto en la IPF 19968 como en la IPF15363 y aproximadamente el 20% de los aminoácidos son Ser o Thr, indicando que la proteína podría estar muy glicosilada (Adaptado de Ruiz-Herrera *et al.*, 2006).

La naturaleza del enlace que une las proteínas Pir con la pared celular ha sido recientemente elucidada. La presencia de estas proteínas unidas al  $\beta$ -1,3-glucano que son liberadas por un tratamiento con álcali sugiere que un puente glicosídico une al  $\beta$ -1,3-glucano y al residuo de manosa de las cadenas O-glicosiladas de las proteínas Pir. Se ha demostrado que se requieren las secuencias repetidas para la unión al  $\beta$ -1,3-glucano (Castillo *et al.*, 2003; Klis *et al.*, 2002). Si estas repeticiones contienen la secuencia “de unión”, están directamente implicadas en la unión al  $\beta$ -1,3-glucano y por tanto las proteínas Pir pueden interconectar dos o más moléculas de  $\beta$ -1,3-glucano.

Estudios con Pir4 de *S. cerevisiae* han identificado el aminoácido responsable de la unión de esta proteína al  $\beta$ -1,3-glucano. Pir4 se une a la pared mediante un residuo de glutamina 74, dentro de la secuencia repetida QIGDGQ<sub>74</sub>VQ (Ecker *et al.*, 2006). Aunque aún no se conoce la enzima que cataliza dicha reacción, se ha postulado la existencia de un enlace éster, entre el  $\gamma$ -carboxilo del residuo glutamato, que proviene de la glutamina y forma el hidróxido de glucosa (Ecker *et al.*, 2006). Podría esperarse que este enlace éster sea álcali lábil, lo que concordaría con la idea de que las proteínas Pir se extraen de la pared celular utilizando tratamientos con álcali.

Se ha demostrado también que algunas proteínas Pir se encuentran retenidas en la pared exclusivamente por puentes disulfuro, debido a que son liberadas por agentes reductores tales como  $\beta$ -ME o DTT (Castillo *et al.*, 2003; Orlean *et al.*, 1986; Moukadiri y Zueco, 2001).

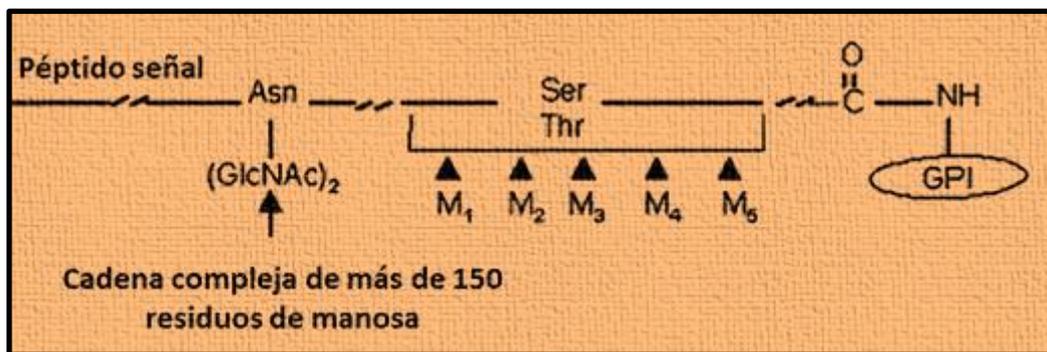
En *S. cerevisiae* la familia Pir está compuesta por cuatro miembros: Pir1 (Mrsa *et al.*, 1997; Toh-e *et al.*, 1993), Pir2/Hsp150 (Moukadiri y Zueco, 2001; Russo *et al.*, 1992), Pir3 (Toh-e *et al.*, 1993; Mrsa *et al.*, 1997) y Pir4 (Moukadiri *et al.*, 1999). Por el momento, en *C. albicans* solo dos miembros han sido encontrados: Pir1 (Martínez *et al.*, 2004) y Pir32 (Bahnan *et al.*, 2012).

#### **I.5.1.3.1.4. Proteínas unidas por enlaces glicosil fosfatidil inositol.**

A las proteínas unidas a través de un enlace glicosil fosfatidil inositol (GPI) al  $\beta$ -1,6-glucano se denominan en inglés GPI-Cell Wall Protein (GPI-CWP). Estas proteínas se unen vía  $\beta$ -1,6-glucano al  $\beta$ -1,3-glucano, en un 90% de los casos o a quitina en el 10% restante (Marcilla *et al.*, 1991).

La mayoría de las proteínas GPI de pared descritas en *C. albicans* presentan las siguientes características (Richard y Plaine *et al.*, 2007) (Figura I.13) : (i) poseen un péptido señal procesable en el extremo N-terminal, (ii) una secuencia rica en serinas y/o treoninas que podría proporcionar sitios para O-glicosilación, (iii) tienen un sitio de anclaje de GPI en el extremo C-terminal y (iv) un sitio  $\omega$  en la cola hidrofóbica donde se une el enlace GPI al  $\beta$ -1,6-glucano (Caro *et al.*, 1997).

El sitio  $\omega$  consiste en una región hidrofóbica de aminoácidos y un grupo de unión formado por tres aminoácidos denominados  $\omega$ ,  $\omega+1$  y  $\omega+2$ . La rotura de la proteína tiene lugar entre el sitio  $\omega$  y el sitio  $\omega+1$  permitiendo la unión del anclaje GPI al aminoácido  $\omega$  (Nuoffer *et al.*, 1993).



**Figura I.13. Esquema general de una GPI-CWP de levaduras.** Son proteínas ricas en Ser/Thr, indicando que la proteína podría estar muy glicosilada, con uno o más sitios potenciales de N-glicosilación. (Adaptado de Ruiz-Herrera *et al.*, 2006).

En *C. albicans*, las proteínas GPI son aparentemente las más abundantes, representando aproximadamente el 88% de las proteínas de pared celular unidas covalentemente.

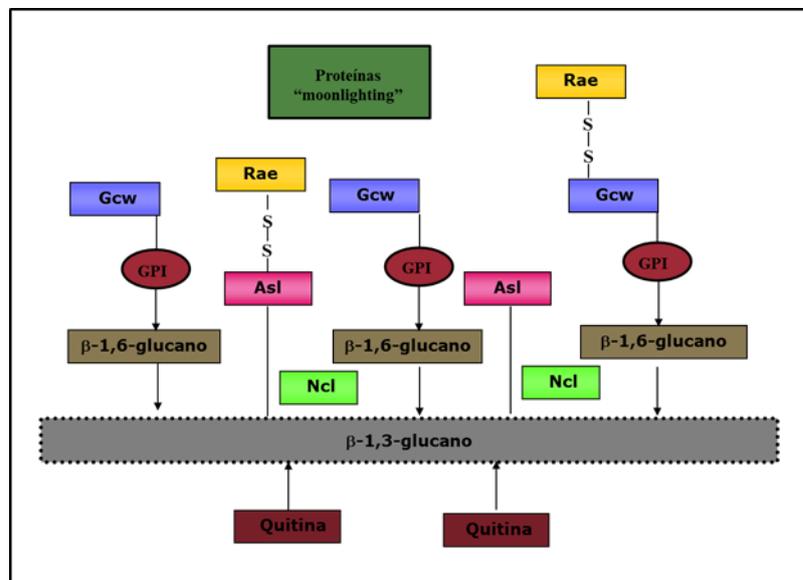
En el año 2007, Richard y Plaine publicaron una lista de 115 posibles proteínas GPI que corresponden al genoma de *C. albicans*. Se clasificaron en cuatro clases: (i) 76 de esas proteínas putativas tienen funciones desconocidas, (ii) 15 proteínas tienen funciones relacionadas con la biogénesis o remodelación de la pared celular, (iii) 13 proteínas relacionadas con la adhesión célula a célula y otras interacciones, y (iv) 11 proteínas presentan actividades enzimáticas diferentes.

### I.5.1.3.1.5. Proteínas atípicas de pared celular.

Este grupo está compuesto por proteínas que aunque detectadas en la pared, son reconocidas como proteínas citoplasmáticas, y no poseen las características propias de proteínas de pared celular (péptido señal y sitios potenciales de glicosilación). Algunas de estas proteínas atípicas encontradas en extractos de pared celular son enzimas glicolíticas y factores de traducción (Nombela *et al.*, 2006).

En la pared celular de *C. albicans* han sido encontradas por primera vez, proteínas relacionadas con el estrés como Hsp70 (López-Ribot y Chaffin, 1996); relacionadas con la glicólisis tales como enolasa (Edwards *et al.*, 1999), gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (Delgado *et al.*, 2001); relacionadas con la síntesis de proteínas tales como factores de elongación Tef1, Tef2 y Tef3; o con otras funciones (revisión Nombela *et al.*, 2006).

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



**Figura I.14. 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*), extraíbles con un tratamiento con  $\beta$ -mercaptoetanol. **ASL-CWP** (*alkali sensitive linkage cell wall proteins*), extraíbles con un tratamiento suave con álcali. **GPI-CWP** (*glycosylphosphatidylinositol cell wall proteins*), extraíbles con un tratamiento con HF-piridina o por digestión con laminarinasa o zimoliasa.

Las proteínas se pueden extraer de la pared mediante diferentes tratamientos tanto químicos como enzimáticos:

- Tratamiento con SDS para extraer las proteínas no retenidas covalentemente a la pared celular (Valentín *et al.*, 1984).
- Tratamiento con  $\beta$ -ME para extraer las proteínas unidas por puentes disulfuro a otras proteínas (Popolo *et al.*, 2008).
- Tratamiento con NaOH para extraer las proteínas retenidas covalentemente a la pared 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).
- Tratamiento 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 desestabiliza toda la pared celular (Chaffin, 2008).

### **I.6. MODIFICACIONES POSTRADUCCIONALES.**

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

Entre las modificaciones postraduccionales podemos destacar:

1. Señalización.
2. O-glicosilación.
3. N-glicosilación.
4. Adición y modificación del resto GPI.

### **I.6.1. Señalización.**

Las proteínas que van a la superficie celular poseen en su secuencia un péptido señal que las va a dirigir del 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).

### **I.6.2. O-glicosilación.**

Al igual que sucede con el proceso de N-glicosilación, O-glicosilación es un proceso esencial implicado en gran número de propiedades, modulación de la secreción, proporcionar estabilidad y la estructura correcta a las glicoproteínas, etc. De hecho, en mutantes deficientes en O-glicosilación se han podido observar diferencias en la morfología celular así como en el desarrollo de hifas (Goto, 2004).

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 cadenas cortas de 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 *C. albicans*, la familia de proteínas Pmt incluye cinco isoformas (Pmt1, Pmt2, Pmt4, Pmt5 y Pmt6). En función de su homología con las de *S. cerevisiae* se han clasificado en tres grupos: (i) Pmt1 y Pmt5, (ii) Pmt2, Pmt6 y (iii) Pmt4 (Ernst y Prill, 2001).

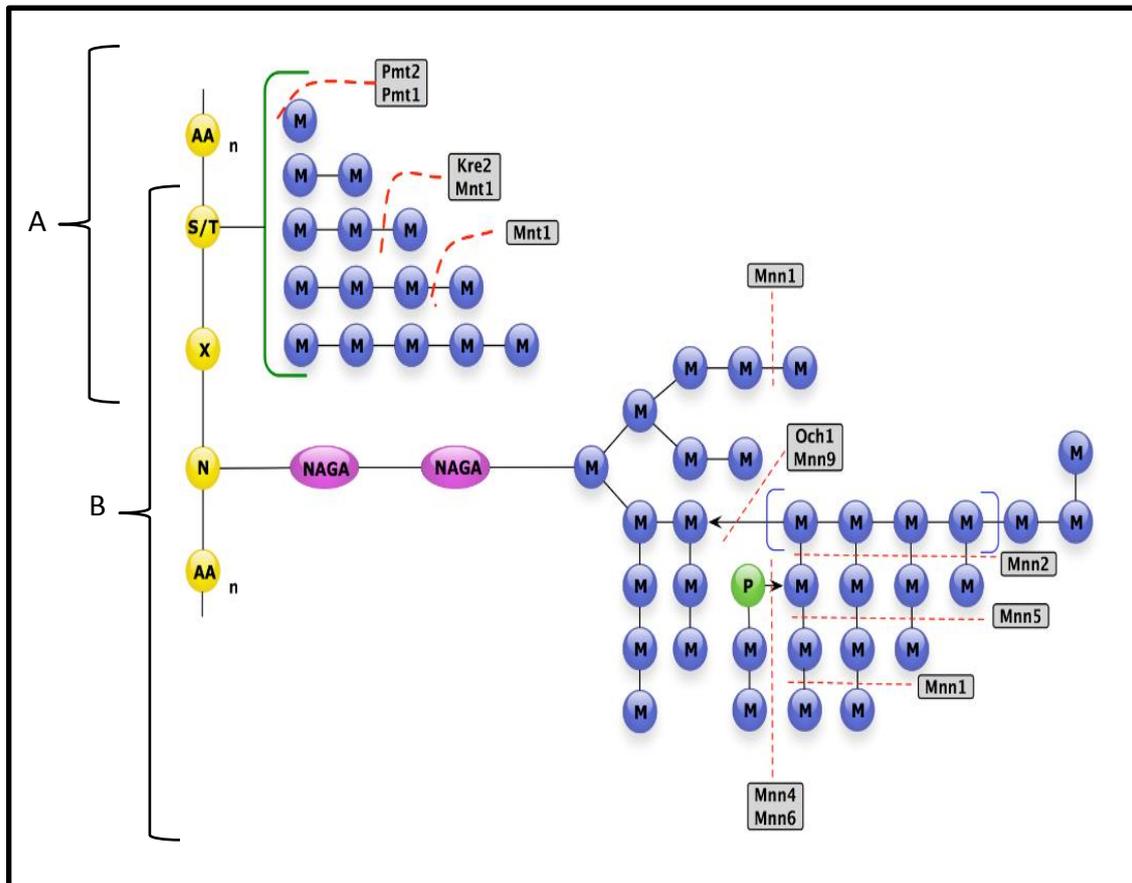
La O-glicosilación mediada por Pmts no sólo modifica a proteínas de secreción y pared celular, sino que también está implicada en el dimorfismo y en la resistencia a distintos antifúngicos. Se ha demostrado la disminución del número de manoproteínas en la pared celular, así como una mayor sensibilidad a antifúngicos en cepas mutantes *pmt1* y *pmt4*, mientras que en cepas en la que se realizó la doble disrupción de un mismo gen no fueron viables. Además las proteínas Pmt están implicadas en procesos de miceliación debido a que en todas las cepas mutantes se han visto cambios a excepción del mutante *pmt5*, e incluso en cepas *pmt1*, *pmt2* y *pmt6* se apreciaron cambios en el mutante heterocigótico en condiciones de inducción de la miceliación (Prill *et al.*, 2005).

La transferencia de unidades de manosa utiliza GDP-manosa como sustrato y tiene lugar en el aparato de Golgi siendo catalizado por manosil transferasas (Proteínas Mnt). El GDP es hidrolizado por una GDP-asa, codificada por el gen *GDA1*. La interrupción de este gen en *C. albicans* provoca una disminución del 90% de la capacidad de hidrolizar GDP. El mutante presenta alteraciones en la O-manosilación y una reducción en el contenido de fosfato de la pared celular, así como alteraciones en la formación de micelio (Herrero *et al.*, 2002). Con el objetivo de conocer cual son los sustratos utilizados por las enzimas manosil transferasas, se expresaron las formas recombinantes de Mnt1, Mnt2 y Mnt5 en *Pichia Pastoris* y se caracterizó la actividad enzimática. A la vista de los resultados, éstos sugieren que en *C. albicans*, Mnt1 y Mnt2 podrían intervenir en la transferencia del cuarto y quinto residuo de manosa a la cadena O-manosilada y Mnt5 intervenir en la adición de los residuos de manosa a la segunda cadena N-glicosilada (Díaz-Jiménez *et al.*, 2012).

### **I.6.3. N-glicosilación.**

La N-glicosilación de proteínas es un proceso indispensable en todas las células eucariotas y algunas procariontas. Este enlace consiste en la unión de una molécula de dos unidades de N-acetilglucosamina (quitobiosa) a un residuo de asparagina de la proteína (Figura I.15), 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 prolina (Varki, 1999). 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, algunas moléculas de manosa pueden encontrarse fosforiladas a través de enlaces manosilfosodiéster.



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

Este proceso se inicia en el RE, mediante la transferencia co-traducciona del núcleo oligosacárido ( $\text{Glc}_3\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$ ) desde el dolicol-pirofosfato a la amida de la asparagina susceptible de N-glicosilación, catalizado por la acción del complejo N-oligosacaril transferasa. Una vez unidos los residuos de glucosa, éstos son eliminados por la glucosidasa I (elimina la glucosa terminal unida por enlace  $\alpha$ -1,2) y la glucosidasa II (que elimina las glucosas unidas por enlace  $\alpha$ -1,3).

La importancia de este tipo de glicosilación para la viabilidad de las células ha sido demostrada con los mutantes *och1* que son sensibles a la temperatura presentando defectos en el crecimiento. Además, los mutantes *och1* presentan una disminución de la virulencia según se ha demostrado en modelo murino en infección sistémica (Bates *et al.*, 2005).

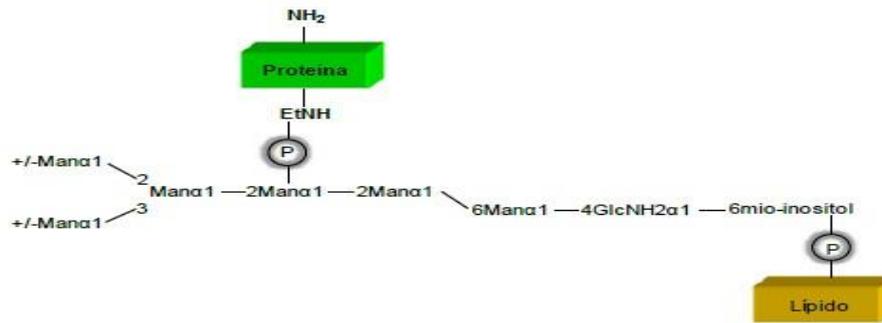
La N-glicosilación de proteínas de la pared celular es importante en la activación inmune del hospedador, porque restos glicosídicos parecen ser esenciales en la modulación de la inmunidad epitelial y la inducción de apoptosis, pudiendo generar ambos la patogénesis fúngica *in vivo* (Wagener *et al.*, 2012).

### **I.6.4. Adición y modificación del resto GPI.**

En hongos, las proteínas GPI pueden encontrarse incorporadas covalentemente a la pared celular o bien permanecer unidas a la membrana plasmática. Estas proteínas participan en la biosíntesis de la pared, en su remodelación, pueden determinar su hidrofobicidad o antigenicidad y algunas poseen un papel importante en adhesión y virulencia (Hoyer, 2001; Klis *et al.*, 2001; De Groot *et al.*, 2003).

El resto GPI se une a la región carboxi terminal de algunas proteínas de la pared celular. Dicha región carboxi debe presentar una región hidrofóbica terminal y tres aminoácidos consecutivos de cadena corta a una distancia de 10-12 aminoácidos, encontrándose el lugar de corte y anclaje de GPI entre el primer y segundo aminoácido (Chaffin, 2008).

El enlace GPI está formado por una molécula de mioinositol, una unidad de N-acetilglucosamina, tres unidades de manosa y una molécula de fosfoetanolamina que conecta el enlace GPI a la proteína (Tiede *et al.*, 1999) (Figura I.16). La transferencia del resto GPI a las proteínas tiene lugar en el lumen del RE y está catalizada por el complejo GPI transamidasa (Hong *et al.*, 2003). Los anclajes GPI se encuentran en todas las células eucariotas, incluyendo levaduras unicelulares, parásitos y células de mamíferos (Browman *et al.*, 2006).



**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).

Actualmente se ha sintetizado una molécula denominada gepinacina que actúa como un inhibidor selectivo de Gwt1, una aciltransferasa necesaria para la biosíntesis del enlace GPI en hongos. Se ha demostrado que su uso no afecta en manera alguna a la viabilidad de células de mamífero y por tanto podría llegar a ser una alternativa más en terapia antifúngica (McLellan *et al.*, 2012).

## I.7. OBJETIVOS Y JUSTIFICACIÓN DEL TRABAJO.

*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 en relación 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 mortalidad como consecuencia de estas infecciones.

La pared celular fúngica es la estructura más externa de la célula, responsable de su rigidez, de su morfología característica y participa en el reconocimiento específico y adhesión a los tejidos del hospedador. Se considera una característica diferencial importante entre células eucariotas humanas y fúngicas, convirtiéndola en una diana ideal para el ataque selectivo con fármacos que produzcan una menor toxicidad para los pacientes. Las manoproteínas son un componente esencial en la estructura de la pared celular y son responsables de funciones capitales tales como ensamblaje, remodelación, transferencias de información al núcleo, etc., de ahí el interés de su estudio.

El presente trabajo tiene como objetivo el estudio de los siguientes aspectos relacionados con un mejor conocimiento de la biología de la pared celular de *C. albicans*: (i) identificar nuevas proteínas utilizando tecnologías diferentes a las empleadas en estudios previos y específicamente aquellas que se liberan con agentes reductores y/o en soluciones alcalinas débiles, (ii) identificar las proteínas de la pared o su falta en condiciones de estrés químico y osmótico, o en mutantes deficientes en alguna proteína específica de la pared celular y (iii) estudiar en detalle las proteínas identificadas. En este apartado se estudiará en detalle las características bioquímicas del antígeno reconocido por el anticuerpo 3H8.

## **II. MATERIALES Y MÉTODOS.**



## II.1. MICROORGANISMOS Y PLÁSMIDOS EMPLEADOS.

### II.1.1. Levaduras.

Las 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
CAI4	<i>ura3Δ::imm434/ura3Δ::imm434</i>	SC5314	Fonzi e Irwin, 1993
GCA1/ <i>gca1</i>	<i>gca1Δ::FRT/GCA1</i>	SC5314	Este trabajo
<i>gca1/gca1</i>	<i>gca1Δ::FRT/gca1Δ::FRT</i>	GCA1/ <i>gca1</i>	Este trabajo
<i>pga13/pga13</i>	<i>ura3Δ::imm434/ura3Δ::imm434</i> <i>pga13Δ::hisG/pga13Δ::hisG</i>	CAI4	Gelis <i>et al.</i> , 2012
<i>pga31/pga31</i>	<i>ura3Δ::imm434/ura3Δ::imm434</i> <i>pga31Δ::hisG/pga31Δ::hisG</i>	CAI4	T. doctoral (Gelis, S.)
<i>pga26/pga26</i>	<i>ura3Δ::imm434/ura3Δ::imm434</i> <i>pga26Δ::hisG/pga26Δ::hisG</i>	CAI4	Laforet <i>et al.</i> , 2011
PIR1/ <i>pir1</i>	<i>pir1Δ::FRT/PIR1</i>	SC5314	Nuestro grupo de investigación.
CNC64-1	<i>ura3Δ::imm434/ura3Δ::imm434</i> <i>eng1Δ::hisG/eng1Δ::hisG</i>	CAI4	Esteban <i>et al.</i> , 2005
CEC668	<i>ura3Δ::imm434/ura3Δ::imm434</i> <i>his1Δ::hisG/His1</i> <i>arg4Δ::hisG/arg4Δ::hisG</i> <i>RPS10/RPS10::URA3</i> <i>sun42Δ::SAT2A/sun42Δ::ARG4</i>	SC5314	Firon <i>et al.</i> , 2007
<i>pga45/pga45</i>	<i>ura3Δ::imm434/ura3Δ::imm434</i> <i>his1Δ::hisG/his1Δ::hisG</i> <i>arg4Δ::hisG/arg4Δ::hisG</i> <i>pga45Δ::hisG/pga45Δ::hisG</i>	BWP17	Plaine <i>et al.</i> , 2008
NGY355	<i>ura3Δ::imm434/ura3Δ::imm434</i> <i>pmr1Δ::hisG/pmr1Δ::hisG</i> <i>RPS1/rps1Δ::Clp10</i>	NGY98	Bates <i>et al.</i> , 2005a
NGY357	<i>ura3Δ::imm434/ura3Δ::imm434</i> <i>och1Δ::hisG/och1Δ::hisG</i> <i>RPS1/rps1Δ::Clp10</i>	NGY205	Bates <i>et al.</i> , 2005b
NGY111	<i>ura3Δ::imm434/ura3Δ::imm434</i> <i>mnt1-mnt2Δ::hisG/mnt1-mnt2Δ::hisG-URA3-hisG</i> <i>RPS1/Δrps1::Clp10</i>	NGY110	Munro <i>et al.</i> , 2005

<b>CDH15</b>	<i>ura3Δ::imm434/ura3Δ::imm434 mnn4Δ::hisG/mnn4Δ::hisG RPS10::URA3 RPS1/rps1Δ::Cip10</i>	CAI4	Hobson <i>et al.</i> , 2004
<b>PP46-428</b>	<i>ura3Δ::imm434/ura3Δ::imm434 pmt6Δ::hisG/pmt6Δ::hisG pmt4Δ::hisG-URA3- hisG/pmt4Δ::hisG</i>	CAP2-2391	Prill <i>et al.</i> , 2005
<b>CPP117</b>	<i>ura3Δ::imm434/ura3Δ::imm434 pmt1Δ::hisG/pmt1Δ::hisG pmt6Δ::hisG/pmt6Δ::hisG- URA3-hisG</i>	CAP1-3121	Timpel <i>et al.</i> , 2000
<b>SN152</b>	<i>his1Δ/his1Δ, leu2Δ/leu2Δ arg4Δ/arg4Δ ura3/ura3Δ::imm<sup>434</sup> IRO1/iro1Δ::imm<sup>434</sup></i>	CAI4	Noble y Johnson (2005)
<b>IQ49-1</b>	<i>orf19.12732Δ::C.dublHIS1/ orf19.12732Δ::C.maltosaLEU2</i>	SN152	Noble <i>et al.</i> , 2010
<b>NP77-2</b>	<i>rot11Δ::C.dublHIS1/ rot11Δ::C.maltosaLEU2</i>	SN152	Noble <i>et al.</i> , 2010
<b>IB15-1</b>	<i>iff11Δ::C.dublHIS1/ iff11Δ::C.maltosaLEU2</i>	SN152	Noble <i>et al.</i> , 2010
<b>CO56-4</b>	<i>msb2Δ::C.dublHIS1/ msb2Δ::C.maltosaLEU2</i>	SN152	Noble <i>et al.</i> , 2010
<b>LR58-2</b>	<i>orf19.2336Δ::C.dublHIS1/ orf19.2336::C.maltosaLEU2</i>	SN152	Noble <i>et al.</i> , 2010
<b>IF17-3</b>	<i>sap8Δ::C.dublHIS1/ sap8Δ::C.maltosaLEU2</i>	SN152	Noble <i>et al.</i> , 2010
<b>BY54-5</b>	<i>ecm14Δ::C.dublHIS1/ ecm14Δ::C.maltosaLEU2</i>	SN152	Noble <i>et al.</i> , 2010
<b>FJS26</b>	<i>pra1Δ::C.dublHIS1/ pra1Δ::C.maltosaLEU2</i>	SN152	Noble <i>et al.</i> , 2010
<b>L586-1</b>	<i>sap98Δ::C.dublHIS1/ sap98Δ::C.maltosaLEU2</i>	SN152	Noble <i>et al.</i> , 2010
<b>LQ71-1</b>	<i>cda2Δ::C.dublHIS1/ cda2Δ::C.maltosaLEU2</i>	SN152	Noble <i>et al.</i> , 2010
<b>CV53-7</b>	<i>sun41Δ::C.dublHIS1/ sun41Δ::C.maltosaLEU2</i>	SN152	Noble <i>et al.</i> , 2010

<b>FB63-1</b>	<i>bgl2Δ::C.dublHIS1/ bgl2Δ::C.maltosaLEU2</i>	SN152	Noble <i>et al.</i> , 2010
<b>JJH13</b>	<i>plb2Δ::C.dublHIS1/ plb2Δ::C.maltosaLEU2</i>	SN152	Noble <i>et al.</i> , 2010
<b>J004-2</b>	<i>rbe1Δ::C.dublHIS1/ rbe1Δ::C.maltosaLEU2</i>	SN152	Noble <i>et al.</i> , 2010
<b>BC40-3</b>	<i>wsc4Δ::C.dublHIS1/ wsc4Δ::C.maltosaLEU2</i>	SN152	Noble <i>et al.</i> , 2010
<b>HU63-1</b>	<i>orf19.1392Δ::C.dublHIS1/ orf19.1392Δ::C.maltosaLEU2</i>	SN152	Noble <i>et al.</i> , 2010
<b>FU32-1</b>	<i>msb2Δ::C.dublHIS1/ msb2Δ::C.maltosaLEU2</i>	SN152	Noble <i>et al.</i> , 2010
<i>tos1/tos1</i>	<i>tos1Δ::C.dublHIS1/ tos1Δ::C.maltosaLEU2</i>	SN152	Noble <i>et al.</i> , 2010
<i>kex2/kex2</i>	<i>kex2Δ::C.dublHIS1/ kex2::C.maltosaLEU2</i>	SN152	Noble <i>et al.</i> , 2010
<i>rbt4/rbt4</i>	<i>rbt4Δ::C.dublHIS1/ rbt4Δ::C.maltosaLEU2</i>	SN152	Noble <i>et al.</i> , 2010
<b>RLVCA96</b>	<i>ura3Δ::imm434/ura3Δ::imm434 MP65::hisG/MP65::hisG, RPS1/rps1Δ::Cip10</i>	RLVCA35A	Sandini <i>et al.</i> , 2007
<b>1467</b>	<i>ura3Δ::imm434/ura3Δ::imm434 als1Δ/als1Δ-URA3</i>	1417	Zhao <i>et al.</i> , 2004

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

## II.1.2. Bacterias.

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

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

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

### II.1.3. Plásmidos.

Los plásmidos empleados como herramientas de trabajo en las diferentes etapas de interrupción del gen *GCAI* se detallan en la tabla II.3.

Plásmido	Descripción	Referencia
pClone-Jet	Amp <sup>R</sup>	Fermentas
pSFS2A	Clo <sup>R</sup> , con los genes <i>CaSAT1</i> y <i>CaFLP</i> y las secuencias de reconocimiento FRT	Reuss <i>et al.</i> , 2004
pClone-Jet-F1	pClone-Jet con el fragmento de 471 pb de la región 5' del gen <i>GCAI</i>	Este trabajo
pClone-Jet-F2	pClone-Jet con el fragmento de 562 pb de la región 3' del gen <i>GCAI</i>	Este trabajo
pSFS2A/F1	pSFS2A con el fragmento de 471 pb de la región 5' del gen <i>GCAI</i>	Este trabajo
pADG	Plásmido 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>GCAI</i>	Este trabajo

Tabla II.3. Plásmidos utilizados y construidos en este trabajo.

## II.2. MEDIOS Y CONDICIONES DE CULTIVO.

### II.2.1. Cultivo de levaduras.

Todos los medios utilizados en este trabajo, fueron preparados en agua destilada y se esterilizaron en autoclave a 120°C durante 20 min. Los medios sólidos contenían además agar al 2%.

Cuando fue necesario, se suplementaron con aminoácidos a las concentraciones adecuadas, partiendo de soluciones originales estériles (Sherman *et al.*, 1986).

Los cultivos en medio líquido se realizaron en matraces del tipo Erlenmeyer de vidrio con un volumen de medio no superior a un cuarto del volumen total. La incubación se realizó a 28°C y 150 rpm en un agitador orbital (Orbi-Safe, SANYO), 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 composición de los medios de cultivo se detalla a continuación:

**MEDIO YPD (Yeast extract Peptone Dextrose):**

Medio rico que contiene todas las sales minerales y vitaminas necesarias para el crecimiento de levaduras.

Peptona	2%
Glucosa	2%
Extracto de levadura	1%

Las cepas de *C. albicans* se mantuvieron mediante resiembras periódicas en agar YPD, y es usado de manera rutinaria en el trabajo de laboratorio en forma sólida en placa y líquida en tubo.

**MEDIO YPM (Yeast extract Peptone Maltose):**

Medio utilizado en los pasos de transformación en que fue necesaria la pérdida del casete que contenía el gen marcador de sensibilidad a nourseotricina.

Peptona	2%
Maltosa	2%
Extracto de levadura	1%

**MEDIO SD o YNB (Synthetic Dextrose o Yeast Nitrogen Base):**

Medio selectivo que contiene solamente una fuente de nitrógeno, por ello no permite el crecimiento de cepas auxotróficas. Se utiliza para el crecimiento de transformantes que hayan incorporado el gen marcador que complementa una auxotrofia, bien mediante la integración de un plásmido o un casete de interrupción.

Base nitrogenada de levadura sin aminoácidos	0.17%
Sulfato amónico	0.5 %
Glucosa	2 %

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

### **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%
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0.02%
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (anhidro)	0.25%
NaCl	0.5%
Glucosa	1.25%
Prolina	0.05%
Biotina	0.0001%

El pH final del medio se ajustó a 6.8 con NaOH.

### **MEDIO SPIDER:**

Manitol	1%
Caldo nutritivo	1%
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0.2%
Agar	2%

### **MEDIO YE-Pro:**

Extracto de levadura	0.1%
Prolina	0.01%
Agar	2%

## **II.2.2. Cultivo de bacterias.**

Los medios utilizados para el crecimiento de *E. coli* fueron descritos por Sambrok *et al.* (1989). Los medios se prepararon con agua destilada y fueron esterilizados en autoclave.

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

**MEDIO LB (Luria Bertani):**

Tripticasa peptona	1%
Extracto de levadura	0.5%
NaCl	1%

El pH final se ajustó a 7.4 con HCl. 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 a 200 rpm.

La selección de transformantes se llevó a cabo en el mismo medio adicionado de cloranfenicol a 30 µg/ml (LB-Clo) o ampicilina a 50 µg/ml (LB-Amp) según el vector utilizado para la transformación, es decir, para el vector comercial pClone-Jet se utilizó el medio LB-Amp y para el vector con el casete de disrupción pSFS2, el medio LB-Clo.

**II.3. TRANSFORMACIÓN DE CÉLULAS CON ADN EXÓGENO.****II.3.1. Transformación de 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.3.1.1. Obtención de células competentes con cloruro de calcio.**

Para la obtención de células competentes se inocularon 100 ml de medio LB con 500 µl de un precultivo, y se incubaron a 37°C hasta alcanzar una D.O.<sub>600nm</sub> = 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 en alícuotas de 100 a 500 µl a -80°C.

### **II.3.1.2. Transformación de células competentes de *E. coli*.**

Para realizar la transformación, las células competentes se descongelaron suavemente, manteniéndolas en hielo durante 10 min. Una vez descongeladas, se añadieron 100 µl de células competentes sobre el ADN transformante a 0°C y se mantuvieron en hielo durante 30 min. Pasado este tiempo, las células se sometieron a un choque térmico calculado para cada cepa (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 la resistencia al antibiótico correspondiente.

Pasado este tiempo, las bacterias se recogieron por centrifugación (5000 xg, 5 min) y se resuspendieron en 200 µl de LB fresco. La selección de los transformantes se llevó a cabo sembrando la suspensión bacteriana en placas de medio LB con el antibiótico correspondiente. Las placas se incubaron a 37°C hasta la aparición de colonias (24 h).

### **II.3.2. Transformación de levaduras.**

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

A partir de un precultivo en fase estacionaria en YPD de la cepa de *C. albicans* a transformar se tomaron 50 µl y se inocularon en 50 ml de medio YPD fresco y crecidas a 28°C durante toda la noche hasta una D.O.<sub>600nm</sub> = 1.6-2.2 medido 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 (100 mM Tris-HCl, 10 mM EDTA, pH 7.5) y 1 ml de acetato de litio 1 M. La suspensión fue incubada en agitación a 30°C durante 1 h a 150 rpm.

Posteriormente se añadieron 250 µl de 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

sorbitol 1 M frío con poco volumen (5 ml). Seguidamente se recogieron las células electrocompetentes y se resuspendieron con 50  $\mu$ l de sorbitol 1 M frío manteniéndose las células en hielo.

Se tomaron 40  $\mu$ l de la suspensión de células a las que se añadió el casete de disrupción cortado con las enzimas de restricción adecuadas, y fue purificado previamente por electroforesis y elución en columna (Gel Extraction Kit). El ADN a integrar se añadió muy concentrado (1,5  $\mu$ g/ $\mu$ l). Finalmente se procedió al proceso de electroporación, mediante el empleo de una cubeta de 0.2 cm (BioRad<sup>®</sup>) y a 1.8 kV, en un electroporador modelo GenePulser de BioRad<sup>®</sup>.

Después de la electroporación, las células fueron lavadas con 1 ml de sorbitol 1 M y resuspendidas en 1 ml de YPD e incubadas durante 4 h a 28°C en agitación suave. Las células fueron sembradas a continuación, en placas de YPD conteniendo 200  $\mu$ g/ml de nourseotricina e incubadas a 28°C hasta la aparición de colonias (72 h).

## **II.4. OBTENCIÓN Y PURIFICACIÓN DE ADN.**

### **II.4.1. Obtención de ADN plasmídico de *E. coli*.**

La cepa de la que se tenía la intención de obtener el plásmido fue inoculada en 5 ml o 50 ml (según la cantidad de plásmido a querer obtener) de medio LB, y se añadió ampicilina o cloranfenicol según el marcador de resistencia albergado por el vector (véase Tabla II.3). Tras dejarlo incubar 24 h, se recogieron las células por centrifugación (5000  $\times$ g, 5 min) y se obtuvo el ADN plasmídico usando el High pure plasmid isolation Kit (Roche<sup>®</sup>) siguiendo las instrucciones del fabricante.

### **II.4.2. Obtención de ADN genómico de *C. albicans*.**

Para el análisis rápido de transformantes de *C. albicans* se utilizó el método de Fujimura y Sakuma (1993). Se partió de 5 ml de cultivo crecido durante 24 h en YPD a 28°C y 110 rpm; las células fueron recogidas por centrifugación (10000  $\times$ g, 10 min) y lavadas con agua destilada estéril. Seguidamente, se resuspendieron las células en 200  $\mu$ l de tampón de lisis (EDTA, Tris-HCl, SDS, Triton X-100 y NaCl). Las células se rompieron adicionando a la suspensión 0.3 g de perlas de vidrio de 0.45 mm de diámetro (Sigma<sup>®</sup>) y sometiéndolas a agitación vigorosa en agitador vórtex realizando

4 ciclos de 50 s alternado con 1 min en hielo. Una vez obtenidas las células rotas se incubaron 10 min a 70°C para inactivar la acción de las ADNasas. A continuación, se agitaron rápidamente en vórtex y se adicionaron 200 µl de AcK 4M y 150 µl de NaCl 5M, y tras agitar nuevamente la mezcla se mantuvo en hielo 20 min.

Tras una centrifugación a 10000 xg durante 20 min, se recogió el sobrenadante cuidadosamente, añadiéndole a continuación un tercio de volumen de PEG 6000 al 30% en tampón TE (10 mM Tris-HCl pH 7.5; 1 mM EDTA pH 8.0). Se mezcló vigorosamente y se incubó en hielo durante 10 min para favorecer la precipitación del ADN genómico. El sedimento se separó por centrifugación a 10000 xg durante 10 min y fue resuspendido en 300 µl de agua o tampón TE. Posteriormente se realizaron dos extracciones con fenol:cloroformo:isoamílico (25:24:1) tomándose la fase acuosa que contenía el ADN.

El ADN purificado se precipitó con 1/10 volúmenes de NH<sub>4</sub>Ac 4 M y 3 volúmenes de etanol absoluto durante 1 h a -70°C. Finalmente se centrifugó a 10000 xg durante 10 min, se secó al vacío y se resuspendió en 50 µl de H<sub>2</sub>O. Este ADN se usó posteriormente para realizar comprobaciones por PCR.

## **II.5. TRATAMIENTO ENZIMÁTICO DE ADN.**

### **II.5.1. 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 las dos enzimas si no eran compatibles, primero se realizaba la digestión con el enzima y su correspondiente tampón de menor temperatura requerida, y a continuación la digestión con el segundo enzima y su correspondiente tampón a la temperatura necesaria.

### **II.5.2. Ligación de ADN con ligasa de T4.**

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

## **II.6. REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR).**

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

### **II.6.1. Diseño de oligonucleótidos.**

Para el diseño de oligonucleótidos específicos se siguieron las recomendaciones de Saiki (1989). Básicamente se tomaron secuencias de 20 nucleótidos, con un 50 % de C y G. Se evitaron secuencias palindrómicas, y se procuró que el oligonucleótido sintetizado tuviera en el extremo 3' la secuencia CC, GG o GC. La secuencia de los oligonucleótidos ya diseñados se introdujo en el programa informático 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. En la tabla II.4 se muestran los oligonucleótidos empleados en este trabajo, los nucleótidos subrayados corresponden a secuencias diseñadas para corte de endonucleasas de restricción seleccionadas.

Oligonucleótido	Secuencia 5'-3'	Sitio de restricción diseñado
<b>F1-5'</b>	GAGAG <u>GGTACCT</u> GCTTCCATTCTTCATGGAGTTTCG	<i>KpnI</i>
<b>F1-3'</b>	GAGAC <u>CTCGAGA</u> AATAAGTTCCTGTTTGGGGGGG	<i>XhoI</i>
<b>F2-5'</b>	GAGAG <u>GCGGCCGCGC</u> AGGTTTCGTGACCATCTTGAA	<i>NotI</i>
<b>F2-3'</b>	GAGAG <u>GAGCTCT</u> GACAGAAAGGCTTTGACTGGG	<i>SacI</i>
<b>FSAT5</b>	ATGAAAATTTTCGGTGATCCCTGAGC	-
<b>Ext-3'</b>	TTGTGTCCGGTTCTAAAACGCC	-

Tabla II.4. Oligonucleótidos utilizados en este trabajo.

## II.6.2. Condiciones de reacción.

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se realizó en un termociclador Minicycler (MJ Research®). El contenido de cada tubo de reacción fue el siguiente: se usó entre 0.25 y 2 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 se usó 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:

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

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

## II.7. ELECTROFORESIS DE ADN EN GELES DE AGAROSA.

Los fragmentos de ADN obtenidos por digestión con endonucleasas de restricción pueden separarse mediante electroforesis en geles de agarosa ya que debido a su carga negativa, migran hacia el polo positivo. La movilidad de fragmentos lineales de ADN depende de su tamaño, siendo independiente de la composición en bases. Así pues,

la separación de fragmentos de ADN se realizó en geles de agarosa SeaKEM LE (FMC Bioproducts<sup>®</sup>) en una concentración variable entre el 0.8 y 1.2% en función de los fragmentos que se querían separar, en el tampón de electroforesis TAE (Tris-acetato 40 mM, pH 8.3; EDTA 1 mM). La electroforesis se llevó a cabo horizontalmente en una cubeta con el gel sumergido en tampón TAE y a un voltaje constante de entre 60 y 90 V.

Antes de realizar la electroforesis, la muestra a separar se mezcló en una proporción 1:6 con una solución de azul de bromofenol al 0.025% y glicerol al 40% en tampón TAE (para visualizar el frente de la electroforesis y aumentar la densidad de la muestra). Paralelamente se corrió una muestra de marcadores de peso molecular obtenidos mediante la digestión del ADN del fago  $\lambda$ gt 11 con las enzimas de restricción *EcoRI* y *HindIII* (Fermentas<sup>®</sup>).

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<sup>®</sup> (360 nm). Las fotografías de los geles se tomaron con un equipo GelPrinter Plus<sup>®</sup>.

## **II.8. PURIFICACIÓN DE FRAGMENTOS DE ADN EN GELES DE AGAROSA.**

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

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

## II.9. CUANTIFICACIÓN DE ADN.

Para el cálculo de la concentración y pureza de las muestras de ADN se empleó un espectrofotómetro GeneQuant II de GE Healthcare® que mide la densidad óptica a 260 nm y realiza automáticamente el cálculo de la concentración, empleando la fórmula:

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

El factor de conversión depende del tipo de muestra, siendo 50 para ADN de doble cadena y 40 para el ARN.

## II.10. 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 de 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 que permitirá eliminar el casete para una siguiente ronda de transformación). A dicho 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 para aumentar la eficiencia de la transformación integrativa. Aproximadamente 5  $\mu\text{g}$  de casete digerido se utilizaron para transformar la cepa de *C.albicans* SC5314 según el protocolo descrito por Reuss *et al.* (2004).

Los transformantes obtenidos de cada una de las interrupciones secuenciales se seleccionaron en placas de medio YPD con nourseotricina en una concentración de 200  $\mu\text{g/ml}$ , 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 nourseotricina de 10 µg/ml en las que pudieron aislarse colonias sensibles con un crecimiento menor a este antibiótico, es decir, se pudo aislar cepas con el gen de interés interrumpido y sensibles a la nourseotricina.

## **II.11. ANÁLISIS DE LAS CEPAS DISRUPTANTES.**

Para dilucidar el grado de afectación de la pared celular de las cepas a estudiar, se analizó el efecto de diversas sustancias que afectan a la pared celular de *C. albicans* o la síntesis de sus componentes: drogas antifúngicas o antibióticas y diferentes concentraciones de estrés. Para esto, a partir de cultivos en fase exponencial en YPD de las distintas cepas a estudiar (SC5314, GCA1H<sup>S</sup> y GCA1Ø<sup>S</sup>) cuya densidad óptica D.O.<sub>600nm</sub> se había ajustado a 1, se hicieron diluciones decimales hasta 10<sup>-5</sup>, y 5 µl de cada dilución se gotearon en placas de YPD, que en los casos en que correspondía contenían concentraciones crecientes de las drogas a analizar. Posteriormente se incubaron durante 72 h a 28°C, y se observó la capacidad de crecimiento de estas cepas bajo las diversas condiciones, utilizándose como control a la cepa parental.

### **II.11.1. Estudio del efecto del blanco de calcoflúor, rojo congo y SDS.**

Se estudió el efecto de sustancias que afectan específicamente el ensamblaje de la pared celular o la síntesis de sus componentes, por lo que las distintas cepas a estudiar, se gotearon en placas que contenían de 25 a 200 µg/ml de rojo congo; de 5 a 80 µg/ml de blanco de calcoflúor, y de 0.01 a 0.06% de SDS.

### **II.11.2. Estudio de la sensibilidad a choque térmico.**

Se analizó el efecto del choque térmico sobre el crecimiento de las cepas mutantes y se comparó con la cepa parental. Para esto y tal como se describió anteriormente, se hicieron diluciones decimales hasta 10<sup>-5</sup> y 5 µl de cada dilución, se gotearon en placas de YPD. Una vez inoculadas las placas se introducían en una estufa a 55°C para someterlas al choque térmico, y tras períodos de tiempo de 5, 10, 15, 20, 30, 40, 50 y 60 min se pasaban a 28°C y se incubaban durante 2-3 días.

### **II.11.3. Estudio del efecto de estrés osmótico sobre el crecimiento.**

Se prepararon placas que contenían concentraciones de 0.4 M, 0.8 M, 1 M y 1.2 M de NaCl; 0.1 M de LiCl y 0.3 M y 0.6 M de CaCl<sub>2</sub>; y se sembraron las cepas mediante goteo. Las placas fueron incubadas a 28°C y se estudió la capacidad de crecimiento de las distintas cepas al someterlas al choque osmótico.

### **II.11.4. Estudio del efecto de estrés oxidativo sobre el crecimiento.**

Se analizó el efecto del estrés oxidativo sobre las cepas, para esto se prepararon placas que contenían concentraciones de 4 mM, 6 mM y 8 mM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y se sembraron gotas con distintas diluciones de las cepas SC5314, GCA1H<sup>S</sup> y GCA1Ø<sup>S</sup>.

### **II.11.5. Estudio del efecto de la cafeína.**

Se estudió el efecto de la cafeína sobre el crecimiento de las cepas, por lo que se prepararon placas que contenían concentraciones crecientes de cafeína desde 8 mM hasta 20 mM con o sin sorbitol 0.5 M.

### **II.11.6. Estudio de sensibilidad a drogas antifúngicas o antibióticas.**

Se estudió el efecto de diferentes antifúngicos y antibióticos. Para ello se prepararon placas que contenían: 2 a 8 µg de anfotericina B; 0.5 y 1 µg de ketoconazol; 2, 4, 6 y 8 µg de tunicamicina.

## **II.12. MICELIACIÓN EN MEDIO SÓLIDO.**

Cultivos de las cepas obtenidas en medio YNB fueron recogidos a 3500 xg durante 10 min y su D.O.<sub>600nm</sub> se ajustó a 1. Se hicieron diluciones decimales seriadas y se plaquearon 100 µl de las diluciones 10<sup>-5</sup> y 10<sup>-6</sup> (alrededor de 100 células) en placas de los medios de miceliación: Lee, YE-Pro, YNB-suero y Spider. 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.13. OBTENCIÓN Y REGENERACIÓN DE PROTOPLASTOS.

Los protoplastos se obtuvieron siguiendo el protocolo descrito por Elorza *et al.* (1988). Las células crecieron por la noche en medio de YNB a 28°C, se recogieron por centrifugación y se lavaron dos veces con agua destilada estéril para eliminar los restos de medio de cultivo. La obtención de protoplastos consta de dos etapas secuenciales efectuadas a 30°C. En la primera etapa se suspendieron las células en tampón fosfato sódico 10 mM pH 8.0 adicionado de EDTA 10 mM,  $\beta$ -ME 100 mM y 0.5 mg/ml de proteasa tipo XVI (*Streptomyces griseus*, Sigma®).

Este tratamiento duró 30 min, tras el cual las células se recogieron por centrifugación (2000 xg, 10 min), se lavaron dos veces con agua destilada estéril y una tercera con KCl 0.6 M que actúa como estabilizador osmótico. El segundo tratamiento consistió en la incubación de las células con una solución de KCl 0.6 M adicionado de zimoliasa 20 T (0.37 mg/ml), con agitación suave alrededor de 20 min. A partir de dicho tiempo se comprobó la sensibilidad a choque osmótico mediante observación microscópica en contraste de fases, hasta que la rotura fue prácticamente del 100%.

Una vez obtenidos los protoplastos, se recogieron por centrifugación (1000 xg, 10 min) y se lavaron cinco veces con KCl 0.6 M.

Para su regeneración, los protoplastos se ajustaron a D.O.<sub>600nm</sub> = 0.4 en medio de Lee que contenía KCl 0.6 M, incubándose a 28°C a velocidad suave (50 rpm). Una vez alcanzado el tiempo de regeneración deseado, las células se separaron del medio de regeneración por centrifugación (1000 xg, 10 min).

## II.14. OBTENCIÓN DE FRACCIONES SUBCELULARES.

### II.14.1. Paredes celulares.

El método seguido para la obtención y purificación de paredes celulares fue el descrito por Pastor *et al.* (1984) y Valentín *et al.* (1984) para *S. cerevisiae*. Así, las células procedentes de los cultivos incubados durante toda una noche a 28°C se recogieron por centrifugación (8000 xg, 10 min), 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  $\mu\text{m}$  (Sigma<sup>®</sup>) y se sometieron a agitaciones repetidas de 60 s en vórtex, con intervalos iguales de reposo en hielo. Si el volumen de células era mayor se procedió a su rotura en un homogeneizador de células Braun modelo MSK (Braun<sup>®</sup>). 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 s por medio de un motor a la vez que circulaba  $\text{CO}_2$  para mantener la temperatura próxima a  $0^\circ\text{C}$ , 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 Olympus BX41. Una vez realizada la rotura, se recuperó el extracto celular separándolo de las perlas de vidrio por decantación.

La fracción correspondiente a las paredes celulares se purificó por centrifugación a 2000  $\times g$  durante 10 min lavándose posteriormente con PMSF 1 mM hasta que la solución de lavado aparecía transparente. De este modo se eliminan restos de proteínas citoplasmáticas y de membranas.

### **II.14.2. Citosol y fracción mixta de membranas.**

Tras recoger las paredes del extracto celular mediante centrifugación, el sobrenadante fue recuperado, ya que contiene el citosol y las membranas celulares. Este sobrenadante fue centrifugado durante 15 min a 100000  $\times g$  para separar la fracción citosólica, que queda en el nuevo sobrenadante y una fracción mixta de membranas en el precipitado.

Esta última se lavó varias veces con PMSF 1 mM y se resuspendió en PMSF 1 mM. Ambas fracciones se guardaron a  $-20^\circ\text{C}$  para posteriores análisis.

## **II.15. SOLUBILIZACIÓN DE COMPONENTES DE LA PARED CELULAR.**

### **II.15.1. Tratamiento con dodecil sulfato sódico (SDS).**

Se siguió el protocolo descrito por Valentín *et al.*, 1984. Con el objetivo de eliminar proteínas unidas no covalentemente a las paredes celulares, se sometieron las paredes a ebullición con 1 litro de SDS al 2% en agua destilada durante 2 h. El procedimiento así descrito es útil para que la muestra pueda ser analizada por espectrometría de masas con teóricamente un bajo nivel de contaminantes. Tras enfriar la muestra, las paredes se separaron del material extraído por el SDS mediante centrifugación durante 10 min a 2000  $xg$  y se lavaron con solución de PMSF 1 mM hasta eliminar el detergente.

### **II.15.2. Tratamiento con $\beta$ -mercaptoetanol ( $\beta$ -ME).**

Las paredes celulares aisladas y previamente extraídas con SDS se suspendieron en una solución de  $\beta$ -ME al 2% (v/v) en tampón acetato amónico pH 6.3 10 mM, (5 ml/g de paredes, peso húmedo), durante 3 h 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  $\beta$ -ME.

### **II.15.3. Tratamiento con soluciones alcalinas diluidas.**

Las paredes celulares previamente tratadas con  $\beta$ -ME se extrajeron toda la noche en una solución 30 mM de NaOH (100 mg paredes/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  $xg$  y obtenido el sobrenadante se dializó en agua destilada con cambios periódicos, para ser finalmente liofilizado, al igual que las paredes que también fueron liofilizadas.

### **II.15.4. Tratamiento con ácido fluorhídrico-piridina.**

Las paredes liofilizadas se suspendieron en una solución de ácido fluorhídrico-piridina (HF/piridina) comercial (SIGMA<sup>®</sup>) en una proporción 300/4 ( $\mu$ l/mg) de pared en tubo de plástico. Se mantuvo en hielo durante 3 h con agitaciones periódicas.

Finalmente se paró la reacción añadiendo el doble de volumen de agua. Se dializó el sobrenadante en agua destilada con cambios periódicos y se liofilizó. Las paredes también se liofilizaron.

### **II.15.5. Tratamiento con zimoliasa.**

Las paredes aisladas (100 mg peso húmedo) previamente extraídas con SDS u otros tratamientos se digirieron con 1 ml de zimoliasa 20 T (1 mg/ml) en PMSF 1 mM, Tris-HCl 5 mM pH 7.4 a 30°C durante 3 h y una vez finalizado el tiempo se separó el extracto del residuo insoluble mediante centrifugación a 2000  $\times g$  durante 10 min.

## **II.16. CUANTIFICACIÓN DE MACROMOLÉCULAS.**

### **II.16.1. Determinación de proteína total.**

La cuantificación de proteína total se realizó por el método de Bradford (Bradford, 1976). Las proteínas de la muestra fueron extraídas con NaOH 1 M durante 30 min a 100°C. A continuación se separó la fracción proteica por centrifugación y el sobrenadante se utilizó para llevar a cabo la cuantificación. La muestra fue diluida en un total de 800  $\mu l$  a los que se les añadieron 200  $\mu l$  de una dilución (1:4) del reactivo de Bradford (Bio-Rad<sup>®</sup>) en agua. Transcurridos 10 min se leyó la D.O.<sub>595nm</sub> de las muestras y los resultados se interpolaron en una curva patrón de cantidades conocidas de BSA (entre 0 y 20  $\mu g$  de proteína).

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

### **II.16.2. Determinación de azúcares no reductores.**

Se utilizó la técnica descrita por Dubois *et al.* (1956), que básicamente consiste en: a 2 ml de la solución problema, conteniendo entre 10 y 80  $\mu g$  de azúcar, se añadieron 50  $\mu l$  de una solución de fenol al 80% (v/v) y a continuación, se adicionaron rápidamente 5 ml de ácido sulfúrico concentrado 95.5% (v/v). La mezcla se agitaba y se dejaba reposar 30 min a temperatura ambiente. El color desarrollado se determinaba

midiendo la D.O.<sub>490 nm</sub> y los valores obtenidos se interpolaban en una curva patrón realizada con distintas cantidades conocidas de glucosa (desde 0 a 100 µg de glucosa).

## **II.17. DESGLICOSILACIÓN DE MANOPROTEÍNAS.**

### **II.17.1. Tratamiento con meta-periodato.**

Las paredes celulares que previamente se habían extraído con SDS fueron incubadas en oscuridad a 4°C con 10 mM de sodio metaperiodato en 50 mM de tampón acetato sódico pH 4.5 durante 20 min a temperatura ambiente. Las paredes se centrifugaron (3000 xg, 10 min), se lavaron dos veces con tampón 50 mM acetato sódico pH 4.5 y se incubaron durante 30 min con glicina al 1% en tampón 50 mM de acetato sódico pH 4.5.

Finalmente, las paredes fueron lavadas una vez más con tampón 50 mM acetato sódico pH 4.5 y se almacenaron a -20°C para un posterior uso.

### **II.17.2. Tratamiento con endo-β-N-acetilglucosaminidasa H.**

A las muestras que contenían 15-20 µg de proteínas en 25 µl del tampón PBS (NaCl 8 g/l, KCl 0.2 g/l, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1.44 g/l, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.24 g/l, pH 7.4) se le adicionaron 25 µl de una solución de β-ME 0.1 M y SDS al 0.1%, se desnaturalizaron durante 3-5 min a 100°C y se dejaron enfriar. Posteriormente se les adicionó 15 µl de citrato sódico 0.5 M, pH 5.5, 75 µl de agua, 5 µl de PMSF al 10% en isopropanol y 5 µl de la enzima Endo H (0.5 U/ml).

Las mezclas se incubaron durante toda la noche a 37°C y la enzima fue inactivada por ebullición durante 5 min al día siguiente. El material así tratado fue analizado por electroforesis en geles de SDS-poliacrilamida.

### **II.17.3. Tratamiento con ácido trifluorometanosulfónico.**

Para el tratamiento con ácido trifluorometanosulfónico (TFMS) se puede partir de extracto de HF-piridina, NaOH, β-ME o zimoliasa previamente cuantificado por Bradford u otro método similar de cuantificación de proteínas (Castillo *et al.*, 2008). Se depositaron 100 µg de proteína en un tubo pyrex o core de 10 ml para posteriormente

liofilizarse. Una vez liofilizado, se agregaron con cuidado 200  $\mu$ l de TFMS (compuesto que debe ser burbujado en nitrógeno para que no entre oxígeno) y 30  $\mu$ l de anisole. Se incubó la mezcla durante 5 horas en hielo. Transcurrido este tiempo, se neutralizó con 400  $\mu$ l de N-etilmorfolina, volviéndose una mezcla altamente viscosa. Se agregaron 5 ml de acetona, se cubrió con parafilm y se mezcló bien para disolver la muestra. La suspensión obtenida se incubó durante toda la noche a  $-20^{\circ}\text{C}$  o durante 1 hora a  $80^{\circ}\text{C}$ . Finalmente, se centrifugó y se resuspendió en 100  $\mu$ l de buffer para correr geles, cargando en el gel entre 30 y 40  $\mu$ l.

### **II.18. 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 poliactilamida al 8% (relación de acrilamida:bisacrilamida de 30:0.2) preparados en tampón de separación. Los geles de empaquetamiento se prepararon en tampón empaquetador y a una concentración de acrilamida del 8%. A las muestras a analizar (10  $\mu$ g de proteína en un volumen de 10  $\mu$ l) se les adicionaron 7  $\mu$ l de una solución solubilizadora que contenía glicerol al 40 %, SDS al 8 %,  $\beta$ -ME 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  $100^{\circ}\text{C}$ .

Las muestras se empaquetaron a un voltaje constante de 120 V, realizándose el resto del proceso a 180 V. Como patrón de peso molecular en la separación de especies proteicas por SDS-PAGE se empleó PageRuler<sup>TM</sup> Prestained Protein Ladder Plus (Fermentas<sup>®</sup>) que consiste en 9 proteínas de pesos moleculares aparentes entre 10 y 250 kDa.

## **II.19. TINCIÓN DE PROTEÍNAS EN GELES DE SDS-POLIACRILAMIDA.**

Tras la separación de las proteínas mediante electroforesis, los geles se tiñeron a temperatura ambiente durante 25-30 min con una solución azul de Coomassie al 0.2% en una mezcla de metanol/ácido acético/agua destilada (45:10:45 v/v) en agitación suave. El exceso de colorante se eliminó mediante adición sucesiva de una mezcla de metanol/ácido acético/agua destilada (45:10:45 v/v).

## **II.20. TRANSFERENCIA Y DETECCIÓN DE PROTEÍNAS EN SOPORTES DE NITROCELULOSA (Western-blot).**

### **II.20.1. Transferencia a membranas de nitrocelulosa por “Western-blot”.**

Las proteínas separadas mediante SDS-PAGE fueron transferidas y retenidas en membranas de nitrocelulosa (Hybond C extra, Amersham Pharmacia Biotech<sup>®</sup>). Para ello los geles y las membranas fueron sumergidos 10 min en el tampón de transferencia (Tris 25 mM, glicina 192 mM, pH 8.3 y metanol al 20%). Los geles se pusieron en contacto con los soportes de nitrocelulosa y se introdujeron en una cubeta de Cleaver Scientific<sup>®</sup> con sistema de transferencia de proteínas en proceso semiseco, donde se realizó la transferencia aplicando una corriente constante de 100 V durante 1 h.

### **II.20.2. Adsorción de proteínas en soportes de nitrocelulosa por “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<sup>®</sup>, siguiendo las instrucciones del fabricante. Las muestras una vez fijadas se procedieron a inmunodetectarlas como se describe en el apartado II.21.3.4.

### **II.20.3. Detección de las proteínas en soportes de nitrocelulosa.**

#### **II.20.3.1. Tinción con colorante Ponceau.**

Esta tinción permite la visualización de los polipéptidos retenidos en las membranas de nitrocelulosa. La solución utilizada está compuesta por 0.2% de colorante Ponceau en ácido tricloroacético al 3%. Las membranas se sumergieron 10 min en esta preparación, se lavaron posteriormente con agua para eliminar el exceso de colorante y fueron fotografiadas dada la brevedad de la coloración. El colorante fue totalmente eliminado mediante lavados con TBS (Tris-HCl 10 mM pH 7.2, NaCl al 10%) y las proteínas retenidas en las membranas fueron detectadas específicamente por otros procedimientos.

#### **II.20.3.2. Tinción con concanavalina A.**

En algunos casos, el carácter glicoproteico del material transferido a las membranas de nitrocelulosa se determinó mediante tinción con concanavalina A. La concanavalina A es una lectina que se utiliza para la detección de los restos de manosa de las glicoproteínas. El método utilizado fue descrito por Hawkes (1982) y modificado por Millete y Scott (1984).

Una vez transferidas las proteínas a membrana de nitrocelulosa, ésta se bloqueó por incubación en una solución de BSA al 3% en TBS durante una hora, se lavó a continuación tres veces en TBS, cinco minutos por lavado y se incubó durante 30 min en una solución de 100 mg/ml de concanavalina A (Sigma<sup>®</sup> tipo IV) y 3% de BSA en TBS.

Se volvió a lavar tres veces en TBS y se incubó otros 30 min más en una solución de 100 mg/ml de peroxidasa (Sigma<sup>®</sup>, tipo IV) y 3% de BSA en TBS. Al cabo de este tiempo se lavó cuatro veces en TBS y se procedió al revelado sumergiendo la membrana de nitrocelulosa en una solución consistente en 60 mg de 4-cloro-1-naftol, 60 µl de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 30% (Merck<sup>®</sup>), 20 ml de metanol y 80 ml de TBS. El revelado se detuvo sumergiendo la nitrocelulosa en agua destilada.

### **II.20.3.3. Tinción con coomassie blue R-250 staining.**

El coomassie blue R-250 (0.025% (w/v) en 40% metanol y 7% de ácido acético) puede ser usado con la mayoría de membranas excepto nitrocelulosa (altas concentraciones de disolvente orgánico pueden disolver las membranas de nitrocelulosa).

En primer lugar, la membrana se lavó tres veces con agua millipore durante 5 min cada vez. Posteriormente se tiñó con la solución de coomassie blue R-250 durante 5 min. Se destiñó la membrana con solución de 50% metanol y 7% ácido acético durante 10 min y finalmente se lavó varias veces con agua millipore.

### **II.20.3.4. Inmunodetección de proteínas en soportes de nitrocelulosa.**

El primer paso en la detección fue el bloqueo de las membranas con leche desnatada en polvo al 5 % en tampón TBS suplementado con Tween % (TTBS), a temperatura ambiente, durante 1 h y en agitación suave. Tras esta etapa se realizaron dos lavados de 10 min cada uno con tampón TTBS y un tercer lavado de 10 min con el tampón TBS.

A continuación las membranas con las proteínas fijadas fueron incubadas con el anticuerpo adecuado. La dilución del anticuerpo en tampón TTBS conteniendo además leche en polvo desnatada al 2%, al igual que el tiempo de incubación, son variables en función de las características del anticuerpo utilizado en cada caso. El anticuerpo policlonal PAbL se utilizó en dilución 1:1000 durante una hora.

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

El método de revelado empleado fue la quimioluminiscencia, se utilizó la técnica de ECL (Lumi-light western blotting substrate, Roche<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 5 min con los líquidos de revelado 1 y 2 del kit comercial Lumi-light western blotting substrate (Roche®) en una relación 1:1.

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

### **II.21. IDENTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS MEDIANTE ESPECTROMETRÍA DE MASAS.**

Con los materiales liofilizados obtenidos por diferentes procedimientos se realizó la digestión proteolítica y para ello se resuspendieron en 50 µl de 50 mM de bicarbonato amónico a pH 7.8. Después, se añadió tripsina modificada (Promega, Madison, WI, USA) en una proporción de 0.5 µg por muestra. La digestión se llevó a cabo en agitación a 37°C durante 2 horas. Finalmente, los péptidos trípticos se liofilizaron y fueron resuspendidos en 5% ACN y 0.5% de ácido acético previamente a la inyección en una nano columna C-18 RP (Discovery® Wide pore, Supelco) siendo analizados en gradiente continuo. La información obtenida de los péptidos se contrastó con la base de datos CandidaDB de *C. albicans* (<http://genolist.pasteur.fr/CandidaDB/help/flat-files.html>).

### **II.22. INMUNOFLUORESCENCIA INDIRECTA.**

Se siguió la técnica descrita por Sundstrom y Kenny (1984) ajustando la concentración a 10<sup>6</sup> células/ml, que se lavaron dos veces con PBS. Se depositaron 10 µl de esta suspensión en pocillos de portaobjetos Microslide (BioMerieux®), donde se fijaron las células a 37°C en cámara húmeda durante 16 h, aunque en algunas ocasiones se añadió formaldehído al 4%. Posteriormente se añadieron 10 µl de las diluciones de anticuerpos en PBS a cada pocillo. Las preparaciones se incubaron 30 min a 37°C en cámara húmeda, lavándose a continuación 3 veces (15 min en total) con PBS. Seguidamente se añadieron 10 µl de la anti-inmunoglobulina correspondiente acoplada

a isotiocianato de fluoresceína (Boehringer Mannheim<sup>®</sup>) a una dilución de 1/20 o 1/10, incubándose 30 min a 37°C. Finalmente se lavaron los portaobjetos con PBS, se montaron en glicerol al 20% y se examinaron utilizando un microscopio de contraste de fases Olympus BX41.

## **II.23. MODELIZACIÓN DE LA PROTEÍNA Gca1 de *C. albicans*.**

La secuencia de aminoácidos (1-946) de la proteína Gca1 madura de *C. albicans* se envió al servidor Jigsaw (<http://www.w3.org/Jigsaw/>) (Bates *et al.*, 2001) para predecir su modelo tridimensional. Se identificaron dos regiones en la proteína que coincidían con el dominio catalítico de las glicosidasas. La secuencia también se envió para su modelización al servidor Phyre2 (<http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/phyre2/html/>) (Kelley y Sternberg, 2009) que permite generar un modelo de homología más preciso. Adicionalmente al dominio catalítico de glicosidasas predicho por Jigsaw, Phyre2 reconoció un dominio de unión a carbohidratos en la secuencia de Gca1. Ambas propuestas de alineación (Jigsaw y Phyre2) se perfeccionaron mediante inspección visual y utilizando el servidor SSM (<http://www.ebi.ac.uk/msd-srv/ssm/>) (Krissinel y Henrick, 2004) que tiene en consideración la estructura secundaria de la proteína. La utilización conjunta de los programas descritos, permitió obtener una estructura superpuesta y consensuada que implica la modelización casi completa de la secuencia aminoacídica de Gca1. Posteriormente, la secuencia se envió al servidor 3DLigandSite (<http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/3dligandsite>) (Wass *et al.*, 2010) para intentar predecir sitios de unión a ligandos en la proteína.

## **II.24. CROMATOGRAFÍAS.**

### **II.24.1. Cromatografía de afinidad con concanavalina A sepharosa 4B.**

Una suspensión comercial de concanavalina A sepharosa 4B (GE Healthcare<sup>®</sup>) se lavó con tampón 0.1 M acetato pH 6.0, conteniendo 1 M NaCl, 1 mM CaCl<sub>2</sub>, 1mM MnCl<sub>2</sub> y 1 mM MgCl<sub>2</sub>, y se diluyó en un volumen igual de dicho tampón, procediéndose a continuación al empaquetado de una columna de 3 cm de altura y 1 cm de diámetro. Las muestras se diluyeron en el tampón indicado anteriormente y se

pasaron por columna. La elución del material retenido se realizó con  $\alpha$ -metilmanósido 1M, siendo precipitado a continuación con 3 volúmenes de etanol a 0°C durante 22 h.

El material no retenido por la lectina se desechó y la columna de Con A sepharosa 4B fue regenerada para un posterior uso mediante lavados alternantes con 2 o 3 volúmenes de columna de soluciones que contenían NaCl 0.5 M y con pH 8.5 y 4.5.

Para su conservación y almacenamiento, evitando el crecimiento bacteriano se mantuvo en una solución al 20% etanol.

### **II.24.2. Cromatografía de filtración molecular con sepharosa CL-6B.**

Una suspensión comercial de Sepharose CL-6B (Sigma<sup>®</sup>) se lavó con tampón 20 mM de NaCl. Después, en dicho tampón fue resuspendida y se empaquetó en una columna de 15 cm de altura y 1 cm de diámetro. El volumen de exclusión determinado con azul dextrano fueron 90 gotas siendo la equivalencia: 1ml = 21 gotas.

La muestra liofilizada fue resuspendida en 2 ml de tampón 20 mM de NaCl y se pasó por la columna, recogándose alícuotas de 500  $\mu$ l con ayuda de un colector de fracciones RETRIEVER II. En total se recogieron 25 alícuotas, esperándose que el antígeno se eluyera a partir de la fracción novena tal como fue el resultado.

### **II.24.3. Cromatografía de afinidad con proteína G sepharosa.**

La proteína G presenta gran afinidad por anticuerpos tanto monoclonales como policlonales, en concreto por la IgG<sub>1</sub> (MAb 3H8), motivo por el cual se eligió para realizar la purificación del antígeno reconocido por el anticuerpo monoclonal.

En primer lugar, la resina se lavó varias veces con tampón TBS y se centrifugó durante 1 min a 150 *xg*. Posteriormente se añadieron 200  $\mu$ l de la solución del MAb 3H8 (0.5 a 1.0 mg/ml en tampón TBS) y se incubó durante 30 min con agitación suave. Terminada la incubación, se centrifugó durante 1 min a 150 *xg* para eliminar el anticuerpo no unido. Después, se lavó la resina con el mismo tampón y se centrifugó de nuevo durante 1 min a 150 *xg*.

A continuación se añadieron 400 µl de una solución 50 mM de dimetilo de dihidroclorhidrato y pimelidato (DMP) en 200 mM de trietanolamina pH 8.9 y realizó una incubación de 60 min con agitación suave para facilitar la unión covalente antígeno-anticuerpo. Se lavó posteriormente con 400 µl de trietanolamina y se centrifugó durante 1 min a 150 xg.

El siguiente paso fue el bloqueo de los grupos activos de proteína G no unidos al MAb 3H8. Para conseguirlo, se añadieron 400 µl de etanolamina y se mantuvo durante 15 min, después la etanolamina se eliminó por centrifugación.

Se realizaron dos lavados previos de la resina con tampón TBS, previamente a la adición de 200 µl de tampón TBS donde se solubilizó el antígeno liofilizado y se mantuvo en agitación suave durante 60 min. Para eliminar la muestra no unida se centrifugó durante 1 min a 150 xg, recogiendo el sobrenadante. Se realizaron cinco lavados con tampón TBS.

Finalmente se realizó la elución, añadiendo 200 µl de tampón glicina 0.1 M pH 2.8, se mezcló por inversión y se recogió el sobrenadante por centrifugación durante 1 min a 1000 xg, tal proceso se repitió tres veces. A continuación, se realizó un lavado con tampón TBS y después se eluyó con tampón 0.1 M hidróxido amónico pH 10.5 repitiéndose el mismo procedimiento que con el tampón eluyente glicina. Una vez realizado todo el proceso, la columna se desechó.

#### **II.24.4. Cromatografía de afinidad con NHS-activated sepharose 4 fast flow<sup>®</sup>.**

Para mantener una alta eficacia en el acoplamiento del anticuerpo a la resina, es necesario realizar una dilución previa del anticuerpo previamente dializado, en tampón de unión estándar 0.2 M NaHCO<sub>3</sub>, 0.5 M NaCl, pH 8.3 en la siguiente proporción 0.5:1.

Paralelamente, se procedió a la activación de la resina NSH-activate sepharosa 4 fast flow<sup>®</sup> mediante varios lavados con 10-15 volúmenes de HCl 1 mM. A continuación, se puso en contacto la resina activada con la solución del anticuerpo. Se mantuvo la mezcla a temperatura ambiente durante 2-4 horas para que la reacción fuera completada o bien a 4°C durante toda la noche.

Una vez realizado el acoplamiento, los grupos que no habían reaccionado de la resina fueron bloqueados mediante la adición de 15 ml de una solución 0.5 M etanolamina, 0.5 M NaCl, pH 8.3 o 0.1 M Tris-HCl, pH 8.5 incubándose durante unas pocas horas. Se centrifugó con el objetivo de eliminar la etanolamina y para lavar el medio después del acoplamiento, se usó un método de lavado alternante con tampones de alto y bajo pH respectivamente, tales como 0.1 M Tris-HCl pH 8-9 y 0.1 M tampón acetato, 0.5 M NaCl pH 4-5, repitiéndose de 3 a 6 veces.

A continuación la resina se empaquetó en una columna de 5 cm de altura y 1 cm de diámetro. Se realizaron dos lavados con tampón TBS previamente a la adición de la muestra que contenía el antígeno. Para eliminar el material no retenido, se realizaron varios lavados con tampón TBS.

Finalmente se realizó la elución, añadiendo 15 ml de tampón glicina 0.1 M pH 2.8, y se recogieron 3 viales de 5 ml cada uno. A continuación se realizó un lavado intermedio con tampón TBS tal como se indicaba anteriormente, antes de proceder a la elución con el siguiente tampón que fue 0.1 M hidróxido amónico pH 10.5. La resina para un posterior uso, fue recomendable lavarla con una solución 20% etanol y se almacenó con tal solución a temperatura ambiente.

### **II.24.5. Cromatografía de afinidad con proteína A sepharosa en presencia de alta concentración salina.**

En primer lugar, 5 ml de la suspensión del MAb3H8 (1mg/ml) fue dializado frente a tampón Tris 50 mM pH 9.0. Por otra parte, se tomaron 2.5 ml de la suspensión de proteína A-sepharosa (Sigma<sup>®</sup>) que fue lavada con el tampón Tris 50 mM pH 9.0.

Se ajustó el pH de la solución del anticuerpo a pH 9.0 y se añadió NaCl hasta alcanzar una concentración final de 3 M. Posteriormente, se mezcló la solución del anticuerpo con la resina y se mantuvo en agitación constante durante 16 horas a 4°C.

Al día siguiente, la resina fue recuperada por sedimentación, aspirándose el sobrenadante que correspondía con la cantidad de anticuerpo no unido a la resina. Después, la resina se lavó con 10 volúmenes de 3 M de NaCl, 50 mM de borato sódico (pH 9.0) y se volvió a separar la resina por sedimentación y aspiración. Una vez finalizado el lavado, se resuspendió la resina en 10 volúmenes de 3 M de NaCl, 0.2 M

de borato sódico (pH 9.0). Se adicionó una cantidad suficiente de dimetilpimelidato para tener una concentración final de 20 mM. La mezcla fue incubada durante 30 minutos a temperatura ambiente con agitación constante.

La reacción se paró cuando la resina fue lavada con 0.2 M de etanolamina (pH 8.0). Posteriormente se realizó una incubación de la resina en dicha disolución a temperatura ambiente durante 2 horas con agitación constante. Finalizado el tiempo, la resina se separó por sedimentación y fue lavada con tampón TBS pH 7.5.

La resina se mezcló con la solución del antígeno y se incubó a 4°C con constante agitación durante 16 horas. Al día siguiente, se separó la resina por sedimentación y el sobrenadante fue recogido correspondiendo a la cantidad de antígeno no unido al anticuerpo acoplado a la resina. Se empaquetó la resina en una columna de 3 cm de altura y 0.5 cm de diámetro.

La resina fue lavada con 20 volúmenes de tampón TBS pH 7.5. Una vez lavada, se procedió a la elución con tampón 100 mM de glicina pH 2.5, recogándose 10 fracciones de 1 ml cada una. Se realizó un lavado con tampón TBS y se recogieron también 10 fracciones de 1 ml. Finalmente se terminó la elución empleando un tampón 100 mM de trietilamina a pH 11.5, recogándose la misma cantidad de alícuotas.



### **III. RESULTADOS.**



### **III.A. IDENTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS.**



### **III.A.1. IDENTIFICACIÓN POR ESPECTROMETRÍA DE MASAS DE PROTEÍNAS UNIDAS COVALENTEMENTE A LA PARED CELULAR DE *C. albicans* (SC5314) Y EN EL SOBRENADANTE DE PROTOPLASTOS.**

Considerando la importancia que tienen las proteínas en la estructura y función de la pared celular en hongos, se pueden diferenciar dos tipos de proteínas: (i) proteínas estructurales de pared y (ii) proteínas con función enzimática.

Según una revisión realizada por Richard y Plaine (2007) de los datos publicados por cuatro grupos de investigación de las proteínas identificadas en *C. albicans* (De Groot *et al.*, 2003; Eisenhaber *et al.*, 2004; Garcerá *et al.*, 2003; Sundstrom, 2002) mediante un análisis *in silico* de su genoma, se ha sugerido la existencia de 115 genes que codifican proteínas GPI. Dada la gran importancia de las proteínas GPI debido a que suponen alrededor del 88% de todas las proteínas de la pared, se ha querido realizar una serie de experimentos con el fin de identificar mediante espectrometría de masas, las proteínas presentes en diferentes materiales.

La identificación de proteínas en las diferentes muestras se ha realizado gracias a la colaboración con el grupo de investigación del Dr. Juan A. López en el Centro Nacional de Investigaciones Cardiovasculares del Instituto Carlos III de Madrid; siguiendo el protocolo descrito en el apartado II.21 de Materiales y Métodos.

#### **III.A.1.1. Identificación de proteínas en el sobrenadante de protoplastos de *C. albicans*.**

Se obtuvieron protoplastos de la cepa SC5314 de *C. albicans* según el método descrito por Elorza *et al.*, (1988). La regeneración tuvo lugar durante 5 horas en medio Lee con 0.6 M de KCl, incubándose a 28°C con agitación suave (50 rpm). El resultado obtenido de las proteínas que fueron identificadas en el sobrenadante de protoplastos previamente dializado y liofilizado se detalla en la tabla III.1.

## RESULTADOS

Proteína	Descripción	Secuencia	Residuos	"Score"
Als2	Agglutinin like-protein	FITDQTSVDLTAEGVK	77-92	304
		TNEDASGYFIASR	176-188	
Als4	Agglutinin like-protein	FITDQTSIDLVDGR	77-91	405
		ILLSR	184-188	
Cht2	Chitinase 2	TVLLSLGGGVGDYGFSDVASATK	99-121	8787
		FADTLWNK	122-129	
		FADSAPNKNIK	229-239	
		LFVGVPTSNIAGYVDTSK	240-258	
		GENFVVQVK	291-299	
Crh11	Transglycosylase	QGTIDSGSNGLSLTMK	60-75	1392
		QGTIDSGSNGLSLTMKK	60-76	
		RFDNPSFK	77-84	
		VEVVLK	94-99	
		GNTATYDR	140-147	
		DAVTWSVDGVSIR	170-182	
		SVLVADYSSGK	236-246	
		SVLVADYSSGKQYSYSDQSGSWESIK	236-261	
		QYSYSDQSGSWESIK	247-261	
		QYSYSDQSGSWESIKADGGK	247-266	
Ecm33.3	Protein involved in cell wall	TGLTAGITSAESVVISDTGLSSLTGINVK	139-168	4075
		VDVILK	203-208	
		TIGGALQISDNSELR	276-290	
		SFSGFPK	291-297	
		VSGGFILK	322-329	
Pga29	Unknown function	SDDSKVDGLGLYSK	26-39	779
		HEGAAIDYFLGK	40-52	
		DGTLSTGDDKVVYASK	104-119	
		NVNDPYPYSESEYAVSNK	120-137	
		NVNDPYPYSESEYAVSNKK	120-138	
		KTDDSAPITIVAK	138-150	
		TDDSAPITIVAK	139-150	
Phr1	$\beta$ -1,3-glucanosyltransferase	SNTDASAFVK	175-184	133
Phr2	$\beta$ -1,3-glucanosyltransferase	DIPYLEAVDTNVIR	75-88	433
		SNTDASAFVK	165-174	
		SIPVGYSANDDSAIR	191-205	
Scw1	Glucosidase	SNQQAIISSIK	334-344	490
Tos1	Unknown function	SGEYIIFSGSK	288-299	60

**Tabla III.1. Proteínas identificadas en el sobrenadante de protoplastos regenerados durante 5 horas.**

Se detalla la descripción, los péptidos correspondientes a las proteínas identificadas, la situación de estos péptidos en la secuencia aminoacídica de las proteínas y el "score".

En el sobrenadante de protoplastos después de 5 horas de regeneración se identificaron un total de diez proteínas de pared celular de las cuales ocho proteínas son GPI mientras que Scw1 y Tos1 no lo son. Ambas proteínas fueron identificadas con un único péptido. Tos1 es una proteína de función desconocida y sobre Scw1 se conoce que es una proteína necesaria para mantener la integridad de la pared, así mismo facilita la adherencia a células epiteliales y está implicada en la formación de biopelículas

(Sandini *et al.*, 2011), de manera que no es extraña su identificación en la regeneración de la pared del protoplasto.

### III.A.1.2. Identificación de proteínas presentes en paredes celulares de *C. albicans*.

Se obtuvieron paredes celulares de la cepa SC5314 de *C. albicans* procedentes de un cultivo de YPD en fase exponencial tardía y se trataron exhaustivamente con SDS, un detergente necesario para eliminar todas aquellas proteínas presentes que no están retenidas de manera covalente a la pared celular y podrían interferir en la identificación por espectrometría de masas y como consecuencia dar un resultado erróneo. Las proteínas identificadas en paredes celulares se detallan en la tabla III.2.

Proteína	Descripción	Secuencia	Residuos	"Score"
Als1	Agglutinin like-protein	STVDPSGYLYASR	176-188	161
		GLNDWNYPVSSEFSYTK	237-254	
Als2	Agglutinin like-protein	AGTNTVTFNDGDKK	153-166	141
		ISIDVDFEK	167-175	
		TNEDASGYFIASR	176-188	
Als4	Agglutinin like-protein	FITDQTSIDLVLADGR	77-91	2961
		STVASSDR	176-183	
Bgl21	1,3-beta-glucosyltransferase	DVSTFEGDLDFLK	37-49	49
		EALQNYLPK	97-105	
Cht2	Chitinase 2	TVLLSLGGVGDYGFSDVASATK	99-121	5985
		FADTLWNK	122-129	
		FGAGEDPERPFDDAVVDGFDIEHGGATGYPELATALR	130-168	
		LFVGVPTSNIAGYVDTSK	240-258	
		LSSAIEEIK	259-267	
Crh11	Transglycosylase	GENFVVQVK	291-299	246
		FDNGLGPHFESLKK	46-59	
		GGYHDIANPLK	148-158	
		DYHTYVIDWTK	159-169	
		DAVTWSVDGSVIR	170-182	
		SVLVADYSSGK	236-246	
Ecm33.3	Protein involved in cell wall	QYSYSDQSGSWESIK	247-261	9583
		VFNVNNNDNIDTIDSLQEVTDITIDISYNAEK	185-202	
		VELAELTSIGNSLTINK	246-262	
		NDDLTELDFPK	263-273	
		TIGGALQISDNSELR	276-290	
Pga4	$\beta$ -1,3-glucanosyltransferase	VSGGFILK	322-329	375
		VEGNAFWDESESGDR	24-37	
		YFQELGINTIR	69-79	
		TIPVGYSAAASVDEYR	184-198	
Pga29	Unknown function	GDSVTTNDDFDNLK	302-315	1068
		VDGLGLYSK	31-39	
		HEGAAIDYLFLGK	40-52	
		YSESEYAVSNK	127-137	
		YSESEYAVSNKK	127-138	
		KTDDSAPITIVAK	138-150	
TDDSAPITIVAK	139-150			

Tabla III.2. Continuación en página siguiente.

## RESULTADOS

Proteína	Descripción	Secuencia	Residuos	"Score"
Phr1	$\beta$ -1,3-glucanosyltransferase	NNPEWNLDLYK	136-146	65
		LFQEIGTLYSDK	280-291	
Phr2	$\beta$ -1,3-glucanosyltransferase	DIPYLEAVDTNVIR	75-88	610
		DDPSWDLDFER	126-137	
		SIPVGYSANDDSAIR	191-205	
		ASGYESATNDYK	239-250	
		DKLSFVMNLYEQNK	424-438	
Pir1	Structural protein	ACSSANNLEMTLHDSVLK	249-266	995
		WGAIVANHQFQFDGPIQAGTIYSAGWSIK	272-301	
Sap9	Secreted aspartyl protease	AGSILFGAIDHAK	307-319	150
		TYSQISYPVR	332-341	
		VPISDLVLQASK	427-438	
Scw1	Glucosidase	SESQIASEIAQLSGFDVIR	142-160	2801
		IFAGIFDVSSITSGIESLAEAVK	182-204	
		KNVLITETGWPSR	310-322	
		NVLITETGWPSR	311-322	
		SNQQAASSIK	334-344	
Sun42	Protein involved in cell wall	TDYPGSENMNIPTLLSAGGK	233-252	78
		TYLSLIPNPNNK	314-325	
Utr2	1,3-1,4- $\beta$ -glucanase	YDYPQTPSR	245-253	364
		IQFSLWPGGDSSNAK	254-268	
		YGYYYAHIK	288-296	
		EIYATAYDIPNDVK	297-310	

**Tabla III.2. Proteínas identificadas en paredes celulares.** Se detalla la descripción, los péptidos correspondientes a las proteínas identificadas, la situación de estos péptidos en la secuencia aminoacídica de las proteínas y el "score".

Se identificaron dieciseis proteínas en la pared celular siendo doce proteínas GPI. Bgl21, Pir1, Scw1 y Sun42 son proteínas no GPI, identificadas solamente con dos péptidos cada una, a excepción de Scw1 que en este experimento fue identificada con 5 péptidos y presentaba un "score" alto.

Bgl21 es una enzima extracelular asociada a la pared celular con actividad 1,3- $\beta$ -glucosiltransferasa. Pertenece a la familia de las glicosil hidrolasas y se encuentra implicada en la biosíntesis de la pared celular presentando cierta homología con Bgl2 de *S. cerevisiae*. Los mutantes deficientes en esta proteína presentan defectos en la pared y en el crecimiento aunque no existen diferencias significativas en cuanto a los niveles de 1,3 o 1,6- $\beta$ -glucano (Sarthy *et al.*, 1997). Esta proteína no está N-glicosilada y presenta un porcentaje relativamente bajo de O-glicosilación. Además tiene cuatro residuos cisteína, dos cercanos al extremo N-terminal y los otros dos en la parte C-terminal de la proteína.

Con respecto a la función de la proteína Pir1 y su implicación en la pared celular, no se conoce demasiado, pero se ha demostrado que el mutante heterocigótico con una disrupción en cualquiera de los dos alelos crece lentamente y muestra una morfología

anormal, una tendencia a formar grupos y alta sensibilidad a blanco de calcoflúor y rojo congo en comparación con la cepa parental (Martínez *et al.*, 2004). Estos resultados fueron obtenidos en la cepa CAI4 de *C. albicans*. Estudios recientes realizados por nuestro grupo de investigación muestran la no esencialidad del gen *PIR1* (Valentín, E. comunicación personal).

Sun42 se encuentra relacionada también con el mantenimiento de la pared celular y remodelación de ésta ya que tiene una función de degradación de la pared evitando la lisis después de la separación celular (Firon *et al.*, 2007). Este hecho, se explica debido a que la disrupción simultánea de los genes *SUN41* y *SUN42* que codifican las proteínas Sun provoca la lisis de la célula madre después de la septación.

### III.A.1.3. Identificación de proteínas en el material solubilizado por $\beta$ -ME.

Paredes celulares de la cepa SC5314 de *C. albicans* (100 mg peso seco) fueron resuspendidas en 2.5 ml de tampón acetato amónico 1 mM a pH 6.3 conteniendo 2% v/v  $\beta$ -ME y se incubaron a 28°C durante 3 horas con agitación. La suspensión se centrifugó a 1200 *xg* durante 10 min, y del sobrenadante se tomó una alícuota que posteriormente se liofilizó para poder realizar la identificación de proteínas. El resultado de la identificación en el material solubilizado por  $\beta$ -ME se detalla en la tabla III.3.

Proteína	Descripción	Secuencia	Residuos	"Score"
Als1	Agglutinin like-protein	YTTSQTSVDLTADGVK	77-92	340
		STVDPSGYLYASR	176-188	
		GLNDWNYPVSSSESFSYTK	237-254	
Als2	Agglutinin like-protein	FITDQTSVDLTADGVK	77-91	585
		AGTNTVTFNDGDK	153-165	
		AGTNTVTFNDGDKK	153-166	
		ISIDVDFEK	167-175	
		TNEDASGYFIASR	176-188	
		LIPSINK	189-195	
Als4	Agglutinin like-protein	FITDQTSIDLVDGR	77-91	554
Crh11	Transglycosylase	SVLVADYSSGK	236-246	85
		YDQAQDDIK	271-279	
Ecm33.3	Protein involved in cell wall	VELAELTSIGNSLTINK	246-262	1163
		NDDLTELDFPK	263-273	
		TIGGALQISDNSELR	276-290	
		VSGGFILK	322-329	

Tabla III.3. Continuación en página siguiente.

## RESULTADOS

Proteína	Descripción	Secuencia	Residuos	"Score"
Eng1	Endo-1,3-beta-glucanase	AIDTNAPPTVFAR	431-443	1276
		VFGSINTNNK	507-516	
		GVASYYFNPTNNAELIFSATFSK	517-540	
		DLSLETSDALLSNVLK	601-616	
		LEVEDFYNLK	642-651	
		FSYTTAGK	703-710	
		DQLELLASAANK	785-796	
		ELAANIAATVK	797-807	
		DWVNSLVR	924-931	
		DASNPSADDTYFPVSR	932-947	
		VSGIFFENK	1030-1038	
Gca1	Glucoamylase	GGNIIPTQEPGYTTESR	817-834	59
Pga4	$\beta$ -1,3-glucanosyltransferase	VEGNAFWDESEGDR	24-37	293
		YFQELGINTIR	69-79	
		TIPVGYSAASVDEYR	184-198	
		TKNPSGDGGYK	321-332	
Pga24	Unknown function	YNTDIR	77-82	245
		NLYGAGAVPFFQVHLEK	94-110	
Pga29	Unknown function	YSESEYAVSNK	127-137	121
		TDDSAPITIVAK	139-150	
Pga52	Unknown function	FASYVSDGFK	85-94	42
Phr1	$\beta$ -1,3-glucanosyltransferase	SNTDASAFVK	175-184	61
		LFQEIGTLYSK	280-291	
Phr2	$\beta$ -1,3-glucanosyltransferase	DIPYLEAVDTNVIR	75-88	456
		DDPSWDLDFER	126-137	
		SNTDASAFVK	165-174	
		SIPVGYSANDDSAIR	191-205	
Plb3	Phospholipase B	NADSLSPQEQEWLK	44-57	77
		IGLSFSGGGYR	94-104	
Plb5	Phospholipase B	GTPFPFAPDYK	533-543	25
Sap9	Secreted aspartyl protease	TYSQISYPVR	332-341	34
Scw1	Glucosidase	SESQIASEIAQLSGFDVIR	124-160	4764
		IFAGIFDVSSITSGIESLAEVK	182-204	
		KNVLITETGWPSR	310-322	
		NVLITETGWPSR	311-322	
		SNQQAASSIK	334-344	
		YWGIYSN	372-378	
Scw11	Hydrolase activity	VTTSEPPATYK	377-388	25
Sod4	Superoxide dismutase	TPAALELGDLSGR	105-117	223
Tos1	Unknown function	SGEYIIFSGSK	288-299	189
		KGTVAYHGFK	311-320	
Utr2	1,3-1,4- $\beta$ -glucanase	YDYPQTPSR	245-253	126
		IQFSLWPGGDSSNAK	254-268	
		EIYATAYDIPNDVK	297-310	

**Tabla III.3. Proteínas identificadas en el material solubilizado por  $\beta$ -ME.** Se detalla la descripción, los péptidos correspondientes a las proteínas identificadas, la situación de estos péptidos en la secuencia aminoacídica de las proteínas y el "score".

En el material solubilizado por  $\beta$ -ME de las paredes celulares se identificó un total de veintiuna proteínas, de las cuales cinco no son proteínas GPI (Eng1, Gca1, Scw1, Scw11 y Tos1). Se identificaron por primera vez, Gca1 y Scw11 con un único

péptido en el extracto de  $\beta$ -ME, a diferencia de Eng1 cuya identificación fue con once péptidos

Eng1 es una endo-1,3- $\beta$ -glucanasa implicada en la separación celular. Además, el gen *ENG1* es un ortólogo de *DSE4* de *S. cerevisiae* cuya proteína codificante ScDse4 se encuentra implicada en la degradación de la pared celular en células gemando (Colmar-Lerner *et al.*, 2001).

Gca1 es una proteína de 946 aminoácidos y un peso de 190 kDa. Degrada el almidón y en modelo murino se ha visto expresado el gen *GCA1* causando una candidiasis oral (Sturtevant *et al.*, 1999).

Scw1 y Scw11, pertenecen a la familia de las glicosil hidrolasas y presentan un papel importante en la relación hongo-hospedador.

Tos1 previamente se había identificado en el sobrenadante de protoplastos y como hemos mencionado anteriormente, es una proteína de función desconocida. Es homóloga a la subunidad  $\alpha$ -aglutinina de *S. cerevisiae* pero en *C. albicans* contiene péptido señal y como consecuencia debe ser liberada de la parte externa de la membrana plasmática y debido a que posee diez residuos cisteína puede encontrarse unida a la pared celular mediante puentes disulfuro.

#### **III.A.1.4. Identificación de proteínas en el material solubilizado por NaOH.**

Paredes celulares de la cepa SC5314 de *C. albicans* (100 mg peso seco) fueron resuspendidas en una solución de NaOH 30 mM, incubándose durante toda una noche a 4°C. La reacción fue parada al adicionar 100  $\mu$ l de ácido acético, seguido de centrifugación a 1200  $\times$ g durante 10 min, posterior diálisis y liofilización para realizar la identificación por espectrometría de masas.

Las proteínas identificadas en el material solubilizado por NaOH de las paredes se muestran en la tabla III.4.

## RESULTADOS

Proteína	Descripción	Secuencia	Residuos	"Score"
Als2	Agglutinin like-protein	VITGVFNSFDSLWTR	19-34	327
		FITDQTSVDLTADGVK	77-91	
		ISIDVDFEK	167-175	
		TNEDASGYFIASR	176-188	
Als4	Agglutinin like-protein	FITDQTSIDLVDAGR	77-91	654
		PFVDAYVSATR	274-284	
Bgl21	1,3-beta-glucosyltransferase	EDLTASELASK	124-134	44
Cht2	Chitinase 2	TVLLSLGGVGDYGFSDVASATK	99-121	2249
		FADTLWNK	122-129	
		FGAGEDPERPFDDAVVDGDFDIEHGGATGYPELATALR	130-168	
		DTSKNYFLSAAPQCPYPDASLGDLLSK	174-200	
		NYFLSAAPQCPYPDASLGDLLSK	178-200	
		FADSAPNK	229-236	
		LFVGV PATSNIAGYVDTSK	240-258	
		LFVGV PATSNIAGYVDTSKLSSAIEEIK	240-267	
		LSSAIEEIK	259-267	
		GENFVVQVK	291-299	
Ecm33.3	Protein involved in cell wall	TIGGALQISDNSELR	276-290	160
Eng1	Endo-1,3-beta-glucanase	AIDTNAPPTVFAR	431-443	342
		DQLELLASAANK	785-796	
		ELAANIAATVK	797-807	
		DWVNSLVR	924-931	
		DASNPSADDTYFPVSR	932-947	
		VSGIFFENK	1030-1038	
Pga4	$\beta$ -1,3-glucanosyltransferase	TIPVGYSAASVDEYR	184-198	65
Phr1	$\beta$ -1,3-glucanosyltransferase	SNTDASAFVK	175-184	41
		LFQEIGTLYSDK	280-291	
Phr2	$\beta$ -1,3-glucanosyltransferase	DIPYLEAVDTNVIR	75-88	255
		DDPSWDLDFER	126-137	
		SNTDASAFVK	165-174	
		SIPVGYSANDDSAIR	191-205	
Pir1	Structural protein	WGAIIVANHQFQFDGPIQAGTIYSAGWSIK	272-301	1517
		DGYLYLGDNSNIFYQCLSGDFYNLYDENVAK	302-331	
		LSVIEFVNC	338-346	
Scw1	Glucosidase	SESQIASEIAQLSGFDVIR	142-160	1719
		IFAGIFDVSSITSGIESLAEAVK	182-204	
		NVLITETGWPSR	311-322	
		SNQQAAISSIK	334-344	
		SSCGASAILFTA FN DLWK	345-362	
Sod4	Superoxide dismutase	TPAALELGDLSGR	105-117	104

**Tabla III.4. Proteínas identificadas en el material solubilizado por NaOH.** Se detalla la descripción, los péptidos correspondientes a las proteínas identificadas, la situación de estos péptidos en la secuencia aminoacídica de las proteínas y el "score".

Se identificaron doce proteínas de pared celular, siendo cuatro proteínas no GPI, que al igual que en los anteriores experimentos fueron Bgl21, Eng1, Pir1 y Scw1. Bgl21 fue identificada en el extracto de NaOH con un único péptido a diferencia de cómo había sido identificada en paredes celulares con dos péptidos.

Eng1 y Scw1 fueron dos proteínas no GPI solubilizadas tanto por  $\beta$ -ME como por NaOH, aunque en el caso de Scw1 prácticamente fue identificada en todos los experimentos de este apartado.

### III.A.1.5. Identificación de proteínas en bandas de electroforesis obtenidas mediante SDS-PAGE del material solubilizado de paredes celulares por $\beta$ -ME y NaOH.

Con alícuotas del material solubilizado por  $\beta$ -ME y NaOH en experimentos anteriores se realizó una electroforesis en gel de poliacrilamida al 8% para posteriormente poder realizar una identificación de las proteínas en función de su tamaño y poder comparar con los resultados previos. En el gel de poliacrilamida se cargaron un total de 20  $\mu$ g de proteína y fue teñido con una solución de azul de Coomassie al 0.2% en metanol/ácido acético/agua destilada (45:10:45 v/v). La tinción permitió observar tres bandas con una movilidad aparente de 250, 75 y 36 kDa. Con estas tres bandas se realizó la identificación de proteínas mediante espectrometría de masas y los datos obtenidos se detallan en las tablas III.5, III.6 y III.7.

Las proteínas identificadas en la banda de 250 kDa se muestran en la tabla III.5.

Proteína	Descripción	Secuencia	Residuos	"Score"
Als1	Agglutinin like-protein	STVDPSGYLYASR	176-188	155
		GLNDWNYPVSSSEFSYTK	237-254	
Als2	Agglutinin like-protein	ISIDVDFEK	167-175	98
		TNEDASGYFIASR	176-188	
Als4	Agglutinin like-protein	FITDQTSIDLVDGR	77-91	183
Bgl21	1,3-beta-glucosyltransferase	DVSTFEGDLDFLK	37-49	126
Cht2	Chitinase 2	TVLLSLGGVGDYGFSDVASATK	99-121	5230
		FADTLWNK	122-129	
		FGAGEDPERPFDDAVVDGDFDIEHGGATGYPELATALR	130-168	
		FADSAPNK	229-236	
		FADSAPNKNIK	229-239	
		LFVGV PATSNIAGYVDTSK	240-258	
		LSSAIEIK	259-267	
GENFVVQVK	291-299			
Ecm33.3	Protein involved in cell wall	VFNVNNNDNIDTIDSGLQEVTDITIDISYNAEK	185-202	1081
		VELAELTSIGNSLTINK	246-262	
		VELAELTSIGNSLTINKNDLTELDFPK	246-273	
		NDDLTELDFPK	263-273	
		TIGGALQISDNSELR	276-290	
		VSGGFILK	322-329	
Eng1	Endo-1,3-beta-glucanase	DLSLETS DALLSNVLK	601-616	1338
Pga4	$\beta$ -1,3-glucanosyltransferase	VEGNAFWDSSEGDR	24-37	423
		YFQELGINTIR	69-79	
		AGIYVILDVNTPHSSITR	99-116	
		TIPVGYSAASVDEYR	184-198	
		GDSVTTNDDFDNLK	302-315	
		TKNPSGDGGYLK	321-332	
Pga24	Unknown function	NLYGAGAVPFFQVHLEK	94-110	113
Pga29	Unknown function	KTDDSAPITIVAK	138-150	690
Pga31	Protein involved in cell wall	HEGAALNYLFLAAPGVAENLK	102-122	51
		GGDGAIPK	201-209	
Pga45	Unknown function	YSGALSQILQDLEK	351-364	88

Tabla III.5. Continuación en página siguiente.

## RESULTADOS

Proteína	Descripción	Secuencia	Residuos	"Score"
Phr1	$\beta$ -1,3-glucanosyltransferase	IFSDAGIYIVADLSEPTVSINR	114-135	427
		NNPEWNLPLYK	136-146	
		NNPEWNLPLYKR	136-147	
		SNTDASAFVK	175-184	
		QIPVGYSSNDDEEIR	201-215	
		LFQEIGTLYSDK	280-291	
		LSYVLNQYYLDQDKK	438-452	
Phr2	$\beta$ -1,3-glucanosyltransferase	SNTDASAFVK	165-174	237
		SIPVGYSANDDSAIR	191-205	
		ASGYESATNDYK	239-250	
Pir1	Structural protein	WGAIVANHQFQFDGPIQAGTIYSAGWSIK	272-301	112
Scw1	Glucosidase	SESQIASEIAQLSGFDVIR	142-160	858
		KNVLITETGWPSR	310-322	
		NVLITETGWPSR	311-322	
		GDSNGVAVPSK	323-333	
		SNQQAIISSIK	334-344	
Scw11	Hydrolase activity	SDIQLINSK	267-275	64
		VTTSEPPATYK	377-388	
Sod5	Superoxide dismutase	TEYDDSYISLNEK	128-140	74
Tos1	Unknown function	SGEEYIIFSGSK	288-299	72

**Tabla III.5. Proteínas identificadas en la banda de 250 kDa.** Se detalla la descripción, los péptidos correspondientes a las proteínas identificadas, la situación de estos péptidos en la secuencia aminoacídica de las proteínas y el "score".

Las proteínas identificadas en la banda de 75 kDa se muestran en la tabla III.6.

Proteína	Descripción	Secuencia	Residuos	"Score"
Bgl21	1,3-beta-glucosyltransferase	DVSTFEGDLDFLK	37-49	142
		EALQNYLPK	97-105	
		IFLVGSEALYR	113-123	
Cht2	Chitinase 2	FADTLWNK	122-129	401
		LFVGV PATSNIAGYVDTSK	240-258	
		LSSAIEEIK	259-267	
		GENFVVQVK	291-299	
Crh11	Transglycosylase	GGYHDIANPLK	148-158	153
		SVLVADYSSGK	236-246	
		QYSYSDQSGSWESIK	247-261	
Ecm33.3	Protein involved in cell wall	VFNVNNDNIDTIDSLQEVDTIDISYNAEK	185-202	1595
		VELAELTSIGNSLTINK	246-262	
		NDDLTELDFPK	263-273	
		TIGGALQISDNSELR	276-290	
		VSGGFILK	322-329	
Eng1	Endo-1,3-beta-glucanase	DLSLETS DALLSNVLK	601-616	282
		LEVEDFYNLK	642-651	
		DQLELLASAANK	785-796	
		DWVNSLVR	924-931	
		DASNPSADDTYFPVSR	932-947	
Pga4	$\beta$ -1,3-glucanosyltransferase	VEGNAFWDESESGDR	24-37	536
		YFQELGINTIR	69-79	
		AGIYVILDVNTPHSSITR	99-116	
		TIPVGYSAASVDEYR	184-198	
		GDSVTTNDDFDNLK	302-315	
		TKNPSGDGGYK	321-332	
		NPSGDGGYK	323-332	
Pga24	Unknown function	NLYGAGAVPFFQVHLEK	94-110	55

**Tabla III.6.** Continuación en página siguiente.

Proteína	Descripción	Secuencia	Residuos	"Score"
Pga29	Unknown function	VDGLGLYSK QIFQELK	31-39 65-71	41
Phr1	$\beta$ -1,3-glucanosyltransferase	FESSTPPVEVVGNK GIAYQQDAAGSVSSGYDADPNR IFSDAGIYIVADLSEPTVSINR NNPEWNLDTYK SNTDASAFVK QIPVGYSSNDDEEIR STFETSGYK LFQEIGTLYSK MTDVWSGGIVMYFEEANK LSYVLNQYYLDQDK LSYVLNQYYLDQDKK	22-35 49-70 114-135 136-146 175-184 201-215 245-253 280-291 292-310 438-451 438-452	1391
Phr2	$\beta$ -1,3-glucanosyltransferase	DIPYLEAVDTNVIR DDPSWDLDFER SNTDASAFVK SIPVGYSSANDSAIR ASGYESATNDYK	75-88 126-137 165-174 191-205 239-250	525
Pir1	Structural protein	WGAIVANHQFQFDGPIQAGTIYSAGWSIK	272-301	286
Plb3	Phospholipase B	NADSLSPQEQEWLK IGLSFSGGGYR	44-57 94-104	110
Plb5	Phospholipase B	NLIDFLSK AMLAGAGQILGLDGR TIAYYYGLAQAVQAK GTPFPFAPDYK	146-153 188-202 270-284 533-543	210
Rbt7	Unknown function	LSQVQEALQK	263-272	27
Sap9	Secreted aspartyl protease	SLSYLYLNTADAK AGSILFGAIDHAK YQGDLVTVK TYSQISYPVR VPISDLVLQASK	294-306 307-319 320-328 332-341 427-438	468
Scw1	Glucosidase	SESQIASEIAQLSGFDVIR KNVLITETGWPSR NVLITETGWPSR SNQQAASSIK ADGPYNAEK	142-160 310-322 311-322 334-344 363-371	1045
Sod4	Superoxide dismutase	TPAALELGDLSGR	105-117	128
Sod5	Superoxide dismutase	AATPAAHEVGDLAGK	103-117	64
Sun42	Protein involved in cell wall	TDYPGSENMNIPTLLSAGGK	233-252	92
Tos1	Unknown function	FGNSLYANADNSGGSTPVLEETIK SGEYIIFSGSK	260-287 288-299	153
Utr2	1,3-1,4- $\beta$ -glucanase	MSTFQESFDSK YLWYGK IEWYIDGK YDYPQTPSR IQFSLWPGGDSSNAK GTIEWAGGLINWDSEDIK EIYATAYDIPNDVK	75-85 137-142 220-228 245-253 254-268 269-287 297-310	266
Yps7	Putative aspartic-type endopeptidase	AYYSSELTR	431-439	28

**Tabla III.6. Proteínas identificadas en la banda de 75 kDa.** Se detalla la descripción, los péptidos correspondientes a las proteínas identificadas, la situación de estos péptidos en la secuencia aminoacídica de las proteínas y el "score".

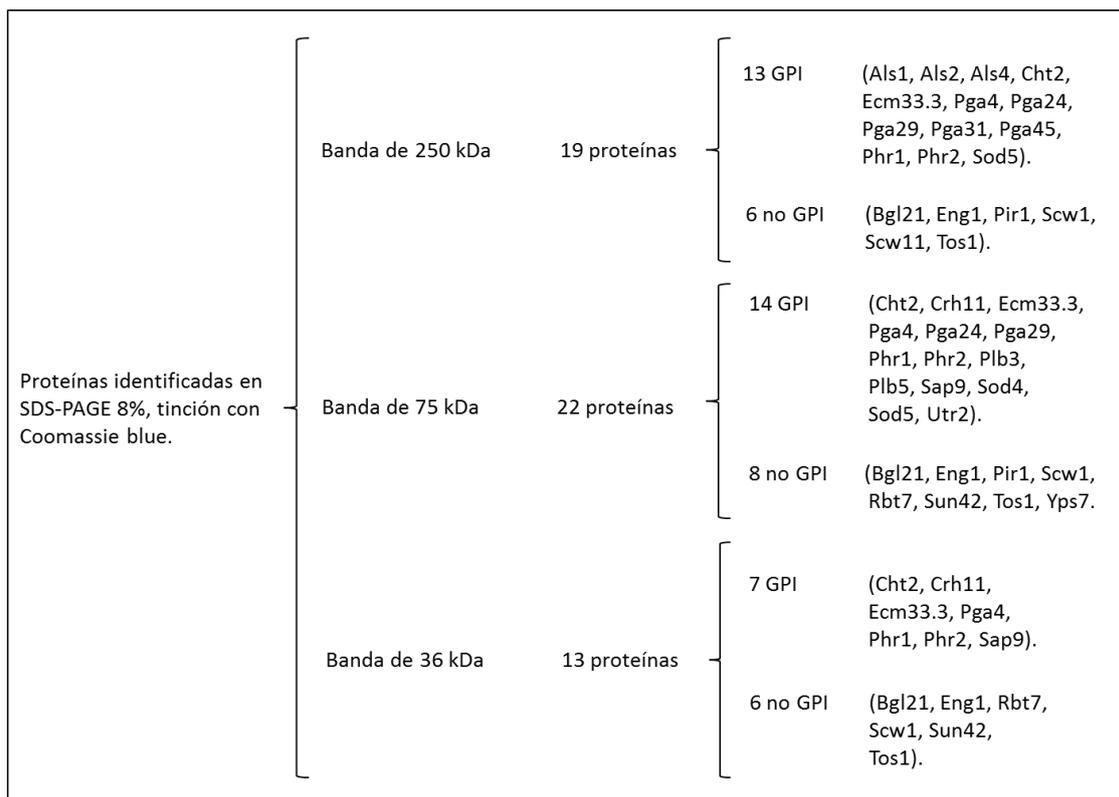
Las proteínas identificadas en la banda de 36 kDa se muestran en la tabla III.7.

## RESULTADOS

Proteína	Descripción	Secuencia	Residuos	"Score"
Bgl21	1,3-beta-glucosyltransferase	DVSTFEGDLDFLK EALQNYLPK IFLVGSEALYR	37-49 97-105 113-123	144
Cht2	Chitinase 2	TVLLSLGGGVGDYGFSDVASATK FADTLWNK FGAGEDPERPFDDAVVDGDFDIEHGGATGYPELATALR LFVGVPTSNIAGYVDTSK LSSAIEEIK GENFVVQVK	99-121 122-129 130-168 240-258 259-267 291-299	509
Crh11	Transglycosylase	DYHTYVIDWTK	159-169	25
Ecm33.3	Protein involved in cell wall	VFNVNNDNIDTIDSGLQEVTDITIDISYNAEK VELAELTSIGNSLTINK NDDLTELDFPK TIGGALQISDNSELR VSGGFILK	185-202 246-262 263-273 276-290 322-329	937
Eng1	Endo-1,3-beta-glucanase	DLSLETS DALLSNVLK LEVEDFYNLK DQLELLASAANK	601-616 642-651 785-796	291
Pga4	$\beta$ -1,3-glucanosyltransferase	VEGNAFWDESESGDR YFQELGINTIR AGIYVILDVNTPHSSITR TIPVGYSAAVDEYR GDSVTTNDDFDNLK TKNPSGDDGGYK	24-37 69-79 99-116 184-198 302-315 321-332	914
Phr1	$\beta$ -1,3-glucanosyltransferase	IFSDAGIYIVADLSEPTVSIINR NNPEWNL DLYK SNTDASAFVK QIPVGYSSNDDEEIR STFETSGYK LFQEIGTLYSDK	114-135 136-146 175-184 201-215 245-253 280-291	763
Phr2	$\beta$ -1,3-glucanosyltransferase	DIPYLEAVDTNVIR DDPSWDLDLDFER SNTDASAFVK SIPVGY SANDSAIR ASGYESATNDYK	75-88 126-137 165-174 191-205 239-250	544
Rbt7	Unknown function	LSQVQEALQK	263-272	28
Sap9	Secreted aspartyl protease	SLSLYLNTADAK YQGDLVTVK TYSQISYPVR	294-306 320-328 332-341	121
Scw1	Glucosidase	SESQIASEIAQLSGFDVIR NVLITETGWPSR SNQQAIISSIK	142-160 311-322 334-344	445
Sun42	Protein involved in cell wall	TDYPGSENMNIPTLLSAGGK	233-252	76
Tos1	Unknown function	SGEYIIFSGSK	288-299	54

**Tabla III.7. Proteínas identificadas en la banda de 36 kDa.** Se detalla la descripción, los péptidos correspondientes a las proteínas identificadas, la situación de estos péptidos en la secuencia aminoacídica de las proteínas y el "score".

A la vista de los resultados, la distribución fue la siguiente: diecinueve proteínas fueron identificadas en la banda de 250 kDa, veintidós proteínas en la banda de 75 kDa y trece proteínas en la banda de 36 kDa. Se identificaron un total de cincuenta y cuatro proteínas en las tres bandas, siendo veintiocho proteínas distintas las que se identificaron en la electroforesis en gel de poliacrilamida al 8%. Una clasificación más detallada se puede observar en la figura III.1.



**Figura III.1. Proteínas identificadas en bandas de electroforesis, obtenidas mediante SDS-PAGE del material solubilizado de paredes celulares por  $\beta$ -ME y NaOH.**

Con respecto a las proteínas no GPI, en las tres bandas se identificaron de nuevo proteínas que habían aparecido en experimentos anteriores como en el caso de Scw1, Scw11, Bgl21, Eng1, Pir1, Tos1 y Sun42. Se identificó en las bandas de 75 y 36 kDa la proteína Rbt7 y por primera vez en la banda de 75 kDa con un único péptido la proteína Yps7. Respecto a esta proteína, se ha demostrado en un análisis cuantitativo del mutante *yps7* de *P. pastoris*, un menor contenido en quitina, aumentando considerablemente la cantidad de  $\beta$ -1,3-glucano y por tanto una mayor resistencia a agentes desestabilizantes de la pared celular como el congo rojo, blanco de calcoflúor y dodecil sulfato sódico (Guan *et al.*, 2012).

Proteínas como Bgl21, Cht2, Ecm33.3, Eng1, Pga4, Phr1, Phr2, Scw1 y Tos1 fueron identificadas en las tres bandas, lo cual sugirió que la sensibilidad del espectrómetro de masas es tan alta que permite la identificación de péptidos correspondientes a proteínas en bandas del gel donde se encuentran en una proporción minoritaria. Un ejemplo podría ser el caso de la proteína Eng1 teniendo un peso teórico de 124 kDa y diez sitios teóricos de N-glicosilación, y sin embargo fue identificada con tres péptidos en la banda de 36 kDa.

### III.A.1.6. Identificación de proteínas en el material solubilizado por $\beta$ -ME y NaOH desglicosilado químicamente con TFMS.

En este experimento, se pretendió averiguar si existían diferencias significativas en la identificación de proteínas en el material solubilizado por  $\beta$ -ME y NaOH pero con la particularidad de que en este caso las proteínas no presentarían parte azucarada. Para la realización de tal experimento, se partió de 100 mg de proteína total del material solubilizado por  $\beta$ -ME y NaOH de paredes celulares. Se desglicosiló químicamente con TFMS y anisole manteniendo la mezcla en un baño de hielo durante 5 horas (Castillo *et al.*, 2008). Finalmente se neutralizó la mezcla con N-etilmorfolina y se preparó la liofilización y posterior identificación de proteínas por espectrometría de masas. El resultado de la identificación de proteínas en el material solubilizado por  $\beta$ -ME y NaOH desglicosilado químicamente con TFMS se detalla en la tabla III.8.

Proteína	Descripción	Secuencia	Residuos	"Score"
Als2	Agglutinin like-protein	TNEDASGYFIASR	176-188	253
Als4	Agglutinin like-protein	FITDQTSIDLVDGR	77-91	497
Blg21	1,3-beta-glucosyltransferase	IFLVGSEALYR	113-123	115
Ecm33.3	Protein involved in cell wall	TIGGALQISDNSELR	276-290	181
Eng1	Endo-1,3-beta-glucanase	QSESLQPTQSSK	76-87	448
		AIDTNAPPTVFAR	431-443	
		DLSLETSDALLSNVLK	601-616	
		DQLELLASAANK	785-796	
		LNQALFDPK	1101-1109	
Pga4	$\beta$ -1,3-glucanosyltransferase	YFQELGINTIR	69-79	244
		TIPVGYSAASVDEYR	184-198	
Pga24	Unknown function	TTAVTTHGSTFETVAYITVTK	395-415	129
		GGEQHQPGSPAGAATSAPGAPAGASGAHASTANK	421-455	
		TTISQTTVAK	488-497	
Pga38	Unknown function	SNPSNPSSSPIVEK	413-426	108
Pga54	Unknown function	AAVSTNDVSENAK	186-198	70
Pga62	Protein involved in cell wall	TTAAESSPAQETTPK	158-172	142
Phr2	$\beta$ -1,3-glucanosyltransferase	DIPYLEAVDTNVIR	75-88	721
		DDPSWDLDLFER	126-137	
		SIPVGYSANDDSAIR	191-205	
		ASGYESATNDYK	239-250	
Pir1	Structural protein	EATPVAQITDGQVQHQTGGVSAIK	77-101	613
		QISDGQIQHQTTVQPVAQISDGQIQHQHTAK	102-131	
		ASATPVQQIGDGQIQHQTTAAAATTASAVK	169-198	
		QINDGQIQHQTTAENVAK	199-217	
Sun42	Protein involved in cell wall	TDYPGSENMNIPTLLSAGGK	233-252	153
		TYLSLIPNPNK	314-325	
Tos1	Unknown function	SGEEYIIFSGSK	288-299	68

**Tabla III.8. Proteínas identificadas en el material solubilizado por  $\beta$ -ME y NaOH desglicosilado químicamente con TFMS.** Se detalla la descripción, los péptidos correspondientes a las proteínas identificadas, la situación de estos péptidos en la secuencia aminoacídica de las proteínas y el "score".

Las proteínas que se identificaron en los apartados III.A.1.3. y III.A.1.4 fueron veinticuatro, casi el doble, en comparación con las que fueron identificadas en este experimento siendo un total de catorce proteínas.

Además del menor número de proteínas identificadas en este experimento en comparación con los anteriores (Figura III.2) se identificaron por primera vez con un único péptido en este experimento las proteínas GPI Pga38, Pga54 y Pga62. Estas tres proteínas pertenecen a la misma familia y de Pga62 aunque no se conoce demasiado su función, se ha demostrado que el doble mutante *pga59/pga62*, no presenta cambios en la morfogénesis de las hifas ni tampoco la disrupción de estas proteínas se ha visto ligada a cambios en la formación de biopelículas, sin embargo, se observó una alta sensibilidad a blanco de calcoflúor, rojo congo y nikomicina (Moreno-Ruiz, *et al.*, 2009), lo que sugiere que *pga62* contribuye a la estabilidad y estructura de la pared celular.

β-ME (21 proteínas)	16 GPI	Als1, Als2, Als4, Crh11, Ecm33.3, Pga4, Pga24, Pga29, Pga52, Phr1, Phr2, Plb3, Plb5, Sap9, Sod4, Utr2.
	5 no GPI	Eng1, Gca1, Scw1, Scw11, Tos1..
NaOH (12 proteínas)	8 GPI	Als2, Als4, Cht2, Ecm33.3, Pga4, Phr1, Phr2, Sod4.
	4 no GPI	Bgl21, Eng1, Pir1, Scw1.
β-ME + NaOH desglucosilado (14 proteínas)	9 GPI	Als2, Als4, Ecm33.3, Pga4, Pga24, Pga38, Pga54, Pga62, Phr2.
	5 no GPI	Bgl21, Eng1, Pir1, Sun42, Tos1.

**Figura III.2. Proteínas identificadas en el material solubilizado por β-ME y NaOH desglucosilado químicamente con TFMS en comparación con las proteínas identificadas en el material sin desglucosilar.**

Las proteínas Crh11, Phr1, Plb3, Plb5, Sap9 y Sod4 entre otras, que previamente se habían identificado en los extractos de β-ME y NaOH con uno o dos péptidos; sin embargo, en el material desglucosilado no se identificaron.

A la vista de todos los resultados obtenidos correspondientes a los experimentos realizados en el apartado III.A.1, se identificaron un total de treinta y tres proteínas de pared celular, de las cuales veintitrés son proteínas ancladas a la pared por un residuo GPI. Es significativo el hecho de que la mayor parte de proteínas identificadas sean GPI, porque en ninguno de los experimentos se ha utilizado HF-piridina responsable de la liberación de dichas proteínas de la pared celular. Por tanto, esto podría significar que estas proteínas pueden encontrarse retenidas en la pared mediante puentes disulfuro establecidos con proteínas que estén directamente unidas al 1,3- $\beta$ -glucano como es el caso de las proteínas Pir o unidas covalentemente con otras proteínas.

En cuanto a las proteínas GPI, se identificaron varias proteínas de la familia Als (Als1, Als2, Als4); la quitinasa Cht2; Crh11; Ecm33.3; 9 proteínas de la familia Pga (Pga4, Pga24, Pga29, Pga31, Pga38, Pga45, Pga52, Pga54 y Pga62); Phr1 y Phr2; 2 fosfolipasas (Plb3 y Plb5), la aspartil proteinasa Sap9, 2 proteínas superóxido dismutasas (Sod4, Sod5) y Utr2.

Las proteínas de la familia Als son codificadas por un grupo de ocho genes, de los cuales solamente han sido disruptados *ALS1* (Fu *et al.*, 2002), *ALS3* (Zhao *et al.*, 2004), *ALS4* (Zhao *et al.*, 2005) y *ALS7* (Nobile *et al.*, 2003). El mutante nulo *als4* presentó la misma virulencia que la cepa parental, del mutante nulo *als7* no se conoce su comportamiento fenotípico y de los mutantes nulos *als1* y *als3* se demostró que presentaban disminución en la adhesión tanto a células epiteliales como endoteliales en un estudio *in vitro* (Zhao *et al.*, 2004). De hecho, el mutante nulo *als1* demostró menor virulencia en modelo murino y disminución de la adhesión en lenguas de ratones (Alberti-Seguí *et al.*, 2004; Kamai *et al.*, 2002). Estos datos corroboran que en cierta medida una parte de la función de las proteínas de la familia Als se basa en la adhesión célula-célula. Respecto a su localización, se han desarrollado anticuerpos monoclonales específicos para cada proteína Als, observándose colocalización de Als1 y Als4 en células de levadura y de Als1, Als3 y Als4 en tubos germinales (Coleman *et al.*, 2012).

Cht2 pertenece a la familia de las glicosil hidrolasas y se encuentra implicada en el proceso de separación celular madre-hija después de la citokinesis (Dunkler *et al.*, 2005). Crh11 y Utr2 presentan ambas función transglicosidasa y la disrupción de los genes que codifican estas proteínas ha ocasionado en mutantes una

mayor sensibilidad a compuestos que interfieren en la formación de la pared celular normal (blanco de calcoflúor, rojo congo, y altas concentraciones de calcio) (Pardini *et al.*, 2006). Ecm33.3 es otra proteína implicada en la remodelación de la pared celular, debido a que el mutante nulo presenta diferencias en la filamentación y floculación con respecto a la cepa parental (Martínez-López *et al.*, 2006).

Las proteínas de la familia Pga, la mayor parte son de función desconocida, a excepción de Pga4 que presenta actividad 1,3-beta-glucanosiltransferasa y es homóloga a Gas1 de *S. cerevisiae*; Pga31 (Gelís, S. Tesis Doctoral) al igual que Pga62 (Moreno-Ruiz *et al.*, 2009) su ausencia provoca en mutantes una alta sensibilidad a blanco de calcoflúor y rojo congo, de manera que ambas proteínas están relacionadas con la biogénesis o remodelación de la pared celular. Sin embargo, Pga24 es otra proteína de la misma familia de la cual solo se conoce su localización en la superficie celular de levaduras al final del crecimiento exponencial y no ha sido observada ni en hifas ni pseudohifas (Granger *et al.*, 2005).

Phr1 y Phr2 son proteínas con actividad glicosidasa, necesaria para la unión del  $\beta$ -1,3- y  $\beta$ -1,6-glucano. Se encuentran implicadas en el procesamiento del  $\beta$ -1,3-glucano facilitando sitios de unión al  $\beta$ -1,6-glucano. Además, mutantes nulos *phr1* y *phr2* mostraron una disminución en la adhesión e incapacidad de invasión del epitelio humano. Por tanto, Phr1 y Phr2 son de importancia fundamental en el mantenimiento del estado morfológico en el que las propiedades adhesivas e invasivas dependen en gran medida (Calderon *et al.*, 2010).

Plb3 y Plb5 presentan actividad fosfolipasa y pertenecen a una familia de cinco miembros, y mutantes *Plb5* demostraron una disminución en la colonización de órganos realizado en un estudio *in vivo* (Theiss *et al.*, 2006)

Sap9, es una proteasa con un papel importante en la adhesión. Pertenece a una familia de proteínas codificada por diez genes, existiendo semejanzas entre ellas, tal es el caso de Sap1 y Sap3 o Sap4 y Sap6 con 67% y 89% de similitud. Existen diferencias entre las proteínas Sap respecto al pH, pues *Candida* es un comensal en la vagina con un pH ácido y en la cavidad oral con un pH neutro. Así por ejemplo, Sap1-3 tienen su mayor actividad a valores bajos de pH (3 a 5), mientras que Sap4-6 prefieren valores de pH altos (5 a 7) (Smolenski *et al.*, 1997). Además en el año 2009, Hornbach *et al.*,

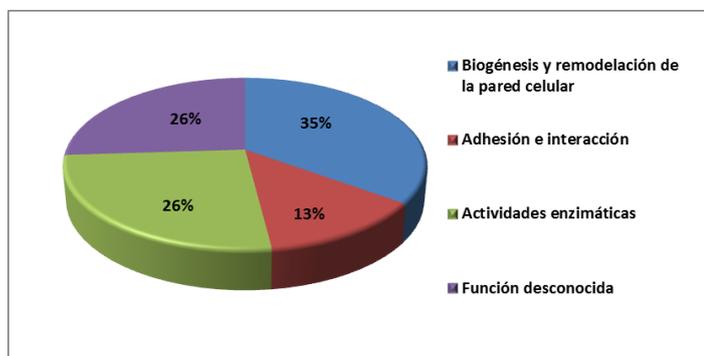
demonstraron que Sap9 presentaba un papel importante en la iniciación de la inmunidad innata protectora, ya que induce la quimiotaxis en neutrófilos

Sod4 y Sod5 pertenecen a la familia de las superóxido dismutasas que se encuentran implicadas en la virulencia. Sod4 se localiza tanto en la forma levaduriforme como de micelio de *C. albicans* y está implicada en la destrucción de especies reactivas del oxígeno (ROS) sintetizadas por células de mamíferos para defensa frente a este patógeno oportunista (Frohner *et al.*, 2009). Mutantes nulos *Sod5* son más sensibles a neutrófilos (Fradin *et al.*, 2005) lo cual sugiere el importante papel de los neutrófilos en la prevención de candidiasis, así como la posible elección del estrés oxidativo en un tratamiento de candidiasis.

Según la clasificación propuesta por Richard y Plaine (2007) sobre las proteínas GPI, podemos clasificar las proteínas GPI identificadas en el apartado III.A.1 en las siguientes categorías:

- Proteínas de función desconocida: Pga24, Pga29, Pga38, Pga45, Pga52 y Pga54.
- Proteínas con función relacionada con la biogénesis o remodelación de la pared celular: Cht2, Ecm33.3, Pga4, Pga31, Pga62, Phr1, Phr2 y Utr2.
- Proteínas relacionadas con la adhesión célula a célula y otras interacciones: Als1, Als2 y Als4.
- Proteínas con actividades enzimáticas diferentes: Crh11, Plb3, Plb5, Sod4, Sod5 y Sap9.

La distribución en porcentaje según la función de las proteínas GPI identificadas se muestra en la figura III.3.



**Figura III.3.** Distribución en porcentaje según su función de las proteínas GPI identificadas en los experimentos correspondientes al apartado III.A.1.

Las proteínas con función relacionada con la biogénesis o remodelación de la pared celular son las mayoritarias, seguida de las proteínas con actividad enzimática y con función desconocida. Finalmente se encuentran aquellas proteínas implicadas en la adhesión de la célula-hospedador.

Más de trescientas proteínas denominadas “atípicas” fueron identificadas también en los experimentos. Estas proteínas carecen de péptido señal, son de origen citosólico y participan en diversas rutas metabólicas de la célula. En la tabla III.9 se muestra la clasificación según su función de algunas de las proteínas “atípicas” identificadas.

Proteína	Descripción
<b>METABOLISMO Y ENERGÍA</b>	
Gap1	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase
Eno1	Enolase I
Cdc19	Pyruvate kinase
Pgk1	Phosphoglycerate kinase
Pot14	Acetyl-CoA acetyltransferase
Gpm1	Phosphoglycerate mutase
Lab2	Lipoate biosynthesis
Pgi1	Glucose-6-phosphate isomerise
Pdc11	Pyruvate decarboxylase
Acs2	Acetyl-CoA-synthetase
Adh1	Alcohol dehydrogenase
Pet9	ADP/ATP carrier protein
<b>SÍNTESIS DE PROTEÍNAS</b>	
Ubi4	Polyubiquitin
Rpl2.3	Ribosomal protein
Rpl3	Ribosomal protein
Rpl20b	Ribosomal protein
Rps13.3	Ribosomal protein
Rpl12	Ribosomal protein
Rps19a.3	Ribosomal protein
<b>RESPUESTA A ESTRÉS</b>	
Ssb1	Heat shock protein
Hsp104	Heat shock protein
<b>FACTOR DE ELONGACION</b>	
Tef1	Translation elongation factor
Eft2	Translation elongation factor
<b>TRANSPORTE</b>	
Hxt5.5f	Sugar transporter
Pma1	Plasma membrane H <sup>+</sup> transporting ATPase1
Por1	Mitochondrial outer membrane porin
Shm2	Serine hydroxymethyltransferase precursor
Cyb5	Cytochrome b5
<b>OTRAS FUNCIONES</b>	
Rpb140	DNA-dependent RNA polymerase II
Pdr13	Drug resistance
Act1	Actin
Sah1	S-adenosyl-L-homocysteine hydrolase
TK1	Transketolase
Nup188	Nucleoporin
Rad57	DNA-repair like protein
Mak10.3	Glucose-repressible protein

Tabla III.9. Clasificación según su función de las proteínas “atípicas” identificadas.

### III.A.2. IDENTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS EN PAREDES CELULARES DE MUTANTES: *pga13*; *pga26*; *pga31*; *pir1/PIR1*; *pmt1/pmt6*.

Para poder comprender mejor la función de las proteínas así como su localización en la pared celular, decidimos identificar las proteínas presentes en las paredes de mutantes sometidos a estrés biológico. Para ello, se eligieron mutantes nulos con lo que previamente en nuestro laboratorio se había realizado la disrupción en algún gen que codificaba alguna proteína de pared, a excepción del mutante nulo *pmt1/pmt6* que resultaba interesante por presentar alteraciones en glicosilación y fue cedido por el laboratorio de Microbiología del Dr. Ernst en Düsseldorf, Alemania.

De cada una de los mutantes se obtuvieron paredes celulares y se trataron con SDS 2% durante 2 h para eliminar todos aquellos posibles contaminantes. Las paredes se liofilizaron y se realizó la identificación de proteínas.

#### III.A.2.1. Identificación de proteínas en paredes celulares del mutante *pga13*.

El resultado de la identificación de proteínas en paredes celulares del mutante *pga13* se detalla en la tabla III.10.

Proteína	Descripción	Secuencia	Residuos	"Score"
Ecm33.3	Protein involved in cell wall	TIGGALQISDNSELR	276-290	127,61

**Tabla III.10. Identificación de proteínas en paredes celulares del mutante *pga13*.** Se detalla la descripción, el péptido correspondiente a la proteína identificada, la situación del péptido en la secuencia aminoacídica de la proteína y el "score".

Solamente se identificó la proteína Ecm33.3 con un único péptido y un "score" muy bajo. Una proteína que como se ha citado anteriormente, presenta un papel importante en la remodelación de la pared celular y su ausencia provoca cambios en la morfología de las hifas.

#### III.A.2.2. Identificación de proteínas en paredes celulares del mutante *pga26*.

El resultado de la identificación de proteínas en paredes celulares del mutante *pga26* se detalla en la tabla III.11.

Proteína	Descripción	Secuencia	Residuos	"Score"
Als2	Agglutinin like-protein	LIPSINK	189-195	30
Als4	Agglutinin like-protein	ILLSR	184-188	66
		VSSYAMR	285-291	
Als9	Agglutinin like-protein	IIPSLNK	189-195	30
Bgl21	1,3-beta-Glucosyltransferase	ISVSTIK	106-112	76
Cht2	Chitinase 2	FADTLWNK	122-129	258
		FAKDTSK	171-177	
		FADSAPNK	229-236	
		FADSAPNKNIK	229-239	
		LSSAIEEIK	259-267	
Crh11	Transglycosylase	VEVVLK	94-99	299
		SVLVADYSSGK	236-246	
		QYSYSDQSGSWESIKADGGK	247-266	
Ecm33.3	Protein involved in cell wall	VDVILK	203-208	334
		TIGGALQISDNSELR	276-290	
		SFSGFPK	291-297	
		VSGGFILK	322-329	
Eng1	Endo-1,3-beta-glucanase	AIDTNAPPTVFAR	431-443	43
Pga4	$\beta$ -1,3-glucanosyltransferase	TKNPSGDGGYLK	321-332	50
Pga17	Unknown function	LYELQER	42-48	22
Pga29	Unknown function	SDDSKVDGLGLYSK	26-39	699
		HEGAAIDYLFLGK	40-52	
		TSSITVR	72-78	
		YSESEYAVSNKK	127-138	
		KTDDSAPITIVAK	138-150	
Phr2	$\beta$ -1,3-glucanosyltransferase	TDDSAPITIVAK	139-150	339
		KSNTDASAFVK	164-174	
		SNTDASAFVK	165-174	
Sap9	Secreted aspartyl protease	SKGYR	186-190	230
		YQGDLVTVK	320-328	
		TYSQISYPVR	332-341	
Scw1	Glucosidase	IQVPVSK	342-348	215
		GDSNGVAVPSK	323-333	
		SNQQAASSIK	334-344	

**Tabla III.11. Identificación de proteínas en paredes celulares del mutante *pga26*.** Se detalla la descripción, los péptidos correspondientes a las proteínas identificadas, la situación de estos péptidos en la secuencia aminoacídica de las proteínas y el "score".

Según el resultado obtenido en comparación con las proteínas identificadas en paredes sin estrés (Tabla III.2), se observó menor cantidad de proteínas y menor cantidad de péptidos en la identificación de cada una de ellas, de hecho, la proteína Als9 se identificó por primera vez, con un único péptido. Sin embargo, proteínas como Phr1, Pir1, Sun42 y Utr2 entre otras, no se identificaron.

### III.A.2.3. Identificación de proteínas en paredes celulares del mutante *pga31*.

El resultado de la identificación de proteínas en paredes celulares del mutante *pga31* se detalla en la tabla III.12.

Proteína	Descripción	Secuencia	Residuos	"Score"
Als2	Agglutinin like-protein	AGTNTVTFNDGDKK	153-166	126
Als4	Agglutinin like-protein	FITDQTSIDLVDAGR	77-91	622
		ILLSR	184-188	
Bgl21	1,3-beta-Glucosyltransferase	ISVSTIK	106-112	32
Cht2	Chitinase 2	TVLLSLGGGVGDYGFSDVASATK	99-121	2251
		FADTLWNK	122-129	
		FADSAPNKNIK	229-239	
		LFVGVPTSNIAGYVDTSK	240-258	
Crh11	Transglycosylase	DAVTWSVDGVSIR	170-182	800
		SVLVADYSSGK	236-246	
Ecm33.3	Protein involved in cell wall	TGLTAGITSAESVVISDGLSSLTGINVK	139-168	1400
		VDVILK	203-208	
		TIGGALQISDNSELR	276-290	
		SFSGFPK	291-297	
		VSGGFILK	322-329	
Pga29	Unknown function	SDDSKVDGLGLYSK	26-39	545
		HEGAAIDYLFLGK	40-52	
		QIFQELK	65-71	
		DGTLSTGDDKVYASK	104-119	
		NVNDPYRYSESEYAVSNK	120-137	
		YSESEYAVSNK	127-137	
		KTDDSAPITIVAK	138-150	
		TDDSAPITIVAK	139-150	
Phr2	$\beta$ -1,3-glucanosyltransferase	DIPYLEAVDTNVIR	75-88	230
		KSNTDASAFVK	164-174	
		SNTDASAFVK	165-174	
		SIPVGY SANDDSAIR	191-205	
Scw1	Glucosidase	IFAGIFDVSSITSGIESLAEAVK	182-204	439
		SNQQAASSIK	334-344	
Utr2	1,3-1,4- $\beta$ -glucanase	IQFSLWPGGDSSNAK	254-268	29

**Tabla III.12. Identificación de proteínas en paredes celulares del mutante *pga31*.** Se detalla la descripción, los péptidos correspondientes a las proteínas identificadas, la situación de estos péptidos en la secuencia aminoacídica de las proteínas y el "score".

No se observaron muchas diferencias en el resultado con respecto al anterior mutante, ya que a excepción de alguna proteína, la mayor parte también fueron identificadas en el mutante *pga26*. Además, proteínas como Cht2, Ecm33.3, Pga29 y Phr2 son las que se identificaron con mayor número de péptidos, al igual que en el experimento anterior.

### III.A.2.4. Identificación de proteínas en paredes celulares del mutante *PIR1/pir1*.

El resultado de la identificación de proteínas en paredes celulares del mutante *PIR1/pir1* se detalla en la tabla III.13.

Proteína	Descripción	Secuencia	Residuos	"Score"
Cht2	Chitinase 2	FADTLWNK	122-129	22
Ecm33.3	Protein involved in cell wall	VSGGFILK	322-329	61

**Tabla III.13. Identificación de proteínas en paredes celulares del mutante *PIR1/pir1*.** Se detalla la descripción, los péptidos correspondientes a las proteínas identificadas, la situación de estos péptidos en la secuencia aminoacídica de las proteínas y el "score".

Solamente se identificaron dos proteínas, Cht2 y Ecm33.3. Ambas se identificaron en las paredes de los mutantes *pga26* y *pga31* con un mínimo de cuatro péptidos y en este experimento solo con un péptido cada una y un "score" muy bajo.

### III.A.2.5. Identificación de proteínas en paredes celulares del doble mutante *pmt1/pmt6*.

En este experimento se obtuvieron paredes de la cepa CPP117 en la que se encuentran disrupcionados los genes *PMT1* y *PMT6* que como ya se ha mencionado anteriormente, codifican proteínas manosiltransferasas necesarias en el proceso de O-glicosilación. El resultado de la identificación de proteínas en paredes celulares del doble mutante *pmt1/pmt6* se detalla en la tabla III.14.

Proteína	Descripción	Secuencia	Residuos	"Score"
Cht2	Chitinase 2	TVLLSLGGGVGDYGFSDVASATK	99-121	656
		FADSAPNKNK	229-239	
		LFVGV PATSNIAGYVDTSK	240-258	
		LAISTVTDVQK	404-414	
		IVTTSAQTVGSSTK	511-524	
Ecm33.3	Protein involved in cell wall	ATTINAATLQLVSGVLEFNANTILSDLNLAQLTTVGSFNLNALPALEK	91-138	2173
		TGLTAGITSAESVVISDTGLSSLTGINVFK	139-168	
		LKVFNVNNDNIDTIDISGLQEVTDITDISYNAEKVDVILK	183-223	
		LKTIGGALQJSDNSELR	274-290	
		TIGGALQJSDNSELR	276-290	
		VSGGFILK	322-329	
Pga4	$\beta$ -1,3-glucanosyltransferase	AGIYVILDVNTPHSSITR	99-116	48
		TKNPSGDGGYLYK	321-332	
Pga29	Unknown function	QSFTLGGDVYELGATDNFIPVTINKDGLSFTGDDKVYASK	79-119	302
Pga31	Unknown function	GGDGAIPKLVAK	201-213	38

**Tabla III.14.** Continuación en página siguiente.

## RESULTADOS

Proteína	Descripción	Secuencia	Residuos	"Score"
Phr1	$\beta$ -1,3-glucanosyltransferase	NNPEWNLPLYKR	136-147	70
		SNTDASAFVK	175-184	
Phr2	$\beta$ -1,3-glucanosyltransferase	SNTDASAFVK	165-174	166
		SIPVGYSANDDSAIR	191-205	
Scw1	Glucosidase	IFAGIFDVSSITSGIESLAEAVK	182-204	325
		SNQQAIISSIK	334-344	
Swp1	Glycotransferase	LVEVLPSPEFK	134-144	43

**Tabla III.14. Identificación de proteínas en paredes celulares del doble mutante *pmt1/pmt6*.** Se detalla la descripción, los péptidos correspondientes a las proteínas identificadas, la situación de estos péptidos en la secuencia aminoacídica de las proteínas y el "score".

Se identificó la proteína Swp1 con un único péptido. Swp1 se encuentra implicada en N-glicosilación, formando parte del complejo OST junto con siete subunidades más (Ost1, Ost2, Ost3, Ost4, Ost5, Wbp1 y Stt3) responsable de la transferencia del oligosacárido  $\text{Glc}_3\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$  a un residuo de asparragina (Mora-Montes *et al.*, 2009).

En las paredes celulares de todos los mutantes, se ha identificado un total de 18 proteínas que presentan péptido señal, característica propia de proteínas de pared celular y de todas ellas, catorce son proteínas GPI. De las cuatro proteínas no GPI (Bgl21, Eng1, Scw1 y Swp1), Swp1 fue la única proteína identificada por primera vez, con un único péptido en paredes del doble mutante *pmt1/pmt6*. Proteínas GPI tales como Ecm33.3 y Cht2 prácticamente han aparecido en las paredes de la cepa control y en las paredes de casi todos los mutantes. Sin embargo, Sap9, Swp1 y Utr2, únicamente fueron identificadas cada una de ellas en un único mutante.

A pesar de que los mutantes sobre los que se realizó la identificación de proteínas presentaban un estrés causado por la interrupción de algún gen codificante de proteína de pared, no se encontraron resultados significativos en comparación con las paredes de la cepa control que demostraran algún cambio importante en la pared como por ejemplo podría haber sido: (i) identificación de nuevas proteínas, (ii) proteínas diferentes en cada mutante, etc. De manera que los resultados nos sugerían que la función realizada por una determinada proteína que se encuentra ausente en la pared, podría llegar a ser sustituida por otras que también forman parte de la misma estructura.

### III.A.3. IDENTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS EN PAREDES CELULARES DE LA CEPA SC5314 SOMETIDA A CONDICIONES DE ESTRÉS QUÍMICO Y/O OSMÓTICO.

#### III.A.3.1. Control.

Se realizó de nuevo la identificación de proteínas de paredes celulares de la cepa SC5314 de *C. albicans* crecida en medio YPD hasta alcanzar la fase exponencial tardía, con el propósito de observar si existían diferencias significativas en la identificación de proteínas con respecto a paredes de la misma cepa pero crecida en condiciones de estrés químico y/o osmótico. Para llevar a cabo el experimento, se obtuvieron paredes celulares que fueron tratadas con SDS 2% y finalmente se liofilizaron para poder realizar la identificación de proteínas. El resultado se detalla en la tabla III. 15.

Proteína	Descripción	Secuencia	Residuos	"Score"
Als1	Agglutinin-like protein	STVDPSGLYASR	176-188	235
		GLNDWNYPVSSSEFSYTK	237-254	
		SQSKPFTLR	303-311	
Als2	Agglutinin-like protein	AGTNTVTFNDGDKK	153-166	177
		ISIDVDFEKTNEDASGYFIASR	167-188	
		TNEDASGYFIASR	176-188	
		LIPSINK	189-195	
Als4	Agglutinin-like protein	STVASSDRILLSR	176-188	49
Als9	Agglutinin-like protein	IIPSLNK	189-195	20
Cht2	Chitinase 2	TVLLSLGGGVGDYGFSDVASATK	99-121	5495
		TVLLSLGGGVGDYGFSDVASATKFADTLWNK	99-129	
		FADTLWNK	122-129	
		FGAGEDPERPFDDAVVDGDFDIEHGGATGYPELATALR	130-168	
		FADSAFNKNIK	229-239	
		LFVGV PATSNIAGYVDTSK	240-258	
Crh11	Transglycosylase	FDNGLGPHFESLKK	46-59	1386
		KQGTIDSGSNGLSLTMK	59-75	
		KQGTIDSGSNGLSLTMKK	59-76	
		QGTIDSGSNGLSLTMK	60-75	
		QGTIDSGSNGLSLTMKK	60-76	
		RFDNPSFK	77-84	
		FDNPSFK	78-84	
		SNFYIMFGR	85-93	
		VEVVLKGAEGK	94-104	
		GNTATYDRGGYHDIANPLKDYHTYVIDWTK	140-169	
		GGYHDIANPLKDYHTYVIDWTK	148-169	
		GGYHDIANPLKDYHTYVIDWTKDAVTWSVDGVSIR	148-182	
		DAVTWSVDGVSIR	170-182	
		SVLVADYSSGK	236-246	
		SVLVADYSSGKQYSYSDQSGSWESIK	236-261	
		SVLVADYSSGKQYSYSDQSGSWESIKADGGK	236-266	
QYSYSDQSGSWESIK	247-261			
QYSYSDQSGSWESIKADGGK	247-266			
QYSYSDQSGSWESIKADGGKVNGR	247-270			
Ecm33.1	Protein involved in cell wall	SVGNMQIFAHDELTK	247-262	95

Tabla III.15. Continuación en página siguiente.

## RESULTADOS

Proteína	Descripción	Secuencia	Residuos	"Score"
Ecm33.3	Protein involved in cell wall	ATTINAATLQLVSGVLEFNANTILSDLNLAQLTTVGSFNLNALPALEK	91-138	6949
		TGLTAGITSAESVVISDTGLSSLTGIVFK	139-168	
		LKVFVNNNDNIDTIDISGLQEVTDIDISYNAEKVDVILK	183-223	
		VFNVNNNDNIDTIDISGLQEVTDIDISYNAEK	185-216	
		VFNVNNNDNIDTIDISGLQEVTDIDISYNAEKVDVILK	185-223	
		VDVILKQLSSAK	203-214	
		NDDLTELDFPKLK	263-275	
		LKTIGGALQISDNSELR	274-290	
		LKTIGGALQISDNSELSFSGFPK	274-297	
		TIGGALQISDNSELR	276-290	
		TIGGALQISDNSELSFSGFPK	276-297	
		RVSGGFILK	321-329	
		VSGGFILK	322-329	
		VSGGFILKTDGK	322-333	
		Eng1	Endo-1,3-beta-glucanase	
LNQALFDPK	1101-1109			
Pga4	$\beta$ -1,3-glucanosyltransferase	VEGNAFWDSSESGDRFYIR	24-41	2058
		DVKYFQELGINTIR	66-79	
		YFQELGINTIR	69-79	
		AGIYILDVNTPHSSITR	99-116	
		DMKTFIK	172-178	
		TIPVGYSAAVDEYR	184-198	
		TKNPSGDDGYLK	321-332	
Pga29	Unknown function	SDDSKVDGLGLYSK	26-39	2657
		SDDSKVDGLGLYSKHEGAAIDYFLGK	26-52	
		HEGAAIDYFLGK	40-52	
		YDDEKKQIFQELK	59-71	
		QIFQELK	65-71	
		QIFQELKTSSITVR	65-78	
		QSFTLGGDVYELGATDNFIPVTINK	79-103	
		QSFTLGGDVYELGATDNFIPVTINKDGTLSFTGDDKVYASK	79-119	
		DGTLSFTGDDKVYASK	104-119	
		NVNDPYRYSESEYAVSNK	120-137	
		NVNDPYRYSESEYAVSNKK	120-138	
		YSESEYAVSNK	127-137	
		YSESEYAVSNKTTDDSAPIVAK	127-150	
		KTDDSAPIVAK	138-150	
TDDSAPIVAK	139-150			
Phr2	$\beta$ -1,3-glucanosyltransferase	DIPYLEAVDTNVIR	75-88	614
		KSNTDASAFVK	164-174	
		SNTDASAFVK	165-174	
		AAIRDTKAYIK	175-185	
		SIPVGYSANDDSAIR	191-205	
		ASGYESATNDYK	239-250	
Pir1	Structural protein	WGAIVANHQQFQDGPPIQAGTIYSAGWSIK	272-301	149
Sap9	Secreted aspartyl protease	DGSLDMLTNK	51-61	354
		IGSNEDENRVLVDTGSSDLVVMSHDLK	71-97	
		LKADGIIAK	285-293	
		SLYSLYLNTADAK	294-306	
		SLYSLYLNTADAKAGSILFGAIDHAK	294-319	
		AGSILFGAIDHAK	307-319	
		YQGDVTVK	320-328	
		TYSQISYPVR	332-341	
		TIKVPISDLVLQASK	424-438	
		VPISDLVLQASK	427-438	
Scw1	Glucosidase	SESQIASEIAQLSGFDVIR	142-160	981
		AKTSSQKIFAGIFDVSSITSGIESLAEAVK	175-204	
		IFAGIFDVSSITSGIESLAEAVK	182-204	
		NVLITETGWPSRGDSNGVAVPSK	311-333	
		NVLITETGWPSRGDSNGVAVPSKSNQQAIISSIK	311-344	
		SNQQAIISSIK	334-344	
		ADGPYNAEKYWGIIYSN	363-378	

**Tabla III.15.** Continuación en página siguiente.

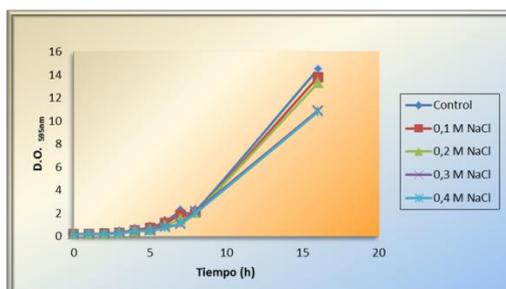
Proteína	Descripción	Secuencia	Residuos	"Score"
Sod4	Superoxide dismutase	TPAALELGDLSGR	105-117	89
Tos1	Unknown function	FGNSLSYANADNSGGSSTPVPLEETIK	260-287	280
		SGEEYIIFSGSK	288-299	
		IFVFEFEMPSTDNGNGYNQDMPAVWLLNAK	325-354	
Utr2	1,3-1,4-β-glucanase	MSTFQESFDSKDKVK	75-89	493
		YLWYGK	137-142	
		IQFSLWPGGDSSNAK	254-268	
		GTIEWAGGLINWDEDIKK	269-287	
		YGYYYAHIK	288-296	
Yps3	Putative aspartic-type endopeptidase	SSVSDGILGIGIANGYDNFPVLLQK	170-194	90
Yps7	Putative aspartic-type endopeptidase	YVGNFYQFDMIPHTGFR	342-359	161
		SNDDQIPVLLDSR	399-411	
		VVPSSVTGYNMLGLPFLK	494-511	

**Tabla III.15. Identificación de proteínas en paredes celulares de la cepa SC5314 de *C. albicans* crecida en medio YPD en fase exponencial tardía.** Se detalla la descripción, los péptidos correspondientes a las proteínas identificadas, la situación de estos péptidos en la secuencia aminoacídica de las proteínas y el “score”.

Se identificaron veinte proteínas en el control siendo cinco las proteínas no GPI. Por primera vez se identificaron, Yps3 e Yps7, dos proteínas con actividad aspártico proteasa de las cuales se conoce que en *P. pastoris*, estas proteínas se encuentran codificadas por una familia de cinco genes *YPS1*, *YPS2*, *YPS3*, *YPS7* y *MKC7* (Guan *et al.*, 2012)

### III.A.3.2. Sensibilidad a NaCl.

Para determinar la sensibilidad de la cepa SC5314 de *C. albicans* a un agente osmótico como el NaCl, se preparó medio YPD que contenía NaCl a concentraciones de 0,1, 0,2, 0,3 y 0,4 M creándose un medio hipertónico iónico. Se observó que la concentración 0,4 M resultaba ser la más idónea ya que el crecimiento se veía afectado sin perder la viabilidad (Figura III.4). Posteriormente, se obtuvieron paredes celulares de la cepa crecida en medio YPD con 0,4 M de NaCl, se trataron con SDS 2% y se liofilizaron.



**Figura III.4. Sensibilidad a NaCl.** Cultivos de la cepa SC5314 de *C. albicans* crecieron en presencia de NaCl a concentraciones de 0, 0,1, 0,2, 0,3 y 0,4 M.

## RESULTADOS

El resultado de la identificación de proteínas en paredes celulares de la cepa SC5314 crecida en medio YPD con 0.4 M de NaCl se detalla en la tabla III.16.

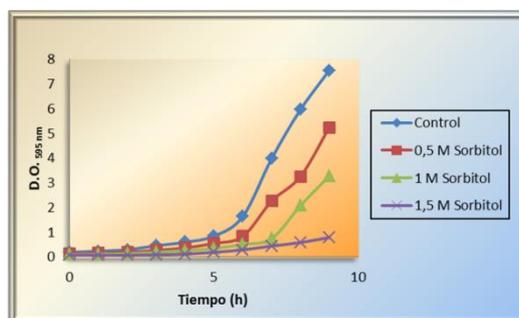
Proteína	Descripción	Secuencia	Residuos	"Score"
Als1	Agglutinin-like protein	STVDPSGYLYASR	176-188	124
		GLNDWNYPVSSSEFSYTK	237-254	
Bgl21	1,3-beta-Glucosyltransferase	IFLVGSEALYREDLTASELASK	113-134	142
Cht2	Chitinase 2	TVLLSLGGGVGDYGFSDVASATK	99-121	1762
		FADSAPNKNIK	229-239	
		LFVGVPTSNIAGYVDTSK	240-258	
Ecm33.3	Protein involved in cell wall	ATTINAATLQLVSGVLEFNANTILSDLNLAQLTTVGSFNLNPALEK	91-138	5952
		TGLTAGITSAESVVISDTGLSSLTGINVK	139-168	
		LKVFVNNDNDNIDTIDSLQEVTDIDISYNAEKVDVILK	169-208	
		VFNVNNDNDNIDTIDSLQEVTDIDISYNAEKVDVILK	171-208	
		LKTIGGALQJSDNSELR	274-290	
		TIGGALQJSDNSELR	276-290	
		TIGGALQJSDNSELRSFSGFPK	276-297	
		RVSGGFILK	321-329	
Pga4	$\beta$ -1,3-glucanosyltransferase	DVKYFQELGINTIR	66-79	646
		YFQELGINTIR	69-79	
		AGIYVILDVNTPHSSITR	99-116	
		DMKTFIK	172-178	
		TKNPSGDGGYLYK	321-332	
Pga29	Unknown function	SDDSKVDGLGLYSK	26-39	1174
		SDDSKVDGLGLYSKHGAAIDYFLGK	26-52	
		HEGAAIDYFLGK	40-52	
		QSFTLGGDVYELGATDNFIPVTINKDGLSFTGDDKVYASK	79-119	
		NVNDPYRYSESEYAVSNKK	120-138	
		YSESEYAVSNKK	127-138	
		YSESEYAVSNKKTDDSAPIVAK	127-150	
		KTDDSAPIVAK	138-150	
TDDSAPIVAK	139-150			
Phr1	$\beta$ -1,3-glucanosyltransferase	YFKESNTNLR	88-98	186
		NNPEWNLIDLYKR	136-147	
		SNTDASAFVK	175-184	
Phr2	$\beta$ -1,3-glucanosyltransferase	DIPYLEAVDTNVIR	75-88	533
		KSNTDASAFVK	164-174	
		SNTDASAFVK	165-174	
		SIPVGYSAINDSAIR	191-205	
Sap9	Secreted aspartyl protease	DGSLDMTLTNK	51-61	371
		QTFYMATLK	62-70	
		LKADGHIK	285-293	
		SLYSLYLNTADAK	294-306	
		AGSILFGAIDHAK	307-319	
		YQGDLVTVK	320-328	
		TYSQISYPVR	332-341	
		VPISDLVLQASK	427-438	
Scw1	Glucosidase	IFAGIFDVSSITSGIESLAEAVK	182-204	402
		SNQQAASSIK	334-344	
		ADGPYNAEKYWGIYSN	363-378	
Sod4	Superoxide dismutase	TPAALELGDLGR	105-117	75
Tos1	Unknown function	FGNSLSYANADNSGGSSTPVLEETIK	260-287	51
		SGEEYIIFSGSK	288-299	
Utr2	1,3-1,4- $\beta$ -glucanase	IQFSLWPGGDSSNAK	254-268	55
		GTIEWAGGLINWDSEDIKK	269-287	

**Tabla III.16. Identificación de proteínas en paredes celulares de la cepa SC5314 de *C. albicans* crecida en medio YPD con NaCl 0.4 M.** Se detalla la descripción, los péptidos correspondientes a las proteínas identificadas, la situación de estos péptidos en la secuencia aminoacídica de las proteínas y el "score".

Se identificaron trece proteínas de las que tres no eran GPI. Ecm33.3, Pga4, Pga29, Phr2 y Sap9 fueron identificadas con tres péptidos como mínimo al igual que en las paredes del control. Prácticamente no hubo diferencias significativas del control con respecto a la cepa crecida en medio hipertónico iónico.

### III.A.3.3. Sensibilidad a sorbitol.

Para este experimento, la células crecieron en medio YPD que contenía concentraciones de 0.5, 1 y 1.5 M de sorbitol, creándose un medio de crecimiento hipertónico no iónico. En estas condiciones, se observó que la concentración 1 M de sorbitol era idónea para disminuir el crecimiento respecto al control manteniendo la viabilidad de la célula (Figura III.5). De manera, que las células crecieron en esta condición y después se obtuvieron las paredes tratándose de manera exhaustiva con SDS 2%. Con las paredes una vez liofilizadas se realizó la identificación de proteínas.



**Figura III.5. Sensibilidad a sorbitol.** Cultivos de la cepa SC5314 de *C. albicans* crecieron en presencia de sorbitol a concentraciones de 0, 0.5, 1 y 1.5 M.

El resultado de la identificación de proteínas en paredes celulares de la cepa SC5314 crecida en medio YPD con 1 M de sorbitol se detalla en la tabla III.17.

Proteína	Descripción	Secuencia	Residuos	"Score"
Als1	Agglutinin-like protein	GLNDWNYPVSSSEFSYTK	237-254	92
		SQSKPFTLR	303-311	
Als2	Agglutinin-like protein	TNEDASGYFIASR	176-188	63
		LIPSINK	189-195	
Als3	Agglutinin-like protein	ISINVDFER	167-175	98
		GLNDWNYPVSSSEFSYTK	237-254	
Als4	Agglutinin-like protein	STVASSDRILLSR	176-188	41
Bgl21	1,3-beta-Glucosyltransferase	IFLVGSEALYREDLTASELASK	113-134	92
		INDIKDLVK	135-143	
Cht2	Chitinase 2	TVLLSLGGVGDYGFSDVASATK	99-121	2583
		FADTLWNK	122-129	
		FGAGEDPERPFDDAVVDGFDIEHGGATGYPELATALR	130-168	
		FADSAPNKNIK	229-239	
		LFVGV PATSNIAGVDTSK	240-258	

**Tabla III.17.** Continuación en página siguiente.

## RESULTADOS

Proteína	Descripción	Secuencia	Residuos	"Score"
Crh11	Transglycosylase	FDNGLGPHFESLKK	46-59	1063
		KQGTIDSGSNGLSLTMK	59-75	
		QGTIDSGSNGLSLTMK	60-75	
		QGTIDSGSNGLSLTMKK	60-76	
		RFDNPSFK	77-84	
		SNFYIMFGR	85-93	
		VEVVLKGAEGK	94-104	
		GNTATYDRGGYHDIANPLKDYHTYVIDWTK	140-169	
		GGYHDIANPLKDYHTYVIDWTK	148-169	
		GGYHDIANPLKDYHTYVIDWTKDAVTWSVDGSVIR	148-182	
		DAVTWSVDGSVIR	170-182	
		SVLVADYSSGK	236-246	
		SVLVADYSSGKQYSYSDQSGSWESIK	236-261	
		SVLVADYSSGKQYSYSDQSGSWESIKADGGK	236-266	
		QYSYSDQSGSWESIK	247-261	
		QYSYSDQSGSWESIKADGGK	247-266	
Ecm33.1	Protein involved in cell wall	SVGNMQIFAHDELTK	247-262	69
Ecm33.3	Protein involved in cell wall	TGLTAGITSAESVVISDTGLSSLTGINVK	139-168	8055
		LKVFVNNDNIDTIDSGLQEVTDITIDISYNAEKVDVILK	183-223	
		VFVNNDNIDTIDSGLQEVTDITIDISYNAEKVDVILK	185-223	
		VDVILKQLSSAK	203-214	
		NDDLTELDLFPK	263-273	
		LKTIGGALQISDNSELR	274-290	
		TIGGALQISDNSELR	276-290	
		TIGGALQISDNSELRFSFGFPK	276-297	
		RVSGGFILK	321-329	
		VSGGFILK	322-329	
		VSGGFILKTDGK	322-333	
		Eng1	Endo-1,3-beta-glucanase	
		LNQALFDPK	1101-1109	
Pga4	$\beta$ -1,3-glucanosyltransferase	VEGNAFWDESESGDRFYIR	24-41	1595
		DVKYFQELGINTIR	66-79	
		YFQELGINTIR	69-79	
		AGIYVILDVNTPHSSITR	99-116	
		DMKTFIK	172-178	
		TIPVGSAASVDEYR	184-198	
		TKNPSGDGGYLK	321-332	
		SNIWNVTEEIPDTPKGALK	343-361	
Pga24	Unknown function	NLYGAGAVPFFQVHLEK	94-110	27
Pga29	Unknown function	SDDSKVDGLGLYSK	26-39	2869
		SDDSKVDGLGLYSKHGAAIDYFLGK	26-52	
		HEGAAIDYFLGK	40-52	
		YDDEKKQIFQELK	59-71	
		QIFQELK	65-71	
		QIFQELKTSSITVR	65-78	
		QSFTLGGDVYELGATDNFIPVTINK	79-103	
		QSFTLGGDVYELGATDNFIPVTINKDGLSFTGDDKVYASK	79-119	
		DGTLSTGDDKVYASK	104-119	
		NVNDPYRYSESEYAVSNK	120-137	
		NVNDPYRYSESEYAVSNKK	120-138	
		YSESEYAVSNKKTDDSAPIITIVAK	127-150	
		KTDDSAPIITIVAK	138-150	
		TDDSAPIITIVAK	139-150	
Phr1	$\beta$ -1,3-glucanosyltransferase	NNPEWNLDLYKR	136-147	153
		SNTDASAFVK	175-184	
Phr2	$\beta$ -1,3-glucanosyltransferase	DIPYLEAVDTNVIR	75-88	461
		KSNTDASAFVK	164-174	
		SNTDASAFVK	165-174	
		SIPVGYSANDDSAIR	191-205	
Pir1	Structural protein	WGAIVANHQFQFDGPIPQAGTIYSAGWSIK	272-301	86

**Tabla III.17.** Continuación en página siguiente.

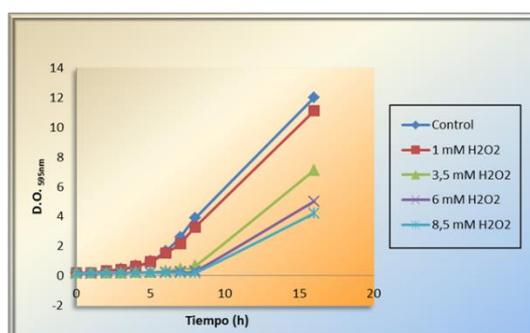
Proteína	Descripción	Secuencia	Residuos	"Score"
Scw1	Glucosidase	SESQIASEIAQLSGFDVIR	142-160	852
		TSSQKIFAGIFDVSSITSGIESLAEAVK	177-204	
		IFAGIFDVSSITSGIESLAEAVK	182-204	
		NVLITETGWPSRGDSNGVAVPSK	311-333	
		SNQQAASSIK	334-344	
		ADGPYNAEKYWGIYSN	363-378	
Sod1	Superoxide dismutase	LIGKDSILGR	107-116	29
Sun42	Protein involved in cell wall	TYLSLIPNPNKDKPNYNIK	314-333	33
Tos1	Unknown function	FGNSLSYANADNSGGSSTPVPLEETIK	260-287	72
		SGEYIIFSGSK	288-299	
Utr2	1,3-1,4-β-glucanase	YLWYGK	137-142	230
		IQFSLWPGGDSSNAK	254-268	
		GTIEWAGGLINWDSEDIKK	269-287	
Yps7	Putative aspartic-type endopeptidase	VVPSSVTGYNMLGLPFLK	494-511	58

**Tabla III.17. Identificación de proteínas en paredes celulares de la cepa SC5314 de *C. albicans* crecida en medio YPD con sorbitol 1 M.** Se detalla la descripción, los péptidos correspondientes a las proteínas identificadas, la situación de estos péptidos en la secuencia aminoacídica de las proteínas y el “score”.

Se identificaron veintidós proteínas, siendo ocho de ellas, proteínas no GPI. Pga24 de función desconocida y Sod1 con función superóxido dismutasa no aparecieron en el control pero sin embargo solamente en estas condiciones de estrés osmótico no iónico se consiguieron identificar con un único péptido.

### III.A.3.4. Sensibilidad a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

Se estudió el efecto del estrés oxidativo exógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) sobre la cepa SC5314 de *C. albicans*, para conseguir tal objetivo, las células crecieron en medio YPD que contenía concentraciones de 0, 1, 3.5, 6 y 8.5 mM de peróxido de hidrógeno. La condición idónea que afectó al crecimiento de las células era 3.5 mM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Figura III.6) y se realizó el mismo procedimiento de obtención y tratamiento de las paredes celulares citado anteriormente.



**Figura III.6. Sensibilidad a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.** Cultivos de la cepa SC5314 de *C. albicans* crecieron en presencia de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a concentraciones de 0, 1, 3.5, 6 y 8.5 mM.

## RESULTADOS

El resultado de la identificación de proteínas en paredes celulares de la cepa SC5314 crecida en medio YPD con 3.5 mM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> se detalla en la tabla III.18.

Proteína	Descripción	Secuencia	Residuos	"Score"
Als1	Agglutinin-like protein	STVDPSGYLASR	176-188	143
		GLNDWNYPVSESFSYTK	237-254	
Bgl21	1,3-beta-Glucosyltransferase	IFLVGSEALYREDLTASELASK	113-134	64
Cht2	Chitinase 2	TVLLSLGGVGDYGFSDVASATK	99-121	504
		FADSAPNKNIK	229-239	
		LFVGV PATSNIAGYVDTSK	240-258	
Crh11	Transglycosylase	QGTIDSGSNGLSLTMK	60-75	459
		RFDNPSFK	77-84	
		SNFYIMFGR	85-93	
		VEVVLKGAEGK	94-104	
		SVLVADYSSGK	236-246	
		SVLVADYSSGKQYSYSDQSGSWESIK	236-261	
		QYSYSDQSGSWESIK	247-261	
QYSYSDQSGSWESIKADGGK	247-266			
Ecm33.1	Protein involved in cell wall	SVGNSMQIFAHDELTK	247-262	68
Ecm33.3	Protein involved in cell wall	ATTINAATLQLVSGVLEFNANTILSDLNLAQLTTVGSFNLNALPALEK	91-138	5945
		TGLTAGITSAESVVISDTGLSLLTGIVFK	139-168	
		TGLTAGITSAESVVISDTGLSLLTGIVFKLK	139-170	
		LKVFVNNNDNIDTIDSGLQEVTDIDISYNAEKVDVILK	169-208	
		VFNVNNNDNIDTIDSGLQEVTDIDISYNAEKVDVILK	171-208	
		VDVILKQLSSAK	203-214	
		LKTIGGALQISDNSELR	274-290	
		TIGGALQISDNSELR	276-290	
		TIGGALQISDNSELRSFSGFPK	276-297	
		RVSGGFILK	321-329	
		VSGGFILK	322-329	
		VSGGFILKTDGK	322-333	
		Pga4	β-1,3-glucanosyltransferase	
DVKYFQELGINTIR	66-79			
YFQELGINTIR	69-79			
AGIYVILDVNTPHSSITR	99-116			
DMKTFIK	172-178			
TIPVGYSAASVDEYR	184-198			
GDSVTTNDDFDNLKSQFEK	302-320			
TKNPSGGGYLK	321-332			
GALKYLK	358-364			
Pga29	Unknown function	SDDSKVDGLGLYSK	26-39	948
		SDDSKVDGLGLYSKHEGAAIDYFLGK	26-52	
		HEGAAIDYFLGK	40-52	
		QIFQELK	65-71	
		QIFQELKTSSITVR	65-78	
		QSFTLGGDVYELGATDNFIPVTINK	79-103	
		QSFTLGGDVYELGATDNFIPVTINKDGLSFTGDDKVYASK	79-119	
		NVNDPYRYSESEYAVSNK	120-137	
		NVNDPYRYSESEYAVSNKK	120-138	
		YSESEYAVSNK	127-137	
		YSESEYAVSNKK	127-138	
		YSESEYAVSNKKTDDSAITIVAK	127-150	
		KTDDSAITIVAK	138-150	
TDDSAITIVAK	139-150			
Phr1	β-1,3-glucanosyltransferase	YFKESNTNTRLR	88-98	190
		NNPEWNL DLYKR	136-147	
		SNTDASAFVK	175-184	
		LFQEIGTLYSDK	280-291	
Phr2	β-1,3-glucanosyltransferase	DIPYLEAVDTNVIR	75-88	510
		KSNTDASAFVK	164-174	
		SNTDASAFVK	165-174	
		AAIRDTKAYIK	175-185	
		SIPVGYSANDDSAIR	191-205	
		ASGYESATNDYK	239-250	

**Tabla III.18.** Continuación en página siguiente.

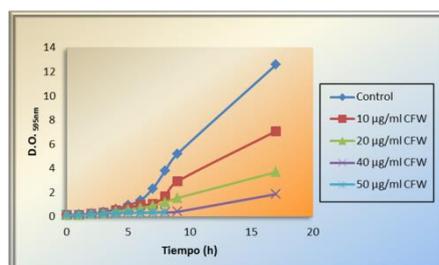
Proteína	Descripción	Secuencia	Residuos	"Score"
Scw1	Glucosidase	SESQIASEIAQLSGFDVIR	142-160	468
		IFAGIFDVSSITSGIESLAEAVK	182-204	
		NVLITETGWPSR	311-322	
		NVLITETGWPSRGDSDNGVAVPSK	311-333	
		SNQQAASSIK	334-344	
		ADGPYNAEKYWGIIYSN	363-378	
Sun42	Protein involved in cell wall	TYLSLIPNPNKDKPNYNIK	314-333	23
Tos1	Unknown function	SGEEYIIFSGSK	288-299	84
		KGTVAYHGFK	311-320	
Utr2	1,3-1,4-β-glucanase	YLWYGK	137-142	75
		IQFSLWPGGDSSNAK	254-268	

**Tabla III.18. Identificación de proteínas en paredes celulares de la cepa SC5314 de *C. albicans* crecida en medio YPD con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 3.5 mM.** Se detalla la descripción, los péptidos correspondientes a las proteínas identificadas, la situación de estos péptidos en la secuencia aminoacídica de las proteínas y el "score".

Se identificaron catorce proteínas de las que cuatro eran proteínas no GPI. No se observaron diferencias significativas respecto a los anteriores experimentos, identificándose proteínas como Crh11, Pga4, Pga29 con un número elevado de péptidos y un "score" alto.

### III.A.3.5. Sensibilidad a blanco de calcoflúor.

En este experimento se utilizó el blanco de calcoflúor, caracterizado por ser una molécula dipolo que interfiere en la cristalización de los componentes de la pared celular, distorsionando por tanto el ensamblaje de éstos. Las concentraciones utilizadas para realizar tal experimento fueron 0, 10, 20, 40 y 50 µg/ml, eligiendo 20 µg/ml como la concentración óptima para provocar una disminución de crecimiento (Figura III.7). Las células crecieron en un cultivo de YPD conteniendo 20 µg/ml de blanco de calcoflúor, después se obtuvieron paredes celulares y tras ser tratadas con SDS 2% se liofilizaron y se realizó la identificación de proteínas mediante espectrometría de masas.



**Figura III.7. Sensibilidad a blanco de calcoflúor.** Cultivos de la cepa SC5314 de *C. albicans* crecieron en presencia de blanco de calcoflúor a concentraciones de 0, 10, 20, 40 y 50 µg/ml.

## RESULTADOS

El resultado de la identificación de proteínas en paredes celulares de la cepa SC5314 crecida en medio YPD con 20 µg/ml de blanco de calcoflúor se detalla en la tabla III.19.

Proteína	Descripción	Secuencia	Residuos	"Score"
Als1	Agglutinin-like protein	STVDPSGYLYASR	176-188	207
		GLNDWNYPPVSSSEFSYTK	237-254	
		SQSKPFTLR	303-311	
Als2	Agglutinin-like protein	AGTNTVTFNDGDKK	153-166	142
		TNEDASGYFIASR	176-188	
		LIPSINK	189-195	
Als3	Agglutinin-like protein	KISINVDFER	166-175	315
		ISINVDFER	167-175	
		SNVDPKGYLTDSR	176-188	
		GLNDWNYPPVSSSEFSYTK	237-254	
Als4	Agglutinin-like protein	STVASSDRILLSR	176-188	36
Bgl21	1,3-beta-Glucosyltransferase	IFLVGSEALYR	113-123	156
		IFLVGSEALYREDLTASELASK	113-134	
		INDIKDLVK	135-143	
		SYSSVPVGTVDSWNVLDGASKPAIDAADVVSNSFSYWQK	152-192	
Cht2	Chitinase 2	TVLLSLGGGVGDYGFSDVASATK	99-121	4827
		FADTLWNK	122-129	
		FGAGEDPERPFDDAVVDGDFDIEHGGATGYPELATALR	130-168	
		FADSAPNKNIK	229-239	
		LFVGV PATSNIAGYVDTSK	240-258	
Ecm33.1	Protein involved in cell wall	SVGNMQIFAHDELTK	247-262	139
Ecm33.3	Protein involved in cell wall	ATTINAATLQLVSGVLEFNANTILSDLNLAQLTTVGSFNLNALPALEK	91-138	8177
		TGLTAGITSAESVVISDTGLSSLTGINVFK	139-168	
		LKVFNVNNDNIDTIDISGLQEVTDIDISYNAEKVDVILK	183-223	
		VFNVNNDNIDTIDISGLQEVTDIDISYNAEKVDVILK	185-223	
		VDVILKQLSSAK	203-214	
		NDDLTELDFPKLK	263-275	
		LKTIGGALQISDNSELR	274-290	
		TIGGALQISDNSELR	276-290	
		TIGGALQISDNSELR SFSGFPK	276-297	
		RVSGGFILK	321-329	
		VSGGFILK	322-329	
		VSGGFILKTDGK	322-333	
		Eng1	Endo-1,3-beta-glucanase	
DASNPSADDTYFPVSR	932-947			
LNQALFDPK	1101-1109			
Pga4	β-1,3-glucanosyltransferase	VEGNAFWDESESGDRFYIR	24-41	1419
		DVKYFQELGINTIR	66-79	
		YFQELGINTIR	69-79	
		AGIYVILDVNTPHSSITR	99-116	
		DMKTFIK	172-178	
		TIPVGYSAASVDEYR	184-198	
		TKNPSGDGGYLYK	321-332	
GALKYLYK	358-364			
Pga29	Unknown function	SDDSKVDGLGLYSK	26-39	3272
		SDDSKVDGLGLYSKHEGAAIDYFLGK	26-52	
		VDGLGLYSKHEGAAIDYFLGK	31-52	
		HEGAAIDYFLGK	40-52	
		YDDEKKQIFQELK	59-71	
		QIFQELK	65-71	
		QIFQELKTSSITVR	65-78	
		QSFTLGGDVYELGATDNFIPVTINK	79-103	
		QSFTLGGDVYELGATDNFIPVTINKDGLTSFTGDDKVVYASK	79-119	
		DGTLSTGDDKVVYASK	104-119	
		NVNDPYRYSESEYAVSNK	120-137	
		NVNDPYRYSESEYAVSNKK	120-138	
		YSESEYAVSNKKTDD SAPITIVAK	127-150	
		KTDD SAPITIVAK	138-150	
		TDD SAPITIVAK	139-150	

Tabla III.19. Continuación en página siguiente.

Proteína	Descripción	Secuencia	Residuos	"Score"
Pga31	Unknown function	HEGAALNYLFLAAPGVAENLK	102-122	395
		HEGAALNYLFLAAPGVAENLKYDDETKTVYTELK	102-135	
		NINDPYNYSK	184-193	
		NINDPYNYSKDSYAVVK	184-200	
		NINDPYNYSKDSYAVVKGDDGAIPIK	184-209	
		DSYAVVKGDDGAIPIK	194-209	
		DSYAVVKGDDGAIPIKLVAK	194-213	
		GGDGAIPK	201-209	
		GGDGAIPKLVAK	201-213	
Phr1	$\beta$ -1,3-glucanosyltransferase	GIAYQQDAAGSVSSGYDADPNRK	49-71	338
		DVKYFKESNTNLR	85-98	
		YFKESNTNLR	88-98	
		NNPEWNLPLYKR	136-147	
		SNTDASAFVK	175-184	
		LFQEIGTLYSK	280-291	
Phr2	$\beta$ -1,3-glucanosyltransferase	DIPYLEAVDTNVIR	75-88	535
		KSNTDASAFVK	164-174	
		SNTDASAFVK	165-174	
		AAIRDTKAYIK	175-185	
		SIPVGYSANDDSAIR	191-205	
		ASGYESATNDYK	239-250	
Pir1	Structural protein	WGAIVANHQFQFDGPIQAGTIYSAGWSIK	272-301	100
Rbt1	Unknown function	TLGILLGLLK	245-254	144
		TLGILLGLLKK	245-255	
Sap9	Secreted aspartyl protease	DGSLDMLTNK	51-61	286
		QTFYMATLK	62-70	
		IGSNEDENRVLVDTGSSDLWVMSHDLK	71-97	
		LKADGIIAK	285-293	
		SLSYLNLTADAK	294-306	
		AGSILFGAIDHAK	307-319	
		YQGDLVTVK	320-328	
		TYSQISYPVR	332-341	
		TIKVPISDLVLQASK	424-438	
		Scw1	Glucosidase	
TSSQKIFAGIFDVSSITSGIESLAEAVK	177-204			
IFAGIFDVSSITSGIESLAEAVK	182-204			
NVLITETGWPSRGDSNGVAVPSK	311-333			
SNQQAASSIK	334-344			
ADGPPYNAEKYWGYSN	363-378			
Tos1	Unknown function	FGNSLSYANADNSGGSSTPVPLEETIK	260-287	73
Utr2	1,3-1,4- $\beta$ -glucanase	MSTFQESFDSKDKVK	75-89	342
		YLWYGK	137-142	
		IQFSLWPGDSSNAK	254-268	
		GTIEWAGGLINWSEDIKK	269-287	
		YGYYYAHIK	288-296	
Yps7	Putative aspartic-type endopeptidase	YYVGNFYQFDMIPHTGFR	342-359	48
		VVPSSVTGYNMLGLPFLK	494-511	

**Tabla III.19. Identificación de proteínas en paredes celulares de la cepa SC5314 de *C. albicans* crecida en medio YPD con blanco de calcoflúor 20  $\mu$ g/ml.** Se detalla la descripción, los péptidos correspondientes a las proteínas identificadas, la situación de estos péptidos en la secuencia aminoacídica de las proteínas y el "score".

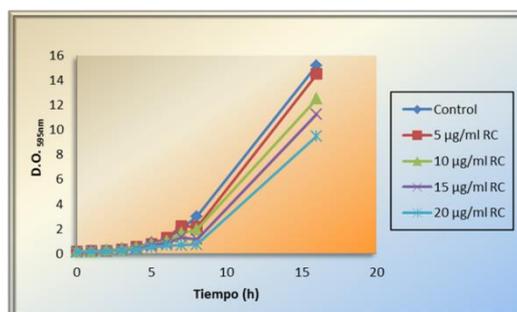
Se identificaron veinte proteínas y cinco fueron proteínas no GPI, entre ellas, se encontraba Yps7 que también se había determinado en el control y en paredes tratadas con sorbitol.

### III.A.3.6. Sensibilidad a rojo congo.

En este experimento se utilizó rojo congo, agente que interfiere en la formación de las microfibrillas de  $\beta$ -1,3-glucano. Las concentraciones utilizadas en los diferentes

## RESULTADOS

cultivos de YPD fueron 0, 5, 10, 15 y 20  $\mu\text{g/ml}$  de rojo congo. El cultivo en YPD con concentración de 20  $\mu\text{g/ml}$  de rojo congo resultó ser el más idóneo, provocando un retraso en el crecimiento (Figura III.8).



**Figura III.8. Sensibilidad a rojo congo.** Cultivos de la cepa SC5314 de *C. albicans* crecieron en presencia de rojo congo a concentraciones de 0, 5, 10, 15 y 20  $\mu\text{g/ml}$ .

El resultado de la identificación de proteínas en paredes celulares de la cepa SC5314 crecida en medio YPD con 20  $\mu\text{g/ml}$  de rojo congo se detalla en la tabla III.20.

Proteína	Descripción	Secuencia	Residuos	"Score"
Als1	Agglutinin-like protein	STVDPSGLYASR	176-188	121
		GLNDWNYVPSSSEFSYTK	237-254	
Cht2	Chitinase 2	TVLLSLGGGVGDYGFSDVASATK	99-121	527
		FGAGEDPERPFDDAVVDGDFDIEHGGATGYPELATALR	130-168	
		FADSAPNKNIK	229-239	
		LFVGV PATSNIAGYVDTSK	240-258	
Crh11	Transglycosylase	QGTIDSGSNGLSLTMK	60-75	272
		RFDNPSFK	77-84	
		SVLVADYSSGK	236-246	
		SVLVADYSSGKQYSYSDQSGSWESIK	236-261	
Ecm33.3	Protein involved in cell wall	ATTINAATLQLVSGVLEFNANTILSDLNLAQLTTVGSFNLNALPALEK	91-138	4564
		TGLTAGITSAESVVISDTGLSSLTGINVK	139-168	
		LKVFVN NNNDNIDTIDSGLQEVTDITIDISYNAEKVDVILK	183-223	
		VFVN NNNDNIDTIDSGLQEVTDITIDISYNAEKVDVILK	185-223	
		LKTIGGALQISDNSEL	274-290	
		TIGGALQISDNSEL	276-290	
		TIGGALQISDNSELRSFSGFPK	276-297	
		VSGGFILK	322-329	
Eng1	Endo-1,3-beta-glucanase	AIDTNAPPTVFAR	431-443	31
Pga4	$\beta$ -1,3-glucanosyltransferase	YFQELGINTIR	69-79	53
Pga29	Unknown function	SDDSKVDGLGLYSK	26-39	1357
		SDDSKVDGLGLYSKHGAAIDYFLGK	26-52	
		HEGAAIDYFLGK	40-52	
		QSFTLGGDVYELGATDNFIPVTINKDGTLSFTGDDKVYASK	79-119	
		NVNDPYRYSESEYAVSNK	120-137	
		YSESEYAVSNKKTDDSAPIITIVAK	127-150	
		KTDDSAPIITIVAK	138-150	
		TDDSAPIITIVAK	139-150	

**Tabla III.20.** Continuación en página siguiente.

Proteína	Descripción	Secuencia	Residuos	"Score"
Phr1	β-1,3-glucanosyltransferase	NNPEWNLPLYKR	136-147	77
		SNTDASAFVK	175-184	
Phr2	β-1,3-glucanosyltransferase	DIPYLEAVDTNVIR	75-88	338
		SNTDASAFVK	165-174	
		SIPVGYSANDDSAIR	191-205	
Rbt1	Unknown function	TLGLLLGLLK	245-254	92
Scw1	Glucosidase	SESQIASEIAQLSGFDVIR	142-160	282
		IFAGIFDVSSITSGIESLAEAVK	182-204	
		NVLITETGWPSRGDSNGVAVPSK	311-333	
		SNQQAASSIK	334-344	
		ADGPYNAEKYWGIVSN	363-378	
Sod4	Superoxide dismutase	TPAALELGDLGR	105-117	71
Swp1	Glycotransferase	LVEVLPSPEFK	134-144	43
Utr2	1,3-1,4-β-glucanase	IQFSLWPGGDSSNAK	254-268	72

**Tabla III.20. Identificación de proteínas en paredes celulares de la cepa SC5314 de *C. albicans* crecida en medio YPD con rojo congo 20 µg/ml.** Se detalla la descripción, los péptidos correspondientes a las proteínas identificadas, la situación de estos péptidos en la secuencia aminoacídica de las proteínas y el "score".

Se identificaron trece proteínas y Eng1 fue la única proteína no GPI. Proteínas como Cht2, Pga29, Phr2 y Scw1 al igual que en los anteriores experimentos se volvieron a identificar con gran número de péptidos y en este caso, Pga4 solamente se identificó con un único péptido.

Según todos los resultados que se obtuvieron en paredes celulares sometidas a estrés químico y/o osmótico, veintiocho proteínas fueron identificadas en total, de las cuales ocho fueron proteínas no GPI.

Los datos nos sugerían que no existían diferencias significativas en unas condiciones de estrés respecto a otras, debido a que por una parte, una gran proporción del total de las proteínas se identificaron en todos los experimentos (Figura III.9) y por otra, algunas fueron identificadas en experimentos concretos con un único péptido, lo cual resultaba ser información insuficiente. Hubo proteínas identificadas únicamente en algunos de los experimentos, Pga24 y Sod1 en estrés con sorbitol y Pga31 en estrés con blanco de calcoflúor. Proteínas de la familia Als como Als2, Als3 y Als4 al igual que Yps7 se identificaron solamente en estrés con sorbitol y blanco de calcoflúor, a diferencia de Als1 que fue identificada en todos los experimentos.

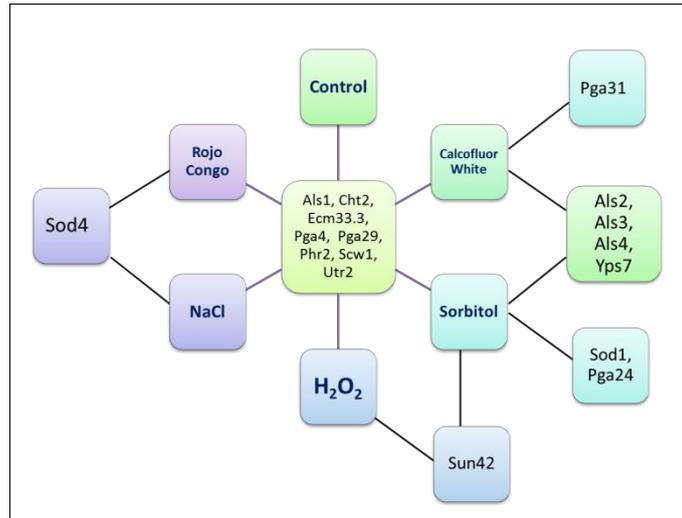


Figura III.9. Representación de la interrelación de proteínas con los experimentos realizados.

En el presente capítulo de Resultados se identificaron un total de cuarenta y una proteínas de pared celular, de las cuales doce son proteínas no GPI y en la figura III.10 se detalla el número de experimentos en el que son identificadas las proteínas citadas anteriormente.

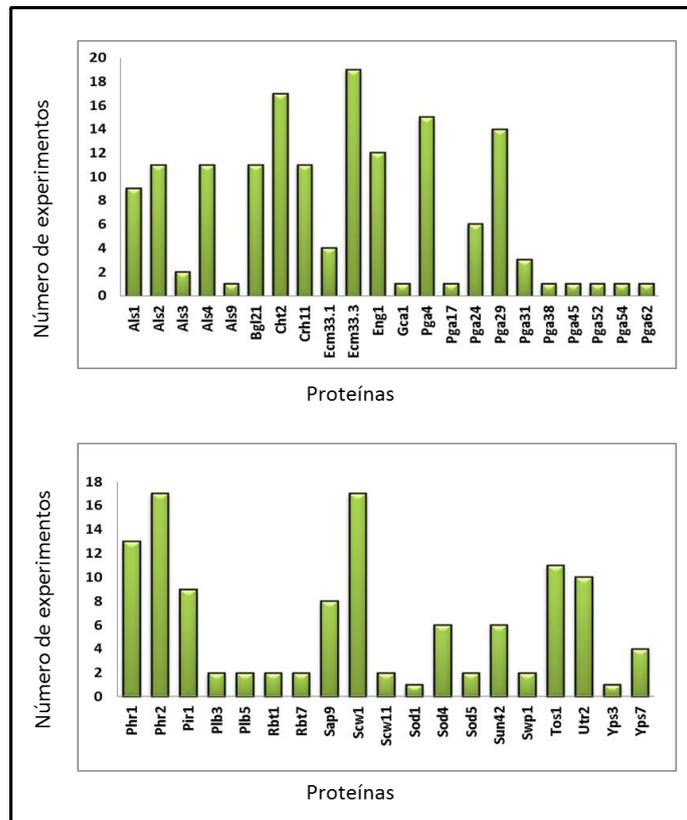


Figura III.10. Número de experimentos en el que son identificadas las proteínas citadas en el capítulo de Resultados III.A.

Ecm33.3, fue la proteína que con mayor frecuencia se identificó, seguida de Cht2, Pga4, Pga29, Phr2 y Scw1. Las proteínas de la familia Als también fueron identificadas en gran parte de los experimentos, a excepción de Als3 y Als9. Por último, gran parte de las proteínas de la familia Pga se identificaron en experimentos individuales, al igual que las fosfolipasas Plb3 y Plb5, o las superóxido dismutasas Sod1 y Sod5. Estos resultados sugieren que no todas las proteínas en la pared celular tienen la misma importancia en cuanto a su función, existiendo aquellas cuyo papel es esencial y por este motivo prácticamente en todos los experimentos fueron identificadas y aquellas otras proteínas que de manera minoritaria fueron identificadas en experimentos individuales.

Si atendemos a la distribución propuesta por Richad y Plaine en 2007 sobre la función de las proteínas en la pared celular, pero considerando tanto las proteínas que son y que no son GPI de todos los experimentos que se han realizado en este capítulo de resultados, la clasificación sería la siguiente:

- Proteínas de función desconocida: Ecm33.1, Pga17, Pga24, Pga29, Pga38, Pga45, Pga52, Pga54, Rbt1, Rbt7 y Tos1.
- Proteínas con función relacionada con la biogénesis o remodelación de la pared celular: Bgl21, Cht2, Ecm33.3, Eng1, Pga4, Pga31, Pga62, Phr1, Phr2, Pir1, Sun42 y Utr2.
- Proteínas relacionadas con la adhesión célula a célula y otras interacciones: Als1, Als2, Als3, Als4, Als9 y Scw1.
- Proteínas con actividades enzimáticas diferentes: Crh11, Gca1, Plb3, Plb5, Sap9, Scw11, Sod1, Sod4, Sod5, Swp1, Yps3 e Yps7.

De manera que en la pared celular encontramos un 29% de proteínas que presentan función relacionada con la biogénesis o remodelación de la pared celular al igual que proteínas con diferentes actividades enzimáticas, seguida del 27% con función desconocida y finalmente el 15% presentan un papel importante en la adhesión e interacción. Los datos nos sugieren la gran cantidad de manoproteínas que de manera directa en la biogénesis o indirecta con actividades enzimáticas se encuentran implicadas en la organización y estructura de la pared celular.



**III.B. CARACTERIZACIÓN DEL ANTÍGENO  
RECONOCIDO POR EL ANTICUERPO  
MONOCLONAL 3H8.**

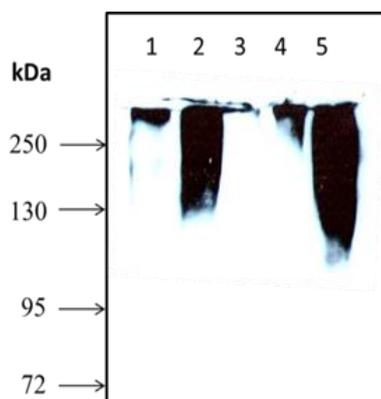


### III.B.1. CARACTERÍSTICAS BIOQUÍMICAS DEL ANTÍGENO 3H8 PRESENTE EN LA PARED CELULAR DE *C. ALBICANS*.

Con el objetivo de conocer la naturaleza bioquímica del antígeno reconocido por el anticuerpo monoclonal 3H8 (Marcilla *et al.*, 1999) se procedió a la extracción de paredes celulares aisladas con diferentes reactivos químicos.

Las paredes obtenidas procedían de cultivos celulares de *C. albicans* en fase exponencial de crecimiento cultivadas en las condiciones descritas en materiales y métodos. En primer lugar, las paredes fueron extraídas con 2% de SDS, para eliminar aquellas proteínas retenidas no unidas covalentemente a la pared y se trataron posteriormente con  $\beta$ -ME al 2% (v/v) en tampón acetato amónico pH 6.3 10 mM, fraccionándose las paredes resultantes en dos alícuotas. Una de las alícuotas fue extraída con 30 mM de NaOH y finalmente con HF-piridina, mientras que la otra alícuota directamente fue extraída con HF-piridina. Por otra parte, el sobrenadante de protoplastos regenerados durante 5 horas en medio de Lee con KCl 0.6 M fue dializado y liofilizado. Con los tres materiales se realizó una electroforesis SDS-PAGE y la inmunodetección con el anticuerpo monoclonal 3H8.

El antígeno fue detectado en los extractos de  $\beta$ -ME y NaOH como un material polidisperso de alto peso molecular a excepción del extracto HF-piridina de paredes que previamente habían sido extraídas con  $\beta$ -ME y NaOH donde no se detectó (Figura III.11). Por tanto, al saber que en el extracto HF-piridina se encuentran proteínas con unión GPI al glucano (De Groot *et al.*, 2004), el experimento fue claramente una evidencia de que el antígeno no es una proteína GPI, sino una proteína unida directamente al  $\beta$ -1,3-glucano mediante un enlace sensible al álcali o bien mediante un puente disulfuro establecido con otra proteína unida directamente al glucano.

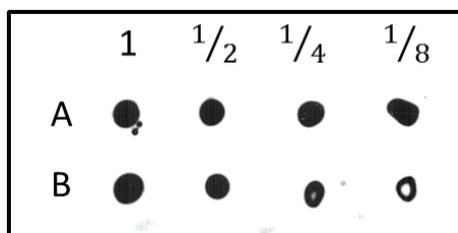


**Figura III.11. Western-blot de material solubilizado de paredes celulares de *C. albicans*.** (1)  $\beta$ -ME, (2) NaOH, (3) HF-piridina de paredes extraídas previamente con NaOH, (4) HF-piridina sin tratamiento previo con NaOH y (5) Sobrenadante de protoplastos. La inmunodetección se realizó con el anticuerpo monoclonal 3H8.

### III.B.2. ESTUDIOS DE ESTABILIDAD DEL ANTÍGENO A DISTINTAS CONDICIONES.

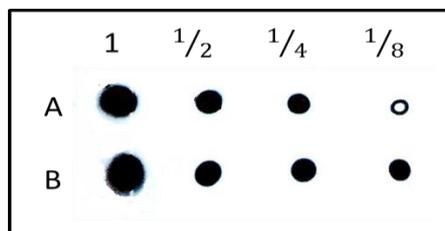
#### III.B.2.1. Estabilidad a la temperatura.

Para comprobar la estabilidad que presentaba el antígeno a la temperatura, se utilizaron temperaturas extremas de congelación a  $-20^{\circ}\text{C}$  y de ebullición a  $100^{\circ}\text{C}$ . Se mezclaron alícuotas del material solubilizado con  $\beta$ -ME y con NaOH de paredes celulares de la cepa SC5314 de *C. albicans* y después se mantuvo a  $-20^{\circ}\text{C}$  durante 24 horas. Pasado este tiempo, se realizó un dot-blot (Figura III.12) para comprobar si se veía afectada la reactividad del antígeno.



**Figura III.12. Estabilidad a  $-20^{\circ}\text{C}$  del antígeno 3H8.** (A) Extracto  $\beta$ -ME + Extracto NaOH de paredes de la cepa SC5314. (B) Extracto  $\beta$ -ME + Extracto NaOH de paredes de la cepa SC5314 congelado a  $-20^{\circ}\text{C}$  durante 24 h. La inmunodetección se realizó con el anticuerpo monoclonal 3H8.

Posteriormente, se realizó el experimento de estabilidad a  $100^{\circ}\text{C}$  (Figura III.13). Una alícuota del material solubilizado con NaOH se liofilizó y el liófilo se disolvió en tampón Tris-HCl 0.1 M pH 7.5. La solución obtenida se fraccionó a su vez en dos alícuotas. La primera alícuota fue tomada como control y calentada en baño a  $100^{\circ}\text{C}$  durante 10 min. Sin embargo la segunda alícuota, primero fue incubada a  $37^{\circ}\text{C}$  durante 16 h y después calentada en baño a  $100^{\circ}\text{C}$  durante 10 min.



**Figura III.13. Estabilidad a  $100^{\circ}\text{C}$  del antígeno 3H8.** (A) Alícuota del material solubilizado con NaOH calentada en baño a  $100^{\circ}\text{C}$  durante 10 min. (B) Alícuota del material solubilizado con NaOH incubada a  $37^{\circ}\text{C}$  durante 16 h y calentada en baño a  $100^{\circ}\text{C}$  durante 10 min. La inmunodetección se realizó con el anticuerpo monoclonal 3H8.

Los resultados obtenidos sugerían que el antígeno es resistente tanto a la ebullición como a la congelación, debido a que no se encontraron diferencias significativas respecto a los controles.

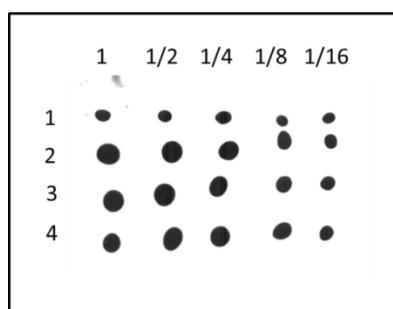
### III.B.2.2. Estabilidad frente agentes caotrópicos.

#### III.B.2.2.1. Estabilidad a SDS y temperatura.

En el siguiente experimento se pretendía conocer la estabilidad del antígeno en presencia de SDS y temperatura de 100°C. Para tal objetivo, se realizó una comparación del comportamiento del antígeno mediante dot-blot (Figura III.14) cambiando las condiciones de la solución solubilizadora en la cual el material se solubiliza siendo necesaria para realizar la desnaturalización de las proteínas a 100°C previamente a ser separadas en un gel de poliacrilamida SDS-PAGE.

En condiciones normales la solución solubilizadora contiene glicerol al 40 %, SDS al 8 %,  $\beta$ -ME al 20 % y azul de bromofenol al 0.001 % en tampón Tris HCl 0.25 M, pH 6.8.

Se utilizó como control la solución solubilizadora sin SDS, realizándose la incubación a temperatura ambiente con el material solubilizado con  $\beta$ -ME y NaOH. Por otra parte, dicho material se mezcló también con solución solubilizadora con SDS y se fraccionó en tres alícuotas para posteriormente incubar cada una de ellas a temperatura y tiempo diferente.

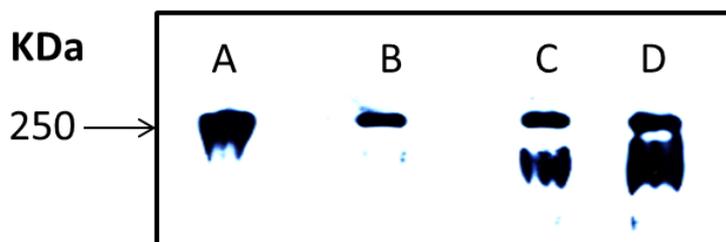


**Figura III.14. Estabilidad a SDS y temperatura del antígeno 3H8.** (1) Control, el material solubilizado con  $\beta$ -ME y NaOH se incubó a temperatura ambiente en presencia de solución solubilizadora sin SDS. (2) La incubación se realizó con solubilizadora con SDS a temperatura ambiente. (3) La incubación se realizó con solubilizadora con SDS a 100°C durante 10 minutos. (4) La incubación se realizó con solubilizadora con SDS a 100°C durante 30 minutos.

A la vista de los resultados, se observó que el comportamiento del antígeno en presencia de SDS y a una temperatura elevada no se encontraba afectado, de tal manera el antígeno resultaba ser estable frente a este agente caotrópico.

### III.B.2.2.2. Estabilidad a persulfato amónico.

Con el objetivo de conocer en qué manera podía afectar el persulfato de amonio (agente reductor necesario para iniciar la reacción de polimerización en un gel de poliacrilamida) a la estabilidad del antígeno se realizó un western-blot partiendo del material solubilizado con NaOH de paredes celulares que fue fraccionado en cuatro alícuotas a fin de poder separarlas electroforéticamente a distintos tiempos (Figura III.15). Los tiempos utilizados en la aplicación de las muestras fueron 0, 30, 60 y 120 min.



**Figura III.15. Estabilidad a persulfato amónico del antígeno 3H8.** (A) Muestra aplicada a tiempo: 0 min. (B) Muestra aplicada a tiempo: 30 min. (C) Muestra aplicada a tiempo: 60 min. (D) Muestra aplicada a tiempo: 120 min. Tiempo total de SDS-PAGE: 3 horas. La inmunodetección del western-blot se realizó con el anticuerpo monoclonal 3H8.

El resultado indicaba que el persulfato de amonio empleado en SDS-PAGE no provocaba la pérdida de la actividad del antígeno.

### III.B.2.3. Estabilidad a tripsina.

La tripsina es una proteasa utilizada en la identificación de proteínas debido a que esta enzima corta en el extremo carboxilo de los residuos de lisina o arginina de la estructura primaria de las proteínas dando lugar a una serie de péptidos suficientemente específicos para poder realizar la identificación de una proteína.

En este experimento se quería conocer si la actividad antigénica de la proteína reconocida por el anticuerpo monoclonal 3H8 se podía ver afectada en presencia de tripsina. Se partió de 60  $\mu$ g de proteína total extraída con NaOH de paredes celulares y

se solubilizó en 150 µl de tampón Tris 0.1 M pH 7.5 y se añadieron 12 µg de tripsina. Posteriormente, la mezcla se incubó a 37°C y se fueron tomando alícuotas a diferentes tiempos: 0, 5, 10, 15, 20 y 30 min, con las que se realizó un dot-blot (Figura III.16).

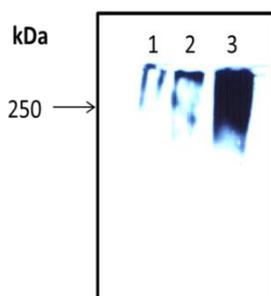


**Figura III.16. Estabilidad a tripsina del antígeno 3H8.** Se realizó la solubilización del material extraído con NaOH de paredes celulares en tampón TRIS 0.1 M pH 7.5, y después la digestión con tripsina a diferentes tiempos: 0, 5, 10, 15, 20 y 30 min. La inmunodetección fue realizada con el anticuerpo monoclonal 3H8.

Según el resultado, la tripsina destruyó en 5 minutos gran parte del poder inmunogénico del antígeno 3H8 y por tanto se consideró un antígeno extraordinariamente sensible a la enzima.

### III.B.3. ANÁLISIS ELECTROFORÉTICO DE LA FRACCIÓN MIXTA DE MEMBRANAS.

Una vez realizado el estudio de la presencia del antígeno en el material solubilizado de las paredes celulares se quiso completar dicho estudio comprobando si el antígeno se podría encontrar en la fracción mixta de membranas. Para ello, una vez rotas las células de la cepa SC5314 de *C. albicans*, el sobrenadante que contenía el citosol y las membranas celulares fue centrifugado durante 15 minutos a 100000 xg, esto permitió la obtención de vesículas con las que se realizó un western-blot y pudo compararse con el material solubilizado con β-ME y con NaOH (Figura III.17).

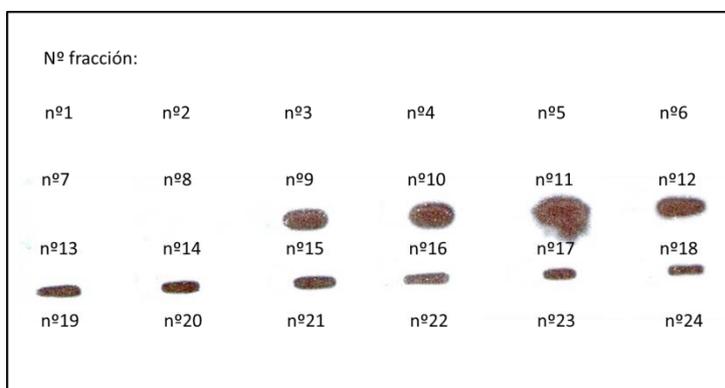


**Figura III.17. Western-blot de vesículas.**  
 (1) Fracción mixta de membranas.  
 (2) Material solubilizado con β-ME.  
 (3) Material solubilizado con NaOH.  
 La inmunodetección se realizó con el anticuerpo monoclonal 3H8.

El anticuerpo reconoció la fracción mixta de membranas de la misma manera que lo realizó con las fracciones de  $\beta$ -ME y NaOH, de lo cual se dedujo que el antígeno se encontraba en ellas. Además en todas las fracciones el peso molecular es muy alto, pudiendo llegar a ser más de 300 kDa, por lo que sería una proteína muy glicosilada o bien con una parte proteica de alto peso. En todos los experimentos, el antígeno presentaba un gran tamaño y resultaba necesaria la determinación de su peso molecular por lo que se realizó una cromatografía de exclusión molecular.

### III.B.4. DETERMINACIÓN DEL PESO MOLECULAR DEL ANTÍGENO.

Para la determinación del peso molecular del antígeno se realizó una columna de filtración molecular de 15 cm de altura y 1 cm de diámetro, siendo el volumen de gel sepharose CL-6B<sup>®</sup> utilizado 143 ml (diámetro de partícula: 40-165  $\mu$ m). Se recogieron fracciones de 500  $\mu$ l y de cada alícuota se tomaron 10  $\mu$ l para realizar un análisis dot-blot. Se observó que el antígeno fue detectado en la fracción n<sup>o</sup>9 del extracto de  $\beta$ -ME y dejó de detectarse en la fracción n<sup>o</sup>19 (Figura III.18).



**Figura III.18. Determinación del peso molecular del antígeno 3H8.** Extracto  $\beta$ -ME de paredes de la cepa SC5314 de *C. albicans*.

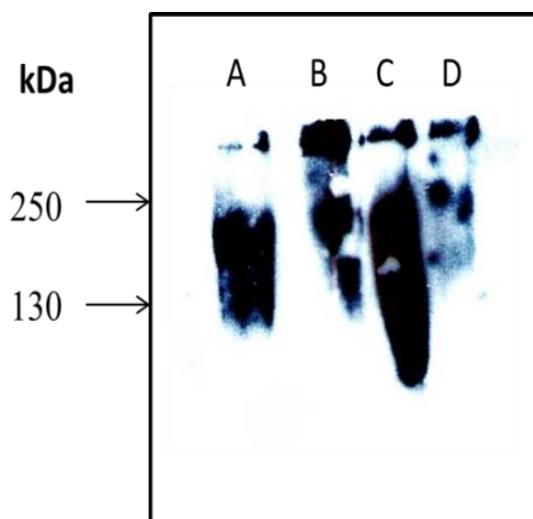
Reproduciendo las mismas condiciones de la columna se utilizó como muestra patrón una solución de 100  $\mu$ l de azul dextrano (523 kDa) y 100  $\mu$ l de sacarosa al 40% (342.3 kDa), de manera que el azul dextrano fue recogido en la fracción n<sup>o</sup>10 y la sacarosa se recogió en la fracción n<sup>o</sup>20 y comparando con el resultado obtenido sugería la posibilidad de que el antígeno presentara un peso molecular muy elevado y probablemente próximo a los 500 kDa.

### III.B.5. SOLUBILIZACIÓN DEL ANTÍGENO 3H8 EN PRESENCIA DE ÁCIDO IODOACÉTICO.

El ácido iodoacético es un inhibidor irreversible de las cisteína peptidasas, porque su mecanismo de acción consiste en la reacción con grupos cisteína (-SH) de las proteínas, formando proteínas carboximetiladas. En este experimento fue utilizado el ácido iodoacético para determinar si el antígeno podía formar complejos con otras proteínas estableciéndose puentes de hidrógeno entre ellas. Para conseguir tal objetivo, se partió de paredes celulares tratadas previamente con SDS 2%. Las paredes se separaron en dos alícuotas, una de ellas fue extraída con  $\beta$ -ME en presencia de urea 8 M como agente desnaturalizante y posteriormente se añadió ácido iodoacético solubilizado en tampón Tris acetato 0.5M pH 8.5 manteniéndose en incubación durante 30 min a temperatura ambiente. Una pequeña cantidad de paredes obtenida después de haber realizado la solubilización con  $\beta$ -ME se extrajeron con NaOH 30 mM en ausencia de ácido iodoacético.

Con el otro lote de paredes se realizó el mismo procedimiento pero de manera inversa, es decir, primero las paredes fueron extraídas con NaOH en presencia de ácido iodoacético y con el residuo obtenido se realizó la extracción con  $\beta$ -ME sin ácido iodoacético.

Finalmente se realizó un western-blot (Figura III.19) para comprobar si existían diferencias en la extracción del antígeno al tener bloqueados los grupos cisteína, e impedir que formase complejos con otras proteínas, circunstancia que podría ser la responsable del peso molecular tan alto que presentaba el antígeno.



**Figura III.19. Extracción de paredes celulares en presencia de ácido iodoacético.**

(A) Extracción con  $\beta$ -ME 2% y bloqueo de grupos cisteína (-SH) con ácido iodoacético. (B) Extracción con NaOH 30 mM sin bloqueo de grupos cisteína. (C) Extracción con  $\beta$ -ME 2% sin bloqueo de grupos cisteína. (D) Extracción con NaOH 30 mM y bloqueo de grupos cisteína (-SH) con ácido iodoacético. La inmunodetección se realizó con el anticuerpo 3H8.

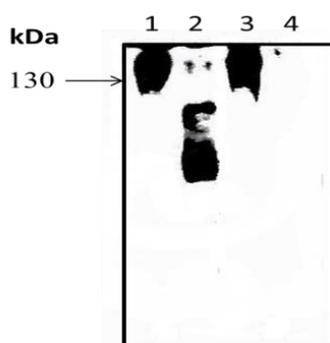
Como muestra el resultado, la proteína no formaba complejos con otras proteínas debido a que no se observaban diferencias significativas en las extracciones en presencia y ausencia del ácido iodoacético.

### III.B.6. DESGLICOSILACIÓN QUÍMICA Y ENZIMÁTICA.

#### III.B.6.1. Desglicosilación química con meta-periodato.

El material solubilizado con  $\beta$ -ME y revelado con el anticuerpo monoclonal 3H8 demostraba ser un material polidisperso de alto peso molecular rico en residuos de manosa.

Se decidió tratar dicho material con m-periodato, un compuesto químico que oxida fracciones de azúcar que contienen grupos hidroxilo vecinales, detectándose en un western-blot una nueva banda con tamaño entre 60-90 kDa al realizarse la inmunodetección con un anticuerpo policlonal. Sin embargo si el material se trataba con m-periodato y después en el western-blot se realizaba la inmunodetección con el anticuerpo 3H8 no se detectaba (Figura III.20).



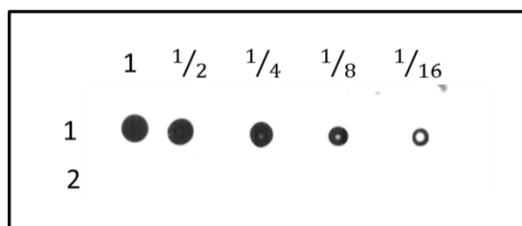
**Figura III.20. Western-blot del material solubilizado con  $\beta$ -ME de paredes celulares previamente tratadas con SDS 2%. (1) y (3) no tratado con m-periodato. (2) y (4) tratado con m-periodato; (1) y (2) inmunodetección con anticuerpo policlonal de levadura. (3) y (4) inmunodetección con anticuerpo monoclonal 3H8.**

El resultado sugería que el epítipo debía estar formado por parte proteica y parte azucarada, siendo esta última muy necesaria para la actividad antigénica, debido a que no se detectó al realizar la inmunodetección con el anticuerpo monoclonal.

#### III.B.6.2. Desglicosilación química con ácido trifluorometanosulfónico.

A fin de conocer la importancia de la parte azucarada en el epítipo, se decidió realizar un dot-blot con un extracto de NaOH de paredes celulares sin desglicosilar y un extracto desglicosilado con TFMS (Figura III.21) mediante un protocolo modificado del descrito por Edge *et al.*, (2003). Para ello, 100  $\mu$ g de proteína liofilizada procedente de

un extracto de NaOH se mezcló con 200  $\mu$ l de TFMS y 30  $\mu$ l de anisol. Transcurridas 5 h, la mezcla se neutralizó con N-etilmorfolina y finalmente se disolvió la muestra con acetona. Se liofilizó y el material resultante se solubilizó en agua destilada.



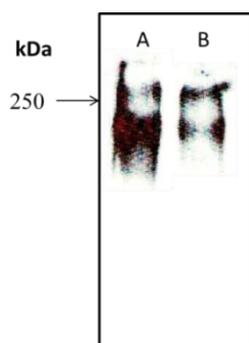
**Figura III.21. Desglicosilación química con TFMS.** (1) Extracto de NaOH sin desglicosilar. (2) Extracto de NaOH desglicosilado con TFMS y solubilizado en agua destilada. La inmunodetección se realizó con el anticuerpo 3H8.

El resultado confirmaba de nuevo que el antígeno no se detectaba después de haberse realizado desglicosilación química, de manera que la parte azucarada era responsable en parte de su actividad antigénica.

### III.B.6.3. $\beta$ -eliminación.

La  $\beta$ -eliminación es un proceso que rompe enlaces O-glicosídicos por tratamiento en condiciones alcalinas suaves. Con el objetivo de determinar la presencia de dichos tipos de enlaces en las manoproteínas de la pared celular de *C. albicans* y concretamente conocer qué importancia tienen en la antigenicidad de la proteína estudiada se quiso realizar una  $\beta$ -eliminación del material solubilizado de las paredes.

Se trataron las paredes con  $\beta$ -ME y el material solubilizado representaba alrededor de 100  $\mu$ g de proteína que fue incubado en presencia de borohidruro sódico en condiciones alcalinas suaves (0.5 M NaOH) durante 18 horas a 22°C. Finalizada la incubación, se neutralizó la reacción con ácido acético. Posteriormente, se realizó un western-blot con un control y el material sometido a  $\beta$ -eliminación (Figura III.22).



**Figura III.22.  $\beta$ -eliminación del material solubilizado con  $\beta$ -ME.**

(A) Material solubilizado con  $\beta$ -ME.

(B) Material solubilizado con  $\beta$ -ME con el que se realizó  $\beta$ -eliminación. La inmunodetección se realizó con el anticuerpo monoclonal 3H8.

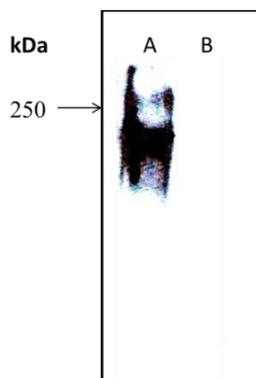
A la vista del resultado, no se observó ninguna diferencia en la detección de ambos materiales, lo cual apoyaba la hipótesis de que la mayoría de las manoproteínas solubilizadas por  $\beta$ -ME tienen pocos restos de manosa unidos mediante enlaces O-glicosídicos y por tanto el PM no varía en exceso teniendo además poca importancia en la antigenicidad de la proteína.

### III.B.6.4. Desglicosilación enzimática con Endo H.

La Endo H es una enzima hidrolítica producida por *Streptomyces plicatus*. Es capaz de desglicosilar una amplia variedad de glicoproteínas que contienen oligosacáridos formados por restos de manosa unidos mediante enlaces N-glicosídicos. La hidrólisis se produce a nivel de la unidad de di-N-acetilglucosamina, dejando un residuo de NAcGlc como resto reductor terminal del glúcido liberado, en tanto que el otro resto queda unido a la Asn del péptido.

Con la finalidad de conocer el tipo de enlace existente entre la parte proteica y el carbohidrato, los materiales solubilizados de las paredes celulares se trataron con endo- $\beta$ -N-acetilglucosaminidasa (Endo H), enzima que rompe los enlaces N-glicosídicos de las manoproteínas.

Con el material solubilizado con  $\beta$ -ME de paredes celulares desglicosilado con Endo H y el mismo material sin desglicosilar utilizado como control se realizó una electroforesis SDS-PAGE utilizándose para la inmunodetección el anticuerpo monoclonal 3H8 (Figura III.23).



**Figura III.23. Desglicosilación enzimática con Endo H.**  
 (A) Extracto de  $\beta$ -ME sin desglicosilar. (B) Extracto de  $\beta$ -ME desglicosilado con Endo H. Inmunodetección realizada con el anticuerpo monoclonal 3H8.

El resultado confirmó que el epítipo formado por parte azucarada unida a la parte proteica mediante enlaces N-glicosídicos fue altamente sensible a ser desglicosilado enzimáticamente debido a que no se detectó.

### **III.B.7. ANÁLISIS POR CROMATOGRAFÍA DE AFINIDAD DE LAS MANOPROTEÍNAS SOLUBILIZADAS DE LA PARED CELULAR.**

#### **III.B.7.1. Cromatografía de afinidad en Concanavalina A-Sepharose 4B<sup>®</sup>.**

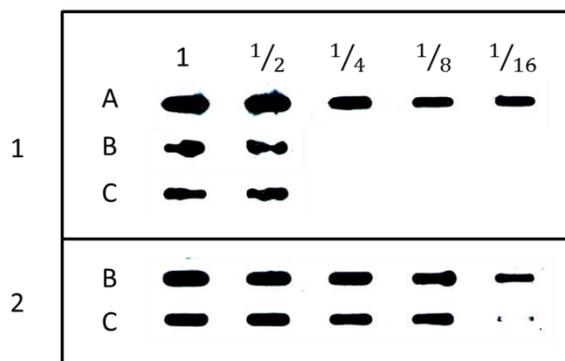
Para realizar una determinación cualitativa de la cantidad total de proteína reconocida por el anticuerpo monoclonal en comparación con todas las manoproteínas solubilizadas por  $\beta$ -ME de paredes celulares de *C. albicans*, se decidió realizar una cromatografía con Concanavalina A-Sepharose 4B<sup>®</sup>.

La Concanavalina A es una metaloproteína tetramérica aislada de *Canavalia ensiformis* que se une a moléculas que contienen residuos D-manosa, siendo necesaria la presencia de grupos hidroxilo en C-3, C-4 y C-5 para que tenga lugar la unión.

En la realización del experimento, se partió del material solubilizado con NaOH 30 mM de paredes celulares. Se liofilizó y el liófilo se disolvió en tampón 0.1 M acetato pH 6.0 conteniendo 1 M NaCl, 1 mM CaCl<sub>2</sub>, 1 mM MnCl<sub>2</sub> y 1 mM MgCl<sub>2</sub>, necesario para facilitar el acoplamiento con la resina. Posteriormente, la muestra se pasó por una columna de 3 cm de altura y 1 cm de diámetro. La columna fue lavada y la elución del material retenido se realizó con  $\alpha$ -metilmanósido 1M.

Una vez recogidas las fracciones y realizadas diluciones de éstas, se aplicaron en dos membranas de nitrocelulosa, una fue revelada con el anticuerpo monoclonal 3H8 y la otra membrana se reveló con un anticuerpo policlonal de levadura.

El resultado demostró que el antígeno presentaba el mismo comportamiento que el resto de manoproteínas, es decir, parte no quedaba retenida y era eliminada mediante lavado y otra parte era eluida, posiblemente fue debido a que la columna había quedado saturada (Figura III.24).



**Figura III.24. Dot-blot del material eluido por cromatografía de afinidad en Concanavalina A-Sepharose 4B.** (A) Material solubilizado con NaOH sin pasar por columna. (B) Material solubilizado no retenido. (C) Material solubilizado eluido con  $\alpha$ -metilmanósido; (1) Inmunodetección con anticuerpo monoclonal 3H8. (2) Inmunodetección con anticuerpo policlonal de levadura.

### III.B.7.2. Cromatografía de afinidad con proteína G sepharose.

La proteína G al igual que la proteína A, ambas aislada de cepas bacterianas (Proteína A de *Staphylococcus aureus* y Proteína C de *Streptococcus* spp), son muy utilizadas en inmunología por sus múltiples aplicaciones. Una de ellas, consiste en la purificación de anticuerpos cuando la proteína se encuentra unida a una resina de cromatografía. En el caso del anticuerpo monoclonal 3H8 que disponemos en el laboratorio, es una inmunoglobulina G1 de ratón, cuya fracción constante a diferencia de otros anticuerpos presenta mucha afinidad por la proteína G y muy poca por la proteína A (Tabla III.21).

La finalidad de este experimento, consistía en comprobar si la unión establecida entre el anticuerpo monoclonal y la proteína G unida covalentemente a la resina de cromatografía era lo suficientemente alta para poder realizar una purificación del antígeno reconocido por el anticuerpo.

SPECIES	SUBCLASS	PROTEIN A BINDING	PROTEIN G BINDING
Human	IgA	variable	-
	IgD	-	-
	IgG <sub>1</sub>	++++	++++
	IgG <sub>2</sub>	++++	++++
	IgG <sub>3</sub>	-	++++
	IgG <sub>4</sub>	++++	++++
	IgM	variable	-
Avian egg yolk	IgY	-	-
Cow		++	++++
Dog		++	+
Goat		-	++
Guinea pig	IgG <sub>1</sub>	++++	++
	IgG <sub>2</sub>	++++	++
Hamster		+	++
Horse		++	++++
Koala		-	+
Llama		-	+
Monkey		++++	++++
Mouse	IgG <sub>1</sub>	+	++++
	IgG <sub>2a</sub>	++++	++++
	IgG <sub>2b</sub>	+++	+++
	IgG <sub>3</sub>	++	+++
	IgM	variable	-
Pig		+++	+++
Rabbit		++++	+++
Rat	IgG <sub>1</sub>	-	+
	IgG <sub>2a</sub>	-	++++
	IgG <sub>2b</sub>	-	++
	IgG <sub>3</sub>	-	++
Sheep		+	++

**Tabla III.21. Especificidad de la proteína A y proteína G.** (Antibodies: A laboratory manual, Cold Spring Harbor Laboratory, 1988).

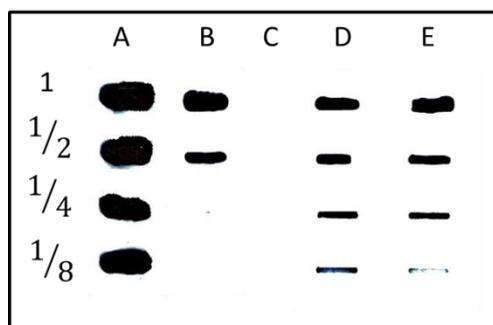
La cromatografía de afinidad con proteína G-sepharose se realizó de acuerdo a las instrucciones del kit comercial (GE-Healthcare® Bio-Science, Sweden) utilizándose un volumen de 200 µl de una solución del MAb 3H8 (1mg/ml en tampón TBS) y se mantuvo en incubación durante 30 minutos con agitación suave.

Después se centrifugó a 150 xg para recoger el anticuerpo no retenido, y la resina se lavó con tampón TBS, centrifugándose de nuevo para eliminar los restos de anticuerpo no unido.

Previamente a la unión covalente de la resina con el anticuerpo, la resina fue lavada con trietanolamina y por centrifugación a 150 xg fue recuperada, desechándose el sobrenadante. Se añadieron 400 µl de una solución 50 mM de DMP en 200 mM de trietanolamina pH 8.9, incubándose durante 60 min con agitación suave. Transcurrida la unión covalente se centrifugó a 150 xg recuperándose de nuevo la resina y se realizó un

lavado con trietanolamina. Finalmente, se llevó a cabo el bloqueo de los grupos activos de proteína G no unidos al anticuerpo monoclonal incubando la resina durante 15 min en presencia de etanolamina. Se terminó el proceso con dos lavados con tampón TBS.

Con las fracciones recogidas antes y después de tener lugar la unión covalente del anticuerpo con la proteína G y el bloqueo de los grupos activos de ésta, se elaboró un dot-blot (Figura III.25) que fue revelado utilizando exclusivamente el segundo anticuerpo (anti-inmunoglobulina de ratón acoplada a peroxidasa).



**Figura III.25. Dot-blot del material eluido por cromatografía de afinidad con proteína G-sepharose.**

(A) Anticuerpo monoclonal 3H8 con una concentración de 1 mg/ml. (B) Anticuerpo no retenido en un primer lavado con tampón TBS. (C) Anticuerpo no retenido después de realizar la unión covalente del anticuerpo con la proteína G. (D) y (E) Anticuerpo no retenido en lavados posteriores al bloqueo de los grupos activos de la proteína G.

Según el resultado obtenido, parece poco efectivo el sistema ya que la cantidad de anticuerpo monoclonal 3H8 eliminada como consecuencia de no encontrarse unido covalentemente a la proteína G sepharose fue muy alta. Una posibilidad podría ser que el anticuerpo presentara un tamaño bastante grande y por impedimento estérico no hubiera resultado suficientemente efectiva la columna de afinidad con proteína G.

### III.B.7.3. Cromatografía de afinidad con NHS-activated sepharose 4 fast flow<sup>®</sup>.

Debido a que el anterior sistema no funcionó correctamente, se decidió repetir el proceso con una resina NHS-activated sepharose 4 fast flow<sup>®</sup> (GE Healthcare<sup>®</sup>, Sweden). Esta resina presenta grupos N-hidroxisuccinimida que forman un acoplamiento amida químicamente estable con aquellos ligandos que

presentan grupos amino primario. Por sus características, proporciona una alta eficiencia en la inmovilización de ligandos peptídicos (Tabla III.22).

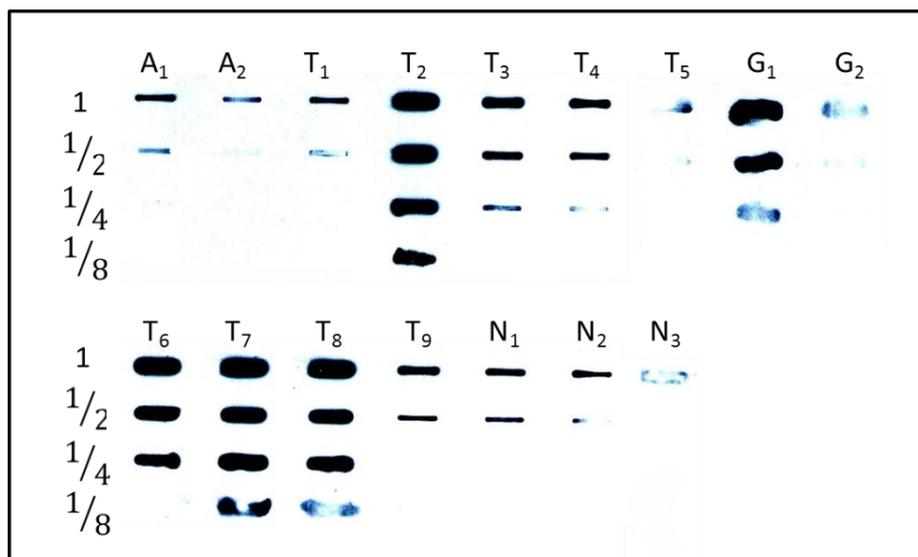
<b>Mean particle size</b>	90 $\mu\text{m}$
<b>Particle size range</b>	45-165 $\mu\text{m}$
<b>Bead structure</b>	Highly cross-linked 4% agarose, spherical
<b>Linear flow velocity*</b>	150 cm/h at 100 kPa
<b>Ligand density</b>	16-23 $\mu\text{mol NHS/ml}$ drained medium
<b>pH stability**</b>	3-13

**Tabla III.22. Características de NHS-activated Sepharose 4 fast flow<sup>®</sup>.** \*El flujo después del acoplamiento puede ser diferente dependiendo del ligando. \*\*Depende del ligando.

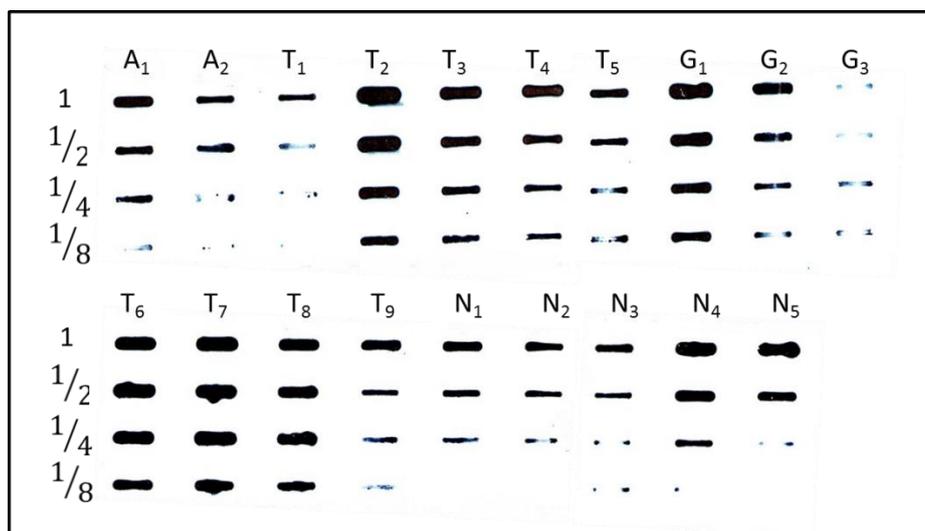
El experimento se orientó a la purificación del antígeno reconocido por el anticuerpo monoclonal teniendo en cuenta todos los problemas que se habían presentado al utilizar proteína G-sepharosa. De tal manera, que se realizó el acoplamiento del anticuerpo con la resina de forma covalente y para la elución del antígeno se decidió utilizar tampones que provocaran un cambio brusco de pH y como consecuencia la desestabilización del complejo antígeno-anticuerpo. Una vez recogidas todas las fracciones, para comprobar si el sistema respecto a la unión antígeno-anticuerpo y a la unión anticuerpo-resina había funcionado correctamente, se realizaron dos dot-blot en paralelo, uno se reveló exclusivamente con el segundo anticuerpo (anti-inmunoglobulina de ratón acoplada a peroxidasa) y el otro con el anticuerpo monoclonal 3H8 como primer anticuerpo y anti-inmunoglobulina de ratón acoplada a peroxidasa como segundo anticuerpo (Figuras III.26 y III.27).

Con los resultados obtenidos se dedujo que el sistema tampoco estaba funcionando correctamente al igual que pasaba con la cromatografía de afinidad con proteína G-sepharose. Gran parte del anticuerpo no quedaba retenido a la resina después de haber realizado la unión covalente y fue eliminado en los lavados con tampón TBS.

De manera, que la cromatografía de afinidad con NHS-activated sepharose 4 fast flow<sup>®</sup> no resultaba eficaz para realizar la purificación del antígeno reconocido por el anticuerpo monoclonal.



**Figura III.26. Dot-blot del material eluído de la cromatografía de afinidad NHS-activated sepharose 4 fast flow®.** (A<sub>1</sub>-A<sub>2</sub>) Anticuerpo no unido a la resina; (T<sub>1</sub>-T<sub>5</sub>) Lavados con tampón TBS; (G<sub>1</sub>-G<sub>2</sub>) Elución del antígeno con tampón glicina 0.1 M pH 2.8; (T<sub>6</sub>-T<sub>9</sub>) Lavados con tampón TBS; (N<sub>1</sub>-N<sub>3</sub>) Elución del antígeno con NH<sub>4</sub>OH 0.1 M pH 10.5. Inmunodetección realizada con anti-inmunoglobulina de ratón acoplada a peroxidasa.



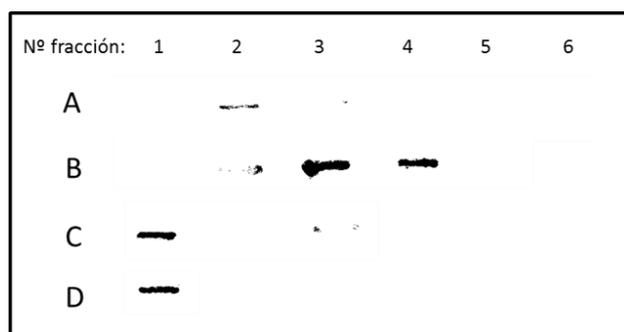
**Figura III.27. Dot-blot del material eluído de la cromatografía de afinidad NHS-activated sepharose 4 fast flow®.** (A<sub>1</sub>-A<sub>2</sub>) Antígeno no unido al anticuerpo; (T<sub>1</sub>-T<sub>5</sub>) Lavados con tampón TBS; (G<sub>1</sub>-G<sub>3</sub>) Elución del antígeno con tampón glicina 0.1 M pH 2.8; (T<sub>6</sub>-T<sub>9</sub>) Lavados con tampón TBS; (N<sub>1</sub>-N<sub>5</sub>) Elución del antígeno con NH<sub>4</sub>OH 0.1 M pH 10.5. Inmunodetección realizada con anticuerpo monoclonal 3H8 y anti-inmunoglobulina de ratón acoplada a peroxidasa.

### III.B.7.4. Cromatografía de afinidad con proteína A en condiciones de alta salinidad.

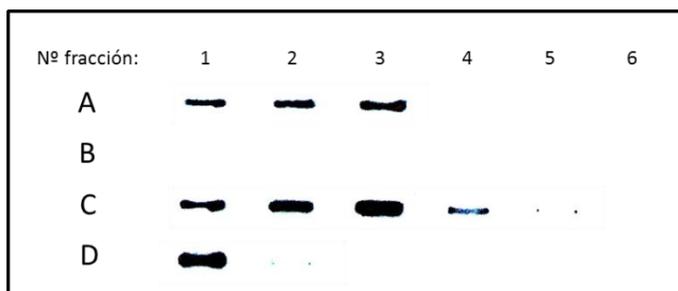
En condiciones normales, usando proteína A con IgG<sub>1</sub> de ratón la efectividad de unión es 1/10 comparada con otras subclases, pero si se cambian las condiciones de pH y concentración salina el nivel de efectividad puede aumentar. Para aumentar la efectividad, el tampón en que se encuentra el anticuerpo ha de ser de pH 9.0 y una concentración de NaCl 3 M. Este procedimiento permite un rango de unión de 2-5 mg de anticuerpo por mililitro de resina unida a proteína A, sin ser un problema el exceso de anticuerpo añadido.

La cromatografía se realizó utilizando como eluyentes tampón glicina 0.1 M pH 2.8 y trietanolamina 0.1 M pH 8.0. Para facilitar la unión covalente de la resina con la proteína A se empleó dimetilpimelidato a una concentración 20 mM en una solución que contenía 3 M de NaCl y 0.2 M de borato sódico a pH 9.0.

Se recogieron fracciones de la elución con los diferentes tampones y de lavados intermedios con tampón TBS, realizándose dos análisis dot-blot, en uno la inmunodetección se realizó exclusivamente con el segundo anticuerpo (anti-inmunoglobulina de ratón acoplada a peroxidasa) y en el otro con el anticuerpo monoclonal 3H8 como primer anticuerpo y anti-inmunoglobulina de ratón acoplada a peroxidasa como segundo anticuerpo (Figuras III.28 y III.29).



**Figura III.28. Dot-blot del material eluido de la cromatografía de afinidad con proteína A en condiciones de alta salinidad.** (A) Elución del antígeno con tampón glicina 0.1 M pH 2.8. (B) Lavado con tampón TBS. (C) Elución del antígeno con trietanolamina 0.1 M pH 8.0. (D) Lavado con tampón TBS. Inmunodetección realizada con anti-inmunoglobulina de ratón acoplada a peroxidasa.



**Figura III.29. Dot-blot del material eluido de la cromatografía de afinidad con proteína A en condiciones de alta salinidad.** (A) Elución del antígeno con tampón glicina 0.1 M pH 2.8. (B) Lavado con tampón TBS. (C) Elución del antígeno con trietanolamina 0.1 M pH 8.0. (D) Lavado con tampón TBS. Inmunodetección realizada con anticuerpo monoclonal 3H8 y anti-inmunoglobulina de ratón acoplada a peroxidasa.

Los resultados demuestran que la cromatografía de afinidad ha funcionado mejor que en casos anteriores, aunque sigue habiendo pérdida de anticuerpo en los lavados y en la elución con trietanolamina lo cual podría ser debido al gran exceso de anticuerpo añadido o bien, que la unión covalente del anticuerpo con la proteína A como consecuencia de impedimentos estéricos no ha sido totalmente correcta. En cuanto al antígeno unido al anticuerpo se eluye correctamente en la elución con glicina y trietanolamina respectivamente, pero en un lavado posterior a este último eluyente se sigue eliminando, por tanto la cromatografía de afinidad con proteína A en condiciones de alta salinidad es el sistema que mejor se aproxima a una posible purificación del antígeno pero a la vista de los resultados no parece completamente efectiva.

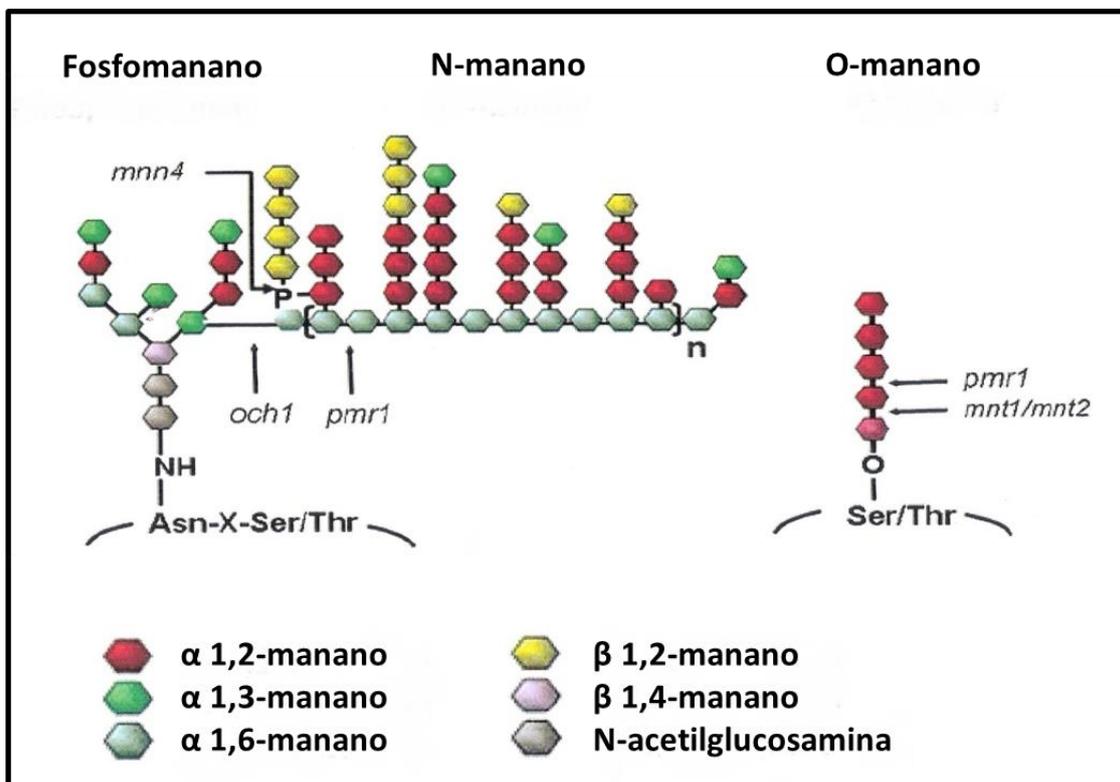
### **III.B.8. DOT-BLOT DEL MATERIAL SOLUBILIZADO DE LAS PAREDES CELULARES DE MUTANTES HOMOCIGÓTICOS.**

Con el propósito de mejorar la caracterización así como una posible identificación del antígeno reconocido por el anticuerpo monoclonal 3H8, se procedió a realizar un estudio de mutantes con disrupción en genes que codifican proteínas implicadas en la arquitectura de la pared celular.

#### **III.B.8.1. Estudio de mutantes deficientes en N- y O-glicosilación.**

El estudio se realizó con mutantes que presentan deficiencias en N- y O-glicosilación a diferentes niveles relacionadas con una disminución en el

reconocimiento, unión y fagocitosis de células de *C. albicans* por células polimorfonucleares, aunque la producción de citoquinas no es dependiente del grado de manosilación de la pared celular (Sheth *et al.*, 2011) (Figura III.30). Dichos mutantes deficientes en N- y O-glicosilación fueron cedidos por gentileza del Dr. Neil A.R. Gow del Instituto de Ciencias Médicas de la Universidad de Aberdeen (Reino Unido).



**Figura III.30.** Estructura del N-manano (incluyendo fosfomanano) y O-manano de *C. albicans*. Las moléculas glicosiladas se representan con hexágonos de diferentes colores y la zona de rotura en los mutantes se representa mediante flechas. La zona de rotura de la cadena principal de manano del mutante *pmr1* no es fija y no elimina todas las cadenas exteriores como sucede con el mutante *och1* (Adaptado de Sheth *et al.*, 2011).

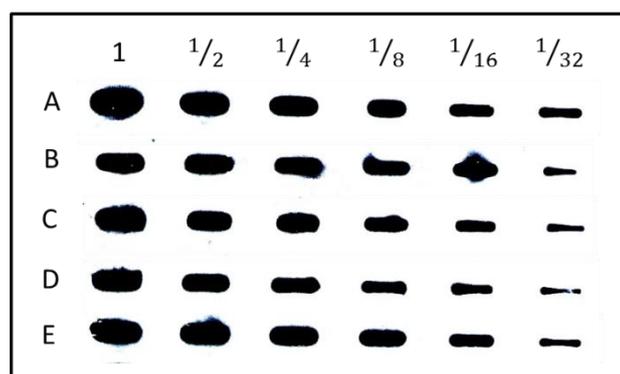
Una breve descripción de los mutantes se detalla a continuación:

- El mutante *och1* carece de una proteína α 1,6-manosiltransferasa responsable en el aparato de Golgi de unir el primer residuo de manosa mediante una unión α 1,6 al núcleo oligosacárido (Man<sub>8</sub>GlcNAc<sub>2</sub>) (Bates *et al.*, 2005).
- El mutante *pmr1* carece de la proteína Pmr1 implicada en proporcionar la concentración adecuada de Ca<sup>2+</sup> y Mn<sup>2+</sup> requeridos como cofactores por manosiltransferasas a nivel de N- y O-glicosilación, de manera que el mutante

nulo presenta un menor crecimiento en medios que contienen baja concentración de estos iones (Bates *et al.*, 2005).

- El doble mutante *mnt1/mnt2* presenta la disrupción de dos genes *MNT1* y *MNT2* que codifican  $\alpha$  1,2-manosiltransferasas responsables en el aparato de Golgi a nivel de O-glicosilación de catalizar la unión del 2° y 3° residuo de manosa.
- El mutante *mnn4* presenta la disrupción del gen *MNN4* que codifica una proteína implicada en la unión mediante un enlace fosfodiéster de manosilfosfato (uno a catorce residuos de manosa con uniones  $\beta$  1,2) a la cadena principal.

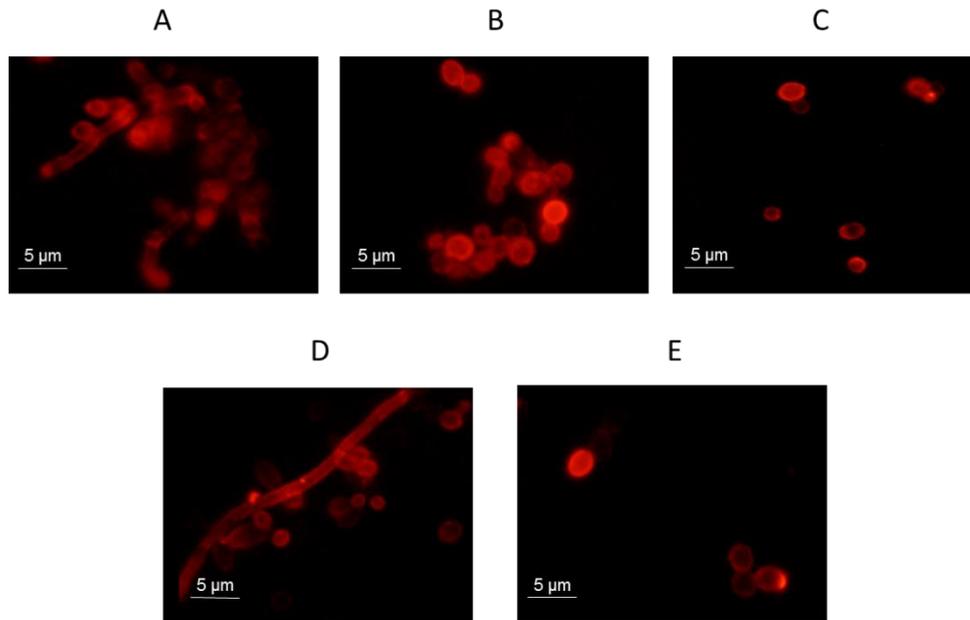
Se realizó un dot-blot con el material solubilizado por  $\beta$ -ME de paredes celulares de cada uno de los mutantes homocigóticos descritos anteriormente (Figura III.31).



**Figura III.31. Dot-blot del material solubilizado por  $\beta$ -ME de paredes de mutantes homocigóticos deficientes en N- y O- glicosilación.** (1) SC5314. (2) *och1*. (3) *pmr1*. (4) *mnt1/mnt2*. (5) *mnn4*. Inmunodetección realizada con el anticuerpo monoclonal 3H8.

El resultado demostró que a pesar de que los mutantes presentaban modificaciones en el grado de glicosilación, éstos no carecían del epítipo reconocido por el anticuerpo monoclonal.

A fin de completar el resultado obtenido, se realizó también inmunofluorescencia indirecta con células levaduriformes de los mutantes homocigóticos, obteniendo el mismo resultado positivo que con el dot-blot (Figura III.32).



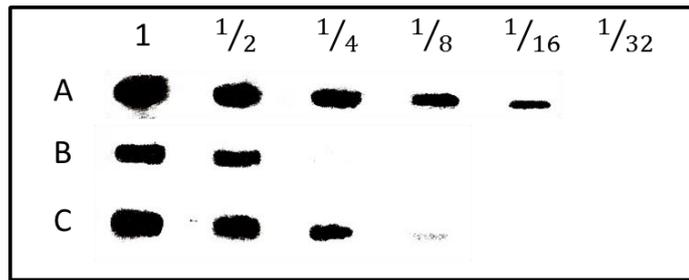
**Figura III.32. Inmunofluorescencia indirecta con células levaduriformes de mutantes homocigóticos deficientes en N- y O- glicosilación.** (A) *och1*. (B) *pmr1*. (C) *mnt1/mnt2*. (D) *mnn4*. (E) SC5314.

### III.B.8.2. Estudio de mutantes deficientes en O-glicosilación.

En *C. albicans* existe una familia de 5 genes denominados *PMT* que codifican proteínas O-manosiltransferasas que transfieren residuos de manosa desde dolicol-fosfato-manosa a residuos de serina y/o treonina. Se ha visto que los mutantes son viables a excepción del doble mutante *pmt1/pmt4*, y presentan cambios en la composición de la pared celular, de manera que las proteínas Pmt de forma individualizada y en conjunto son esenciales para el crecimiento y adhesión de células de *C. albicans* (Prill *et al.*, 2005).

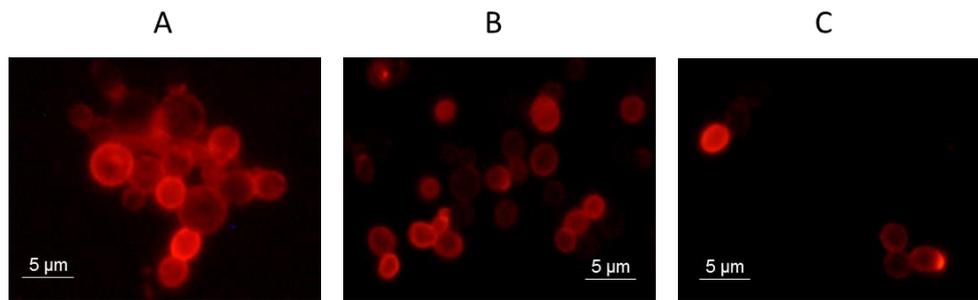
Este experimento fue posible gracias a la colaboración del Dr. J.F. Ernst del Instituto de Microbiología de la Universidad Heinrich-Heine de Düsseldorf (Alemania) que cedió las cepas correspondientes a los mutantes deficientes en O-glicosilación.

Se realizó un dot-blot del material solubilizado por  $\beta$ -ME de paredes celulares correspondientes a cepas que presentaban una doble mutación y el resultado obtenido demostró que la glicosilación de la proteína reconocida por el anticuerpo monoclonal no era dependiente de las proteínas codificadas por los genes de la familia *PMT* (Figura III.33).



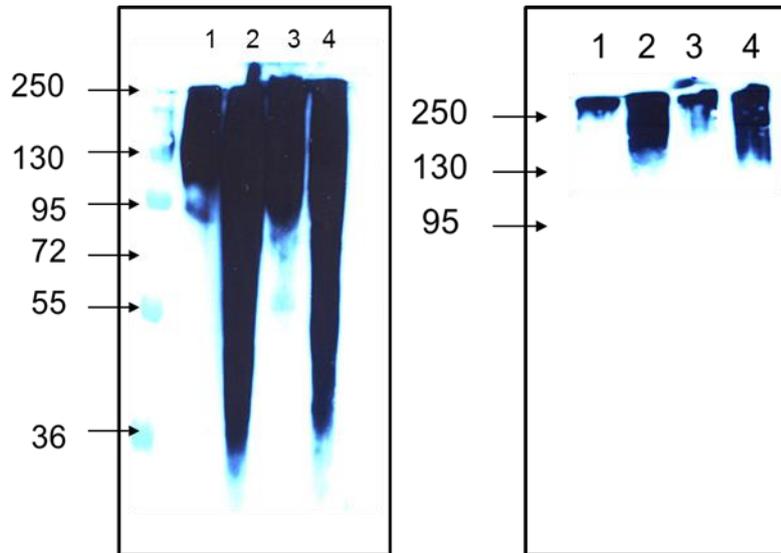
**Figura III.33. Dot-blot del material solubilizado por  $\beta$ -ME de paredes celulares de mutantes homocigóticos deficientes en O- glicosilación.** (1) SC5314. (2) *pmt6/pmt4-URA3*. (3) *pmt1/pmt6-URA3*. La inmunodetección se realizó con el anticuerpo monoclonal 3H8.

A fin de completar el resultado, se realizó inmunofluorescencia indirecta con células levaduriformes y al igual que en el apartado anterior, se observó que el antígeno se encuentra distribuido de manera homogénea en toda la superficie celular de los mutantes homocigóticos como en la cepa control (Figura III.34).



**Figura III.34. Inmunofluorescencia indirecta con células de mutantes homocigóticos deficientes en O-glicosilación.** (A) *pmt1/pmt6-URA3*. (B) *pmt6/pmt4-URA3*. (C) SC5314 (control).

Para comprobar si existían diferencias de movilidad electroforética de la proteína reconocida por el anticuerpo monoclonal 3H8 en el mutante homocigótico *pmt1/pmt6-URA3* respecto a la cepa control se realizó un western-blot con el material solubilizado de paredes celulares con  $\beta$ -ME y NaOH de ambas cepas utilizando para la inmunodetección el anticuerpo monoclonal 3H8 y el anticuerpo policlonal de levadura (Figura III.35).



**Figura III.35. Western-blot del material solubilizado por  $\beta$ -ME y NaOH de paredes celulares de la cepa SC5314 y de *pmt1/pmt6-URA3*.** (1) Extracto  $\beta$ -ME de paredes de SC5314. (2) Extracto de NaOH de paredes de SC5314. (3) Extracto  $\beta$ -ME de paredes del mutante *pmt1/pmt6-URA3*. (4) Extracto de NaOH de paredes del mutante *pmt1/pmt6-URA3*. (A) Inmunodetección con anticuerpo policlonal de levadura. (B) Inmunodetección con anticuerpo monoclonal 3H8.

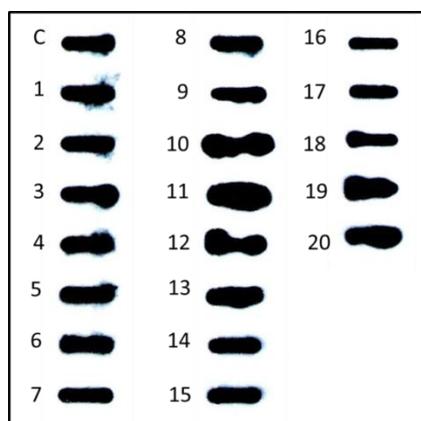
El resultado demostró que existe gran cantidad de proteínas en el material solubilizado de paredes celulares detectado con un anticuerpo policlonal de levadura y que el antígeno presentaba un elevado peso molecular, no habiendo cambios de movilidad en el mutante homocigótico respecto a la cepa control.

### III.B.8.3. Estudio de mutantes cuyos genes codifican proteínas con características bioquímicas semejantes a la proteína objeto de ser identificada.

Noble *et al.* (2010) queriendo conocer mejor la patogenicidad de *C. albicans*, así como los cambios morfológicos levadura-micelio, realizaron pruebas fenotípicas con alrededor de 3000 cepas de mutantes homocigóticos obtenidos, disrupcionando 674 genes que representa aproximadamente el 11% del genoma del microorganismo. De esta colección de mutantes se solicitaron especialmente aquellos mutantes que carecían de proteínas de pared celular, los cuales fueron cedidos por gentileza del Dr. A.D. Johnson del Departamento de Microbiología e Inmunología de la Universidad de California (San Francisco).

Se realizó un estudio con diecinueve cepas de mutantes homocigóticos a fin de intentar identificar la proteína reconocida por el anticuerpo monoclonal mediante un

dot-blot del material solubilizado por  $\beta$ -ME de paredes celulares. Todos los mutantes seleccionados dieron reacción positiva con el anticuerpo 3H8 demostrando que poseían el antígeno 3H8 (Figura III.36).



**Figura III.36. Dot-blot del material solubilizado por  $\beta$ -ME de paredes celulares de mutantes homocigóticos disrupcionados en genes que codifican proteínas con características bioquímicas semejantes a la proteína objeto de ser identificada. (C) SC5314. (1) *orf19.12732* (2) *rot11* (3) *iff11* (4) *msb2* (5) *orf19.2336* (6) *sap8* (7) *ecm14* (8) *pra1* (9) *sap98* (10) *cda2* (11) *sun41* (12) *bgl2* (13) *plb2* (14) *rbe1* (15) *wsc4* (16) *orf19.1392* (17) *msb2* (18) *tos1* (19) *kex2* (20) *rbt4*.**

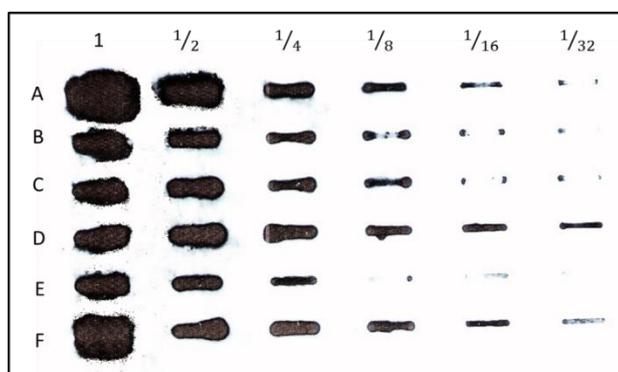
Según el resultado, el MAb 3H8 reconocía el material solubilizado por  $\beta$ -ME de paredes celulares de cada uno de los mutantes homocigóticos, por tanto, ninguna de las proteínas deletionadas en las cepas de los mutantes seleccionados se correspondía con el antígeno buscado.

Como consecuencia de que el antígeno no fue identificado y basándonos en datos obtenidos de proteínas identificadas mediante espectrometría de masas de los eluidos procedentes de las columnas de afinidad citadas en los apartados III.B.7.3 y III.B.7.4 (datos no presentados), del total de proteínas identificadas se eligieron seis porque presentaban características bioquímicas semejantes a las que podría tener la proteína reconocida por el anticuerpo monoclonal 3H8, tal como se detalla en la tabla III.23. De manera que se decidió realizar un estudio mediante dot-blot con los mutantes nulos viables correspondientes a estas proteínas citadas y respecto a la proteína Gca1 que carecía de mutante nulo descrito, se realizó previamente la interrupción del gen tal como se presenta en el siguiente capítulo de Resultados del presente trabajo.

Proteína	Peso molecular teórico	Sitios teóricos O-glicosilación	Sitios teóricos N-glicosilación	Anclaje GPI
Pga45	48,9 kDa	5	7	SI
Als1	132,8 kDa	116	15	SI
Gca1	105,6 kDa	9	11	NO
Eng1	124,0 kDa	10	11	NO
Sun42	39,4 kDa	12	2	NO
Scw1	39,2 kDa	27	0	NO

**Tabla III.23. Características de las proteínas estudiadas.** Pga45 (Plaine *et al.*, 2008), Als1 (Zhao *et al.*, 2004), Gca1 (Este trabajo), Eng1 (Esteban *et al.*, 2005), Sun42 (Firon *et al.*, 2007), Scw1 (Sandini *et al.*, 2007).

De nuevo, se realizó un dot-blot con el material solubilizado por  $\beta$ -ME de las paredes celulares de los mutantes homocigóticos que carecían de estas proteínas teniendo un resultado positivo en todos los casos (Figura III.37).



**Figura III.37. Dot-blot del material solubilizado por  $\beta$ -ME de mutantes homocigóticos.** (A) *pga45* (B) *als1* (C) *gca1* (D) *eng1* (E) *sun42* (F) *scw1*.

En nuestro laboratorio actualmente disponemos de los siguientes mutantes nulos: *pga13*, *pga26*, *pga31*, *pir1* y *pir32* con los que también se realizó un dot-blot del material solubilizado por  $\beta$ -ME de paredes celulares obteniéndose de nuevo un resultado positivo con la reacción del anticuerpo 3H8 (datos no presentados).



### **III.C. ESTUDIO DE LA PROTEÍNA Gca1.**



### III.C.1. SELECCIÓN *IN SILICO* DE Gca1, UNA PROTEINA POTENCIAL DE PARED.

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

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

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

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

A fin de determinar si la proteína Gca1 cuyo peso teórico es de 105.6 kDa y con once sitios teóricos de N-glicosilación podría ser reconocida por el anticuerpo monoclonal 3H8 se decidió realizar la disrupción del gen codificante y poder conocer el papel que desempeña en la pared celular. No presenta anclaje putativo GPI y es también conocida como *orf19.4899*, *AMYG1*, MP190, Contig4-2955\_0029, CA0855 e IPF22352.1. El estudio de las secuencias aminoacídicas de las proteínas Gca1 y Gca2 puso de manifiesto un elevado grado de homología entre ellas, tal como se muestra en la figura III.38.

## RESULTADOS

Gca1	MKLLSKVFTALGLTSIVNAAPTSSSSAEEAQKTVPELSIGVKQLPNIHNSAVDANAV	60
Gca2	MKLLSKVFAALGLSSIASAAPTSSSSAENAQKTVPELTLGVKQVPNILLNDTAVDANVA	60
	*****:***:*.*****:*****.**:***:*** **:****..	
Gca1	AKGYSLVNVSILTARGLTGILKKEATNIYGYDFEYLNLSVEYQSDTRLNVHIEPTDLTDV	120
Gca2	AKGYSLVNVTLTGRGLTGILKKEATNIYGYDFEYLNLSVEYQSDTRLNVHIEPTDLTDV	120
	*****:*.*****	
Gca1	FVLPEELVVKPKLEGDAKTFNFENSIDLVEYDEEDFGFEVLRSSSTREVLVSTKGNPLVFS	180
Gca2	FVLPEELVVKPKLEGDAKTFNFENSIDLVEYDEEDFGFEVLRSSSTREVLVSTKGNPLVFS	180
	*****	
Gca1	NQFIQFNTTLPKGSITGLGESIHGSLNEPGVVKTLYANDIADPIDGNIYGVHPVYDQR	240
Gca2	NQFIQFNTTLPKGSITGLGESIHGSLNEPGVVKTLFANDVGDPIIDGNIYGVHPVYDQR	240
	*****:***:.******	
Gca1	YDNTNTHGVYWRTSAIQEVVGETSLTWRALSGVIDLYFFSGPDPKDVIIQQYVSEIGLPA	300
Gca2	YDNTNTHAVYWRTSAIQEVVGETSLTWRALSGVIDLYFFSGPDPKDVIIQQYVSEIGLPA	300
	*:*****.*****	
Gca1	MQPYWALGYHQCRWGYDVTVESLETVVENFKKFDIPLLETIWSDDIDYMDGYKDFNDPYRFP	360
Gca2	MQPYWALGYHQCRWGYDVTVESLETVVENFKKFDIPLLETIWSDDIDYMDGYKDFNDPYRFP	360
	*****	
Gca1	TDKFRKFLDDLHNNSQHYPVIFDAAIYVNPNNATDDDYEPFHLGNESDVLKPNPDGSLY	420
Gca2	TDKFRKFLDDLHNNSQHYPVIFDAAIYVNPNNATDDDYEPFHLGNESDVLKPNPDGSLY	420
	*****	
Gca1	IGAVWPGYTVFPDFLANNTQEYWNKMKDWYERIPFDGIWDMNEVSSFCVSGCGTGRYF	480
Gca2	IGAVWPGYTVFPDFLANNTQEYWNKMKDWYERIPFDGIWDMNEVSSFCVSGCGTDRYF	480
	*****.***	
Gca1	DNPVHPPFEVGYSGSDYPLGFDKSNASEWKSISEAAAATKTTTTSSSTSTSIDGKNTLA	540
Gca2	DNPVHPPFEVGYSGSDYPLGFDKSNASEWKSISEAAAATKTTTTSSSASTSIDGKNTLA	540
	*****:*****	
Gca1	PGKANINYPPYAINNNQGDHGLATHAISPETHADGTVEYDIHNIYGLIQERAIYEALLE	600
Gca2	PGKGININYPPYAINNDQGDHDLATHAISPETHADGTVEYDIHNIYGLIQERAIYEALLE	600
	***.*****:***.*****	
Gca1	IHPNKRPFIIIGRSSFAGSGKYMGHWGGDNYADYYMMYFSIPQALSMGLSGIPFFGV DACG	660
Gca2	IHPNKRPFIIIGRSSFAGSGKYMGHWGGDNYADYYMMYFSIPQALSMGLSGIPFFGV DACG	660
	*****	
Gca1	FNGNTDMELC SRWMLASFFPFYRNHNVLGAIQEPYVWEGVMNATKTSINVRYSLLPYY	720
Gca2	FNGNTDMELC SRWMLASFFPFYRNHNVLGAIQEPYVWEAVMKATKTSINVRYSLLPYY	720
	*****.**:*****	
Gca1	YTLHESHVTGIPIMRAFNWQFPYSKELAGVDTQFFVGDALLVTPVLEPGVNHTKGIFFG	780
Gca2	YTLHESHVTGIPIMRAFNWQFPYSKELAGVDTQFFVGDALLVTPVLEPGVNHTKGIFFG	780
	*****	
Gca1	ENAVYYDFYTHKKQKFTAGKNETLAAPLGHIPHLIKGNIIPTQEPGYTTTESRKNPFGL	840
Gca2	ENAVYYDFYTHKKQKFTAGKNETLAAPLGHIPHLIKGNIIPTQEPGYTTTESRKNPFGL	840
	*****	
Gca1	LVALDAEGTASGKLYLDDGESVDVEEALYVDFVASKNKLVASVFGEYEVQRPLANVTILG	900
Gca2	LVALDAEGTASGKLYLDDGESVDVEEALYVDFVASKNKLVASVFGEYEVQRPLANVTILG	900
	*****	
Gca1	VDSEPKKVLFNNETVSHNYENGAVYLTDLKFTKEGAFEEFSIQW	946
Gca2	VDSEPKKVLFNNETVSHKYENGAVYLTDLKFTKEGAFEEFTLQW	946
	*****:*****:***	

Figura III.38. Homología entre Gca1 y Gca2 de *C. albicans*.

Para conocer el grado de homología que presentaba la secuencia de aminoácidos de la proteína Gca1 se comparó su secuencia con las de otras proteínas de distintas bases de datos, utilizando el programa BLAST y FASTA



## RESULTADOS

---

Los porcentajes de homología entre la proteína Gca1 de *C. albicans* y las proteínas citadas anteriormente se detallan en la tabla III.24.

REFERENCIA	PROTEÍNA	ESPECIE	% HOMOLOGIA
XP 002549000.1	Mya-3404	<i>C. tropicalis</i>	81 %
EGW 32344.1	Nrr1 y-27907	<i>S. passalidarum</i>	76 %
BAE 20170.1	$\alpha$ -glucosidasa	<i>D. occidentalis</i>	72 %
CAF 31354.1	$\alpha$ -glucosidasa	<i>S. fibuligera</i>	71 %

Tabla III.24. Comparación del porcentaje de homología de la proteína Gca1 de *C. albicans* y las proteínas Mya-3404 de *Candida tropicalis*, Nrr1 y-27907 de *Spathaspora passalidarum*,  $\alpha$ -glucosidasa de *Debaryomyces occidentalis* y  $\alpha$ -glucosidasa de *Saccharomyces fibuligera*.

### III.C.2. ANÁLISIS DE LA REGIÓN CODIFICANTE.

#### III.C.2.1. Composición de bases.

La composición nucleotídica de la ORF correspondiente al gen *GCAI* es A (30%); T (33%); G (19%) y C (18%), siendo el contenido en A+T del 63%, dato en consonancia con la frecuencia descrita para *C. albicans* (Odds, 1988; Brown *et al.*, 1991).

#### III.C.2.2. Frecuencia del uso de codones.

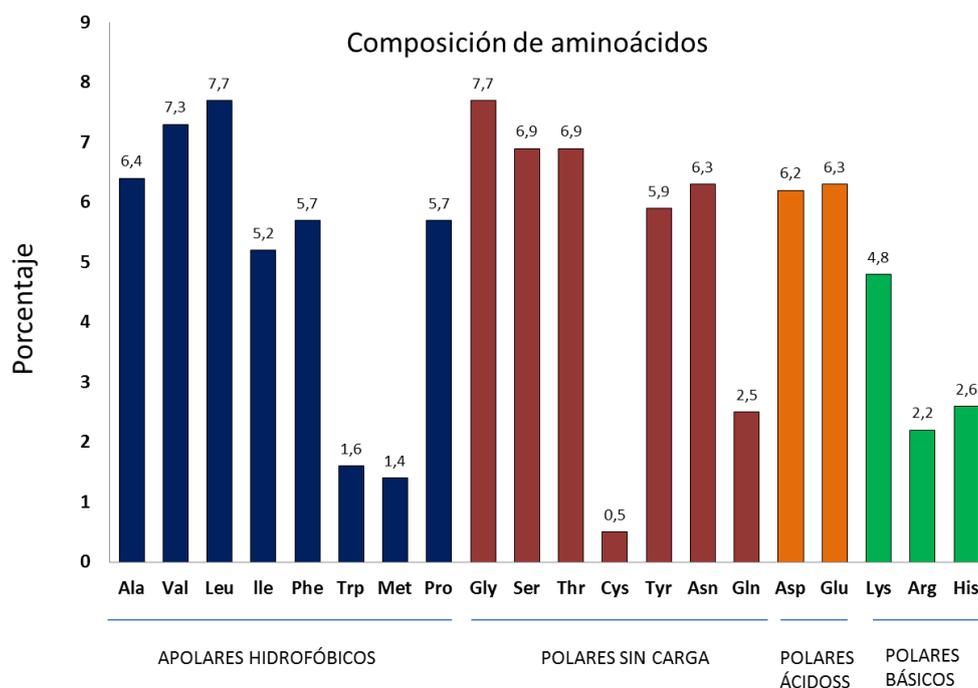
Se ha demostrado la existencia de una relación directa entre el uso de codones sinónimos y el grado de expresión de un gen, de manera que los genes que están altamente expresados utilizan determinados codones sinónimos mientras que los genes de un menor nivel de expresión utilizan todos los codones sinónimos de una manera aleatoria (Grosjean y Friers, 1982). En la tabla III.25 se recoge la frecuencia del uso de codones del gen *GCAI*. Se observa una clara tendencia en usar preferentemente los codones que terminan en T o A, tendencia descrita para *C. albicans* (Brown *et al.*, 1991; Lloyd y Sharp, 1992).

Codón	aa	N	%												
TTT	Phe	27	2.8	TCT	Ser	20	2.1	TAT	Tyr	32	3.4	TGT	Cys	5	0.5
TTC	Phe	27	2.8	TCC	Ser	9	0.9	TAC	Tyr	24	2.5	TGC	Cys	0	0.0
TTA	Leu	22	2.3	TCA	Ser	21	2.2	TAA	---	1	0.1	TGA	---	0	0.0
TTG	Leu	35	3.7	TCG	Ser	2	0.2	TAG	---	0	0.0	TGG	Trp	15	1.6
CTT	Leu	13	1.4	CCT	Pro	11	1.1	CAT	His	15	1.6	CGT	Arg	6	0.6
CTC	Leu	3	0.3	CCC	Pro	0	0.0	CAC	His	10	1.0	CGC	Arg	0	0.0
CTA	Leu	0	0.0	CCA	Pro	43	4.5	CAA	Gln	24	2.5	CGA	Arg	0	0.0
CTG	Ser	0	0.0	CCG	Pro	0	0.0	CAG	Gln	0	0.0	CGG	Arg	0	0.0
ATT	Ile	40	4.2	ACT	Thr	39	4.1	AAT	Asn	33	3.5	AGT	Ser	10	1.0
ATC	Ile	6	0.6	ACC	Thr	7	0.7	AAC	Asn	27	2.8	AGC	Ser	3	0.3
ATA	Ile	3	0.3	ACA	Thr	19	2.0	AAA	Lys	34	3.6	AGA	Arg	15	1.6
ATG	Met	13	1.4	ACG	Thr	0	0.0	AAG	Lys	11	1.2	AGG	Arg	0	0.0
GTT	Val	46	4.8	GCT	Ala	31	3.3	GAT	Asp	51	5.4	GGT	Gly	55	5.8
GTC	Val	6	0.6	GCC	Ala	12	1.3	GAC	Asp	8	0.8	GGC	Gly	4	0.4
GTA	Val	8	0.8	GCA	Ala	18	1.9	GAA	Glu	53	5.6	GGA	Gly	12	1.3
GTG	Val	9	0.9	GCG	Ala	0	0.0	GAG	Glu	7	0.7	GGG	Gly	2	0.2

**Tabla III.25. Uso de codones en el gen *GCAI*.** N simboliza el número de veces que aparece el codón en la proteína y % el porcentaje de aparición de codones respecto al total.

### III.C.2.3. Análisis de la secuencia de aminoácidos.

La composición de aminoácidos se detalla en la figura III.40. Como se puede observar los aminoácidos más representados son glicina (7.7%), leucina (7.7%), treonina (6.9%) y serina (6.9%).

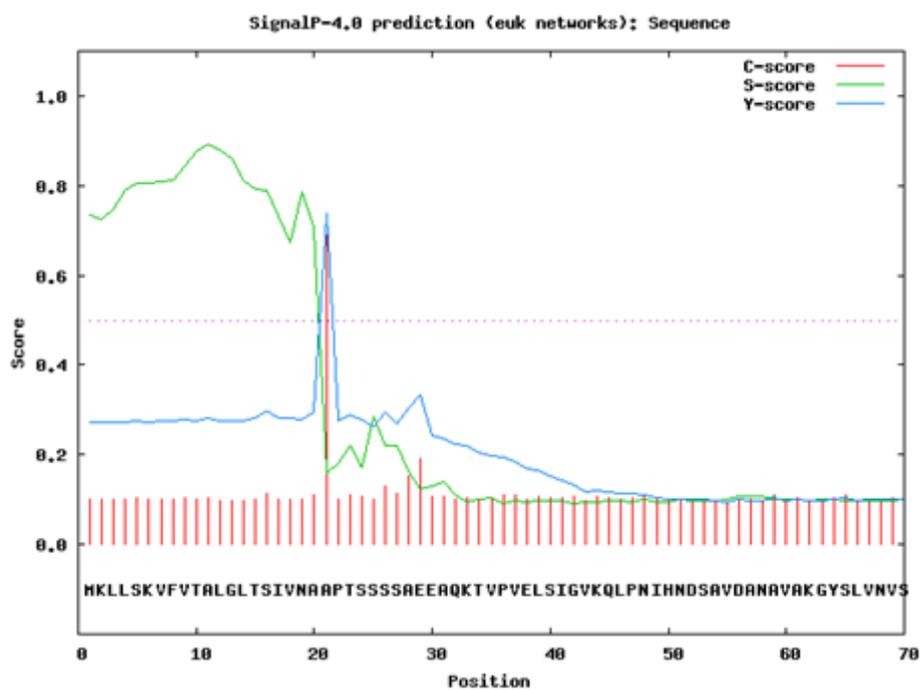


**Figura III.40. Composición en aminoácidos de la proteína *Gca1*.**

## RESULTADOS

El estudio de su secuencia peptídica puso de manifiesto una serie de características que se detallan a continuación:

1. La proteína Gca1 contiene 946 aminoácidos, presenta un peso molecular teórico de 105.6 kDa y un punto isoeléctrico de 4.51.
2. Presencia de un péptido señal típico en la región N-terminal (Von Heijne, 1986) y un posible sitio de corte entre las posiciones 20 y 21 (Figura III.41) determinado mediante el empleo del programa Signal P-NN.
3. Según la secuencia predicha encontramos 11 posibles sitios teóricos de N-glicosilación (Figura III.42) según el programa NetNGlyc 1.0
4. La proteína madura posee 9 sitios teóricos de O-glicosilación según el programa NetOGlyc 3.1
5. No presenta pseudorepeticiones internas en su secuencia aminoacídica.
6. Presencia de cinco cisteínas.



**Figura III.41. Predicción teórica de la existencia de péptido señal mediante el empleo del programa SignalP 4.0 Server.** Se aprecia la presencia de un sitio teórico de procesamiento por la peptidasa señal entre los aminoácidos 20 y 21.

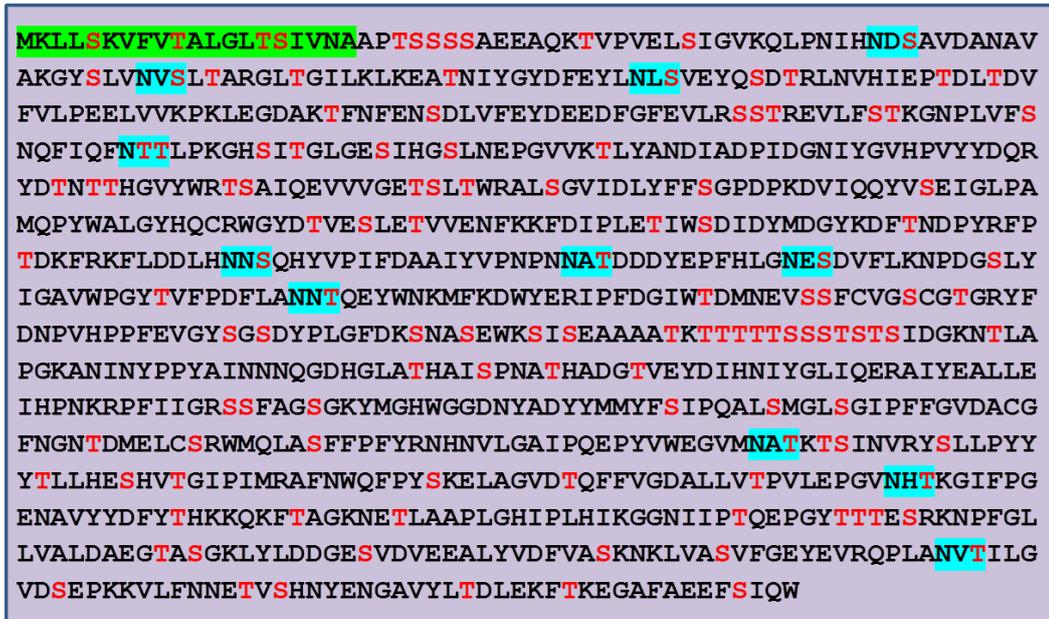


Figura III.42. Secuencia aminoacídica de la proteína Gca1. La secuencia de aminoácidos correspondiente al péptido señal se encuentra resaltado en verde, los residuos de serina y treonina se han resaltado en rojo y los sitios teóricos de N-glicosilación se encuentran marcados en azul.

### III.C.2.4. Hidrofobicidad de la proteína Gca1.

Se realizó un análisis de la hidrofobicidad de la proteína Gca1 representándola en la escala Kyte-Doolittle (Figura III.43). En esta escala, las regiones con valores superiores a 0 presentan un carácter hidrofóbico, y las regiones por debajo de 0 un carácter hidrofílico.

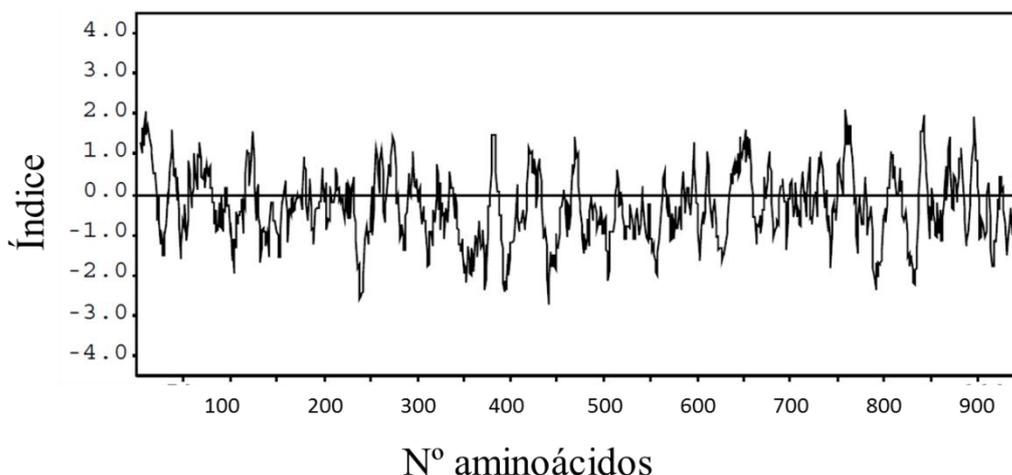
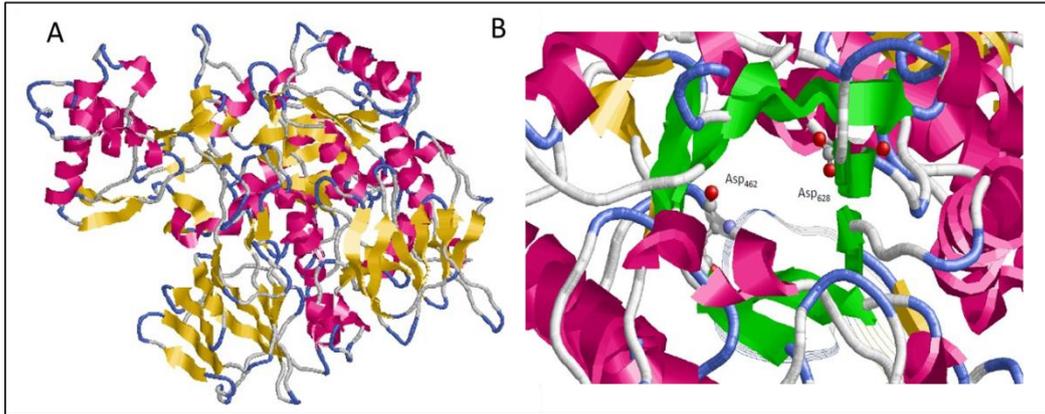


Figura III.43. Perfil hidrofóbico de la proteína Gca1. Los valores por encima de la línea horizontal indican las regiones hidrofóbicas y los valores por debajo de la línea representan las regiones hidrofílicas.

### III.C.3. MODELO DE HOMOLOGÍA DE Gca1.

Para la obtención del modelo de homología de Gca1 se utilizaron los servidores JIGSAW y PHYRE (Bates *et al.*, 2001). La estructura de Gca1 se pudo predecir utilizando como molde la glucoamilasa-maltasa humana (MGAM) (PDB entry: 2QMJ). La búsqueda en bases de datos de proteínas demostró que Gca1 tenía una secuencia y estructura similar a las  $\alpha$ -glucosidasas de la familia glicosil hidrolasa 31 ( $\alpha$ -glucosidasas de *E.coli* y *Sulfolobus sulfataricus*) (Henrissat y Davies, 1997) (Figura III.44.(A)). Posteriormente se realizaron alineamientos entre ellas y se obtuvo la información que el dominio de la proteína Gca1 estaba formado por ocho  $\alpha$ -hélices y ocho  $\beta$ -hélices. Se encontraron dos regiones conservadas en las hélices  $\beta$ -4 y  $\beta$ -6, incluyendo los dos residuos catalíticos típicos de la familia glicosil hidrolasa 31, Asp<sub>462</sub> y Asp<sub>628</sub> que actuarían como sitio catalítico nucleófilo y catalítico ácido/base respectivamente (Figura III.44.(B)).

La proteína Gca1 contiene la secuencia catalítica WxDMNE, siendo “x” una posición variable y en *C. albicans* es una treonina (T). Este grupo está presente en enzimas con actividades  $\alpha$ -glucosidasa, glucoamilasa,  $\alpha$ -xilosidasa y maltasa-glucoamilasa, a diferencia de la  $\alpha$ -xilosidasa de *E. coli*, representativa de estructuras bacterianas y que contiene la secuencia invariable KTDFGE (Lovering *et al.*, 2005). Respecto a la estructura propuesta por el modelo Gca1 reveló que son muy similares en su arquitectura. El sitio catalítico ( $\beta/\alpha$ )<sub>8</sub> (Tyr<sub>253</sub>-Ile<sub>748</sub>) está estructuralmente conservado.  $\beta$ 1 (His<sub>310</sub>-Arg<sub>313</sub>),  $\alpha$ 1 (Val<sub>319</sub>-Lys<sub>331</sub>),  $\beta$ 2 (Thr<sub>338</sub>-Ser<sub>341</sub>),  $\alpha$ 2 (Phe<sub>367</sub>-His<sub>372</sub>),  $\beta$ 3 (His<sub>377</sub>-Asp<sub>383</sub>),  $\alpha$ 3 (Asn<sub>437</sub>-Asp<sub>449</sub>),  $\beta$ 4 (Asp<sub>458</sub>-Glu<sub>462</sub>),  $\alpha$ 4 (Ile<sub>584</sub>-Ile<sub>601</sub>),  $\beta$ 5 (Phe<sub>608</sub>-Gly<sub>611</sub>),  $\alpha$ 5 (Ser<sub>618</sub>-Lys<sub>620</sub>),  $\beta$ 6 (His<sub>623</sub>-Asn<sub>626</sub>),  $\alpha$ 6 (Met<sub>634</sub>-Leu<sub>648</sub>),  $\beta$ 7 (Phe<sub>654</sub>-Val<sub>656</sub>),  $\alpha$ 7 (Met<sub>667</sub>-Ala<sub>677</sub>),  $\beta$ 8 (Arg<sub>684</sub>-Asn<sub>687</sub>) y  $\alpha$ 8 (Ala<sub>705</sub>-Val<sub>729</sub>). Además las siete regiones típicas (I a VII) y los residuos 16 y 17 (Tyr<sub>316</sub>, Asp<sub>342</sub>, Asp<sub>462</sub>, Glu<sub>465</sub>, Trp<sub>625</sub>, Asp<sub>628</sub>, Gly<sub>650</sub>, Gly<sub>660</sub>, Pro<sub>681</sub>, Arg<sub>684</sub>, Arg<sub>713</sub>, Leu<sub>717</sub>, Tyr<sub>721</sub>, Gly<sub>731</sub> y Gly<sub>809</sub>) en GH31 propuesto por Kashiwabara *et al* (2000) están conservados, con la única excepción del residuo de Trp entre Asp<sub>628</sub> y Gly<sub>650</sub> que no se ha detectado en la glucoamilasa de *C. albicans*, donde Tyr<sub>637</sub> puede realizar su función. En el plegamiento, los residuos de asparragina (Asp<sub>462</sub> y Asp<sub>628</sub>) fueron los últimos de las hélices  $\beta$ -4 y  $\beta$ -6 en el barril ( $\beta/\alpha$ )<sub>8</sub>, respectivamente.



**Figura III.44. Representación esquemática de la estructura de la proteína Gca1 de *C. albicans*.**

(A) Estructura secundaria de la proteína Gca1 predecida utilizando la glucoamilasa-maltasa humana (PDB: 2QMJ) como modelo. La figura fue generada con RasMol (Bernstein, 2000). (B) Representación esquemática de la estructura central de Gca1 de *C. albicans*. El diagrama representa el dominio de la familia glicosil hidrolasa 31. Los aminoácidos catalíticos son Asp<sub>462</sub>: nucleófilo catalítico al final de la hoja  $\beta_4$  y Asp<sub>628</sub>: ácido/base catalítico al final de la hoja  $\beta_6$ .

### III.C.4. CONSTRUCCIÓN DEL CASETE DE INTERRUPCIÓN PARA EL GEN *GCA1*.

Con el objetivo de conocer si la proteína Gca1 podría ser reconocida por el anticuerpo monoclonal 3H8 tal como se ha mencionado en el capítulo III.B de resultados, se decidió realizar la obtención del mutante nulo *gca1*. Para 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 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 llevar a cabo 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 como el medio YNB, de esta manera podemos seleccionar los transformantes en este medio. Sin embargo esta cepa presenta otras mutaciones en otros dos genes como consecuencia del proceso de disrupción del gen *URA3*, lo que la hace una cepa con un fondo genético alterado.

Para el estudio de genes por interrupción de los mismos es importante poder trabajar con una cepa con un fondo genético no modificado en laboratorio, es decir, una cepa silvestre por ejemplo de un aislado clínico como la cepa SC5314 ampliamente usada en laboratorio y de la cual se ha hecho la secuenciación de su genoma. Por todas estas características, 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 estreptomicina (derivado o de la misma familia), 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 adaptado a *C. albicans* (*CaSAT1*) (Streptotricin Acetil Transferasa) bajo el promotor constitutivo del gen *ACT1*, para la selección de transformantes, y el gen *CaFLP1* (gen que codifica para la flipasa Flp), 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 que flanquean el casete (Figura III.45).

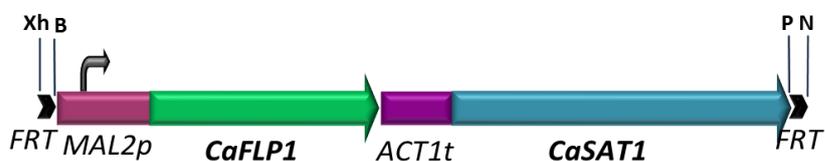


Figura III.45. Esquema del casete de interrupción del plásmido pSFS2.

Para la interrupción génica era necesaria la construcción de un plásmido en el que el casete pSFS2, estuviera flanqueado por secuencias del gen *GCA1*, correspondientes a las regiones nucleotídicas 5' y 3' de este gen (Figura III.46). 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 *GCA1* e interrumpiendo de esta manera el gen selectivamente.



Figura III.46. Plásmido pSFS2 que contiene el gen *SAT1* (Reuss *et al.*, 2004), utilizado para la construcción del casete de interrupción del gen *GCA1*.

La construcción del casete se hizo en dos pasos. Primero, mediante PCR, usando los oligonucleótidos F1-5' y F1-3' (véase Tabla II.4. de Materiales y Métodos), se obtuvo el amplicón F1 de 471 pb que contenía los puntos de corte para *KpnI* y *XhoI*. El amplicón F1 se digirió con estas enzimas de restricción y se subclonó en el plásmido pSFS2 (Figura III.45) que contenía el gen *SAT1* (Reuss *et al.*, 2004). El plásmido resultante se llamó pSFS2A/F1 y contenía la región 5' del gen.

En el segundo paso se obtuvo el amplicón F2 de 562 pb mediante el empleo de los oligonucleótidos F2-5' y F2-3' (véase Tabla II.4. de Materiales y Métodos). El amplicón F2 y el plásmido pSFS2A/F1, se digirieron con *NotI* y *SacI* y se ligaron generándose el plásmido pSFS2A-F1-F2 conteniendo el casete que se emplearía para interrupción del gen *GCA1* (Figura III.47).

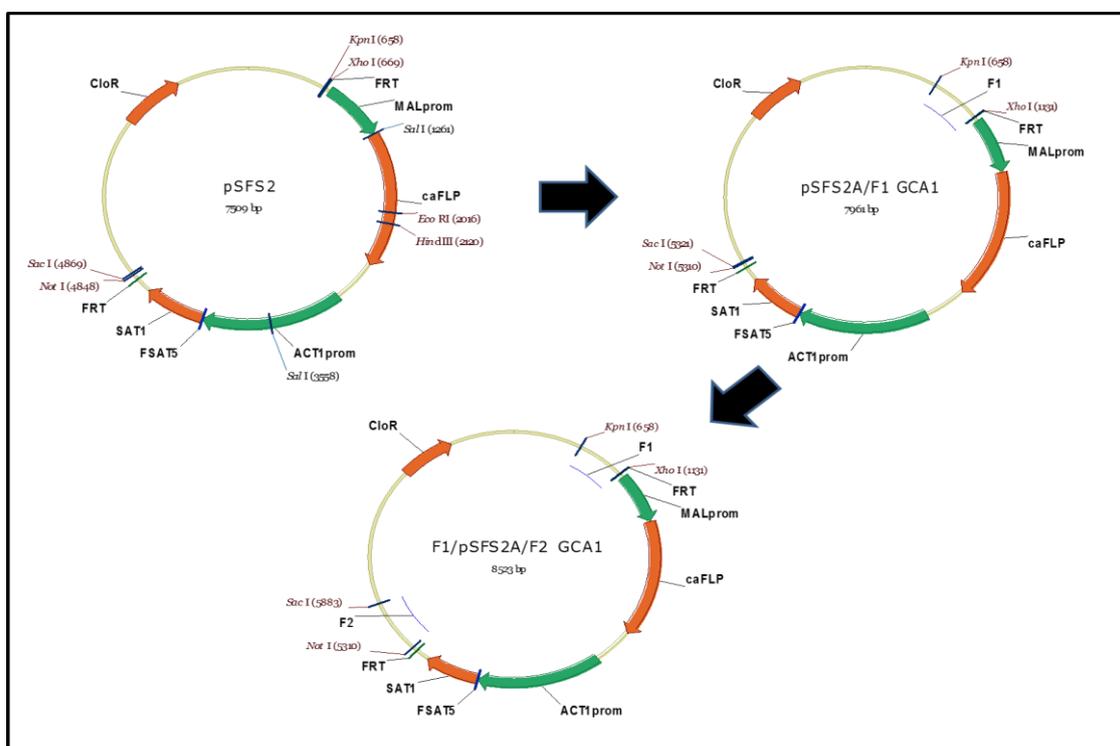


Figura III.47. Esquema de la construcción del plásmido pADG (F1/pSFS2A/F2) conteniendo el casete de interrupción para el gen *GCA1*.

### III.C.5. OBTENCIÓN DEL MUTANTE HOMOCIGÓTICO PARA EL GEN *GCA1*.

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.10 de Materiales y Métodos, para la interrupción del gen *GCA1*. Para tal proceso, se empleó de 3 a 5  $\mu\text{g}$  de ADN del plásmido F1/pSFS2A/F2 que fue digerido previamente con *KpnI* y *SacI*, enzimas que permiten liberar el casete (Figura III.47). De esta forma se permite la integración por recombinación homóloga del casete que contiene el gen *SAT1* en el locus correspondiente del gen *GCA1* (Figura III.48).

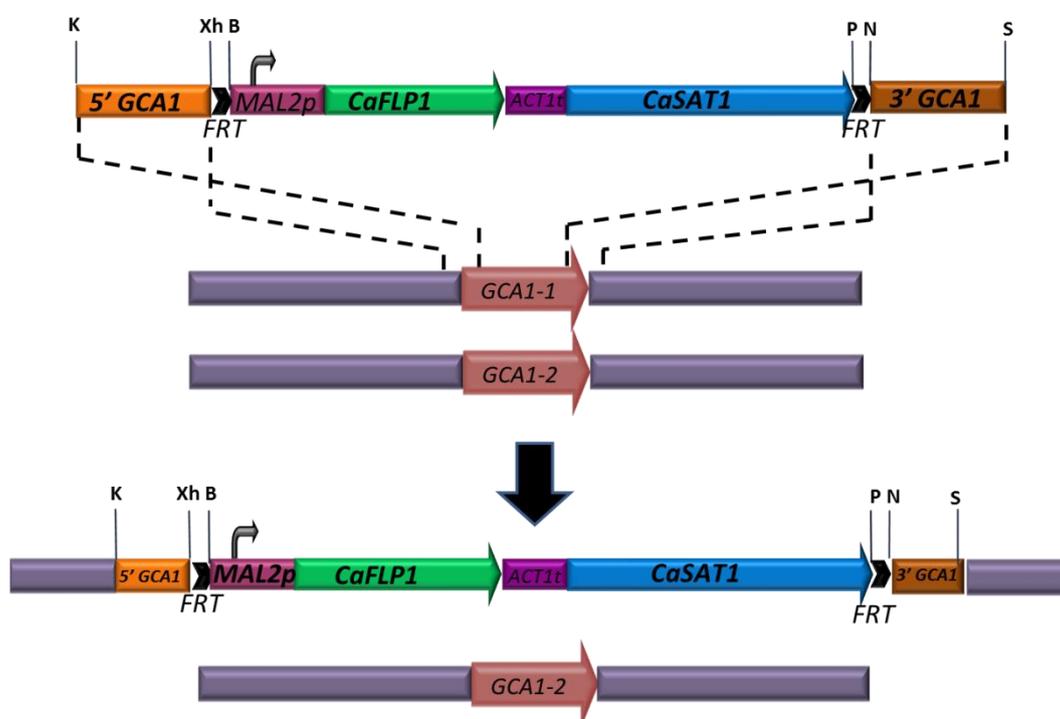
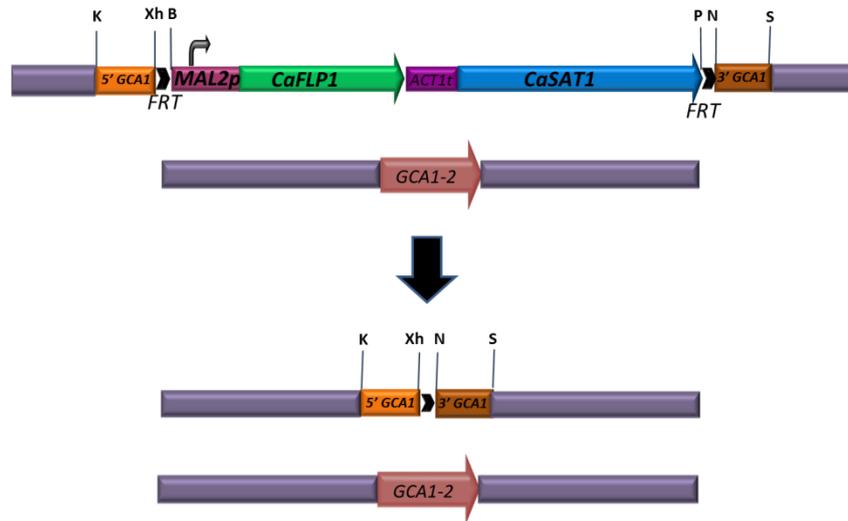


Figura III.48. Esquema de inserción del casete de interrupción en un alelo de *GCA1*, mediante recombinación homóloga.

La selección de los transformantes se realizó en placas de YPD conteniendo nourseotricina 200  $\mu\text{g}/\text{ml}$ . Las cepas identificadas por PCR como mutantes en uno de los dos alelos de *GCA1* se nombraron  $\text{GCA1H}^{\text{R}}$ .

Tras esta transformación, las cepas identificadas como  $\text{GCA1H}^{\text{R}}$  se sembraron en medio YPM para que se expresara el gen *CaFLP* que se encuentra en el casete de interrupción ahora integrado en el locus del gen *GCA1*. 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 nourseotricina (Figura III.49).

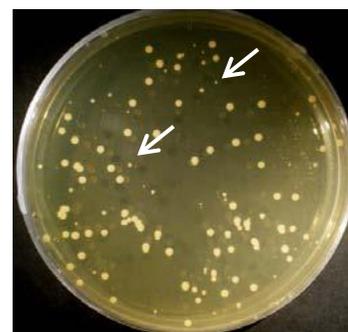


**Figura III.49. Esquema de inserción del casete de interrupción en un alelo del gen *GCA1* mediante recombinación homóloga.**

Seguidamente se seleccionaron aquellas células que habían perdido la resistencia a este antibiótico mediante la siembra en YPD sólido conteniendo distintas concentraciones de nourseotricina (entre 10 y 25  $\mu\text{g/ml}$ ). Aprovechando que las cepas sensibles a nourseotricina 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.50), que eran los transformantes sensibles nombrados  $GCA1H^S$ . De esta forma se consiguió la interrupción de un alelo.



**NTC 200  $\mu\text{g/ml}$**



**NTC 10  $\mu\text{g/ml}$**

**Figura III.50. Placas resultantes de la transformación.** A) transformantes con el gen *SAT1* integrado en el locus *GCA1*. B) transformantes sensibles a nourseotricina al haber perdido la resistencia a dicho antibiótico.

## RESULTADOS

A partir de la cepa heterocigótica  $GCA1H^S$  se repitió el mismo proceso de transformación empleando el casete de interrupción descrito y así se consiguió interrumpir el segundo alelo para obtener la cepa mutante homocigótica correspondiente al gen *GCA1* (Figura III.51). También se analizaron los transformantes mediante PCR. La cepa identificada como mutante nulo con el casete integrado se nombró como  $GCA1\emptyset^R$  y tras el cultivo en medio YPM se aisló la cepa sensible a nourseotricina  $GCA1\emptyset^S$ .

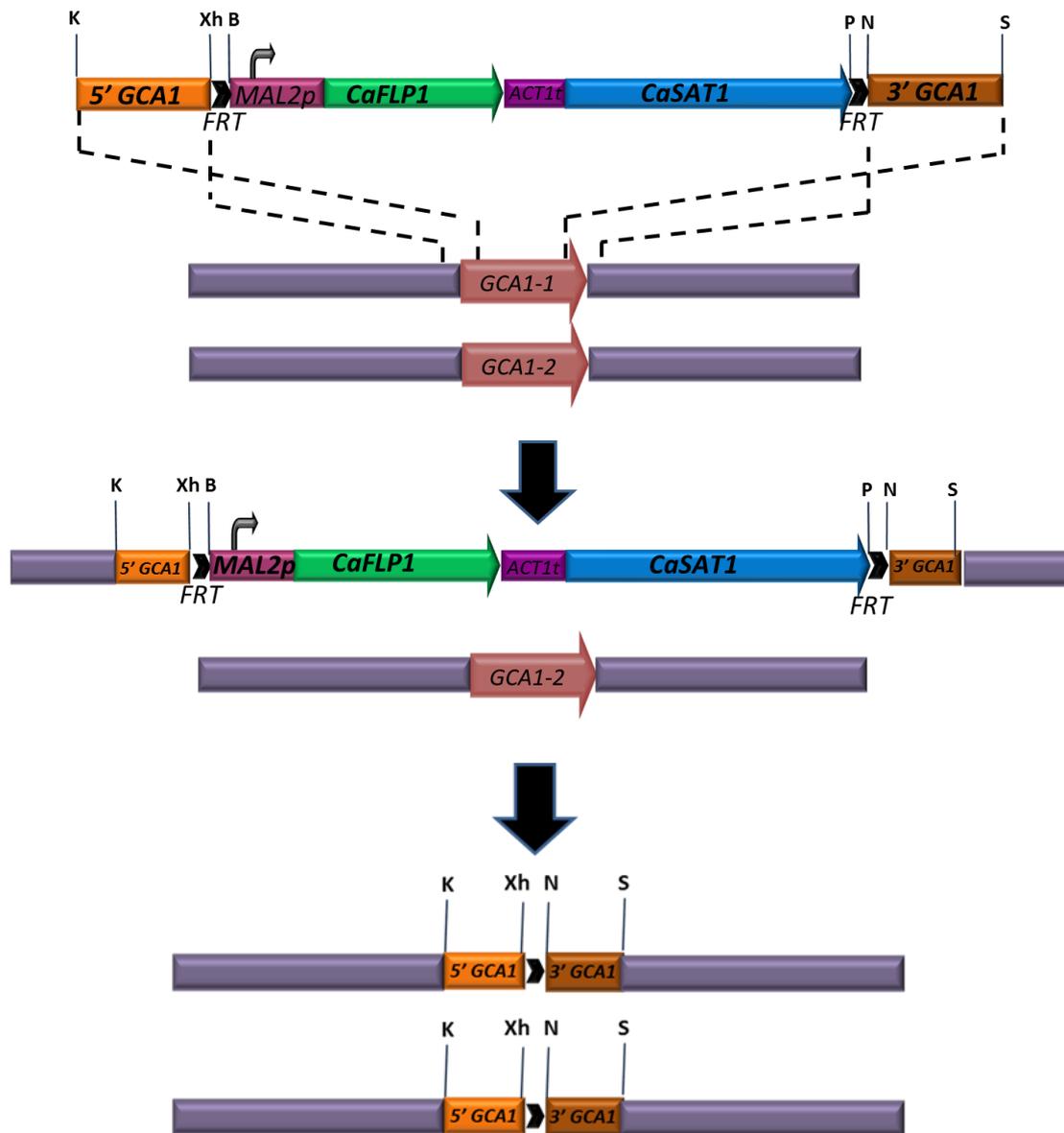


Figura III.51. Esquema de interrupción del gen *GCA1*, segundo paso de transformación.

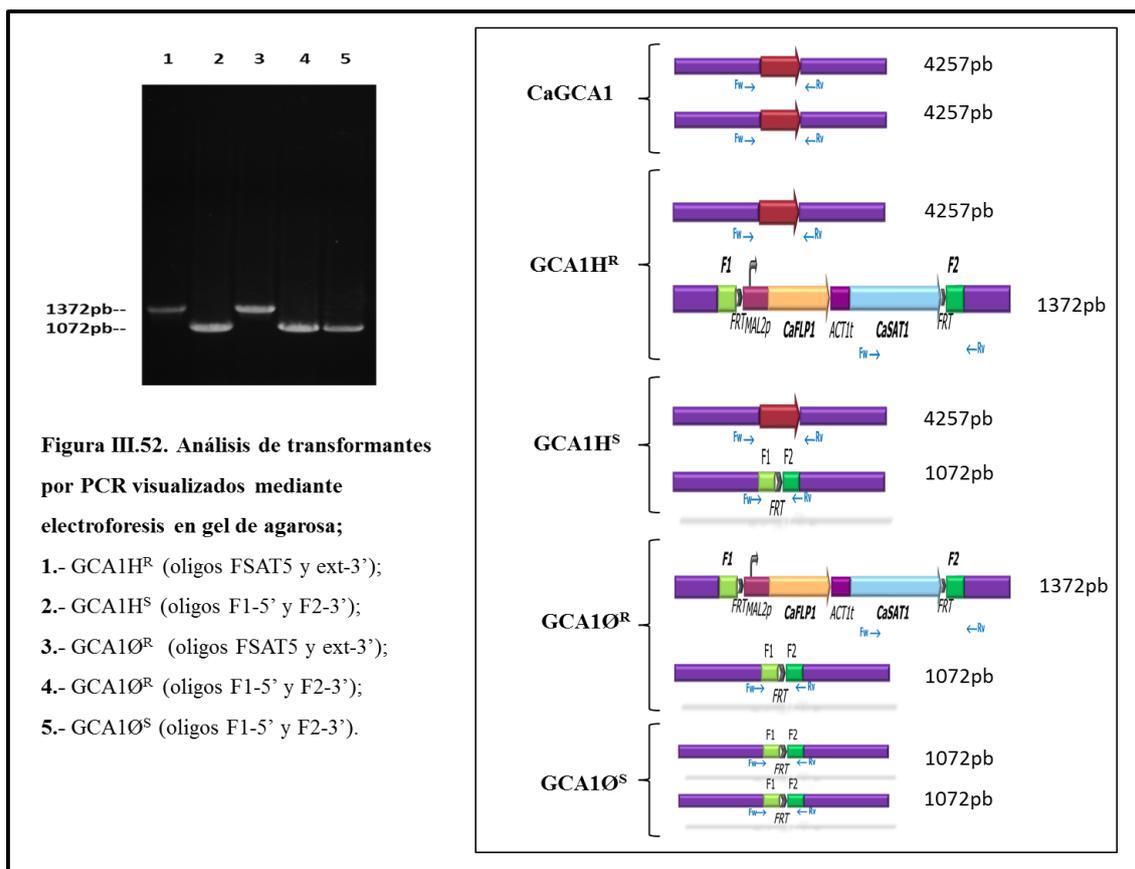
### III.C.6. COMPROBACIÓN DE LOS MUTANTES.

#### III.C.6.1. Selección de las colonias susceptibles de transformación mediante PCR.

Todas las colonias obtenidas en las distintas etapas de la transformación fueron analizadas mediante PCR de ADN genómico utilizándose diferentes oligonucleótidos (véase Tabla II.4 de Materiales y Métodos):

- ✓ Por un lado, para comprobar la correcta integración del casete se emplearon: un oligonucleótido del casete, el FSAT5, y ext-3' flanqueante al sitio correcto de integración que se encuentra ausente en el casete, obteniendo una banda de 1372 pb.
- ✓ Por otro lado, se utilizaron los oligonucleótidos F1-5' y F2-3' para comprobar la interrupción del alelo, entonces para el alelo silvestre se espera una banda de 4257 pb y para el alelo interrumpido una banda de 1372 pb.

Los tamaños esperados fueron de 4257 pb para la cepa sin interrumpir SC5314, y para la cepa GCA1H<sup>R</sup> se utilizaron los oligonucleótidos FSAT5 y ext-3' apareciendo una banda de 1372 pb del alelo que había integrado el casete de interrupción (Figura III.52, calle 1). Para el mutante heterocigótico *GCAI/gcaI* (cepa GCA1H<sup>S</sup>) se esperaban bandas de 1072 pb para el alelo interrumpido que había perdido el gen *SAT1* (Figura III.52, calle 2) y 4257 pb para el alelo sin interrumpir; a su vez para la cepa GCA1Ø<sup>R</sup> se esperaba una banda de 1372 pb para el alelo que había integrado el casete de interrupción (Figura III.52, calle 3); así como una banda de 1072 pb para el otro alelo ya interrumpido y pasado por maltosa (Figura III.52, calle 4) y finalmente para el mutante homocigótico *gcaI/gcaI* (GCA1Ø<sup>S</sup>) se esperaba una banda de 1072 pb que correspondía a los dos alelos del gen *GCAI* interrumpidos que habían perdido el gen *SAT1* de resistencia al antibiótico (Figura III.52, calle 5).



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

### III.C.7. ANÁLISIS FENOTÍPICO DE LAS CEPAS MUTANTES DEL GEN *GCAI*.

Con la finalidad de elucidar la posible función de la proteína Gca1, se llevó a cabo un análisis fenotípico de las cepas mutanes GCA1H<sup>S</sup> y GCA1Ø<sup>S</sup> bajo distintas condiciones y los resultados se compararon con los de la cepa parental SC5314 que sirvió como control.

Los estudios realizados con el fin de encontrar diferencias fenotípicas entre las distintas cepas (SC5314, GCA1H<sup>S</sup> y GCA1Ø<sup>S</sup>), se detallan a continuación:

### III.C.7.1. Estudio de la integridad de la pared celular.

#### III.C.7.1.1. Estudio de sensibilidad a zimoliasa.

La zimoliasa es un complejo enzimático con actividad principalmente  $\beta$ -1,3-glucanasa. La sensibilidad a zimoliasa se ha utilizado para monitorizar los cambios en la composición y la organización de la pared celular de las levaduras como apareció en estudios iniciales realizados 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 llevó a cabo utilizando cultivos en fase exponencial ( $D.O._{600\text{nm}} = 0.5$ ) de las cepas parental y mutantes heterocigótico y homocigótico.

Las células fueron recogidas y se ajustaron a una  $D.O._{600\text{nm}}$  aproximada de 1 en tampón Tris-HCl 10 mM pH 7.5 conteniendo zimoliasa 20 T a una concentración de 100  $\mu\text{g/ml}$ . Las variaciones de  $D.O._{600\text{nm}}$  fueron monitorizadas durante 60 min en un espectrofotómetro Graphicord (Shimadzu®). No se observaron diferencias significativas en el crecimiento de las cepas mutantes en comparación con la parental, lo cual nos sugería que no existía modificación alguna en la arquitectura y/o composición de la pared de las cepas mutantes (Figura III.53).

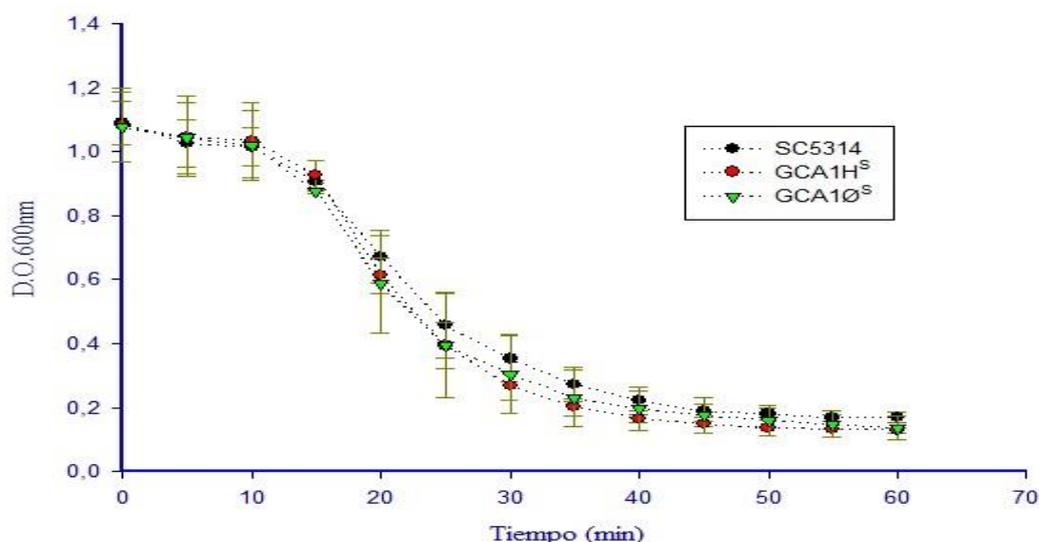


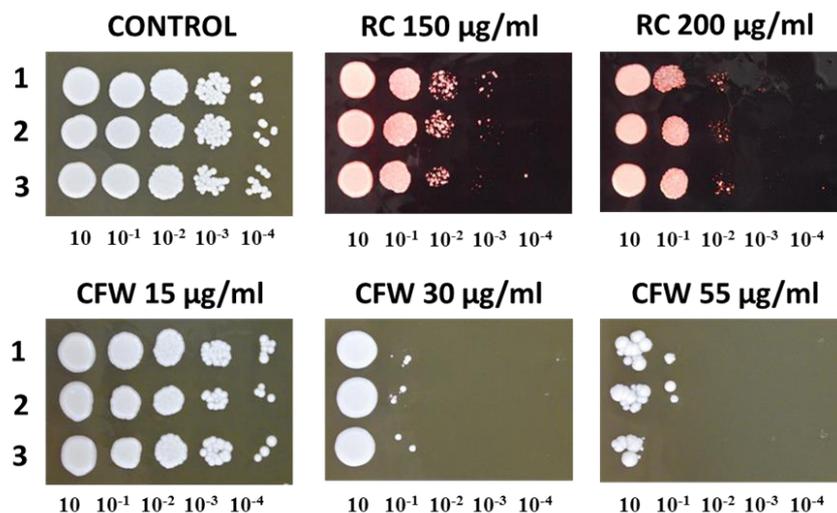
Figura III.53. Curva de sensibilidad a zimoliasa.

### III.C.7.1.2. Estudio de sensibilidad a rojo congo y al blanco de calcoflúor.

Para estudiar el efecto producido por la interrupción del gen *GCA1* sobre la integridad de la pared celular, se analizó el efecto de sustancias como rojo congo (Kopecka y Gabriel, 1992) y blanco de calcoflúor (Elorza *et al.*, 1983; Ram *et al.*, 1994) que interfieren en la síntesis de la pared distorsionando el ensamblaje de los distintos componentes de la misma. El blanco de calcoflúor es una molécula bipolar que se intercala entre las cadenas de quitina de la pared celular (Murgui *et al.*, 1985). El rojo Congo actúa de una manera similar, interfiriendo principalmente en la formación de microfibrillas de  $\beta$ -1,3-glucano.

Se realizaron diluciones decimales seriadas hasta  $10^{-4}$  de cada cultivo depositándose 5  $\mu$ l en medio YPD que contenía blanco de calcoflúor a concentraciones de 15, 30 y 55  $\mu$ g/ml y placas a concentraciones de 150 y 200  $\mu$ g/ml de rojo congo.

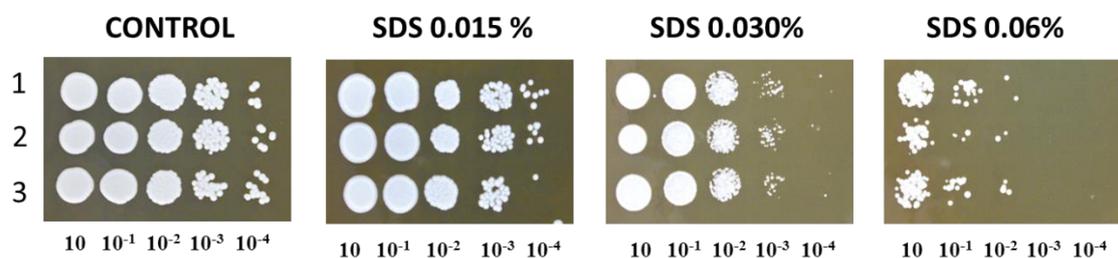
No se observaron diferencias significativas entre las cepas mutantes heterocigótica y homocigótica en comparación con la cepa parental, lo que indicaría que la falta de la proteína Gca1 no deriva en una alteración de la arquitectura de la pared celular de *C. albicans* (Figura III.54).



**Figura III.54. Sensibilidad a rojo congo y blanco de calcoflúor.** Cultivos en fase exponencial crecidos en YPD de las cepas: (1) SC5314, (2) *GCA1H<sup>S</sup>* y (3) *GCA1Ø<sup>S</sup>*, fueron recogidos por centrifugación y ajustados a una  $D.O_{.600nm} = 1$ . A continuación se hicieron diluciones decimales seriadas, tomándose 5  $\mu$ l de cada dilución y se sembraron en medio sólido YPD que contenía 150 y 200  $\mu$ g/ml de rojo congo y 15, 30 y 55  $\mu$ g/ml de blanco de calcoflúor.

### III.C.7.1.3. Estudio de sensibilidad a SDS.

El SDS es un detergente que distorsiona las membranas celulares afectando la estabilidad de las mismas y por tanto también a la construcción de la pared celular. Se analizó la sensibilidad a SDS para estudiar el efecto producido por la interrupción del gen *GCA1* sobre la integridad de la pared. Se sembraron 5  $\mu$ l de cada dilución decimal en medio YPD que contenía de 0.015 a 0.06% de SDS. No se observaron diferencias significativas entre las cepas mutantes heterocigótica y homocigótica en comparación con la cepa parental (Figura III.55).

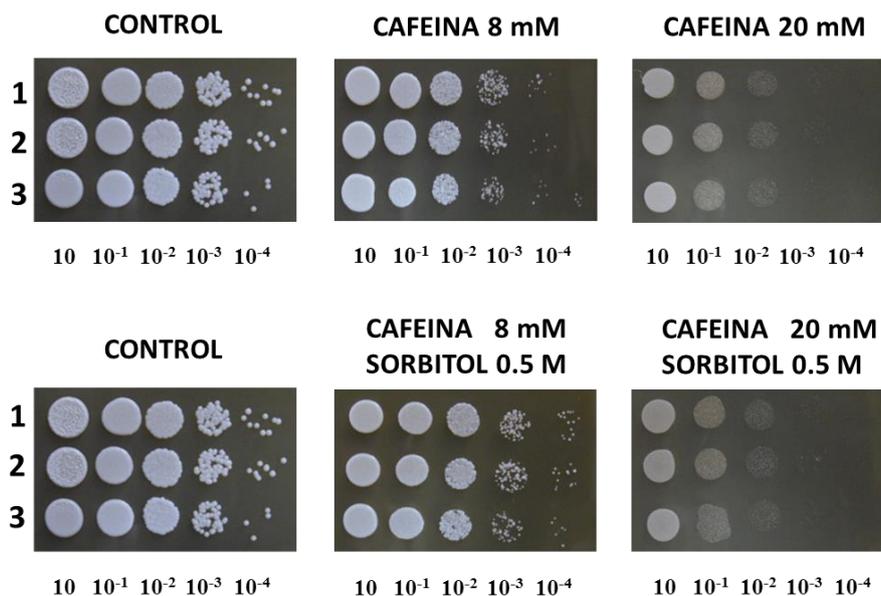


**Figura III.55. Sensibilidad a dodecil sulfato sódico (SDS).** Cultivos en la fase exponencial crecidos en YPD de las cepas: (1) SC5314, (2) *GCA1H<sup>S</sup>* y (3) *GCA1Ø<sup>S</sup>*, fueron recogidos por centrifugación y ajustados a una  $D.O_{600nm} = 1$ . A continuación, se hicieron diluciones decimales seriadas, tomándose 5  $\mu$ l de cada dilución y se sembraron en medio sólido YPD que contenían 0.015; 0.03 y 0.06% de SDS.

### III.C.7.2. Estudio del efecto de cafeína, sorbitol, etanol, glicerol y EDTA.

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

Se sembraron 5  $\mu$ l de cada dilución decimal en medio YPD que contenían 8 y 20 mM de cafeína en presencia y ausencia de sorbitol 0.5 M. No se observaron diferencias significativas en la sensibilidad a la cafeína de los mutantes respecto de la cepa parental (Figura III.56).



**Figura III.56. Sensibilidad a cafeína con o sin sorbitol 0.5 M.** Cultivos en la fase exponencial crecidos en YPD de las cepas: (1) SC5314, (2) GCA1H<sup>S</sup> y (3) GCA1Ø<sup>S</sup>, fueron recogidos por centrifugación y ajustados a una  $D.O_{600\text{ nm}} = 1$ . A continuación se hicieron diluciones decimales seriadas, tomándose 5  $\mu$ l de cada dilución y se sembraron en medio sólido YPD que contenía 8 y 20 mM de cafeína con o sin sorbitol 0.5 M.

Además, se comparó también el comportamiento de las cepas parental y mutantes en placas de YPD con etanol, glicerol y EDTA. De los resultados obtenidos no se observaron diferencias de sensibilidad significativas de los distintos mutantes a estos compuestos (datos no presentados).

### III.C.7.3. Estudio de sensibilidad frente a drogas.

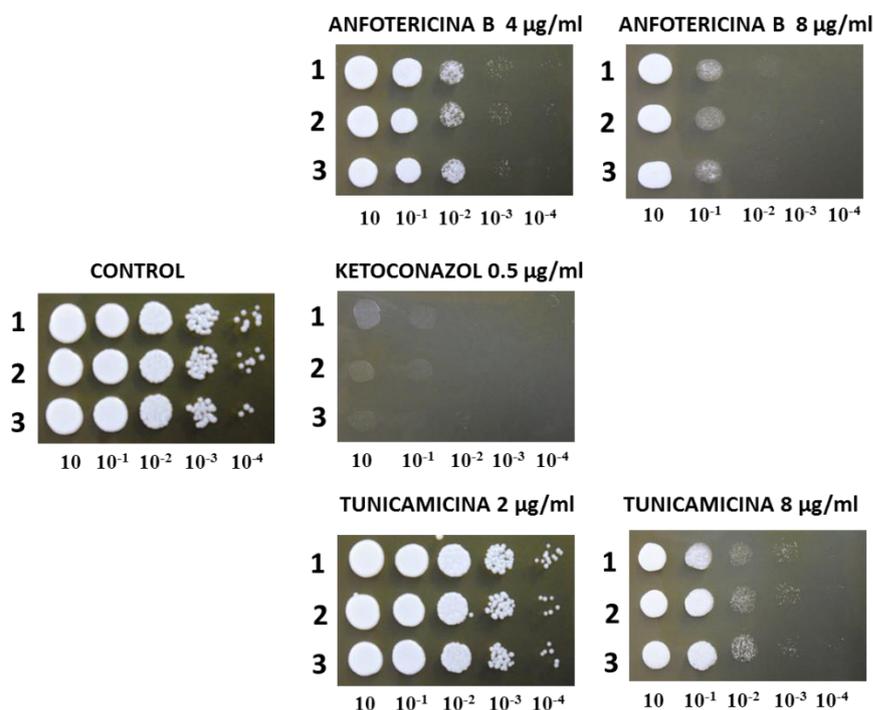
Para dilucidar el grado de alteración en la estructura de la pared celular debido a la falta de la proteína Gca1, se comparó el comportamiento de la cepa parental y las mutantes en presencia de drogas que afectan diferentes compuestos y procesos celulares. Para ello se hicieron diluciones decimales hasta  $10^{-5}$  de las cepas parental y mutantes y se dispensaron en gotas sobre placas que contenían:

- **Anfotericina B.** Es un antibiótico macrólido poliénico que actúa formando poros hidrofílicos en la membrana plasmática. La anfotericina B se une a los esteroides de las membranas celulares tanto de las células fúngicas como células de mamífero, deteriorando la integridad de las mismas. Esto se traduce en una pérdida de potasio y otros contenidos celulares. La mayor afinidad de la

anfotericina B hacia el ergosterol, un esteroles encontrado primordialmente en las membranas de los hongos, es la clave de su acción antifúngica. Sin embargo, como el fármaco se une también al colesterol (esteroles preferente de las membranas de células humanas) la anfotericina B presenta algunos efectos tóxicos, particularmente a nivel renal.

- **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.

Posteriormente, las placas se incubaron durante 72 horas a 28°C y se estudió la capacidad de crecimiento de cada cepa. No se observaron diferencias de sensibilidad de los distintos mutantes a la acción de anfotericina B, ketoconazol y tunicamicina (Figura III.57).

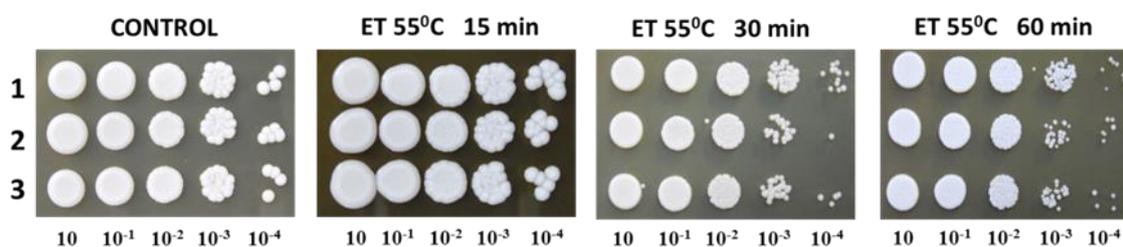


**Figura III.57. Sensibilidad a anfotericina B, ketoconazol y tunicamicina.** Cultivos en fase exponencial crecidos en YPD de las cepas: (1) SC5314, (2) GCA1H<sup>S</sup> y (3) GCA1Ø<sup>S</sup>, fueron concentrados a una D.O.<sub>600nm</sub> = 1, se hicieron diluciones decimales seriadas, tomándose 5 µl de cada dilución y se depositaron en medio sólido YPD que contenían 4 y 8 µg/ml de anfotericina B, 0.5 µg/ml de ketoconazol y 2 y 8 µg/ml de tunicamicina.

### III.C.7.4. Estudio de la respuesta a estrés.

#### III.C.7.4.1. Estudio de sensibilidad a choque térmico.

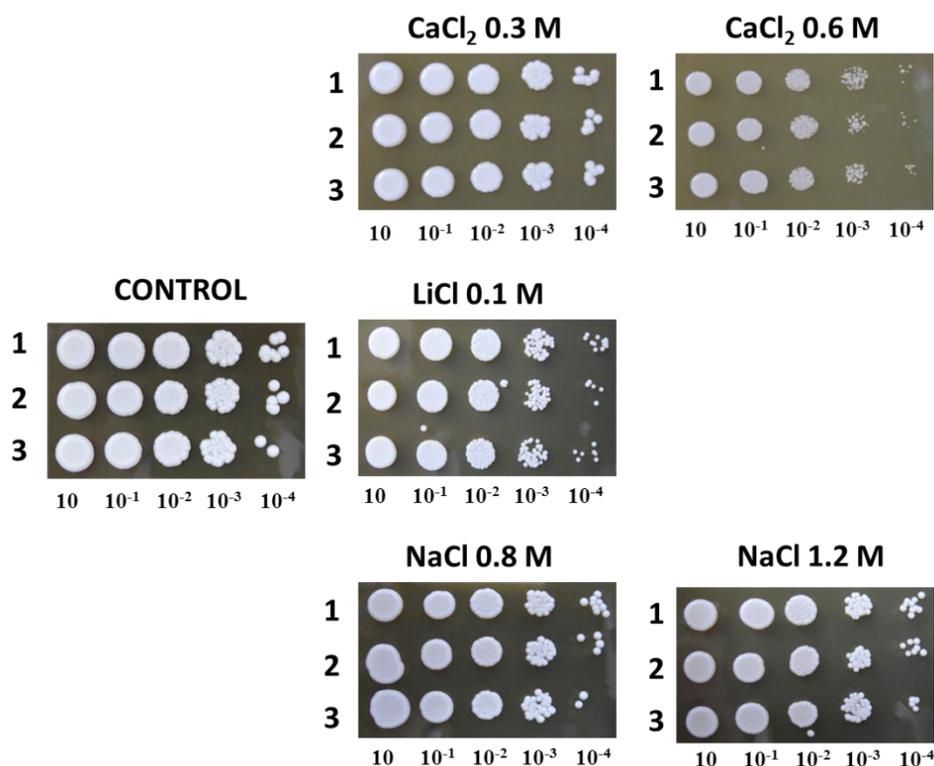
Con el fin de saber más sobre la integridad celular, se sometieron cultivos en fase exponencial de crecimiento de la cepa parental SC5314 y los respectivos mutantes GCA1H<sup>S</sup> y GCA1Ø<sup>S</sup>, a un choque térmico de 55°C. Se tomaron muestras a distintos intervalos de tiempo: 5, 10, 15, 20, 30, 40, 50 y 60 min, los cultivos se transfirieron de nuevo a 28°C, incubándose durante 2-3 días. Como puede observarse en la figura III.58, la ausencia de Gca1 no confiere a las células mayor resistencia al choque térmico, ya que no se aprecian diferencias significativas.



**Figura III.58. Sensibilidad a choque térmico (55°C) a diferentes períodos de tiempo.** Cultivos en fase exponencial crecidos en YPD de las cepas: (1) SC5314, (2) GCA1H<sup>S</sup> y (3) GCA1Ø<sup>S</sup>, fueron concentrados a una D.O.<sub>600nm</sub> = 1, se hicieron diluciones decimales seriadas, tomándose 5 µl de cada dilución y se depositaron en medio sólido YPD, posteriormente se incubaron a 28°C, 72 horas.

#### III.C.7.4.2. Estudio de sensibilidad a choque osmótico.

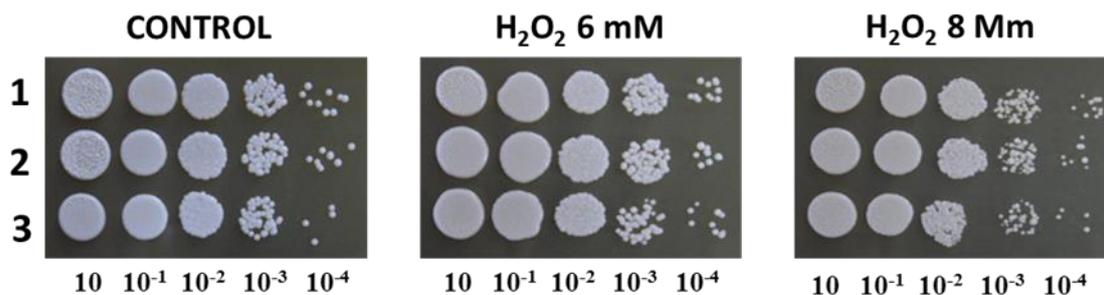
Los mutantes afectados en la pared, con frecuencia tienen una mayor sensibilidad a variaciones en la concentración osmótica exterior, pudiendo quedar seriamente dañada la integridad celular. Para analizar el comportamiento de las cepas mutantes frente al choque osmótico, se depositaron 5 µl de cada dilución decimal de las cepas parental SC5314, GCA1H<sup>S</sup> y GCA1Ø<sup>S</sup> en medio hipertónico YPD conteniendo concentraciones de 0.8 M y 1.2 M de NaCl; 0.1 M de LiCl; y 0.3 M y 0.6 M de CaCl<sub>2</sub>. En ninguno de los tres casos se observaron diferencias, de manera que el comportamiento de las distintas cepas no varió en medios hipertónicos (Figura III.59).



**Figura III.59. Sensibilidad a choque osmótico.** Cultivos en fase exponencial crecidos en YPD de las cepas: (1) SC5314, (2) GCA1H<sup>S</sup> y (3) GCA1Ø<sup>S</sup>, fueron concentrados a una  $D.O_{600nm} = 1$ , se hicieron diluciones decimales seriadas, tomándose 5  $\mu$ l de cada dilución y se depositaron en medio sólido YPD que contenía concentraciones de 0.8 M y 1.2 M de NaCl; 0.1 M de LiCl; y 0.3 M y 0.6 M de CaCl<sub>2</sub>.

### III.C.7.4.3. Estudio del efecto del estrés oxidativo sobre el crecimiento.

Se estudió el efecto del estrés oxidativo exógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) sobre las cepas GCA1H<sup>S</sup> y GCA1Ø<sup>S</sup> respecto a la cepa parental SC5314, mediante el análisis de la viabilidad celular en presencia de peróxido de hidrógeno. Los 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 6 y 8 mM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en las que se sembraron 5  $\mu$ l de las diluciones de cada una de las cepas. Las placas fueron incubadas a 28°C y se estudió la capacidad de crecimiento. Tampoco fue apreciado ningún cambio fenotípico entre las colonias de las diferentes cepas (Figura III.60).

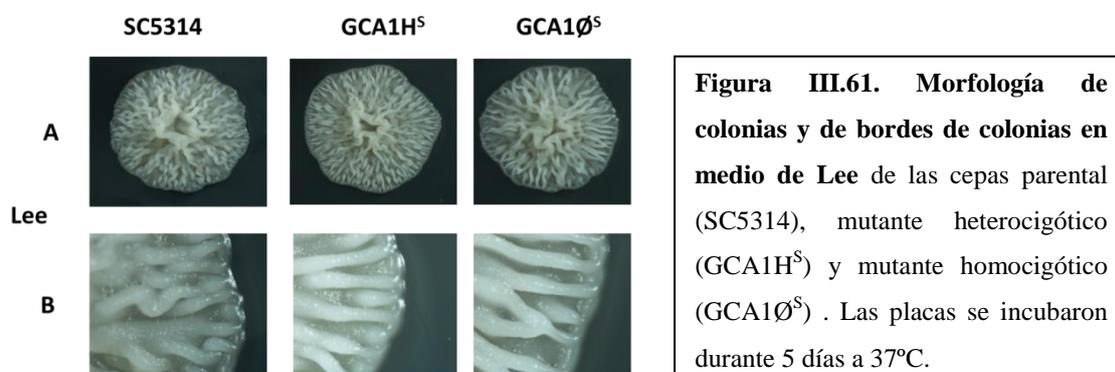


**Figura III.60. Sensibilidad a estrés oxidativo.** Cultivos en fase exponencial crecidos en YPD de las cepas: (1) SC5314, (2) GCA1H<sup>S</sup> y (3) GCA1Ø<sup>S</sup>, fueron concentrados a una D.O. <sub>600 nm</sub> = 1, se hicieron diluciones decimales seriadas, tomándose 5 µl de cada dilución y se depositaron en medio sólido YPD que contenían 6 y 8 mM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

### III.C.7.5. Estudio de filamentación en medio sólido.

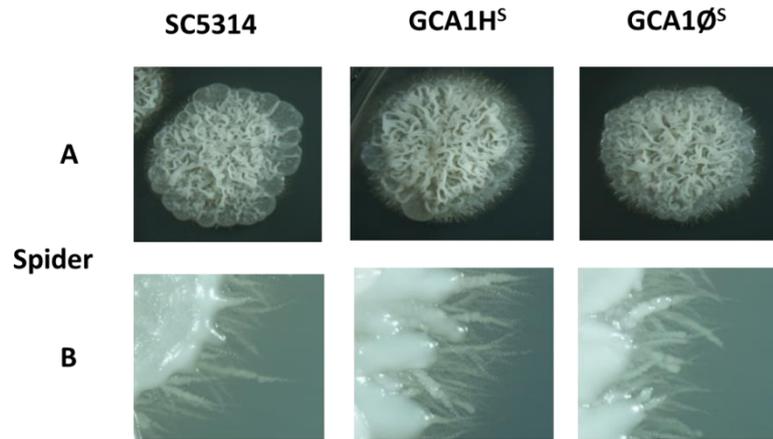
La forma, color, textura y disposición de las colonias que presenta *C. albicans* se puede considerar como el reflejo de la morfología celular. Así, el aspecto visual que presentan las colonias de *C. albicans* en determinados medios ha sido considerado como prueba macroscópica de la capacidad de sus células para llevar a cabo el cambio morfogénico. Para estudiar el efecto de la interrupción del gen *GCA1* en la transición dimórfica en medios sólidos, se analizaron las colonias obtenidas tras 5 días de incubación a 37°C en distintos medios diseñados para el estudio de la filamentación. Las cepas que se utilizaron para los ensayos de filamentación fueron la cepa parental SC5314, y las cepas mutantes GCA1H<sup>S</sup> y GCA1Ø<sup>S</sup>.

Las cepas se sembraron en diferentes medios de cultivo que inducen la formación de micelio, como es el medio Lee (Figura III.61), Spider (Figura III.62) y YE-Pro (Figura III.63).



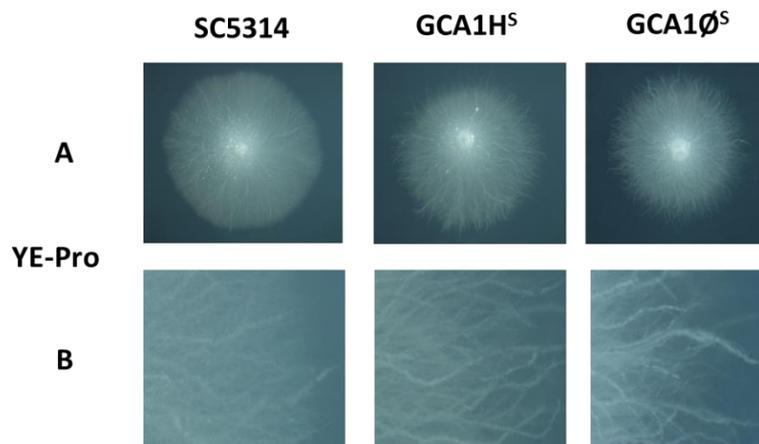
**Figura III.61. Morfología de colonias y de bordes de colonias en medio de Lee** de las cepas parental (SC5314), mutante heterocigótico (GCA1H<sup>S</sup>) y mutante homocigótico (GCA1Ø<sup>S</sup>). Las placas se incubaron durante 5 días a 37°C.

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



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

**Figura III.62. Morfología de colonias y de bordes de colonias en medio de Spider** de las cepas parental (SC5314), mutante heterocigótico (GCA1H<sup>S</sup>) y mutante homocigótico (GCA1Ø<sup>S</sup>). Las placas se incubaron durante 5 días a 37°C.



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

**Figura III.63. Morfología de colonias y de bordes de colonias en medio de extracto de levadura y prolina** de las cepas parental (SC5314), mutante heterocigótico (GCA1H<sup>S</sup>) y mutante homocigótico (GCA1Ø<sup>S</sup>). Las placas se incubaron durante 5 días a 37°C.

En cualquiera de estos medios no se observaron diferencias significativas en cuanto a la morfología, el tamaño de las colonias y el grado o capacidad de filamentación de las cepas mutantes GCA1H<sup>S</sup> y GCA1Ø<sup>S</sup> respecto a la cepa parental SC5314.

### III.C.7.6. Ensayo enzimático.

Debido a que la proteína Gca1 presenta un papel importante en la degradación del almidón, en este experimento se valoró el nivel de actividad glicídica de las cepas mutantes heterocigótica y homocigótica en comparación con la cepa parental. Para ello se incubaron las tres cepas en medio YPD y también en medio inductor (0.67 g/l YNB; 1% xilano), posteriormente fueron tomadas alícuotas de 2 ml de cada uno de los medios y se resuspendieron en 750  $\mu$ l de 0.1 M de tampón citrato fosfato a pH 5.0. Se adicionaron 250  $\mu$ l de sustrato (4-nitrofenil- $\beta$ -D-glucopiranosido (pNPG)) y se incubaron a 40°C durante 90 minutos. Finalmente, como consecuencia de la hidrólisis del sustrato, el medio viró de incoloro a amarillo y fue medido a una absorbancia de 404 nm, observándose tanto en medio YPD como en medio inductor una disminución significativa de la actividad enzimática de la cepa mutante homocigótica en comparación con la cepa parental debido a la ausencia de la proteína Gca1 necesaria para la degradación del sustrato (Figura III.64).

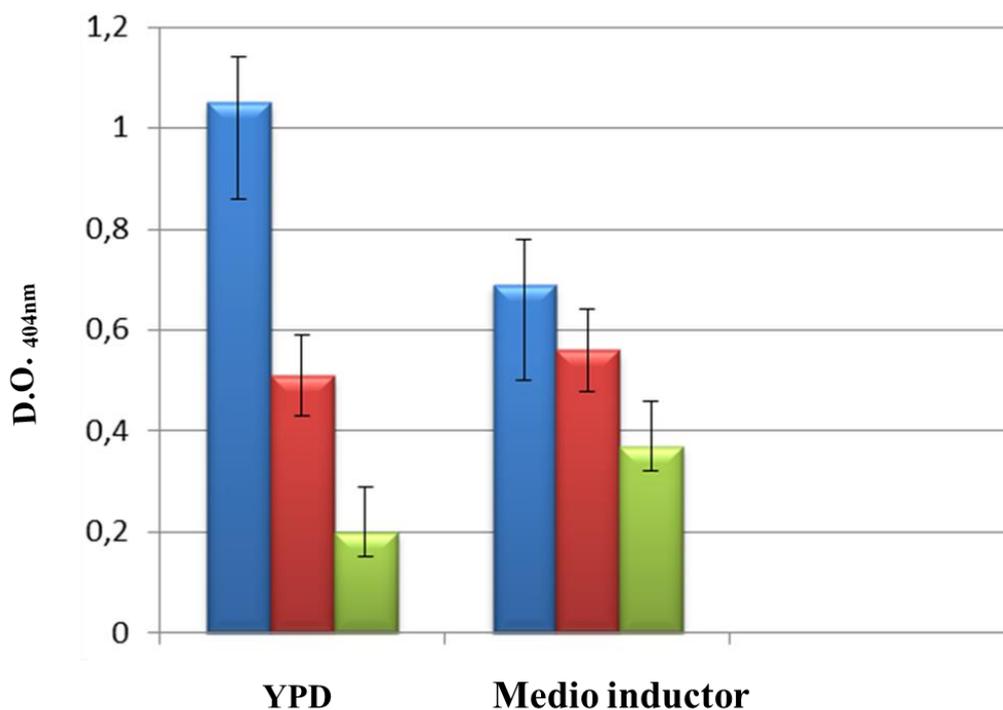


Figura III.64. Determinación de la actividad glicídica de las cepas SC5314 (color azul); GCA1H<sup>S</sup> (color rojo) y GCA1Ø<sup>S</sup> (color verde).

#### **IV. DISCUSIÓN.**



En las últimas décadas, diferentes especies de hongos oportunistas han alcanzado una enorme relevancia clínica, como es el caso del género *Candida*, en especial *C. albicans*. Se considera el patógeno oportunista más prevalente en humanos y causa varias formas de candidiasis: desde infecciones superficiales en la piel y mucosas hasta enfermedades sistémicas que ponen en riesgo la vida, principalmente en pacientes con el sistema inmune deprimido. *C. albicans*, se ha elegido como modelo de estudio para poder identificar las proteínas constituyentes de su pared celular y poder entender mejor las interacciones patógeno-hospedador, así como las condiciones que permiten generar un cuadro infeccioso, fenómeno impedido bajo condiciones normales de inmunidad.

En levaduras y hongos filamentosos, la rigidez de la pared celular 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. De hecho, la pared celular sirve de soporte a las glicoproteínas (receptores) que juegan un papel importante en las interacciones célula-célula, ya sean de carácter sexual, infeccioso, inmunológico o inmunomodulador (Calderone *et al.*, 1991; Cassone *et al.*, 1989; Chaffin *et al.*, 1998).

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. Concretamente en hongos, se denominan manoproteínas debido a que las cadenas de carbohidrato contienen mayoritariamente unidades de manosa, aunque frecuentemente también presentan pequeñas cantidades de otros azúcares y grupos fosfato (Ruiz-Herrera, 2012).

Las manoproteínas de la pared fúngica participan en múltiples procesos biológicos: (i) unión de macromoléculas, (ii) remodelación de la pared celular durante el crecimiento y morfogénesis, (iii) obtención de nutrientes y (iv) adaptación de la célula a diferentes tipos de estrés, aunque para entender el papel de estas moléculas y completar nuestro conocimiento de su función biológica, es importante su identificación.

Las uniones de estas proteínas a los polisacáridos estructurales de la pared celular es conocida, pero poco se sabe acerca de otras proteínas intrínsecas y enzimas que catalizan las uniones entre los distintos constituyentes, así como, si se pueden llegar a establecer otro tipo de ensamblaje entre manoproteínas conocidas actualmente. Las proteínas intrínsecas de la pared celular (CWP) se clasifican en tres grupos principales: GPI-CWP, ASL-CWP y RAE-CWP. Estas proteínas se caracterizan por presentar un péptido señal, sitios potenciales de O- y N-glicosilación y frecuentemente pero no siempre un motivo GPI o una serie de repeticiones internas, a diferencia de las denominadas proteínas “atípicas” que carecen de estas características, son retenidas en la pared por una unión no covalente y han sido previamente identificadas como miembros de rutas metabólicas que tienen lugar en el citoplasma celular.

### **IV. 1. IDENTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS.**

En este trabajo se describe la identificación de un grupo de proteínas en: (i) material solubilizado de paredes celulares mediante  $\beta$ -ME (un agente reductor) y/o NaOH a baja concentración previamente tratadas con detergentes (específicamente SDS 2%) en condiciones exhaustivas a fin de eliminar componentes celulares extraños a la propia estructura, (ii) paredes celulares de mutantes que presentaban disrupción de un gen codificante de alguna proteína de pared y (iii) paredes de células sometidas a estrés químico y/o osmótico. En los tres casos no se observaron diferencias significativas, aunque fue relevante la gran cantidad de proteínas GPI identificadas en comparación a las demás proteínas. Para realizar tal identificación, se utilizó espectrometría de masas (LC-MS), considerándose una técnica sensible y más versátil que otras.

Dicha técnica, nos permitió identificar un total de cuarenta y una proteínas diferentes que poseen péptido señal en su forma inmadura, siendo la mayoría como se ha citado en el párrafo anterior, alrededor de veintinueve, las que presentan un motivo GPI. Se identificaron, además, proteínas de membrana y más de trescientas proteínas que carecen de péptido señal y que son de origen intracelular. Si atendemos a la clasificación propuesta por Richard y Plaine (2007) sobre la función de las proteínas GPI en pared y lo extrapolamos a nuestros resultados con todas las proteínas identificadas, podemos afirmar que el 29% de proteínas presentan función relacionada con la biogénesis o remodelación de la pared celular al igual que proteínas con

diferentes actividades enzimáticas, seguida del 27% con función desconocida y finalmente el 15% presentan un papel importante en la adhesión e interacción. Los datos nos sugieren la gran cantidad de manoproteínas que de manera directa en la biogénesis o indirecta con actividades enzimáticas se encuentran implicadas en la organización y estructura de la pared celular.

La mayoría de las proteínas no GPI identificadas en la pared son responsables de funciones implicadas en su síntesis o remodelación (glucanasas...), mientras que otras carecen actualmente de función conocida como es el caso de Tos1. Las proteínas identificadas desde el punto de vista de la arquitectura molecular de la pared celular se pueden encontrar unidas por puentes disulfuro a proteínas GPI o a aquellas que son liberadas de la pared mediante un tratamiento con álcali suave. El resultado más significativo fue la identificación de proteínas GPI en material solubilizado con  $\beta$ -ME o NaOH, porque según la información conocida actualmente deberían encontrarse unidas al  $\beta$ -1,3-glucano vía  $\beta$ -1,6-glucano y liberarse exclusivamente mediante tratamiento con HF-piridina (Kapteyn *et al.*, 1994; Klis *et al.*, 2001).

Proteínas como Pga38 y Pga54 entre otras, no habían sido previamente identificadas con HF-piridina como agente solubilizante (Castillo *et al.*, 2008). Por tanto hemos de pensar en un mecanismo que controle el hecho de que proteínas GPI puedan formar puentes disulfuro con otras manoproteínas, que a su vez pueden ser sensibles al álcali, para poder explicar su presencia en material solubilizado por un agente reductor como el  $\beta$ -ME o por un tratamiento alcalino suave.

A pesar de un tratamiento exhaustivo con dodecil sulfato sódico, un agente detergente que elimina todo material no unido covalentemente a la pared celular y sus componentes, fueron identificadas muchas proteínas de membrana en los experimentos. Para comprender su significado, podríamos pensar en que estas proteínas membranales pueden presentar un residuo externo que establezca uniones covalentes con proteínas de la pared celular. Tal es el caso de la proteína Pma1, una proteína citoplasmática con diez dominios transmembranales que no presenta repeticiones internas pero tiene doce residuos cisteína que podrían sugerir la formación de puentes disulfuro con otras proteínas de la pared celular y por tanto resistir el tratamiento con el agente detergente a temperatura de 100°C.

Según los estudios realizados, la organización de las manoproteínas en la pared celular es mucho más compleja de lo que actualmente la conocemos (Ruiz-Herrera *et al.*, 2006; Kapteyn *et al.*, 2000; Nather *et al.*, 2008), sugiriendo un modelo alternativo al propuesto actual de la organización molecular de la pared celular de *C. albicans* y probablemente de otros hongos microscópicos. Hipotéticamente, los resultados sugieren que las proteínas GPI además de poder estar ancladas en la membrana plasmática o establecer una unión con el  $\beta$ -1,6-glucano podrían formar puentes disulfuro con otras proteínas y estar unidas directamente al  $\beta$ -1,3-glucano o indirectamente mediante una proteína sensible al álcali.

### **IV.2. CARACTERIZACIÓN DEL ANTÍGENO RECONOCIDO POR EL ANTICUERPO MONOCLONAL 3H8.**

Los anticuerpos tanto poli- como monoclonales han sido usados como una alternativa en investigación de la pared celular con el objetivo de obtener más información sobre su dinámica y arquitectura (Monteagudo *et al.*, 1995; Moukadiri *et al.*, 1999). Con el objetivo de caracterizar moléculas de la pared celular de *C. albicans*, nuestro grupo de investigación obtuvo varios anticuerpos monoclonales contra los componentes de la pared y uno de ellos fue denominado 3H8. Este anticuerpo ha demostrado una alta especificidad y sensibilidad por la especie *C. albicans* y por ello se utiliza en un kit de diagnóstico llamado Bichro-latex albicans desarrollado por nuestro grupo de investigación en colaboración con la empresa Fomouze Diagnostics (Asnières, France) (Dromer *et al.*, 1996; Freydière *et al.*, 1997; Quindós *et al.*, 1997; Robert *et al.*, 1994).

El kit de identificación se ha utilizado directamente sobre hemocultivos permitiendo una rápida identificación de fungemia por *C. albicans* (Laurent *et al.*, 1996) y sobre tejido celular mediante inmunofluorescencia permitiendo la diferenciación de *C. albicans* de especies de otros géneros como *Aspergillus*, *Cryptococcus* e *Histoplasma* (Chandler *et al.*, 1989; Kovacs *et al.*, 1988) y de otras especies de *Candida* tales como *C. lusitaniae*, *C. parapsilosis*, *C. glabrata*, *C. krusei* y *C. tropicalis* (Marcilla *et al.*, 1999; Järvensivu *et al.*, 2004).

En el presente trabajo, se ha realizado la caracterización del antígeno reconocido por el previamente aislado anticuerpo monoclonal 3H8 (Marcilla *et al.*, 1999). Este anticuerpo reconoce un antígeno específico de *C. albicans* presente en la pared celular tanto de levadura como micelio. El antígeno fue inicialmente descrito como parte de una proteína de superficie celular liberado por  $\beta$ -1,3-glucanasas como la zimoliasa, sugiriendo que está directa o indirectamente unido al  $\beta$ -1,3-glucano. Además, el antígeno también puede liberarse por tratamiento alcalino y agentes reductores. Los resultados demuestran que no es una proteína GPI y se encuentra retenida a la pared celular por dos tipos uniones: (i) puentes disulfuro y (ii) unión sensible al álcali. Esta proteína además de encontrarse en la pared también fue identificada en la fracción mixta de membranas. Se demostró también que fue secretado al medio de regeneración durante la síntesis *de novo* de la pared celular por protoplastos, alcanzando un máximo a las tres horas.

De acuerdo a los resultados obtenidos, el antígeno demostró ser resistente a numerosos factores. Temperaturas extremas de fusión (100°C) o de congelación (-20°C) no alteran la estructura del antígeno, al igual que agentes caotrópicos como SDS o la utilización de persulfato de amonio en SDS-PAGE no provocan la pérdida de su actividad antigénica. Sin embargo, dicha actividad sí se ve afectada en presencia de tripsina, comportándose de una forma extraordinariamente sensible a la enzima.

Mediante su comportamiento en SDS-PAGE y por determinación de su peso molecular mediante filtración molecular con sepharose CL-6B<sup>®</sup> se observó que presentaba un peso teórico probablemente próximo a los 500 kDa, lo cual nos sugiere que es una proteína con una proporción importante de cadenas azucaradas porque su comportamiento en electroforesis no varía en presencia y ausencia de ácido iodoacético. De hecho, como sucede en la mayor parte de las proteínas de pared celular de hongos, esta proteína se encuentra altamente N- y O-manosilada y los residuos glicosídicos son parte del epítipo como demostró el hecho de que la reactividad desapareciera después de ser tratada con m-periodato, ácido trifluormetanosulfónico o mediante desglicosilación enzimática con Endo H.

Respecto a su identificación mediante espectrometría de masas, ha resultado imposible todavía a pesar de haber utilizado varias técnicas de purificación como por ejemplo cromatografía de afinidad, debido a que el anticuerpo monoclonal 3H8

aparentemente no se une covalentemente a las resinas utilizadas, sugiriendo que por su gran tamaño y por impedimentos estéricos no pueda realizarse el acoplamiento. Sin embargo, aunque no siendo completamente efectiva, se mejoró dicho acoplamiento utilizando proteína A con una alta concentración salina.

Por tanto, con el objetivo de poder explicar la importancia de la cadena azucarada en la antigenicidad y una posible identificación de la proteína se realizó un estudio mediante dot-blot e inmunofluorescencia indirecta en mutantes con unas determinadas características: (i) mutantes deficientes en O-glicosilación (Pmts), (ii) mutantes deficientes en N- y O-glicosilación y (iii) mutantes que presentaban disrupción en genes que codificaban proteínas de pared; pero según los resultados obtenidos todos los mutantes fueron reconocidos por el anticuerpo monoclonal, demostrando que en todos ellos el antígeno continuaba estando presente.

### **IV.3. ESTUDIO DE LA PROTEÍNA Gca1.**

Gca1 fue identificada en el extracto de  $\beta$ -ME de paredes celulares de la cepa SC5314 y se caracteriza por ser una manoproteína de 190 kDa, implicada en el metabolismo glucídico celular y cuyo gen codificante se expresa más cuando las células crecen en presencia de galactosa en vez de glucosa. De hecho, resultados obtenidos a partir de northern-blot, confirmaron que la transcripción de *GCA1* es mayor en presencia galactosa que de sacarosa o glucosa y mediante PCR se observó la expresión de *GCA1* en candidiasis oral en modelo murino (Sturtevant *et al.*, 1999).

En el presente trabajo, se realizó una búsqueda de homólogos de la secuencia aminoacídica de Gca1 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 cuatro proteínas ortólogas: la proteína Mya-3404 de *Candida tropicalis*, la proteína Nrr1 y-27907 de *Spathaspora passalidarum*, la proteína  $\alpha$ -glucosidasa de *Debaryomyces occidentalis* y la proteína  $\alpha$ -glucosidasa de *Saccharomyces fibuligera*. La homología más acusada al comparar las cinco proteínas fue con la proteína Mya-3404 de *Candida tropicalis* y también mediante otro alineamiento de la secuencia aminoacídica con la proteína Gca2 de *Candida albicans*, se observó bastante homología con ésta. De manera que el hecho de que el grado de

homología sea tan alto con otros organismos diferentes, sugiere que esta proteína no es específica del género *Candida* y concretamente en la especie *albicans*, las proteínas Gca1 y Gca2 son muy parecidas en la secuencia aminoacídica.

Gca1 contiene 946 aminoácidos, 11 posibles sitios teóricos de N-glicosilación y 9 sitios de O-glicosilación; no presenta pseudorepeticiones internas en su secuencia aminoacídica y presenta cinco cisteínas, responsables de su unión a otras proteínas mediante puentes disulfuro. Siendo las características mencionadas anteriormente, de interés apoyando la hipótesis de que pudiera ser el antígeno reconocido por el anticuerpo monoclonal 3H8.

Como consecuencia, para poder conocer si era el antígeno 3H8 y determinar la importancia, así como 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 SC5314 de *C. albicans* que no poseía ninguna mutación en su genoma que pudiese alterar los resultados obtenidos. La obtención del mutante homocigótico *gca1* demostró la no esencialidad de este gen.

No solo resultó el gen *GCA1* no esencial para la célula, sino que además los posteriores análisis fenotípicos realizados en los mutantes obtenidos no mostraron prácticamente ninguna diferencia significativa en el comportamiento de los mutantes  $GCA1H^S$  y  $GCA1\emptyset^S$  comparándolo con la cepa silvestre SC5314. La ausencia de susceptibilidad a agentes perturbadores de la pared fue esperado, debido a que estábamos realizando la disrupción de un gen codificante de una proteína implicada en el metabolismo pero por sus características bioquímicas se encuentra en la pared celular.

Para una mejor caracterización del efecto de la delección de *GCA1* en la construcción de la pared celular se realizaron diferentes pruebas fenotípicas. Sin embargo, no se observaron diferencias significativas de las cepas  $GCA1H^S$  y  $GCA1\emptyset^S$  en presencia de zimoliasa, 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) y tampoco se observaron cambios frente a SDS y estrés térmico.

Los resultados también nos demostraron que la disrupción del gen no provocó modificaciones en la composición de la pared ya que las cepas GCA1H<sup>S</sup> y GCA1Ø<sup>S</sup> siguieron manteniendo la misma sensibilidad a las drogas que la cepa parental (MacPherson *et al.*, 2005). No obstante, recientemente se ha demostrado que en muchos casos, la célula presenta una mayor resistencia a agentes perturbadores de la pared 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 misma, 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.

Para complementar la información que la delección del gen no provocaba cambios en la pared celular se decidió realizar estudios de miceliación en medio sólido. Según los resultados de filamentación en medios Lee, Spider y YE-Pro no se encontraron diferencias en la morfología de las colonias ni en el borde de las mismas en comparación con la cepa parental. De manera que, claramente Gca1 demostraba de nuevo, no tener una función relacionada con la biogénesis o remodelación de la pared.

Un experimento significativo fue la realización de un ensayo enzimático en presencia del sustrato *p*NPG con las cepas: parental, GCA1H<sup>S</sup> y GCA1Ø<sup>S</sup>, observándose tanto en medio YPD como en medio de inducción una disminución importante de la actividad glicídica en la cepa homocigótica en comparación con la parental.

Por tanto a la vista de todos los resultados, queda mucho trabajo por hacer en la caracterización del epítipo reconocido por el anticuerpo monoclonal 3H8 y en el conocimiento de la biogénesis y arquitectura de la pared celular, una estructura tan importante en la biología y patogenicidad de un hongo como es *C. albicans*.

## **V. CONCLUSIONES.**



1. A partir del material solubilizado por distintos agentes químicos, proveniente de paredes aisladas de diferentes cepas mutantes de *C. albicans* y de la cepa silvestre SC5314 sometida a distintos tipos de estreses ambientales, se han identificado 41 proteínas propias de pared celular.
2. En el material solubilizado por agentes alcalinos y reductores se han identificado proteínas de pared del tipo GPI como por ejemplo Als2 y Pga29.
3. La mayoría de proteínas identificadas no pertenecientes al grupo de las proteínas GPI, fueron proteínas implicadas en la biosíntesis y/o remodelación de la pared celular tales como Eng1 y Sun42.
4. Se han identificado más de 300 proteínas “moonlighting” carentes de péptido señal y con una función implícitamente citoplasmática.
5. El epítipo reconocido por el anticuerpo monoclonal 3H8 se encuentra retenido en la pared formando parte de un complejo de alrededor de 500 kDa que es solubilizado por condiciones alcalinas suaves y agentes reductores.
6. El epítipo 3H8 está constituido por una fracción glicídica y una fracción proteica. Es sensible a la tripsinización, crio resistente, termoresistente y resistente a agentes caotrópicos.
7. La proteína Gca1 es una proteína que posee todas las características de una proteína de secreción que ha sido identificada mediante espectrometría de masas en la pared celular de *C. albicans*.
8. El gen *GCA1* no es esencial, y su producto proteico ha sido identificado como una glicosidasa sin un papel estructural aparente en la arquitectura de la pared celular de *C. albicans*.
9. La proteína Gca1 no contiene el epítipo 3H8.



## **VI. BIBLIOGRAFÍA.**



- 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.
- Alberti-Segui, C., Morales, A.J., Xing, H., Kessler, M.M., Willins, D.A., Weinstock, K.G., Cottarel, G., Fachtel, K., Rogers, B.** 2004. Identification of potential cell-surface proteins in *Candida albicans* and investigation of the role of a putative cell-surface glycosidase in adhesion and virulence. *Yeast*. 21: 285-302.
- Alonso-Monge, R., Carvaihlo, S., Nombela, C., Rial, E., Plá, J.** 2009. The Hog1 MAP kinase controls respiratory metabolism in the fungal pathogen *Candida albicans*. *Microbiology*. 155: 413-423.
- Alonso-Monge, R., Navarro-García, F., Molero, G., Diez-Orejas, R., Gustin, M., Plá, J., Sánchez, M., Nombela, C.** 1999. Role of the mitogen-activated protein kinase Hog1p in morphogenesis and virulence of *Candida albicans*. *J Bacteriol*. 181: 3058-3068.
- Alonso-Monge, R., Navarro-García, F., Román, E., Negro, A.I., Eisman, B., Nombela, C., Plá, J.** 2003. The Hog1 mitogen-activated protein kinase is essential in the oxidative stress response and chlamyospore formation in *Candida albicans*. *Eukaryot Cell*. 2: 351-361.
- Alonso-Monge, R., Román, E., Arana, D.M., Prieto, D., Urrialde, V., Nombela, C., Plá, J.** 2010. The Sko1 protein represses the yeast-to-hypha transition and regulates the oxidative stress response in *Candida albicans*. *Fungal Genet Biol*. 47: 587-601.
- Alonso-Monge, R., Román, E., Nombela, C., Plá, J.** 2006. The MAP kinase signal transduction network in *Candida albicans*. *Microbiology*. 152: 905-912.
- 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: 3389-3402.
- Arana, D.M., Nombela, C., Alonso-Monge, R., Plá, J.** 2005. The Pbs2 MAP kinase kinase is essential for the oxidative-stress response in the fungal pathogen *Candida albicans*. *Microbiology*. 151: 1033-1049.

- Arana, D.M., Prieto, D., Román, E., Nombela, C., Alonso-Monge, R., Plá, J.** 2009. The role of the cell wall in fungal pathogenesis. *Microbiol Biotechnol.* 2: 308-320.
- Arellano, M., Valdivieso, M.H., Calonge, T.M., Coll, P.M., Durán, A., Pérez, P.** 1999. *Schizosaccharomyces pombe* protein kinase C homologues, pck1p and pck2p, are targets of rho1p and rho2p and differentially regulate cell integrity. *J Cell Sci.* 112: 3569-3578.
- Asmundsdottir, L.R., Erlendsdottir, H., Haraldsson, G., Gus, H., Xu, J., Gottfredsson, M.** 2008. Molecular epidemiology of candidemia: evidence of clusters of smoldering nosocomial infections. *Clin Infect Dis.* 47, e17-24
- 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: 107-119.
- Ballou, C.E.** 1990. Isolation, characterization, and properties of *Saccharomyces cerevisiae* *mnn* mutants with non-conditional protein glycosylation defects. *Methods Enzymol.* 185: 440-470.
- Bartie, K.L., Williams, D.W., Wilson, M.J., Potts, A.J., Lewis, M.A.** 2001. PCR fingerprinting of *Candida albicans* associated with chronic hyperplastic candidosis and other oral conditions. *J Clin Microbiol.* 39: 4066-4075.
- Bates, P.A., Kelley, L.A., MacCallum, R.M., Sternberg, M.J.** 2001. Enhancement of protein modeling by human intervention in applying the automatic programs 3D-JIGSAW and 3D-PBSM. *Proteins.* 5: 39-46.
- Bates, S., MacCallum, D.M., Bertram, G., Munro, C.A., Hughes, H.B., Buurman, E.T., Brown, A.J.P., Odds, F.C., Gow, N.A.R.** 2005a. *Candida albicans* Pmr1p a secretory pathway P-type Ca<sup>2+</sup>/Mn<sup>2+</sup>-ATPase, is required for glycosylation and virulence. *J Biol Chem.* 280: 23408-23415.
- Bates, S., Hughes, H.B., Munro, C.A., Thomas, W.P.H., MacCallum, D.M., Bertram, G., Atrih, A., Ferguson, M.A.J., Brown, A.J.P., Odds, F.C., Gow, N.A.R.** 2005b. Outer chain N-glycans are required for cell wall integrity and virulence of *Candida albicans*. *J Biol Chem.* 281: 90-96.

- Bennett, R.J., Johnson, A.D.** 2005. Mating in *Candida albicans* and the search for a sexual cycle. *Annu Rev Microbiol.* 59: 233-255.
- Berman, J., Sudbery, E.** 2002. *Candida albicans*: a molecular revolution built on lessons from budding yeast. *Nature Genetics.* 3: 918-930.
- 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: 1113-1124.
- Bernstein, H.J.** 2000. Recent changes to RasMol, recombining the variants. *Trends Biochem Sci.* 25: 453-455.
- Biswas, S., Van Dijck, P., Datta, A.** 2007. Environmental sensing and signal transduction pathways regulating morphopathogenic determinants of *Candida albicans*. *Microbiol Mol Biol Rev.* 71: 348-376.
- Bliss, J.M, Basavegowda, K.P., Watson, W.J., Sheikh, A.U., Ryan, R.M.** 2008. Vertical and horizontal transmission of *Candida albicans* in very low birth weight infants using DNA fingerprinting techniques. *Pediatr Infect Dis J.* 27: 231-235
- Bockmuhl, D.P., Ernst, J.F.** 2001. A potential phosphorylation site for an A-type kinase in the Efg1 regulator protein contributes to hyphal morphogenesis of *Candida albicans*. *Genetics.* 157: 1523-1530
- Bowman, S.M., Piwovar, A., Al Dabbous, M., Vierula, J., Free, S.J.** 2006. Mutational analysis of the glycosylphosphatidylinositol (GPI) anchor pathway demonstrates that GPI-anchored proteins are required for cell wall biogenesis and normal hyphal growth in *Neurospora crassa*. *Eukaryot Cell.* 5: 587-600.
- Bradford, M.M.** 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* 72: 248-254.
- Braun, B.R., Johnson, A.D.** 1997. Control of filament formation in *Candida albicans* by the transcriptional repressor TUP1. *Science.* 277: 105-109.

**Braun, B.R., Johnson, A.D.** 2000. *TUP1*, *CPH1* and *EFG1* make independent contributions to filamentation in *Candida albicans*. *Genetics*. 155: 57-67.

**Braun, B.R., Kadosh, D., Johnson, A.D.** 2001. *NRG1*, a repressor of filamentous growth in *Candida albicans*, is down-regulated during filament induction. *EMBO J*. 20: 4753-4761.

**Brown, A.J., Bertram, G., Feldmann, P.J., Pegg, M.W., Swoboda, R.K.** 1991. Codon utilisation in the pathogenic yeast *Candida albicans*. *Nucleic Acids Res*. 19: 4298.

**Brown, C.C., Baker, D.C., Barker, I.K.** 2007. Mycotic diseases of the gastrointestinal tract. In: M.G. Maxie, Editor, Jubb, Kennedy, and Palmer's Pathology of Domestic Animals, Elsevier, Philadelphia. 229-231.

**Burnett, J.H.** 1979. Aspects of the structure and growth of hyphas walls. In: Burnet, J. H. Ad Trinci, A.P.J. (Eds) Fungal walls and hyphal growth Cambridge University Press, Cambridge, 1-25.

**Cabib, E., Kang, M.S.** 1987. Fungal 1,3- $\beta$ -glucan synthase. *Methods Enzymol*. 138: 637-642.

**Calderon, J., Zavrel, M., Ragni, E., Fonzi, W.A., Rupp, S., Popolo, L.** 2010. *PHR1*, a pH-regulated gene of *Candida albicans* encoding a glucan-remodelling enzyme, is required for adhesion and invasion. *Microbiology*. 156: 2484-2494.

**Calderone, R.A., Braun, P.C.** 1991. Adherence and receptor relationships of *Candida albicans*. *Microbiol Rev*. 55: 1-20.

**Calderone, R.A., Fonzi, W.A.** 2001. Virulence factors of *Candida albicans*. *Trends Microbiol*. 9: 325-337.

**Cantero, P.D., Ernst, J.F.** 2011. Damage to the glycoshield activates PMT-directed O-mannosylation via the Msb2-Cek1 pathway in *Candida albicans*. *Mol Microbiol*. 80: 715-725.

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

- 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. *Lancet Infect Dis.* 8: 114-124.
- Castillo, L., Calvo, E., Martínez, A.I., Ruiz-Herrera, J., Valentín, E., López, J.A., Sentandreu, R.** 2008. A study of the *Candida albicans* cell wall proteome. *Proteomics.* 8: 3871-3881.
- Castillo, L., Martínez, A.I., Garcerá, A., Elorza, M.V., Valentín, E., Sentandreu, R.** 2003. Functional analysis of the cysteine residues and the repetitive sequence of *Saccharomyces cerevisiae* Pir4/Cis3: the repetitive sequence is needed for binding to the cell wall  $\beta$ -1,3-glucan. *Yeast.* 20: 973-983.
- Castillo, L., Martínez, A.I., Garcerá, A., García-Martínez, J., Ruiz-Herrera, J., Valentín, E., Sentandreu, R.** 2006. Genomic response programs of *Candida albicans* following protoplasting and regeneration. *Fungal Genet Biol.* 43: 124-134.
- Chaffin, W.L.** 2008. *Candida albicans* cell wall proteins. *Microbiol Mol Biol Rev.* 72: 495-544.
- Chaffin, W.L., López-Ribot, J.L., Casanova, M., Gozalbo, D., Martínez J.P.** 1998. Cell wall and secreted proteins of *Candida albicans*: identification, function and expression. *Microbiol Mol Biol Rev.* 62: 130-80.
- Chandler, F.W., Kaplan, W., Ajello, L.** 1989. Histopathology of Mycotic Diseases, pp. 18-22, 42-46. London: Wolfe Medical Publications.
- Chang, H.C., Leaw, S.N., Huang, A.H., Wu, T.L., Chang, T.C.** 2001. Rapid identification of yeasts in positive blood cultures by a multiplex PCR method. *J Clin Microbiol.* 39: 3466-3471.
- Chattaway, F.W., Holmes, M.R., Barlow, A.J.E.** 1968. Cell wall composition of the mycelial and blastospore forms of *Candida albicans*. *J Gen Microbiol.* 51: 367.
- Cheetham, J., Smith, D.A., da Silva, D.A., Doris, K.S., Patterson, M.J., Bruce, C.R., Quinn, J.** 2007. A single MAPKKK regulates the Hog1 MAPK pathway in the pathogenic fungus *Candida albicans*. *Mol Biol Cell.* 18: 4603-4614.

**Chen, C.G., Yang, Y.L., Cheng, H.H., Su, C.L., Huang, S.F., Chen, C.T., Liu, Y.T., Su, I.J., Lo, H.J.** 2006. Non-lethal *Candida albicans* *cph1/cph1 efg1/efg1* transcription factor mutant establishing restricted zone of infection in a mouse model of systemic infection. *Int J Immunopathol Pharmacol.* 19: 561-565.

**Chen, J., Chen, J., Lane, S., Liu, H.** 2002. A conserved mitogen-activated protein kinase pathway is required for mating in *Candida albicans*. *Mol Microbiol.* 46: 1335-1344.

**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

**Cleary, I.A., Lazzell, A.L., Monteagudo, C., Thomas, D.P., Saville, S.P.** 2012. *BRG1* and *NRG1* form a novel feedback circuit regulating *Candida albicans* hypha formation and virulence. *Mol Microbiol.* 85: 557-573.

**Coleman, D.A., Oh, S.H., Manfra-Maretta, S.L., Hoyer, L.L.** 2012. A monoclonal antibody specific for *Candida albicans* Als4 demonstrates overlapping localization of Als family proteins on the fungal cell surface and highlights differences between Als localization in vitro and in vivo. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 64: 321-333.

**Collina, A.R., Aumont, F., Deslauriers, N., Belhumeur, P., De Repentigny, L.** 1996. Evidence for degradation of gastrointestinal mucin by *Candida albicans* secretory aspartyl proteinase. *Infect Immun.* 64: 4514-4519.

**Colman-Lerner, A., Chin, T.E., Brent, R.** 2001. Yeast Cbk1 and Mob2 activate daughter-specific genetic programs to induce asymmetric cell fates. *Cell.* 107: 739-750.

**Cowan, K.J., Storey, K.B.** 2003. Mitogen-activated protein kinases: new signaling pathways functioning in cellular responses to environmental stress. *J Exp Biol.* 206: 1107-1115.

**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.* 47:1637-1651.

- Csank, C., Schröppel, K., Leberer, E., Harcus, D., Mohamed, O., Meloche, S., Thomas, D.Y., Whiteway, M.** 1998. Roles of the *Candida albicans* mitogen-activated protein kinase homolog, Cek1p, in hyphal development and systemic candidiasis. *Infect Immun.* 66: 2713-2721.
- Cutler, J. E., Deepe, G. S. Jr., Klein, B. S.** 2007. Advances in combating fungal diseases: vaccines on the threshold. *Nat Rev Microbiol.* 5: 13-28.
- Davis, D.** 2003. Adaptation to environmental pH in *Candida albicans* and its relation to pathogenesis. *Curr Genet.* 44: 1-7.
- Davis, D., Wilson, R.B., Mitchell, A.P.** 2000. *RIM101*-dependant and independent pathway govern pH response in *Candida albicans*. *Mol Biol Cell.* 20: 971-978
- De Groot, P.W., De Boer, A.D., Cunningham, J., Dekker, H.L., de Jong, L., Hellingwerf, K.J., De Koster, C., Klis, F.M.** 2004. Proteomic analysis of *Candida albicans* cell walls reveals covalently bound carbohydrate-active enzymes and adhesins. *Eukaryot Cell.* 3: 955-965.
- De Groot, P.W., Hellingwerf, K. J., Klis, F.M.** 2003. Genome-wide identification of fungal GPI proteins. *Yeast.* 20: 781-796.
- 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.
- Deepe, G.S. Jr.** 1997. Prospects for the development of fungal vaccines. *Clin Microbiol. Rev* 10: 585-596.
- 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., Goyard, S., Rodríguez-Arnaveilhe, S., Frangeul, L., Jones, L., Tekaia, F., Bader, D., Albrecht, A., 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., López, M.C., Mavor, A., Martín, N., Moszer, I., Onésime, D., Pérez Martín, J., Sentandreu, R., Valentín, E., Brown, A.J.P.** 2005. Candida DB: a genome database for *Candida albicans* pathogenomics. *Nucleic Acids Res.* 33: D353-D357.

**Díaz-Jiménez, D.F., Mora-Montes, H.M., Hernández-Cervantes, A., Luna-Arias, J.P., Gow, N.A., Flores-Carreón, A.** 2012. Biochemical characterization of recombinant *Candida albicans* mannosyltransferases Mnt1, Mnt2 and Mnt5 reveals new functions in O- and N-mannan biosynthesis. *Biochem Biophys Res Commun.* 419: 77-82.

**Díez-Orejas, R., Molero, G., Navarro-García, F., Plá, J., Nombela, C., Sánchez-Pérez, M.** 1997. Reduced virulence of *Candida albicans* *MKC1* mutants: a role for a mitogen-activated protein kinase in pathogenesis. *Infect Immun.* 65: 833-837.

**Doedt, T., Krishnamurthy, S., Bockmuhl, D.P., Tebarth, B., Stempel, C., Rusell, C.L., Brown, A.J., Ernst, J.F.** 2004. APSES proteins regulate morphogenesis and metabolism in *Candida albicans*. *Mol Biol Cell.* 15: 3167-3180.

**Donlan, R.M.** 2002. Biofilm microbial life on surfaces. *Emerg Infect Dis.* 8: 881-890

**Donlan, R.M., Costerton, J.W.** 2002. Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clin Microbiol Rev.* 15: 167-193.

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

**Drees, B.L., Sundin, B., Brazeau, B., Caviston, J.P., et al.** 2001. A protein interaction map for cell polarity in development. *J Cell Biol.* 159: 549-571.

**Dromer, F., Ronin, O., Improvisi, L., Dupont, B.** 1996. Utilité et limites du Bichro-latex albicans pour l'identification rapide de *Candida albicans*. *J Mycol Med.* 6: 91-92.

- Du, C., Calderone, R., Richert, J., Li, D.** 2005. Deletion of the *SSK1* response regulator gene in *Candida albicans* contributes to enhanced killing by human polymorphonuclear neutrophils. *Infect Immun.* 73: 865-871.
- Dubois, M., Giles, K.A., Hamilton, J.K., Rebes, P.A., Smith, F.** 1956. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Anal Chem.* 28: 350-356.
- Dunkler, A., Walther, A., Specht, C.A., Wendland, J.** 2005. *Candida albicans* CHT3 encodes the functional homolog of the Cts1 chitinase of *Saccharomyces cerevisiae*. *Fungal Genet Biol.* 42: 935-947.
- Ecker M., Deutzmann, R., Lehle, L., Mersa, V., Tanner, W.** 2006. Pir proteins of *Saccharomyces cerevisiae* are attached to  $\beta$ -1,3-glucan by a new protein-carbohydrate linkage. *J Biol Chem.* 281: 11523-11529.
- Eckert, S.E., Heinz, W.J., Zakikhany, K., Thewes, S., Haynes, K., Hube, B., Mühlischlegel, F.A.** 2007. *PGA4*, a GAS homologue from *Candida albicans*, is up-regulated early in infection processes. *Fungal Genet Biol.* 44: 368-377.
- Edge, A.S.** 2003. Deglycosylation of glycoproteins with trifluoromethanesulphonic acid: elucidation of molecular structure and function. *Biochem J.* 76: 339-350.
- Edwards, J.E. Jr.** 2012. Fungal cell wall vaccines: an update. *J Med Microbiol.* 61(Pt7): 895-903.
- Edwards, S.R., Braley, R., Chaffin, W.L.** 1999. Enolase is present in the cell wall of *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiol Lett.* 177: 211-216.
- Eisenhaber, B., Schneider, G., Wildpaner, M., Eisenhaber, F.** 2004. A sensitive predictor for potential GPI lipid modification sites in fungal protein sequences and its application to genome-wide studies for *Aspergillus nidulans*, *Candida albicans*, *Neurospora crassa*, *Saccharomyces cerevisiae* and *Schizosaccharomyces pombe*. *J Mol Biol.* 337: 243-253.
- 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.

**Ernst, J.F., Prill, S.K.** 2001. O-glycosylation. *Med Mycol.* 39:67-74.

**Ernst, J.F., Plá, J.** 2011. Signaling the glycoshield: maintenance of the *Candida albicans* cell wall. *Int J Med Microbiol.* 301: 378-383.

**Esteban, P.F., Ríos, I., García, R., Dueñas, E., Plá, J., Sánchez, M., Vázquez de Aldana, C.R., del Rey, F.** 2005. Characterization of the *CaENG1* gene encoding an endo-1,3- $\beta$ -glucanase involved in cell separation in *Candida albicans*. *Current Microbiol.* 51: 385-392.

**Feldmesser, M.** 2005. Prospects of vaccines for invasive aspergillosis. *Med Mycol.* 43: 571-587.

**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 to Sap6 are required for the invasion of parenchymal organs. *Infect Immun.* 70: 3689-3700.

**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: 102-107.

**Firon, A., Aubert, S., Iraqui, I., Guadagnini, S., Goyard, S., Prévost, M.C., Janbon, G., d'Enfert, C.** 2007. The *SUN41* and *SUN42* genes are essential for cell separation in *Candida albicans*. *Mol Microbiol.* 66: 1256-1275.

**Fishman, J.A., González, R.G., Branda, J.A.** 2008. Case 11-2008: a 45-year old man with changes in mental status after liver transplantation. *N Engl J Med.* 358: 1604-1613.

**Fleet, G.H., Manners, D.J.** 1976. Isolation and composition of an alkali-soluble glucan from the cell wall of *Saccharomyces cerevisiae*. *J Gen Microbiol.* 94: 180-192.

**Fleet, G.H., Manners, D.J.** 1977. The enzymatic degradation of an alkali-soluble glucan from the cell wall of *Saccharomyces cerevisiae*. *J Gen Microbiol.* 98: 315-327.

- Fonseca-García, C.** 2010. Análisis de los mecanismos de regulación de diversas rutas metabólicas por medio de la vía Pal/Rim en *Ustilago maydis*. (M.Sc.Thesis) Irapuato, Mexico: Unidad Irapuato, Centro de Investigación y de Estudios Avanzados, IPN.
- Fonzi, W.A., Irwin, M.Y.** 1993. Isogenic strain construction and gene mapping in *Candida albicans*. *Genetics*. 134: 717-728.
- Fortún, J.** 2011. Actualización en terapia antifúngica: nuevos fármacos e indicaciones. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 29: 38-44.
- Fradin, C., De Groot, P., MacCallum, D., Schaller, M., Klis, F., Odds, F.C., Hube, B.** 2005. Granulocytes govern the transcriptional response, morphology and proliferation of *Candida albicans* in human blood. *Mol Microbiol*. 56: 397-415.
- Freydière, A.M., Buchaille, L., Guinet, R., Gille, Y.** 1997. Evaluation of latex reagents for rapid identification of *Candida albicans* and *C. krusei* colonies. *J Clin Microbiol*. 35: 877-880.
- Frohner, I.E., Bourgeois, C., Yatsyk, K., Majer, O., Kuchler, K.** 2009. *Candida albicans* cell surface superoxide dismutases degrade host-derived reactive oxygen species to escape innate immune surveillance. *Mol Microbiol*. 71: 240-252.
- Fu, Y., Ibrahim, A.S., Sheppard, D.C., Chen, Y.C., French, S.W., Cutler, J.E., Filler, S.G., Edwards, J.E.** 2002. *Candida albicans* Als1p: an adhesin that is a downstream effector of the *EFG1* filamentation pathway. *Mol Microbiol*. 44: 61-72.
- Fujimura, H., Sakuma, Y.** 1993. Simplified isolation of chromosomal and plasmid DNA from yeasts. *Biotechniques*. 14: 538-540.
- Fujita, S.I., Senda, Y., Nakaguchi, S., Hashimoto, T.** 2001. Multiplex PCR using internal transcribed spacer 1 and 2 regions for rapid detection and identification of yeast strains. *J Clin Microbiol*. 39: 3617-3622.
- Garcerá, A., Martínez, A.I., Castillo, L., Elorza, M.V., Sentandreu, R., Valentín, E.** 2003. Identification and study of a *Candida albicans* protein homologous to *Saccharomyces cerevisiae* Ssr1p, an internal cell-wall protein. *Microbiology*. 149: 2137-2145.

**García, J.M.** 2008. Biotipado molecular de hongos con interés clínico y su aplicación en el diagnóstico y la epidemiología. Tesis doctoral, Universidad de Valencia.

**Gattiker, A., Gasteiger, E., Bairoch, A.** 2002. SCANPROSITE: a reference implementation of a PROSITE scanning tool. *Appl Bioinform.* 1: 107-108.

**Gelis, S.** 2009. Functional characterization of Pga13 and Pga31, two *Candida albicans* GPI-anchored cell wall proteins. Tesis doctoral. Universidad de Valencia.

**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: 322-331.

**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. *Mol Gen Genet.* 198: 179-182.

**Girrbach, V., Zeller, T., Priesmeier, M., Strahl-Bolsinger, S.** 2000. Structure-function analysis of the dolichyl phosphate-mannose: protein O-mannosyltransferase ScPmt1p. *J Biol Chem.* 275: 19288-19296.

**Goto, M.** 2004. Protein O-glycosylation in fungi: Diverse structures and multiple functions. *Biosci Biotechnol Biochem.* 71: 1415-1427.

**Gow, N.A., Hube, B.** 2012. Importance of the *Candida albicans* cell wall during commensalism and infection. *Curr Opin Microbiol.* 15: 406-412.

**Gow, N.A., Robbins, P.W., Lester, J.W., Brown, A.J., Fonzi, W.A., Chapman, T., Kinsman, O.S.** 1994. A hyphal-specific chitin synthase gene (*CHS2*) is not essential for growth, dimorphism, or virulence of *Candida albicans*. *Proc Natl Acad Sci. USA.* 91: 6216-6220.

**Granger, B.L., Flenniken, M.L., Davis, D.A., Mitchell, A.P., Cutler, J.E.** 2005. Yeast wall protein 1 of *Candida albicans*. *Microbiology.* 151: 1631-1644.

- Greene, C.E., Chandler, F.W.** 2006. Candidiasis and rhodotorulosis. In: C.E. Greene, Editor. *Infectious Diseases of the Dog and Cat*, Elsevier, St. Louis. 627-633.
- Guan, B., Lei, J., Su, S., Chen, F., Duan, Z., Chen, Y., Gong, X., Li, H., Jin, J.** 2012. Absence of Yps7p, a putative glycosylphosphatidylinositol-linked aspartyl protease in *Pichia pastoris*, results in aberrant cell wall composition and increased osmotic stress resistance. *FEMS Yeast Res.* 12: 969-979.
- Guo, W., Tamanoi, F., Novick, P.** 2001. Spatial regulation of the exocyst complex by Rho1 GTPase. *Nat Cell Biol.* 3: 353-360.
- Hachem, R., Hanna, H., Kontoyiannis, D., Jiang, Y., Raad, I.** 2008. The changing epidemiology of invasive candidiasis: *Candida glabrata* and *Candida krusei* as the leading causes of candidemia in hematologic malignancy. *Cancer.* 112: 2493-2499.
- Hajjeh, R.A., Sofair, A.N., Harrison, L.H., Lyon, G.M., Arthington-Skaggs, B.A., Mirza, S.A., Phelan, M., Morgan, J., Lee-Yang, W., Ciblak, M.A., Benjamin, L.E., Sanza, L.T., Huie, S., Yeo, S.F., Brandt, M.E., Warnock, D.W.** 2004. Incidence of bloodstream infections due to *Candida* species and in vitro susceptibilities of isolates collected from 1998 to 2000 in a population-based active surveillance program. *J Clin Microbiol.* 42: 1519-1527.
- Hamada, K., Fukuchi, S., Arisawa, M., Baba, M., Kitada, K.** 1998. Screening for glycosylphosphatidylinositol (GPI)-dependent cell wall proteins in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Gen Genet.* 258: 53-59.
- Hanahan, D.** 1985. Techniques for transformation of *Escherichia coli*. In: Glover D.M, ed. *DNA cloning: a practical approach*. Oxford, IRL Press, 109-135.
- Harrison, J.C., Zyla, T.R., Bardes, E.S., Lew, D.J.** 2004. Stress-specific activation mechanisms for the cell integrity MAPK pathway. *J Biol Chem.* 279: 2616-2622.
- Hawkes, R.** 1982. Identification of concanavalin A-binding proteins after sodium dodecyl sulfate-gel electrophoresis and protein blotting. *Anal Biochem.* 123: 143-146.
- Henrissat, B., Davies, G.** 1997. Structural and sequence-based classification of glycoside hydrolases. *Current Opin Struct Biol.* 7: 637-644.

- Herrero de Dios, C., Román, E., Diez, C., Alonso-Monge, R., Plá, J.** 2013. The transmembrane protein Opy2 mediates activation of the Cek1 MAP kinase in *Candida albicans*. *Fungal Genet Biol.* 50: 21-32.
- Herrero, A.B., Magnelli, P., Mansour, M.K., Levitz, S.M., Bussey, H., Abeijon, C.** 2004. *KRE5* gene null mutant strains of *Candida albicans* are avirulent and have altered cell wall composition and hypha formation properties. *Eukaryot Cell.* 3: 1423-1432
- Herrero, A.B., Uccelletti, D., Hirschberg, C.B., Domínguez, A., Abeijon, C.** 2002. The Golgi GDPase of the fungal pathogen *Candida albicans* affects morphogenesis, glycosylation, and cell wall properties. *Eukaryot Cell.* 1: 420-431.
- Hobson, R.P., Munro, C.A., Bates, S., MacCallum, D.M., Cutler, J.E., Heinsbroek, S.E.M., Brown, G.D., Odds, F.C., Gow, N.A.R.** 2004. Loss of cell wall mannosylphosphate in *Candida albicans* does not influence macrophage recognition. *J Biol Chem.* 279: 39628-39635.
- Hong, Y., Ohishi, K., Kang, J.Y., Tanaka, S., Inoue, N., Nishimura, J., Maeda, Y., Kinoshita, T.** 2003. Human PIG-U and yeast Cdc91p are the fifth subunit of GPI transamidase that attaches GPI-anchors to proteins. *Mol Biol Cell.* 14: 1780-1789.
- Hope, W.W., Billaud, E.M., Lestner, J., Denning, D.W.** 2008. Therapeutic monitoring for triazoles. *Curr Opin Infect Dis.* 21: 580-586.
- Horn, D.L., Fishman, J.A., Steinbach, W.J., Anaissie, E.J., Marr, K.A., Olyaei, A.J., Pfaller, M.A., Weiss, M.A., Webster, K.M., Neofytos, D.** 2007. Presentation of the PATH Alliance registry for prospective data, collection and analysis of the epidemiology, therapy and outcomes of invasive fungal infections. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 59: 407-414.
- Horn, D.L., Neofytos, D., Anaissie, E.J., Fishman, J.A., Steinbach, W.J., Olyaei, A.J., Marr, K.A., Pfaller, M.A., Chang, C.H., Webster, K.M.** 2009. Clinical characteristics of 2,019 patients with candidemia: data from the PATH Alliance Registry. *Clin Infect Dis.* 48: 1695-1703.

- Hornbach, A., Heyken, A., Schild, L., Hube, B., Löffler, J., Kurzai, O.** 2009. The glycosylphosphatidylinositol-anchored protease Sap9 modulates the interaction of *Candida albicans* with human neutrophils. *Infect Immun.* 77: 5216-5224.
- Hoyer, L.L.** 2001. The *ALS* gene family of *Candida albicans*. *Trends Microbiol.* 9: 176-180.
- Hoyer, L.L., Green, C.B., Oh, S.H., Zhao, X.** 2008. Discovering the secrets of the *Candida albicans* agglutinin-like sequence (*ALS*) gene family-a sticky pursuit. *Med Mycol.* 46: 1-15.
- Hoyer, L.L., Hecht, J.E.** 2000. The *ALS6* and *ALS7* genes of *Candida albicans*. *Yeast.* 16: 847-855.
- Hull, C.M., Raisner, R.M., Johnson, A.D.** 1999. Evidence for mating of the "asexual" yeast *Candida albicans* in a mammalian host. *Science.* 289: 307-310.
- 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.
- Ishibashi, K., Yoshida, M., Nakabayashi, I., Shinohara, H., Miura, N.N., Adachi, Y., Ohno, N.** 2005. Role of anti- $\beta$ -glucan antibody in host defense against fungi. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 44: 99-109.
- Ishii, N., Yamamoto, M., Yoshihara, F., Arisawa, M., Aoki, Y.** 1997. Biochemical and genetic characterization of Rbf1p, a putative transcription factor of *Candida albicans*. *Microbiology.* 143: 429-435.
- Ito, J.I., Lyons, J.M., Díaz-Arevalo, D., Hong, T.B., Kalkum, M.** 2009. Vaccine progress. *Med Mycol* 47 (Suppl. 1), S394-S400.
- Järvensivu, A., Hietanen, J., Rautemaa, R., Sorsa, T., Richardson, M.** 2004. *Candida* yeast in chronic periodontitis tissues and subgingival microbial biofilms in vivo. *Oral Dis.* 10: 106-112.
- Kamada, Y., Qadota, H., Python, C.P., Anraku, Y., Ohya, Y., Levin, D.E.** 1996. Activation of yeast protein kinase C by Rho1 GTPase. *J Biol Chem.* 271: 9193-9196.

- Kamai, Y., Kubota, M., Kamai, Y., Hosokawa, T., Fukuoka, T., Filler, S.G.** 2002. Contribution of *Candida albicans* *ALSI* to the pathogenesis of experimental oropharyngeal candidiasis. *Infect Immun.* 70: 5256-5258.
- 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.
- Kashiwabara, S., Azuma, S., Tsuduki, M., Suzuki, Y.** 2000. The primary structure of the subunit in *Bacillus thermoamyloliquefaciens* KP1071 molecular weight 540,000 homohexameric  $\alpha$ -glucosidase II belonging to the glycosyl hidrolase family 31. *Biosci Biotechnol Biochem.* 64: 1379-1393.
- Kelley, L.A., Sternberg, M.J.E.** 2009. Protein structure prediction on the web: a case study using the Phyre server. *Nature Protocols.* 4: 363-371.
- Klis, F.M., De Groot, P., Hellingwerf, K.** 2001. Molecular organization of the cell wall of *Candida albicans*. *Med Mycol.* 39: 1-8.
- Klis, F.M., Mol, P., Hellingwerf, K., Brul, S.** 2002. Dynamics of cell wall structure in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiol Rev.* 26: 239-256.
- Klotz, S.A., Gaur, N.K., Lake, D.F., Chan, V., Rauceo, J. Lipke, P.N.** 2004. Degenerate peptide recognition by *Candida albicans* adhesins Als5p and Als1p. *Infect Immun.* 72: 2029-2034.
- Kollár, R., Petrakova, E., Ashwell, G., Robbins, P.W., Cabib, E.** 1995. Architecture of the yeast cell wall: the linkage between chitin and  $\beta$ (1,3)-glucan. *J Biol Chem.* 270: 1170-1178.
- Kondoh, O., Tachibana, Y., Ohya, Y., Arisawa, M., Watanabe, T.** 1997. Cloning of the *RHO1* gene from *Candida albicans* and its regulation of  $\beta$ -1,3-glucan synthesis. *J Bacteriol.* 179: 7734-7741.

- Kopecka, M., Gabriel, M.** 1992. The influence of congo red on the cell wall and (1,3)-beta-D-glucan microfibril biogenesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Arch Microbiol.* 158: 115-126.
- Kopecka, M., Phaff, H.J., Fleet, G.H.** 1974. Demonstration of a fibrillar component in the wall of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* and its chemical structure. *J Cell Biol.* 62: 66-76
- Korting, H.C., Hube, B., Oberbauer, 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.
- Kovacs, J.A., Ng, V.L., Masur, H., et al.** 1988. Diagnosis of *Pneumocystis carinii* pneumonia: improved detection in sputum with use of monoclonal antibodies. *N Engl J Med.* 318: 589-593.
- Krissinel, E., Henrick, K.** 2004. Secondary-structure matching (SSM), a new tool for fast protein structure alignment in three dimensions. *Acta Cryst.* 60: 2256-2268.
- Kumamoto, C.A.** 2002. *Candida* biofilms. *Curr Opin Microbiol.* 5: 608-611.
- Kumamoto, C.A.** 2005. A contact-activated kinase signals *Candida albicans* invasive growth and biofilm development. *Proc Natl Acad Sci. USA.* 102: 5576-5581.
- Kumar, M.J., Jamaluddin, M.S., Natarajan, K., Kaur, D., Datta, A.** 2000. The inducible N-acetylglucosamine catabolic pathway gene cluster in *Candida albicans*: discrete N-acetylglucosamine-inducible factors interact at the promoter of *NAG1*. *Proc Natl Acad Sci. USA.* 97: 14218-14223.
- Laemmli, U.K.** 1970. Structural proteins during the head assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* 227: 680-685.
- Laforet, L., Moreno, I., Sánchez-Fresneda, R., Martínez-Esparza, M., Martínez, J.P., Argüelles, J.C., De Groot, P.W., Valentín, E.** 2011. Pga26 mediates filamentation and biofilm formation and is required for virulence in *Candida albicans*. *FEMS Yeast Res.* 11: 389-397.

- Lan, C.Y., Newport, G., Murillo, L.A., Jones, T., Scherer, S., Davis, R.W., Agabian, N.** 2002. Metabolic specialization associated with phenotypic switching in *Candida albicans*. *Proc Natl Acad Sci. USA.* 99: 14907-14912.
- Laurent, F., Cahen, P., Honderlick, P.** 1996. Utilisation du réactif Bichro-latex *albicans* pour l'identification rapide de *Candida albicans* dans les flacons d'hémoculture: résultats préliminaires. *J Mycol Med.* 6: 19-21.
- Lee, B.N., Elion, E.A.** 1999. The MAPKKK Ste11 regulates vegetative growth through a kinase cascade of shared signalling components. *Proc Natl Acad Sci. USA.* 102: 5576-5581.
- 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: 148-153.
- Lengeler, K.B., Davidson, R.C., D'souza, C., Harashima, T., Shen, W.C., Wang, P., Pan, X., Wangh, M., Heitman, J.** 2000. Signal transduction cascades regulating fungal development and virulence. *Microbiol Mol Biol Rev.* 64: 746-785.
- Leroy, O., Gangneux, J.P., Montravers, P., Mira, J.P., Guin, 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: 1612-1618.
- Levin, D.E.** 2005. Cell wall integrity signaling in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol Mol Biol Rev.* 69: 262-291.
- Li, F., Palecek, S.P.** 2003. *EAP1*, a *Candida albicans* gene involved in binding human epithelial cells. *Eukaryot Cell.* 2: 1266-1273.
- Li, F., Svarovsky, M.J., Karlsson, A.J., Wagner, J.P., Marchillo, K., Oshel, P., Andes, D., Palecek, S.P.** 2007. *Eap1p*, an adhesin that mediates *Candida albicans* biofilm formation in vitro and in vivo. *Eukaryot Cell.* 6:931-939.
- 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, Y., Filler, S.G.** 2011. *Candida albicans* Als3, a multifunctional adhesin and invasin. *Eukaryot Cell*. 10: 168-173.
- Lloyd, A.T., Sharp, P.M.** 1992. Evolution of codon usage patterns: the extent and nature of divergence between *Candida albicans* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Nucleic Acids Res.* 20: 5289-5295.
- Lo, H.J., Köhler, J.R., DiDomenico, B., Loebenberg, D., Cacciapuoti, A., Fink, G.R.** 1997. Nonfilamentous *C. albicans* mutants are avirulent. *Cell*. 90: 939-949.
- Lockhart, S.R., Zhao, R., Daniels, K.J., Soll, D.R.** 2003. Alpha-pheromone-induced "shmooing" and gene regulation require white-opaque switching during *Candida albicans* mating. *Eukaryot Cell*. 2: 847-855.
- López-Ribot, J.L., Chaffin, W.L.** 1996. Members of the Hsp70 family of proteins in the cell wall of *Saccharomyces cerevisiae*. *J Bacteriol.* 178: 4724-4726.
- Lovering, A.L., Lee, S.S., Kim, Y-W., Withers, S.G., Strynadka, N.C.J.** 2004. Mechanistic and structural analysis of a family 31  $\alpha$ -glycosidase and its glycosyl-enzyme intermediate. *J Biol Chem.* 280: 2105-2115.
- Lussier, M., Sdicu, A.M., Bussey, H.** 1999. The *KTR* and *MNN1* mannosyltransferase families of *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochim Biophys Acta.* 1426: 323-334.
- Ma, L.J., Ashraf, S., Ibrahim, A.S. et al.** 2009. Genomic analysis of the basal lineage fungus *Rhizopus oryzae* reveals a whole-genome duplication. *PLoS Genetics* 5e: 1000549.
- 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: 1745-1752.
- Magee, B.B., Legrand, M., Alarco, A.M., Raymond, M. y Magee, P.T.** 2002. Many of the genes required for mating in *Saccharomyces cerevisiae* are also required for mating in *Candida albicans*. *Mol Microbiol.* 46: 1345-1351.
- Magee, P.T., Magee, B.B.** 2004. Through a glass opaquely: the biological significance of mating in *Candida albicans*. *Curr Opin Microbiol.* 7: 661-665.

- Manners, D.J., Masson, A.J., Patterson, J.C.** 1973. The structure of a  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 3)-D-glucan from yeast cell walls. *Biochem J.* 135: 19-30.
- Mao, X., Liu, Y., Wang, H., Cao, F., Chen, J.** 2008. Antagonistic interplay of Swi1 and Tup1 on filamentous growth of *Candida albicans*. *FEMS Microbiol Lett.* 285: 233-241.
- Marcilla, A., Elorza, M.V., Mormeneo, S., Rico, H., Sentandreu, R.** 1991. *Candida albicans* mycelial wall structure: supramolecular complexes released by zymoliasse, chitinase and  $\beta$ -mercaptoethanol. *Arch Microbiol.* 155: 312-319.
- Marcilla, A., Monteagudo, C., Mormeneo, S., Sentandreu, R.** 1999. Monoclonal antibody 3H8: a useful tool in the diagnosis of candidiasis. *Microbiology.* 145: 695-701.
- Martín, G.S., Mannino, D.M., Eaton, S., Moss, M.** 2003. The epidemiology of sepsis in the United States from 1979 through 2000. *N Engl J Med.* 348: 1546-54.
- Martínez, A.I., Castillo, L., Garcerá, A., Elorza, M.V., Valentín, E., Sentandreu, R.** 2004. Role of Pir1 in the construction of the *Candida albicans* cell wall. *Microbiology.* 150: 3151-3161.
- Martínez-Lopez, R., Park, H., Myers, C.L., Gil, C., Filler, S.G.** 2006. *Candida albicans* Ecm33 is important for normal cell wall architecture and interactions with host cells. *Eukaryot Cell.* 5: 140-147.
- McLellan, C.A., Whitesell, L., King, O.D., Lancaster, A.K., Mazitschek, R., Lindquist, S.** 2012. Inhibiting GPI anchor biosynthesis in fungi stresses the endoplasmic reticulum and enhances immunogenicity. *ACS Chem Biol.* 7: 15201528.
- McNeil, M., Nash, S., Hajjeh, R., Phelan, M., Conn, L., Plikaytis, B., Warnock, D.** 2001. Trends in mortality due to invasive mycotic diseases in the United States. *Clin Infect Dis.* 33: 641-647.
- Mean, M., Marchetti, O., Calandra, T.** 2008. Bench-to-bedside review: *Candida* infections in the intensive care unit. *Crit Care.* 12: 204-212.
- Millette, C.F., Scott, B.K.** 1984. Identification of spermatogenic cell plasma membrane glycoproteins by two-dimensional electrophoresis and lectin blotting. *J Cell Sci.* 65: 233-248.

- Mio, T., Yabe, T., Sudoh, M., Satoh, Y., Nakajima, T., Arisawa, M., Yamada-Okabe, H.** 1996. Role of three chitin synthase genes in the growth of *Candida albicans*. *J Bacteriol.* 178: 2416-2419.
- Mio, T., Yamada-Okabe, T., Yabe, T., Nakajima, T., Arisawa, M., Yamada-Okabe, H.** 1997. Isolation of the *Candida albicans* homologs of *Saccharomyces cerevisiae* *KRE6* and *SKN1*: expression and physiological function. *J Bacteriol.* 179: 2363-2372.
- Mitrovich, Q.M., Tuch, B.B., Guthrie, C., Johnson, A.D.** 2007. Computational and experimental approaches double the number of known introns in the pathogenic yeast *Candida albicans*. *Genome Res.* 17: 492-502.
- Mol, P.C., Park, H.M., Mullins, J.T., Cabib, E.** 1994. A GTP binding protein regulates the activity of (1-3)- $\beta$ -glucan synthase, and enzyme directly involved in yeast cell wall morphogenesis. *J Biol Chem.* 269: 31267-31274.
- Molina, M., Gil, C., Plá, J., Arroyo, J., Nombela, C.** 2000. Protein localisation approaches for understanding yeast cell wall biogenesis. *Microsc Res Tech.* 51: 601-612.
- Monteagudo, C., Marcilla, A., Mormeneo, S., Llombart-Bosch, A., Sentandreu, R.** 1995. Specific immunohistochemical identification of *Candida albicans* in paraffin-embedded tissue with a new monoclonal antibody (1B12). *Am J Clin Pathol.* 103: 130-135.
- 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  $\alpha$ 1,2-mannosidase of *Candida albicans* into a soluble cytosolic form. *Microbiology.* 154: 3782-3794.
- Mora-Montes, H.M., Ponce-Noyola, P., Villagómez-Castro, J.C., Gow, N.A., Flores-Carreón, A., López-Romero, E.** 2009. Protein glycosylation in *Candida*. *Future Microbiol.* 4: 1167-1183.
- Moreno-Ruiz, E., Ortu, G., De Groot, P.W.J., 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: 2004-2020.

- Moukadiri, I., Jaafar, L., Zueco, J.** 1999. Identification of two mannoproteins released from cell walls of a *Saccharomyces cerevisiae mnn1 mnn9* double mutant by reducing agents. *J Bacteriol.* 181: 4741-4745.
- Moukadiri, I., Zueco, J.** 2001. Evidence for the attachment of Hsp150/Pir2 to the cell wall of *Saccharomyces cerevisiae* through disulfide bridges. *FEMS Yeast Res.* 1: 241-245.
- Mrsa, V., Seidl, T., Gentsch, M., Tanner, W.** 1997. Specific labelling of cell wall proteins by biotinylation. Identification of four covalently linked O-mannosylated proteins of *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast.* 13: 1145-1154.
- 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: 2585-2597.
- Munro, C.A., Bates, S., Buurman, E.T., Hughes, B., MacCallum, D.M., Bertram, G., Atrih, A., Ferguson, M.A.J., Bain, J.M., Brand, A., Hamilton, S., Westwater, C., Thomson, L.M., Brown, A.J.P., Odds, F., Gow, N.A.R.** 2005. Mnt1p and Mnt2p of *Candida albicans* are partially redundant  $\alpha$ -1,2-mannosyltransferases that participate in O-linked mannosylation and are required for adhesion and virulence. *J Biol Chem.* 280: 1051-1060.
- Munro, C.A., Gow, N.A.** 2001. Chitin synthesis in human pathogenic fungi. *Med Mycol.* 39: 41-53.
- Munro, C.A., Selvaggini, S., De Bruijn, I., Walker, L., Lenardon, M.D., Gerssen, B., Milne, S., Brown, A.J.P., Gow, N.A.R.** 2007. The PKC, HOG and  $Ca^{2++}$  signalling pathways co-ordinately regulate chitin synthesis in *Candida albicans*. *Mol Microbiol.* 63: 1399-1413.
- Munro, C.A., Whitton, R.K., Hughes, H.B., Rella, M., Selvaggini, S., Gow, N.A.** 2003. *CHS8*-a fourth chitin synthase gene of *Candida albicans* contributes to in vitro chitin synthase activity, but is dispensable for growth. *Fungal Genet Biol.* 40: 146-158.

- Munro, C.A., Winter, K., Buchan, A., Henry, K., Becker, J.M., Brown, A.J., Bulawa, C.E., Gow, N.A.** 2001. Chs1 of *Candida albicans* is an essential chitin synthase required for synthesis of the septum and for cell integrity. *Mol Microbiol.* 39: 1414-1426.
- Murgui, A., Elorza, M.V., Sentandreu, R.** 1985. Tunicamycin and papulacandin B inhibit incorporation of specific mannoproteins into the wall of *Candida albicans* regenerating protoplast. *Biochem Biophys Acta.* 884: 552-558.
- Naglik, J.R., Challacombe, S.J., Hube, B.** 2003. *Candida albicans* secreted aspartyl proteinases in virulence and pathogenesis. *Microbiol Mol Biol Rev.* 67: 400-428.
- Nakai, K., Horton, P.** 1999. PSORT: a program for detecting sorting signals in proteins and predicting their subcellular localization. *Trends Biochem Sci.* 24: 34-36.
- Naseem, S., Gunasekera, A., Araya, E., Konopka, J.** 2011. N-Acetylglucosamine (GlcNAc) induction of hyphal morphogenesis and transcriptional responses in *Candida albicans* are not dependent on its metabolism. *J Biol Chem.* 286: 28671-28680.
- Nather, K., Munro, C.A.** 2008. Generating cell surface diversity in *Candida albicans* and other fungal pathogens. *FEMS Microbiol Lett.* 285: 137-145.
- Navarro-García, F., Alonso-Monge, R., Rico, H., Plá, J., Sentandreu, R., Nombela, C.** 1998. A role for the MAP kinase gene *MKC1* in cell wall construction and morphological transitions in *Candida albicans*. *Microbiology.* 144: 411-424.
- Navarro-García, F., Eisman, B., Fiuza, S.M., Nombela, C., Plá, J.** 2005. The MAP kinase Mkc1p is activated under different stress conditions in *Candida albicans*. *Microbiol.* 151: 2737-2749.
- Navarro-García, F., Sanchez, M., Plá, J., Nombela, C.** 1995. Functional characterization of the *MKC1* gene of *Candida albicans*, which encodes a mitogen-activated protein kinase homolog related to cell integrity. *Mol Biol Cell.* 15: 2197-2206.
- Nie, X., Liu, X., Wang, H., Chen, J.** 2010. Deletion of *EFG1* promotes *Candida albicans* opaque formation responding to pH via Rim101. *Acta Biochim Biophys Sin.* 42: 735-744.

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

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

**Nobile, C.J., Bruno, V.M., Richard, M.L., Davis, D.A., Mitchell, A.P.** 2003. Genetic control of chlamydospore formation in *Candida albicans*. *Microbiology.* 149: 3629-3637.

**Noble, S.M., French, S., Kohn, L.A., Chen, V., Johnson, A.D.** 2010. Systematic screens of a *Candida albicans* homozygous deletion library decouple morphogenetic switching and pathogenicity. *Nat Genet.* 42: 590-598.

**Noble, S.M., Johnson, A.D.** 2005. Strains and strategies for large-scale gene deletion studies of the diploid human fungal pathogen *Candida albicans*. *Eukaryot Cell.* 4: 298-309.

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

**Nonaka, H., Tanaka, K., Hirano, H., Fujiwara, T., Kohno, H., Umikawa, M., Mino, A., Takai, Y.** 1995. A downstream target of *RHO1* small GTP-binding protein is PKC1, a homolog of protein kinase C, which leads to activation of the MAP kinase cascade in *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO J.* 14: 5931-5938.

**Nuoffer, C., Horvath, A., Riezman, H.** 1993. Analysis of the sequence requirements for glycosylphosphatidylinositol anchoring of *Saccharomyces cerevisiae* Gas1 protein. *J Biol Chem.* 268: 10558-10563.

**Odds, F.C.** 1988. *Candida* and Candidosis: a review and bibliography. Baillière Tindal ed. London.

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

**Orlean, P., Ammer, A., Watzele, M., Tanner, W.** 1986. Synthesis of an O-glycosylated cell surface protein induced in yeast by alpha-factor. *Proc Natl Acad Sci. USA.* 83: 6263-6266.

- Pappas, P.G.** 2006. Invasive candidiasis. *Infect Dis Clin N Am.* 20: 485-506.
- Pardi, G., Cardozo, E.I.** 2002. Algunas consideraciones sobre *Candida albicans* como agente etiológico de candidiasis bucal. *Acta odontol. Venez.* 40: 9-17.
- Pardini, G., De Groot, P.W., Coste, A.T., Karababa, M., Klis, F.M., De Koster, C.G., Sanglard, D.** 2006. The *CRH* family coding for cell wall glycosylphosphatidylinositol proteins with a predicted transglycosidase domain affects cell wall organization and virulence in *Candida albicans*. *J Biol Chem.* 281: 40399-40411.
- Pastor, F.I.J., Valentín, E., Herrero, E., Sentandreu, R.** 1984. Structure of the *Saccharomyces cerevisiae* cell wall: mannoproteins released by zymoliasis and their contribution to wall architecture. *Biochem Biophys.* 802: 292-300.
- Pearson, G., Robinson, F., Beers, G.T., Xu, B.E., Karandikar, M., Berman, K., Cobb, M.H.** 2001. Mitogen-activated protein (MAP) kinase pathways: regulation and physiological functions. *Endocr Rev.* 22: 153-183
- Pearson, W.R., Lipman, D.J.** 1988. Improved tools for biological sequences analysis. *Proc Natl Acad Sci. USA.* 85: 2444-2448.
- 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.
- Pelroth, J., Choi, B., Spellberg, B.** 2007. Nosocomial fungal infections: epidemiology, diagnosis, and treatment. *Med Mycol.* 45: 321-346.
- 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.** 1996. Nosocomial candidiasis: emerging species, reservoirs, and modes of transmission. *Clin Infect Dis.* 22, S89-94.

- Pfaller, M.A., Diekema, D.J.** 2004. Rare and emerging opportunistic fungal pathogens: concern for resistance beyond *Candida albicans* and *Aspergillus fumigatus*. *J Clin Microbiol.* 42: 4419-4431.
- Pfaller, M.A., Diekema, D.J.** 2007. Epidemiology of invasive candidiasis: a persistent public health problem. *Clin Microbiol Rev.* 20: 133-163.
- Pfaller, M.A., Pappas, P.G., Wingard, J.R.** 2006. Invasive fungal pathogens: current epidemiological trends. *Clin Infect Dis.* 43, S3-14.
- Pham, C.D., Zhanyang, Y., Sandrock, B., Bölker, M., Scott, E., Gold, S., Perlin, M.H.** 2009. *Ustilago maydis* Rho1 and 14-3-3 homologues participate in pathways controlling cell separation and cell polarity. *Eukaryot Cell.* 8: 977-989.
- Plaine, A., Walker, L., Da Costa, G., Mora-Montes, H.M., McKinnon, A., Gow, N.A.R., Gaillardin, C., Munro, C.A., Richard, M.L.** 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  $\beta(1,3)$ -glucanosyltransferases involved in cell wall biogenesis. *J Biol Chem.* 18553-18565.
- Poulain, D., Jouault, T.** 2004. *Candida albicans* cell wall glycans, host receptors and responses: elements for a decisive crosstalk. *Curr Opin Microbiol.* 7: 342-349.
- Prill, S.K., Klinkert, B., Timpel, C., Gale, C.A., Schröppel, K., Ernst, J.F.** 2005. *PMT* family of *Candida albicans*: five protein mannosyltransferase isoforms affect growth, morphogenesis and antifungal resistance. *Mol Microbiol.* 55: 546-560.
- Procop, G.W., Roberts, G.D.** 2004. Emerging fungal diseases: the importance of the host. *Clin Labs Med.* 24: 691-719.
- Qadota, H., Python, C.P., Inoue, S.B., Arisawa, M., Anraku, Y., Zheng, Y., Watanabe, T., Levin, D.E., Ohya, Y.** 1996. Identification of yeast Rho1p GTPase as a regulatory subunit of 1,3- $\beta$ -glucan synthase. *Science.* 272: 279-281.

- Quindós, G., San Millán, R., Robert, R., Bernard, C., Pontón, J.** 1997. Evaluation of Bichro-latex albicans, a new method for rapid identification of *Candida albicans*. *J Clin Microbiol.* 35: 1263-1265.
- 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: 1019-1030.
- Ramage, G., VandeWalle, K., Lopez-Ribot, J.L., Wickes, B.L.** 2002. The filamentation pathway controlled by the Efg1 regulator protein is required for normal biofilm formation and development in *Candida albicans*. *FEMS Microbiol Lett.* 214: 95-100.
- Ramón, A.M., Valentín, E., Maicas, S., Sentandreu, R.** 1997. Expression of *YWPI*, a gene that encodes a specific *Yarrowia lipolytica* micelial cell wall protein, in *Saccharomyces cerevisiae*. *Fungal Genet Biol.* 22: 77-83.
- Rees, J.R., Pinner, R.W., Hajjeh, R.A., Brandt, M.E., Reingold, A.L.** 1998. The epidemiological features of invasive mycotic infections in the San Francisco Bay Area, 1992-1993: results of a population-based laboratory active surveillance. *Clin Infect Dis.* 27: 1138-47.
- Reuss, O., Vik, A., Kolter, R., Morschhäuser, J.** 2004. The *SAT1* flipper, an optimized tool for gene disruption in *Candida albicans*. *Gene.* 341: 119-127.
- Richard, M.L., Nobile, C.J., Bruno, V.M., Mitchell, A.P.** 2005. *Candida albicans* biofilm-defective mutants. *Eukaryot Cell.* 4: 1493-1502.
- Richard, M.L., Plaine, A.** 2007. Comprehensive analysis of glycosylphosphatidylinositol-anchored proteins in *Candida albicans*. *Eukaryot Cell.* 6: 119-133.
- Román, E., Arana, D.M., Nombela, C., Alonso-Monge, R., Plá, J.** 2007. MAP kinase pathways as regulators of fungal virulence. *Trends Microbiol.* 15: 181-190.
- Román, E., Alonso-Monge, R., Gong, Q.H., Li, D.M., Calderone, R., Plá, J.** 2009a. The Cek1 MAPK is a short-lived protein regulated by quorum sensing in the fungal pathogen *Candida albicans*. *FEMS Yeast Res.* 9: 942-955

- Román, E., Cottier, F., Ernst, J.F., Plá, J.** 2009b. Msb2 signaling mucin controls activation of Cek1 mitogen-activated protein kinase in *Candida albicans*. *Eukaryot Cell*. 8: 1235-1249.
- Román, E., Nombela, C., Plá, J.** 2005. The Sho1 adaptor protein links oxidative stress to morphogenesis and cell wall biosynthesis in the fungal pathogen *Candida albicans*. *Mol Biol Cell*. 25: 10611-10627.
- Ruiz-Herrera, J.** 1967. Chemical composition of the cell wall of *Aspergillus* species. *Arch Biochem Biophys*. 122: 18-125.
- Ruiz-Herrera, J.** 1992. Fungal cell wall: structure, synthesis and assembly. CRC Press,
- Ruiz-Herrera, J.** 2012. Fungal Cell Wall. CRC Press.
- Ruiz-Herrera, J., Elorza, M.V., Valentín, E., Sentandreu, R.** 2006. Molecular organization of the cell wall of *Candida albicans* and its relation to pathogenicity. *FEMS Yeast Res*. 6: 14-29.
- Ruiz-Herrera, J., González-Prieto, J.M., Ruiz-Medrano, R.** 2002. Evolution and phylogenetic relationships of chitin synthase from yeasts and fungi. *FEMS Yeast Res*. 1: 247-256.
- Ruiz-Herrera, J., Ruiz-Medrano, R.** 2004. Chitin biosynthesis in fungi. In Handbook of Fungal Biotechnology, 2nd ed. Edited by P.K. Arora. New York: Marcel Dekker.
- Russo, P., Kalkkinen, N., Sareneva, H., Paakkola, J., Makarow, M.** 1992. A heat shock gene from *Saccharomyces cerevisiae* encoding a secretory glycoprotein. *Proc Natl Acad Sci. USA*. 89: 8857.
- Saiki, R.K., Walsh, P.S., Levenson, C.H., Erlich, H.A.** 1989. Genetic analysis of amplified DNA with immobilized sequence-specific oligonucleotide probes. *Proc Natl Acad Sci. USA*. 86: 6230-6234.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T.** 1989. Molecular cloning: a laboratory manual. 2nd ed. Cold Spring Harbor, N.Y. Cold Spring Harbor Laboratory Press.

- San José, C., Alonso-Monge, R., Pérez-Díaz, R.M., Plá, J., Nombela, C.** 1996. The mitogen-activated protein kinase homolog *HOG1* gene controls glycerol accumulation in the pathogenic fungus *Candida albicans*. *J Bacteriol.* 178: 5850-5852.
- Sandini, S., La Valle, R., De Bernardis, F., Macri, C., Cassone, A.** 2007. The 65 KDa mannoprotein gene of *Candida albicans* encodes a putative betaglucanase adhesin required for hyphal morphogenesis and experimental pathogenicity. *Cell Microbiol.* 9: 1223-1238.
- Sandini, S., Stringaro, A., Arancia, S., Colone, M., Mondello, F., Murtas, S., Girolamo, A., Mastrangelo, N., De Bernardis, F.** 2011. The MP65 gene is required for cell wall integrity, adherence to epithelial cells and biofilm formation in *Candida albicans*. *BMC Microbiol.* 11: 106.
- 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.
- Schaller, M., Borelli, C., Korting, H.C., Hube, B.** 2005. Hydrolytic enzymes as virulence factors of *Candida albicans*. *Mycoses.* 48: 365-377.
- Schaller, M., Schackert, C., Korting, H.C., Januschke, E., Hube, B.** 2000. Invasion of *Candida albicans* correlates with expression of secreted aspartic proteinases during experimental infection of human epidermis. *J Invest Dermatol.* 114: 712-717.
- Schmidt, A., Schmelzle, T., Hall, M.N.** 2002. The *RHO1-GAPs* *SAC7*, *BEM2* and *BAG7* control distinct Rho1 functions in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Microbiol.* 45: 1433-1441.
- Selvaggini, S., Munro, C.A., Paschoud, S., Sanglard, D., Gow, N.A.** 2004. Independent regulation of chitin synthase and chitinase activity in *Candida albicans* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiology.* 150: 921-928.

- Shahinian, S., Bussey, H.** 2000.  $\beta$ -1,6-glucan synthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Microbiol.* 35: 477-489.
- Shahinian, S., Dijkgraaf, G.J., Sdicu, A.M., Thomas, D.Y., Jakob, C.A., Aebi, M., Bussey, H.** 1998. Involvement of protein N-glycosyl chain glucosylation and processing in the biosynthesis of cell wall  $\beta$ -1,6-glucan of *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics.* 149: 843-856.
- Sharkey, L.L., McNemar, M.D., Saporito-Irwin, S.M., Sypherd, P.S., Fonzi, W.A.** 1999. *HWPI* functions in the morphological development of *Candida albicans* downstream of *EFG1*, *TUP1* and *RBF1*. *J Bacteriol.* 181:5273-5279.
- Shaw, J.A., Mol, P.C., Bowers, B., Silverman, S.J., Valdivieso, M.H., Durán, A., Cabib, E.** 1991. The function of chitin synthases 2 and 3 in the *Saccharomyces cerevisiae* cell cycle. *J Cell Biol.* 114: 111-123.
- Shematek, E.M., Broatz, J.A., Cabib, E.** 1980. Biosynthesis of the yeast cell wall. I. Preparation and properties of  $\beta$ (1 $\rightarrow$ 3) glucan synthetase. *J Biol Chem.* 255: 888-894.
- Shematek, E.M., Cabib, E.** 1980. Biosynthesis of the yeast cell wall. II. Regulation of  $\beta$ (1,3)-glucan synthetase by ATP and GTP. *J Biol Chem.* 255: 895-902.
- Sherman, F., Fink, G.R., Hicks, J.B.** 1986. *Methods in yeast genetics.* Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY.
- Sheth, C.C., Hall, R., Lewis, L., B, A.J.P., Odds, F.C., Erwig, L.P., Gow, N.A.R.** 2011. Glycosylation status of the *C. albicans* cell wall affects the efficiency of neutrophil phagocytosis and killing but not cytokine signaling. *Med Mycol.* 49: 513-524.
- Sigrist, C.J., Cerutti, L., Hulo, N., Gattiker, A., Falquet, L., Pagni, M., Bairoch, A., Bucher, P.** 2002. PROSITE: a documented database using patterns and profiles as motif descriptors. *Brief Bioinform.* 3: 265-274.
- Singh, P., Ghosh, S., Datta, A.** 2001. Attenuation of virulence and changes in morphology in *Candida albicans* by disruption of the N-acetylglucosamine catabolic pathway. *Infect Immun.* 69: 7898-7903.
- Sipos, G., Puoti, A., Conzelmann, A.** 1995. Biosynthesis of the side chain of yeast glycosyl phosphatidylinositol anchors is operated by novel mannosyltransferases

located in the endoplasmic reticulum and the Golgi apparatus. *J Biol Chem.* 270: 19709-19715.

**Smith, D.A., Nicholls, S., Morgan, B.A., Brown, A.J., Quinn, J.** 2004. A conserved stress-activated protein kinase regulates a core stress response in the human pathogen *Candida albicans*. *Mol Biol Cell.* 15: 4179-4190.

**Smith, S.E., Csank, C., Reyes, G., Ghannoum, M.A., Berlin, V.** 2002. *Candida albicans RHO1* is required for cell viability in vitro and in vivo. *FEMS Yeast Res.* 2: 103-111.

**Smolenski, G., Sullivan, P.A., Cutfield, S.M., Cutfield, J.F.** 1997. Analysis of secreted aspartic proteinases from *Candida albicans*: purification and characterization of individual Sap1, Sap2 and Sap3 isoenzymes. *Microbiology.* 143: 349-356.

**Sobel, J.D., Rex, J.H.** 2001. Invasive candidiasis: turning risk into a practical prevention policy? *Clin Infect Dis.* Rew 33: 187-190.

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

**Spellberg, B.** 2011. Vaccines for invasive fungal infections. *F1000 Med Rep.* 3, 13

**Srikantha, T., Tsai, L., Daniels, K., Klar, A.J., Soll, D.R.** 2001. The histone deacetylase genes *HDA1* and *RPD3* play distinct roles in regulation of high-frequency phenotypic switching in *Candida albicans*. *J Bacteriol.* 183: 4614-4625.

**Staab, J.F., Bradway, S.D., Fidel, P.L., Sundstrom, P.** 1999. Adhesive and mammalian transglutaminase substrate properties of *Candida albicans* Hwp1. *Science.* 283: 1535-1538

**Staib, P., Kretschmar, M., Nichterlein, T., Hof, H., Morschhauser, J.** 2000. Differential activation of a *Candida albicans* virulence gene family during infection. *Proc Natl Acad Sci.* 97: 6102-6107.

**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.

**Sturtevant, J., Dixon, F., Wadsworth, E., Latge, J.P., Zhao, X.J., Calderone, R.** 1999. Identification and cloning of *GCA1*, a gene that encodes a cell surface glucoamylase from *Candida albicans*. *Med Mycol.* 37: 357-366.

**Sundstrom, P.** 2002. Adhesion in *Candida spp.* *Cell Microbiol.* 4: 461-469.

**Sundstrom, P., Cutler, J.E., Staab, J.F.** 2002. Reevaluation of the role of *HWPI* in systemic candidiasis by use of *Candida albicans* strains with selectable marker *URA3* targeted to the *ENO1* locus. *Infect Immun.* 70:3281-3283

**Sundstrom, P.M., Kenny, G.E.** 1984. Characterization of antigens specific to the surface of germ tubes of *Candida albicans* by immunofluorescence. *Infect Immun.* 43: 850-855.

**Surarit, R., Gopal, P.K., Shepherd, M.G.** 1988. Evidence for a glucosidic linkage between chitin and glucan in the cell wall of *Candida albicans*. *J Gen Microbiol.* 134: 1723-1730.

**Tebarth, B., Doedt, T., Krishnamurthy, S., Weide, M., Monterola, F., Domínguez, A., Ernst, J.F.** 2003. Adaptation of the *Efg1p* morphogenetic pathway in *Candida albicans* by negative autoregulation and PKA-dependent repression of the *EFG1* gene. *J Mol Biol.* 329: 949-962.

**Tellez, I., Barragan, M., Franco-Paredes, C., Petraro, P., Nelson, K., Del Rio, C.** 2008. *Pneumocystis jiroveci* pneumonia in patients with AIDS in the inner city: a persistent and deadly opportunistic infection. *Am J Med Sci.* 335: 192-197.

**Theiss, S., Ishdorj, G., Brenot, A., Kretschmar, M., Lan, C.Y., Nichterlein, T., Hacker, J., Nigam, S., Agabian, N., Kohler, G.A.** 2006. Inactivation of the phospholipase B gene *PLB5* in wild-type *Candida albicans* reduces cell-associated phospholipase A2 activity and attenuates virulence. *Int J Med Microbiol.* 296: 405-420.

**Thomson, L.M., Bates, S., Yamazaki, S., Arisawa, M., Aoki, Y., Gow, N.A.** 2000. Functional characterization of the *Candida albicans MNT1* mannosyltransferase expressed heterologously in *Pichia pastoris*. *J Biol Chem.* 275: 18933-18938.

- Tiede, A., Bastisch, I., Schubert, J., Orlean, P. And Schmidt, R.E.** 1999. Biosynthesis of glycosylphosphatidylinositols in mammals and unicellular microbes. *Biol Chem.* 380: 503-523.
- Timpel, C., Zink, S., Strahl-Bolsinger, S., Schröppel, K., Ernst, J.** 2000. Morphogenesis, adhesive properties, and antifungal resistance depend on the Pmt6 protein mannosyltransferase in the fungal pathogen *Candida albicans*. *J Bacteriol.* 182: 3063-3071.
- 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.
- Tzung, K.W., Williams, R.M., Scherer, S., Federspiel, N., Jones, T., Hansen, N., Bivolarevic, V., Huizar, L., Komp, C., Surzycki, R., Tamse, R., Davis, R.W. Agabian, N.** 2001. Genomic evidence for a complete sexual cycle in *Candida albicans*. *Proc Natl Acad Sci. USA.* 98: 3249-3253.
- 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 Microbiol.* 130: 1419-1428.
- Valentín, 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.
- 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: 3104-3110.
- Vaerki, A.** 1999. Exploring the biological roles of glycans. In: Vaerki, A., Cummings, R., Esko, J., Freeze, H., Hart, G., Marth, J., eds. *Esenciales of Glucobiology*. New York: Cold Spring Harbor. Laboratory Press, 1999: 57-68.
- Verstrepen, K.J., Klis, F.M.** 2006. Flocculation, adhesion and biofilm formation in yeasts. *Mol Microbiol.* 60:5-15.

**Von Heijne, G.** 1986. A new method for predicting signal sequence cleavage sites. *Nucleic Acids Res.* 14: 4683-4690.

**Wagener, J., Weindl, G., De Groot, P.W., De Boer, A.D., Kaesler, S., Thavaraj, S., Bader, O., Mailänder-Sanchez, D., Borelli, C., Weig, M., Biedermann, T., Naglik, J.R., Korting, H.C., Schaller, M.** 2012. Glycosylation of *Candida albicans* cell wall proteins is critical for induction of innate immune responses and apoptosis of epithelial cells. *PLoS One.* 7: e50518.

**Walker, L.A., Munro, C.A., De Bruijn, I., Lenardon, M.D., McKinnon, A., Gow, N.A.R.** 2008. Stimulation of chitin synthesis rescues *Candida albicans* from Echinocandins. *PLoS Pathog.* E1000040, 1-12.

**Wass, M.N., Kelley, L.A., Sternberg, M.J.** 2010. 3DLigand Site: predicting ligand-binding sites using similar structures. *Nucleic acids research* 38 (Web Server issue): W469-473.

**Widmann, C., Gibson, S., Jarpe, M.B., Johnson, G.L.** 1999. Mitogen-activated protein kinase: conservation of a three-kinase module from yeast to human. *Physiol Rev.* 79: 143-180

**Wison, L.S., Reyes, C.M., Stolpman, M., Speckman, J., Allen, K., Beney, J.** 2002. The direct cost and incidence of systemic fungal infections. *Value Health.* 5: 26-34.

**Xu, W., Mitchell, A.P.** 2001. Yeast PalA/AIP1/Alix homolog Rim20p associates with a PEST-like region and is required for its proteolytic cleavage. *J Bacteriol.* 183: 6917-6923

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

**Zaoutis, T.E., Argon, J., Chu, J., Berlin, J.A., Walsh, T.J., Feudtner, C.** 2005. The epidemiology and attributable outcomes of candidemia in adults and children hospitalized in the United States: a propensity analysis. *Clin Infect Dis.* 41: 1231-1239.

**Zaragoza, R., Pemán, J.** 2012. Opciones terapéuticas para el tratamiento antifúngico en el paciente crítico. *Rev Iberoam Micol.* 29: 108-113.

**Zhao, R., Daniels, K.J., Lockhart, S.R., Yeater, K.M., Hoyer, L.L., Soll, D.R.** 2005. Unique aspects of gene expression during *Candida albicans* mating and possible G1 dependency. *Eukaryot Cell.* 4: 1175-1190.

**Zhao, X., Oh, S.H., Yeater, K.M., Hoyer, L.L.** 2005. Analysis of the *Candida albicans* Als2p and Als4p adhesins suggests the potential for compensatory function within the Als family. *Microbiology.* 151:1619-1630.

**Zhao, X., Pujol, C., Soll, D.R., Hoyer, L.L.** 2003. Allelic variation in the contiguous loci encoding *Candida albicans* ALS5, ALS1 and ALS9. *Microbiology.* 149: 2947-2960.

**Zhao, X., Oh, S-H., Cheng, G., Green, C.B., Nuessen, J.A., Yeater, K., Leng, R.P., Brown, A.J.P., Hoyer, L.L.** 2004. ALS3 and ALS8 represent a single locus that encodes a *Candida albicans* adhesin; functional comparisons between Als3p and Als1p. *Microbiology.* 150: 2415-2428.

**Zilberberg, M.D., Schorr, A.F., Kollef, M.H.** 2008. Secular trends in candidemia-related hospitalization in the United States, 2000-2005. *Infect Control Hosp Epidemiol.* 29: 978-980.



## **VII. AGRADECIMIENTOS.**



Me gustaría agradecer la ayuda prestada a todas aquellas personas que, tanto científica como personalmente, han contribuido al desarrollo de esta Tesis Doctoral.

A mis directores de Tesis, el Dr. Rafael Sentandreu Ramón y el Dr. Eulogio Valentín Gómez, por su apoyo y ayuda. A D. Rafael, por darme su confianza y seguridad, que me acompañarán siempre y mostrarme que las cosas en Ciencia son lo que son, no lo que queremos o creemos que deberían ser. Me ha transmitido su punto especial de perseverancia e inconformismo tan necesarios en este campo y en la vida. A Eulogio, por su confianza en mí y por su apoyo constante en la resolución de cualquier problema, ha sido un placer trabajar con él.

A mi querido Dr. José Ruiz-Herrera, por todo lo que he aprendido de él en sus visitas al laboratorio y “discutir” con él de Ciencia, ha sido siempre divertido y enriquecedor.

A los profesores del Departamento de Microbiología y Ecología, especialmente al Dr. Lucas del Castillo y Dr. Jesús Zueco por la ayuda en cualquier situación que lo requiriera y al Dr. Daniel Gozalbo y a la Dra Amelia Murgui por su gran calidad humana.

A profesores de otras Unidades Departamentales como el Dr. Antonio Marcilla, por sus ánimos constantes, al Dr. Joaquín Timoneda y al Dr. Fernando Aniento, por su ayuda desinteresada. También, al Dr. Sergi Maicas por su interés en mi trabajo y por su colaboración en algún apartado del presente trabajo.

Además, quiero agradecer al Dr. Enrique Calvo y al Dr. Juan Antonio López de la Unidad de Proteómica en el Centro Nacional de Investigaciones Cardiovasculares de Madrid, su colaboración en la identificación de proteínas mediante espectrometría de masas.

Agradecer a mis compañeros y amigos del laboratorio: Leslie, Teresa, Samuel, Ruth y Miguel tantos buenos momentos que han tenido lugar dentro y fuera de la facultad. Leslie, por su acogida tan familiar en el laboratorio, Teresa, siempre dispuesta a ayudar y hacerme agradable cualquier circunstancia. A Sam, por ser ese compañero y amigo preocupado de que todo mi esfuerzo no sea en vano, a Ruth, por ser tal como es, un encanto de persona y finalmente a Miguel que siempre sabía dar una respuesta y solución a cualquier problema científico que surgiera. Es importante mencionar también

a compañeras procedentes de otros laboratorios como Emira y Jihène que nos daban a conocer su cultura y aportaban “aires nuevos”.

A mi querida jefa de farmacia y amiga, la Dra María Sentandreu, que me ha brindado la oportunidad de poder compaginar la elaboración de esta Tesis Doctoral con el trabajo en su empresa, siendo en todo momento muy comprensible y dándome consejos que siempre han valido la pena. A mis compañeros, Marta y Emilio, que a pesar de desconocer como es este “mundillo de la investigación” siempre se han mostrado receptivos e interesados.

Quiero dar las gracias también a todos mis amigos y compañeros de carrera que ajenos al conocimiento de la investigación en levaduras, se han interesado de mi vida en estos últimos años, con los que he podido compartir y enseñar en que consiste la investigación y lo fascinante que puede llegar a ser.

Finalmente, es muy importante agradecer a mis padres, a mis hermanos y al resto de toda mi familia que a partir de ahora “conocen a *Candida albicans*”, su confianza y cariño. Dedicando especialmente el esfuerzo de esta Tesis Doctoral a la persona más maravillosa, mi madre, que sin su apoyo estoy seguro que no se hubiera podido finalizar este trabajo.

A todos los anteriormente citados y a los que no menciono pero que están en mi corazón, quiero dar mis más sentidas gracias, el hecho de haberlos conocido justifica plenamente mi agradecimiento.

**Muchas gracias.**



