

Departamento de Microbiología y Genética
Instituto de Biología Funcional y Genómica
(USAL / CSIC)



TESIS DOCTORAL

Regulación por NDR kinasas durante el crecimiento polarizado en *C. albicans*

Memoria presentada por **Ana Santos Almeida**
para optar al Grado de Doctor en Biología por la
Universidad de Salamanca (dentro del Programa de
Doctorado de Biología Funcional y Genómica)

Salamanca, 2021



EL Dr. Francisco del Rey Iglesias, Coordinador del Programa de Doctorado de Biología Funcional y Genómica de la Universidad de Salamanca.

CERTIFICA:

Que la memoria titulada “**Regulación por NDR kinasas durante el crecimiento polarizado en *C. albicans***” presentada por la graduada Ana Santos Almeida para optar al Grado de Doctor en Biología por la Universidad de Salamanca (dentro del Programa de Doctorado de Biología Funcional y Genómica), ha sido realizada bajo la dirección del Dr. Carlos Rodríguez Vázquez de Aldana y el Dr. Francisco del Rey Iglesias, en el Instituto de Biología Funcional y Genómica, Centro Mixto de la Universidad de Salamanca y el Consejo Superior de Investigaciones Científicas.

Y para autorizar su presentación y evaluación por el tribunal correspondiente, firma el presente certificado en Salamanca, a 26 de Octubre del 2021.

Fdo. Dr. Francisco del Rey Iglesias



El Dr. Carlos Rodríguez Vázquez de Aldana, Investigador Científico del CSIC y el Dr. Francisco del Rey Iglesias, Catedrático de Microbiología en la Universidad de Salamanca,

CERTIFICAN:

Que la licenciada Ana Santos Almeida ha realizado el trabajo titulado “**Regulación por NDR kinasas durante el crecimiento polarizado en *C. albicans***” bajo su dirección, en el Centro Mixto Instituto de Biología Funcional y Genómica (Consejo Superior de Investigaciones Científicas y Universidad de Salamanca).

Y para autorizar su presentación y evaluación por el tribunal correspondiente, firman el presente certificado en Salamanca, a 26 de Octubre del 2021.

Fdo. Dr. Carlos Rodríguez Vázquez de Aldana

Fdo. Dr. Francisco del Rey Iglesias

Esta tesis doctoral ha sido financiada por una beca predoctoral de Formación de Personal Investigador (FPI) del Ministerio de Economía y Competitividad del Gobierno de España con referencia BES-2016-078778 y asociada al proyecto de investigación BIO2015-70195-C2-1-R en el Organismo CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS (CSIC)

Abreviaturas y siglas

- Δ:** Delección
- aa:** Aminoácido
- AcLi:** Acetado de litio
- ADN:** Ácido desoxirribonucleico
- AGC:** Grupo de kinasas denominadas así por las proteínas kinasas A, G y C
- Amp:** Ampicilina
- As-:** *Analogous sensitive*
- AMPc:** Adenosín mono-fosfato cíclico
- ARN:** Ácido Ribonucleico
- ARNasa:** Ribonucleasa
- ARNm:** ARN mensajero
- Cdc:** Ciclo de división celular
- CDK:** Kinasa dependiente de Ciclina
- CF:** Calcoflúor
- ClonNat:** Nourseotricina (*Nourseothricin*)
- C-terminal:** Carboxiterminal
- CWI:** Ruta de Integridad de la Pared Celular (*Cell Wall Integrity*)
- DAPI:** 4',6-diamino-2-fenilindol
- DIC:** Microscopía diferencial de contraste de interferencia (*Differential Interference Contrast*)
- DMSO:** Dimetil sulfóxido
- DTT:** Ditiotreitól (*DiThioThreitol*)
- EDTA:** Ácido etilendiaminotetra-acético (*EthyleneDiamineTetraacetic Acid*)
- FEAR:** Liberación temprana de Cdc14 (*cdc Fourteen Early Anaphase Release*)
- GAP:** Proteína activadora de la actividad GTPasa (*GTPase Activating Protein*)
- GDP:** Guanosín Difosfato
- GEF:** Factor de intercambio de nucleótidos (*Guanine nucleotide Exchange Factor*)
- GFP:** Proteína Fluorescente Verde (*Green Fluorescent Protein*)
- GlcNAc:** N-acetil-D-glucosamina
- GTP:** Guanosina trifosfato
- GTPasa:** Guanosina trifosfatasa
- HSG:** Genes específicos de hifas (*Hyphae-Specific Genes*)
- KD:** *Kinase-Dead*
- kDa:** Kilodalton
- kV:** Kilovoltio
- LB:** Medio rico para *E. coli* (*Luria-Bertani*)
- MAPK:** Proteína quinasa activada por mitógeno (*Mitogen-Activated Protein Kinase*)
- Mb:** Megabases
- MEN:** Ruta de salida de mitosis (*Mitotic Exit Network*)
- Min:** Minutos
- MTL:** Locus de apareamiento (*Mating Type Like*)
- N-terminal:** Aminoterminal
- NDR:** Kinasa nuclear relacionada con Dbf2 (*Nuclear Dbf2-Related kinase*)

D.O.: Densidad óptica
ORF: Fase de lectura abierta (*Open Reading Frame*)
pb: Pares de bases
PBS: Tampón fosfato salino (*Phosphate-Buffered Saline*)
PBS- T: Buffer fosfato salino + Tween 1% (*Phosphate-Buffered Saline + Tween 1%*)
PCR: Reacción en cadena de la polimerasa (*Polymerase Chain Reaction*)
PH: Homología con Pleckstrinas (*Pleckstrin Homology*)
PKA: Protein Kinase A
PVDF: Fluoruro de polivinilideno (*PolyVinylidene Fluoride*)
RAM: Ruta de regulación de Ace2 y morfogénesis (*Regulation of Ace2 and Morphogenesis*)
rpm: Revoluciones por minuto (*Revolutions Per Minute*)
DS: Desviación estándar (*Standard Deviation*)
SDS: Dodecil Sulfato Sódico (*Sodium Dodecyl Sulfate*)
SDS-PAGE: Electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes
SEM: Error estándar de la media (*Standard Error of the Mean*)
SIN: Ruta de inicio de la septación (*Septation Initiation Network*)
SNARE: Receptores de SNAP (Soluble NSF Attachment Protein Receptor)
SPB: Cuerpo Polar del huso (*Spindle Pole Body*)
TCA: Ácido tricloroacético (*Trichloroacetic Acid*)
YEPD: Medio rico para *Candida* (*Yeast Extract Peptone Dextrose*)
YNB: Medio mínimo para *C. albicans*, nitrógeno base (*Yeast Nitrogen Base*)
WT: Silvestre (*wild type*)

Índice

INTRODUCCIÓN

1. <i>Candida albicans</i> y la salud pública	1
2. Genoma y ciclo sexual de <i>C. albicans</i>	4
3. Morfología de <i>C. albicans</i>	5
3.1. Contribución de las distintas formas morfológicas a la virulencia de <i>C. albicans</i>	7
3.2. Ciclo celular de levaduras	9
3.2.1. Importancia de las septinas en el ciclo celular.	10
3.3. Transición levadura-hifa.....	12
3.3.1. Rutas de señalización implicadas en la transición levadura-hifa.....	13
3.3.2. La ciclina de G1 Hgc1 promueve el desarrollo hifal en <i>C. albicans</i>	14
3.3.3. Rho GTPasas.....	16
3.3.4. El polarisoma y el excisto.....	16
4. Las kinasas de la familia NDR y el crecimiento polarizado.....	18
4.1. La ruta de salida de mitosis MEN (<i>Mitotic Exit Network</i>).	19
4.2. La ruta de señalización RAM (<i>Regulation of Ace2 and Morphogenesis</i>).....	20
4.3. Regulación de Ace2 durante la degradación del septo y entrada en G1.....	21
4.4. Control de la traducción de proteínas por la ruta RAM.....	23
4.5. Control del crecimiento polarizado y la morfogénesis por la ruta RAM.....	24
4.6. La ruta RAM en <i>C. albicans</i>	24

OBJETIVOS

RESULTADOS

Capítulo 1. Análisis bioinformático del proteoma de <i>C. albicans</i>	33
Capítulo 2. Caracterización de la función de Cbk1 durante el desarrollo hifal en <i>C. albicans</i>	39
2.1. Introducción y antecedentes	39
2.2. Determinación del crecimiento polarizado en las distintas etapas de la filamentación de <i>C. albicans</i>	40
2.3. Importancia de Cbk1 en el mantenimiento del crecimiento polarizado de la hifa.	42
2.4. Estudio del efecto de la inhibición de la actividad de Cbk1 en proteínas implicadas en polaridad y crecimiento en <i>C. albicans</i>	44
2.4.1. La actividad kinasa de Cbk1 contribuye a la polarización de Cdc42 activo en el ápice de las hifas.....	46
2.4.2 Cbk1 contribuye al mantenimiento de la polarización de los parches de actina en el ápice de las hifas	47
2.4.3. Cbk1 es esencial para el mantenimiento del polarisoma en el ápice de las hifas	49
2.4.4. Cbk1 también es necesario para el mantenimiento de la polarización del excisto durante el crecimiento hifal.	51
2.5. Relación entre la kinasa Cbk1 y el factor de transcripción Ace2.....	54
2.5.1. La inhibición de la actividad kinasa de Cbk1 resulta en la pérdida de la asimetría de la localización de Ace2.....	55
2.5.2. Ace2 contribuye, junto con Cbk1, al crecimiento polarizado de las hifas.....	57
2.5.3. Construcción de un mutante condicional de <i>ACE2</i>	59

Capítulo 3. Estudio de la función de la GTPasa Rho4 durante el crecimiento polarizado en *C.*

<i>albicans</i>	63
3.1. Caracterización de la función de Rho4 durante el crecimiento levaduriforme de <i>C. albicans</i>	63
3.1.1. Los defectos en separación tras la delección de <i>RHO4</i> no se deben a un mal ensamblaje del anillo de septinas.....	63
3.2. Caracterización de la función de Rho4 durante la filamentación de <i>C. albicans</i>	65
3.3. Caracterización de la función de Rho4 en separación celular durante la filamentación de <i>C. albicans</i>	67
3.3.1. Rho4 es necesario para la separación de las hifas.	67
3.4. Rho4 se localiza en los septos y como puntos dinámicos en el córtex celular.	69
3.4.1. La localización de Rho4 no se encuentra afectada en los mutantes <i>sep7ΔΔ</i>	74
3.4.2. La localización de Rho4 no depende de la actividad de Cbk1	75
3.5. Los posibles sitios de fosforilación por Cbk1 son importantes en levaduras e hifas	76
3.5.1. Las mutaciones en los posibles sitios de fosforilación por Cbk1 afectan a la separación celular en levaduras.....	79
3.5.2. El mutante fosfomimético presenta hifas más largas y gruesas.....	79
3.5.3. Los mutantes en los sitios de fosforilación corrigen el defecto de separación de las hifas de la cepa <i>sep7ΔΔ</i>	80
3.6. Las proteínas rho4-3A y rho4-3E se localizan en el septo con un patrón temporal diferente al de la proteína silvestre.	81
 Capítulo 4. Estudio preliminar de la función del componente del exocisto Exo84 durante el crecimiento polarizado en <i>C. albicans</i>	89
4.1. Diferentes estrategias para la construcción de cepas con el gen <i>EXO84</i> regulado por tetraciclina.	89
4.2. Caracterización del fenotipo de las cepas mutantes durante el crecimiento levaduriforme.....	94
4.3. Caracterización del fenotipo de las cepas mutantes durante el crecimiento hifal.	96
 DISCUSIÓN	
1. Función de la NDR kinasa Cbk1 en la fase de mantenimiento del crecimiento hifal en <i>C. albicans</i>	99
1.1. La importancia del crecimiento polarizado	99
1.2. Función de Cbk1 en las dos etapas del proceso de filamentación.....	100
1.3. Cbk1 regula la localización de proteínas clave en el crecimiento polarizado.....	102
1.4. Cbk1 y la exocitosis	104
1.5. Cbk1 y la endocitosis.....	107
1.6. Cbk1 y la asimetría celular durante el crecimiento hifal.....	108
1.7. Cbk1 y las GTPasas de la familia Rho.....	111
 CONCLUSIONES	
 MATERIALES Y MÉTODOS	
1. Microorganismos utilizados.....	119
2. Medios de cultivo y condiciones de crecimiento.....	119
3. Procedimientos generales de clonación molecular.	119
3.1 Obtención de ADN plasmídico.	119

3.2. Obtención de ADN genómico de <i>C. albicans</i>	120
3.3. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).	120
3.4. Manipulación del ADN y ligación.	120
3.5. Construcción de plásmidos por ensamblaje.....	121
3.6. Generación de mutaciones puntuales.	121
4. Construcción de plásmidos y cepas de <i>C. albicans</i>	122
4.1. Mutantes de delección.....	122
4.2. Construcción de los plásmidos pFA-RHO4-3A-ARG4 y pFA-RHO4-3E-ARG4.	122
4.3. Construcción de los plásmidos pFA-EXO84-3A-URA3-Clox y pFA-EXO84-3E-URA3-Clox.	124
4.4. Construcción del plásmido pFA-URA3-Clox-HOP1p-myc.....	124
4.5. Construcción de los plásmidos pDIS-URA3-Clox-EXO84-3A y pDIS-URA3-Clox-EXO84-3E.....	125
4.6. Inserción de las mutaciones en el genoma de <i>C. albicans</i>	125
5. Transformación de <i>Escherichia coli</i>	126
6. Transformación de <i>Candida albicans</i>	127
7. Extracción, detección y análisis de proteínas.....	128
7.1 Extracción de proteínas	128
7.2. Separación electroforética e inmunodetección de proteínas (Western Blot).....	128
8. Técnicas de microscopía.	129
8.1. Preparación de muestras.....	129
8.2. Tinción con calcoflúor.	129
8.3. Microscopía óptica.....	129
8.3. Microscopía de fluorescencia in vivo.	129
8.4 Microscopía confocal a lo largo del tiempo (<i>time-lapse</i>).....	130

BIBLIOGRAFÍA

Introducción

1. *Candida albicans* y la salud pública.

Los hongos son organismos eucariotas con una gran distribución en el medio ambiente. Forman una parte importante de nuestro microbioma, con relaciones simbióticas que pueden ser mutualistas, comensalistas, parasitarias o amensalistas (Hall y Noverr, 2017). Muchos de los hongos asociados a los seres humanos se clasifican como patógenos oportunistas (como es el caso de *Candida* y *Cryptococcus*), los cuales causan enfermedades principalmente en individuos inmunodeprimidos, mientras que solo algunos de ellos se consideran verdaderos patógenos que causan enfermedades en individuos sanos (*Histoplasma* y *Paracoccidioides*).

C. albicans forma parte de la microbiota habitual del ser humano y habita en la mucosa vaginal, oral y gastrointestinal de individuos sanos como comensal inocuo (Drell *et al.*, 2013; Ghannoum *et al.*, 2010; Nash *et al.*, 2017; Williams *et al.*, 2013). En mujeres sanas, *C. albicans* se mantiene como simbionte mutualista colonizando de manera persistente la vagina, lo cual podría darse por la ubicación de ésta entre el recto y la uretra (Hall y Noverr, 2017). Las relaciones antagónicas que *C. albicans* ejerce sobre muchas especies bacterianas, incluidas aquellas que causan infecciones del tracto urinario (ITU) como *Escherichia coli*, inhiben la migración de estos patógenos desde el recto a la uretra, proporcionando de esta manera una barrera microbiológica (Hall y Noverr, 2017). Sin embargo, en condiciones específicas del hospedador y del medio ambiente, *C. albicans* puede pasar de su estado comensal a un estado parasitario, pudiendo actuar como patógeno oportunista.

La patogenicidad microbiana es el resultado de la interacción entre un huésped y un microorganismo, y puede resultar de factores microbianos y/o de la respuesta del hospedador. Por tanto, el resultado de esta interacción y la ratio daño/beneficio al huésped determina la virulencia del microorganismo (Casadevall y Pirofski, 2003). *C. albicans* es un claro ejemplo de la gran capacidad que poseen algunos hongos de ajustar su relación daño/beneficio con el hospedador en función de las condiciones del medio, por lo que es el comensal fúngico más estudiado por la transición de comensal a patógeno (Hall y Noverr, 2017) (Figura 1).

Las infecciones de las mucosas, caracterizadas por la colonización por hongos (es decir, el crecimiento excesivo) asociada con una respuesta inflamatoria del huésped, son extremadamente comunes y pueden tener un impacto importante en la calidad de vida de muchas personas (Figura 2) (d'Enfert *et al.*, 2021). Por ejemplo, la mayoría de las mujeres en edad reproductiva (75%) experimentarán al menos un episodio de candidiasis vulvovaginal en su vida, y más de un 5% la sufrirá de manera recurrente (Rosati *et al.*, 2020; Yano *et al.*, 2019). Los factores de riesgo de candidiasis vulvovaginales incluyen niveles altos de estrógenos, el uso de anticonceptivos orales y diabetes no controlada (d'Enfert *et al.*, 2021). Por otro lado, las candidiasis orofaríngeas se pueden deber a factores como deficiencias nutricionales, disbiosis local, disfunción salival, tabaquismo, uso de dentaduras postizas e inmunidad disfuncional de las células T debido a alteraciones genéticas u otras infecciones (Vila *et al.*, 2020).

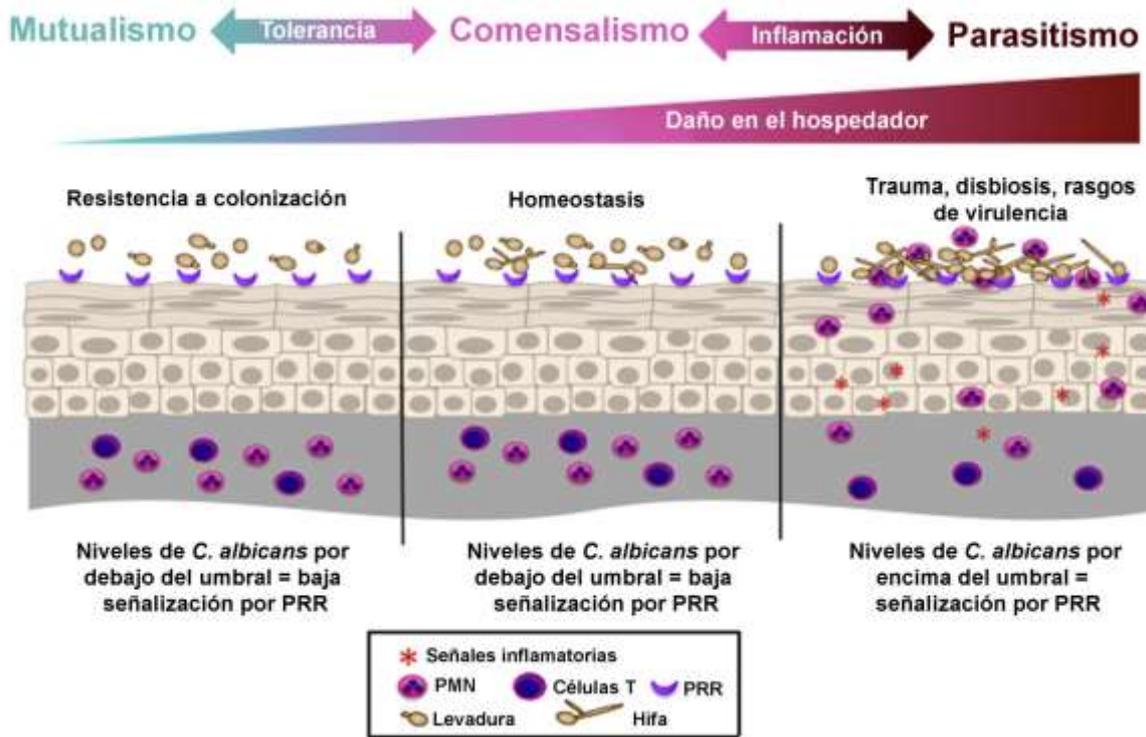


Figura 1. Transición de *C. albicans* de comensal a parásito. Durante el desarrollo como comensal, *C. albicans* presenta, predominantemente, un crecimiento levaduriforme y es tolerada por el huésped. En este caso, no activa la respuesta inmunitaria. Los períodos de disbiosis (momentos en los que se produce un desequilibrio de la microbiota habitual) e inmunosupresión permiten que *C. albicans* prolifere, induzca la formación de hifas y active la respuesta inmune en el hospedador. En la mucosa vaginal, las células epiteliales se sensibilizan dando como resultado la hiperactivación de la respuesta inmune y la afluencia de neutrófilos. Esta hiperactivación de los neutrófilos provoca un daño en la mucosa vaginal y candidiasis vaginal sintomática. PMN, leucocitos polimorfonucleares, PRR receptores de reconocimiento de patrón (*pattern recognition receptors*). Imagen modificada de Hall y Noverr, 2017.

De esta manera, *C. albicans* puede causar infecciones leves de piel o mucosas e infecciones sistémicas (candidemias), potencialmente mortales, que pueden surgir cuando el hongo ingresa al torrente sanguíneo (Cottier y Hall, 2019). La presencia de un catéter intravenoso, diálisis, estancias prolongadas en unidades de cuidados intensivos (UCI), cirugía mayor, prótesis (por la capacidad de *C. albicans* de formar *biofilms* sobre superficies inertes) y la nutrición parenteral se encuentran entre los factores que predisponen a sufrir una candidiasis sistémica (Pappas *et al.*, 2018; Tsui *et al.*, 2016). Además, la toma de antibióticos de amplio espectro, una ingesta de alta frecuencia de carbohidratos, desequilibrios hormonales y una nutrición deficiente también pueden ser factores contribuyentes (Williams *et al.*, 2013).

Una vez en el torrente sanguíneo, *C. albicans* puede diseminarse a casi todos los órganos, incluyendo el riñón, el hígado y el bazo (Pappas *et al.*, 2018). La tasa de mortalidad por estas infecciones, que varía según las regiones geográficas, se sitúa entre el 10 al 20%, estando el riesgo de muerte relacionado con el aumento de la edad, mayor fisiología aguda y enfermedad crónica del paciente (Pappas *et al.*, 2018). De hecho, la candidiasis invasiva está estrechamente vinculada a los avances en la tecnología médica y está ampliamente reconocida como una de las principales causas de morbilidad y mortalidad en el entorno hospitalario (Magill *et al.*, 2014).

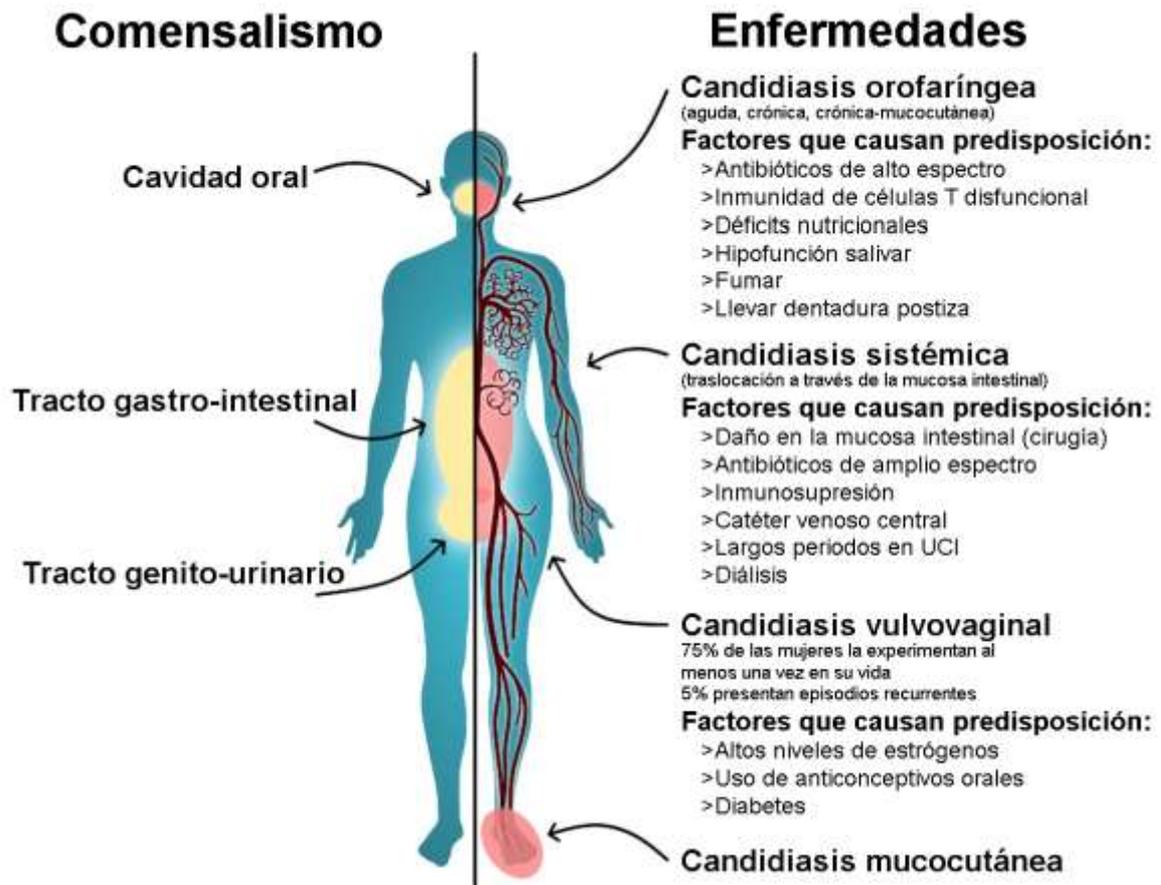


Figura 2. Sitios de comensalismo y enfermedad de *C. albicans* en el cuerpo humano. Los sitios de comensalismo de *C. albicans* (lado izquierdo) incluyen la cavidad oral, el tracto gastro-intestinal y el tracto genito-urinario. *C. albicans* puede colonizar otras partes del cuerpo (lado derecho) y causar candidiasis orofaríngea o vulvovaginal. *C. albicans* también puede causar infecciones sistémicas de la sangre y los órganos internos, que a menudo se producen por su translocación del intestino al torrente sanguíneo. También causa infecciones mucocutáneas de la piel y las uñas. Se enumeran los factores que predisponen a las personas a sufrir tales infecciones. Ver texto. Imagen modificada de D'Enfert *et al.*, 2021.

Estas tasas de mortalidad se deben también a que las infecciones por hongos a menudo son difíciles de diagnosticar y particularmente difíciles de tratar (Köhler *et al.*, 2014). Existe una necesidad urgente en la salud pública de diagnósticos más precisos, y la búsqueda de dianas de fármacos antimicóticos está un tanto limitada por el hecho de que, como eucariotas, los hongos comparten mecanismos fundamentales de crecimiento y división celular con los humanos. Además, el tratamiento de la candidiasis crónica o diseminada puede resultar complicado por la toxicidad del fármaco, asociada con altas dosis de estos agentes antifúngicos, y la creciente resistencia adquirida por algunas cepas de *C. albicans* (Colombo *et al.*, 2017; Davis *et al.*, 2015; Prasad *et al.*, 2019; Sanglard, 2019; Wadhwa *et al.*, 2019).

Comprender el equilibrio y las transiciones entre comensal y patógeno, y la búsqueda de marcadores de diagnóstico que puedan distinguir entre comensalismo e infección es vital para el futuro de la micología médica (Dadar *et al.*, 2018; Hall y Noverr, 2017). Por lo tanto, el desarrollo de nuevas herramientas clínicas potentes depende de una comprensión integral de la patogenicidad de los hongos y de la inmunidad antifúngica.

2. Genoma y ciclo sexual de *C. albicans*.

C. albicans es un hongo diploide con un genoma de 15,845 megabases (Mb) que consta de ocho cromosomas (van het Hoog *et al.*, 2007) y un contenido en GC del 33,5% (Jones *et al.*, 2004). Durante mucho tiempo se pensó que era una especie asexual obligada, sin embargo, recientemente se ha definido un ciclo parasexual inusual que carece de una meiosis convencional pero que aún puede generar formas altamente recombinantes (Bennett, 2015; Ene *et al.*, 2019; Miller y Johnson, 2002).

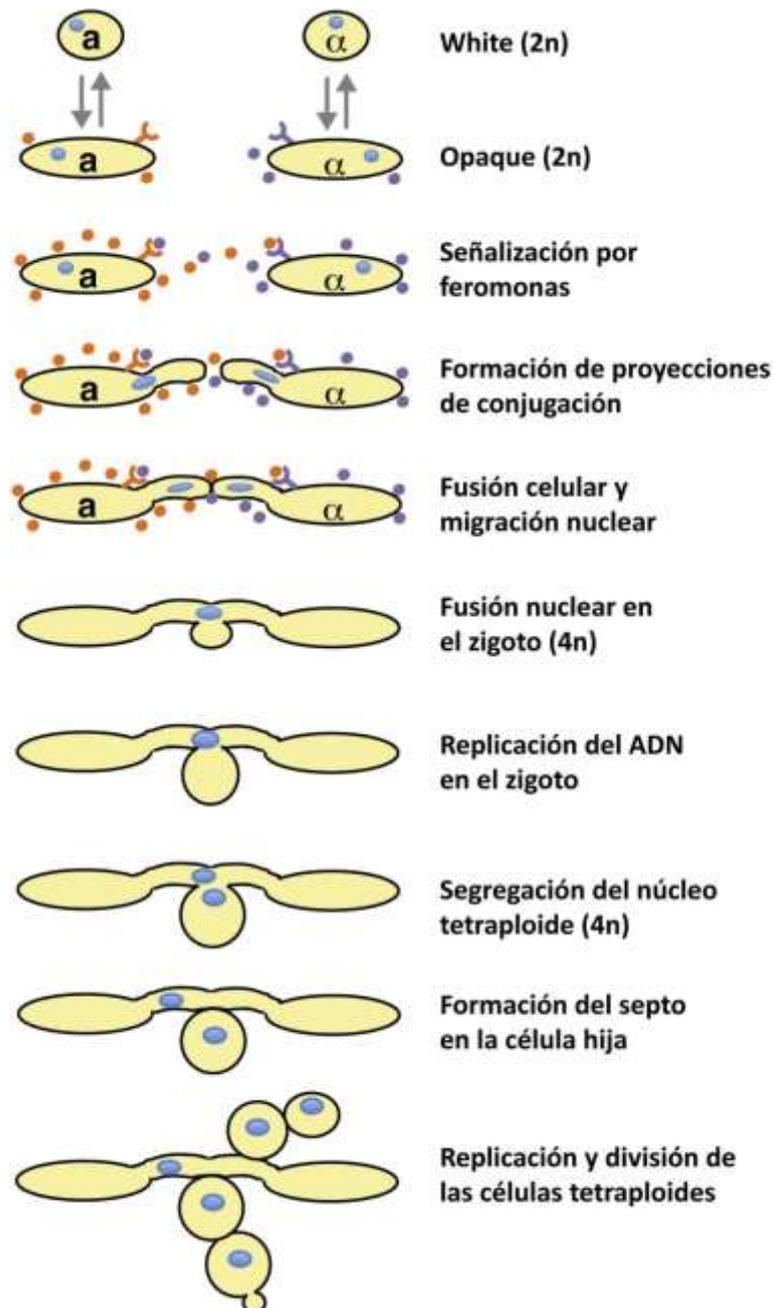


Figura 3. Ciclo parasexual de *C. albicans*. Las células *White* cambian a la forma *Opaque* competente para el apareamiento y, tras recibir la señalización de las feromonas de las células del tipo sexual opuesto, forman proyecciones de conjugación. Las proyecciones se fusionan formando un cigoto en el que ocurre la cariogamia, generando un núcleo tetraploide que se replica. Se produce la replicación y la gemación continua de las células tetraploides. Estas células pueden dividirse establemente o sufrir pérdida de cromosomas, produciendo células diploides a, α o a/ α . Imagen modificada de Bennett, 2015.

La reproducción sexual es omnipresente entre los hongos y está asociada con la diversificación genética, la evolución de la resistencia a los antifúngicos y la adaptación a los cambios ambientales (Heitman, 2006; Otto y Lenormand, 2002).

Dado que *C. albicans* es diploide, las células resultantes del apareamiento son tetraploides (Miller y Johnson, 2002). La secuencia de su genoma reveló que posee un locus “*Mating Type-Like*” (MTL), siendo la mayoría de las cepas de *C. albicans* heterocigóticas, con alelos tanto MTL α como MTL β (Figura 3). Para poder aparearse, las células cambian de la forma *White* (levaduras redondeadas) a la forma *Opaque* (levaduras elipsoidales granuladas), que son las formas competentes para el apareamiento, y forman proyecciones de conjugación entre dos células con locus MTL opuestos (Bennett, 2015; Noble *et al.*, 2017; Popp *et al.*, 2019). Los productos de apareamiento tetraploides son inestables y, aunque hasta ahora no se ha observado meiosis en *C. albicans*, pueden perder cromosomas de forma aleatoria y, finalmente, volver al estado diploide para producir una progenie recombinante que contenga material genético de ambos padres (Bennett, 2015; Popp *et al.*, 2019).

La plasticidad morfológica de *C. albicans* durante el apareamiento tiene que ver con la capacidad de adaptación que ha desarrollado a lo largo de su evolución. *C. albicans* ha desarrollado una serie de mecanismos que le permiten adaptarse rápidamente a los estímulos ambientales a los que está sujeto durante la colonización de nuevos nichos en animales de sangre caliente, sus hospedadores (Berman y Sudbery, 2002). Ocurre lo contrario en *Saccharomyces cerevisiae*, que se adaptó al crecimiento en ambientes con alta concentración de azúcares, pudiendo resistir elevadas concentraciones de etanol. Y es que, aunque muchos estudios sobre la biología *C. albicans* estén fundamentados en el conocimiento que se tiene sobre *S. cerevisiae*, ambos divergieron de un ancestro común hace aproximadamente 200 millones de años (Pesole *et al.*, 1995).

3. Morfología de *C. albicans*.

C. albicans tiene la capacidad de diferenciarse en múltiples estados morfológicos distintos en función de las condiciones ambientales en las que se encuentre. El morfotipo principal es la forma de levadura, o células “*White*”. Estas células son redondeadas u ovaladas, similares a las de *S. cerevisiae*, y miden alrededor de 5-6 μm (Klis *et al.*, 2014). Las levaduras se reproducen por gemación y la división nuclear se produce en la unión entre la célula madre y la hija. Debido a que la célula hija se separa de la madre después de la citoquinesis, las levaduras se consideran unicelulares (Sudbery *et al.*, 2004; Warena y Konopka, 2002), que son una forma ampliamente observada en estudios *in vivo* y en aislados clínicos, y es eficaz para la diseminación y adhesión a superficies.

Un morfotipo derivado de la levadura son las células *Opaque* (Figura 4), competentes para el apareamiento, con forma elipsoidal y unas 7 μm de largo; presentan la superficie granulada (Lockhart *et al.*, 2002) y se asocian a las membranas mucosas de la piel (Noble *et al.*, 2017).

Recientemente, se han observado nuevas formas de levaduras elipsoidales, como son las células *Grey* y las células *GUT* (*Gastrointestinally induced Transition*), ambas de tamaño similar a las células *Opaque* y sin gránulos en su superficie (Pande *et al.*, 2013; Tao *et al.*, 2014). Estas células

también presentan especificidad de nicho: las *Grey* se encuentran en las mucosas de la cavidad oral y las *GUT* en el intestino, y están asociadas al comensalismo (Noble *et al.*, 2017). Pande y colaboradores (2013) demostraron que una población de células de *C. albicans* sufría un cambio en su desarrollo al pasar por el intestino de ratón, regulado por el factor de transcripción *Wor1*. Las células resultantes se denominaron células *GUT*. A nivel molecular, las células *GUT* muestran un programa transcripcional distinto y optimizado para el crecimiento en el intestino. Este trabajo definió, por primera vez, un tipo de célula comensal especializada de *C. albicans* y, lo que es más importante, subrayó la evidencia de que las infecciones mediadas por este hongo no están estrictamente relacionadas con el deterioro de la inmunidad del huésped, sino que también están relacionadas con un control de identidad celular determinado por las transiciones comensal-patógeno (Sellam y Whiteway, 2016).

El cambio morfológico más estudiado de *C. albicans* es la formación de hifas. Esta transición morfológica se desencadena por varias señales ambientales presentes en el cuerpo humano, como son el suero sanguíneo, 37°C de temperatura, el pH, los niveles de CO₂ y de oxígeno, el bajo contenido de nitrógeno o los nutrientes disponibles (Noble *et al.*, 2017; Villa *et al.*, 2020). En este

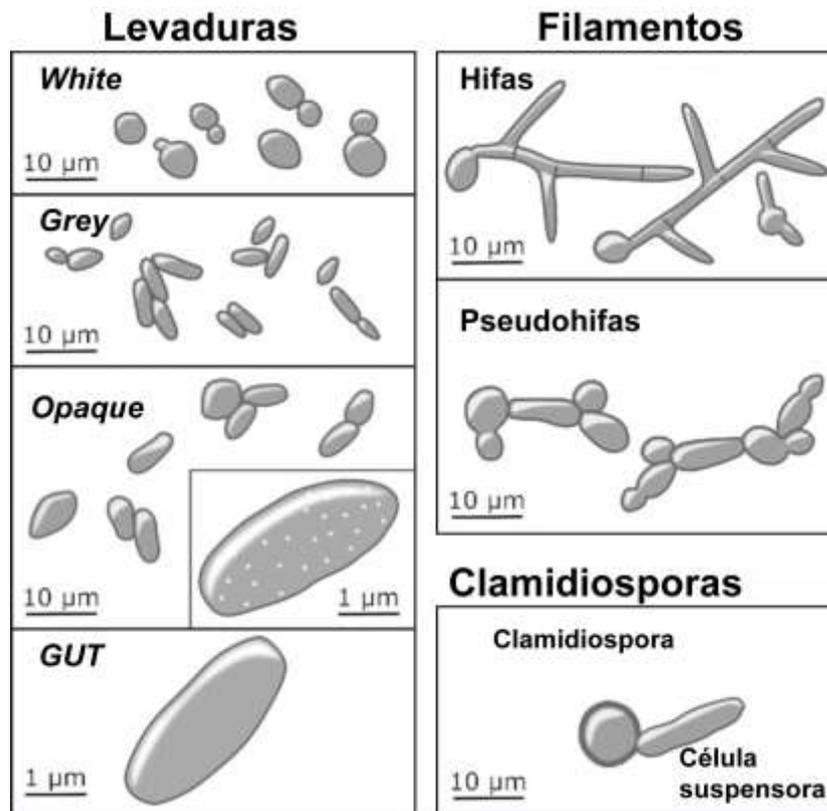


Figura 4. *C. albicans* es polimórfica y muestra una variedad de formas de crecimiento. Las células de levadura de *C. albicans* pueden experimentar cambios fenotípicos entre formas de crecimiento *White*, *Opaque* y *Grey* que poseen diferentes formas y características de la superficie celular. Estas formas se inducen en respuesta a diferentes factores ambientales y, por lo tanto, se asocian con distintos tipos de infección. La forma *Opaque* se asocia con un apareamiento eficiente. El fenotipo de “transición inducida gastrointestinalmente” (*GUT*) se observa en células de *C. albicans* que expresan ectópicamente *WOR1*, un regulador clave del comensalismo. La transición de células de levadura (*White*) a pseudohifas o hifas es estimulada por una amplia variedad de factores ambientales, que incluyen temperaturas elevadas, pH y peptidoglicano. Las pseudohifas se pueden distinguir de las hifas por la presencia de invaginaciones en las uniones septales en las pseudohifas, pero no en las hifas. *C. albicans* también tiene la capacidad de formar clamidiosporas en condiciones ambientales específicas. Imagen modificada de D’Enfert *et al.* 2021.

proceso, la levadura deja de formar yemas y comienzan a producir prolongaciones tubulares en las cuales la división nuclear ocurre dentro de la célula hija de la hifa, seguida de la migración de un núcleo de la progenie a la célula madre. Las células hifales permanecen unidas entre sí por un tabique o septo tras la citoquinesis, de modo que a medida que se van produciendo divisiones celulares se producen estructuras filamentosas multicelulares, sin ramificaciones, llamadas micelios o filamentos (Sudbery, 2011). El cuerpo celular de las hifas tiene un diámetro menor en comparación con las levaduras, alrededor de 2,5 a 3,5 μm , pero su longitud puede superar fácilmente las 100 μm , superando el tamaño de las células inmunitarias (Klis *et al.*, 2014).

Otro tipo morfológico son las pseudohifas, cuyas células comparten características tanto con levaduras como con hifas. Al igual que las

levaduras, presentan una forma ovalada/elipsoide; al igual que las hifas, pueden formar un micelio. Sin embargo, la forma de las pseudohifas no cambia a tubular y, tras la citoquinesis, se forma una constricción entre cada célula que se identifica fácilmente por un cambio de diámetro (Sudbery *et al.*, 2004). Existe cierta controversia sobre si representan un tipo de célula diferente o son simplemente un tipo de célula intermedia entre las otras dos morfologías mejor caracterizadas (Noble *et al.*, 2017).

Por último, *C. albicans* puede formar clamidosporas, células redondeadas con un diámetro de 7-8 μm , caracterizadas por tener una pared celular gruesa (Hayes, 1966). Las clamidosporas son generadas por células suspensoras, en las cuales ocurre la división nuclear, y se localizan en los extremos distales de los filamentos (Martin *et al.*, 2005). Se han identificado varias señales ambientales que desencadenan la diferenciación de clamidosporas, como la luz, la ausencia de nutrientes o la hipoxia, pero la función biológica de este morfotipo aún no se conoce del todo (Böttcher *et al.*, 2016).

Si bien cada una de estas formas morfológicas desempeña un papel importante en la biología de *C. albicans*, este trabajo se centrará principalmente en la transición morfológica de levadura a hifa (Figura 5), ya que son los morfotipos más comúnmente observados durante la infección (Mayer *et al.*, 2013) y ejercen, por tanto, una función relevante en la virulencia de este patógeno fúngico (Villa *et al.*, 2020).

3.1. Contribución de las distintas formas morfológicas a la virulencia de *C. albicans*.

Los estudios que muestran que las hifas verdaderas evaden o escapan a las células fagocíticas, y que las células de levadura se diseminan en el torrente sanguíneo sugieren que la morfología contribuye a la supervivencia de *C. albicans* en una amplia gama de nichos (Berman, 2006). Además,

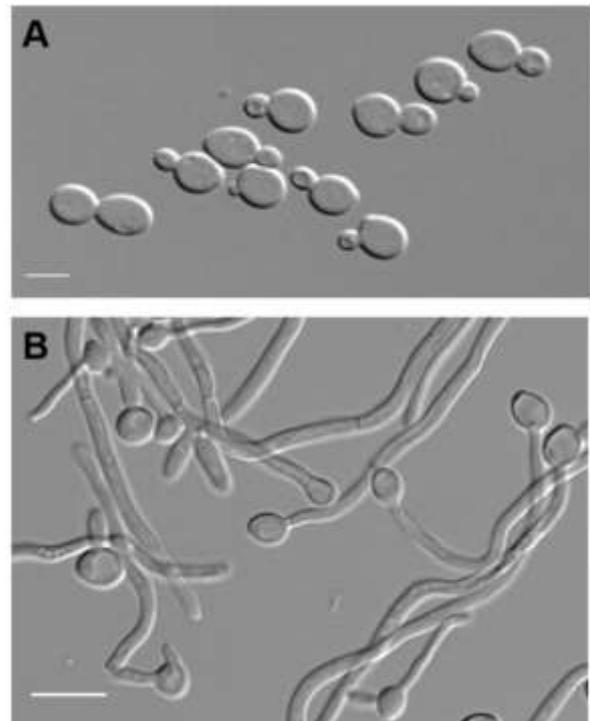


Figura 5. Morfologías principales de *C. albicans*. Imágenes de microscopía de contraste interferencial (DIC) de levaduras (A) e hifas (B). Barras de escala: 5 y 10 μm .

Introducción

estos tipos celulares son reversibles entre sí, por lo que se piensa que la virulencia requiere la capacidad reversible de cambiar de una morfología a la otra (Berman, 2006; Saville *et al.*, 2003; Vila *et al.*, 2020).

El polimorfismo contribuye a la transición de *C. albicans* de una forma comensal a una patológica, que depende de los cambios en el entorno en el que se encuentra. Se caracteriza por la transición morfológica de levaduras a hifas para la invasión de tejidos (Kadosh, 2019; Noble *et al.*, 2017). Las hifas son invasivas, se adhieren de manera más robusta y eficiente a las células del huésped que las células de levadura, y expresan factores de virulencia como las adhesinas Als3 y Hwp1, proteínas relacionadas con la adhesión y la invasión (Mayer *et al.*, 2013). Tienen la capacidad de penetrar en el tejido del huésped por endocitosis inducida, dependiente de la actividad del huésped, y por penetración activa, dependiente de la actividad fúngica (Galocha *et al.*, 2019; Maza *et al.*, 2017). Además, la formación de hifas facilita el escape de los fagocitos e induce la muerte de los macrófagos (Krysan *et al.*, 2014) y se encuentra relacionada con la secreción del péptido citotóxico candidalisina, codificado por *ECE1*, que lisa el epitelio del hospedador y provoca la destrucción del tejido (Wilson *et al.*, 2016). Las hifas carentes de *ECE1* pueden invadir las células epiteliales sin causar daños, pero la colonización efectiva de los tejidos requiere la combinación de filamentación y secreción de candidalisina (Arkowitz y Bassilana, 2019).

Además de estar involucrada en la liberación de la candidalisina, la secreción juega un papel esencial durante la virulencia de *C. albicans*, liberando una gran variedad de proteasas y lipasas. Además de utilizar la vía secretora convencional para secretar componentes al medio externo, de forma similar a otros hongos, *C. albicans* libera vesículas extracelulares (VE) que contienen proteínas citoplásmicas, proteínas “moonlighting”, proteínas de membrana y otras relacionadas con la pared celular (Rollenhagen *et al.*, 2020; Satala *et al.*, 2020).

El tráfico de proteínas a la membrana plasmática está mediado por el transporte vesicular entre diferentes compartimentos celulares, y por las GTPasas pequeñas de las familias Arf (*ADP-Ribosylation Factor*) y Rab (GTPasa de la superfamilia Ras), las cuales regulan los distintos pasos de estos procesos. El papel de las proteínas Arf en el crecimiento hifal y la virulencia se ha investigado recientemente (Labbaoui *et al.*, 2017). De las proteínas Arf/Arl, Arf2 y Arl1 han demostrado ser críticas para la virulencia en modelos de candidiasis de ratón, y Arl1 se requiere específicamente para la candidiasis orofaríngea. Además, se ha demostrado que un mutante carente de Arf1 presenta una virulencia reducida en un modelo de infección sistémica murina y en la lisis de macrófagos, pero esta cepa tiene una tasa de crecimiento reducida y sufre una parada del ciclo celular. Mientras que Arf2 es necesario para la viabilidad, Arl1 participa en la extensión de las hifas y en la restricción de su crecimiento hacia un solo sitio (Arkowitz y Bassilana, 2019).

La capacidad de formar *biofilms* es otra de las propiedades de la patogénesis de *C. albicans* relacionada con la mayoría de las infecciones causadas por este hongo (Talapko *et al.*, 2021). Los *biofilms* son una estructura compleja compuesta por las diferentes morfologías de *C. albicans*, que genera un ambiente resistente al acceso de las drogas antifúngicas (Bonhomme y d'Enfert, 2013; Taff *et al.*, 2013; Wall *et al.*, 2019). Se desarrolla a través de varias fases consecutivas (Talapko y Skrllec,

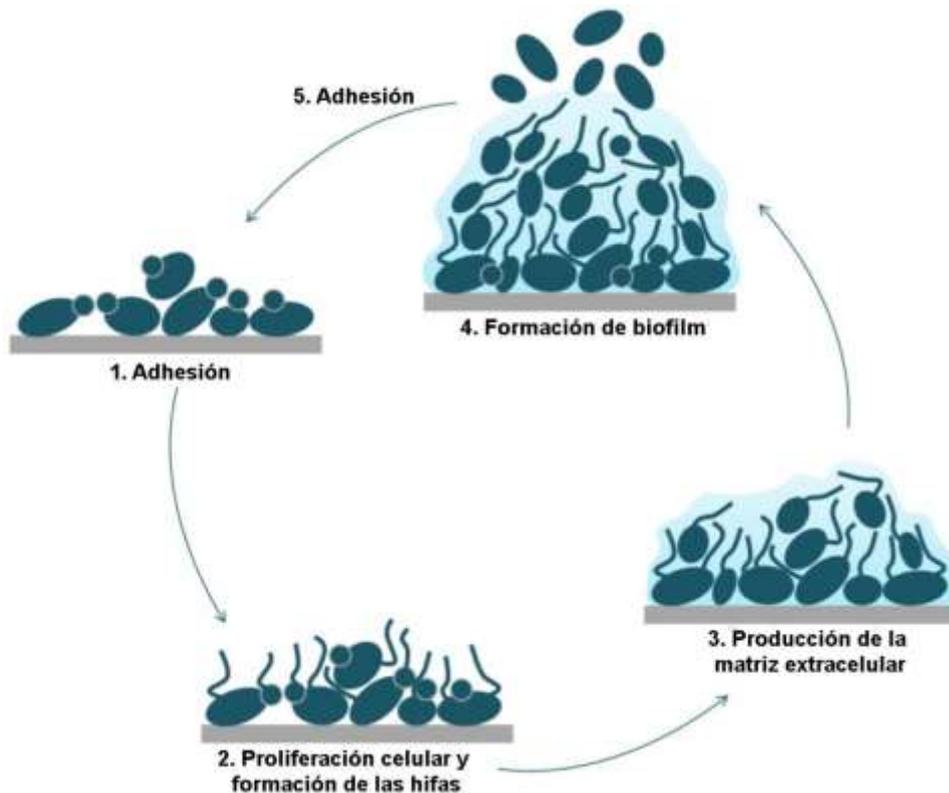


Figura 6. Formación de biofilms de *C. albicans*. La formación comienza con la adhesión de las células de levadura (azul oscuro) a la superficie (gris) (1). En la fase inicial del *biofilm* se produce la proliferación de *C. albicans* y la formación de hifas (2). Seguidamente, las células producen matriz extracelular (3), y la fase de maduración incluye la acumulación de esta matriz extracelular (4). Finalmente, las células de levadura se dispersan a un nuevo sitio y forman un nuevo *biofilm* (5). Imagen modificada de Talapko *et al.*, 2021.

2020) (Figura 6): en un primer lugar, las células de levaduras se adhieren a la superficie y forman la capa basal del *biofilm*. Seguidamente, las levaduras proliferan y comienza el crecimiento filamentos, lo que marca el inicio de la creación del *biofilm*. En la fase de maduración, se acumula una matriz de polisacárido extracelular que protege a las células. Finalmente, se produce la dispersión de células no adherentes, lo que da lugar a la diseminación y formación de nuevos *biofilms* (McCall *et al.*, 2019).

3.2. Ciclo celular de levaduras.

Las levaduras de gemación, tanto *S. cerevisiae* como *C. albicans*, presentan una morfología elipsoidal, las cuales crecen formando colonias lisas y redondas (Berman, 2006). Durante el ciclo celular se polarizan los sistemas citoesqueléticos de actina, septinas y microtúbulos citoplasmáticos, regulados por la GTPasa Cdc42, la cual juega un papel central en la polaridad celular (Park y Bi, 2007; Woods y Lew, 2019).

Tras la emergencia de la yema, se produce un crecimiento apical en la punta entre la fase G1 y G1 tardía debido a la polarización del citoesqueleto y a la secreción de vesículas, provocando el alargamiento de la yema (Howell y Lew, 2012) (Figura 7). La emergencia de la yema se coordina con el inicio de la replicación del ADN y duplicación del cuerpo polar del huso (SPB, *Spindle Pole Body*, equivalente al centrómero en las células animales). En la fase G2 temprana, el crecimiento pasa de apical a isotrópico, impulsando la expansión uniforme al desencadenarse una despolarización del crecimiento en la yema, que está regulado por el complejo ciclinas-Cdk1 (Cdc28)(Howell y Lew, 2012).

Introducción

Seguidamente, el crecimiento pasa de orientarse hacia la yema a dirigirse uniformemente tanto a la célula madre como a la hija, por la ruptura de la asimetría entre las dos células durante la mitosis tardía (Howell and Lew 2012). Por último, tras la salida de mitosis, el crecimiento se reenfoca hacia el cuello, necesario para la síntesis del septo de separación durante la citoquinesis y para la separación de la célula hija (Chiou *et al.*, 2017; Howell y Lew, 2012).

Para regular la progresión del ciclo celular, *C. albicans* tiene dos ciclinas de G1, Cln1 y Cln2, además de Cln3 que es esencial para controlar el tamaño celular y el mantenimiento del morfotipo levaduriforme (Bachewich y Whiteway, 2005; Chapa y Lazo *et al.*, 2005). La ciclina Ccn1 está presente en las fases G1 y S temprana, no es necesaria para el inicio del crecimiento polarizado, pero sí para su mantenimiento (Loeb *et al.*, 1999). En G2, las ciclinas de tipo B se encargan de regular el crecimiento isotrópico, siendo las principales Clb1 y Clb2. Clb2 es esencial, y las células carentes de ella son alargadas y con núcleos divididos conectados por husos mitóticos alargados; otra de las ciclinas de esta fase, Clb4, también contribuye a la regulación negativa del crecimiento polarizado, ya que mutantes deficientes en Clb4 crecen de manera constitutiva en forma de hifas (Bensen *et al.*, 2005; Ofir y Kornitzer, 2010).

3.2.1. Importancia de las septinas en el ciclo celular.

En levaduras de gemación, las septinas son un conjunto de proteínas que desempeñan un papel esencial en morfogénesis y crecimiento, y experimentan cambios organizativos regulados por el ciclo celular. Son proteínas de unión a GTP con capacidad de ensamblarse y formar complejos heterooligoméricos y estructuras altamente ordenadas, como anillos y filamentos. Resultan esenciales para la

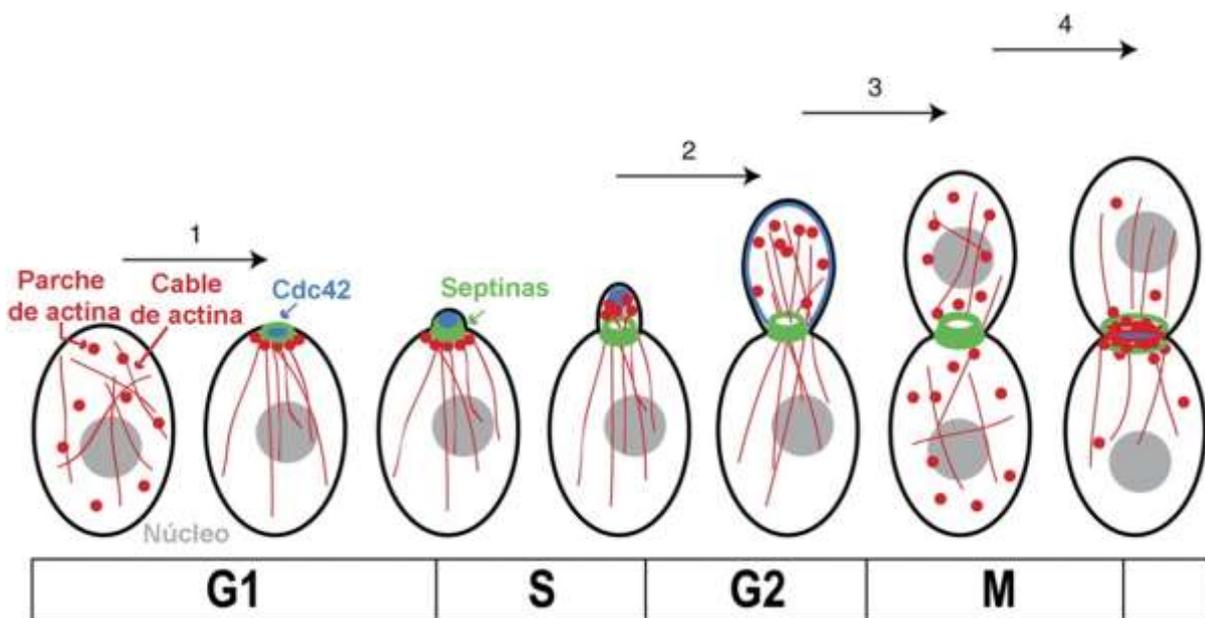


Figura 7. Ciclo celular de la levadura de gemación. (1) Polarización del citoesqueleto y de la maquinaria de secreción en la fase G1 tardía, desencadenada por el complejo Cln1,2-Cdc28; (2) Cambio de crecimiento apical isotrópico en fase G2 temprana, dependiente de Clb1,2-Cdc28; (3) Ruptura de la asimetría célula madre-yema en la mitosis tardía (desencadenante desconocido) y (4) reorientación del crecimiento hacia el cuello después de la salida de mitosis, desencadenada por la inactivación de la actividad de Clb-Cdc28. Se indica la localización de los parches y cables de actina (rojo), Cdc42 (azul) y las septinas (verde) durante el ciclo celular. Imagen modificada de Howell y Lew, 2012.

citoquinesis, ya que participan en el reclutamiento de la maquinaria celular necesaria para la formación del anillo contráctil de actomiosina y porque funcionan como una barrera de difusión entre la célula madre y la hija, ayudando a mantener la polaridad celular (Bridges y Gladfelter, 2015; Caudron y Barral, 2009; Khan *et al.*, 2015; Marquardt *et al.*, 2019; Weirich *et al.*, 2008). En *C. albicans*, los anillos de septinas están compuestos por las septinas Cdc3, Cdc12, Cdc10, Cdc11 y Sep7 (Warenda y Konopka, 2002).

Al inicio de la fase G1, cuando la GTPasa Cdc42 define el sitio de crecimiento polarizado focalizándose en la corteza celular, las septinas son reclutadas a este punto y se asocian con la membrana plasmática. En este momento comienza la organización de las estructuras supramoleculares de septinas (Bertin *et al.*, 2010)(Figura 7).

En el sitio de formación de la yema, las septinas se reorganizan para formar un anillo de aproximadamente 1 μm de diámetro, lo que requiere la hidrólisis del GTP unido a Cdc42 mediado por los factores GAP (*GTPase Activating Protein*)(Caviston *et al.*, 2003; Kadota *et al.*, 2004). Después de la emergencia de la yema, el anillo de septinas se expande en una estructura de reloj de arena, denominado collar, en el cuello entre la célula madre e hija. Al inicio de la citoquinesis, el reloj de arena se divide en dos anillos corticales que intercalan la máquina de citoquinesis y flanquean la región donde se va a formar el septo de división. Cuando se completa la formación del septo, las células comienzan una nueva fase G1 y los dos anillos se desensamblan para volver a formarse en el futuro sitio de gemación (Warenda y Konopka, 2002).

La septina Cdc11 es fosforilada inmediatamente después de la inducción de la filamentación y esta fosforilación se mantiene durante todo crecimiento filamentoso. En levaduras, Cdc11 es fosforilada en la serina 395 por Gin4 y esto es necesario para que tenga lugar la fosforilación en la serina contigua (S394) por la kinasa Cdc28 asociada a la ciclina Ccn1. Esta modificación ocurre en los 5 minutos posteriores a la inducción de las hifas y es esencial para la inducción y el mantenimiento del crecimiento hifal (Sinha *et al.*, 2007). Así, las células deficientes en la proteína Ccn1 o mutantes que contienen un alelo fosfodeficiente (*cdc11-S394A*) emiten tubos germinales normales, pero son incapaces de mantener el crecimiento polarizado una vez se ha formado el primer septo. En el mutante *ccn1 Δ* , este fenotipo se suprime al introducir un alelo fosfomimético (*cdc11-SS394,395DD*). Puesto que Ccn1 se degrada durante el crecimiento hifal, el mantenimiento de la fosforilación de Cdc11 en etapas posteriores depende de Hgc1-Cdc28. Estos resultados indican que el estado de fosforilación de Cdc11 es importante para mantener un crecimiento polarizado sostenido en el tiempo.

En hifas, el crecimiento polarizado es continuo e independiente del ciclo celular, el citoesqueleto de actina está focalizado en la punta de la hifa y la organización y dinámica del anillo de septinas es diferente a la de levaduras (González-Novo *et al.*, 2008; Hazan *et al.*, 2002; Warenda y Konopka, 2002). Al comenzar la emergencia del tubo germinativo, las septinas se agrupan formando barras paralelas en la base. Esta primera estructura se denomina banda basal de septinas (Figura 8). A medida que el tubo germinativo crece, las septinas pasan a agruparse en el ápice, formando una estructura apical llamada “cap”. Una vez que la hifa adquiere una longitud adecuada, parte de las septinas apicales se quedan en la pared lateral del filamento, formando un anillo de septinas similar al

Introducción

de levaduras que marca el punto donde tendrá lugar la formación del septo. Durante la mitosis, el núcleo migra fuera del cuerpo celular hasta el anillo de septinas para realizar la mitosis dentro el tubo germinativo. Uno de los núcleos regresa al cuerpo celular y el otro migra a la región apical antes de que se produzca la formación del septo que divide el cuerpo celular del compartimento apical (Sudbery, 2011).

3.3. Transición levadura-hifa.

El cambio morfológico de levaduras a hifas de *C. albicans* es la respuesta a una gran variedad de estímulos ambientales. En el ser humano, factores como el pH neutro, el CO₂, una temperatura de 37°C o la presencia de suero (entre otros) inducen esta transición (Chow *et al.*, 2021; Sudbery, 2011). Esta variedad de señales ambientales y nutricionales controla un gran número de factores de transcripción que contribuyen a la activación o represión del programa transcripcional específico de hifas (Rodríguez *et al.*, 2020; Villa *et al.*, 2020).

Como parte de la microbiota del organismo, *C. albicans* interacciona con los demás microorganismos presentes. De hecho, las infecciones causadas por *C. albicans* ocurren cuando hay un cambio ecológico en la comunidad microbiológica, frecuentemente debido al debilitamiento del sistema inmune del hospedador como se ha comentado anteriormente (Ruby y Barbeau, 2002). Esta interacción se da mediante *quorum sensing*, un mecanismo de comunicación microbiana en el que la acumulación de moléculas de señalización permite que una célula detecte una determinada densidad

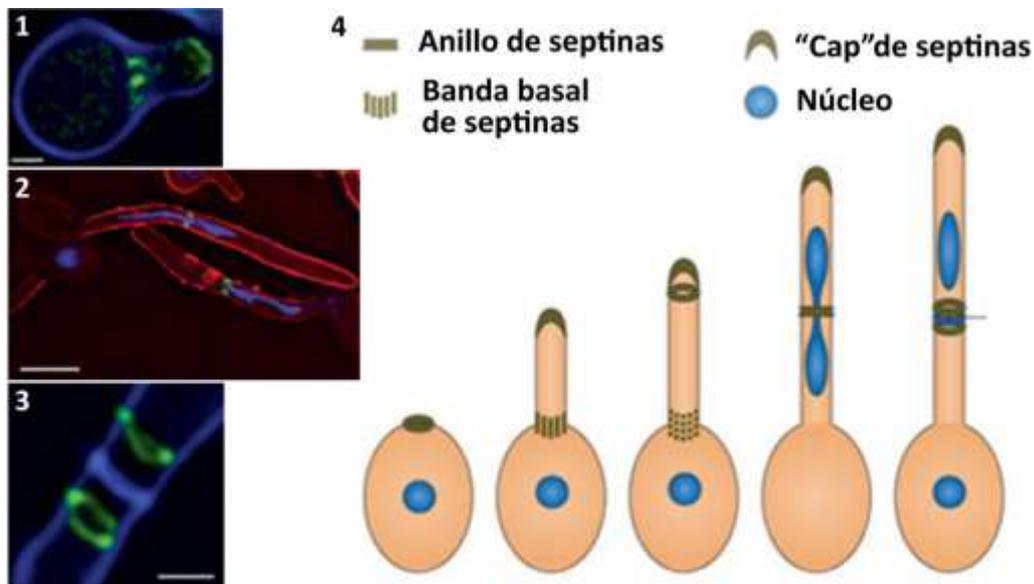


Figura 8. Dinámica de las septinas durante el desarrollo hifal de *C. albicans*. (1) En cuanto ocurre el inicio de la evaginación del tubo germinativo, una banda basal de septinas se hace visible tanto en la base de esta estructura como en la punta. Se muestra la septina Cdc10 marcada con la proteína fluorescente amarilla (YFP). El contorno de la hifa (azul) ha sido teñido con Concavalina-Alexaflúor. (2) El crecimiento del tubo germinativo da lugar a que la banda basal desaparezca para que en su lugar se forme un anillo de septinas en el interior de la hifa en crecimiento. En el momento de la mitosis, el núcleo (teñido con DAPI; color azul) migra fuera del cuerpo de la hifa para dividirse en el tubo germinativo. La tinción con Concavalina-Texas Red marca el contorno de las hifas. (3) El anillo de septinas se divide en dos, permitiendo la formación del septo en medio de ambos. Tinción como en la figura 1. (4) Esquema del primer ciclo celular durante el desarrollo hifal. Imagen modificada de Sudbery, 2011.

celular. Está basado en la producción del alcohol sesquiterpénico farnesol, el cual inhibe el crecimiento hifal y promueve el crecimiento levaduriforme (Mallick y Bennett, 2013; Polke y Jacobsen, 2017; Polke *et al.*, 2018; Wongsuk *et al.*, 2016). Se ha visto que a una densidad de células bacterianas inferior a 10^6 células/ml *C. albicans* crece de forma hifal, mientras que a densidades celulares más altas el crecimiento es en forma de levadura (Hornby *et al.*, 2001; Ramage *et al.*, 2002). Además del farnesol, otro alcohol aromático llamado tirosol, que controla el crecimiento, la morfogénesis y la formación de *biofilms*, también actúa como una molécula de *quorum sensing* realizando el efecto contrario, ya que induce la formación de hifas en levaduras quiescentes (Albuquerque y Casadevall, 2012; Kovacs y Majoros, 2020; Rodrigues y Cernakova, 2020) .

Además, la transición de levaduras a hifas depende de muchas vías de señalización, como la vía de AMPc mediada por Efg1 y la ruta de MAPK mediada por Cph1 (Biswas *et al.*, 2007; Sudbery, 2011). Estas vías de señalización activan factores de transcripción que dan lugar a la expresión de genes específicos de hifas (*Hypha Specific Genes*, HSGs) (Figura 9), que desempeñan un papel importante en la formación de hifas y contribuyen enormemente a la virulencia de *C. albicans* (Whiteway y Bachewich, 2007).

3.3.1. Rutas de señalización implicadas en la transición levadura-hifa.

La ruta del AMPc-PKA juega un papel clave en el crecimiento, morfogénesis, síntesis de glucógeno, actividad mitocondrial y metabolismo energético de *C. albicans* (Cottier y Hall, 2019; Huang *et al.*, 2019; Lin y Chen, 2018). El AMPc es necesario para la activación de la vía de la PKA (Proteín Kinasa A) en respuesta a diversos estímulos ambientales, que incluyen suero, *N*-acetilglucosamina (GlcNAc), aminoácidos y dióxido de carbono. Los niveles intracelulares de AMPc están regulados por la fosfodiesterasa (Pde2) y la adenilil ciclasa (Cyr1)(Chen *et al.*, 2020).

La ruta de la MAPK es inducida por factores como el entorno de la matriz de inclusión, el daño a la pared celular y concentraciones bajas de nitrógeno. Varias proteínas de la ruta (Opy2, Sho1 y Msb2) forman un complejo que interactúa con Cdc42 y con la PAK Kinasa Cst20, lo que desencadena la fosforilación de la MAPK Cek1, que activa la formación de hifas a través de la fosforilación de los factores de transcripción Cph1 y Ace2, este último implicado en separación celular, morfogénesis de hifas y formación de *biofilms* (van Wijlick *et al.*, 2016). Además, bajo estrés osmótico, este complejo recluta a todos los elementos necesarios para la polarización y despolarización del citoesqueleto y otras estructuras relacionadas, como el anillo de septinas (Chen *et al.*, 2020).

La vía de Rim101 regula la virulencia y la transición morfológica controlada por pH. El pH ácido inhibe la transición de células de levaduras a células filamentosas, mientras que valores de pH neutro y alcalino promueven la formación de hifas (Davis, 2003). El proceso de activación de Rim101 requiere de otras tres proteínas, Rim8, Rim20 y Rim13, ya que la ausencia de cualquiera de ellas puede afectar a la capacidad de formar hifas y, por tanto, a la virulencia (Davis *et al.*, 2000).

Por otro lado, la regulación negativa de los genes específicos de hifas durante el crecimiento en forma de levadura la lleva a cabo, principalmente, el factor de transcripción Tup1 en sinergia con Nrg1 o el factor de regulación del crecimiento filamentoso Rfg1 (Khalaf y Zitomer, 2001). Tup1 interacciona con Nrg1 y Rfg1, lo que permite su unión a los promotores de los HSGs, reprimiendo su transcripción,

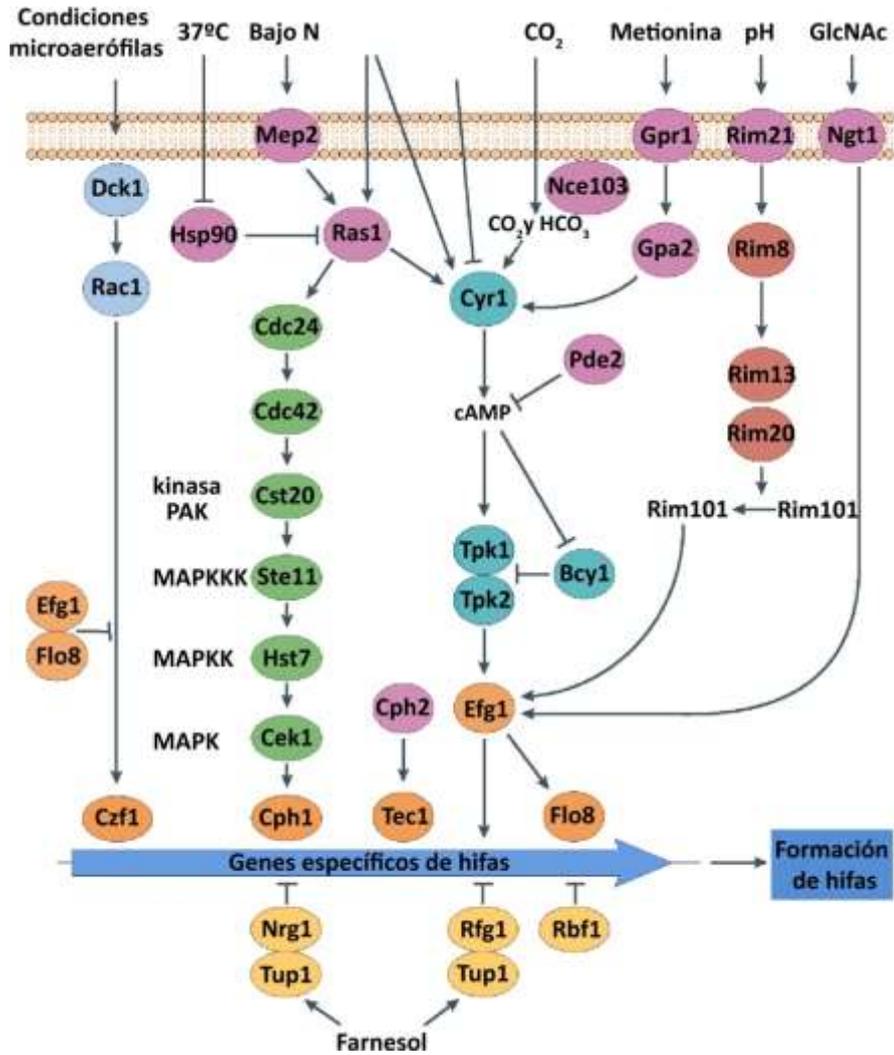


Figura 9. Rutas de transducción de señales que llevan a la expresión de genes específicos de hifas. Las señales ambientales se transmiten a través de múltiples vías de señalización para activar un panel de factores de transcripción. Se cree que la vía dependiente de AMPc que activa al factor de transcripción Efg1 tiene un papel importante. En esta vía, la adenilil ciclasa Cyr1 integra múltiples señales dependientes e independientes de Ras1. La regulación negativa se ejerce a través del correpressor transcripcional Tup1, que se asocia a los promotores de los genes específicos de hifas (HSGs) mediante proteínas de unión al ADN como Nrg1 y el regulador del crecimiento filamentoso Rfg1. Las distintas rutas están indicadas por colores de la siguiente manera: vía de la proteína quinasa activada por mitógenos (MAPK) (verde), vía del AMPc (turquesa), factores de transcripción (naranja), reguladores negativos (amarillo), vía de detección integrada en la matriz (azul claro), vía de detección del pH (marrón), otros factores involucrados en la transducción de señales (azul oscuro), GlcNAc, *N*-acetilglucosamina. Imagen modificada de Sudbery, 2011.

y las cepas deficientes en Tup1 pueden formar hifas de forma eficaz sin necesidad de encontrarse en condiciones de filamentación específicas (Chen *et al.*, 2020).

3.3.2. La ciclina de G1 Hgc1 promueve el desarrollo hifal en *C. albicans*.

Además de las ciclinas mencionadas anteriormente, *C. albicans* tiene otra ciclina de G1 específica de hifas (Hgc1) que juega un papel esencial en la morfogénesis hifal (Zheng *et al.*, 2004). La expresión de esta ciclina está reprimida por Tup1 y Nrg1 y se regula positivamente por el factor de transcripción Ume6, lo que asegura que Hgc1 se exprese de forma constitutiva mientras permanezcan las condiciones inductoras de filamentación. Hgc1 interactúa con Cdc28, formando un complejo que se regula mediante fosforilación y actúa sobre la maquinaria de polaridad celular, sobre el tráfico de

membranas y la separación celular (Figura 10). El complejo Hgc1-Cdc28 fosforila e inactiva a Rga2, secuestrándolo de la punta de la hifa para permitir que la GTPasa Cdc42 se localice en el ápice para activar el crecimiento polarizado (Zheng *et al.*, 2007). Hgc1-Cdc28, junto con Clb2-Cdc28, fosforila a la subunidad del polarisoma Spa2, y a las subunidades del exocisto Exo84 y Sec2, localizando a estos dos complejos en la punta de la hifa (Bishop *et al.*, 2010; Caballero-Lima y Sudbery, 2014; Wang *et al.*, 2016). Además, el complejo Hgc1-Cdc28 fosforila a Efg1, lo que le permite asociarse a Ace2, reprimiendo así la expresión de los genes implicados en la separación celular tras la citoquinesis (Wang *et al.*, 2009). La septina no esencial Sep7 también se encuentra regulada por el complejo Hgc1-Cdc28 durante el crecimiento filamentosos (González-Novo *et al.*, 2008).

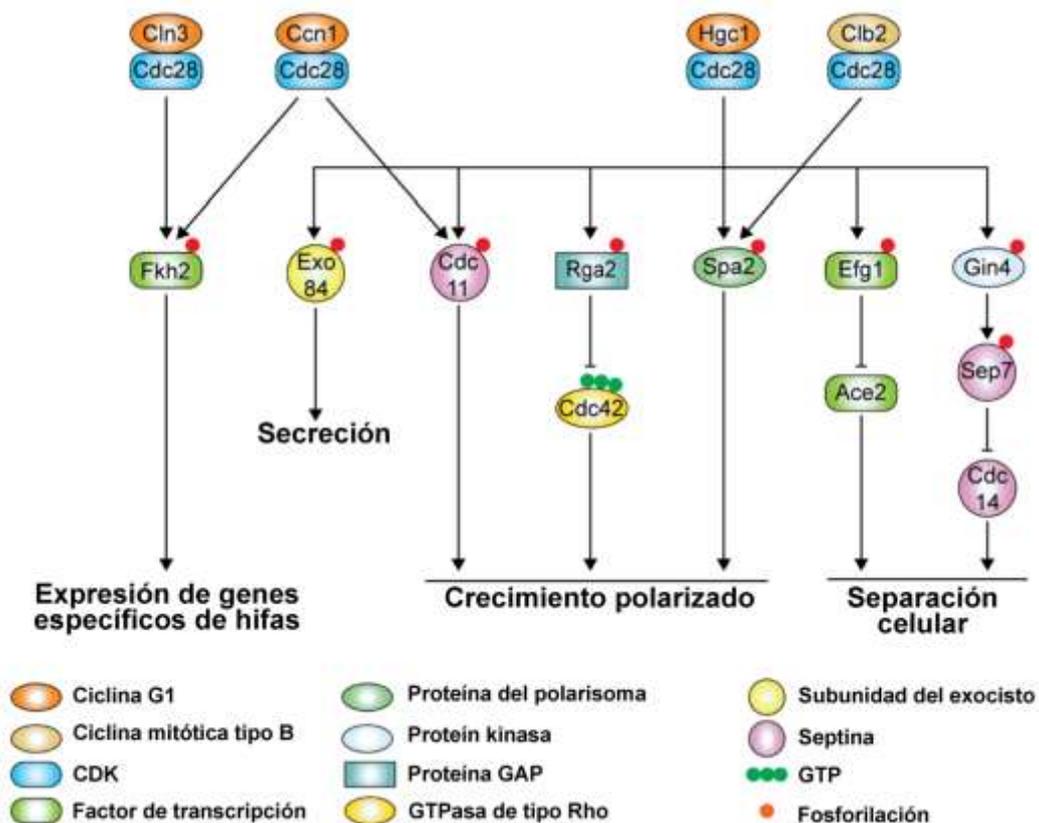


Figura 10. La morfogénesis en *C. albicans* está regulada por ciclinas dependientes del ciclo celular y la quina dependiente de ciclina (CDK). La CDK Cdc28 sirve como regulador maestro que controla la progresión del ciclo celular en las fases G1/S y G2/M formando complejos con ciclinas específicas. Los niveles de Cdc28 son relativamente estables a lo largo del ciclo celular y se reducen durante el crecimiento de las hifas. Por el contrario, los niveles de las ciclinas mitóticas de G1 y B oscilan durante el ciclo celular. Las ciclinas de G1 Cln3 y Ccn1 alcanzan su pico en la fase G1 y caen en la fase G2 temprana, mientras que la ciclina mitótica de tipo B Clb2 alcanza su punto máximo en la fase G2/M temprana y declina en la fase M. Tras la inducción de hifas, Fkh2 es fosforilado por los complejos Cln3-Cdc28 y Ccn1-Cdc28 de una manera dependiente del ciclo celular para inducir la expresión de genes específicos de hifas. El complejo Hgc1-Cdc28 es esencial para el mantenimiento del crecimiento de las hifas. La subunidad del exocisto, Exo84, es fosforilada por el complejo Hgc1-Cdc28 para la regulación de la secreción polarizada. La fosforilación de la septina Cdc11 (por Ccn1-Cdc28 y Hgc1-Cdc28), de la GAP Rga2 (por Hgc1-Cdc28) y de la proteína del polarisoma Spa2 (por Hgc1-Cdc28 y Clb2-Cdc28) promueven el crecimiento polarizado. Rga2 es fosforilado e inactivado por Hgc1-Cdc28, lo que mantiene activa a la GTPasa Cdc42. La fosforilación del factor de transcripción Efg1 y de la proteína kinasa Gin4 inhiben la separación celular. Efg1 fosforilado se une a los promotores de los genes diana de Ace2, inhibiendo su transcripción. Imagen modificada de Chow *et al.*, 2021.

3.3.3. Rho GTPasas.

Las GTPasas de la familia Rho son pequeñas proteínas de unión a GTP de la superfamilia Ras, muy extendidas en eucariotas desde levaduras hasta seres humanos, siendo moléculas clave en los procesos de polaridad (Dautt-Castro *et al.*, 2021; Haga y Ridley, 2016; Mosaddeghzadeh y Ahmadian, 2021; Vicente-Soler *et al.*, 2021). En levaduras de gemación, son responsables de la regulación coordinada de la biosíntesis de la pared celular y el citoesqueleto de actina, necesarios para mantener la integridad celular y el crecimiento polarizado (Hall, 2012; Johnson *et al.*, 2011; Miller *et al.*, 2020; Pérez y Rincón, 2010).

S. cerevisiae tiene seis Rho GTPasas: Cdc42 y de Rho1 a Rho5 (Park and Bi 2007). Cdc42 juega un papel principal en la gemación regulando la organización de la actina, la organización de las septinas y la secreción polarizada. Rho1 y Rho2 participan en la organización de la actina y la integridad de la pared celular, mientras que Rho3 y Rho4 desempeñan un papel fundamental en el mantenimiento del crecimiento de las yemas (Hall, 2012). En *C. albicans*, durante el mantenimiento del crecimiento polarizado en levaduras e hifas, las GTPasas de las familias Ras y Rho desempeñan funciones esenciales, de hecho, la GTPasa Cdc42 es la proteína reguladora maestra del crecimiento polarizado (Chow *et al.*, 2021). La morfogénesis en *C. albicans* está regulada por Cdc42 a nivel transcripcional, ya que la baja expresión de esta GTPasa conduce a una disminución de la expresión de los HSGs (Bassilana *et al.*, 2005). Además, la disminución de los niveles celulares de Cdc42 activo da como resultado levaduras e hifas más grandes y de forma más redonda, lo que indica un defecto de crecimiento polarizado (Bassilana *et al.*, 2005; Ushinsky *et al.*, 2002). Cdc42 cambia entre su estado activo unido a GTP y el inactivo unido a GDP. El GEF (*Guanine nucleotide Exchange Factor*) Cdc24 media la activación de Cdc42 (Bassilana *et al.*, 2003; Bassilana *et al.*, 2005) mientras que los GAPs Rga2 y Bem3 catalizan la hidrólisis del GTP e inactivación de Cdc42. Cdc42 y Cdc24, ambos esenciales para la viabilidad celular, se localizan en la punta de la hifa durante el crecimiento filamentoso (Bassilana *et al.*, 2003; Bassilana *et al.*, 2005). Otro de los GAPs de Cdc42 es Bem2 (Marquitz *et al.*, 2002), y desempeña una función importante en el mantenimiento de la polaridad celular. En *S. cerevisiae*, los mutantes *bem2Δ* son inviables a 37°C y las células son grandes, redondas, sin yemas y multinucleadas con una organización de actina defectuosa (Kim *et al.*, 1994). Bem2 interacciona con otra GTPasa de la familia de las Rho GTPasas, Rho4, de manera dependiente de GTP, y juega un papel negativo en la regulación de Rho4 *in vivo* (Gong *et al.*, 2013).

3.3.4. El polarisoma y el excicisto.

El crecimiento polarizado también es impulsado por el polarisoma, un complejo que incluye la proteína de andamiaje Spa2, la formina Bni1 que sirve como nucleador de los cables de actina, la proteína de unión a formina-actina Bud6 y las proteínas Aip5 y Pea2 (Xie y Miao, 2021). Durante el crecimiento polarizado, las vesículas secretoras unidas a las membranas post-Golgi se dirigen continuamente al ápice de la hifa (Figura 11), suministrando el material necesario para expandir la membrana plasmática y sintetizar nueva pared celular (Xie y Miao, 2021). Las vesículas están unidas a los cables de actina por la GTPasa de tipo Rab Sec4, activada por su GEF Sec2 (Caballero-Lima *et al.*, 2013; Caballero-Lima y Sudbery, 2014), mientras que la miosina Myo2, que forma un complejo con la cadena ligera reguladora Mlc1, proporciona la fuerza motriz para el transporte de vesículas (Jones y

Sudbery, 2010). Al llegar a la membrana plasmática y antes de la fusión con ésta, el excisto media la interacción entre las v-SNARES de la vesícula y las t-SNARES de la membrana, que finalmente conduce a la fusión de las membranas y a la liberación del contenido. El excisto es un complejo octamérico formado por las subunidades Sec3, Sec5, Sec6, Sec8, Sec10, Sec15, Exo70 y Exo84 (Chen *et al.*, 2015; Jones y Sudbery, 2010; Nishida-Fukuda, 2019; Polgar y Fogelgren, 2018; Zeng *et al.*, 2017), y su unión con las vesículas está mediada por Sec4, a través de su interacción con Sec15. Los componentes del excisto permanecen cerca de la superficie celular para anclar las vesículas que llegan a la membrana.

Aunque el polarisoma y el excisto se localizan en el ápice hifal, el crecimiento polarizado de las hifas es impulsado por el Spitzenkörper, una estructura rica en vesículas responsable de la direccionalidad del crecimiento de las hifas, que está presente durante todas las etapas del ciclo celular, incluida la formación del septo (Riquelme y Sánchez-León, 2014). Spa2, Bni1 y Bud6 coordinan

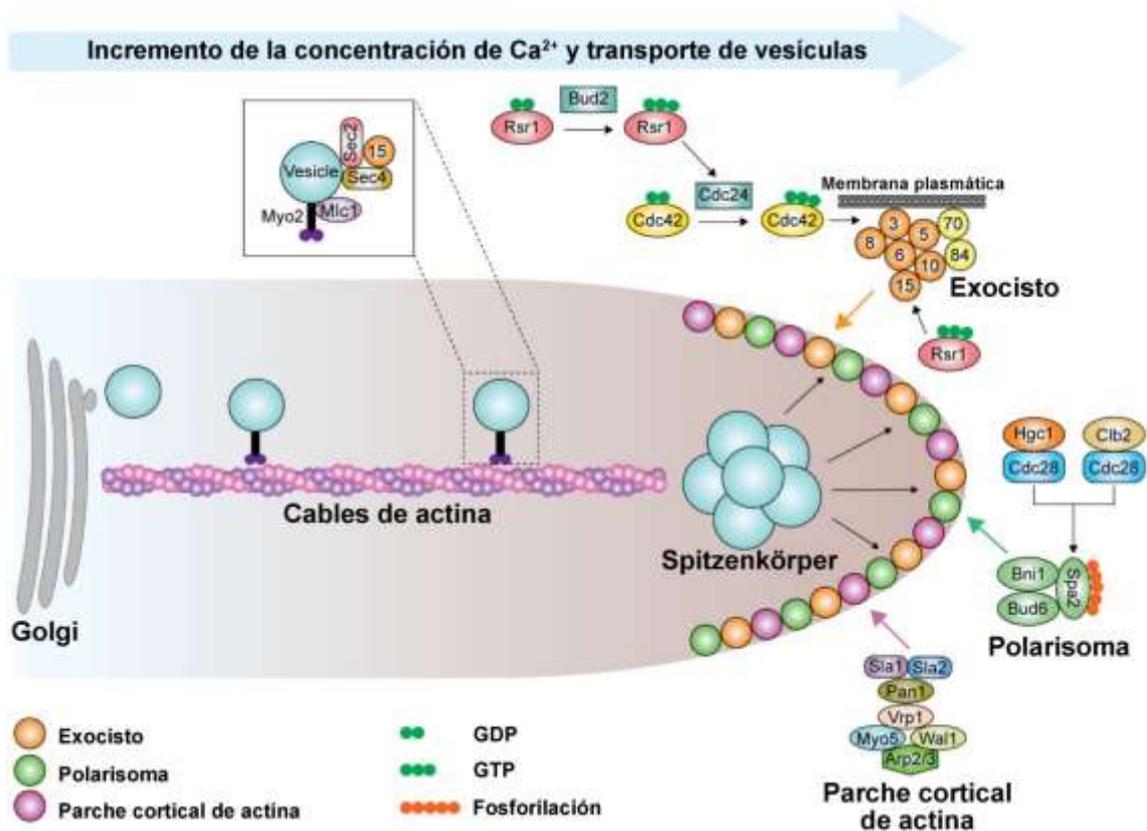


Figura 11. Representación esquemática del crecimiento polarizado en hifas de *C. albicans*. El crecimiento polarizado es impulsado por el Spitzenkörper, un centro de suministro de vesículas que se mantiene a una distancia fija de la punta de la hifa. Las vesículas secretoras post-Golgi se transportan continuamente al sitio de crecimiento polarizado unidas a la GTPasa Sec4 de tipo Rab y la GEF Sec2 a través de cables de actina, y la miosina Myo2 asociada a la cadena reguladora Mlc1 proporcionan la fuerza motriz necesaria para el transporte. Las vesículas se acumulan en el Spitzenkörper antes de acoplarse al excisto, que consta de las subunidades Sec3, Sec5, Sec6, Sec8, Sec10, Sec15, Exo70 y Exo84, y fusionarse con la membrana plasmática. Spa2, Bni1 y Bud6 coordinan las funciones del Spitzenkörper y del polarísoma en el ápice de la hifa. La endocitosis y el reciclaje endocítico de proteínas de polaridad requiere de los parches corticales de actina en la punta de la hifa. Los parches corticales de actina organizan las proteínas necesarias para la endocitosis, que incluyen las proteínas citoesqueléticas Sla1 y Sla2, la proteína reguladora Pan1 y el complejo Vrp1-Wal1-Myo5, que activa el complejo Arp2/3. La GTPasa Rsr1, tras la activación por su GEF Bud2, localiza a Cdc24 en el sitio apical de la hifa. Imagen modificada de Chow *et al.*, 2021.

las funciones del Spitzenkörper y el polarisoma en la punta de la hifa (Crampin *et al.*, 2005; Jones y Sudbery, 2010). Durante el crecimiento de las hifas, las vesículas secretoras post-Golgi viajan hasta el Spitzenkörper, que actúa como un centro de suministro de vesículas. Las proteínas asociadas a vesículas Sec4, Sec2 y Mlc1 se localizan en el Spitzenkörper durante el crecimiento de las hifas (Bishop *et al.*, 2010; Jones y Sudbery, 2010) y en él, las vesículas secretoras se cargan en cables de actina nucleados por el polarisoma para ser transportadas a la membrana plasmática, donde se acoplan al exocisto. Para el crecimiento polarizado de las hifas es necesaria la polarización del citoesqueleto de actina, formado por parches y cables de actina, que dirige el flujo de vesículas hacia la punta de la hifa para su expansión. Los cables de actina son esenciales en el crecimiento de las hifas, ya que su alteración inhibe la formación de estas (Chow *et al.*, 2021).

4. Las kinasas de la familia NDR y el crecimiento polarizado.

La familia de kinasas NDR/LATS (*NDR: Nuclear Dbf2-Related; LATS: LArge Tumour Suppressor*) se encuentra altamente conservada desde levaduras hasta humanos. Es un subgrupo de la familia de kinasas AGC con funciones importantes en morfogénesis y polarización celular. Las NDR kinasas están presentes en *Drosophila melanogaster* (Trc y LATS/Warts), *Caenorhabditis elegans* (SAX-1 y LATS), *S. cerevisiae* (Dbf2, Dbf20 y Cbk1), *Schizosaccharomyces pombe* (Sid2 y Orb6), y otros hongos, plantas y mamíferos (Avruch *et al.*, 2012; Hergovich, 2016; Maerz y Seiler, 2010). En animales, las NDR kinasas forman parte de la ruta *Hippo/MST*, que está implicada en procesos como proliferación celular, desarrollo embrionario, diferenciación neuronal y apoptosis (Parker *et al.*, 2020).

Las NDR/LATS kinasas se unen a coactivadores del tipo Mob altamente conservados, formando un complejo regulador que controla un conjunto diverso de proteínas efectoras *in vivo* (Gógl *et al.*, 2015) (Duhart y Raftery, 2020; Parker *et al.*, 2020). La formación del complejo con las proteínas reguladoras Mob es necesario para su actividad y función (Hergovich *et al.*, 2006; Weiss *et al.*, 2002). El módulo central de la ruta *Hippo/MST* está formado por una kinasa similar a Ste20 (*Hippo/MST*) y la NDR kinasa LATS/Warts asociada a su proteína reguladora MOB1, que forman un complejo gracias a la proteína andamio (*scaffold*) SAV1. Las dianas de esta ruta son los coactivadores transcripcionales YAP y TAZ (Figura 12) (Hergovich, 2016).

La ruta *Hippo/MST* supresora de tumores es un regulador crítico del crecimiento tisular mediante el control de procesos celulares como la proliferación celular, muerte, diferenciación y línea germinal (Hergovich, 2016). En levaduras, existen dos rutas de señalización medidas por NDR kinasas: la ruta MEN/SIN (*Mitotic Exit Network/Septation Initiation Network*), que regula la salida de mitosis y la citocinesis, y la ruta RAM/MOR (*Regulation of Ace2 and Morphogenesis/MORphogenesis-related NDR kinase network*), implicada en crecimiento polarizado y separación celular (Maerz y Seiler, 2010; Saputo *et al.*, 2012; Simanis, 2015). En *S. cerevisiae*, la NDR kinasa de la ruta MEN es el par redundante Dbf2/Dbf20, que se localizan principalmente en los SPBs y en el cuello entre la célula madre e hija durante la mitosis, mientras que la de la ruta RAM es Cbk1 y se localiza en el espacio nuclear y citoplasmático y en el córtex, donde facilita el crecimiento axial de la yema (Figura 12) (Hergovich *et al.*, 2006).

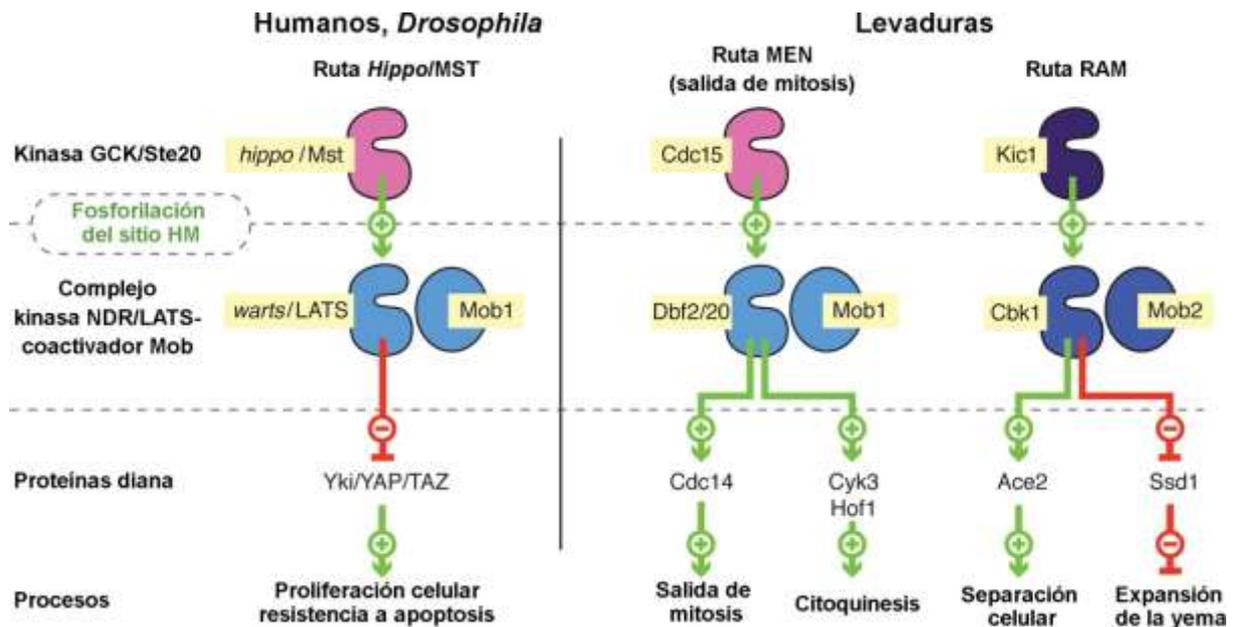


Figura 12. Papel del complejo kinasa NDR/LATS-Mob en las diferentes rutas de señalización. Izquierda: en metazoos, la ruta *Hippo* consta de un complejo LATS-Mob1 que es activado por las kinasas MST/*Hippo* e inhibe el coactivador transcripcional Yki/YAP. Derecha: la levadura de gemación tiene dos vías *Hippo* distintas, la ruta de salida mitótica (MEN), en la que la kinasa Dbf2 o Dbf20 en complejo con Mob1 controla la salida de mitosis y la citoquinesis, y la ruta RAM, en la que la NDR kinasa Cbk1, en complejo con Mob2, controla la separación celular y la morfogénesis. Imagen modificada de Gógl *et al.*, 2015.

4.1. La ruta de salida de mitosis MEN (*Mitotic Exit Network*).

Una de las rutas de kinasas NDR de levaduras controla la salida de mitosis y su coordinación con la formación del septo y la separación celular, un proceso esencial para la distribución equitativa de la información genética entre las células hijas (Baro *et al.*, 2017; Simanis, 2015). Los elementos centrales de la ruta MEN en *S. cerevisiae* incluyen la GTPasa Tem1, su activador Bub2-Bfa1, un factor de intercambio de GTP Lte1, y las kinasas Cdc15 (*Ste20-like*) y el complejo Dbf2-Mob1 que regula la actividad de la fosfatasa Cdc14 (Bardin y Amon, 2001). La misión principal de esta fosfatasa es defosforilar los sustratos que han sido fosforilados durante la mitosis por el complejo ciclinas mitóticas-Cdc28. En *S. cerevisiae*, Cdc14 se mantiene inactivo durante la mayor parte del ciclo celular a través de su interacción con Net1, que lo secuestra en el nucléolo, pero cuando se libera impulsa la salida de mitosis al activar la expresión del inhibidor de Cdk, Sic1. Durante la anafase temprana, se libera una pequeña cantidad de Cdc14 desde el nucleolo al núcleo por la ruta FEAR (*cdc Fourteen Early Anaphase Release*) (Rock y Amon, 2009). Esta pequeña cantidad de Cdc14 es esencial para la activación de la ruta MEN, que a su vez desencadena la liberación total de Cdc14 del nucleolo y su salida al citoplasma donde se asocia a los SPBs y al cuello de la yema (Shou *et al.*, 1999; Visintin *et al.*, 1998). La fosfatasa Cdc14 también se encarga de inactivar a la ruta MEN, lo que restringe la actividad de la ruta a una breve ventana en anafase (Geymonat *et al.*, 2002).

Cdc14 también desempeña un papel en la promoción de la separación celular a través de su interacción con la cascada de señalización RAM que regula las enzimas necesarias para la degradación del septo y la separación celular (Brace *et al.*, 2011).

4.2. La ruta de señalización RAM (Regulation of Ace2 and Morphogenesis).

Otra de las rutas de señalización mediada por kinasas NDR y conservada en levaduras es la ruta de regulación de Ace2 y de la morfogénesis, conocida como ruta RAM (Saputo *et al.*, 2012), que en *S. pombe* se conoce como ruta MOR (Maerz y Seiler, 2010). En *S. cerevisiae*, esta ruta está implicada en la regulación de la separación celular de las células madre e hija, la transcripción de genes específicos de células hijas, el mantenimiento de la integridad de la pared celular y el crecimiento polarizado (Kurischko *et al.*, 2011a; Nelson *et al.*, 2003; Saputo *et al.*, 2012; Weiss *et al.*, 2002).

En *S. cerevisiae*, la ruta RAM consta de la NDR kinasa Cbk1 que regula el factor de transcripción Ace2 (Nelson *et al.*, 2003; Saputo *et al.*, 2012). La actividad de la kinasa depende de una red de cofactores, incluidos Mob2, Kic1, Hym1, Tao3 y Sog2 (Figura 13). Kic1 es una kinasa de la familia Ste20 necesaria para la fosforilación de Cbk1 en el extremo C-terminal (sitio HM). Esta fosforilación no es necesaria para la actividad o localización de Cbk1, pero sí para la formación del complejo Cbk1-Ace2 (Jansen *et al.*, 2006). Además de esta fosforilación, Cbk1 se activa mediante la unión con la subunidad reguladora Mob2 y por autofosforilación en una región que separa el dominio catalítico de Cbk1 en dos subdominios (*T-loop*). Como en otras NDR kinasas, Mob2 es esencial para la activación y localización de Cbk1 (Nelson *et al.*, 2003). La localización de Cbk1 y Mob2 es consistente con su doble función en el control de la morfogénesis celular y de la transcripción de los genes implicados en la separación madre/hija a través de Ace2. Se concentran de manera prominente en el cuello antes de la contracción del anillo de actomiosina, y se localizan algo más débilmente en el córtex celular de la célula hija en crecimiento (Weiss, 2012). El complejo Cbk1-Mob2 también se acumula en el núcleo de la célula hija a medida que las células pasan de fase M a G1, de manera dependiente de Ace2, lo que sugiere que ingresan al núcleo como un complejo ternario junto con el factor de transcripción (Colman-Lerner *et al.*, 2001; Weiss *et al.*, 2002).

Cbk1 tiene una preferencia por fosforilar sitios muy específicos, lo que ha demostrado ser extremadamente útil para identificar sus dianas *in vivo*. El análisis de su especificidad muestra que Cbk1 fosforila a serinas o treoninas presentes en el motivo H-X-(K/R)-(K/R)-X-(S/T), donde X es cualquier aminoácido (Mazanka *et al.*, 2008). Esta secuencia coincide estrechamente con los sitios fosforilados por las kinasas LATS (Zhang *et al.*, 2008), lo que indica que este motivo consenso se conserva en las NDR kinasas.

Kic1 es una kinasa similar a Ste20 que funciona como activador del complejo Cbk1-Mob2 (Nelson *et al.*, 2003). Presenta un dominio catalítico N-terminal muy similar al de Cdc15 y se asocia con la proteína Hym1, que contiene repeticiones helicoidales (Nelson *et al.*, 2003; Sullivan *et al.*, 1998). Hym1 interacciona con Cbk1 y Kic1 y es importante para la actividad catalítica y la localización adecuada del complejo Cbk1-Mob2 (Bidlingmaier *et al.*, 2001). Tao3 (Pag1) pertenece a un grupo de proteínas de andamiaje de gran tamaño, conservadas evolutivamente, cuya función es facilitar la activación de Cbk1-Mob2 por Kic1 (Hergovich *et al.*, 2006; Nelson *et al.*, 2003). Tao3 interacciona físicamente tanto con Kic1 como con Cbk1, por tanto, esta proteína puede facilitar la comunicación entre estos dos módulos (Nelson *et al.*, 2003; Stark *et al.*, 2006). Al igual que otros componentes de la

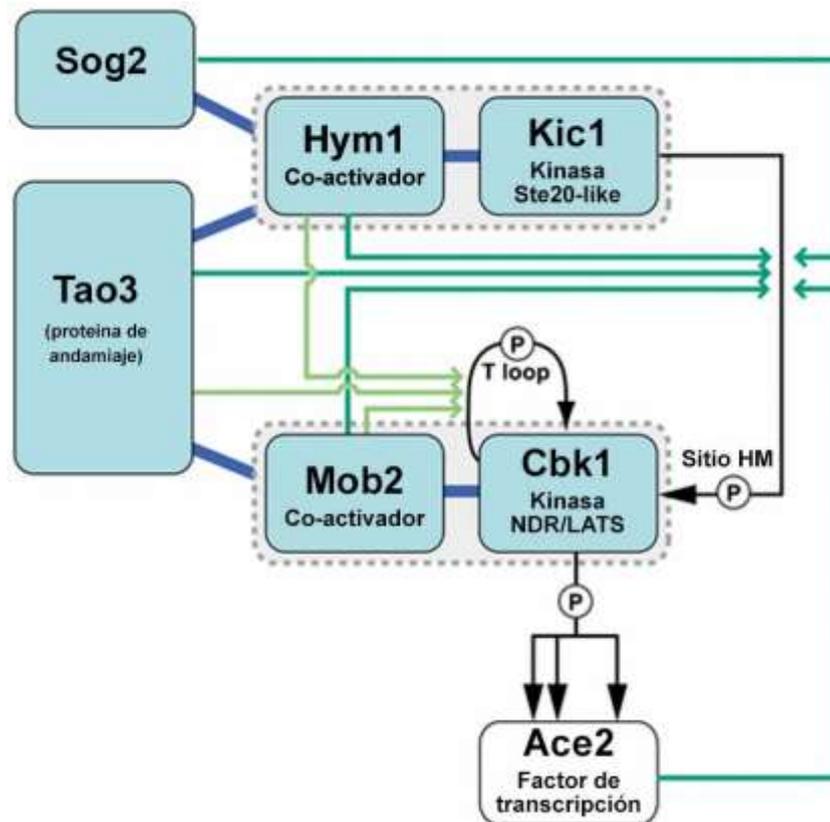


Figura 13. Estructura de señalización de la ruta RAM. Las interacciones proteína-proteína (mostradas como líneas azules gruesas) y la importancia para los niveles de fosforilación *in vivo* de sitios individuales (mostradas como líneas verdes) sugieren cómo se relacionan los módulos de la red RAM con la fosforregulación de Cbk1. Kic1 probablemente fosforila directamente el sitio HM C-terminal de Cbk1, y Cbk1 autofosforila su propio bucle de activación *in cis*. Todos los componentes de la ruta RAM son necesarios para la fosforilación normal del sitio HM, al igual que Ace2. Se necesita a Tao3, Mob2 e Hym1 para la autofosforilación del bucle de activación normal. Imagen modificada de Weiss, 2012.

ruta RAM, Tao3 se localiza tanto en la membrana de la yema como en el cuello de la célula madre-hija, pero no se ha detectado en los núcleos. Finalmente, Sog2 es una proteína que contiene repeticiones ricas en leucina y también es un componente esencial de la ruta RAM en levaduras (Nelson *et al.*, 2003).

4.3. Regulación de Ace2 durante la degradación del septo y entrada en G1.

El septo primario de separación entre la célula madre y la hija se destruye rápidamente minutos después de su síntesis, mostrando que existe una coordinación precisa de los procesos de síntesis y degradación. Una acción prematura de las enzimas que degradan la quitina y destruyen o remodelan otros componentes del septo dificultaría su síntesis o podría producir la lisis de las células madre e hija. Se ha demostrado que la destrucción del septo se regula espacialmente y ocurre desde el lado de la célula hija, y su control temporal y espacial se logra por la regulación de la transcripción y de la traducción por la ruta RAM, lo que hace que la destrucción del septo sea un evento que ocurre solo una vez en la vida de una célula, cuando es una hija recién nacida (Weiss, 2012).

Ace2 regula la expresión de los genes que codifican las proteínas de degradación del septo, activando su expresión tras la formación del septo. Estos genes incluyen la quitinasa *CTS1*, las

Introducción

glucanasas *ENG1/DSE4*, *SCW11* y *SUN4*, y otros genes específicos de la célula hija como *DSE1*, *DSE2* o *DSE3* (Baladrón *et al.*, 2002; Bidlingmaier *et al.*, 2001; Colman-Lerner *et al.*, 2001; O'Conallain *et al.*, 1999). Además, Ace2 también alarga la fase G1 de las células hijas al inhibir la expresión de la ciclina de G1 temprana *CLN3*, permitiéndolas alcanzar un tamaño adecuado para la gemación (Di Talia *et al.*, 2009; Laabs *et al.*, 2003).

La expresión de Ace2 también está regulada durante el ciclo celular, activándose en la fase M temprana, junto con otros genes del "grupo CLB2" (Spellman *et al.*, 1998). Una vez sintetizado, la entrada nuclear de Ace2 es inhibida por la actividad de la CDK mitótica que, al fosforilarlo, inactiva su señal de localización nuclear (NLS) y por lo tanto permanece en el citoplasma hasta la salida de mitosis (Figura 14A) (O'Conallain *et al.*, 1999). El NLS de Ace2 está flanqueado por motivos de

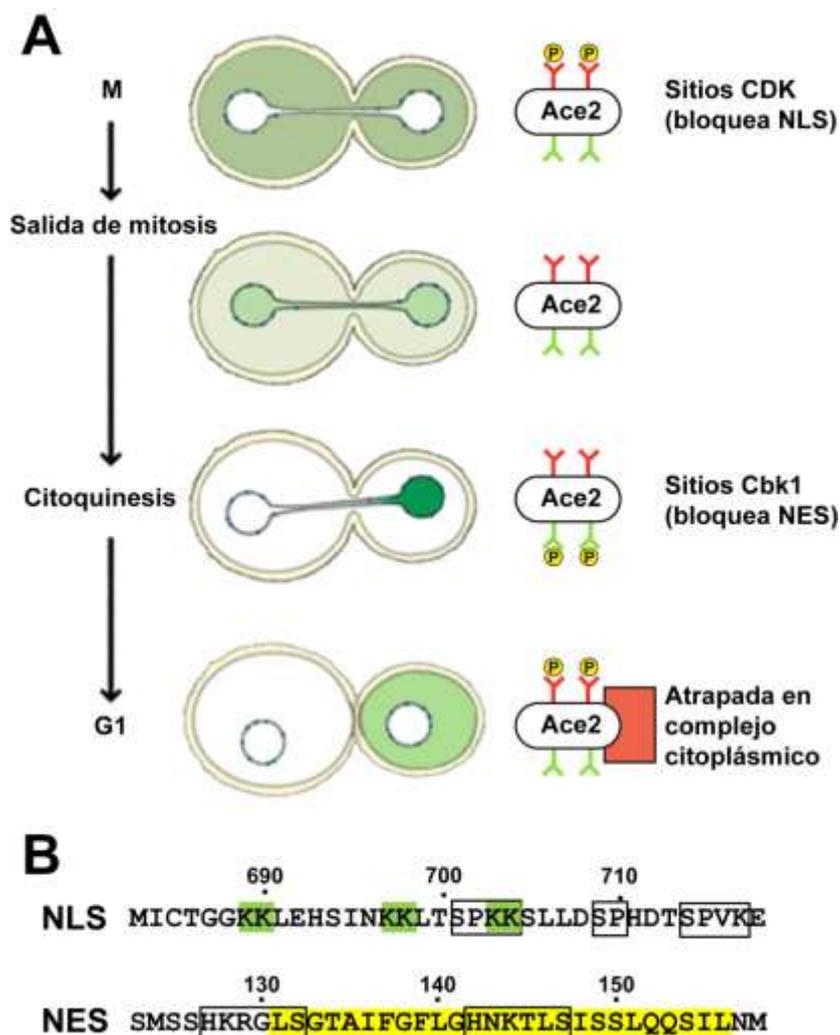


Figura 14. Localización de Ace2 en la transición M/G1. (A) Ace2 se representa en color verde, y a mayor intensidad del color, mayor concentración de Ace2 en las diferentes regiones celulares (y viceversa). En mitosis, la CDK bloquea la secuencia NLS y Ace2 se distribuye homogéneamente por todo el citoplasma. A la salida de mitosis se produce la entrada de Ace2 en ambos núcleos por la activación de la NLS por Cdc14. Durante la citoquinesis, Ace2 se acumula en el núcleo de la célula hija, mostrando una acumulación asimétrica de la proteína por la fosforilación de la secuencia NES por Cbk1. La inactivación de Cbk1 induce la salida de Ace2 al citoplasma donde queda retenida por la Cdc28/ciclina G1. Imagen modificada de Weiss 2012. (B) Secuencia de la señal de localización nuclear (NLS) y de exportación nuclear (NES) de Ace2 de *S. cerevisiae*. Se indican lisinas que componen la secuencia multipartita de la NLS y los sitios de fosforilación por CDK que las rodean. En la parte inferior se indica la secuencia NES en amarillo con los sitios de fosforilación por Cbk1 indicados por recuadros.

fosforilación de CDK (Figura 14B) y su reemplazo por alanina permite la entrada nuclear de Ace2 (Mazanka *et al.*, 2008; Mazanka y Weiss, 2010; Sbia *et al.*, 2008). Cuando se libera del nucleolo, la fosfatasa Cdc14 elimina las fosforilaciones de CDK en Ace2 (Mazanka y Weiss, 2010; Sbia *et al.*, 2008) y la proteína comienza a entrar en los núcleos de las células madre e hija en la telofase temprana. En este momento del ciclo celular, Ace2 entra en ambos núcleos, y no hay asimetría. Unos minutos antes de la contracción del anillo de actomiosina, Ace2 comienza a acumularse casi exclusivamente en el núcleo de la célula hija, donde permanece hasta poco después de que se completa la separación madre/hija (Bidlingmaier *et al.*, 2001; Brace *et al.*, 2011; Mazanka *et al.*, 2008; Sbia *et al.*, 2008; Weiss *et al.*, 2002). Finalmente, poco después de que se completa la separación en la fase G1 temprana, Ace2 desaparece del núcleo de las células hijas y se relocaliza en el citoplasma.

La eliminación de la fosforilación por CDK que rodea al sitio NLS de Ace2 permite que entre en los núcleos, y es necesaria pero no suficiente para su localización y para la activación transcripcional de genes específicos de la hija, ya que Ace2 también contiene una señal de exportación nuclear (NES) altamente activa, y no se acumula en el núcleo en cantidad suficiente como para activar la expresión de sus genes diana (Sbia *et al.*, 2008). Cbk1 regula directamente el transporte nucleocitoplasmático de Ace2 mediante la fosforilación e inactivación del NES, ya que existen dos motivos consenso de Cbk1 dentro de la NES (Figura 14A y B). Cbk1 fosforila estos sitios y permite la acumulación en el núcleo de la célula hija (Brace *et al.*, 2011; Mazanka y Weiss, 2010). Las mutaciones que inactivan el NES de Ace2, incluidas las sustituciones fosfomiméticas, hacen que se localice fuertemente en los núcleos de las células madre e hija y hacen que la degradación del septo sea independiente de la ruta RAM (Mazanka *et al.*, 2008; Racki *et al.*, 2000).

4.4. Control de la traducción de proteínas por la ruta RAM.

Otro de los procesos que regula Cbk1 y, por extensión la ruta RAM, es la traducción de proteínas específicas a través de la proteína de unión al ARNm Ssd1. Ssd1 es una proteína ampliamente conservada en hongos que carece de actividad catalítica, pero se une a ARNm específicos y reprime su traducción. Ssd1 es la proteína que presenta más sitios de fosforilación por Cbk1 en *C. albicans*, *S. cerevisiae* y *S. pombe*, y en todos los hongos estudiados (Kurischko *et al.*, 2011a; Lee *et al.*, 2015). Cbk1 regula de manera negativa esta función a través de la fosforilación de sitios presentes en la región N-terminal de Ssd1 (Jansen *et al.*, 2009; Kurischko *et al.*, 2011a). Ssd1 se asocia con un subconjunto de ARNMs involucrados en la biosíntesis de la pared celular y el crecimiento celular. Cbk1 fosforila Ssd1, modificando su distribución subcelular y permitiendo la traducción de los complejos Ssd1-ARNMs (Jansen *et al.*, 2009; Kurischko *et al.*, 2011a; Kurischko *et al.*, 2011b). La inhibición de Cbk1 provoca que los complejos Ssd1-ARNMs se asocien a los cuerpos P (*P-bodies*) y gránulos de estrés, donde se reprime la traducción de los ARNMs asociados a esta proteína. Se ha demostrado que Ssd1 se asocia específicamente con un subconjunto de ARNMs, incluidos varios que codifican manoproteínas de la pared celular (Jansen *et al.*, 2009) y algunos de estos ARNMs asociados a Ssd1 se localizan asimétricamente en la punta de la yema durante el crecimiento polarizado (Kurischko *et al.*, 2011a). Estos datos sugieren que los ARNMs asociados a Ssd1 están constitutivamente reprimidos en mutantes de la vía RAM de *S. cerevisiae*, lo que conduce a la muerte celular. Ssd1 también se asocia con ARNMs que codifican algunas de las proteínas

específicas de la célula hija, como Cts1, Dse2 y la mayoría de las glucanasas de la familia SUN (Hogan *et al.*, 2008; Jansen *et al.*, 2009), por lo que también controla su traducción durante el proceso de separación celular.

4.5. Control del crecimiento polarizado y la morfogénesis por la ruta RAM.

Como indica su nombre, la ruta RAM juega un papel en la morfogénesis y el crecimiento polarizado en levaduras (Saputo *et al.*, 2012; Weiss, 2012). En *S. cerevisiae*, todos los componentes de la ruta RAM se localizan en sitios de crecimiento polarizado, como la punta de la yema o el septo y los mutantes carentes de cualquiera de los componentes de esta ruta presentan células redondas que no se separan. Además, los mutantes tienen defectos en la formación de las proyecciones de conjugación (*shmoos*) y una menor eficiencia de conjugación. Sin embargo, estos defectos no parecen ser el resultado de cambios drásticos en el citoesqueleto de actina durante el crecimiento polarizado (Weiss *et al.*, 2002).

Varias líneas de evidencia muestran que la ruta RAM está implicada en la regulación de la secreción y en la función de Golgi durante el crecimiento polarizado. Por ejemplo, Cbk1 se une y fosforila a Sec2, el factor de intercambio de GTP de Sec4, una GTPasa de tipo Rab que regula la exocitosis (Kurischko *et al.*, 2008). Además, los mutantes *cbk1Δ* tienen defectos en la glicosilación de proteínas y son hipersensibles a la higromicina B, un fenotipo característico de las células con defectos de glicosilación. Además, la inhibición de Cbk1 altera la localización de las manosiltransferasas del Aparato de Golgi.

Esta ruta de señalización también controla la integridad de la pared celular por dos mecanismos. El primero es a través de la traducción de ARNm de proteínas de la pared celular a través de Ssd1, como se ha comentado anteriormente, y la otra es a través de la ruta de integridad de la pared celular (CWI, *Cell Wall Integrity*) de MAPKs (Kuravi *et al.*, 2011). La ruta CWI es una cascada de MAP kinasas que regula la biosíntesis de la pared celular y la respuesta a daños en la pared celular (Jiménez- Gutiérrez *et al.*, 2020; Levin, 2011). Durante el estrés térmico o el estrés de la pared celular, Cbk1 es crítico para la activación de Slt2, la MAP quinasa terminal de la vía CWI (Kuravi *et al.*, 2011). Aunque no se comprende el mecanismo de la regulación de la ruta CWI por Cbk1, parece funcionar a través de Bck2, un componente de la ruta con sitios de fosforilación por Cbk1.

4.6. La ruta RAM en *C. albicans*.

C. albicans contiene ortólogos de todos los componentes de la ruta RAM descritos en *S. cerevisiae*. Cbk1 fue clonado por primera vez en 2002 (McNemar y Fonzi, 2002). Al igual que en *S. cerevisiae*, la delección de Cbk1 afecta a la separación celular, lo que da lugar a grupos de células que no se separan como resultado de la expresión reducida de los genes de separación celular (*CHT2* y *CHT3*), lo que sugiere que Cbk1 también regula la actividad de Ace2 en este organismo. Los mutantes *cbk1ΔΔ* no son capaces de formar hifas en una variedad de condiciones inductoras de la filamentación (McNemar y Fonzi, 2002; Song *et al.*, 2008), lo que indica que la ruta RAM es esencial para el crecimiento polarizado de *C. albicans*. El heterocigoto también muestra hifas radiales disminuidas en medio sólido. Estos datos indican que las funciones generales de la ruta RAM están conservadas entre *S. cerevisiae* y *C. albicans*. Con respecto a la morfogénesis y la separación celular,

las cepas *mob2ΔΔ*, *kic1ΔΔ*, *pag1ΔΔ*, *hym1ΔΔ* y *sog2ΔΔ* muestran fenotipos similares a los del mutante *cbk1ΔΔ*. Además, la expresión de genes de separación celular regulados por Ace2, así como de un conjunto de genes específicos de hifas, está disminuida en células *mob2ΔΔ* (Song *et al.*, 2008).

Se han caracterizado numerosas funciones de la ruta RAM y Ace2 en *C. albicans*. Además de su papel en el crecimiento polarizado y la separación celular (Kelly *et al.*, 2004; McNemar y Fonzi, 2002), la ruta RAM y Ace2 afectan a la formación de hifas (Mulhern *et al.*, 2006), a la formación de las proyecciones sexuales (Liang *et al.*, 2020), a la respuesta a hipoxia (Mulhern *et al.*, 2006) (Desai *et al.*, 2015), a la formación de *biofilms* (Blankenship *et al.*, 2010; Finkel *et al.*, 2012), a la adherencia a superficies abióticas (Finkel *et al.*, 2012), a la susceptibilidad a fármacos antifúngicos (Song *et al.*, 2008), a la estructura de la pared celular, incluido el enmascaramiento de β -glucanos (Ballou *et al.*, 2016; van Wijlick *et al.*, 2016) y a la regulación de genes metabólicos (Mulhern *et al.*, 2006). Además, mediante análisis de haploinsuficiencia se ha comprobado la existencia de una amplia red de interacciones entre Cbk1 y una variedad de genes funcionalmente distintos, incluidos los genes necesarios para la tolerancia al estrés oxidativo y la utilización de nitrógeno (Saputo *et al.*, 2016). Por tanto, la vía RAM regula directa o indirectamente un abanico de funciones importantes para la biología y patobiología de *C. albicans*.

El ortólogo de Ace2 en *C. albicans* también está conservado, y aunque la homología es baja (24% de identidad), las regiones que contienen los dedos de zinc están muy conservadas (Kelly *et al.*, 2004). De acuerdo con su papel como factor de transcripción específico de células hijas, se ha demostrado que Ace2 se localiza en el núcleo de las yemas de levaduras y de células filamentosas (Bharucha *et al.*, 2011; Calderón-Noreña *et al.*, 2015; Kelly *et al.*, 2004; Wang *et al.*, 2009). Aunque la delección de *ACE2* no afecta el crecimiento vegetativo, las cepas muestran defectos de separación celular y niveles reducidos de expresión de la quitinasa.

Se ha descrito la existencia de dos isoformas de Ace2 que se diferencian por una región de 54 aa en el extremo N-terminal. La forma más corta funciona como factor de transcripción mientras que la larga se asocia a la membrana plasmática y es necesaria para inhibir la separación celular de las hifas (Calderón-Noreña *et al.*, 2015). Ace2 contiene 3 posibles sitios de fosforilación por Cbk1, dos de los cuales se localizan al lado de la NES como en *S. cerevisiae*, y el tercero está en la extensión N-terminal presente únicamente en la forma asociada a la membrana (Calderón-Noreña *et al.*, 2015). Un análisis fosfoproteómico a gran escala durante la filamentación mostró que dos de estos tres sitios contienen fosfatos en esas condiciones (S136 y S151) (Willger *et al.*, 2015), y más recientemente se ha comprobado que Ace2 es un sustrato de Cbk1 en *C. albicans* (Wakade *et al.*, 2020). La mutación de los sitios de fosforilación de Cbk1 a alanina (mutantes *ace2-2A* y *ace2-3A*) produce un aumento en la formación de grumos de células, aunque no son tan grandes como los del mutante nulo y también afectan a la localización específica de Ace2 en el núcleo de la célula hija (Wakade *et al.*, 2020).

Mediante el estudio del perfil transcripcional de mutantes *cbk1ΔΔ* y *ace2ΔΔ* se ha comprobado que, aunque tanto Cbk1 como Ace2 afectan la expresión de un gran número de genes, el eje Cbk1-Ace2 regula directamente un subconjunto específico de estas funciones. Durante el crecimiento como levaduras, el 10% de los genes se regula de forma similar en ambos mutantes. La expresión de los

genes implicados en la degradación del septo (*CHT3* y *SCW11*) depende de ambas proteínas y también de los sitios de fosforilación en Ace2. El reducido número de genes co-regulados por ambas proteínas indica que es probable que Cbk1 tenga otros efectores transcripcionales adicionales y que Ace2 probablemente interactúe con otras proteínas reguladoras (Wakade *et al.*, 2020). Diferentes estudios transcripcionales indican que la expresión de numerosos genes está afectada durante el desarrollo hifal en el mutante *ace2ΔΔ*, a pesar de que es prescindible para la formación de hifas (Mulhern *et al.*, 2006; Wakade *et al.*, 2020). Sorprendentemente, un conjunto significativo de genes está regulado positivamente en ausencia de Ace2, lo que sugiere que directa o indirectamente funciona como un represor de la expresión génica durante el desarrollo hifal y en determinadas condiciones, como crecimiento en medio Spider, el mutante *ace2ΔΔ* presenta una formación temprana de yemas laterales en las hifas, activando la transición de hifa a levadura (Wakade y Krysan, 2021; Wakade *et al.*, 2020), un proceso cuyo mecanismo es poco conocido. Durante la filamentación, las células madre y los compartimentos subapicales de las hifas se paran en la fase G1 del ciclo celular (Mazanka y Weiss, 2010; Sudbery, 2011) y se ha propuesto que Ace2 fosforilado por Cbk1 desempeñaría un papel en la parada en G1 inhibiendo la transición a *Start*, tanto en las células madre como en los compartimentos subapicales (Wakade y Krysan, 2021; Wakade *et al.*, 2020).

Una de las características distintivas de la ruta RAM en *C. albicans* es que podría regular múltiples factores de transcripción, ya que más de 30 contienen una o más posibles dianas de Cbk1. Hasta la fecha, además de Ace2, se ha confirmado genética o bioquímicamente que esta ruta regula otros dos factores de transcripción, Bcr1 y Fkh2. Bcr1 es una proteína con dedos de zinc de tipo C₂H₂ que regula la expresión de genes que codifican adhesinas y proteínas de la superficie celular necesarias para la formación de *biofilms* (Finkel *et al.*, 2012; Nobile y Mitchell, 2005). Se ha demostrado que Bcr1 es una fosfoproteína que interactúa físicamente con Cbk1 y es fosforilado por esta kinasa (Gutiérrez-Escribano *et al.*, 2012). La mutación de los dos sitios de fosforilación por Cbk1 a alanina altera la función de Bcr1 durante este proceso, mientras que el cambio a ácido glutámico rescata parcialmente los defectos de formación de *biofilms* del mutante *cbk1ΔΔ*, lo que indica que la kinasa Cbk1 también regula el desarrollo de esta estructura a través del control de Bcr1. Por su parte, Fkh2 es un factor de transcripción de tipo *Fork-head* necesario para la expresión de los genes específicos de hifas (Song *et al.*, 2008) que está fosforilado tanto en hifas como en levaduras. Greig y colaboradores (2015) demostraron que la fosforilación de Fkh2 por Cbk1 es importante para la morfogénesis de las hifas.

Además de la regulación de la expresión génica, la ruta RAM también desempeña un papel esencial en la inducción de la filamentación, ya que como se ha comentado anteriormente, los mutantes en cualquiera de los componentes de esta ruta son incapaces de formar hifas (Song *et al.*, 2008). El mecanismo molecular de esta incapacidad de generar hifas es parcialmente conocido y depende de la proteína de unión a ARNm Ssd1. La expresión de los HSGs está regulada negativamente por el complejo formado por el correpresor transcripcional Tup1 en asociación con el represor transcripcional Nrg1 (Braun *et al.*, 2001; Murad *et al.*, 2001). Las células que carecen de cualquiera de ellos crecen constitutivamente como pseudohifas largas y la expresión de los HSGs se desreprime. Tras la inducción de la filamentación, Nrg1 se disocia de los promotores y se degrada

rápidamente, coincidiendo con la formación del tubo germinativo, aunque vuelve a recuperarse posteriormente (Lu *et al.*, 2011). Una de las razones por las que el mutante *cbk1ΔΔ* es incapaz de filantar es porque es necesario para la degradación de Nrg1 a través de la proteína Ssd1. Se ha demostrado que la delección de *SSD1* suprime parcialmente el defecto en el inicio del desarrollo hifal del mutante *cbk1ΔΔ* (Lee *et al.*, 2015). Ssd1 tiene nueve sitios consenso de fosforilación por Cbk1, y se conoce que el alelo fosfodeficiente (*ssd1-9A*) produce hifas más cortas que la cepa silvestre mientras que el alelo fosfomimético (*ssd1-9E*) suprime parcialmente el defecto en la formación de hifas del mutante *cbk1ΔΔ*, lo que indica que la fosforilación de Ssd1 por Cbk1 es importante para la morfogénesis de las hifas (Lee *et al.*, 2015). Además, Nrg1 no se degrada en el mutante *cbk1ΔΔ*, pero está completamente ausente en el mutante doble *cbk1ΔΔ ssd1ΔΔ*, lo que sugiere que uno de los ARNs unido a Ssd1 es necesario para la degradación de Nrg1.

Basándose en todos los trabajos descritos anteriormente, Wakade y colaboradores (2020) han propuesto un modelo que resume la función del eje Cbk1-Ace2 durante la morfogénesis de las hifas en condiciones de inducción de medio líquido (Figura 15). Cuando se detecta la señal que induce la formación de hifas, la kinasa Cdc28 se activa y fosforila a Mob2 en cuatro sitios (Gutiérrez-Escribano *et al.*, 2011). Esta fosforilación es esencial para la función del complejo Cbk1-Mob2 durante la filamentación, ya que mutaciones a alanina alteran significativamente el desarrollo de las hifas, que son cortas con puntas abombadas, y activan prematuramente la separación celular. Una vez activado, el complejo Cbk1-Mob2 fosforila a Ssd1, lo que permite la degradación del represor de la morfogénesis hifal Nrg1. Una vez que Nrg1 se separa de los promotores de los HSGs, se activa la morfogénesis de las hifas a través de varias vías. Una de ellas es el factor de transcripción Brg1, cuya expresión está reprimida por Nrg1 (Cleary *et al.*, 2012; Lu *et al.*, 2011). Brg1 activa directamente la expresión de *ACE2* y su expresión alcanza su punto máximo durante la fase de mantenimiento (Saputo *et al.*, 2014). El factor Snf5 también es necesario para la expresión de *ACE2*, y para la supresión de las yemas

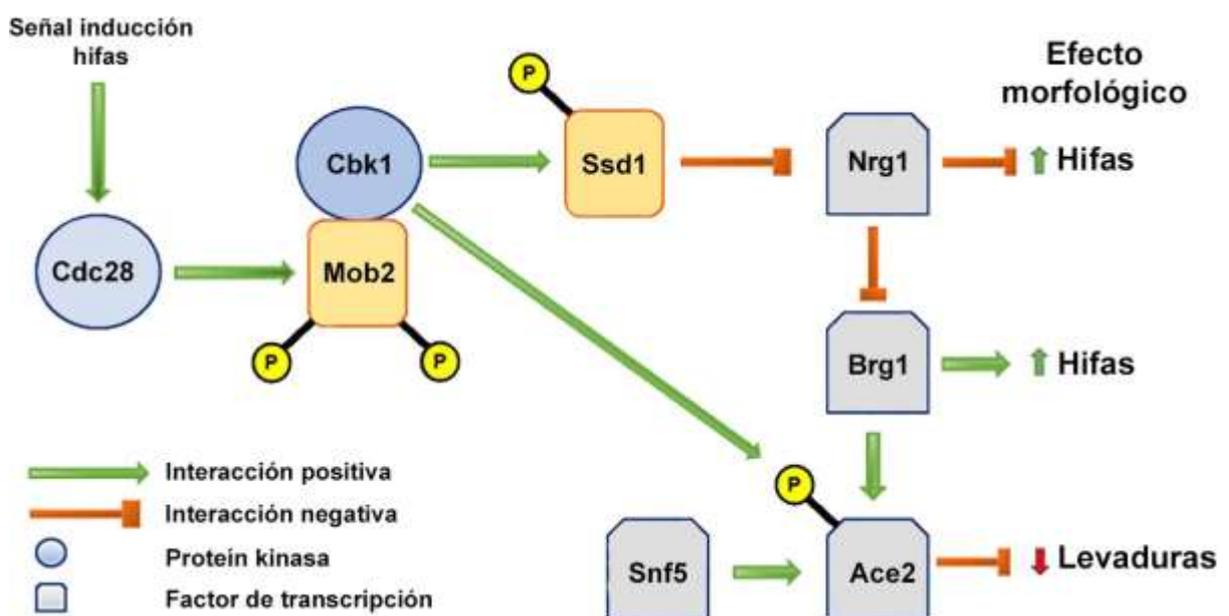


Figura 15. Modelo de la función de Cbk1 y Ace2 durante la morfogénesis de las hifas. Ver detalles en el texto. Imagen modificada de Wakade *et al.*, 2020.

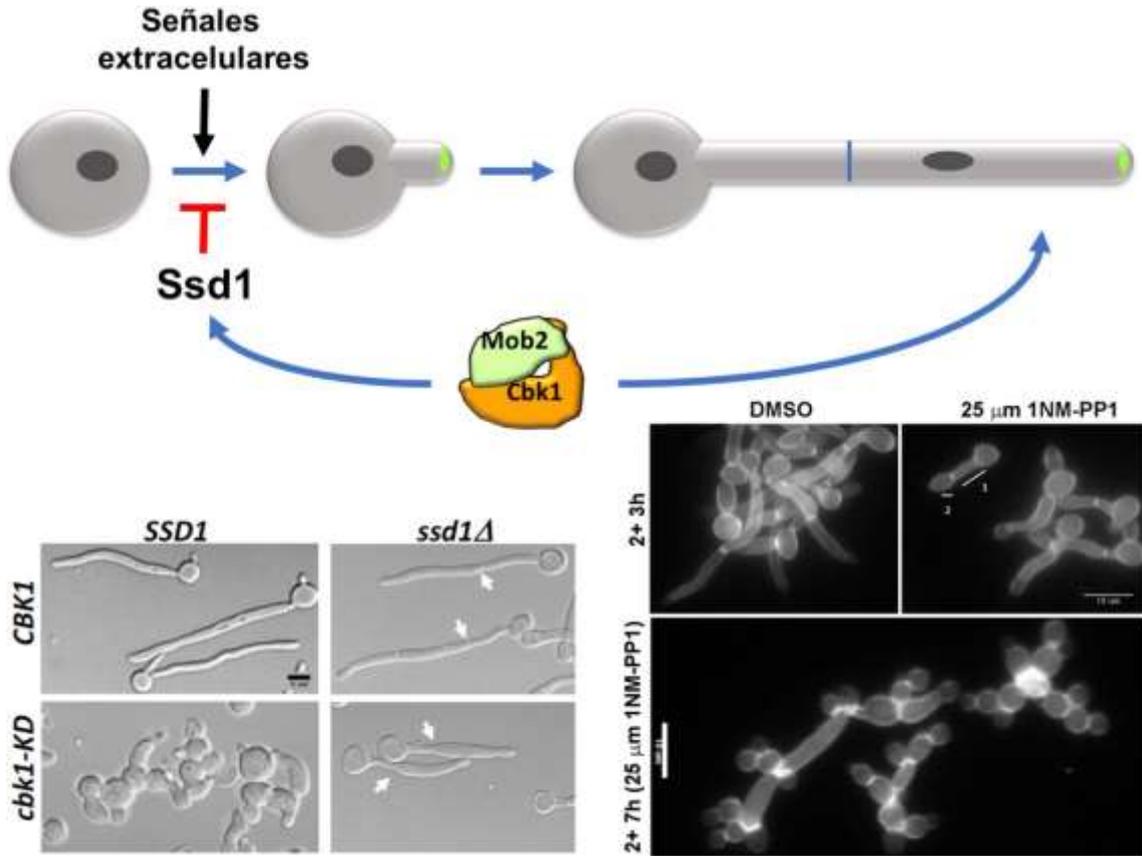


Figura 16. Funciones de Cbk1-Mob2 durante el crecimiento hifal. Cbk1 regula el inicio de la filamentación a través de la proteína Ssd1 y la elongación después de la síntesis del septo de forma independiente de Ssd1. Las imágenes de microscopía de contraste interferencial (DIC) de la izquierda muestran el fenotipo de las cepas indicadas tras dos horas de inducción hifal. Las imágenes de la derecha muestran la tinción con calcoflúor de la cepa *cbk1-as* tras 3 o 7 horas de tratamiento con DMSO o con el análogo 1NM-PP1. Imágenes modificadas de Rojo-Domínguez, 2018.

laterales, lo que indica que desempeña un papel en el mantenimiento de los niveles adecuados de ACE2 durante la morfogénesis (Finkel *et al.*, 2012; Wakade y Krysan, 2021; Wakade *et al.*, 2020). Finalmente, Ace2 fosforilado por Cbk1 funciona, al menos en parte, para suprimir la gemación lateral, probablemente retrasando la transición de G1 a *Start* en los compartimentos de las células subapicales.

Para estudiar la función de la kinasa Cbk1, el grupo del Dr. Jaime Correa (Universidad de Extremadura) construyó cepas que contienen dos alelos mutantes diferentes. Una de ellas es el mutante *cbk1-KD/cbk1Δ* (*Kinase-Dead*), alelo de *CBK1* que genera una proteína catalíticamente inactiva construida por sustitución del ácido aspártico del sitio catalítico por prolina (D548P). Dado que la eliminación del gen *SSD1* suprime el defecto de filamentación del mutante *cbk1ΔΔ* (Lee *et al.*, 2015), el mutante *cbk1-KD/cbk1Δ* se construyó en el fondo genético *ssd1ΔΔ*. La pérdida del gen *SSD1* restaura la capacidad del mutante *cbk1-KD/cbk1Δ* de polarizar el crecimiento en respuesta a suero, aunque las hifas generadas son más cortas que las de la cepa silvestre y la célula apical de la hifa se ensancha una vez sintetizado el primer septo (Rojo-Domínguez, 2018). Sin embargo, la morfología del tubo germinativo (desde el cuerpo basal hasta el primer septo) del doble mutante es igual que el control silvestre, lo que indica que Cbk1 posee una doble función en el desarrollo hifal, siendo

necesaria para la formación del tubo germinativo en un proceso que depende de la inactivación de Ssd1, y también para el crecimiento polarizado de la célula apical una vez formado el primer septo durante la fase de elongación, proceso independiente de Ssd1 (Figura 16). La función de Cbk1 durante la elongación de la filamentación se analizó con más detalle generando el mutante *cbk1-as/cbk1Δ* (*Analogue-Sensitive*) que contiene la mutación M412A que hace que la kinasa Cbk1 sea sensible al análogo de ATP 1NM-PP1. La inhibición de la actividad catalítica de Cbk1 da lugar a hifas con un fenotipo similar al del mutante *cbk1-KD/cbk1Δ ssd1ΔΔ*, ya que los compartimentos apicales de las hifas se ensanchan tras la formación del septo (Figura 16). Adicionalmente, a tiempos más largos se produce una activación de la gemación lateral de las hifas, lo que sugiere que Cbk1 no solo es necesario para un crecimiento apical robusto, sino también para mantener el bloqueo del ciclo celular en los compartimentos subapicales. Por tanto, Cbk1 presenta dos funciones en el desarrollo de la hifa: una función en las etapas iniciales de la filamentación dependiente de *SSD1* necesaria para la germinación y otra tras la síntesis del septo que es independiente de *SSD1* (Rojo-Domínguez, 2018), posiblemente regulando otros procesos necesarios para el crecimiento polarizado, tales como la exocitosis o la endocitosis, ya que el crecimiento polarizado es un balance entre ambos procesos en un punto concreto del córtex celular.

Objetivos

Objetivos

Las NDR kinasas son una familia de proteínas implicadas en morfogénesis y polarización celular, siendo Cbk1 una NDR kinasa clave en la regulación de ambos procesos en *C. albicans*. En esta memoria se aborda el estudio de la función de nuevos sustratos de Cbk1 implicados en el desarrollo hifal, que podrían resultar importantes para la patogenicidad de *C. albicans*. Se plantean tres objetivos:

1. Caracterización de la función de Cbk1 durante el crecimiento polarizado mediante el estudio de la localización de proteínas clave en el mutante condicional *cbk1-as*.
2. Estudio de la función de la GTPasa Rho4 y su regulación mediante fosforilación en los sitios consenso de NDR kinasas.
3. Análisis de la regulación de la subunidad Exo84 del exocisto durante el crecimiento polarizado y su relación con Cbk1.

Resultados

Capítulo 1. Análisis bioinformático del proteoma de *C. albicans*.

Como se ha comentado en la Introducción, en la regulación del crecimiento polarizado, la ruta RAM desempeña un papel esencial y tanto el efector final de esta ruta, la kinasa Cbk1, como su proteína reguladora Mob2 se localizan en las zonas de crecimiento de la célula. Cbk1 se necesita para polarizar el crecimiento en respuesta a suero, ya que las células *cbk1ΔΔ* son incapaces de formar tubos germinativos (Song *et al.*, 2008). En las etapas iniciales de la formación de la hifa, cuanto la función de Cbk1 depende de Ssd1, las hifas *cbk1ΔΔ ssd1ΔΔ* son más cortas y anchas que las de la cepa silvestre tras generar el primer septo (Rojo-Domínguez, 2018), lo que indica que en las etapas posteriores del desarrollo hifal Cbk1 tiene una función independiente de Ssd1, posiblemente regulando otros procesos necesarios para el crecimiento polarizado. Para identificar los posibles sustratos de Cbk1 relacionados con el crecimiento polarizado en el

desarrollo hifal, se realizó una búsqueda informática del proteoma de *C. albicans* para identificar todas las proteínas de este organismo que contenían al menos un sitio consenso de fosforilación de las NDR kinasas, que se ajusta al consenso H-X-(K/R)-X-X- (S/T) o H-X-X-(K/R)-X-(S/T) (Mazanka *et al.*, 2008). Esta búsqueda se realizó usando la herramienta ScanProsite (Hulo *et al.*, 2006), y permitió identificar 1493 proteínas que contenían entre 1 y 10 repeticiones del consenso (Figura 17).

En la Figura 18A se muestran las proteínas que contienen 4 o más sitios posibles de fosforilación por esta NDR kinasa. La proteína que contiene más dianas (10) es uno de los sustratos caracterizados de esta kinasa, la proteína de unión a ARNs Ssd1, que regula la traducción de un grupo específico de

mensajeros y está regulada por Cbk1 (Lee *et al.*, 2015). Hay también otras proteínas en las que se ha demostrado que su regulación depende de Cbk1 como Rga2 (4 sitios) (Zheng *et al.*, 2007) o Spa2 (5 sitios) (Gutiérrez-Escribano *et al.*, 2011), factores de transcripción como Cas5, implicado en la respuesta al estrés de la pared celular y que al mismo tiempo suprime la morfogénesis de las hifas durante el crecimiento levaduriforme (Kim *et al.*, 2021; Xie *et al.*, 2017) o Msn4. Otro grupo relevante de proteínas que contienen numerosos sitios de fosforilación son las implicadas en la polaridad, como Bud3, Boi2 o Int1, y reguladores positivos (GEFs) y negativos (GAPs) de las GTPasas, como Lrg1, Rom2 o el mencionado Rga2 (Xie *et al.*, 2016; Zheng *et al.*, 2007). Todo esto da una idea de la gran variedad de posibles sustratos y procesos dependientes del complejo Cbk1-Mob2.

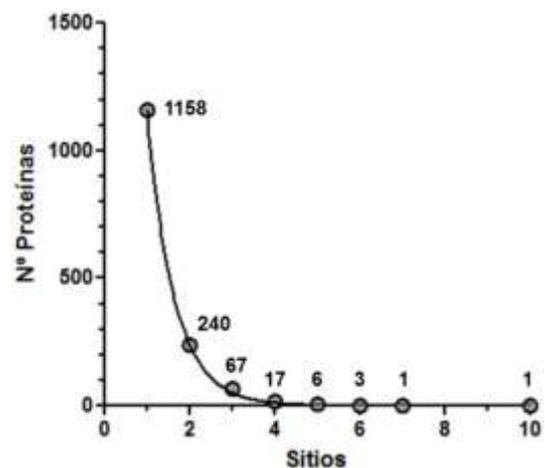


Figura 17. Proteínas con sitios consenso de fosforilación por la NDR kinasa Cbk1. Representación gráfica de la frecuencia de proteínas del proteoma de *C. albicans* que contienen uno o más posibles sitios de fosforilación por Cbk1, obtenida mediante búsqueda con el programa ScanProsite. Los números indican el número de proteínas de cada grupo.

A

GEN	Sitios	Descripción
<i>SSD1</i>	10	Proteína de unión a ARNm que regula la traducción de genes implicados en la síntesis de la pared celular y morfogénesis
<i>orf19.1240</i>	7	Ortólogo de <i>S. cerevisiae YPR117W</i>
<i>TAO3</i>	6	Proteína de la ruta RAM
<i>MIH1</i>	6	Posible proteína fosfatasa de la familia PTP (específica de tirosinas), similar a <i>S. cerevisiae Mih1</i>
<i>orf19.5204</i>	6	Ortólogo de <i>S. cerevisiae BOP3</i>
<i>BOI2</i>	5	Proteína con dominios SH3; implicada en polaridad celular
<i>ZDS1</i>	5	Proteína no esencial similar a <i>S. cerevisiae Zds1</i>
<i>orf19.4043</i>	5	Proteína con un dominio <i>pleckstrin homology</i>
<i>CAS5</i>	5	Factor de transcripción con dedos de zinc; respuesta al daño en la pared celular
<i>orf19.4715</i>	5	Ortólogo de <i>S. cerevisiae NUM1</i> (unión a tubulina, papel en la herencia mitocondrial y organización del citoesqueleto de microtúbulos)
<i>SPA2</i>	5	Componente del polarisoma. Implicado en polaridad celular y formación del Spitzenkörper
<i>TRA1</i>	4	Subunidad de la histona acetil-transferasa NuA4
<i>orf19.2051</i>	4	Ortólogo de <i>S. cerevisiae RPN4</i> (Factor de transcripción que estimula la expresión de genes del proteasoma)
<i>orf19.2372</i>	4	Proteína Pol del retrotransposon Tca
<i>orf19.3041</i>	4	Ortólogo de <i>S. cerevisiae ART5</i> (Regula la endocitosis)
<i>PIKA</i>	4	Fosfatidil inositol kinasa
<i>orf19.3302</i>	4	Subunidad reguladora de la proteína fosfatasa de tipo 1 (PP1); Similar a ScGAC1
<i>INT1</i>	4	Integrina con papel en morfogénesis, similar a <i>S. cerevisiae Bud4</i>
<i>BNI4</i>	4	Proteína necesaria para la síntesis de quitina; similar a <i>S. cerevisiae Bni4</i>
<i>RG2</i>	4	GTPase-activating protein (GAP) de la GTPasa Cdc42
<i>MSN4</i>	4	Factor de transcripción con dedos de zinc
<i>CDR4</i>	4	Transportador de la familia ATP-binding cassette (ABC)
<i>orf19.6277</i>	4	Dominio de unión a fosfatidil inositol.
<i>PRP8</i>	4	Proteína similar a <i>S. cerevisiae Prp8</i>
<i>RIM15</i>	4	Proteína quinasa con papel en la respuesta a estrés
<i>BUD3</i>	4	Papel en la selección del punto de gemación y localización del anillo de actomiosina
<i>LRG1</i>	4	GTPase-activating protein (GAP) que regula negativamente a Cdc42 y Ras1
<i>ROM2</i>	4	Factor de intercambio de GDP/GTP (GEF)

B

GO Molecular Function	N	Esp.	Enriq.	P-value	Genes
Kinase activity (GO:0016301)	28	8.81	3.18	2.90E-07	<i>FAB1, ENV7, PIKA, AKL1, SWE1, KIC1, SAK1, PKH2, RIM15, IPL1, STE11, RIM101, CDC15, TEL1, BCK1</i>
Transcription regulator activity (GO:0140110)	31	13.32	2.33	3.09E-05	<i>ACE2, ADR1, BCR1, CAS5, CRZ1, CRZ2, CSR1, CTA7, FHL1, GAT1, LYS144, MBP1, MIG1, MIG2, MSN4, NRG1, PZF1, RFX2, RIM101, SPT6, SRB9, STP3, TAF145, WOR4, ZCF13, ZCF18, ZCF20, ZCF30, ZCF35</i>
Transcription regulatory region sequence-specific DNA binding (GO:0000976)	21	6.54	3.21	8.16E-06	<i>ACE2, ADR1, ARO1, BCR1, CAS5, CRZ1, CRZ2, CSR1, GAT1, MIG1, MIG2, MSN4, NRG1, PZF1, RPO41, STP3, TFCA, WOR4, ZCF20</i>
Sequence-specific double-stranded DNA binding (GO:1990837)	22	8.34	2.64	7.70E-05	<i>ACE2, ADR1, BCR1, CAS5, CRZ1, CRZ2, CSR1, FHL1, GAT1, LYS144, MIG1, MIG2, MSN4, NRG1, POL1, PZF1, RPO41, STP3, TFCA, WOR4, ZCF20</i>
GO Biological Process	N	Esp.	Enriq.	P-value	Genes
Regulation of cell cycle (GO:0051726)	31	12.04	2.58	5.28E-06	<i>ACE2, CDC14, CDC15, CDC55, CSC25, HGC1, IPL1, LTE1, MIH1, MPH1, MPTS, MRE11, PCL1, PCL2, RIM101, RIM15, ROM2, SDS22, SET3, SSD1, SWE1, TEL1, TOP2, ZDS1</i>
Carbon catabolite regulation of transcription (GO:0045990)	9	1.8	5	2.09E-04	<i>ADR1, BCR1, MIG1, MIG2, NRG1, SPT6, SRB9, ZCF20</i>
Cellular response to extracellular stimulus (GO:0031668)	37	13.79	2.68	1.64E-07	<i>ADR1, BCR1, BNI4, CAS4, CDC14, CRZ1, CSR1, ECM25, FAB1, FGR13, GAT1, GIR2, IPL1, KIC1, KRES, MIG1, MIG2, MSN4, NRG1, PLD1, RIM101, RIM15, RNR1, SET3, SHE3, SPT6, SRB9, SYG1, UBR1, ZCF20</i>
Positive regulation of catabolic process (GO:0009896)	13	3.08	4.22	3.95E-05	<i>ADR1, ATG11, CDC14, CDC55, GAT1, MPTS, PCL1, PET127, PIKA, RIM15, RSP5, STP3, TOM1</i>
Establishment or maintenance of cell polarity (GO:0007163)	16	5.12	3.13	1.32E-04	<i>BCK1, BEM1, CAS4, CRL1, CRZ1, DYN1, INT1, KIC1, MSB1, ROM2, SPA2, ZDS1</i>
GO Cellular component	N	Esp.	Enriq.	P-value	Genes
Cellular bud (GO:0005933)	13	2.56	5.08	7.12E-06	<i>BEM1, BNI4, CAALFM_C406130WA, CAS4, CDC15, CDC55, CHS4, CRL1, EXO84, INT1, KIC1, LTE1, PCL2, RGA2, ROM2, RSP5, SHE3, SPA2, SSD1, SWE1, ZDS1</i>
Cellular bud neck (GO:0005935)	17	4.93	3.45	2.69E-05	<i>BEM1, BNI4, CDC15, CDC55, CHS4, CRL1, EXO84, INT1, PCL2, RGA2, SPA2, SSD1, SWE1, ZDS1</i>

Para clasificar estas proteínas en categorías funcionales, se seleccionaron las 335 proteínas que poseían 2 o más sitios de fosforilación por Cbk1 para su análisis con la herramienta Gene Ontology (GO) (Ashburner *et al.*, 2000). Se analizaron las tres clasificaciones en las que se divide la Ontología, *Molecular Function* (MF), *Biological Process* (BP) y *Cellular Component* (CC) (Figura 18B). Los resultados obtenidos al utilizar la clasificación por su función molecular (*Molecular Function*) mostró la existencia de dos términos que estaban significativamente enriquecidos frente al valor esperado. Estos términos eran *Kinase activity* (GO:0016301), con un enriquecimiento de 3,18 veces (28 genes en la muestra frente a los 8,81 esperados) y *Transcription regulator activity* (GO:0140110) y sus términos hijos *Transcription regulatory region sequence-specific DNA binding* (GO:0000976) y *Sequence-specific double-stranded DNA binding* (GO:1990837), que estaban enriquecidos entre 2,33 y 3,21 veces. El grupo de proteínas con actividad kinasa incluye algunas conocidas como Swe1 (que controla el crecimiento polarizado y morfogénesis), la kinasa de la ruta MEN, Cdc15, el ortólogo de la kinasa Bck1 de la ruta de integridad celular, la kinasa Akl1 que regula endocitosis, la fosfatidil inositol 4-kinasa PikA o la kinasa de la ruta RAM Kic1. Por su parte, entre los factores de transcripción que contienen posibles sitios de fosforilación por Cbk1 se encuentran algunos que ya se conoce que están regulados por esta kinasa, como Ace2 (Wakade *et al.*, 2020), Crz1 (Bharucha *et al.*, 2011) o Bcr1 (Gutiérrez- Escribano *et al.*, 2012). Otros factores de transcripción posiblemente regulados por Cbk1 son Cas5 (implicado en la regulación de la pared celular), Gat1 (necesario para la utilización de fuentes de nitrógeno), Mbp1 (componente del complejo MBF que regula la progresión G1/S), Rim101 (el factor de transcripción de la respuesta a pH alcalino), Srb9 (subunidad del complejo mediador de la ARN polimerasa II) o Wor4, implicado en la transición *White-Opaque*.

En la categoría *Biological Process*, los términos más representados fueron *Regulation of cell cycle* (GO:0051726), *Carbon catabolite regulation of transcription* (GO:0045990), *Cellular response to extracellular stimulus* (GO:0031668) y *Establishment or maintenance of cell polarity* (GO:0007163) (Figura 18B). Finalmente, en cuanto a *Cellular Component*, los únicos términos significativamente enriquecidos fueron *Cellular bud* (GO:0005933) y *Cellular bud neck* (GO:0005935), que incluye proteínas que se localizan en la yema o en el cuello, y tienen un papel importante en el crecimiento polarizado. Este es el caso del factor de intercambio de GDP/GTP Rom2, la GAP de Cdc42 Rga2, las proteínas Cas4 (Tao3) y Kic1 de la ruta RAM, las proteínas Csh4 y Bni4 que regulan la síntesis de quitina, el componente del polarisoma Spa2, la subunidad del exocisto Exo84 o la GTPasa Crl1 (Rho4) (Figura 18B).

Uno de los objetivos del presente trabajo es el estudio de la función de Cbk1 en las etapas tardías del desarrollo hifal, en la fase independiente de Ssd1. Para tratar de identificar los mecanismos de regulación del crecimiento polarizado por esta kinasa, se seleccionaron posibles sustratos que están relacionados con morfogénesis y crecimiento polarizado. Los dos candidatos seleccionados

Figura 18. Posibles sustratos de la kinasa Cbk1 en *C. albicans*. (A). Lista de las proteínas que contienen 4 o más sitios posibles de fosforilación. (B). Clasificación de las proteínas según categorías funcionales. Tabla obtenida a través de la herramienta Gene Ontology (GO) de las proteínas con dos o más sitios consenso de fosforilación por Cbk1. Se muestra la distribución de las proteínas según las clasificaciones *Molecular Function*, *Biological Process* y *Cellular Component*. N: número de genes de una determinada categoría. Esp: valor esperado. Enriq: Enriquecimiento.

Resultados

fueron la GTPasa Crl1/Rho4 (3 sitios de fosforilación) y el componente del exocisto Exo84 (3 sitios de fosforilación), ambos presumiblemente implicados en el proceso de secreción y exocitosis.

Cr1/Rho4 es una proteína de 346 aa que contiene una repetición del motivo *Small GTPase Rho* (IPR003578) típico de la subfamilia de GTPasas similares a Ras (*Ras-like small GTPases*) entre las posiciones 69 y 235. Los tres posibles sitios de fosforilación por Cbk1 se sitúan en una región localizada cerca del extremo C-terminal (entre las posiciones 261 y 294) que carece de estructura secundaria definida (Figura 19). Estas regiones desordenadas son regiones altamente variables que dan flexibilidad a las proteínas y se ha propuesto que pueden actuar como dominios reguladores. De hecho, se ha comprobado que los sitios de fosforilación en las proteínas suelen agruparse en grupos, lo que permite utilizar algoritmos para identificar posibles dianas de kinasas (Moses *et al.*, 2007). Un análisis de fosforilación a escala genómica ha demostrado que más del 90% de los sitios de fosforilación dependientes de CDK en *S. cerevisiae* se localizan en bucles y regiones desordenadas (Holt *et al.*, 2009), y en *C. albicans* también hay una tendencia similar cuando se analizan los sitios de fosforilación de CDK (Vázquez de Aldana y Correa-Bordes, 2012). En Cr1/Rho4, los tres posibles sitios de fosforilación por Cbk1 se localizan juntos dentro de la región desordenada (S274, S278 y S292, Figura 19A), por lo que podrían formar un posible dominio regulador de su actividad o de sus interacciones. Para determinar si estos sitios de fosforilación estaban conservados a lo largo de la

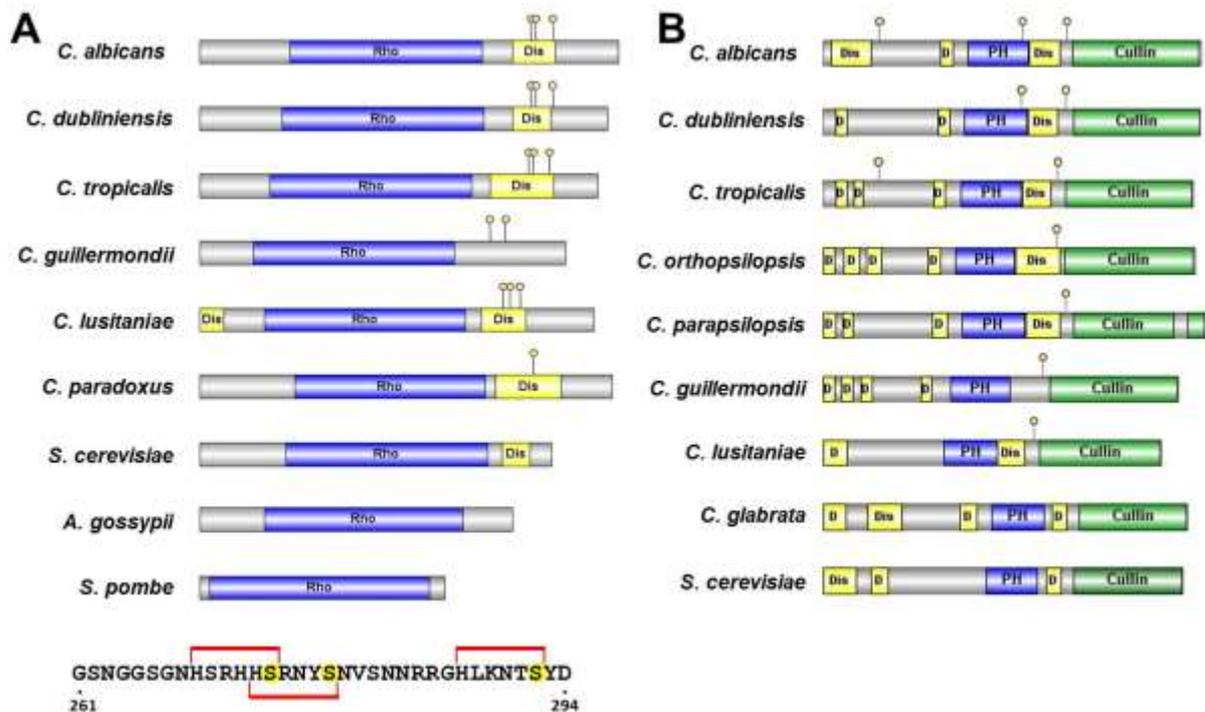


Figura 19. Localización de los sitios consenso de fosforilación por Cbk1 en Rho4 y Exo84. (A). En la GTPasa Rho4, los sitios se encuentran agrupados dentro de una de las regiones desordenadas (Dis) de la proteína (representados como círculos amarillos). En *C. albicans* hay 3 posibles sitios de fosforilación, al igual que en *C. dubliniensis*, *C. tropicalis* y *C. lusitanae*. En la parte inferior se muestra la secuencia de la región que contiene los tres sitios de fosforilación (la serina que se fosforila se indica en amarillo). **(B).** En la subunidad del exocisto Exo84, los posibles sitios de fosforilación se encuentran dispersos por la proteína, y en este caso ninguno forma parte de las regiones desordenadas. En *C. albicans*, Exo84 presenta un dominio *Pleckstrin Homology* (PH), un dominio *Cullin Repeat-like* (Cullin) y tres regiones desordenadas (D o Dis).

evolución, se realizó una búsqueda de ortólogos en otros hongos y levaduras. En la Figura 19A se muestra la estructura de la proteína Rho4 en diversas especies del género *Candida*, en *S. cerevisiae*, *Ashbya gossypii* y *S. pombe*. La región desordenada se encuentra conservada en varias especies de *Candida*, como *C. albicans*, *C. dubliniensis*, *C. tropicalis*, *C. lusitaniae* y *C. paradoxus*, y también existe una de menor tamaño en *S. cerevisiae*. Esta comparación permitió determinar que los posibles sitios de fosforilación por Cbk1 no están presentes en todas las especies analizadas, existiendo tres en las especies más próximas a *C. albicans* y estando ausentes en *S. cerevisiae*. Este hecho podría ser tomado como una indicación de que a lo largo de la evolución la región desordenada ha acumulado sitios de fosforilación, y podría ser una región reguladora de la función de Rho4 específica *C. albicans*.

Por su parte, Exo84 es una proteína de 791 aa que contiene una repetición del dominio *Pleckstrin Homology* (PH, IPR011993) entre las posiciones 304 y 430 y otra del motivo *Exocyst Component Exo84, C-terminal* (IPR032403) o *Cullin Repeat-like* (IPR016159) entre las posiciones 519 y 664 (Figura 19B). Los dominios PH son pequeños dominios globulares presentes en moléculas señalizadoras, en las que actúan como dominios de unión a lípidos. El motivo *Exocyst Component Exo84* corresponde a la región helicoidal C-terminal del componente del exocisto Exo84, que se asemeja a los *Cullin Repeat-like*. En Exo84 también existen tres regiones desordenadas a lo largo de la proteína (16-101; 247-271 y 432-495). En este caso, los tres sitios de fosforilación se sitúan a lo largo de la proteína, en las posiciones S118, T418 y S511. La comparación de las secuencias de Exo84 en diversos hongos y levaduras mostró que *C. albicans* es la única especie que posee tres sitios de fosforilación, *C. dubliniensis* y *C. tropicalis* únicamente dos, el resto de las especies del género *Candida* uno y *S. cerevisiae* ninguno. De nuevo estos resultados parecen indicar que a lo largo de la evolución han ido apareciendo sitios de fosforilación que podrían desempeñar alguna función reguladora durante el ciclo de vida de *C. albicans*.

Capítulo 2. Caracterización de la función de Cbk1 durante el desarrollo hifal en *C. albicans*.

2.1. Introducción y antecedentes.

Como se ha comentado en la Introducción, la kinasa Cbk1 es esencial para el crecimiento polarizado en *C. albicans*, y los mutantes carentes de esta proteína son incapaces de iniciar el desarrollo de hifas en respuesta a las señales extracelulares que inducen este proceso (Song *et al.*, 2008). En *S. cerevisiae*, se ha demostrado que la eliminación del gen *SSD1* suprime la mayoría de los fenotipos del mutante *cbk1Δ* (Jansen *et al.*, 2009). Ssd1 es una proteína de unión a ARNms específicos, cuya actividad y localización son reguladas por Cbk1 para controlar el crecimiento polarizado. Ssd1 se asocia con ARNms que codifican proteínas implicadas en la síntesis de la pared celular, regulando su traducción de forma dependiente de Cbk1 (Jansen *et al.*, 2009; Kurischko *et al.*, 2011).

En *C. albicans*, los mutantes deficientes en Cbk1 son incapaces de formar hifas y son sensibles a agentes que dañan la pared (Song *et al.*, 2008). De forma similar a lo que ocurre en *S. cerevisiae*, muchos de los defectos del mutante *cbk1ΔΔ* son dependientes de la proteína Ssd1, de tal manera que la ausencia de Ssd1 rescata la incapacidad para formar hifas (Lee *et al.*, 2015). Sin embargo, la longitud de las hifas del mutante doble *cbk1ΔΔ ssd1ΔΔ* es más corta que la de la cepa silvestre y su anchura es irregular. Estos resultados sugieren que, durante el desarrollo de las hifas, Cbk1 podría desempeñar una serie de funciones que son dependientes de Ssd1 y otras que son independientes de esta proteína de unión a ARNm.

Trabajos del grupo de investigación del Dr. Jaime Correa (UNEX) han confirmado que Cbk1 desempeña dos funciones diferentes durante el desarrollo hifal de *C. albicans*. En las etapas iniciales de la respuesta a las señales que activan la filamentación, Cbk1 es necesario para inactivar a Ssd1, lo que permite la traducción de los ARNms asociados a esta proteína y la formación del tubo germinativo. En etapas tardías de la filamentación, tras la formación del primer septo, Cbk1 es necesario para el mantenimiento del crecimiento polarizado de la célula apical de forma independiente de Ssd1 (Figura 16) (Rojo-Domínguez, 2018).

Dado que Cbk1 es una kinasa, en el laboratorio del Dr. Jaime Correa se ha construido el mutante *cbk1-KD/cbk1Δ* (*Kinase-Dead*), en el cual el alelo *cbk1-KD* genera una proteína catalíticamente inactiva al sustituir el ácido aspártico del sitio catalítico por prolina (D548P). Esta mutación permite analizar las funciones de Cbk1 que son dependientes de la actividad kinasa, tanto durante el crecimiento levaduriforme como en hifas, ya que la proteína está presente en las células, aunque es incapaz de fosforilar a sus sustratos. Cuando se analizó el fenotipo de la cepa *cbk1-KD/cbk1Δ* se comprobó que era similar al del mutante *cbk1ΔΔ* en levaduras, es decir, las células crecen con un tamaño mayor, son redondeadas y forman grumos. Además, esta cepa también es incapaz de responder a las señales que inducen la filamentación (Rojo-Domínguez, 2018).

De forma similar a lo que ocurre con el mutante *cbk1ΔΔ*, la cepa *cbk1-KD/cbk1Δ* es capaz de filamentar en un fondo *ssd1ΔΔ*, aunque el tubo germinativo se ensancha tras la formación del primer

Resultados

septo y las hifas son más cortas que en la cepa silvestre. Este hecho indica que su actividad kinasa es necesaria para el mantenimiento del crecimiento polarizado, y quizás necesaria para la fusión de vesículas secretoras, portadoras de nuevos materiales, al ápice de la hifa (Rojo-Domínguez, 2018).

2.2. Determinación de la tasa de crecimiento polarizado en las distintas etapas de la filamentación de *C. albicans*.

Para caracterizar con más detalle la función de Cbk1 en las etapas iniciales y tardías de la filamentación de *C. albicans*, se utilizó la cepa *cbk1-KD/cbk1Δ ssd1ΔΔ* para medir la tasa de crecimiento tras la inducción de la filamentación mediante experimentos de microscopía a lo largo del tiempo (*time-lapse*). Como control, se utilizó la cepa *CBK1/cbk1Δ ssd1ΔΔ*. Células de ambas cepas se incubaron en condiciones de filamentación (YEPD con suero 10% a 37°C) durante 20 minutos, tiempo suficiente para permitir la formación de un tubo germinativo incipiente y poder realizar la medida de la tasa de crecimiento desde las fases iniciales del proceso. Tras este tiempo, las células se fijaron al fondo de cámaras *Ibidi* y se incubaron en el microscopio en condiciones que permiten el crecimiento hifal para realizar experimentos de microscopía a lo largo del tiempo (*time-lapse*). Se tomaron

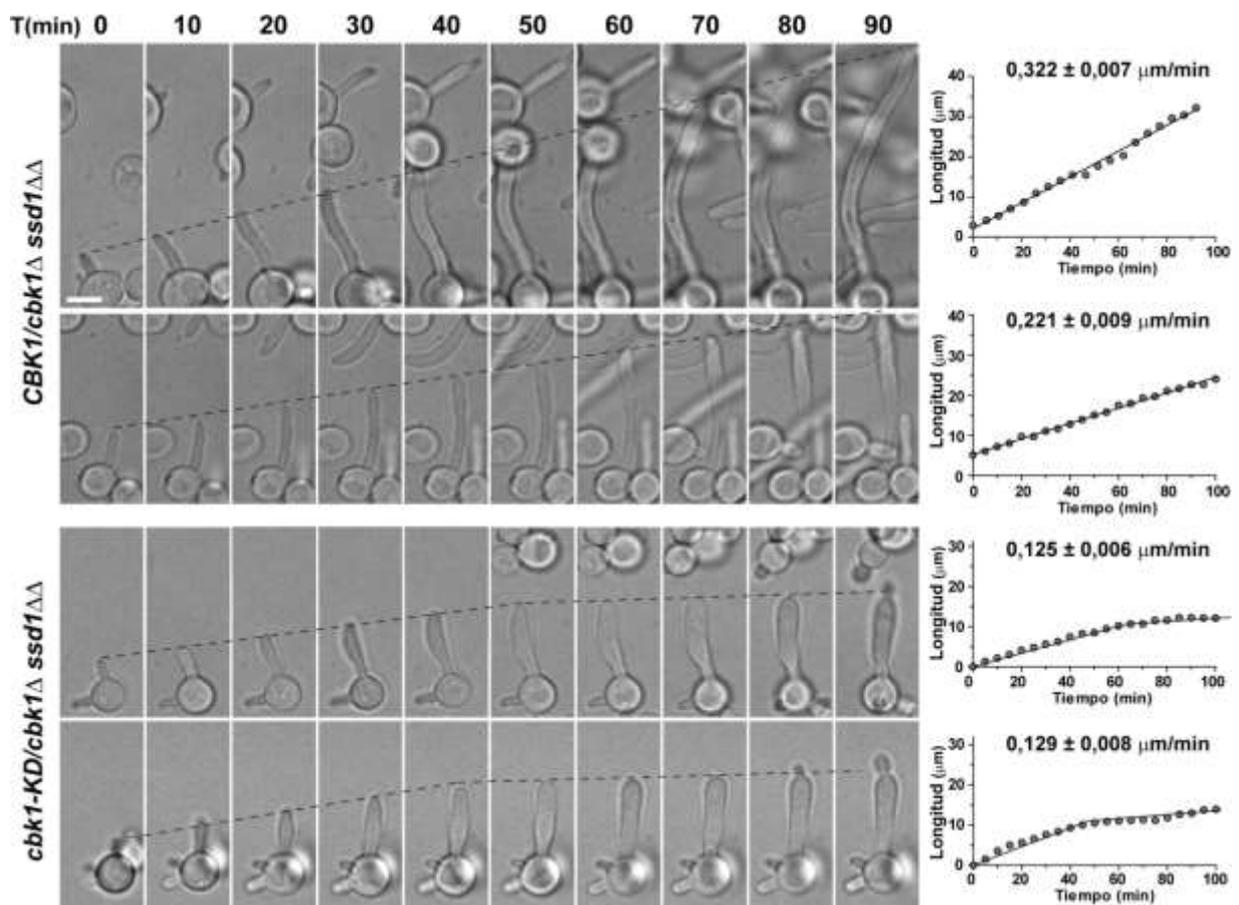


Figura 20. Cbk1 contribuye de manera diferente al crecimiento de las hifas en las distintas etapas de la filamentación. Análisis por microscopía de contraste interferencial (DIC) en hifas de las cepas silvestre (*CBK1/cbk1Δ*) y *cbk1-KD/cbk1Δ* en fondo genético *ssd1ΔΔ*. La línea discontinua marca el ápice de la hifa en cada imagen. En los gráficos de la derecha se muestra la longitud de la hifa a lo largo del tiempo en ambas cepas. Se muestra también la tasa de crecimiento de cada uno de los ejemplos. Barra de escala: 5 μm . *CBK1/cbk1Δ ssd1ΔΔ* (JC1794), *cbk1-KD/cbk1Δ ssd1ΔΔ* (JC1795).

imágenes de campo claro cada 5 minutos, durante 100 minutos, después de fijarlas en la cámara (2 horas de crecimiento total).

Una vez adquiridas las imágenes, se midió la longitud de las hifas en cada uno de los tiempos y se representó esta medida a lo largo del tiempo para calcular la tasa de crecimiento. Como se observa en la Figura 20, las hifas de la cepa control (*CBK1/cbk1Δ ssd1ΔΔ*) crecen de manera continua a lo largo del tiempo, y la tasa media de crecimiento se estimó en $0,320 \pm 0,007 \mu\text{m}/\text{min}$ ($n=7$). Por el contrario, las hifas de *cbk1-KD/cbk1Δ ssd1ΔΔ*, tras una etapa inicial de crecimiento similar a la de las hifas control, dejan de crecer y su tamaño se estabiliza entre los 40 y 50 minutos. La tasa media de crecimiento total de estas hifas es de aproximadamente la mitad de la cepa control, unos $0,174 \pm 0,027 \mu\text{m}/\text{min}$ ($n=9$), aunque claramente parecen existir dos fases de crecimiento bien diferenciadas.

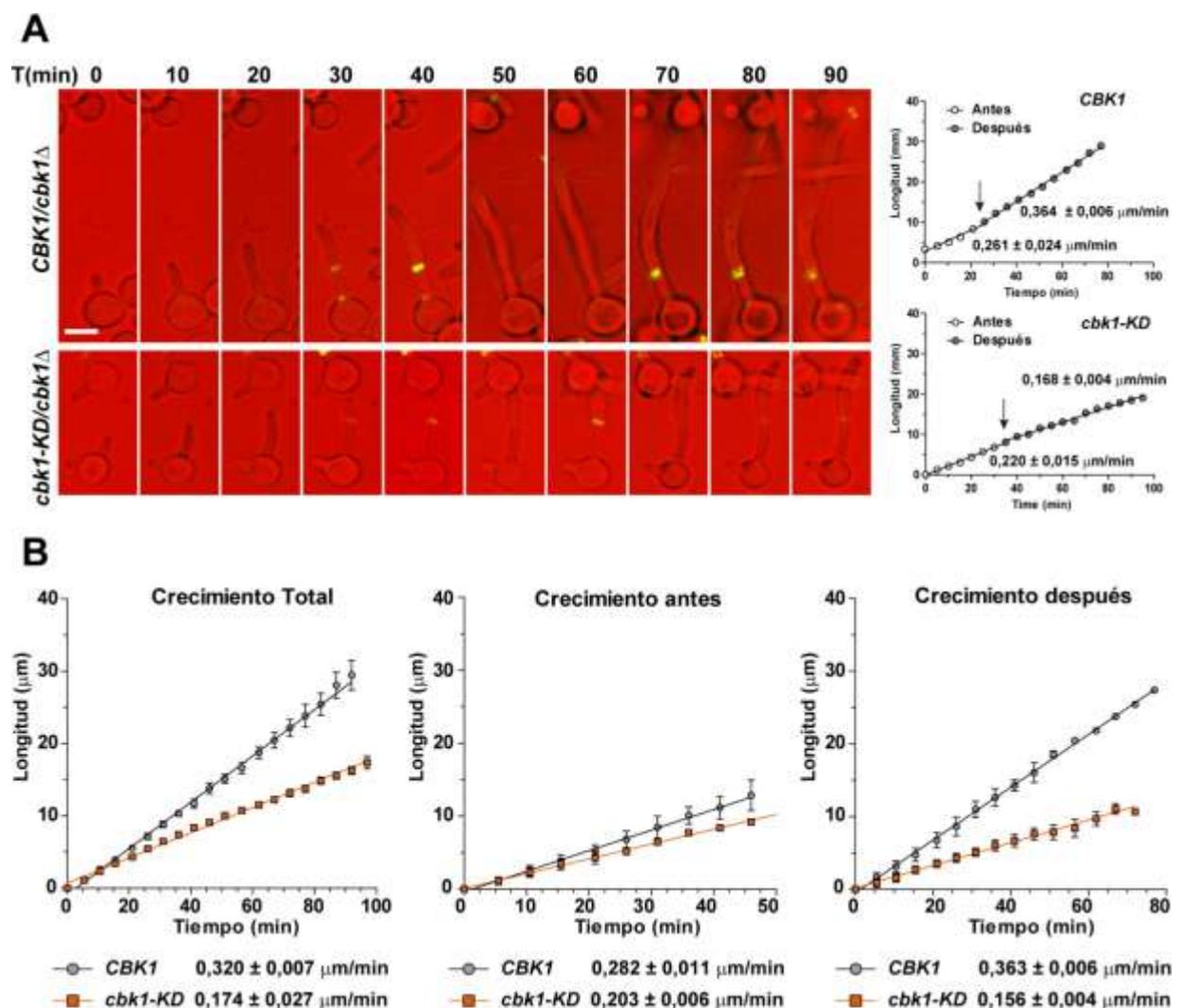


Figura 21. El crecimiento de las hifas del mutante *cbk1-KD* se reduce tras la formación del anillo de septinas. (A). Análisis de microscopía a lo largo del tiempo (*time-lapse*) del crecimiento de las hifas de las cepas las cepas *CBK1/cbk1Δ ssd1ΔΔ CDC10-GFP/CDC10* (OL2987) y *cbk1-KD/cbk1Δ ssd1ΔΔ CDC10-GFP/CDC10* (OL2989). Se capturaron imágenes de contraste interferencial y fluorescencia de Cdc10-GFP cada 5 minutos. Las imágenes muestran la mezcla del canal DIC (en rojo) y de la proyección máxima de 3 planos distintos adquiridos cada $0,5 \mu\text{m}$ de la fluorescencia de Cdc10-GFP (verde). Barra de escala: $5 \mu\text{m}$. **(B).** Representación gráfica del crecimiento total y del crecimiento antes y después de la formación del anillo de septinas en las cepas *CBK1/cbk1Δ ssd1ΔΔ CDC10-GFP/CDC10* (gris) y *cbk1-KD/cbk1Δ ssd1ΔΔ CDC10-GFP/CDC10* (rojo). Se indica la media de la tasa de crecimiento en cada cepa \pm SEM ($n=7$ para *CBK1/cbk1Δ* y $n=9$ para *cbk1-KD/cbk1Δ*).

Resultados

Para analizar con más detalle el momento en el que se producía la disminución de la tasa de crecimiento en las hifas de la cepa *cbk1-KD/cbk1Δ ssd1ΔΔ*, se marcó la septina Cdc10 con la proteína fluorescente verde (GFP) en el extremo carboxilo en ambas cepas, para tener un marcador temporal del desarrollo de las hifas. Se repitieron los experimentos de microscopía a lo largo del tiempo en las mismas condiciones con estas dos nuevas cepas, capturando imágenes de campo claro y de la fluorescencia verde cada cinco minutos. Una vez capturadas las imágenes, se midió de nuevo la longitud de cada hifa en cada tiempo, anotando también en cada caso el tiempo en el que las septinas se reorganizaban y pasaban de la estructura apical (*cap*) al anillo. De esta forma, podíamos determinar la tasa de crecimiento de las hifas antes y después del ensamblaje del anillo de septinas. En la Figura 21A se muestra un ejemplo representativo del crecimiento de ambas cepas. Como puede observarse, la tasa de crecimiento de las hifas en la cepa control *CBK1/cbk1Δ ssd1ΔΔ* es ligeramente superior después de la formación del anillo (indicado por la flecha en la gráfica de la derecha) que antes del ensamblaje de esta estructura. Por el contrario, en la cepa *cbk1-KD/cbk1Δ ssd1ΔΔ*, el crecimiento antes de la formación del anillo es ligeramente inferior al de la cepa control, aunque a partir de este momento la diferencia es mucho más significativa.

En la Figura 21B se representan los valores obtenidos al analizar un conjunto de hifas de cada cepa y la media en cada caso (línea), tanto del crecimiento total como de las tasas de crecimiento antes y después de la formación del anillo de septinas. Para uniformizar la representación, en todos los casos se ha restado el valor de la longitud de la hifa a tiempo 0, de tal manera que el valor inicial siempre es 0 μm . La tasa de crecimiento total de la cepa carente de actividad catalítica es aproximadamente la mitad de la observada en la cepa control ($0,174 \pm 0,027 \mu\text{m}/\text{min}$, $n=9$ frente a $0,320 \pm 0,007 \mu\text{m}/\text{min}$, $n=7$, respectivamente). Cuando se analizó por separado el crecimiento de las dos fases, pudimos comprobar que antes de la formación del anillo la tasa de crecimiento es bastante parecida en ambas cepas ($0,282 \pm 0,011 \mu\text{m}/\text{min}$ para el control y $0,203 \pm 0,006 \mu\text{m}/\text{min}$ en el mutante *cbk1-KD*). Sin embargo, la diferencia de crecimiento después de la formación del anillo es estadísticamente significativa ($p=0,0035$, *unpaired t-test*) y es casi el doble en la cepa control que en el mutante inactivo ($0,363 \pm 0,006 \mu\text{m}/\text{min}$ frente a $0,156 \pm 0,004 \mu\text{m}/\text{min}$).

Además, las hifas del mutante inactivo comenzaban a ensancharse y perder el patrón de crecimiento altamente polarizado característico de las hifas a partir del momento de la formación del anillo de septinas. Estos resultados confirman las observaciones iniciales de que Cbk1 desempeña dos funciones diferentes durante el crecimiento hifal. En las etapas iniciales de la filamentación, Cbk1 es esencial para inactivar a Ssd1, permitiendo la formación de los tubos germinativos. Además, la actividad kinasa de Cbk1 también es esencial para mantener el crecimiento polarizado focalizado en el ápice de la hifa tras el ensamblaje del anillo de septinas, y esta función es independiente de Ssd1.

2.3. Importancia de Cbk1 en el mantenimiento del crecimiento polarizado de la hifa.

Con el fin de profundizar más en el estudio del papel de Cbk1 en el mantenimiento del crecimiento hifal, en el laboratorio del Dr. Jaime Correa también se construyó el mutante *cbk1-as/ckb1Δ* (*analogue-sensitive*), sensible al análogo de ATP, 1NM-PP1 (Rojo-Domínguez, 2018). Como en otros mutantes *analogue-sensitive* previamente descritos (Blethrow *et al.*, 2004; Gegan *et*

al., 2007), se modificó la metionina 412 del bolsillo de unión a ATP sustituyéndola por alanina (M412A) en una cepa *CBK1/cbk1Δ*. La cepa resultante se comporta como una cepa silvestre en ausencia del análogo y como el mutante *cbk1ΔΔ* en presencia del análogo. El uso de este mutante condicional de Cbk1 permite prescindir de la delección de *SSD1* en los experimentos de filamentación y analizar la función de la kinasa Cbk1 durante el crecimiento polarizado de las hifas, al poder inactivar su actividad catalítica en diferentes momentos tras la inducción del crecimiento hifal.

Para realizar una caracterización más detallada del efecto de la inhibición de Cbk1 durante la filamentación, se estableció una colaboración con el laboratorio del Dr. Jaime Correa para analizar la tasa de crecimiento de las hifas de la cepa *cbk1-as/cbk1Δ*. Para ello, se incubó el mutante en medio YEPD con suero 10% a 37°C durante 2 horas en matraces para inducir la filamentación. Transcurrido este tiempo, las hifas se fijaron en dos cámaras *ibidi* independientes, añadiendo el análogo a una de ellas y solvente a otra para usarla como control de crecimiento. Se siguió el crecimiento de las hifas en ambas condiciones mediante experimentos de microscopía a lo largo del tiempo (*time-lapse*), adquiriendo imágenes cada 5 minutos, siendo el tiempo 0 el momento en el que se añadieron el

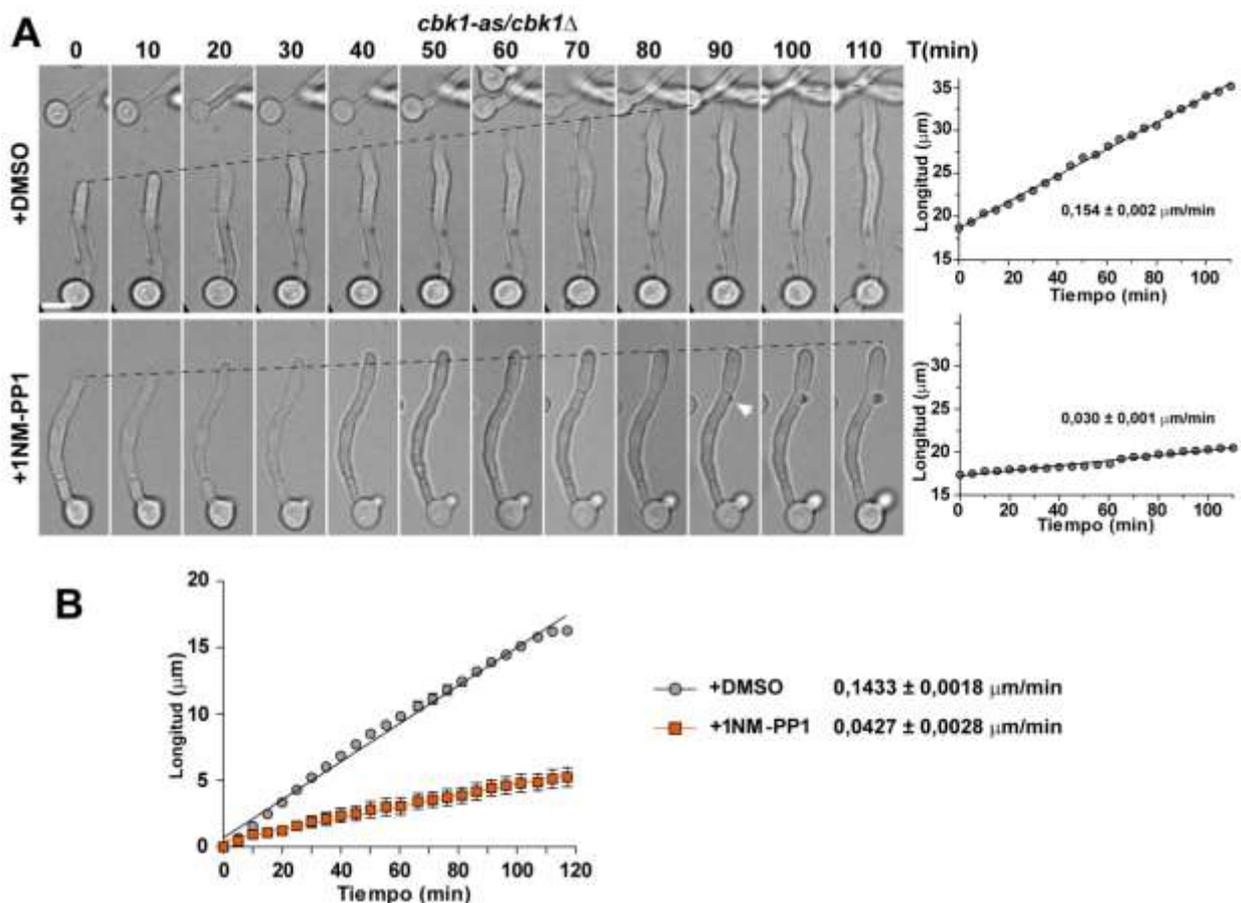


Figura 22. La actividad kinasa de Cbk1 es esencial para el mantenimiento del crecimiento polarizado en hifas. (A). Análisis por microscopía a lo largo del tiempo (*time-lapse*) del crecimiento de las hifas de la cepa *cbk1-as/cbk1Δ* (JC2247) en presencia de DMSO (arriba) o de 1NM-PP1 (abajo). Las imágenes de contraste interferencial (DIC) fueron capturadas cada 5 minutos para determinar la longitud de cada hifa. A la derecha se muestra una representación de la longitud frente al tiempo transcurrido con la tasa de crecimiento de cada hifa. **(B).** Media de la longitud del tubo germinativo en presencia de DMSO o del análogo de ATP (1NM-PP1). Se representa la media \pm SEM en cada caso (n=7 para DMSO y n=6 para 1NM-PP1).

Resultados

análogo y el DMSO. En la Figura 22A se muestra un ejemplo del crecimiento de la cepa *cbk1-as/ckb1Δ* en cada una de las condiciones y en las gráficas de la derecha se representa la longitud total de la hifa en cada tiempo. Como puede observarse, la adición de DMSO no afecta al crecimiento de la hifa, ya que mantiene un crecimiento lineal a lo largo del tiempo, llegando a alcanzar una longitud final de unas 35 μm en el minuto 110, lo que supone una tasa de crecimiento de $0,154 \pm 0,002 \mu\text{m}/\text{min}$. Por el contrario, la adición de 1NM-PP1 resulta en una detención casi inmediata del crecimiento, llegando únicamente a los 20 μm de longitud en el último tiempo (tasa de crecimiento de $0,030 \pm 0,001 \mu\text{m}/\text{min}$). Además, en los tiempos finales del experimento comienza a formarse una yema lateral en el compartimento subapical (Figura 22A, flecha blanca).

En el gráfico de la Figura 22B se representan la media de tasa de crecimiento de varias hifas en cada condición ($n=7$ para DMSO y $n=6$ para 1NM-PP1). De nuevo, para la representación se ha restado el valor inicial de la longitud de cada hifa, y como puede observarse, la diferencia entre ambas condiciones es altamente significativa ($p < 0,0001$; *unpaired t-test*), más de tres veces superior en presencia del análogo que tras la inhibición de la actividad kinasa de Cbk1 ($0,1433 \pm 0,0018$ frente a $0,0427 \pm 0,0028$, respectivamente). Cabe destacar también que el crecimiento de la cepa *cbk1-as/ckb1Δ* en presencia de DMSO es aproximadamente la mitad que el determinado para la cepa *CBK1/ckb1Δ* (Figura 21B) ($0,1433 \pm 0,0018$ frente a $0,320 \pm 0,007$, respectivamente), lo que sugiere que la actividad catalítica del mutante sensible al análogo es menor que la de la proteína silvestre aun en ausencia del inhibidor. Todos estos resultados indican que la actividad kinasa de Cbk1 es esencial para el mantenimiento del crecimiento polarizado en las etapas tardías de la filamentación.

2.4. Estudio del efecto de la inhibición de la actividad de Cbk1 en proteínas implicadas en polaridad y crecimiento en *C. albicans*.

Los resultados anteriores muestran que la actividad kinasa de Cbk1 es esencial para mantener un crecimiento polarizado en el ápice de la hifa ya que, tras su inhibición las hifas reducen significativamente el crecimiento y se produce un engrosamiento de las paredes laterales. Esto sugiere que la actividad kinasa es necesaria para mantener a la maquinaria implicada en el crecimiento polarizado altamente focalizada en el ápice de las hifas, una característica típica del crecimiento filamentoso que no ocurre en levaduras. Durante la formación de las hifas en *C. albicans*, el crecimiento está restringido a una pequeña región para formar un tubo germinativo que resulta en un filamento alargado. La actina y una serie de proteínas de polaridad implicadas en la regulación del citoesqueleto, como Spa2 y Cdc42, están presentes en el sitio de formación del nuevo tubo germinativo y en el ápice de la hifa (Arkowitz y Bassilana, 2019; Sudbery, 2011). En el ápice de la hifa en crecimiento se observa una liberación constante de vesículas exocíticas que llegan a través de los cables de actina y mantienen el suministro de material necesario para la expansión de la pared celular (Desai, 2018). Además, asociadas a la membrana plasmática, se encuentran unas estructuras denominadas “parches corticales de actina”, que corresponden a sitios de endocitosis dependientes de actina y también son esenciales para el crecimiento polarizado (Goode *et al.*, 2015).

Como se comentó en el Capítulo 1, algunas de estas proteínas contienen posibles sitios de fosforilación por Cbk1, por lo que su localización podría estar regulada por esta kinasa, como ocurre

con Cdc42 (1 sitio), el componente del polarisoma Spa2 (4 sitios) o la subunidad del exocisto Exo84 (3 sitios). Por ello, se decidió analizar los efectos de la inhibición de Cbk1 en la localización de algunas de estas proteínas importantes para el crecimiento polarizado.

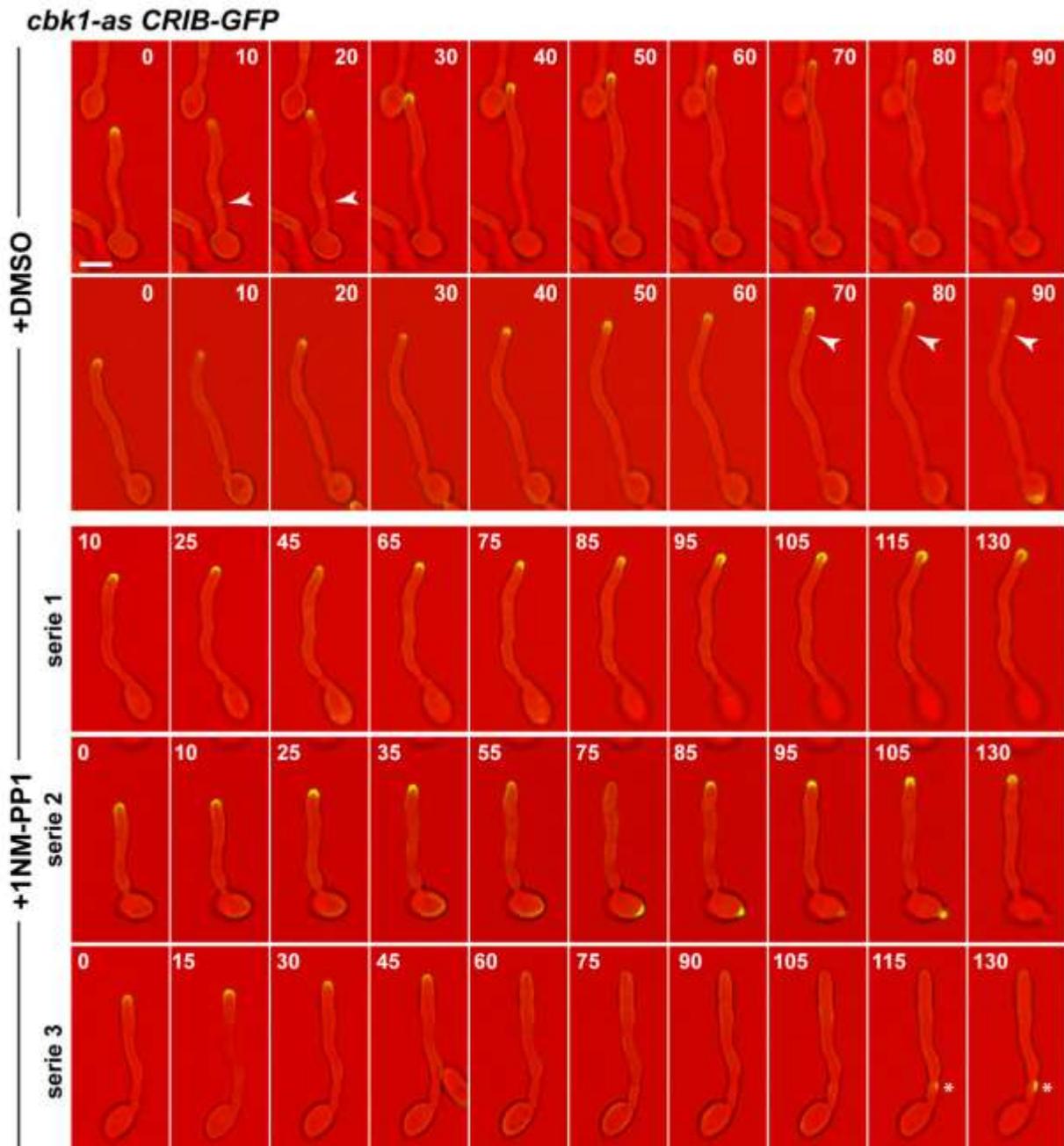


Figura 23. Localización de Cdc42 activo en hifas del mutante *cbk1-as*. Análisis por microscopía a lo largo del tiempo de la localización de Cdc42 activo en hifas de la cepa *cbk1-as/cbk1Δ pACT1-CRIB-GFP@RP10* (OL3111) incubadas en presencia de DMSO (paneles superiores) o de 1NM-PP1 (paneles inferiores). Las imágenes muestran la mezcla del canal de contraste interferencial (DIC, rojo) y de la fluorescencia de CRIB-GFP (verde) a los tiempos indicados tras la adición de los distintos compuestos. Las imágenes de fluorescencia son la proyección máxima de 3 planos adquiridos cada 0,5 μ m. Las puntas de flecha blancas indican la localización de Cdc42 activo en el septo. Los asteriscos indican la localización de Cdc42 activo en el compartimento subapical. Barra de escala: 5 μ m.

Resultados

2.4.1. La actividad kinasa de Cbk1 contribuye a la polarización de Cdc42 activo en el ápice de las hifas.

Cdc42 es una Rho GTPasa fundamental para el establecimiento y mantenimiento del crecimiento polarizado de hifas en *C. albicans* (Bassilana *et al.*, 2005; Ushinsky *et al.*, 2002; VandenBerg *et al.*, 2004) y además, durante el crecimiento del filamento, Cdc42 activo (unido a GTP) permanece estrechamente restringido a la punta de la hifa (Corvest *et al.*, 2013). Así mismo, Cdc42 posee un posible sitio de fosforilación por Cbk1 en el inserto Rho de la proteína. Por ello, se procedió a analizar si la actividad de Cbk1 era importante para regular la asociación de Cdc42 con el ápice de las hifas. La localización de Cdc42 activo se estudió usando una fusión de la GFP a una proteína que contiene el dominio CRIB (*Cdc42 Rac Interactive Binding*) de la proteína Gic2 de *S. cerevisiae* (Brown *et al.*, 1997). Este dominio ha sido adaptado para la traducción apropiada en *C. albicans* mutando los cuatro codones GTG que contiene y clonado bajo el control del promotor *ACT1* en el plásmido pExpArg-pACT1-CRIB-GFP (Corvest *et al.*, 2013).

El plásmido pExpArg-pACT1-CRIB-GFP se linealizó mediante digestión con la enzima *StuI* y se usó para integrar la construcción en el locus *RP10* de la cepa *cbk1-as/cbk1Δ*. Una vez confirmada la correcta integración, se analizó la localización de Cdc42 activo durante la filamentación. Para ello, se procedió como se ha descrito anteriormente, induciendo la filamentación de la cepa en matraces durante 2 horas, momento en el que las hifas se fijaban en cámaras *Ibidi* y se añadía 2% DMSO o 25 μ M 1NM-PP1 para realizar experimentos de *time-lapse* (Figura 23, paneles superiores).

Como se ha descrito previamente, Cdc42 activo se localizaba en el ápice de la hifa y se mantenía polarizado durante todo el desarrollo de la hifa (Corvest *et al.*, 2013) cuando se añadía DMSO. Además, también era posible observar la presencia de Cdc42 activo transitoriamente en la zona del septo durante la septación (Figura 23, flechas blancas).

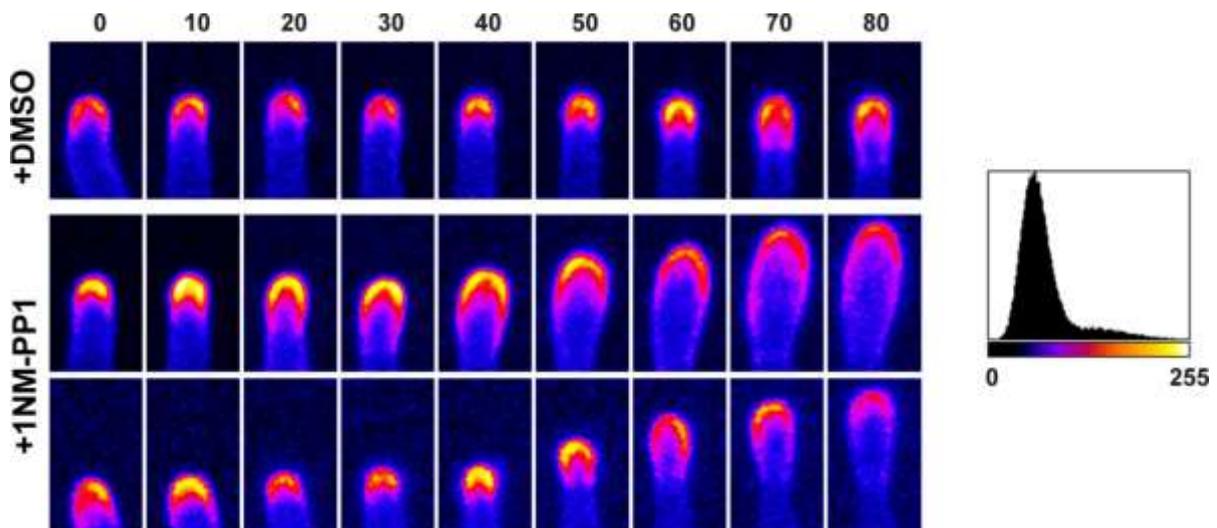


Figura 24. Localización de Cdc42 activo en hifas del mutante *cbk1-as*. Detalle de la localización de Cdc42 activo en los ápices de las hifas de la cepa *cbk1-as/cbk1Δ pACT1-CRIB-GFP@RP10* (OL3111) incubadas en presencia de DMSO (arriba) o de 1NM-PP1 (abajo). Las imágenes se han coloreado en falso usando la tabla LUT Fire de ImageJ, según indica la escala de la derecha.

Cuando se incubaban las células en presencia del inhibidor de la actividad kinasa, se producía una rápida detención del crecimiento, como se ha descrito en el apartado anterior. Sin embargo, en ninguna de las hifas analizadas se observó una despolarización inmediata de Cdc42 activo del ápice de la hifa, como cabría esperar al detenerse el crecimiento (Figura 23, paneles inferiores). Se observaron diferentes comportamientos en la localización de Cdc42 activo, que se muestran en la Figura 23. En algunas hifas (serie 1) Cdc42 activo se mantenía polarizado en el ápice durante 75-85 minutos, a pesar de que la hifa apenas aumentaba su longitud. A partir de ese momento, se producía una reactivación del crecimiento, aunque con un patrón diferente al típico de hifas, pues la punta de la hifa comenzaba a ensancharse (entre 95 y 130 minutos) con un patrón similar al del crecimiento levaduriforme. En otras hifas (serie 2), era posible observar una despolarización de la localización de Cdc42-GTP transcurridos unos 55 minutos de incubación con el análogo, que pasaba a localizarse asociado a las paredes laterales de la hifa (serie 2, minuto 75), para posteriormente volver a localizarse en el ápice y comenzar a formar una yema apical. Finalmente, en otros casos (serie 3) se producía la despolarización de Cdc42-GTP entre los 45 y 60 minutos, momento a partir del cual se observaba tenuemente asociado a las paredes laterales de la hifa. En algunos casos, como el mostrado en este ejemplo, la repolarización de Cdc42-GTP ocurría en el compartimento subapical para dar lugar a una yema lateral (serie 3, asterisco). En la Figura 24 se muestra un detalle de los ápices de las hifas tratadas con DMSO o análogo a lo largo del tiempo, coloreadas en falso usando la tabla LUT (*Look Up Table*) Fire de ImageJ. Puede observarse que en los ápices de las hifas control la fluorescencia se mantiene concentrada en el ápice a lo largo del tiempo, mientras que tras la inhibición de la actividad kinasa Cdc42 activo comienza a extenderse por los laterales de las hifas, lo que finalmente conduce a su engrosamiento.

Estos resultados indican que la detención del crecimiento que ocurre tras la inhibición de la actividad kinasa de Cbk1 no es debida a la rápida disociación de Cdc42 activo del punto de la membrana por donde está creciendo la hifa.

2.4.2 Cbk1 contribuye al mantenimiento de la polarización de los parches de actina en el ápice de las hifas.

El crecimiento de células polarizadas es importante en todos los aspectos del desarrollo celular, tanto en organismos unicelulares como multicelulares. Dicho crecimiento requiere la selección de un sitio específico, seguido de la reordenación del citoesqueleto de actina en dicho sitio (Hazan *et al.*, 2002).

Con el fin de estudiar cómo afecta la inhibición de la actividad de Cbk1 a la dinámica de los parches corticales de actina, que son los sitios en los que se produce la endocitosis, se utilizó la proteína Abp1 (*Actin-Binding Protein 1*) como marcador. Abp1 es un activador del complejo Arp2/3 y se localiza asociado a los parches de actina en las etapas finales de su formación en *S. cerevisiae* (Kaksonen y Roux, 2018; Kaksonen *et al.*, 2003). El homólogo en *C. albicans* ha sido identificado y también se localiza asociado a los parches de actina, concentrándose en las puntas de las hifas en forma de parches con un posible papel en endocitosis, aunque no se asocia a los cables de actina por los que viajan las vesículas de secreción (Martin *et al.*, 2007).

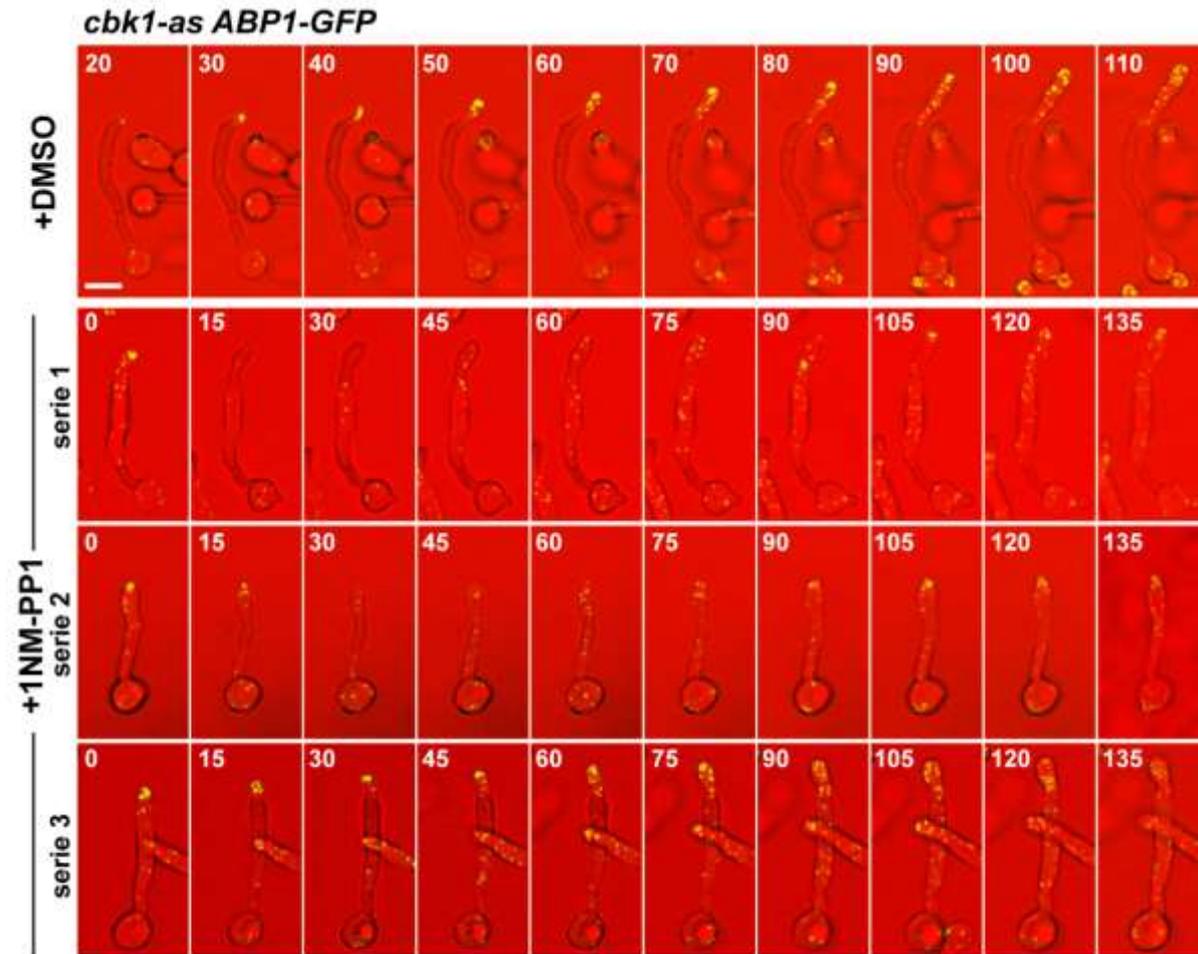


Figura 25. Localización de los parches de actina en hifas del mutante *cbk1-as*. Análisis por microscopía a lo largo del tiempo (*time-lapse*) de la localización de Abp1-GFP en hifas de la cepa *cbk1-as/cbk1Δ ABP1-GFP/ABP1* (OL3170) incubadas en presencia de DMSO (panel superior) o de 1NM-PP1 (paneles inferiores). Las imágenes muestran la mezcla del canal de contraste interferencial (DIC, rojo) y de la fluorescencia de Abp1-GFP (verde) a los tiempos indicados tras la adición de los distintos compuestos. Las imágenes de fluorescencia son la proyección máxima de 5 planos adquiridos cada 0,5 μm . Barra de escala: 5 μm .

Por tanto, se marcó *ABP1* con *GFP* en el extremo C-terminal en la cepa *cbk1-as/cbk1Δ* y se realizaron experimentos de microscopía a lo largo del tiempo similares a los descritos en el apartado anterior (inducción de la filamentación durante 2 horas en matraces y fijación en cámaras *Ibidi* antes de añadir DMSO o 1NM-PP1). Los resultados se muestran en la Figura 25. Cuando la proteína *cbk1-as* estaba activa (presencia de DMSO), Abp1 mostraba una localización cortical en forma de parches en sitios de crecimiento polarizado en la punta de la hifa, que se asemejaba a la tinción del citoesqueleto de actina cortical, como se ha descrito anteriormente (Martin *et al.*, 2007). Esta marcada polarización se mantenía a lo largo de todo el experimento, aunque en los tiempos finales parecía ocurrir una ligera despolarización hacia zonas subapicales de las hifas (quizás debido al largo tiempo transcurrido desde el inicio del experimento).

Cuando se inhibía la actividad kinasa de *cbk1-as* con el análogo 1NM-PP1, en la mayoría de los casos observados se producía una desaparición de los parches de actina en los primeros 15-30 minutos del tratamiento (Figura 25, series 1 y 2). Los parches donde se localiza Abp1 no solo se despolarizaban, sino que también parecía que se reducía su número, llegando casi a desaparecer

completamente como se aprecia en la serie 1 (15-30 minutos) y en la serie 2 (30-45 minutos). Aunque no se ha cuantificado el número de parches presentes en ambas condiciones ni se han realizado análisis estadísticos, esta situación ocurre en un porcentaje significativo de las hifas. Sin embargo, no es posible saber si únicamente se produce la separación de Abp1-GFP de los parches de actina o si éstos últimos también desaparecen tras la inhibición de la actividad de Cbk1. En cualquiera de los dos casos, la ausencia de parches de Abp1 se mantenía por un tiempo variable y poco a poco su número iba aumentando progresivamente, aunque se localizaban dispersos por toda la longitud de la hifa. En tiempos más tardíos (105 minutos en la serie 1 y 90-105 minutos en la serie 2) volvían a acumularse de nuevo en el ápice de la hifa, lo que coincidía con la reactivación del crecimiento, pero en lugar de continuar con el crecimiento altamente polarizado de las hifas se distribuían para formar una yema apical. La serie 3 es un ejemplo de lo que ocurre en una minoría de hifas, en las que los parches de Abp1 (o de actina) no se despolarizaban y se mantenían en el ápice, aunque cesaba el crecimiento. Como ocurre en los casos anteriores, en tiempos más tardíos (90-105 minutos), se dispersaban ligeramente por el córtex apical y se reactivaba el crecimiento en forma de yema apical.

Estos resultados indican que Cbk1 parece ser esencial para el mantenimiento de los parches de actina polarizados en el ápice de la hifa, y en ausencia de su actividad kinasa se produce una rápida disociación de los mismos. Cuando vuelven a ensamblarse más tarde en el ciclo celular, los nuevos parches parecen poseer las características típicas del crecimiento levaduriforme.

2.4.3. Cbk1 es esencial para el mantenimiento del polarisoma en el ápice de las hifas.

Durante el crecimiento polarizado, las GTPasas de la familia Rho desempeñan un papel clave en la determinación del punto de crecimiento (Chiou *et al.*, 2017; Martin, 2015; Pérez y Rincón, 2010). Cdc42 recluta al sitio de crecimiento a un complejo de proteínas de polaridad llamado polarisoma. El polarisoma es un complejo proteico que fue identificado por primera vez en *S. cerevisiae* como un complejo compuesto por Spa2, Pea2, Bud6, Bni1 (Sheu *et al.*, 1998) y desempeña un papel esencial en el crecimiento polarizado al ser el responsable del ensamblaje de los cables de actina. Spa2 actúa como andamio para la formación del complejo mientras que Bni1 es la formina que nuclea el ensamblaje de los cables de actina (Evangelista *et al.*, 2003; Pruyne *et al.*, 2002; Tcheperegine *et al.*, 2005).

Los homólogos de las proteínas del polarisoma en *C. albicans*, como Bni1 y Spa2, se localizan en la punta de las hifas y son esenciales para su formación (Crampin *et al.*, 2005; Jones y Sudbery, 2010; Li *et al.*, 2005). Se ha demostrado que Spa2 es un sustrato de la kinasa Cdc28 y esta fosforilación es esencial para su correcta localización en las zonas de crecimiento tanto en levaduras como en hifas (Wang *et al.*, 2016). Además, el complejo Cbk1-Mob2 también es necesario para la correcta localización de Spa2 en levaduras y en el ápice de las hifas (Gutiérrez-Escribano *et al.*, 2011).

Por todo ello, se decidió analizar la localización de Spa2 en las hifas de *C. albicans* tras la inhibición de la actividad kinasa de la proteína cbk1-as. Como en los casos anteriores, se marcó la proteína con GFP en el extremo C-terminal de la cepa *cbk1-as/cbk1Δ* y se realizaron experimentos de *time-lapse*. En la Figura 26 se observa que en el control al que se le añadió únicamente DMSO, Spa2-GFP permanecía en el ápice de la hifa durante todo el crecimiento filamentoso de manera

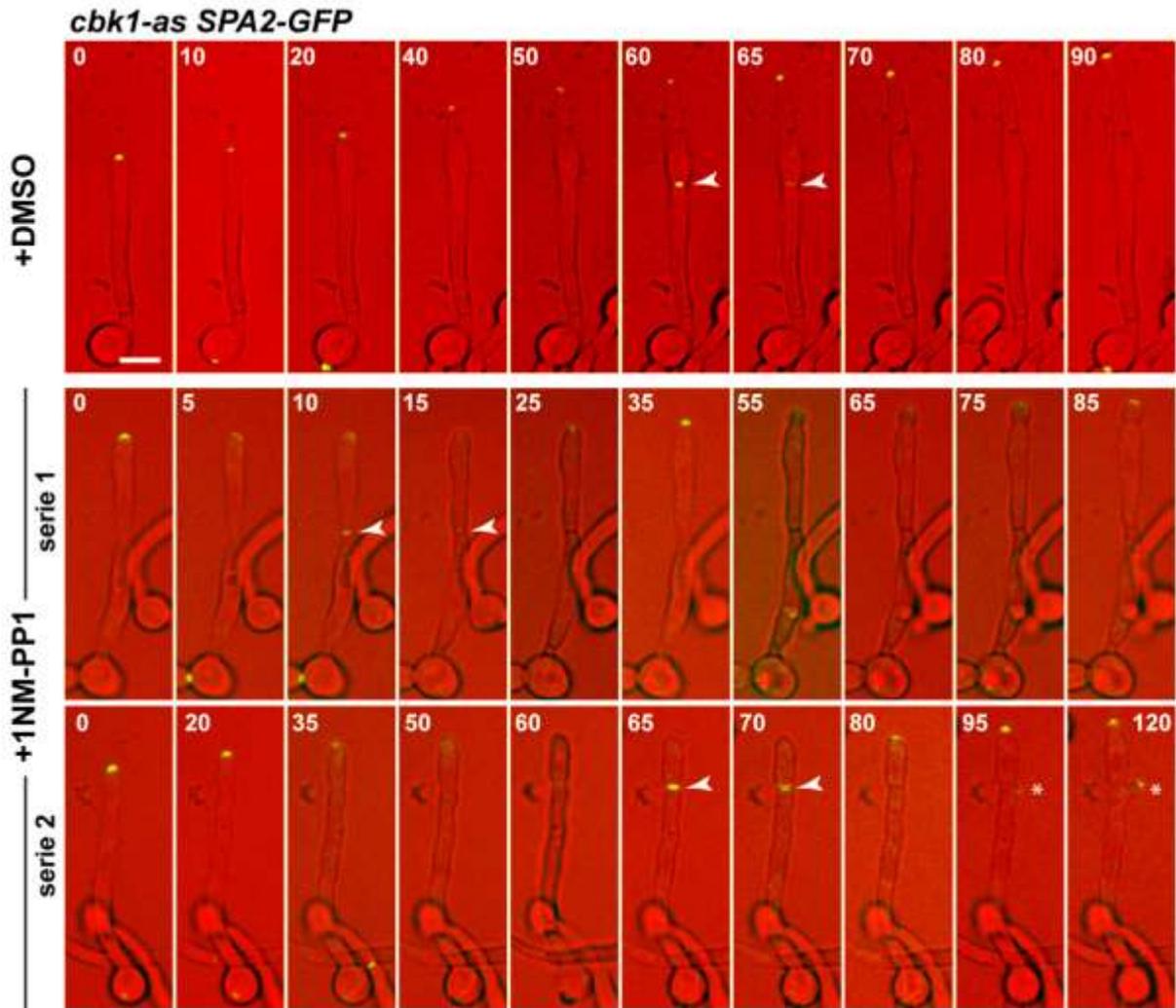


Figura 26. Localización del polarisoma en las hifas del mutante *cbk1-as*. Análisis por microscopía a lo largo del tiempo de la localización de Spa2-GFP en hifas de la cepa *cbk1-as/cbk1Δ SPA2-GFP/SPA2* (JC2284) incubadas en presencia de DMSO (panel superior) o de 1NM-PP1 (paneles inferiores). Las imágenes muestran la mezcla del canal de contraste interferencial (DIC, rojo) y de la fluorescencia de Spa2-GFP (verde) a los tiempos indicados tras la adición de los distintos compuestos. Las imágenes de fluorescencia son la proyección máxima de 5 planos adquiridos cada 0,5 μ m. Las puntas de flecha blanca indican la localización de Spa2-GFP en el septo. Barra de escala: 5 μ m.

independiente del ciclo celular. En el momento de la septación, Spa2-GFP también se localizaba en la zona del septo (minuto 60, flecha) y permanecía durante unos 5 minutos antes de desaparecer de esta región. Es de destacar que, durante la septación, a pesar de que el polarisoma se ensamblaba en la zona del septo para nuclear los cables de actina que dirigen la secreción a esa zona, el apical seguía ensamblado y nunca desaparecía de la punta.

La adición de 1NM-PP1 a las hifas del mutante *cbk1-as/cbk1Δ* provocaba una desaparición del polarisoma del ápice de la hifa, ya que la fluorescencia de Spa2-GFP comenzaba a hacerse más tenue (entre los 5 y 10 minutos en la serie 1 y sobre los 35 minutos en la serie 2) hasta que desaparecía completamente. Posteriormente era posible observar Spa2-GFP en la región del septo (flechas), donde permanecía un tiempo similar al de las hifas tratadas con DMSO (unos 5 minutos). Como ocurre con los parches de actina descritos anteriormente, tras la septación el polarisoma volvía a polarizarse en la punta de la hifa (minuto 25 en la serie 1 y minuto 80 en la serie 2), pero de nuevo se producía un

crecimiento isotrópico que conducía a la formación de una yema apical. En algunos casos, también se observaba que Spa2-GFP comenzaba a acumularse en la célula subapical (minuto 95 de la serie 2, asterisco) que conducía a la formación de una yema lateral, lo que indica que el ciclo celular de la célula subapical se ha reactivado.

Estos resultados indican que la actividad kinasa de Cbk1 es necesaria para mantener al polarisoma concentrado en el ápice de la hifa, ya que cuando se inactiva la kinasa se produce una rápida desaparición de este complejo de las zonas de crecimiento. Cuando vuelve a ensamblarse en las zonas de crecimiento tras la septación, las hifas comienzan a formar yemas apicales o laterales.

2.4.4. Cbk1 también es necesario para el mantenimiento de la polarización del exocisto durante el crecimiento hifal.

La exocitosis polarizada es esencial para una amplia gama de procesos biológicos como el crecimiento, la morfogénesis y la migración celular. La exocitosis se logra mediante la fusión de vesículas secretoras con la membrana plasmática mediada por el complejo SNARE. En la membrana plasmática, las vesículas secretoras se acoplan con un segundo complejo octamérico llamado exocisto que es esencial para el anclaje a dicha membrana (Chen *et al.*, 2015; He y Guo, 2009). En *C. albicans*, los componentes del exocisto son Sec3, Sec5, Sec6, Sec8, Sec10, Sec15, Exo70 y Exo84, que se localizan en forma de media luna en la punta de la hifa, en una estructura que es distinta del Spitzenkörper (Caballero-Lima y Sudbery, 2014; Jones y Sudbery, 2010).

Pocos son los estudios realizados sobre las distintas subunidades del exocisto en *C. albicans*. Se ha descrito que los mutantes *sec3ΔΔ* presentan un engrosamiento en la punta del tubo germinal tras la formación del primer anillo de septinas, por lo que se propuso que el desarrollo de hifas tendría una fase independiente de Sec3 y otra dependiente (Li *et al.*, 2007). Es interesante que este fenotipo es similar al observado en la cepa *cbk1-as/cbk1Δ* tras la inhibición de la actividad kinasa. Otra de las subunidades del exocisto que se ha estudiado es Exo84, que es fosforilado por CDK en tres sitios (S284, S256 y T488), siendo esta fosforilación necesaria para el crecimiento polarizado eficiente de las hifas (Caballero-Lima y Sudbery, 2014). Los mutantes no fosforilables en estos sitios tienen anomalías morfológicas y reducen las tasas de extensión de las hifas. Además de esos tres sitios de fosforilación por CDK, Exo84, posee otros 3 posibles que se ajustan perfectamente al consenso descrito para las NDR kinasas (S118, T418 y S511) (Mazanka *et al.*, 2008), por lo que su localización o actividad podrían estar reguladas también por el complejo Cbk1/Mob2.

Con el fin de analizar si la localización del exocisto se veía afectada por la inhibición de la actividad kinasa de Cbk1, se marcó la subunidad Exo84 con GFP en el extremo C-terminal, generando la cepa *cbk1-as/cbk1Δ EXO84-GFP*. Se realizaron experimentos de microscopía a lo largo del tiempo similares a los descritos en apartados anteriores en presencia de 1NM-PP1 o DMSO. Durante los experimentos iniciales con Exo84-GFP, pudimos comprobar que la fluorescencia de esta proteína era inferior a las de las estudiadas anteriormente, y al mismo tiempo era bastante inestable y desaparecía tras 8-10 tiempos de exposición (unos 60 minutos de filamentación tras la adición de los compuestos). Para prolongar la duración del tiempo de estudio, se decidió capturar las imágenes cada 10 minutos, en lugar de los 5 empleados en casos anteriores. Como se ha descrito previamente (Caballero-Lima y

Resultados

Sudbery, 2014), encontramos que Exo84 estaba presente como una media luna en la superficie en la punta de las hifas y posteriormente, durante la citoquinesis, se localizaba en el sitio de formación del tabique (Figura 27). Sin embargo, en nuestros experimentos no fuimos capaces de detectar la presencia simultánea de Exo84-GFP en el septo y en la punta, como ha sido descrito anteriormente (Caballero-Lima y Sudbery, 2014), posiblemente debido a la inestabilidad de la proteína fluorescente. En la Figura 27 (panel superior) se puede observar que en presencia de DMSO la fluorescencia de Exo84-GFP se mantenía en el ápice de la hifa hasta poco antes de que se formase el primer septo (minuto 80). En el siguiente punto (minuto 90, flecha), se observa claramente en el septo, aunque no en el ápice y en tiempos posteriores (minuto 110) vuelve a localizarse en la punta para continuar el crecimiento apical.

Cuando se añadía el análogo de ATP a las hifas en desarrollo, era difícil observar la fluorescencia de Exo84-GFP en el ápice de la hifa incluso en los tiempos iniciales, aunque en algunos tiempos intermedios si se detectaba en esa región (Figura 27, paneles inferiores). El análogo no parecía afectar a la localización en el plano de división, donde se mantenía entre 5 y 10 minutos, como

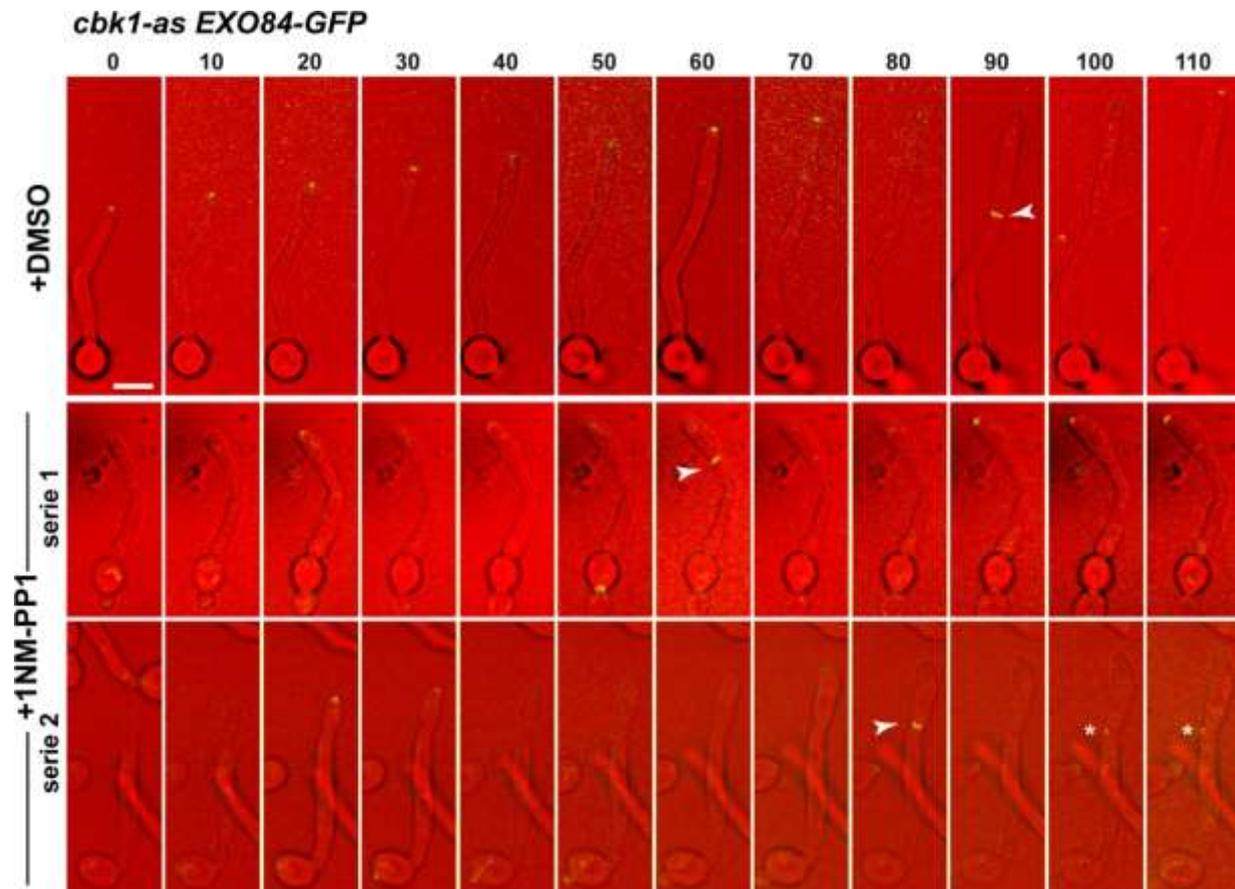


Figura 27. Localización de la subunidad Exo84 del exocisto en las hifas del mutante *cbk1-as*. Análisis mediante *time-lapse* de la localización de Exo84-GFP en hifas de la cepa *cbk1-as/cbk1Δ EXO84-GFP/EXO84* (JC2332) incubadas en presencia de DMSO (panel superior) o de 1NM-PP1 (paneles inferiores). Las imágenes muestran la mezcla del canal de contraste interferencial (DIC, rojo) y de la fluorescencia de Exo84-GFP (verde) a los tiempos indicados tras la adición de los distintos compuestos. Las imágenes de fluorescencia son la proyección máxima de 5 planos adquiridos cada 0,5 μ m. Las puntas de flecha blancas indican la localización de Exo84-GFP en el septo. Los asteriscos indican la localización de Exo84-GFP en el compartimento subapical. Barra de escala: 5 μ m.

ocurría en las hifas control y con una intensidad similar. Una vez formado el septo, la fluorescencia desaparecía y volvía a localizarse en el ápice en el momento en que la hifa comenzaba a ensancharse (serie 1). En otros casos, tras finalizar la citoquinesis Exo84 se acumulaba en los compartimentos subapicales, donde se producía la activación de la gemación lateral (serie 2, asterisco).

Dada la dificultad para observar Exo84-GFP en las hifas a lo largo del tiempo, se decidió utilizar otra de las subunidades para confirmar los resultados obtenidos. Para ello, se marcó la subunidad Sec3 con GFP en el extremo C-terminal, generando la cepa *cbk1-as/cbk1Δ SEC3-GFP* y se repitieron los experimentos de microscopía a lo largo del tiempo. En este caso, la fluorescencia era más estable que en Exo84-GFP, lo que permitió repetir los experimentos capturando imágenes cada 5 minutos. En la Figura 28 se observa que Sec3-GFP se mantenía en el ápice de la hifa durante todo el tiempo del experimento en presencia de DMSO, incluso durante el momento de la septación (minutos 70-75), en los que además de la presencia en el septo (flechas) era posible observarlo tenuemente en el ápice de la hifa, indicando que una pequeña cantidad se mantenía polarizada. Tras la síntesis del septo, Sec3-GFP volvía a concentrarse en la punta y el crecimiento apical continuaba.

Sin embargo, tras la adición de 1NM-PP1, la fluorescencia de Sec3-GFP desaparecía

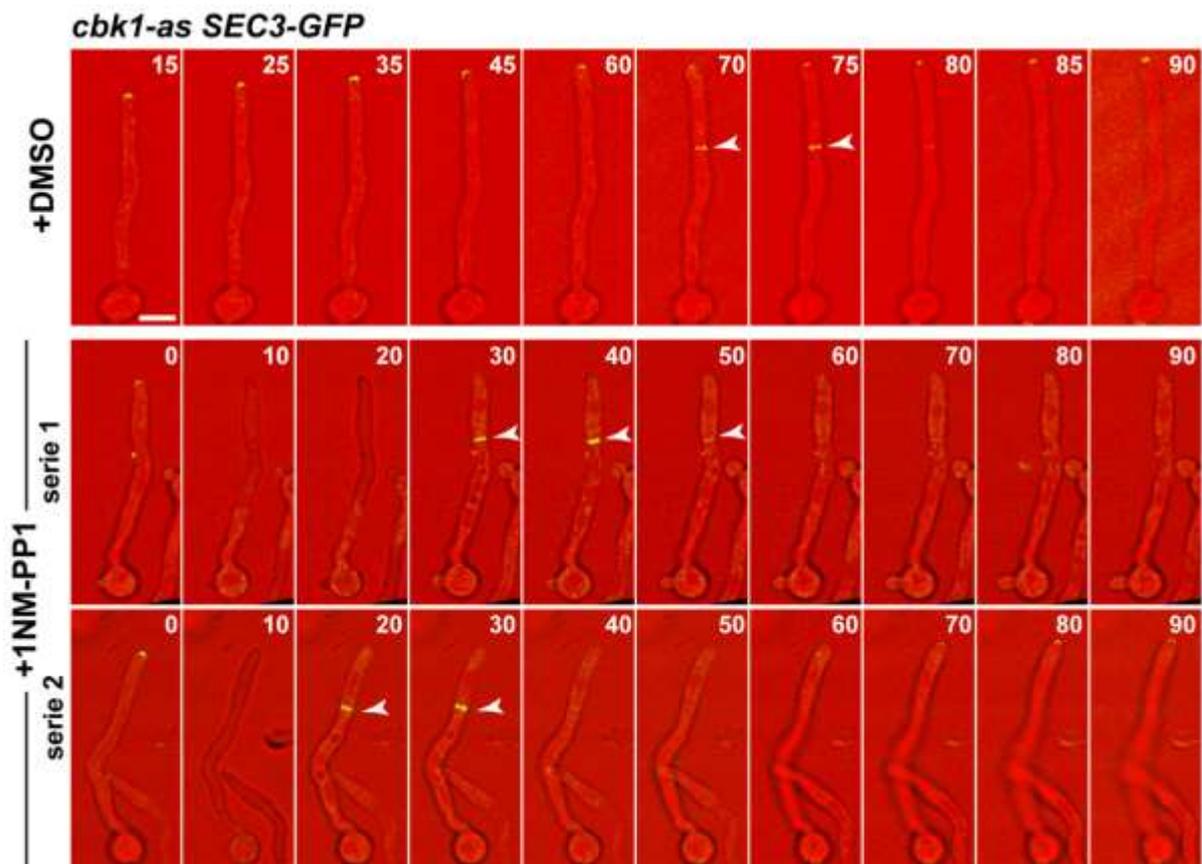


Figura 28. Localización de la subunidad Sec3 del exocisto en las hifas del mutante *cbk1-as*. Análisis por microscopía a lo largo del tiempo de la localización de Sec3-GFP en hifas de la cepa *cbk1-as/cbk1Δ SEC3-GFP/SEC3* (OL3172) incubadas en presencia de DMSO (panel superior) o de 1NM-PP1 (paneles inferiores). Las imágenes muestran la mezcla del canal de contraste interferencial (DIC, rojo) y de la fluorescencia de Sec3-GFP (verde) a los tiempos indicados tras la adición de los distintos compuestos. Las imágenes de fluorescencia son la proyección máxima de 5 planos adquiridos cada 0,5 μm . Las puntas de flecha blancas indican la localización de Sec3-GFP en el septo. Barra de escala: 5 μm .

Resultados

rápida de la zona apical (Figura 28, paneles inferiores) y a los 10 minutos no era posible observar fluorescencia apical (series 1 y 2). Durante la formación del septo, Sec3-GFP se localizaba de forma clara en el septo (flechas), con un patrón temporal similar al de la cepa sin tratar (unos 15 minutos). Tras la formación del septo, volvía a acumularse en la punta (serie 2) o en un lateral del compartimento subapical transcurrido un tiempo variable para continuar el crecimiento.

Estos resultados indican que Cbk1 es necesario para mantener al exocisto concentrado en el ápice de la hifa, ya que cuando se inactiva su actividad catalítica se produce una rápida desaparición del complejo de las zonas de crecimiento. La localización en la zona del septo no parece estar afectada por la ausencia de Cbk1, y posteriormente se acumula de nuevo en las zonas de crecimiento para formar yemas apicales o laterales.

2.5. Relación entre la kinasa Cbk1 y el factor de transcripción Ace2.

Los resultados de los apartados anteriores indican que la actividad kinasa de Cbk1 es esencial para mantener un crecimiento polarizado focalizado en la punta de las hifas, y que en su ausencia se produce una desorganización de algunos de los componentes de la maquinaria de crecimiento, como el polarisoma, el exocisto y los parches de actina. Tras la síntesis del septo, estos componentes vuelven a localizarse en las zonas de crecimiento, pero han perdido las características típicas de las hifas y retornan a un patrón de crecimiento similar al de levaduras. Además, se produce una reactivación del ciclo celular en los compartimentos subapicales, que comienzan a emitir yemas laterales.

La división celular durante la filamentación es un proceso asimétrico que genera dos células diferentes, una subapical que se bloquea en G1 y una apical que continúa creciendo (Gow y Gooday, 1987; Sudbery *et al.*, 2004; Sudbery, 2011). Sin embargo, no existen muchos datos sobre los mecanismos moleculares que gobiernan la parada del ciclo celular de las células subapicales. Recientemente se ha descrito que Cbk1 fosforila al factor de transcripción Ace2 y que esta fosforilación previene la transición de hifa a levadura, siendo en parte responsable de la supresión de la gemación lateral de las hifas, probablemente retrasando la transición de G1 a *Start* en los compartimentos subapicales de la hifa (Wakade *et al.*, 2020). Estos autores proponen que Ace2 actuaría como un regulador negativo reprimiendo directa o indirectamente la expresión de un gran conjunto de genes durante la morfogénesis hifal y uno de esos genes sería el homólogo de *pescadillo*, *PES1*, un regulador positivo de la formación de yemas laterales (Shen *et al.*, 2008; Wakade y Krysan, 2021; Wakade *et al.*, 2020).

En levaduras, Ace2 juega un papel clave en la regulación de genes implicados en la degradación del septo primario y, por tanto, es necesario para la separación celular (Kelly *et al.*, 2004). Cbk1 fosforila a Ace2 en dos sitios próximos a la secuencia de exportación nuclear para bloquear su exportación desde el núcleo de la célula hija en *S. cerevisiae*. En ausencia de esta fosforilación, la localización de Ace2 se altera, lo que da lugar a defectos en la separación celular (Mazanka *et al.*, 2008). La proteína de *C. albicans* contiene los dos sitios de fosforilación descritos en *S. cerevisiae* y un tercero localizado en una extensión en el extremo N-terminal no presente en *S. cerevisiae* (Calderón-Noreña *et al.*, 2015). Mutantes de Ace2 fosfodeficientes aumentan la formación de yemas laterales, lo

que indica que la fosforilación de Ace2 por Cbk1 es necesaria para la supresión de la formación de yemas laterales durante la morfogénesis de hifas (Wakade *et al.*, 2020). Estas observaciones nos llevaron a analizar la relación de Ace2 y Cbk1 durante el crecimiento hifal y su función en la activación de la gemación lateral.

2.5.1. La inhibición de la actividad kinasa de Cbk1 resulta en la pérdida de la asimetría de la localización de Ace2.

Como se ha comentado anteriormente, la localización de Ace2 en levaduras es asimétrica y se localiza en el núcleo de la célula hija tras la mitosis, pero los datos en hifas están menos claros. En algunos artículos se ha descrito que se localiza en los dos núcleos de la hifa tras la formación del septo (Calderón-Noreña *et al.*, 2015; Kelly *et al.*, 2004), mientras que en otros parece estar presente en el núcleo de la célula apical únicamente (Bharucha *et al.*, 2011). Por ello, decidimos analizar con detalle la localización de Ace2 en hifas y la importancia de la actividad de Cbk1 en esta localización.

Para ello, se marcó *ACE2* con *GFP* en el mutante condicional *cbk1-as/cbk1Δ* y los transformantes resultantes se incubaron en condiciones de filamentación durante 2 horas. Tras este tiempo, el cultivo se dividió en dos alícuotas, para añadir DMSO 2% a uno y 1NM-PP1 25 μ M al otro y se incubaron 30 minutos adicionales. Seguidamente, se realizaron fotos en el microscopio de fluorescencia. En las imágenes obtenidas en los cultivos control tratados únicamente con DMSO se pudo comprobar que Ace2-GFP estaba presente tanto en el núcleo de la célula apical como en el de la subapical, aunque con diferente intensidad de fluorescencia (Figura 29A). Para confirmar esta diferencia, se realizaron gráficas representando la intensidad media a lo largo del eje longitudinal de la hifa (*linescan*) que se muestran debajo de la imagen. Como puede observarse, la relación entre la intensidad del núcleo apical frente al subapical (A/S) es de 3,66. Resultados similares se observaron en hifas tratadas durante 60 minutos, como se muestra en la Figura 29A. En el ejemplo mostrado, se puede comprobar que Ace2-GFP está mayoritariamente en el núcleo apical (ratio A/S= 3,92), indicando que Ace2 se acumula preferentemente en el compartimento que continúa creciendo y es menos abundante en los que están parados en G1. Cuando se trataron las hifas con 1NM-PP1, dejaban de crecer, como se ha descrito anteriormente, y se perdía la asimetría de la intensidad de fluorescencia en los núcleos apical y subapical, tanto a 30 como a 60 minutos del tratamiento (ratios A/S de 1,29 y 1,31, respectivamente). Se cuantificó la relación de la intensidad apical/subapical en un conjunto de hifas y los resultados se muestran en la Figura 29B. Como se observa en la gráfica, la inhibición de la actividad kinasa de Cbk1 provoca la pérdida de la asimetría en la localización de Ace2-GFP durante el crecimiento hifal, ya que la media de las ratios A/S pasa de $2,731 \pm 0,29$ a $1,24 \pm 0,07$ ($n = 14$ para DMSO y $n = 25$ para 1NM-PP1), una diferencia que es altamente significativa ($p < 0,0001$, *unpaired t-test*). Estos datos indican que durante el crecimiento hifal la localización de Ace2-GFP también es asimétrica, como ocurre en levaduras, y que esta asimetría depende de la actividad kinasa de Cbk1.

Dado que Cbk1 regula la distribución asimétrica de Ace2-GFP en hifas, también decidimos comprobar si ocurría lo mismo en levaduras. Como se ha descrito previamente (Bharucha *et al.*, 2011; Kelly *et al.*, 2004), Ace2-GFP se localizaba asimétricamente en el núcleo de la célula hija en la mayoría de las células (Figura 29C-D) y esta asimetría también se perdía al inhibir Cbk1. Por tanto, Cbk1 contribuye a la división celular asimétrica tanto en hifas como en levaduras.

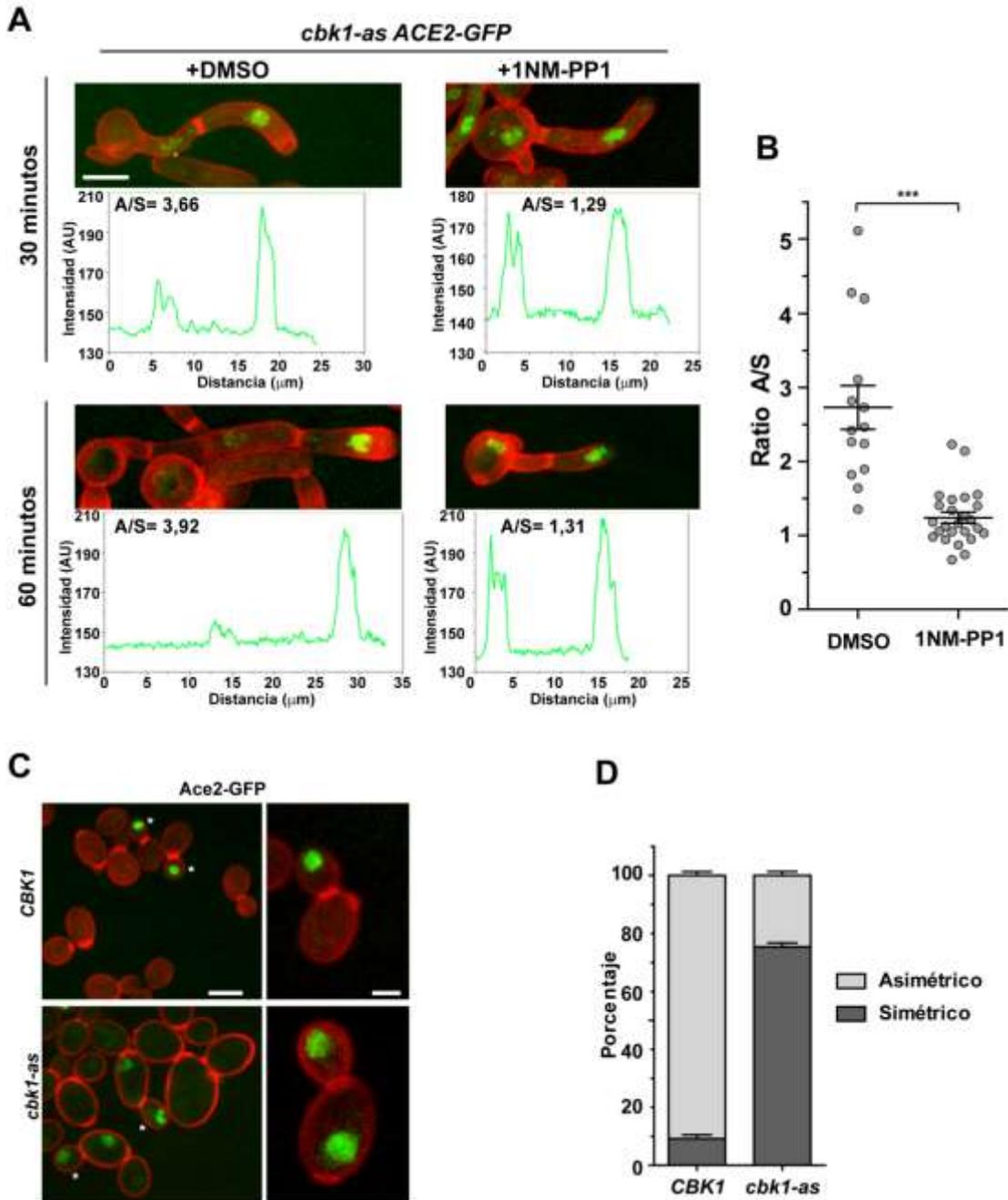


Figura 29. La actividad kinasa de Cbk1 es necesaria para generar la distribución asimétrica de Ace2 en levaduras e hifas. (A). Localización de Ace2-GFP en hifas en la cepa *cbk1-as/cbk1Δ ACE2-GFP/ACE2* (OL3060) incubada en presencia de DMSO o 25 μ M 1NM-PP1 durante 30 minutos. Las imágenes son la proyección máxima de 11 planos y muestran la fluorescencia Ace2-GFP (verde) y Calcofluor (rojo). La grafica bajo las imágenes muestra la intensidad promedio a lo largo del eje longitudinal de las hifas y se indica la relación entre la intensidad de la fluorescencia del núcleo apical/núcleo subapical (A/S). Barra de escala, 5 μ m. **(B)** Relación de intensidad de fluorescencia núcleo apical/núcleo subapical (Ratio A/S) en hifas tratadas con DMSO o con 25 μ M 1NM-PP1. También se indica la media \pm SEM (n=14 para DMSO y n=25 para 1NM-PP1). *** p < 0,0001 (*unpaired t-test*). **(C).** Imágenes de microscopía de fluorescencia de las cepas *CBK1/cbk1Δ ACE2-GFP/ACE2* (OL3125) y *cbk1-as/cbk1Δ ACE2-GFP/ACE2* (OL3060) durante el crecimiento exponencial. Las células de la cepa *cbk1-as/cbk1Δ ACE2-GFP/ACE2* se incubaron en presencia de 25 μ M 1NM-PP1 durante 30 minutos antes de capturar las imágenes. Se muestra la proyección máxima de 11 planos adquiridos cada 0,5 μ m con la fluorescencia de Ace2-GFP (verde) y la tinción de calcofluor (rojo). A la derecha, se muestra un detalle de una célula de cada cepa. Barra de escala: 5 μ m para el campo general y 2 μ m para los detalles. **(D)** Cuantificación del porcentaje de células que presentan Ace2-GFP en el núcleo de la célula hija (asimétrico) o en el núcleo de la célula hija y la madre (simétrico) en ambas cepas. Los datos son la media \pm SEM de dos experimentos distintos.

2.5.2. Ace2 contribuye, junto con Cbk1, al crecimiento polarizado de las hifas.

La delección de *ACE2* en *C. albicans* produce un crecimiento en forma de grumos en condiciones no inductoras de filamentación ya que las células son incapaces de separarse, aunque en medio que contiene suero el mutante *ace2ΔΔ* es capaz de formar hifas similares a las de la cepa silvestre (Kelly *et al.*, 2004). Recientemente, se ha descrito que Ace2 podría actuar como un represor de la gemación lateral de las hifas, ya que en medio Spider forma pseudohifas en lugar de hifas (Wakade *et al.*, 2020). Si esta hipótesis es correcta, cabe esperar que la delección de Ace2 aumente la gemación lateral que se observa en el mutante *cbk1-as*.

Con el fin de analizar con más detalle esta hipótesis, se deleccionaron los dos alelos del gen *ACE2* en el mutante condicional *cbk1-as* (para poder inhibir su actividad kinasa), generando la cepa *cbk1-as/cbk1Δ ace2ΔΔ*. Una vez construida, se indujo la filamentación en YEPD con suero 10% a 37°C durante 2 horas. Seguidamente, el cultivo se dividió en dos alícuotas y se le añadió DMSO 2% a uno de ellos y 25 μM de 1NM-PP1 al otro. Los cultivos se mantuvieron en dichas condiciones y se recogieron muestras a las 3, 5 y 7 horas tras de la adición de ambos compuestos.

La morfología de las hifas en las distintas muestras fue analizada mediante microscopía de contraste interferencial (DIC). Como se puede apreciar en la Figura 30, en las muestras del mutante *cbk1-as/cbk1Δ* en presencia de DMSO, se producía un crecimiento de las hifas que se incrementaba con el tiempo de incubación. En el caso del doble mutante *cbk1-as/cbk1Δ ace2ΔΔ*, el porcentaje de

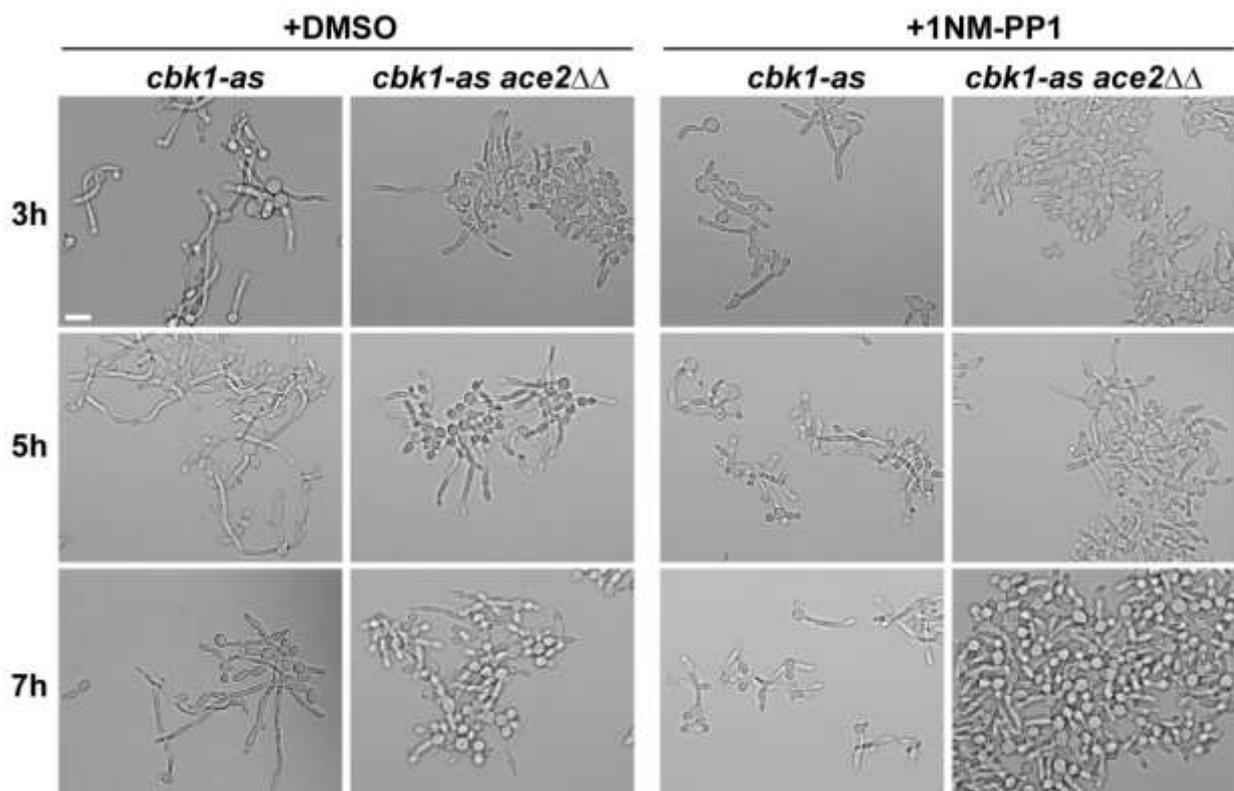


Figura 30. Ace2 contribuye al crecimiento polarizado de las hifas junto con Cbk1. Análisis por microscopía de contraste de fases de las cepas *cbk1-as/cbk1Δ* (OL3054) y *cbk1-as/cbk1Δ ace2ΔΔ* (OL3074). Las dos cepas fueron incubadas en condiciones de filamentación durante 2 horas, momento en el que se añadió DMSO o 1NM-PP1. Las imágenes muestran campos de ambas cepas tras 3, 5 o 7 horas en presencia de cada uno de los compuestos. Barra de escala, 10 μm.

Resultados

respuesta al suero era menor que en la cepa anterior, y la longitud de las hifas también parecía menor en los distintos tiempos. En presencia del análogo 1NM-PP1, en la cepa *cbk1-as/cbk1Δ* se observaba el fenotipo descrito anteriormente, las hifas dejaban de crecer en los primeros tiempos (3 horas) y comenzaban a emitir yemas laterales a medida que se incrementaba el tiempo de incubación (5 y 7 horas). En el caso del doble mutante *cbk1-as/cbk1Δ ace2ΔΔ*, de nuevo se observaba un menor porcentaje de hifas, que aparentemente eran mucho más cortas que las de la cepa con los dos alelos de *ACE2*, aunque debido a los grandes grupos de células de esta cepa eran más difíciles de visualizar.

Para confirmar estas observaciones preliminares, se midió la longitud de las hifas en las cuatro muestras a lo largo del tiempo. Los datos se muestran en la Figura 31A, en la que claramente se observa que la delección de *ACE2* resulta en una menor extensión de las hifas que en la cepa control tanto en presencia de DMSO como en presencia del análogo, aunque la diferencia es mayor tras inhibir la actividad kinasa. Cuando se comparan por pares las muestras de las dos cepas incubadas durante el mismo tiempo en las mismas condiciones, la diferencia en la longitud de las hifas es estadísticamente significativa en todos los casos ($p < 0,0001$, *unpaired t-test*). Estos resultados indican,

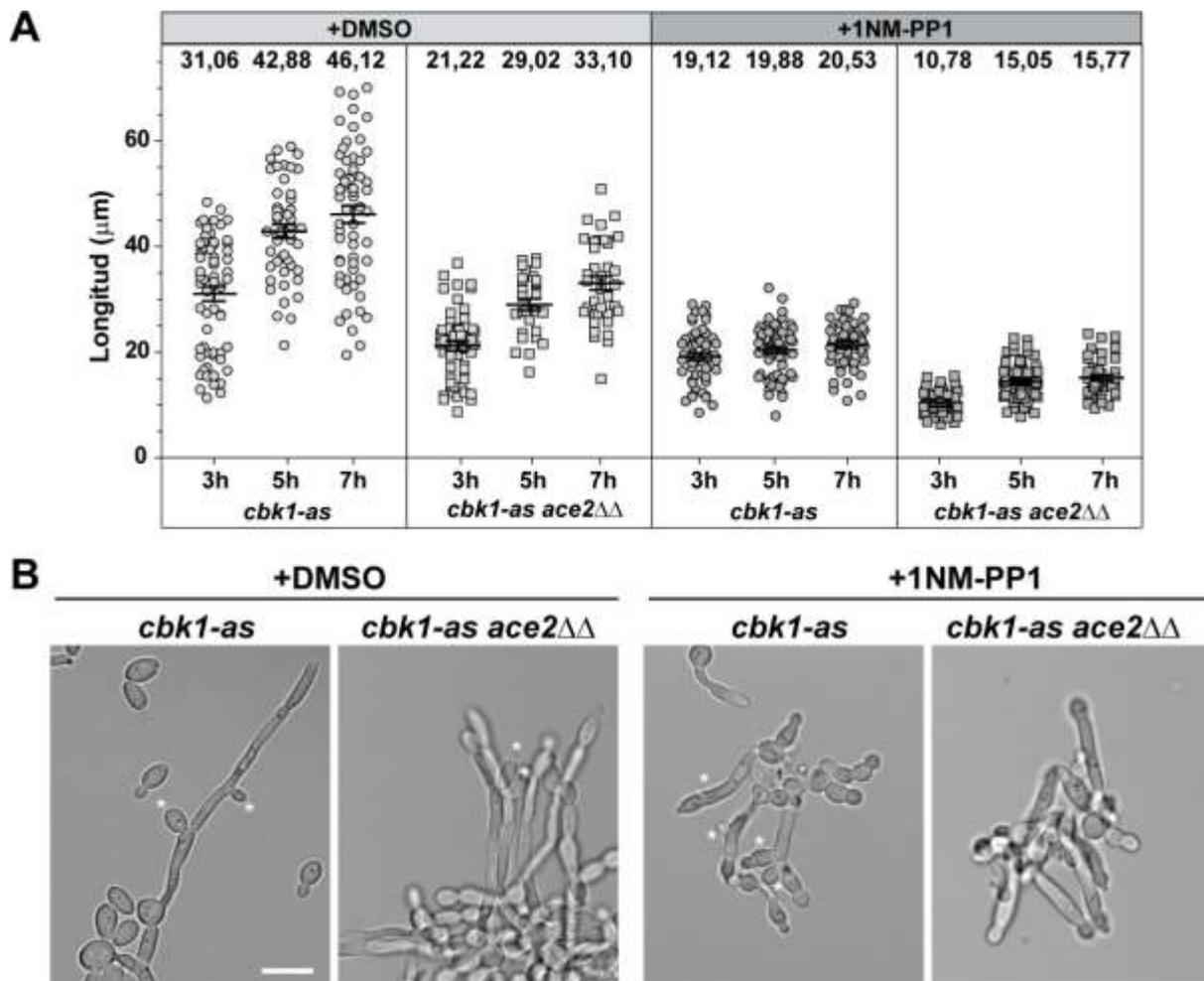


Figura 31. La delección de *ACE2* reduce la tasa de crecimiento de las hifas. (A) Cuantificación de la longitud de las hifas incubadas en presencia de DMSO o 1NM-PP1 a lo largo del experimento. Se indica la media \pm SEM de cada una de las cepas ($n > 30$ en todos los casos). Los números de la parte superior indican la media de la longitud en cada muestra. **(B)** Detalle de la morfología de las hifas de las cepas *cbk1-as/cbk1Δ* (OL3054) y *cbk1-as/cbk1Δ ace2ΔΔ* (OL3074) tras 7 horas en presencia de DMSO o de 1NM-PP1. Los asteriscos indican las yemas laterales.

por tanto, que Ace2 contribuye al crecimiento apical de las hifas, especialmente cuando la actividad de Cbk1 no está presente.

Además de los defectos en la elongación de las hifas entre ambas cepas, también se observó una importante diferencia en el patrón de gemación lateral a las 7 horas de incubación. En la Figura 31B se muestra un detalle de las hifas tras 7 horas de incubación en presencia de DMSO o de 1NM-PP1. En presencia de DMSO, tras 9 horas de inducción de la filamentación (2 horas iniciales más otras 7 en presencia del solvente) el ciclo celular de los compartimentos subapicales de la cepa *cbk1-as/cbk1Δ* comenzaba a reactivarse y se observaban yemas laterales (asteriscos en la Figura 31B), aunque el filamento continúa creciendo. En la cepa *cbk1-as/cbk1Δ ace2ΔΔ* crecida en las mismas condiciones también se podían observar algunas yemas laterales, aunque debido a los grandes grupos de células que forma por la ausencia de Ace2 es difícil su cuantificación. Cuando se inhibe la actividad kinasa en el mutante *cbk1-as/cbk1Δ*, se incrementa significativamente el número de yemas apicales y laterales mientras que en el doble mutante *cbk1-as/cbk1Δ ace2ΔΔ* únicamente se observan yemas apicales (debido al cambio a un patrón de crecimiento levaduriforme), pero no laterales (debidas a la reactivación del ciclo celular en los compartimentos subapicales).

Estos resultados sugieren que Ace2 contribuye al mantenimiento del crecimiento polarizado en los compartimentos hifales, y al mismo tiempo no concuerdan con la hipótesis propuesta recientemente de que Ace2 funcionaría como un represor necesario para suprimir la transición hifa-levadura en las etapas tardías del crecimiento hifal en *C. albicans*, al menos en las condiciones usadas en este trabajo.

2.5.3. Construcción de un mutante condicional de ACE2.

Los resultados del apartado anterior sugieren que Ace2 desempeña un papel en el crecimiento polarizado de las hifas junto a Cbk1, pero la cuantificación de los fenotipos se ve dificultada por los grandes grupos de células que se forman en el mutante *ace2ΔΔ* durante el crecimiento levaduriforme. Para tratar de solventar este problema, se decidió construir un mutante condicional de ACE2 en el que se pudiera regular su expresión a voluntad para evitar la formación de grandes grupos de células, generando una cepa heterocigótica en la que uno de los alelos de ACE2 estuviera deletado y el segundo bajo el control de un promotor regulable. Para ello, se eligió el sistema de expresión regulable por tetraciclina, un sistema de expresión génica usado comúnmente en células eucariotas y adaptado para uso en *C. albicans* (Nakayama *et al.*, 2000). Este sistema consta de dos componentes: uno es un transactivador (TR), una proteína de fusión entre la proteína represora de tetraciclina de *Escherichia coli* (TetR) y el dominio de activación (AD) de Hap4, insertado en el locus *ENO1* y regulado por el promotor de este gen. El segundo componente es el promotor *tetO-SCHOP1*, que contiene una secuencia operadora de tetraciclina (*tetO*) y debe ser insertada delante del gen a regular. De esta forma, es posible regular la expresión del gen de interés mediante la adición de doxiciclina al medio de cultivo. La cepa que contiene el sistema regulable por tetraciclina utilizado en el presente trabajo fue construida en el laboratorio del Dr. Arkowitz y deriva del fondo genético BWP17 (cepa PY173; Vernay *et al.*, 2012).

La utilización de este sistema implica el uso de una nueva cepa parental, por lo que también era necesario introducir la mutación *cbk1-as* en el genoma. Durante los experimentos descritos en este

Resultados

Capítulo hemos podido comprobar que un porcentaje variable de hifas de esta cepa desarrollan el fenotipo mutante incluso en presencia de DMSO, lo que indica que la actividad de la kinasa sensible al análogo es bastante inferior a la de la proteína silvestre. Dado que era necesario generar el mutante heterocigótico *cbk1-as/cbk1Δ* en la cepa PY173, decidimos intentar aumentar la expresión del alelo *cbk1-as* colocándolo bajo el control del promotor *MET3* regulable por metionina. Por tanto, se diseñó una estrategia que permitiera construir la cepa *MET3p-3xmyc-cbk1-as/cbk1Δ HOP1p-3xmyc- ACE2/ace2Δ*.

En primer lugar, se deletionó el primer alelo de *CBK1* mediante la inserción del marcador *HIS1* flanqueado por dos secuencias *loxP* (*LHL*) usando el plásmido pFA-LHL (Dueñas-Santero *et al.*, 2019), generando la cepa *cbk1::LHL/CBK1* (Figura 32, paso a). Para la inserción de la mutación *cbk1-as* en el genoma, se construyó el plásmido pFA-3xmyc-cbk1-as-LAL, el cual contiene la mutación *cbk1-as* (*M412A*) y tres epítomos *myc* en el extremo amino bajo el control del propio promotor de *CBK1* (*CBK1p*), además del marcador auxotrófico *ARG4* flanqueado por *loxP* (*LAL*) para así poder inducir la pérdida de este marcador en un paso posterior. Se transformó la cepa anterior con este plásmido y, de esta manera, se generó la cepa *cbk1::LHL/3xmyc-cbk1-as::LAL* (Figura 32, paso b). El gen *CBK1* de

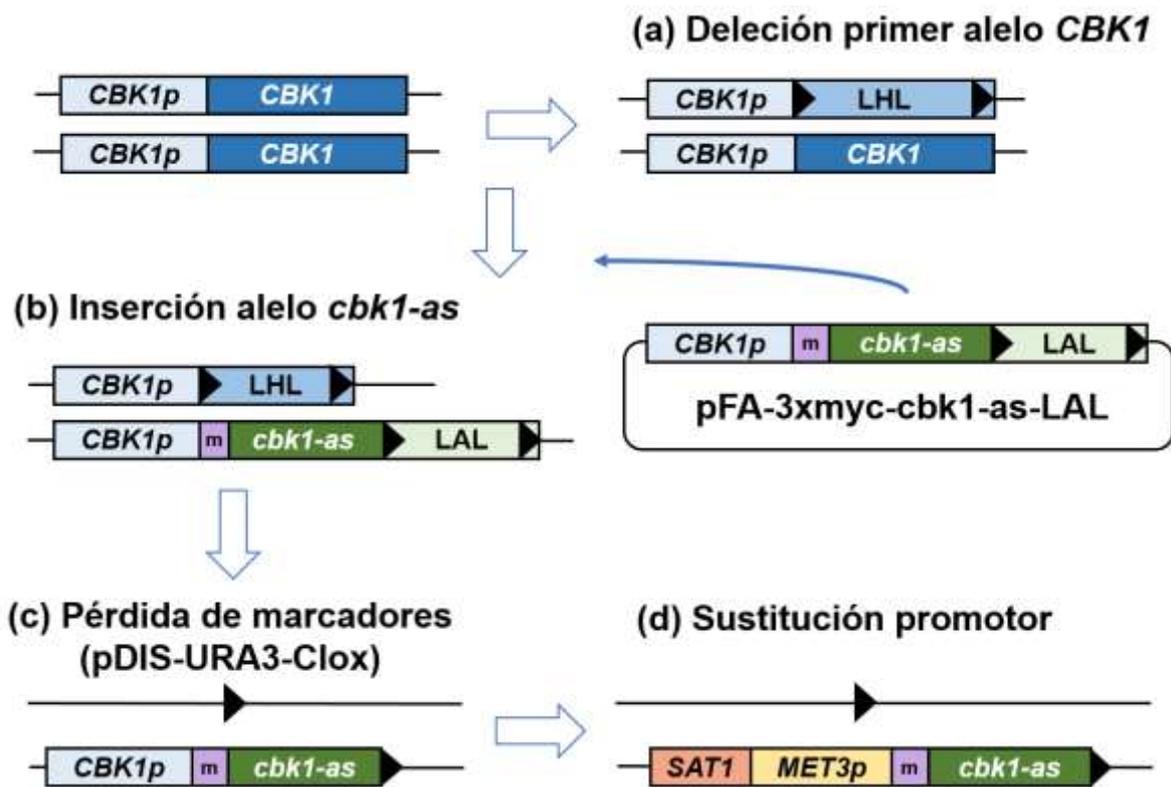


Figura 32. Construcción de la cepa con un alelo de *CBK1* regulado por metionina y un alelo de *ACE2* regulado por doxiciclina. El primer alelo de *CBK1* fue sustituido por el cassette *LHL*, flanqueado por dos secuencias *loxP* (triángulos negros) en la cepa *ade2Δ/ade2Δ ura3Δ/ura3Δ his1Δ/his1Δ arg4Δ/arg4Δ ENO1/eno1::ENO1-tetR-ScHAP4AD-3xHA-ADE2* (PY173) (paso a). Posteriormente se insertó la mutación *cbk1-as* en el segundo alelo del gen *CBK1* con 3 copias del epítomo *myc* (*m*) en el extremo N-terminal de la proteína y el marcador de selección *LAL*. Se muestra también el plásmido pFA-3xmyc-cbk1-as-LAL construido para realizar dicha inserción en el genoma de *C. albicans* (paso b). Los marcadores auxotróficos *LAL* y *LHL* fueron reciclados insertando el cassette *URA3-Clox* en el locus *NEUT5* por transformación con un fragmento lineal obtenido del plásmido pDIS-URA3-Clox (paso c). El paso final en la construcción de la cepa (paso d) fue la sustitución del promotor endógeno del gen *CBK1* por el promotor del gen *MET3* (*MET3p*), generando la cepa *SAT1-MET3p-3xmyc-cbk1-as::loxP/cbk1::loxP*.

los transformantes obtenidos fue secuenciado para confirmar que la mutación *cbk1-as* estaba presente en su genoma y que no se habían introducido cambios indeseados en la misma.

El siguiente paso fue inducir la pérdida de los marcadores *HIS1* y *ARG4* y así recuperar esos marcadores auxotróficos para posteriores manipulaciones genéticas. Para ello, se transformó la cepa *cbk1::LHL/3xmyc-cbk1-as::LAL* con un casete lineal obtenido del plásmido pDIS-URA3-Clox (Dueñas-Santero *et al.*, 2019), que contiene la recombinasa Cre que cataliza la recombinación entre los sitios *loxP* que flanquean ambos marcadores e induce su pérdida. Tras la transformación y selección de transformantes Ura⁺, es posible inducir la expresión de la recombinasa y seleccionar colonias que hayan perdido los tres marcadores y sean His⁻ Arg⁻ Ura⁻, las cuales tendrán el genotipo *cbk1::loxP/3xmyc-cbk1-as::loxP* (Figura 32, paso c).

El paso final en la modificación de los alelos del gen *CBK1* fue la sustitución de su promotor por el promotor del gen *MET3* (*MET3p*), en un intento de aumentar la expresión del alelo mutante. Para ello, la cepa *cbk1::loxP/3xmyc-cbk1-as::loxP* se transformó con el plásmido pFA-SAT1-MET3p (Schaub *et al.*, 2006) generando finalmente la cepa *SAT1-MET3p-3xmyc-cbk1-as::loxP/cbk1::loxP* (Figura 32, paso d). Antes de modificar los alelos del gen *ACE2*, se procedió a comprobar su fenotipo tanto durante el crecimiento en forma de levaduras como tras la inducción de la filamentación.

Dado que en esta cepa la expresión del alelo *cbk1-as* está regulada por el promotor *MET3*, las células se crecieron en medio mínimo con los suplementos adecuados (YNB + Arg, His, Uri), porque el

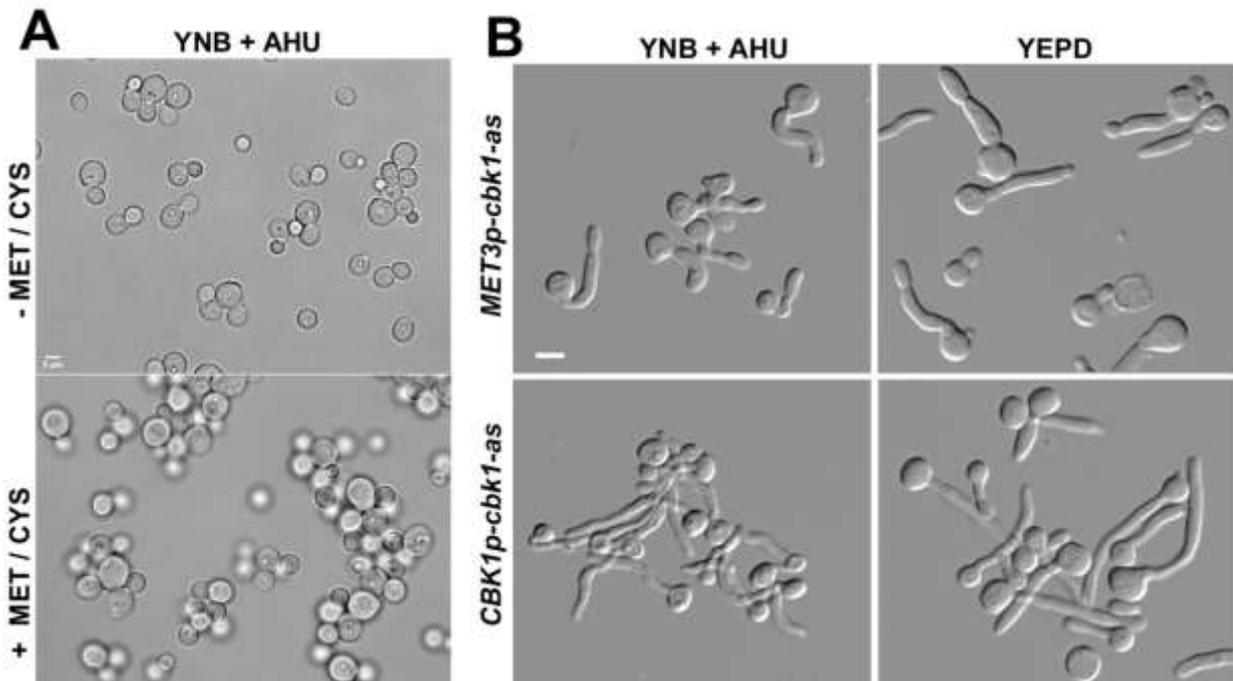


Figura 33. Fenotipo de la cepa *SAT1-MET3p-3xmyc-cbk1-as/cbk1::loxP* durante el crecimiento levaduriforme y en filamentación. (A) Las células fueron crecidas a 28°C durante 15 horas en medio YNB con los suplementos necesarios (Uri, His, Arg) en presencia o ausencia de Metionina 2,5mM y Cisteína 2,5 mM y diluidas en los mismos medios durante otras 5 horas adicionales antes de su observación al microscopio de contraste interferencial (DIC). Barra de escala: 5 µm. **(B)** Las cepas *SAT1-MET3p-3xmyc-cbk1-as/cbk1::loxP* (OL3153) y *cbk1::loxP/3xmyc-cbk1-as::URA3* (OL3054) fueron incubadas en presencia de suero a 37°C durante 2 horas en medio YNB con los suplementos (YNB +AHU) o en medio YEPD antes de recoger muestras para su observación microscópica. Barra de escala: 5 µm.

Resultados

medio YEPD puede contener trazas de Met y Cys que alteran el nivel de expresión del promotor *MET3p*. Cuando las células se incubaron en medio YNB (con el promotor *MET3* encendido), se observó que presentaban un fenotipo similar al de la cepa silvestre y al de la cepa *cbk1-as* usada anteriormente (OL3054), siendo ligeramente redondeadas (Figura 33A). La adición de Met y Cys al medio de cultivo para reprimir la expresión del promotor *MET3* producía un fenotipo similar al del mutante nulo *cbk1ΔΔ*, es decir, las células eran más grandes y redondeadas que las silvestres y comenzaban a formar grumos de células de distintos tamaños, lo que indica que en levaduras está funcionando adecuadamente.

Cuando se analizó la capacidad de filamentar de la nueva cepa con el promotor *MET3* en medio mínimo con suplementos, se observó que era capaz de responder al estímulo y comenzar la formación de tubos germinativos (Figura 33B), pero pronto desarrollaban un fenotipo similar al observado tras la inhibición de la actividad kinasa, es decir, los filamentos eran cortos y los compartimentos apicales se ensanchaban. Resultados similares se obtuvieron en medio YEPD con suero. En ambos casos, las hifas eran mucho más cortas que las producidas por la cepa que contiene el alelo *cbk1-as* controlado por su promotor endógeno (Figura 33B), lo que sugiere que la expresión del promotor *MET3*, a pesar de poder ser regulado por la adición de Met y Cys, es más baja que la del promotor nativo. Por tanto, se decidió no continuar con la construcción de la cepa *MET3p-3xmyc-cbk1-as/cbk1Δ HOP1p-3xmyc- ACE2/ace2Δ* que se había planteado.

Capítulo 3. Estudio de la función de la GTPasa Rho4 durante el crecimiento polarizado en *C. albicans*.

3.1. Caracterización de la función de Rho4 durante el crecimiento levaduriforme de *Candida albicans*.

Como se ha comentado en la Introducción, las GTPasas de la familia Rho participan en la regulación coordinada de la biosíntesis de la pared celular y el citoesqueleto de actina en diversos hongos y levaduras. En *S. pombe*, Rho4 es una proteína no esencial que parece estar implicada en la regulación de la secreción, interaccionando con algunas de las subunidades del exocisto, como Exo70, y con las septinas (Pérez *et al.*, 2015; Santos *et al.*, 2005).

En *C. albicans*, Rho4 está implicada en el control de la separación celular en levaduras. Trabajos previos indican que células de levadura en las que se ha deleciónado *RHO4* no muestran defectos en crecimiento polarizado, aunque son más alargadas que las silvestres (Dünkler y Wendland, 2007). La organización del citoesqueleto de actina en las células mutantes es similar a la de células silvestres, y el defecto más relevante es un defecto en la separación celular que resulta en la formación de cadenas de células. Esto indica que la deleción de *RHO4* interfiere con la secreción de las enzimas necesarias para la separación de las células madre e hija tras completar la citoquinesis, de forma similar a lo descrito en la levadura de fisión (Santos *et al.*, 2005). Durante el crecimiento filamentoso, no existen diferencias significativas entre la cepa silvestre y el mutante (Dünkler y Wendland, 2007).

Como paso previo al estudio de la implicación de Rho4 en la secreción durante el crecimiento hifal y el posible papel regulador de la fosforilación por Cbk1 en este proceso, se generó un mutante nulo *rho4ΔΔ* para utilizar como control, deleciónando las dos copias del gen silvestre con marcadores auxotróficos, como se especifica en Materiales y Métodos. Una vez obtenida esta cepa, se analizó el fenotipo del mutante durante el crecimiento en forma de levadura o durante la filamentación.

Para el crecimiento levaduriforme, las cepas silvestre y mutante *rho4ΔΔ* se incubaron en medio YEPD a 28°C hasta fase logarítmica y se fijaron con formaldehído para su posterior cuantificación. En la cepa silvestre, generalmente se produce la separación de las células madre e hija al final de citoquinesis (Figura 34A), por lo que el porcentaje de células que forman cadenas o grupos de células es bajo (5,3 %; Figura 34B). Por el contrario, en el mutante nulo *rho4ΔΔ* se observó una mayor frecuencia de cadenas de entre 3 y 10 células (38,3 %; Figura 34B). Esto indica que, en levaduras, la deleción de *RHO4* afecta a la separación celular, la última etapa de la citoquinesis, como se ha descrito previamente (Dünkler y Wendland, 2007).

3.1.1. Los defectos en separación tras la deleción de *RHO4* no se deben a un mal ensamblaje del anillo de septinas.

Las septinas son una familia de proteínas de unión a GTP que se ensamblan en filamentos y desempeñan funciones esenciales en la morfogénesis de animales y hongos (Bridges y Gladfelter, 2015; Khan *et al.*, 2015). En *S. cerevisiae*, las septinas se ensamblan en una estructura en forma de anillo en cuello entre la célula madre e hija formado por las septinas Cdc3, Cdc10, Cdc11, Cdc12 y Shs1/Sep7 (Bertin *et al.*, 2008). Inicialmente, las septinas forman un anillo en el lugar de gemación,

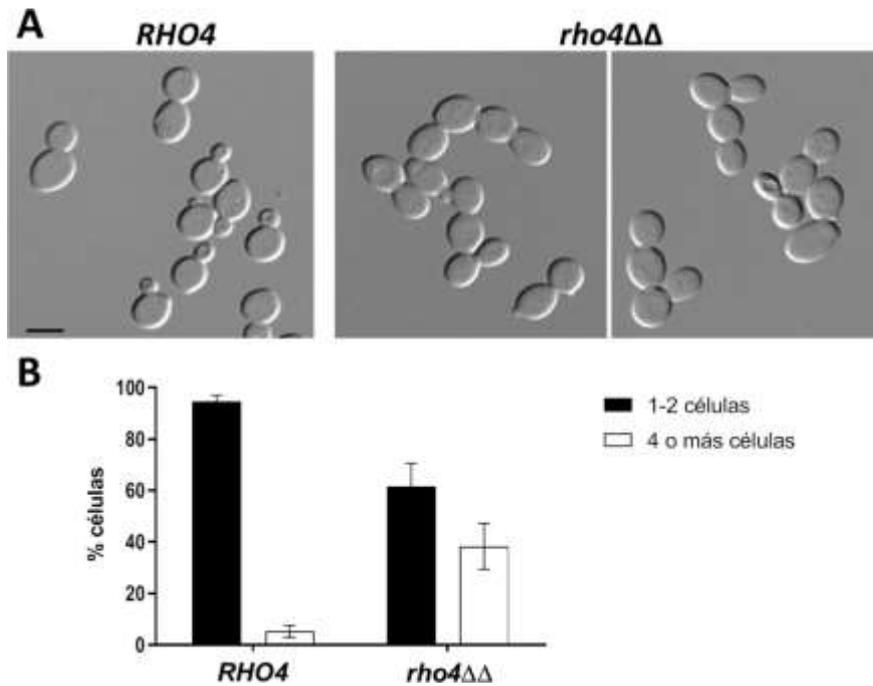


Figura 34. Fenotipo del mutante *rho4ΔΔ* en fase de levaduras (A). Fenotipo durante el crecimiento en forma de levadura de la cepa silvestre (*RHO4*) y el mutante nulo *rho4ΔΔ*. Las células se incubaron en YEPD a 28°C y se recogieron muestras durante el crecimiento en fase exponencial. Imágenes de contraste interferencial (DIC) realizadas mediante microscopía óptica. Barra de escala: 5 μm. **(B).** El mutante *rho4ΔΔ* presenta un alto porcentaje de cadenas de células. El gráfico muestra el porcentaje promedio de cadenas formadas por 4 o más células (blanco) con respecto a células separadas (negro), con la SEM, de, al menos, tres experimentos.

antes de la emergencia de la yema, que luego se reorganiza en un collar con forma de reloj de arena que se extiende por los lados del cuello de la madre y la hija. El collar persiste hasta la citoquinesis, cuando se divide en dos anillos. En la levadura de fisión, las septinas no son esenciales para la viabilidad, pero defectos en su ensamblaje producen un aumento en el porcentaje de cadenas de células, quizás porque retrasan la secreción de las glucanasas necesarias para la disolución del septo primario (An *et al.*, 2004; Martín-Cuadrado *et al.*, 2005). Por tanto, podría existir la posibilidad de que los defectos en separación observados en el mutante *rho4ΔΔ* de *C. albicans* fueran debidos a un defecto en el ensamblaje de los anillos de septinas.

Para analizar esta posibilidad, se marcó una de las septinas con *GFP* en la cepa silvestre y en la mutante. La subunidad elegida fue *CDC12*, una de las dos septinas esenciales en este organismo, y se le fusionó la *GFP* en el extremo carboxilo. Las cepas marcadas se incubaron en medio YEPD a 28°C para su observación al microscopio durante el crecimiento exponencial. Como puede observarse en la Figura 35A, la distribución de *Cdc12* en la cepa mutante era similar a la cepa silvestre, ya que en ambas *Cdc12* se localizaba en el plano de división celular y no se observaban defectos significativos en la estructura de los anillos sencillos o dobles.

Para analizar con un mayor detalle la estructura de los anillos de septinas en ambas cepas, se capturaron series en Z en las que los planos estaban separados por 0,15 μm para tener una mejor resolución espacial. Estas series fueron utilizadas para generar reconstrucciones tridimensionales de anillos sencillos y anillos duplicados en ambas cepas utilizando el programa Imaris. Las imágenes 3D de ambos tipos de anillos de nuevo mostraron que eran similares en la cepa silvestre y en el mutante

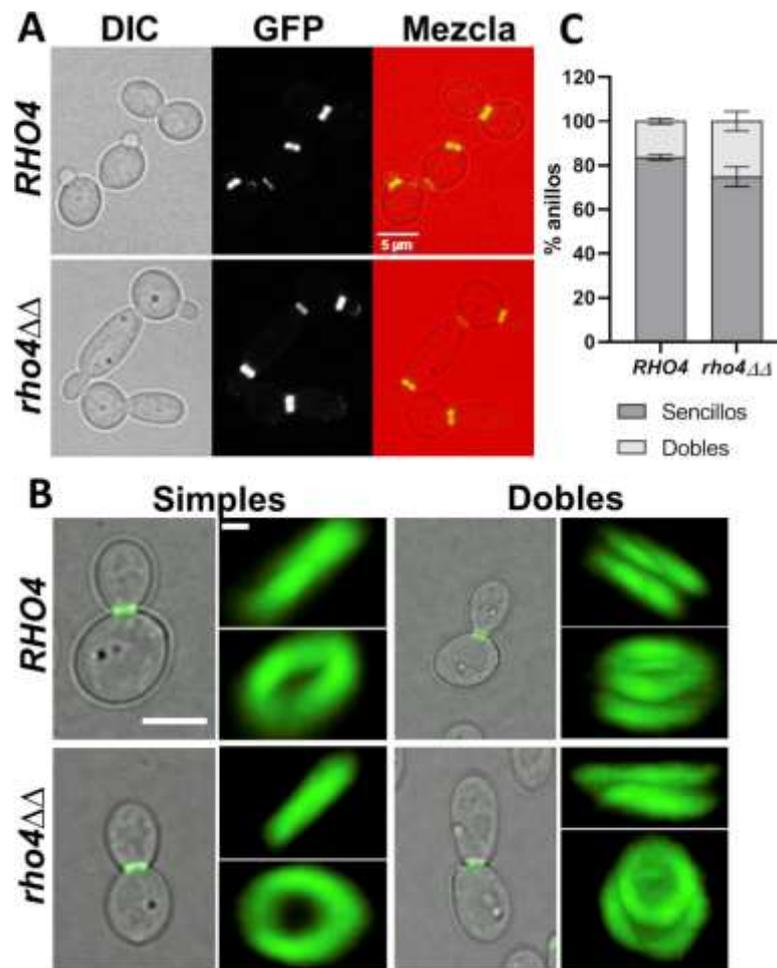


Figura 35. Localización de la septina Cdc12 en el mutante *rho4ΔΔ*. (A). Fenotipo de levaduras de la cepa *CDC12-GFP (RHO4)* (OL2853) y *rho4ΔΔ CDC12-GFP* (OL2851) crecidas a 28°C. Imágenes de contraste interferencial (DIC) y de fluorescencia (GFP, proyección máxima de 6 planos). También se muestra la mezcla de la imagen de DIC (rojo) y Cdc12-GFP (verde). Barra de escala: 5 μm. (B). Reconstrucción 3D de anillos sencillos y dobles de Cdc12-GFP en la cepa *CDC12-GFP (RHO4)* y *rho4ΔΔ CDC12-GFP*. Se adquirieron 11 planos separados por 0,15 μm y las imágenes fueron procesadas con el programa Imaris para generar las reconstrucciones tridimensionales. (C). Porcentaje de anillos sencillos y dobles en la cepa silvestre *CDC12-GFP (RHO4)* y *rho4ΔΔ CDC12-GFP*. La gráfica muestra el porcentaje de anillos de cada tipo de al menos 2 experimentos independientes, con la SEM.

rho4ΔΔ (Figura 35B). Para complementar estas observaciones, se cuantificó el porcentaje de los dos tipos de anillos en ambas cepas (Figura 35C), presentando un porcentaje similar.

Estos resultados sugieren que los defectos en separación en los mutantes *rho4ΔΔ* no se deben a un defecto en el ensamblaje o desensamblaje del anillo de septinas.

3.2. Caracterización de la función de Rho4 durante la filamentación de *C. albicans*.

Con el fin de analizar el fenotipo del mutante *rho4ΔΔ* en condiciones de miceliación, las cepas silvestre y mutante se incubaron en condiciones que inducen la filamentación (YEPD con 10% suero a 37°C) y se tomaron muestras a distintos tiempos de inducción para analizar distintos parámetros, como la respuesta al suero y formación del tubo germinativo en las etapas iniciales o tasa de crecimiento de las hifas en etapas tardías.

Para analizar si la ausencia de Rho4 afectaba a la capacidad para responder a las señales

Resultados

extracelulares que inducen la filamentación, se usaron muestras incubadas durante 45 minutos, tiempo suficiente para que se inicie la filamentación pero insuficiente para la formación del primer septo. En estas muestras se cuantificó el porcentaje de cuerpos celulares que habían iniciado la formación del tubo germinativo frente a los que no habían respondido al estímulo, tanto en la cepa silvestre como en la mutante. Los datos, mostrados en las Figuras 36A y 36B, indican que no existían diferencias estadísticamente significativas entre las dos cepas analizadas, presentando un porcentaje de respuesta muy similar. Por tanto, el mutante *rho4* $\Delta\Delta$ es capaz de responder a suero de igual manera que la cepa silvestre.

Para comprobar si existían defectos en el crecimiento polarizado en etapas más tardías del desarrollo hifal, se analizaron muestras tras 2 horas de incubación en condiciones de filamentación. En este caso se determinó la longitud de las hifas desde el cuerpo celular hasta el ápice como indicación de la tasa de crecimiento polarizado de las hifas. Se observó que tampoco existían diferencias en la longitud de los filamentos de ambas cepas, como se muestra en las Figuras 36C y 36D (34,09 μm en la cepa silvestre frente a 36,18 μm en el mutante *rho4* $\Delta\Delta$). Estos resultados indican que el mutante *rho4* $\Delta\Delta$ no presenta defectos significativos durante el crecimiento polarizado de las hifas.

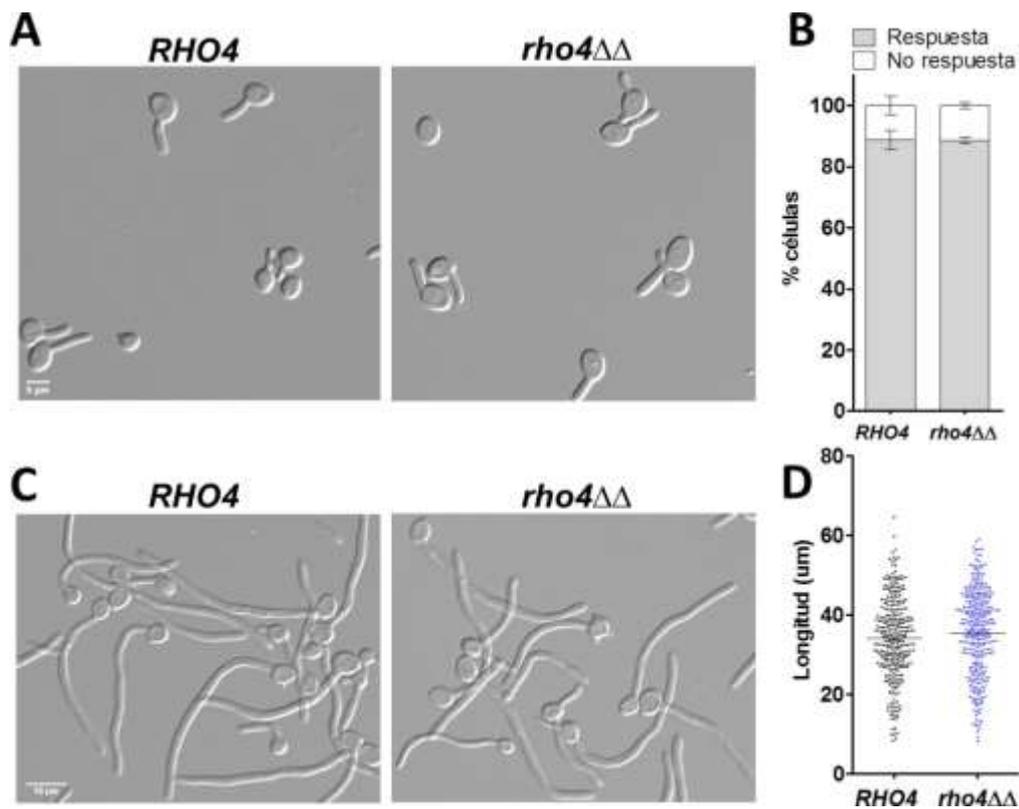


Figura 36. Fenotipo del mutante *rho4* $\Delta\Delta$ durante la filamentación. (A). Imágenes de microscopía de contraste interferencial (DIC) de las cepas silvestre (*RHO4*) (OL1417) y *rho4* $\Delta\Delta$ (OL2824) durante el crecimiento filamentos, tras 45 minutos a 37°C en presencia de suero. Barra de escala: 5 μm . (B). Gráfico donde se representa el porcentaje de células que han respondido a las condiciones de filamentación, tras 45 minutos de crecimiento, con la SEM de al menos 2 experimentos independientes. (C). Imágenes de microscopía de contraste interferencial (DIC) de las cepas silvestre (*RHO4*) y *rho4* $\Delta\Delta$ durante el crecimiento filamentos tras 2 horas a 37°C en presencia de suero. Barra de escala: 10 μm . (D). Representación gráfica de la longitud que alcanzan las hifas en las cepas silvestre (*RHO4*) y *rho4* $\Delta\Delta$ a las 2 horas. La barra horizontal indica la media en cada cepa.

3.3. Caracterización de la función de Rho4 en separación celular durante la filamentación de *C. albicans*.

Como observamos anteriormente, el fenotipo del mutante *rho4* $\Delta\Delta$ en levaduras presenta defectos en separación celular, formando grupos de 3 o 4 células generalmente, a diferencia del silvestre. Para estudiar cómo afectaba la delección de *RHO4* a las etapas tardías del proceso de filamentación, se incubaron células de la cepa *rho4* $\Delta\Delta$ y del control isogénico silvestre en YEPD con suero 10% a 37°C y se visualizaron mediante microscopía a las 3,5 horas de filamentación. La característica más típica del crecimiento hifal es la inhibición de la separación celular tras la citoquinesis, lo que permite mantener los compartimentos hifales unidos formando largos filamentos (Sudbery *et al.*, 2004). Además, los compartimentos subapicales quedan parados en la fase G1 del ciclo celular, y el único que crece activamente es el compartimento apical. Cuando el tiempo de incubación en condiciones de filamentación se alarga, en algunas hifas se produce una reactivación del ciclo celular en los compartimentos subapicales, lo que resulta en la disolución del septo que separa el cuerpo celular del resto de la hifa y en la formación de una yema lateral. Puesto que Rho4 parece implicado en la separación celular durante el crecimiento levaduriforme, se analizó si la ausencia de este gen también afectaba a la separación de las hifas en las etapas tardías de la filamentación. Para ello, se cuantificó el porcentaje de cuerpos separados en la cepa silvestre y en el mutante *rho4* $\Delta\Delta$ (Figura 37A, asteriscos). Como se observa en la Figura 37B, el porcentaje de cuerpos separados en la cepa silvestre tras 3,5 horas de filamentación es de $7,66 \pm 4,75$ mientras que en la cepa *rho4* $\Delta\Delta$ es ligeramente inferior ($6,36 \pm 4,7$ %), aunque esta diferencia no es significativa.

3.3.1. Rho4 es necesario para la separación de las hifas.

Para analizar con más detalle si Rho4 desempeñaba algún papel en la separación de las hifas, se utilizó el mutante *sep7* $\Delta\Delta$. Se ha descrito que las cepas carentes de la septina *SEP7* responden a

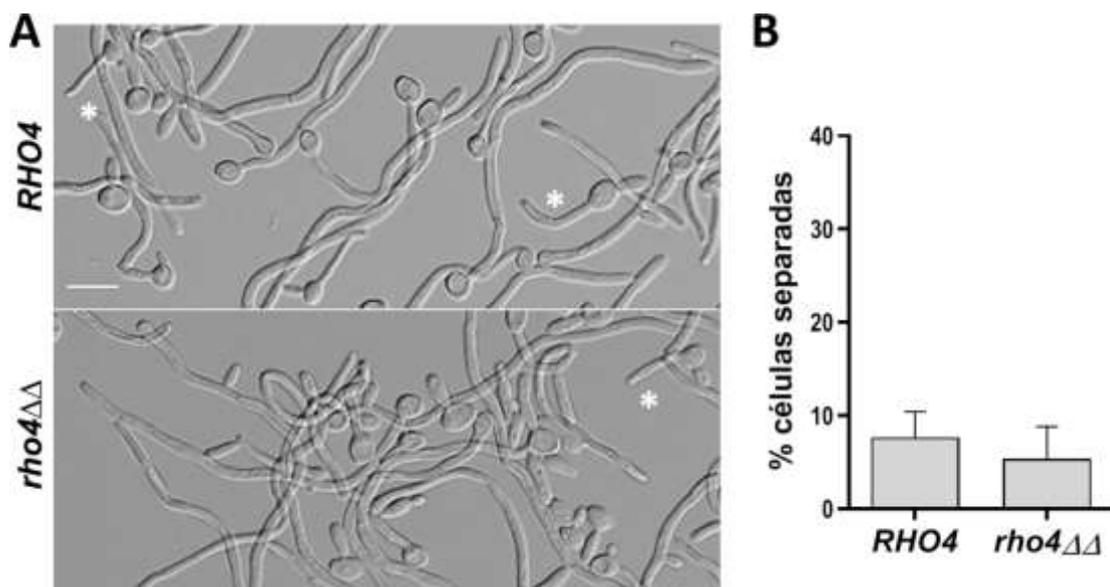


Figura 37. Separación celular en las hifas del mutante *rho4* $\Delta\Delta$. (A) Fenotipo durante el crecimiento en forma de hifas. Las cepas silvestre (*RHO4*) y *rho4* $\Delta\Delta$ se incubaron en condiciones de filamentación durante 3,5 horas. Barra de escala: 10 μ m. (B) Representación gráfica del porcentaje de cuerpos celulares separados del resto de la hifa en ambas cepas. Los datos muestran la media \pm SEM de al menos 3 experimentos independientes.

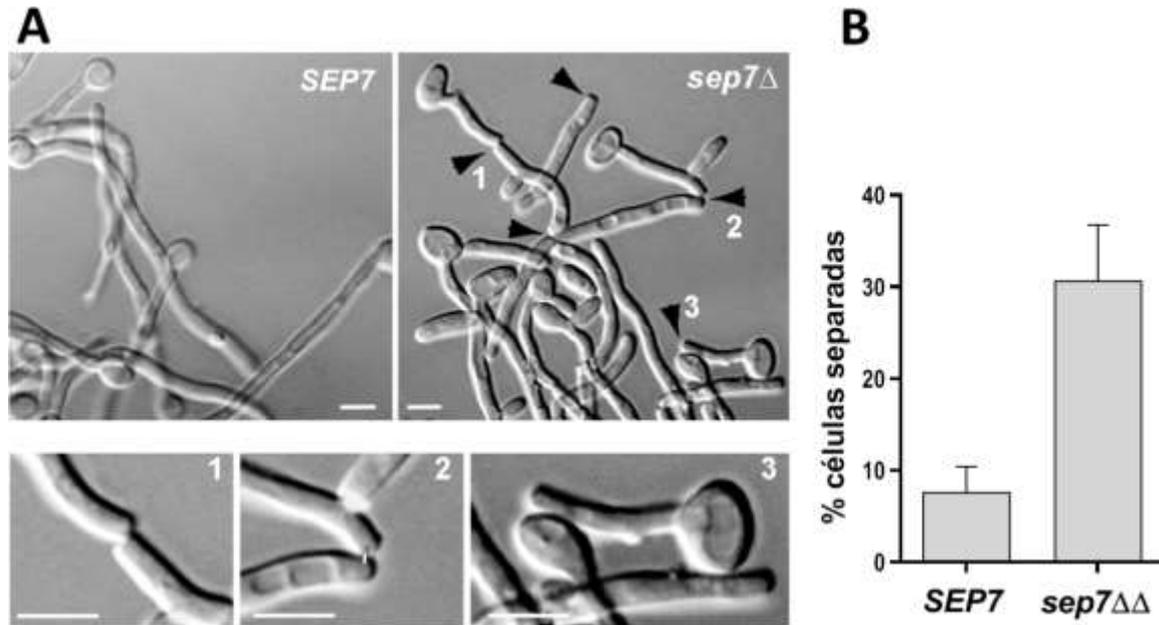


Figura 38. El mutante *sep7ΔΔ* activa prematuramente la separación celular durante la filamentación. (A) Imágenes de hifas silvestres (*SEP7*) y *sep7ΔΔ* tras 3 horas en condiciones de filamentación. Las regiones señaladas con los números “1, 2, 3” se encuentran ampliadas en los recortes inferiores. Barra de escala: 5 μm. Figura tomada de González-Novo *et al.*, 2008. **(B).** El gráfico muestra el porcentaje medio ± SEM de cuerpos basales separados en la cepa silvestre (*SEP7*) y en el mutante *sep7ΔΔ* tras 3,5 horas en condiciones de filamentación de al menos 3 experimentos independientes.

las señales que inducen la filamentación formando hifas normales, pero los compartimentos subapicales reinician el crecimiento y gemación lateral mucho antes que la cepa silvestre, por lo que el tubo germinativo comienza a separarse total o parcialmente del cuerpo celular (González-Novo *et al.*, 2008)(Figura 38A). En la cepa *sep7ΔΔ*, la degradación del septo primario durante el crecimiento hifal ocurre mucho antes que en la cepa silvestre, por lo que los porcentajes de cuerpos celulares separados del resto de la hifa son mucho mayores (Figura 38B).

Por tanto, el mutante *sep7ΔΔ* es una buena herramienta para determinar si Rho4 también es necesario para activar la separación celular en hifas. Si Rho4 participara en el proceso de secreción dirigida al septo durante el crecimiento hifal, cabría esperar que la delección de este gen redujera, total o parcialmente, el alto porcentaje de hifas separadas que se observa en la cepa carente de *SEP7*. Por tanto, se reemplazó la región codificante completa del gen *SEP7* en cada uno de los alelos por los casetes LHL y LAL (Dueñas-Santero *et al.*, 2019) en la cepa *rho4ΔΔ*. El mutante doble *sep7ΔΔ rho4ΔΔ* se incubó en YEPD con suero 10% a 37°C para inducir la filamentación. Posteriormente, se fijaron las muestras de hifas silvestres, de los mutantes simples *rho4ΔΔ* y *sep7ΔΔ* y del doble mutante *rho4ΔΔ sep7ΔΔ* a las 3,5 horas tras la inducción de la filamentación y se determinó el porcentaje de filamentos completos frente a cuerpos celulares separados.

Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 39. Como se ha descrito previamente, el porcentaje de cuerpos celulares separados a las 3,5 horas de filamentación fue del 7,6 % en la cepa silvestre y cercano al 30% en el mutante *sep7ΔΔ* (González-Novo *et al.*, 2008). El mutante *rho4ΔΔ* mostró una ligera reducción respecto a la cepa silvestre, como se comentó previamente. Finalmente, el porcentaje de cuerpos celulares aislados que se observó en el doble mutante *sep7ΔΔ rho4ΔΔ* fue de

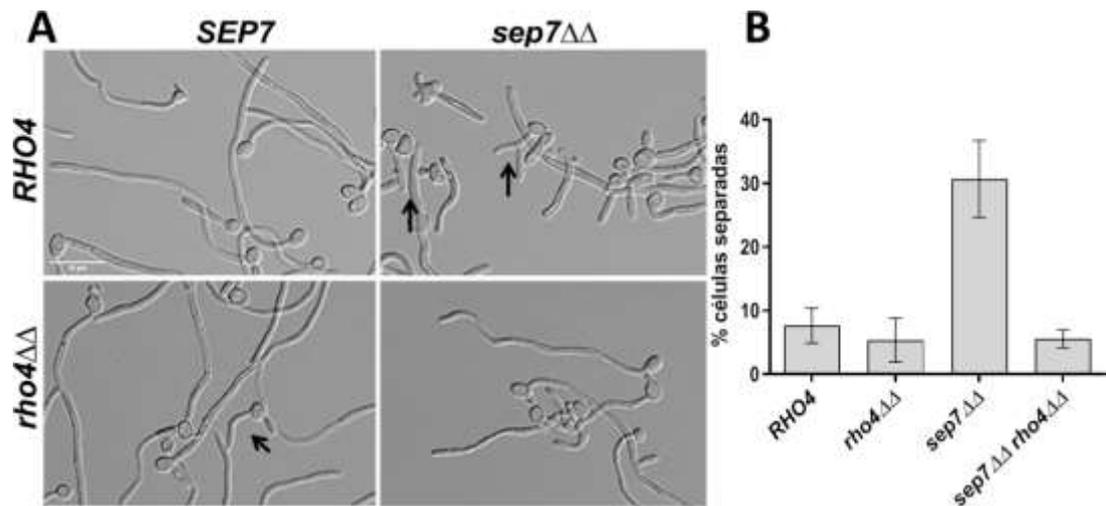


Figura 39. El mutante *rho4ΔΔ* suprime el defecto en separación de la cepa *sep7ΔΔ*. (A) Imágenes de microscopía interferencial (DIC) de la cepa silvestre (*RHO4*), *rho4ΔΔ*, *sep7ΔΔ*, y el doble mutante *rho4ΔΔ sep7ΔΔ* tras 3,5 horas en condiciones de filamentación. Barra de escala: 10 μm. Las flechas indican cuerpos celulares separados del resto de la hifa. (B). El doble mutante *rho4ΔΔ sep7ΔΔ* presenta un porcentaje de separación celular similar al de la cepa silvestre y al del mutante *rho4ΔΔ*, a diferencia del mutante *sep7ΔΔ* tras 3,5 horas de inducción de la filamentación. Los datos muestran la media ± SEM de 3 experimentos independientes.

5,57 ± 2,5 %, similar al del mutante *rho4ΔΔ* y al de la cepa silvestre (Figura 39B). Por tanto, estos datos indican que la delección de *RHO4* suprime el defecto del mutante *sep7ΔΔ* y que Rho4 es necesario para la correcta activación de la separación celular en las etapas tardías del proceso de filamentación, de forma similar a lo que ocurre durante el crecimiento en forma de levaduras, posiblemente implicado en la secreción de enzimas a la región del septo.

3.4. Rho4 se localiza en los septos y como puntos dinámicos en el córtex celular.

Con el fin de estudiar la localización de Rho4 se llevó a cabo la construcción de una cepa con la proteína Rho4 marcada con GFP bajo el control de su propio promotor. Rho4, como todas las GTPasas, contiene un sitio de prenilación en el extremo C-terminal que es esencial para su anclaje a membranas (Figura 40A) (Pérez y Rincón, 2010), por lo que es necesario marcarla introduciendo la GFP en el extremo N-terminal. Por tanto, se construyó un plásmido que contenía el promotor de *RHO4* (*RHO4p*) delante de la región codificante de la *GFP* y se utilizó para insertar esta construcción en el locus *RHO4* del genoma de una cepa heterocigótica *RHO4/rho4Δ* mediante recombinación homóloga. Cuando se analizó la fluorescencia de la cepa *RHO4p-GFP-RHO4* mediante microscopía confocal, se comprobó que no era posible visualizar la proteína recombinante, aunque se probaron diferentes condiciones para obtener las imágenes (Figura 40B). Adicionalmente, se observó que esta cepa presentaba un fenotipo similar al del mutante nulo *rho4ΔΔ*, con un aumento significativo en el número de grupos de células respecto a la cepa control (Figura 40B). Estos resultados parecían indicar que la construcción *RHO4p-GFP-RHO4* no se expresa correctamente o que la proteína de fusión no es funcional.

Para conseguir visualizar la proteína Rho4 en células vivas se utilizaron dos plásmidos diferentes que permiten marcar las proteínas en el extremo N-terminal con distintos promotores, los plásmidos pFA-CdHIS1-AgTEFp-GFP(GA)6 y pFA-CaHIS1-MAL2p-GFP(GA)6 (Schaub *et al.*, 2006). El

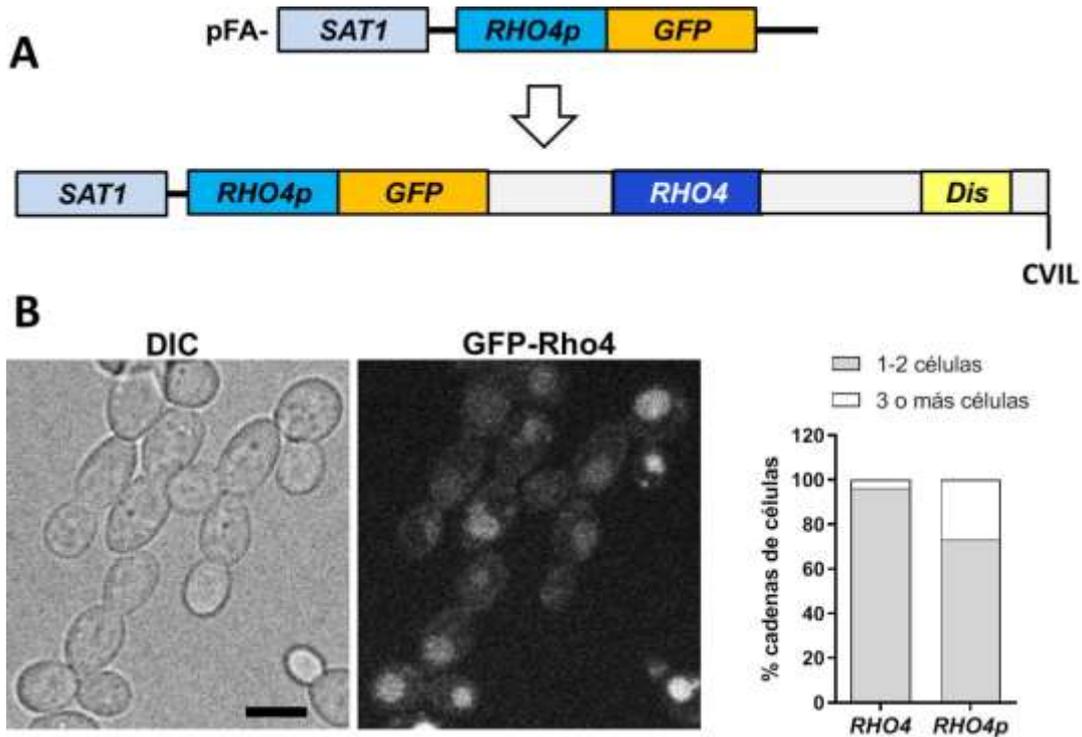


Figura 40. (A). Esquema del plásmido pFA-SAT1-RHO4p-GFP usado para marcar *RHO4* con GFP bajo en control de su propio promotor (*RHO4p*) y de la construcción resultante tras insertarlo en el locus *RHO4* del genoma. Se indican los dominios RHO4 (azul oscuro) y la región desordenada (amarillo), así como la señal de prenilación del extremo C-terminal. **(B).** Fenotipo de la cepa *RHO4p-GFP-RHO4/rho4Δ* crecida en YEPD a 28°C. Se muestran imágenes de campo claro (DIC) y fluorescencia (GFP-Rho4). Barra de escala: 5 μm. El gráfico representa los porcentajes de células formando grupos en la cepa silvestre (*RHO4*) y en la que contiene la construcción *RHO4p-GFP-RHO4* (*RHO4p*).

plásmido pFA-CdHIS1-AgTEFp-GFP(GA)6 contiene el marcador de selección *HIS1* de *Candida dubliniensis* y el promotor constitutivo del gen *TEF1* de *Ashbya gossypii* (*TEFp*) controlando la expresión de la GFP (Figura 41A). Tras la región codificante de la GFP hay un conector (*linker*) de seis repeticiones de los aminoácidos glicina (G) y alanina (A), para permitir el correcto plegamiento de la proteína de fusión. El plásmido pFA-CaHIS1-MAL2p-GFP(GA)6 es similar al anterior, con la diferencia de que contiene el marcador de selección *HIS1* de *C. albicans* y el promotor inducible del gen *MAL2* (*MAL2p*), activado en presencia de maltosa (Figura 41A). Estos dos plásmidos fueron amplificados utilizando oligonucleótidos que contenían regiones de unos 100 nucleótidos correspondientes a la región promotora de *RHO4* y a los primeros nucleótidos de la región codificante y se utilizaron para insertar la GFP por recombinación homóloga en el genoma de la cepa heterocigótica *RHO4/rho4Δ*.

Cuando se analizó la fluorescencia de ambas cepas, se observó que Rho4 se localizaba como puntos en la membrana celular y también en el cuello entre la célula madre y la hija (Figura 41B y C). Sin embargo, en el caso de la cepa *AgTEFp-GFP-RHO4/rho4Δ*, la intensidad de la fluorescencia era relativamente baja y sólo se observaba en un bajo porcentaje de células. Además, el fenotipo de esta cepa también se parecía al del mutante *rho4ΔΔ*, ya que existía un porcentaje elevado de cadenas de 3-4 células (Figura 41B). Puesto que la proteína GFP-Rho4 era la única forma presente en la cepa *AgTEFp-GFP-RHO4/rho4Δ*, estos resultados indicaban que el nivel de expresión que se obtenía usando el promotor *TEF1* de *A. gossypii* no era suficiente para corregir el defecto de separación del mutante *rho4ΔΔ*.

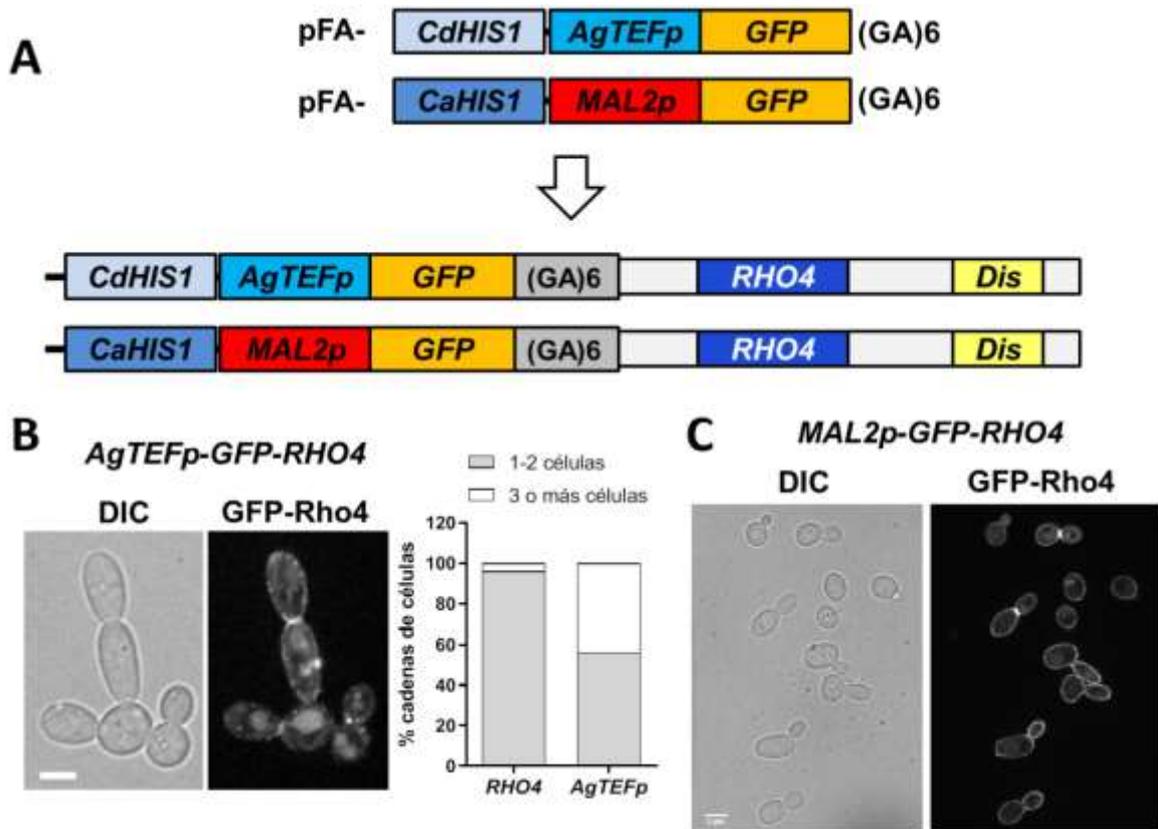


Figura 41. Distintas construcciones para marcar *RHO4* con *GFP* (A). Esquema de los plásmidos pFA-CdHIS1-AgTEFp-GFP(GA)6 y pFA-CaHIS1-MAL2p-GFP(GA)6 usados para marcar *RHO4* con *GFP* bajo en control de promotores heterólogos y de la construcción resultante tras insertarlos en el locus *RHO4* del genoma. Se indican los dominios *RHO4* (azul oscuro) y la región desordenada (amarillo) (B). Fenotipo de la cepa *AgTEFp-GFP-RHO4/rho4Δ* crecida en YEPD a 28°C. Barra de escala: 5 μm. El gráfico representa los porcentajes de células formando grupos en la cepa silvestre (*RHO4*) y en la que contiene la construcción *AgTEFp-GFP-RHO4* (*AgTEFp*). (C). Morfología de la cepa *MAL2p-GFP-RHO4/rho4Δ* incubada en medio YNB con maltosa como fuente de carbono y visualización al microscopio de fluorescencia de GFP-Rho4. Barra de escala: 5 μm.

En el caso de la cepa *MAL2p-GFP-RHO4/rho4Δ*, se incubó en medio YNB (con los suplementos de aminoácidos necesarios) y maltosa como fuente de carbono para inducir el promotor *MAL2*. Mediante análisis por microscopía se pudo determinar que Rho4 se localizaba en el córtex celular y también en el cuello entre la célula madre y la hija durante la citoquinesis. Con esta construcción, era posible observar la fluorescencia en la mayoría de las células, que presentaban un fenotipo silvestre con ausencia de grupos de células, indicando que la proteína GFP-Rho4 era funcional y se expresaba correctamente bajo el control de este promotor inducible (Figura 41C). Cuando se analizó la localización de GFP-Rho4 en el córtex celular, se comprobó que formaba puntos o parches, la mayoría de los cuales eran altamente dinámicos como se puede comprobar en el experimento mostrado en la Figura 42, en el que se capturaron imágenes de un único plano de la célula cada 2 segundos.

Para determinar con mayor precisión el momento en el que Rho4 aparecía en el septo, se marcó la subunidad *CDC10* del anillo de septinas con la proteína fluorescente mCherry en la cepa *MAL2p-GFP-RHO4/rho4Δ*. Una vez construida la cepa, se realizaron estudios de microscopía a lo largo del tiempo para analizar con detalle el patrón temporal de la localización de GFP-Rho4 en la región del cuello, utilizando la duplicación del anillo de septinas como marcador temporal del inicio de la citoquinesis. Estos estudios mostraron que Rho4 aparecía en el cuello en el momento en que el anillo

Resultados

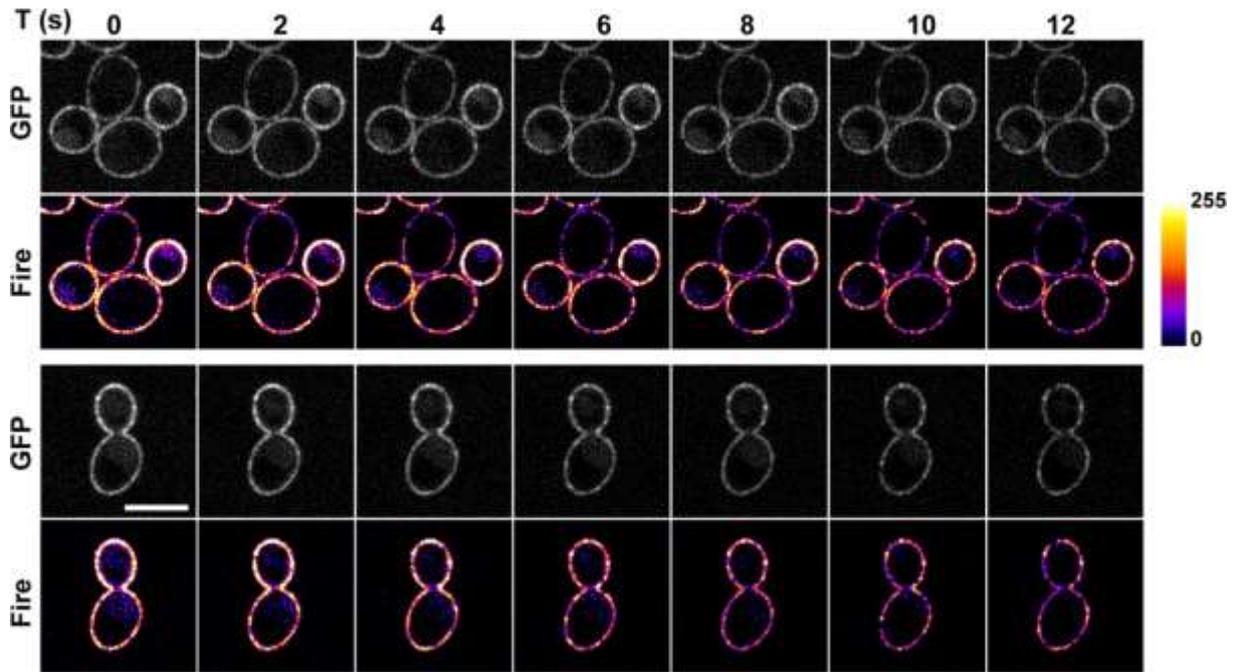


Figura 42. La localización de Rho4 en el córtex celular es altamente dinámica. Análisis por microscopía de fluorescencia a lo largo del tiempo de la fluorescencia de GFP-Rho4 en células de levadura de la cepa *MAL2p-GFP-RHO4/rho4Δ* crecida en YEP con maltosa a 28°C. Las imágenes son un único plano en el centro de la célula capturadas a los tiempos indicados (segundos). Barra de escala: 5 μ m. Se muestra también las mismas imágenes coloreadas en falso usando la tabla LUT Fire de ImageJ, según indica la escala de la derecha.

de septinas se engrosaba y comenzaba a duplicarse (Figura 43, flecha). Cuando se determinó el tiempo de llegada a esta región, se comprobó que Rho4 se detectaba unos $2,5 \pm 2,56$ minutos ($n=19$) antes de la duplicación del anillo de septinas. Esta localización era transitoria, pues Rho4 permanecía unos $13,68 \pm 2,81$ minutos ($n=19$) en el septo antes de que la fluorescencia desapareciera. Estos resultados indican que Rho4 se localiza en la región del septo en las etapas finales del ciclo celular, durante la citoquinesis, lo que concuerda perfectamente con un papel en el proceso de separación de las células madre e hija.

La localización de Rho4 durante el proceso de filamentación también fue analizada mediante microscopía. Para ello, se indujo la filamentación de la cepa *MAL2p-GFP-RHO4/rho4Δ CDC10-mCherry/CDC10* en medio YEP con suero y maltosa como fuente de carbono y se analizó la fluorescencia a los 45 y 90 minutos después de la inducción. En las etapas iniciales de este proceso morfogénico, Rho4 también se localizaba asociado a la membrana celular, formando puntos más o menos definidos (Figura 44A). En algunas de las hifas incipientes, era posible observar un gradiente de intensidad de la fluorescencia de GFP-Rho4, que parecía más intensa en el ápice de la hifa y se iba reduciendo a medida que se acercaba hacia el cuerpo celular. Este gradiente es claramente visible cuando se colorea en falso la imagen utilizando la tabla LUT Fire de ImageJ, como se muestra en la Figura 44B (célula 1). Cuando se prolongaba la incubación en condiciones de filamentación, en algunas hifas se mantenía la polarización de Rho4 (Figura 44B, célula 3), aunque en otras esa polarización era menos evidente (Figura 44B, célula 2). Además de la localización cortical, GFP-Rho4 estaba presente en algunos septos de la hifa (Figura 44A, flecha), aunque no en todos, posiblemente debido a que su asociación con esta estructura sea transitoria, como ocurre en levaduras.

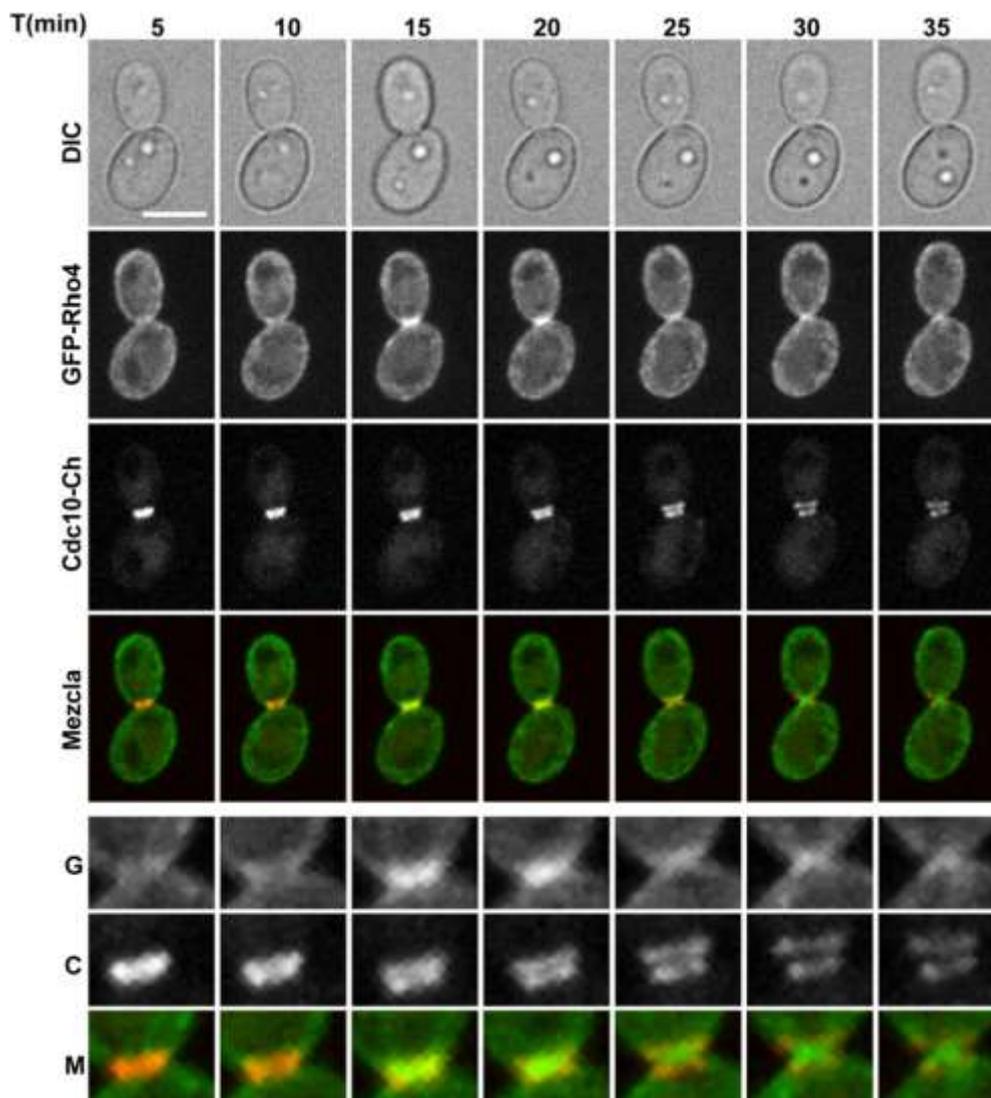


Figura 43. Rho4 se localiza en el cuello en el momento de la duplicación del anillo de septinas. Análisis por microscopía a lo largo del tiempo de fluorescencia de la septina Cdc10-mCherry y GFP-Rho4 en levaduras de la cepa *MAL2p-GFP-RHO4/rho4Δ CDC10-mCherry/CDC10* (OL2924) incubada en YEP con maltosa a 28°C. Mezcla: Cdc10-mCherry (rojo) + GFP-Rho4 (verde). Las imágenes son la proyección máxima de 3 planos adquiridos cada 0,5 μm , y cada 5 minutos. Barra de escala: 5 μm . En la parte inferior se muestra un aumento de la zona del cuello a lo largo del tiempo. La punta de la flecha indica el momento en el que Rho4 es visible en el cuello.

Para analizar con detalle el patrón de asociación de Rho4 al septo de las hifas, de nuevo se realizaron experimentos de microscopía a lo largo del tiempo. Estos experimentos mostraron que la asociación de Rho4 al septo era transitoria y ocurría casi simultáneamente con la duplicación del anillo de septinas (Figura 45), de forma similar a lo que ocurre en levaduras. Cuando se analizó el momento de asociación con el anillo de septinas, se comprobó que ocurría unos $1,07 \pm 3,15$ minutos después de la duplicación del anillo, y que el tiempo de permanencia en el septo de las hifas era de $17,86 \pm 3,95$ minutos ($n= 28$ hifas en ambos casos).

Los resultados obtenidos sobre la localización de Rho4 y el patrón temporal de asociación con el septo, tanto en levaduras como en hifas, concuerdan perfectamente con el hecho de que Rho4 desempeñe un papel en el proceso de separación celular.

Resultados

3.4.1. La localización de Rho4 no se encuentra afectada en los mutantes *sep7* $\Delta\Delta$.

Dadas las interacciones genéticas observadas entre Rho4 y Sep7, se analizó si la localización de Rho4 se veía afectada por la ausencia de la septina Sep7. Para ello, se marcó Rho4 con GFP como se ha descrito anteriormente en el mutante *sep7* $\Delta\Delta$, generando la cepa *MAL2p-GFP-RHO4/RHO4 sep7* $\Delta\Delta$. Esta cepa se incubó en condiciones de filamentación durante dos horas (YEP con maltosa y suero a 37°C), momento en que las células fueron analizadas mediante microscopía de fluorescencia.

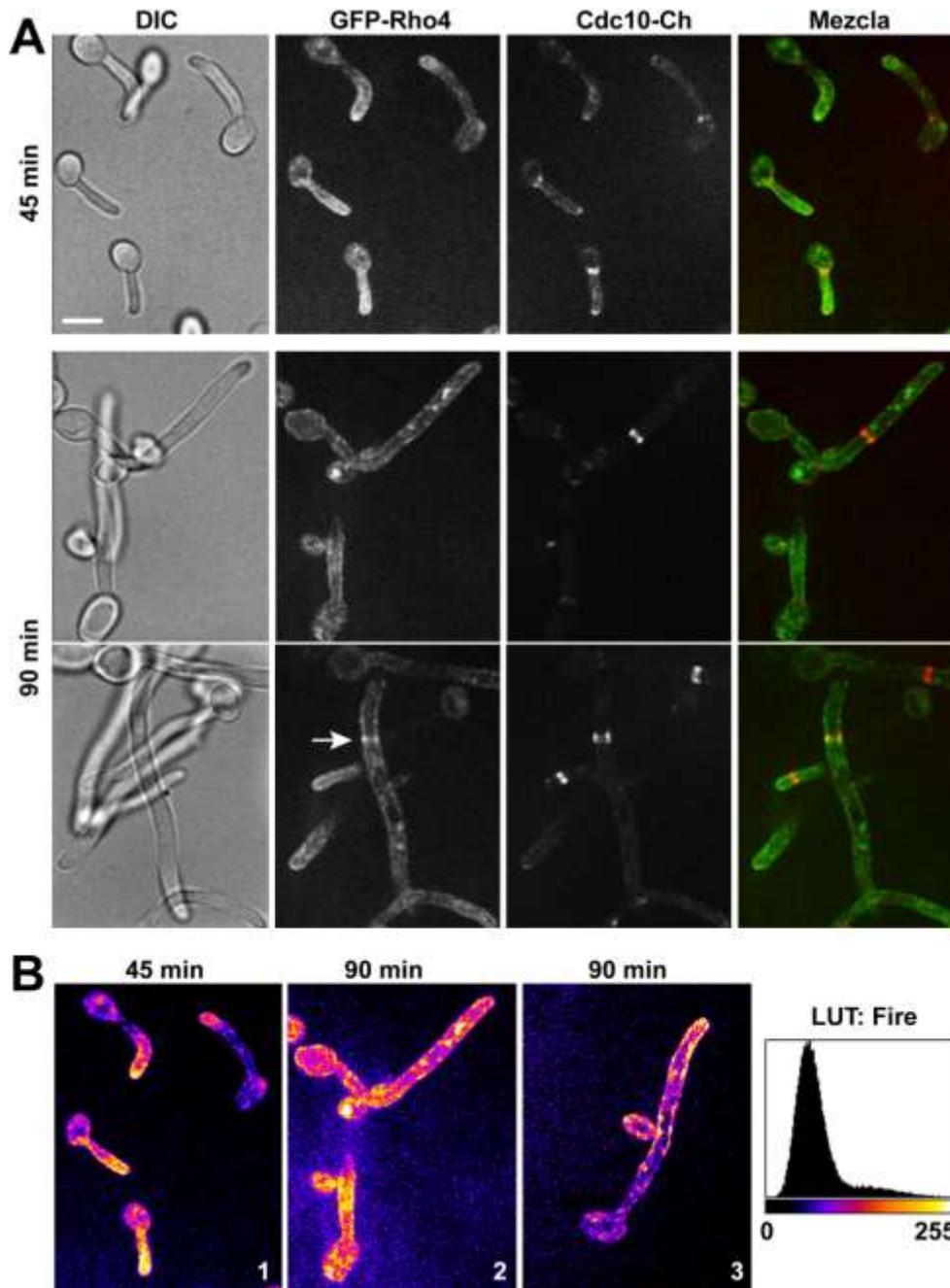


Figura 44. Rho4 se localiza en la membrana y en el septo en hifas. (A) Localización de GFP-Rho4 en hifas de la cepa *MAL2p-GFP-RHO4/rho4* Δ *CDC10-mCherry/CDC10* (OL2924) incubadas en YEP con maltosa a 37°C en presencia de suero durante 45 y 90 minutos. Mezcla: Cdc10-mCherry (rojo) + GFP-Rho4 (verde). Las imágenes son la proyección máxima de 3 planos adquiridos cada 0,5 μ m. Barra de escala: 5 μ m. La flecha indica la localización Rho4 en el septo. **(B)** Imágenes de la fluorescencia de GFP-Rho4 durante el desarrollo hifal. Las imágenes se han coloreado en falso usando la tabla LUT Fire de ImageJ, según indica la escala de la derecha.

Como puede observarse en la Figura 46, es posible visualizar GFP-Rho4 en los septos de las hifas, de forma similar a lo descrito en la cepa silvestre (Figura 44). Por tanto, Sep7 no es necesario para la asociación de Rho4 al septo de las hifas.

3.4.2. La localización de Rho4 no depende de la actividad de Cbk1.

Como se ha descrito anteriormente, Rho4 se localiza transitoriamente en los septos, tanto en levaduras como en hifas, en el córtex de las yemas en crecimiento y en el ápice de las hifas. Ya que Rho4 es un posible sustrato de Cbk1, esta localización podría verse afectada en un mutante carente de

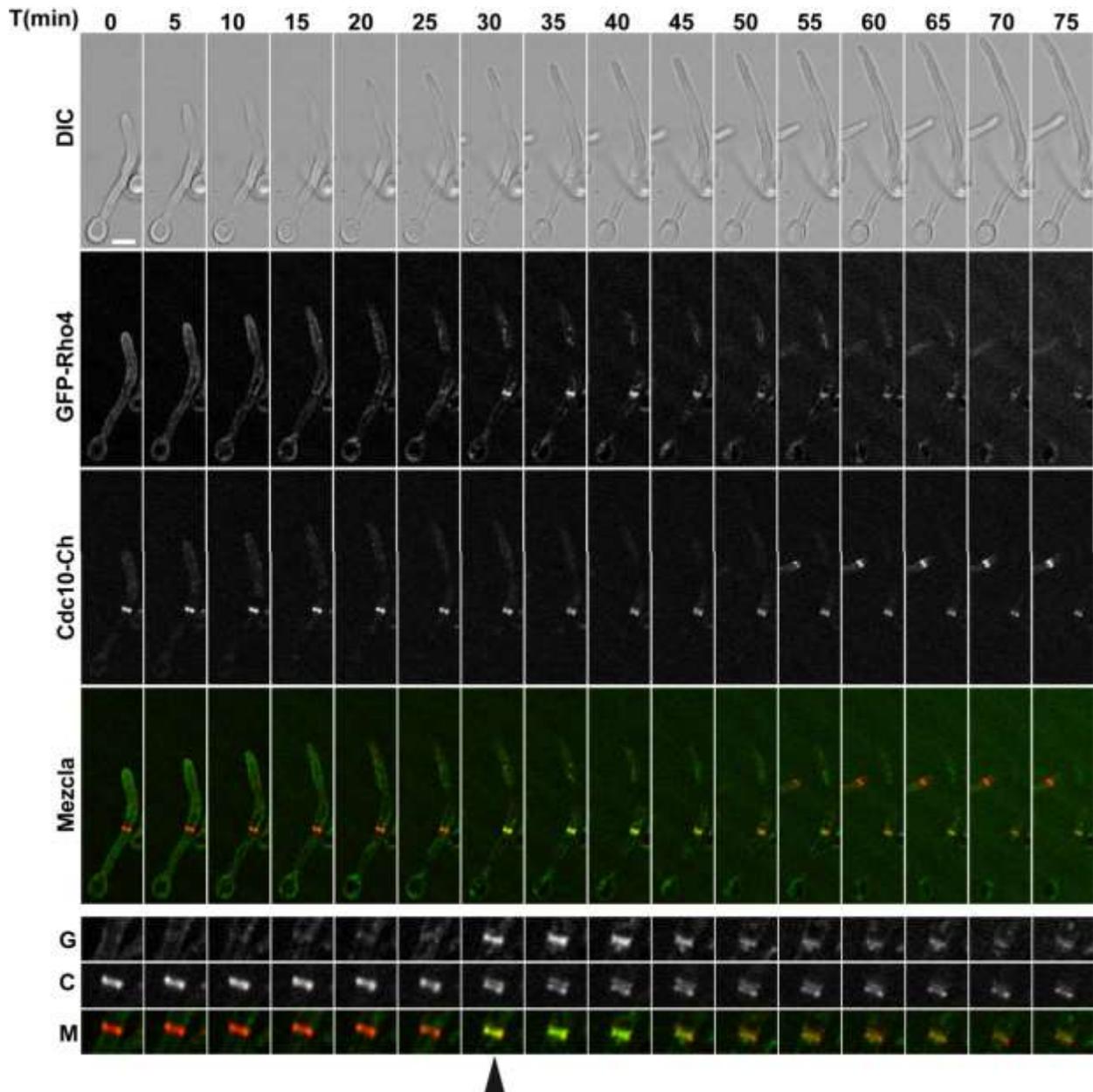


Figura 45. Rho4 aparece en el cuello en el momento de la duplicación del anillo de septinas. Análisis por microscopía de fluorescencia a lo largo del tiempo de la septina Cdc10-mCherry y GFP-Rho4 en hifas de la cepa *MAL2p-GFP-RHO4/rho4Δ CDC10-mCherry/CDC10*. La inducción de la filamentación se realizó en YEP con maltosa y suero 10% a 37°C y se incubaron durante dos horas antes de comenzar el experimento. Mezcla: Cdc10-mCherry (rojo) + GFP-Rho4 (verde). Las imágenes son la proyección máxima de 5 planos adquiridos cada 0,5 μm , y cada 5 minutos. El triángulo señala el momento de la duplicación del anillo de septinas. Barra de escala: 5 μm . En la parte inferior se muestra una ampliación de la zona del cuello a lo largo del tiempo.

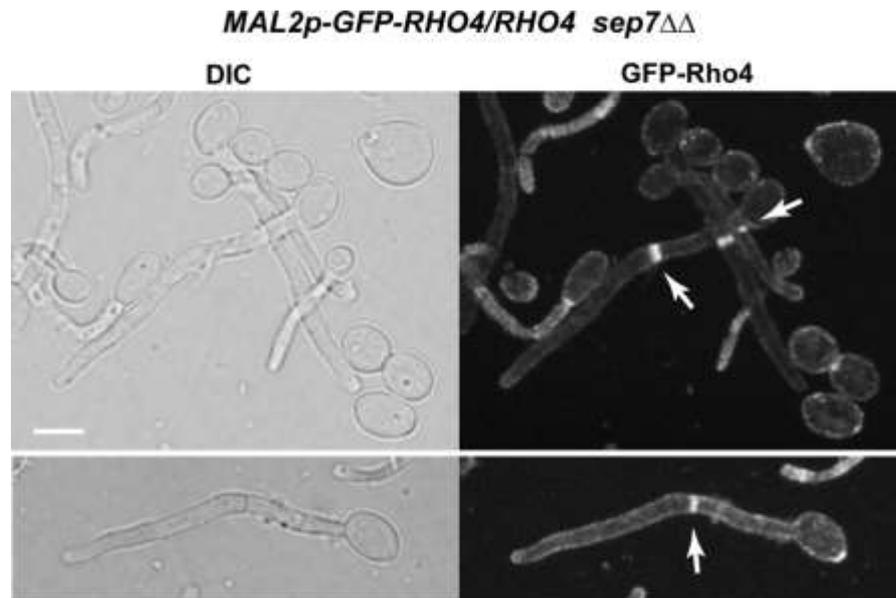


Figura 46. La localización de Rho4 no se ve alterada por la ausencia de la septina Sep7 durante la filamentación. Análisis por microscopía de contraste interferencial (DIC) y de fluorescencia de GFP-Rho4 en hifas de la cepa *MAL2p-GFP-RHO4/RHO4 sep7ΔΔ* (OL2982) crecidas en YEP con maltosa y suero a 37°C durante 2 horas. Las imágenes de fluorescencia son la proyección máxima de 3 planos adquiridos cada 0,5 μm. Las flechas indican la localización de GFP-Rho4 en el septo. Barra de escala: 5 μm.

esta actividad kiinasa. Para estudiar esta posibilidad, se marcó Rho4 con la proteína fluorescente GFP, usando la misma construcción que en las cepas anteriores (con el promotor del gen *MAL2*), en la cepa *cbk1-as/cbk1Δ*. Los transformantes se incubaron en condiciones que inducen el crecimiento levaduriforme (YEP con maltosa a 28°C) o la filamentación (YEP con maltosa y suero a 37°C) antes de añadir el análogo 1NM-PP1 o DMSO a los cultivos.

Como puede observarse en la Figura 47, la distribución de Rho4 no se veía alterada significativamente tras la inhibición de la actividad de Cbk1, ya que se observaba tanto asociada a los anillos de septinas como al córtex celular. La única diferencia observada fue que, en levaduras, la fracción de GFP-Rho4 asociada a la membrana plasmática parecía ser un poco más abundante que en presencia de DMSO y se distribuía de forma más homogénea a lo largo de las células madre e hija. Este defecto posiblemente sea debido a la pérdida de la polaridad que tiene lugar en ausencia de Cbk1. Aunque no se ha analizado si la ausencia de la actividad kinasa Cbk1 afecta al tiempo de permanencia de Rho4 en el cuello de las células, estos resultados ponen de manifiesto que Rho4 es capaz de concentrarse en esta región de la célula de forma similar a la cepa silvestre, lo que indica que Cbk1 no es esencial para su asociación al anillo de septinas.

3.5. Los posibles sitios de fosforilación por Cbk1 son importantes en levaduras e hifas.

Como se comentó en el Capítulo 1, el análisis de la secuencia de Rho4 muestra que posee 3 sitios de fosforilación que se ajustan al consenso descrito para las NDR quinasas como Cbk1 (Mazanka *et al.*, 2008) en los residuos S274, S278 y S292 (Figura 19 y 48A), que se localizan juntos cerca del extremo C-terminal. En el estudio global del fosfoproteoma de *C. albicans* durante la filamentación (Willger *et al.*, 2015) se encontró que Rho4 (Cr1) está fosforilada en siete serinas o

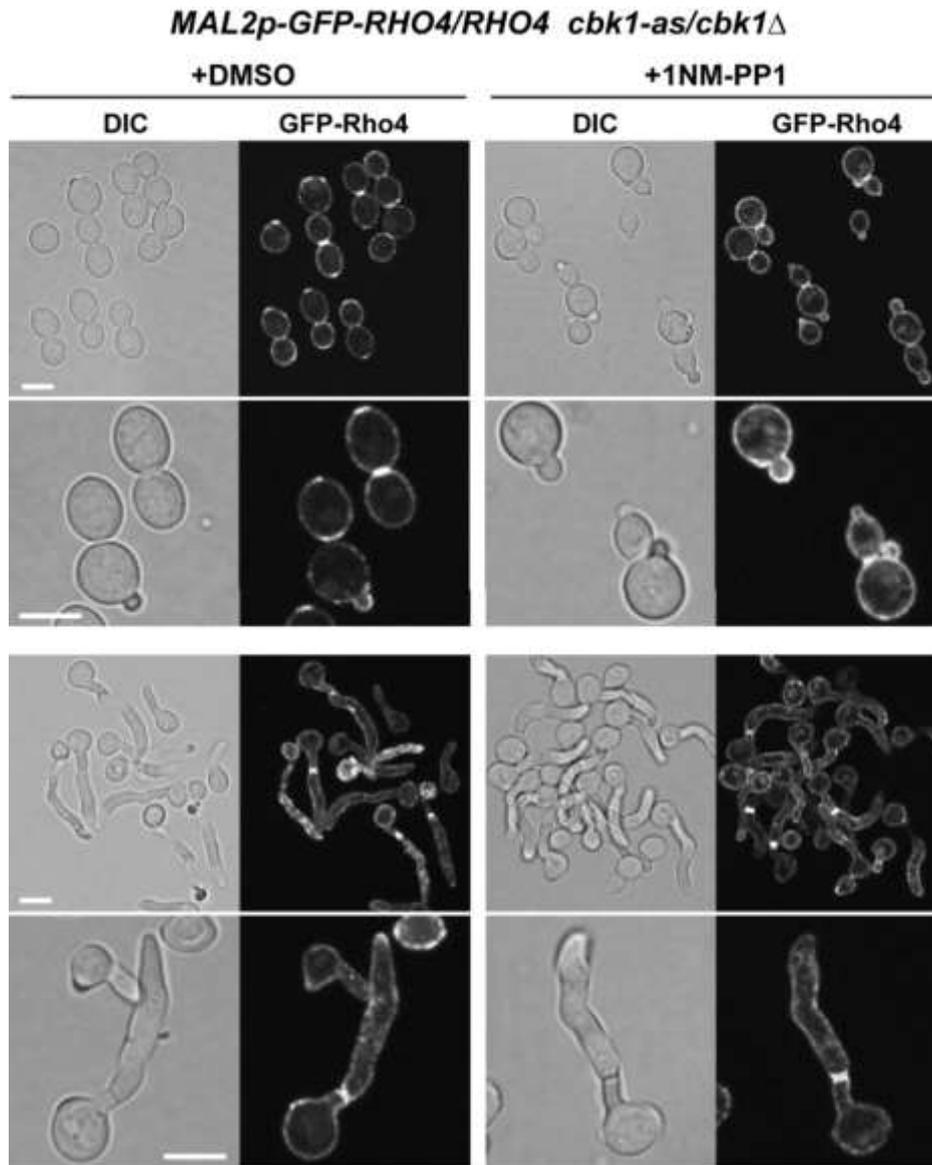


Figura 47. La localización de Rho4 no se ve alterada en ausencia de la actividad kinasa de Cbk1. Análisis por microscopía de contraste interferencial (DIC) y de fluorescencia de GFP-Rho4 en levadura e hifas de la cepa *cbk1-as/cbk1Δ MAL2p-GFP-RHO4/RHO4* (OL2922) crecidas a 37°C en presencia de suero. Las células de levaduras fueron incubadas en YEP con maltosa a 28°C durante 2 horas en presencia de DMSO o de 25 μM 1NM-PP1. Para las hifas, se indujo la filamentación durante 2 horas en YEP con maltosa a 37°C antes de añadir DMSO o 25 μM 1NM-PP1 y se continuó la incubación 30 minutos más. Se muestran imágenes de campos de células y detalles de células individuales. Las imágenes de fluorescencia son la proyección máxima de 3 planos adquiridos cada 0,5 μm. Barras de escala: 5 μm.

treoninas en esta fase del crecimiento, y una de ellas coincide con una de las posibles dianas de Cbk1 (S292). Por tanto, se decidió investigar si los tres residuos potencialmente sustratos de Cbk1 eran importantes para la función de Rho4. Para abordar este objetivo, las serinas en posiciones 274, 278 y 292 se sustituyeron por el residuo no fosforilable alanina o por ácido glutámico mediante la técnica de PCR recombinante, diseñando oligonucleótidos que introducían los cambios a Ala (A) o a Glu (E) que se usaron para amplificar el gen *RHO4* desde el genoma. Los fragmentos recombinantes con las mutaciones se clonaron en el vector pFA-ARG4 (Gola *et al.*, 2003) para su posterior inserción en el genoma de la cepa *RHO4/rho4Δ* (Figura 48B), generando las cepas mutantes *rho4-3A/rho4Δ* y *rho4-3E/rho4Δ*. La presencia de las mutaciones en el genoma se confirmó por secuenciación.

Resultados

Para comprobar si las proteínas mutantes se expresaban al mismo nivel que la silvestre y si existían diferencias en el patrón de movilidad electroforética entre las distintas variantes, se marcaron las distintas variantes con el epítipo *c-myc* en el extremo amino. Para ello, se construyó el plásmido pFA-CdHIS1-MAL2p-myc(GA)₆ para marcar la proteína Rho4 con el epítipo *c-myc* en su extremo N-terminal en las distintas cepas heterocigóticas (*RHO4/rho4Δ*, *rho4-3A/rho4Δ* y *rho4-3E/rho4Δ*). De esta forma, se generaron las cepas *MAL2p-myc-RHO4/rho4Δ*, *MAL2p-myc-rho4-3A/rho4Δ* y *MAL2p-myc-rho4-3E/rho4Δ*. Estas cepas se incubaron en condiciones que favorecen el crecimiento en forma de levaduras o de hifas y se prepararon extractos proteicos para su análisis por Western blot usando anticuerpos anti-*myc*. Los resultados mostraron que las proteínas *rho4-3A* y *rho4-3E* se expresaban de forma similar a la proteína silvestre Rho4 (Figura 49). Cuando se comparó la movilidad electroforética de las distintas proteínas, se comprobó que la proteína *rho4-3A* tenía una movilidad superior a la de las proteínas silvestre y *rho4-3E* tanto en levaduras como en hifas. Por tanto, aunque no se ha comprobado que la fosforilación dependa directamente de la NDR quinasa Cbk1, estos resultados

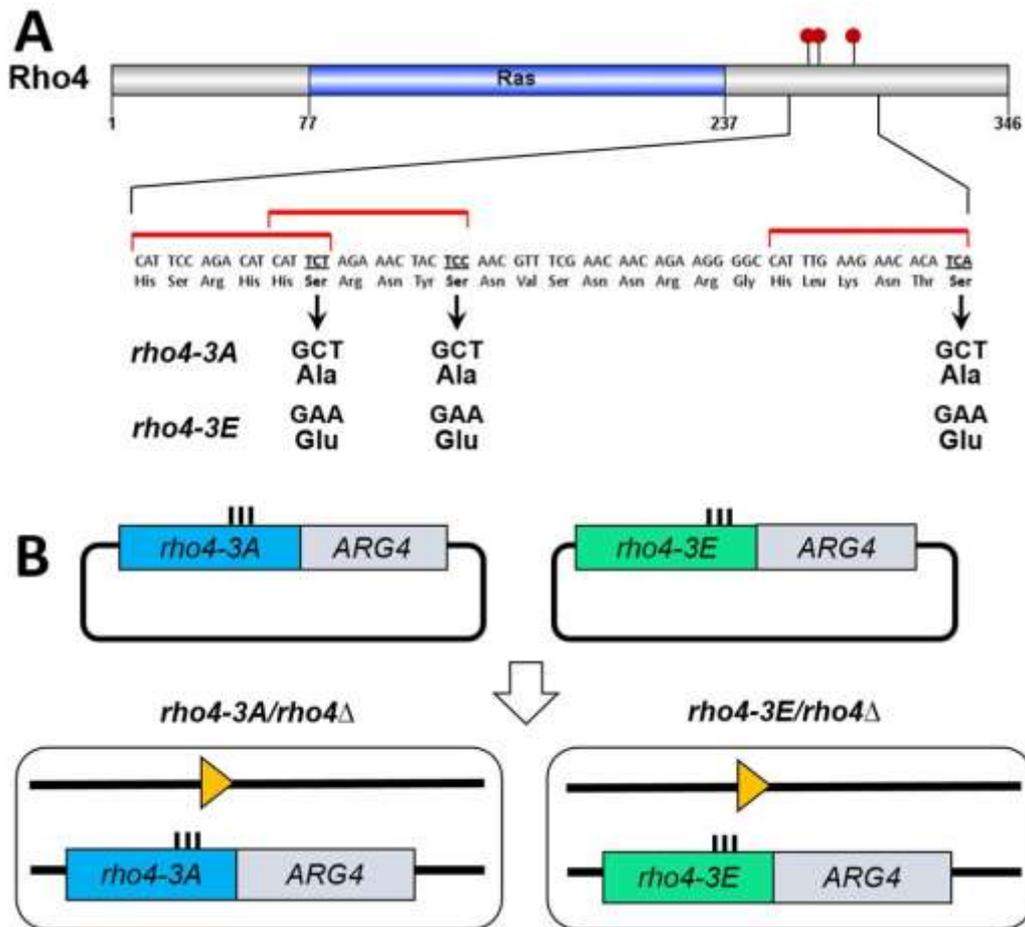


Figura 48. Construcción de mutantes en los 3 posibles sitios de fosforilación por Cbk1 de Rho4. (A) Representación esquemática de los sitios consenso de fosforilación por Cbk1 presentes en Rho4 (círculos rojos), en los residuos S274, S278 y S292. En la parte inferior se muestra la secuencia de Rho4 con los cambios introducidos para generar los mutantes fosfodeficiente (*rho4-3A*) y fosfomimético (*rho4-3E*). **(B)** Esquema de la construcción de las cepas *rho4-3A/rho4Δ* (OL2894) y *rho4-3E/rho4Δ* (OL2893). Los fragmentos recombinantes conteniendo las mutaciones *rho4-3A* y *rho4-3E* se clonaron en el plásmido pFA-ARG4 y se usaron para reemplazar el alelo silvestre en la cepa *RHO4/rho4::loxP* (OL2825), generando las cepas *rho4-3A::ARG4/rho4::loxP* (OL2894) y *rho4-3E::ARG4/rho4::loxP* (OL2893).

indican que alguno de los tres sitios se encontraría modificado *in vivo* en ambas condiciones de crecimiento.

3.5.1. Las mutaciones en los posibles sitios de fosforilación por Cbk1 afectan a la separación celular en levaduras.

Una vez generadas las cepas deseadas y confirmado que las proteínas se expresaban de forma similar a la proteína silvestre, se analizaron los fenotipos de estos mutantes durante el crecimiento levaduriforme. Las células de las cepas *rho4-3A/rho4Δ* y *rho4-3E/rho4Δ*, crecidas hasta fase logarítmica temprana se fijaron para su análisis microscópico. Como puede observarse en la Figura 50, el fenotipo de los mutantes *rho4-3A/rho4Δ* y *rho4-3E/rho4Δ* es similar al fenotipo del mutante nulo *rho4ΔΔ*, ya que el porcentaje de células formando cadenas de entre 3 y 10 células es significativamente superior al de la cepa silvestre. Cabe destacar que en el mutante *rho4-3A/rho4Δ* los grupos de células presentaban una mayor tendencia a agruparse entre sí, formando grumos mayores a los observados en el mutante *rho4-3E/rho4Δ*.

3.5.2. El mutante fosfomimético presenta hifas más largas y gruesas.

Con respecto a las hifas, las cepas mutantes *rho4-3A/rho4Δ* y *rho4-3E/rho4Δ* junto con el control silvestre y el mutante nulo se incubaron en YEPD con suero al 10% a 37°C durante dos horas, momento en que se fijaron para su observación al microscopio. El análisis microscópico de las distintas cepas mostró que no existían diferencias significativas entre las hifas de las cepas *RHO4*, *rho4Δ/rho4Δ* y *rho4-3A/rho4Δ*, pero las hifas del mutante *rho4-3E/rho4Δ* parecían más largas y gruesas que las de las otras 3 cepas (Figura 51).

Para confirmar estas observaciones preliminares, se determinó la longitud y el grosor de las cuatro cepas. Los resultados se muestran en las gráficas inferiores de la Figura 51, y como puede observarse, las hifas del mutante *rho4-3E/rho4Δ* son significativamente más largas y anchas que las de

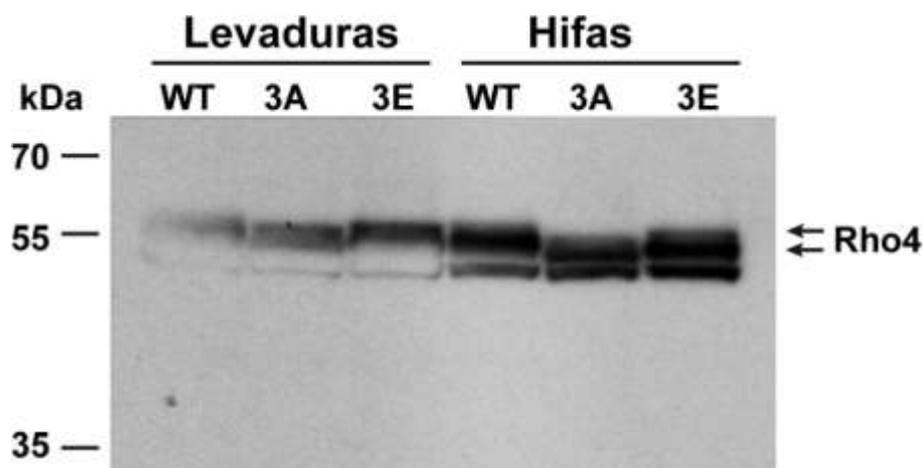


Figura 49. Las proteínas mutantes tienen diferente movilidad electroforética. Las cepas *MAL2p-myc-RHO4/rho4Δ* (OL2972), *MAL2p-myc-rho4-3A/rho4Δ* (OL2958) y *MAL2p-myc-rho4-3E/rho4Δ* (OL2963) fueron incubadas en condiciones que favorecen el crecimiento en forma de levadura (YEP con Maltosa a 28°C) o en condiciones que inducen la filamentación (YEP con Maltosa y suero 10% a 37°C durante 90 minutos). Los extractos proteicos fueron separados en geles de acrilamida Bis-Tris (10%), transferidos a membranas de nylon y analizados por Western blot con anticuerpos anti-*myc*. Las flechas indican las bandas correspondientes a Rho4.

Resultados

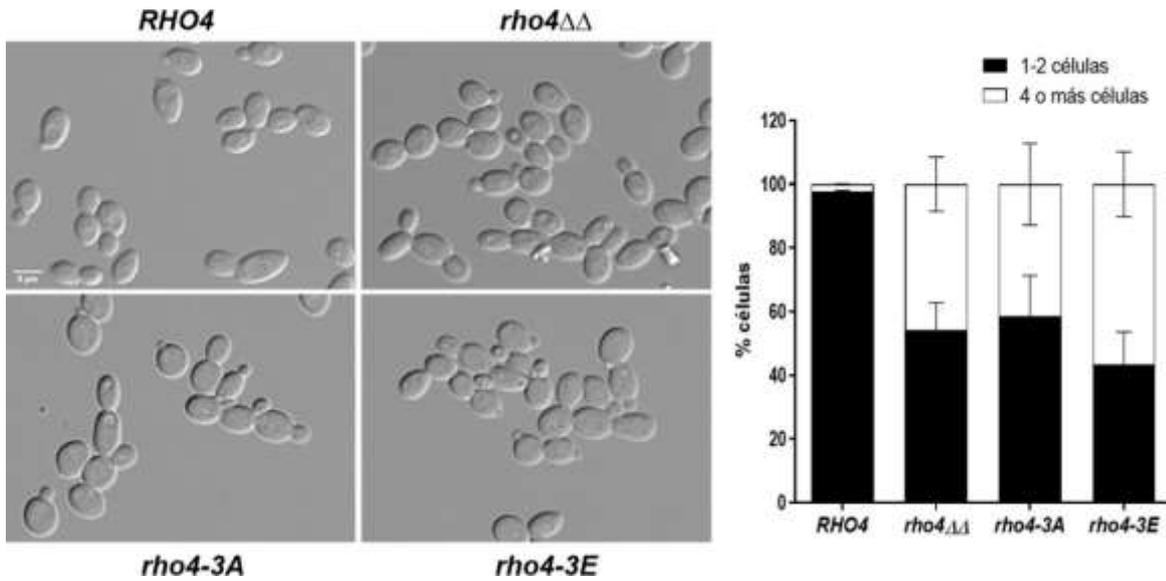


Figura 50. Los mutantes en los posibles sitios de fosforilación por Cbk1 tienen defectos en separación durante el crecimiento en forma de levaduras. Fenotipo de las cepas *RHO4* (BWP17), *rho4ΔΔ* (OL2824), *rho4-3A/rho4Δ* (OL2893), y *rho4-3E/rho4Δ* (OL2894) durante el crecimiento en forma de levaduras. Imágenes de contraste interferencial (DIC). Barra de escala, 5 μ m. A la derecha, representación gráfica del porcentaje de células que forman cadenas o grupos. Se muestra la media \pm SEM de 2 experimentos independientes.

la cepa silvestre (29,58 μ m de longitud frente a 19,43 μ m y 1,69 μ m de grosor frente a 1,39 μ m, respectivamente). Estos resultados indican que la presencia de cargas negativas en los tres sitios mutados favorece el crecimiento de las hifas.

3.5.3. Los mutantes en los sitios de fosforilación corrigen el defecto de separación de las hifas de la cepa *sep7ΔΔ*.

Los resultados presentados en el apartado 3.3.1 indican que la delección de *RHO4* corrige en gran medida el defecto de separación de las hifas del mutante *sep7ΔΔ* a tiempos largos de filamentación. Con objeto de analizar si las dos mutaciones generadas en *RHO4* presentaban la misma interacción con la cepa *sep7ΔΔ*, se construyeron las cepas *rho4-3A/rho4Δ sep7ΔΔ* y *rho4-3E/rho4Δ sep7ΔΔ*. Estas dos cepas, junto con los controles, se incubaron en condiciones que inducen la filamentación (YEPD con suero al 10% a 37°C) durante 3,5 h antes de fijar muestras para la cuantificación de cuerpos separados del resto de la hifa. Como se observa en la Figura 52, la cepa *sep7ΔΔ* presenta un porcentaje de separación cercano al 35%, que se reduce al 7% cuando se elimina el gen *RHO4*. Sorprendentemente, tanto al mutante fosfodeficiente como al fosfomimético mostraron un comportamiento similar al del mutante *rho4ΔΔ*, ya que el porcentaje de cuerpos separados se redujo al 10% y 4%, respectivamente. Estos resultados indican que las proteínas mutantes corrigen la activación temprana de la separación celular que ocurre en ausencia de la septina Sep7, y confirman que Rho4 juega un papel en el proceso de separación celular de las hifas cuando se reactiva el ciclo celular en los compartimentos subapicales.

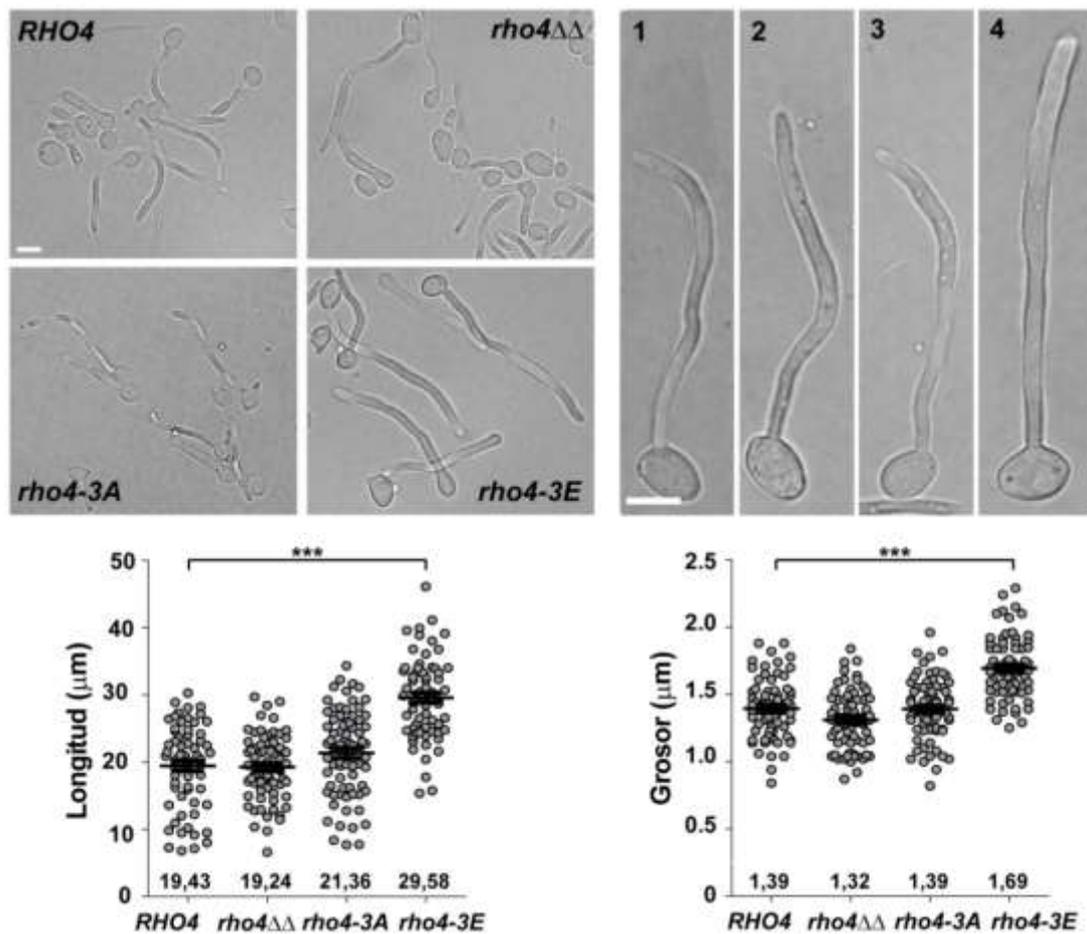


Figura 51. La mutación fosfomimética genera hifas más anchas y largas. Fenotipo de las hifas de las cepas *RHO4* (BWP17; 1), *rho4ΔΔ* (OL2824; 2), *rho4-3A/rho4Δ* (OL2893; 3), y *rho4-3E/rho4Δ* (OL2894; 4) tras 2 horas de inducción de la filamentación en medio YEPD con suero al 10%. Imágenes de contraste interferencial (DIC). A la derecha, se muestra una ampliación de hifas individuales de las cuatro cepas. Barras de escala, 5 μm. Las gráficas inferiores representan la longitud media y el grosor medio ± SEM de las hifas. Los números indican la media de cada cepa y los 3 asteriscos las diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,0001$, *unpaired t-test*).

3.6. Las proteínas *rho4-3A* y *rho4-3E* se localizan en el septo con un patrón temporal diferente al de la proteína silvestre.

Rho4 se localiza en el plano de división y en el córtex celular, tanto en las levaduras como en hifas. Para comprobar si las mutaciones en los sitios de fosforilación alteraban su localización, se marcaron con la GFP las cepas *rho4-3A/rho4Δ* y *rho4-3E/rho4Δ* utilizando el plásmido pFA-CaHIS1-MAL2p-GFP(GA)6 como molde para generar los casetes de transformación. Además, para estudiar el patrón temporal de asociación de ambas proteínas con el septo, se marcó la septina *CDC10* con mCherry. Las cepas así construidas (*MAL2p-GFP-rho4-3A/rho4Δ CDC10-mCherry/CDC10* y *MAL2p-GFP-rho4-3E/rho4Δ CDC10-mCherry/CDC10*) se incubaron en YNB con maltosa a 28°C hasta fase exponencial temprana antes de fijarlas en cámaras *iBidi* para su observación al microscopio.

Resultados

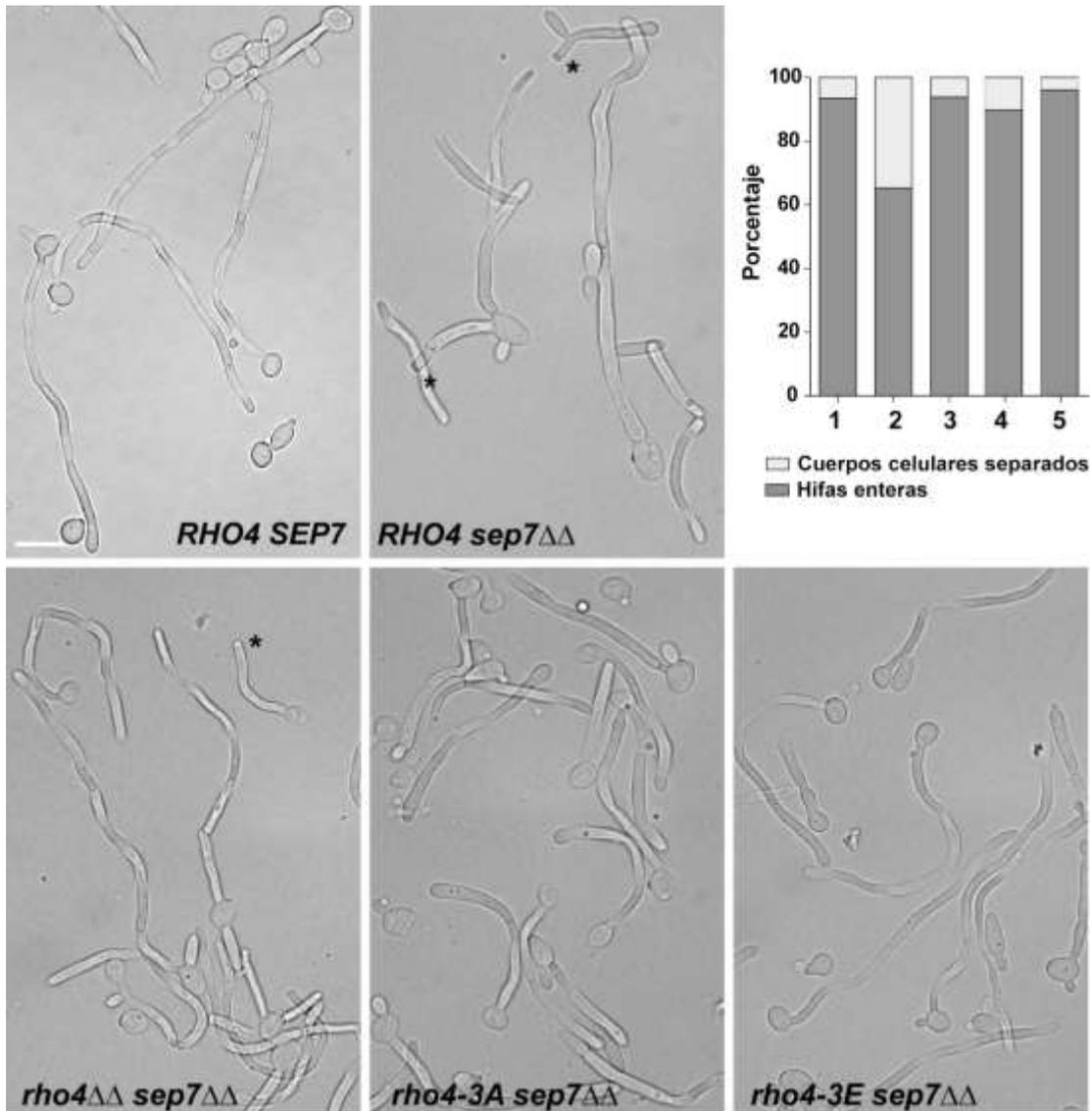


Figura 52. Los mutantes en los sitios de fosforilación de Rho4 revierten el defecto de separación de la cepa *sep7ΔΔ*. Imágenes de microscopía de contraste interferencial (DIC) de las cepas silvestre (BWP17; 1), *sep7ΔΔ* (OL2053; 2), *rho4ΔΔ sep7ΔΔ* (OL2891; 3), *rho4-3A/rho4Δ sep7ΔΔ* (OL2894; 4) y *rho4-3E/rho4Δ sep7ΔΔ* (OL2893; 5) incubadas durante 3,5 horas en YEPD con suero al 10% a 37°C. Los asteriscos indican cuerpos basales separados del resto de la hifa. Barra de escala: 10 μm. La grafica indica el porcentaje de cuerpos celulares separados en cada cepa.

Cuando se analizó la localización de ambas proteínas, se comprobó que tanto GFP-rho4-3A como GFP-rho4-3E tenían una distribución similar a la proteína silvestre, estando presentes tanto en el córtex celular como en el cuello (Figura 53), indicando que la mutación de los 3 sitios fosfoaceptores no altera gravemente la localización de la proteína. Sin embargo, sí existían diferencias en el patrón temporal de asociación de las proteínas mutantes en la región del septo. En ambos casos, se observó que GFP-rho4-3A y GFP-rho4-3E llegaban al septo minutos antes de que ocurriera la duplicación del anillo de septinas, al contrario de lo que ocurre con la proteína silvestre, que es casi simultáneo (Figura 45).

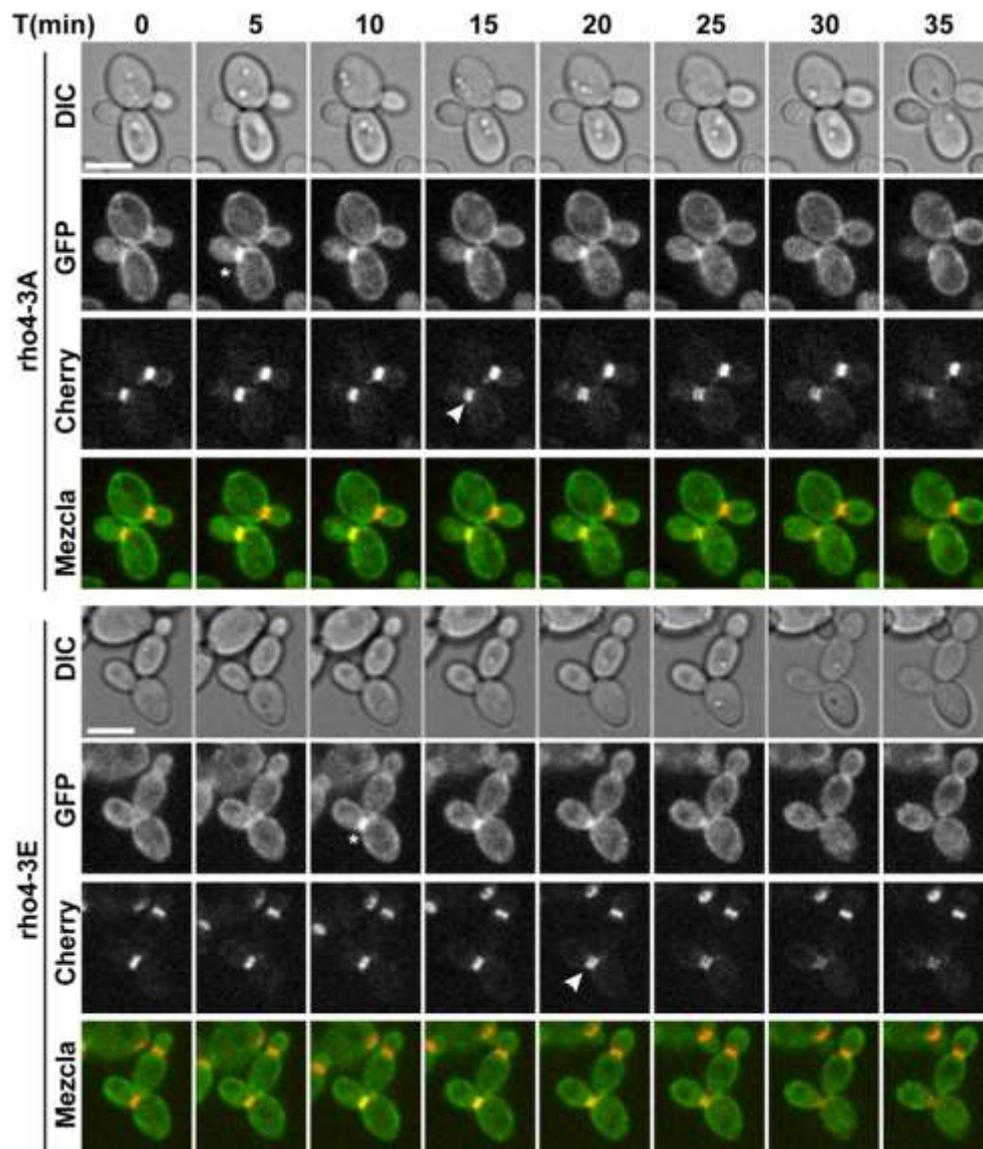


Figura 53. Las proteínas rho4-3A y rho4-3E se localizan en el córtex y cuello de las levaduras. Análisis por microscopía de fluorescencia a lo largo del tiempo de la localización de las proteínas mutantes GFP-rho4-3A y GFP-rho4-3E y de la septina Cdc10 (marcada con mCherry) en levaduras de las cepas *MAL2p-GFP-rho4-3A/rho4Δ CDC10-mCherry/CDC10* (OL2953) y *MAL2p-GFP-rho4-3E/rho4Δ CDC10-mCherry/CDC10* (OL2954). Mezcla: Cdc10-mCherry (rojo) + GFP-Rho4 (verde). Las imágenes de fluorescencia son la proyección máxima de 3 planos adquiridos cada 0,5 μ m. El triángulo señala el momento de la duplicación del anillo de septinas y el asterisco el momento en el que se observa GFP-Rho4 en el septo. Barras de escala: 5 μ m.

Para cuantificar con más detalle esta diferencia temporal, se determinó el tiempo de llegada de las distintas versiones marcadas con GFP al septo, tomando como referencia temporal el momento de la duplicación del anillo de septinas ($T=0$). También se calculó el tiempo de permanencia en el cuello. Los resultados se muestran en la Figura 54. Como puede observarse en la Figura, tanto GFP-rho4-3A como GFP-rho4-3E son visibles asociadas con el anillo de septinas antes de su duplicación. La media del tiempo de llegada (\pm SEM) de GFP-rho4-3A es de $-10,65 \pm 0,57$ minutos ($n=23$) y para GFP-rho4-3E es de $-9,64 \pm 0,724$ ($n=28$), en comparación con la proteína silvestre que se detecta casi simultáneamente a la duplicación ($-2,5 \pm 0,57$ minutos; $n=20$). En ambos casos, las diferencias observadas con la proteína silvestre son estadísticamente significativas ($p < 0,0001$; *unpaired t-test*). Respecto al tiempo de estancia en el septo, también se observaron diferencias significativas,

Resultados

especialmente para la proteína GFP-rho4-3A. La media del tiempo de asociación (\pm SEM) es de $13,68 \pm 0,64$ minutos ($n=20$) para Rho4, $22,39 \pm 0,76$ minutos ($n=23$) para rho4-3A y $17,14 \pm 0,83$ minutos ($n=28$) para rho4-3E. La diferencia entre Rho4 y rho4-3A es altamente significativa ($p < 0,0001$; *unpaired t-test*), mientras que entre Rho4 y rho4-3E es menor ($p=0,0040$). Estos resultados indican, por tanto, que la modificación de los 3 sitios fosfoaceptores es importante para controlar el patrón temporal de asociación y separación de Rho4 con el septo en células de levaduras.

También se analizó la localización de las proteínas GFP-rho4-3A y GFP-rho4-3E durante el desarrollo hifal mediante microscopía a lo largo del tiempo. En las Figuras 55 y 56 se muestran dos ejemplos de la distribución de las proteínas en hifas. Como ocurre con GFP-Rho4, en los momentos iniciales se localiza asociada a la membrana celular, con una mayor concentración hacia la zona apical. A medida que pasa el tiempo, la fluorescencia cortical es más difícil de observar, posiblemente debido a la pérdida de fluorescencia por la irradiación del láser hasta que finalmente aparece asociada a la región donde se va sintetizar el septo. Dado que en levaduras se observaron importantes diferencias temporales entre las tres proteínas, se realizó un análisis similar en hifas para determinar el

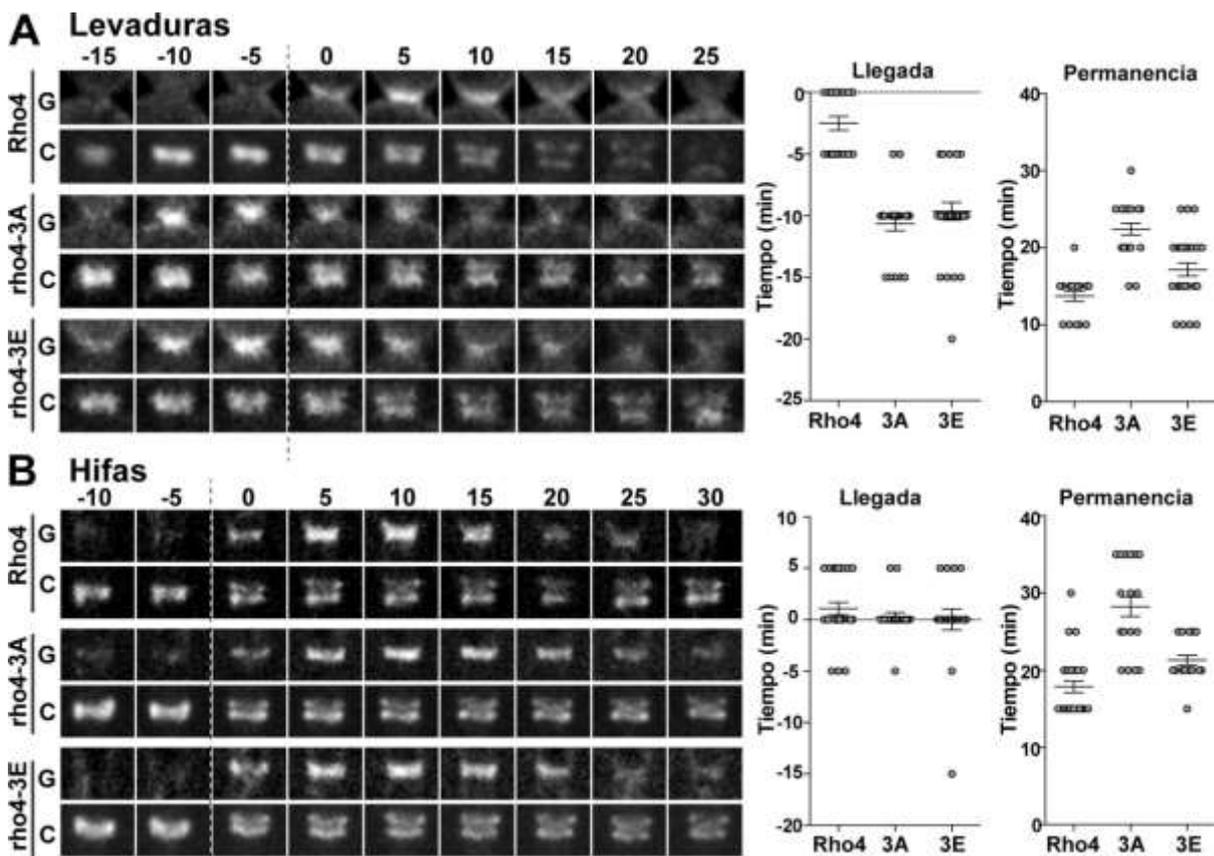


Figura 54. Patrón temporal de asociación de las proteínas GFP-Rho4, GFP-rho4-3A y GFP-rho4-3E al septo en células de levaduras (A) e hifas (B). Se muestran ampliaciones de la zona del septo de las distintas proteínas Rho4 marcadas con GFP (G) y de la septina Cdc10-mCherry (C). Las imágenes de fluorescencia son la proyección máxima de 3 planos adquiridos cada $0,5 \mu\text{m}$ y han sido alineadas usando como referencia la duplicación del anillo de septinas ($T=0$). A la derecha se muestran graficas con la cuantificación del tiempo de llegada al septo y del tiempo de permanencia en el mismo de las tres proteínas. Se indica la media \pm SEM en cada caso.

tiempo de llegada y el tiempo de permanencia en el septo. Los resultados mostraron que durante el desarrollo hifal, las tres proteínas se asocian con el septo casi simultáneamente a la duplicación del anillo de septinas, usado como referencia temporal (Figura 54B).

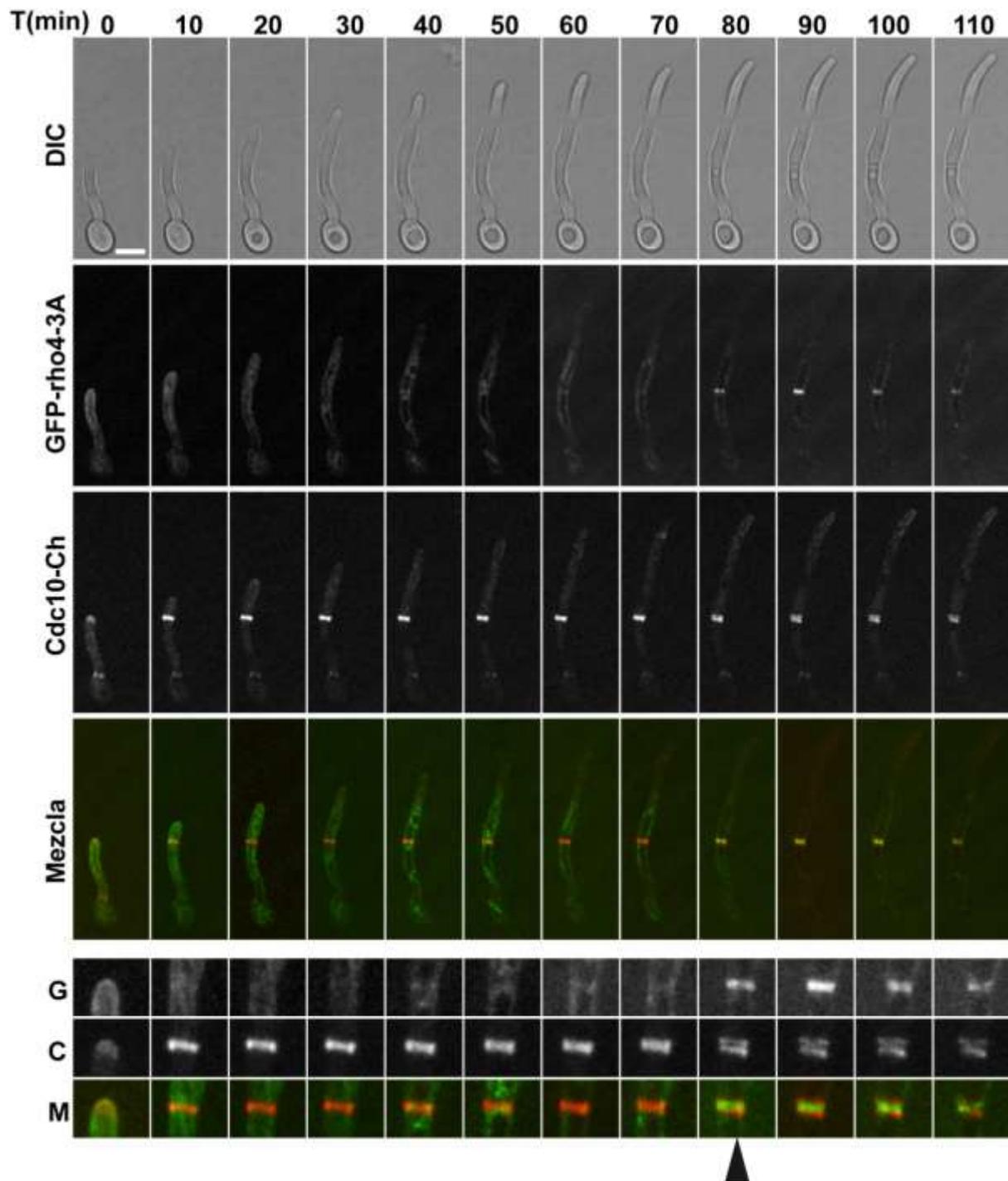


Figura 55. La proteína rho4-3A se localiza en los septos de las hifas. Análisis por microscopía de fluorescencia a lo largo del tiempo de la localización de GFP-rho4-3A y Cdc10-mCherry en hifas de la cepa *MAL2p-GFP-rho4-3A/rho4Δ CDC10-mCherry/CDC10* (OL2953). Las células se crecieron en YEP con maltosa y suero 10% durante 2 horas a 37°C. Mezcla: GFP-Rho4 (verde) + Cdc10-mCherry (rojo). Las imágenes son la proyección máxima de 5 planos adquiridos cada 0,5 μm . El triángulo señala el momento de la duplicación del anillo de septinas. Barra de escala: 5 μm .

Resultados

Las medias (\pm SEM) calculadas fueron de $1,07 \pm 0,59$ minutos ($n=28$) para Rho4, $0,25 \pm 0,44$ minutos ($n=20$) para rho4-3A y $0,0 \pm 1,01$ minutos ($n=19$) para rho4-3E. Donde sí se observaron diferencias fue en el tiempo de permanencia, que fue mayor en ambas proteínas mutantes, especialmente en rho4-3A. Las medias (\pm SEM) en este caso fueron de $17,86 \pm 0,74$ minutos ($n=28$)

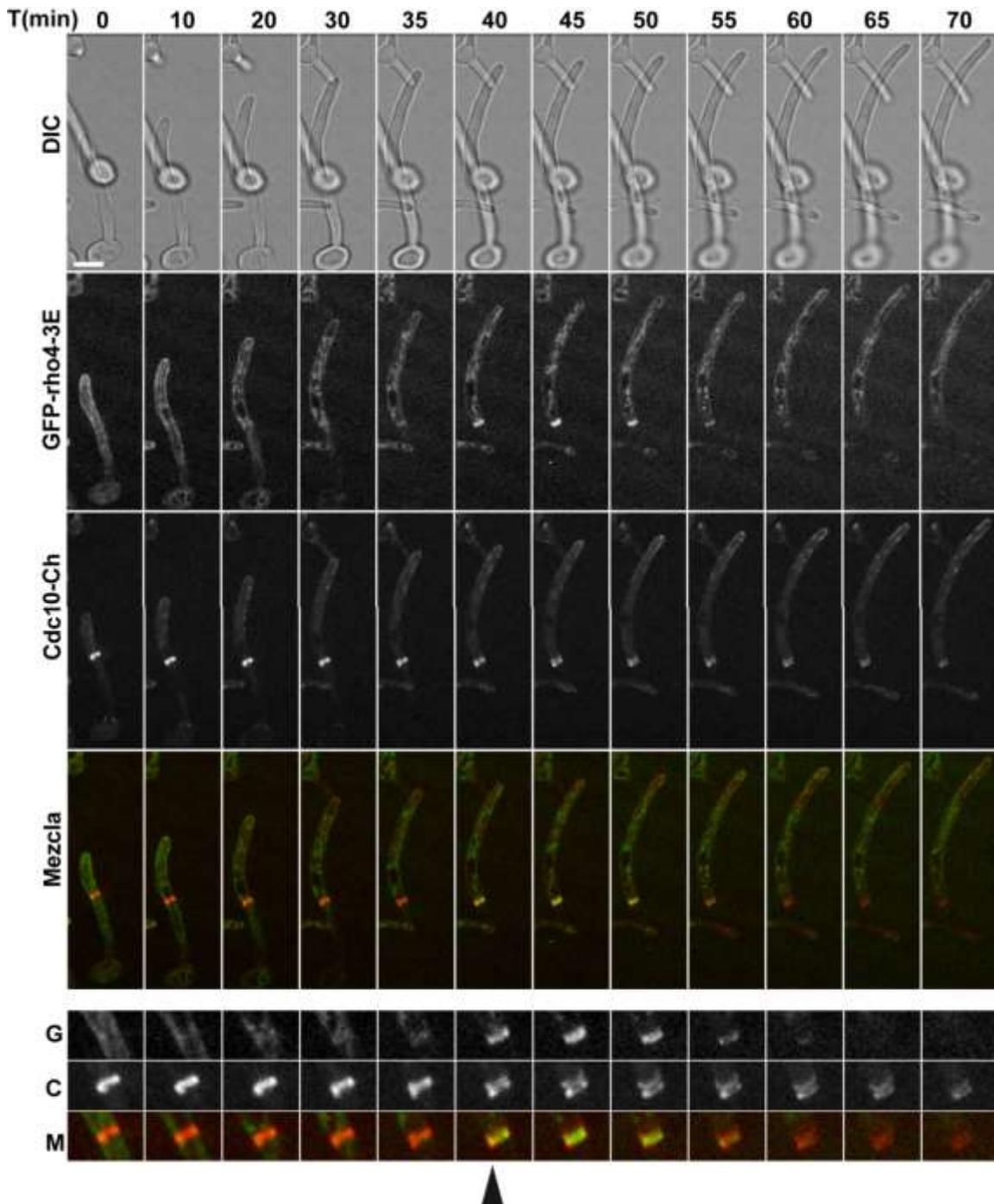


Figura 56. La proteína rho4-3E se localiza en los septos de las hifas. Análisis por microscopía de fluorescencia a lo largo del tiempo (*time-lapse*) de la localización de GFP-rho4-3E y Cdc10-mCherry en hifas de la cepa *MAL2p-GFP-rho4-3E/rho4Δ CDC10-mCherry/CDC10* (OL2954). Las células se crecieron en YEP con maltosa y suero 10% durante 2 horas a 37°C. Mezcla: GFP-Rho4 (verde) + Cdc10-mCherry (rojo). Las imágenes son la proyección máxima de 5 planos adquiridos cada 0,5 μ m. El triángulo señala el momento de la duplicación del anillo de septinas. Barra de escala: 5 μ m.

para Rho4, $28,25 \pm 1,27$ minutos (n=20) para rho4-3A y $21,32 \pm 0,64$ minutos (n=19) para rho4-3E.

Estos resultados indican que la fosforilación/defosforilación de los tres sitios estudiados parecen regular el tiempo de asociación de la proteína con el septo y también el momento del ciclo en el que Rho4 se une a esta estructura en la forma levaduriforme.

Capítulo 4. Estudio preliminar de la función del componente del exocisto Exo84 durante el crecimiento polarizado en *C. albicans*.

Los resultados del Capítulo 2 indican que el mantenimiento del crecimiento hifal en *C. albicans* depende de la NDR kinasa Cbk1, posiblemente a través de la regulación de distintos componentes de la maquinaria de polaridad. Uno de estos componentes es el exocisto, un complejo multiproteico conservado evolutivamente compuesto por 8 subunidades (Sec3, Sec5, Sec6, Sec8, Sec10, Sec15, Exo70 y Exo84) que desempeña un papel conservado en la secreción de células eucariotas siendo necesario para la fusión de vesículas secretoras a la membrana plasmática de las células en los sitios de crecimiento activo (Chen *et al.*, 2015; Nishida-Fukuda, 2019; Polgar y Fogelgren, 2018; Zeng *et al.*, 2017). En el caso de hongos y levaduras, las vesículas de secreción aportan el material necesario para la expansión de la membrana plasmática y para el ensamblaje de la pared celular que los rodea (Guo *et al.*, 2017; Polgar y Fogelgren, 2018; Zeng *et al.*, 2017).

En *S. cerevisiae*, la subunidad Exo84 del exocisto es fosforilada por el complejo Clb2-Cdc28 antes de la transición de metafase a anafase, lo que interrumpe el ensamblaje del exocisto, inhibe la secreción y detiene el crecimiento celular en metafase (Luo *et al.*, 2013). También es sustrato directo del complejo Cln-Cdc28 en la fase G1 tardía, lo que contribuye a la transición G1/S (Duan *et al.*, 2019). En *C. albicans*, Exo84 también está regulado por Cdc28 y la ciclina Hgc1 durante la filamentación, siendo necesaria esa fosforilación para el crecimiento polarizado eficiente de las hifas (Caballero-Lima y Sudbery, 2014). En este organismo, el complejo del exocisto se localiza en forma de media luna en la punta de las hifas (Jones y Sudbery, 2010) y esta localización no se altera durante la mitosis (Caballero-Lima y Sudbery, 2014).

En el Capítulo 1 de esta Memoria, se comentó que Exo84, además de los sitios de fosforilación por CDK, también contiene en su secuencia 3 sitios que se ajustan al consenso descrito para las NDR kinasas (Mazanka *et al.*, 2008), lo que puede ser tomado como una indicación de que también podría ser sustrato de esta kinasa. De hecho, se ha descrito que en *S. pombe* el ortólogo de Cbk1 (Orb6) regula la actividad del exocisto fosforilando las subunidades Sec3 y Sec5, siendo necesaria esta modificación para la localización del complejo en las zonas de crecimiento de la célula y para la disolución del septo tras la citoquinesis (Tay *et al.*, 2019). Dado que las subunidades Sec3 y Sec5 de *C. albicans* no tienen sitios consenso de NDR kinasas, es posible que la regulación de este complejo en este organismo sea diferente a la de la levadura de fisión y se ejerza a través de Exo84. Por ello se decidió analizar si esta posibilidad era correcta.

4.1. Diferentes estrategias para la construcción de cepas con el gen *EXO84* regulado por tetraciclina.

Puesto que *C. albicans* es un organismo diploide y *EXO84* es un gen esencial, no es posible generar mutantes nulos *exo84* $\Delta\Delta$ para utilizar como control, por lo que se decidió construir una cepa heterocigótica que contuviera uno de los alelos del gen *EXO84* delecionado y el segundo bajo el control de un promotor regulable que pudiera ser apagado en el momento deseado. Se decidió usar el sistema de expresión dependiente de tetraciclina descrito en el Capítulo 2 para la construcción del

Resultados

mutante condicional de *ACE2*, lo que supone usar la cepa PY173 que contiene el transactivador (proteína de fusión entre la proteína represora de tetraciclina TetR y el AD de ScHap4) insertado en el locus *ENO1* (Vernay *et al.*, 2012). A partir de esta cepa, se construyeron inicialmente los derivados isogénicos *TetOff-EXO84/EXO84* y *TetOff-EXO84/exo84::loxP*.

En primer lugar, se deletionó uno de los alelos de *EXO84* mediante la inserción del marcador *ARG4* flanqueado por dos secuencias *loxP* (*LAL*) usando el plásmido pFA-*LAL* (Dueñas-Santero *et al.*, 2019), generando la cepa *exo84::LAL/EXO84* (Figura 57). El siguiente paso fue sustituir el promotor nativo del gen *EXO84* por el promotor regulable por tetraciclina *tetO-ScHOP1p* (*TetOff*) delante del alelo silvestre tanto en la cepa *exo84::LAL/EXO84* como en uno de los de la cepa silvestre PY173. Para ello, se utilizó el plásmido pFA-*URA3-Clox-HOP1p-5xmyc*, construido amplificando el promotor *TetOff* desde el genoma de la cepa P4452 (Vernay *et al.*, 2012), que contiene el promotor regulable controlando el gen *MSS4* y clonándolo en el plásmido pFA-*URA3-Clox*. Mediante oligonucleótidos específicos, se amplificó el casete *URA3-Clox-TetOff-5xmyc* y se insertó en el genoma de las cepas mencionadas anteriormente, obteniendo los derivados *URA3-Clox-TetOff-5xmyc-EXO84/exo84::LAL* y *URA3-Clox-TetOff-5xmyc-EXO84/EXO84*. El paso final fue inducir la pérdida de los marcadores flanqueados por secuencias *loxP* activando la expresión del gen *Cre* presente en el casete, para

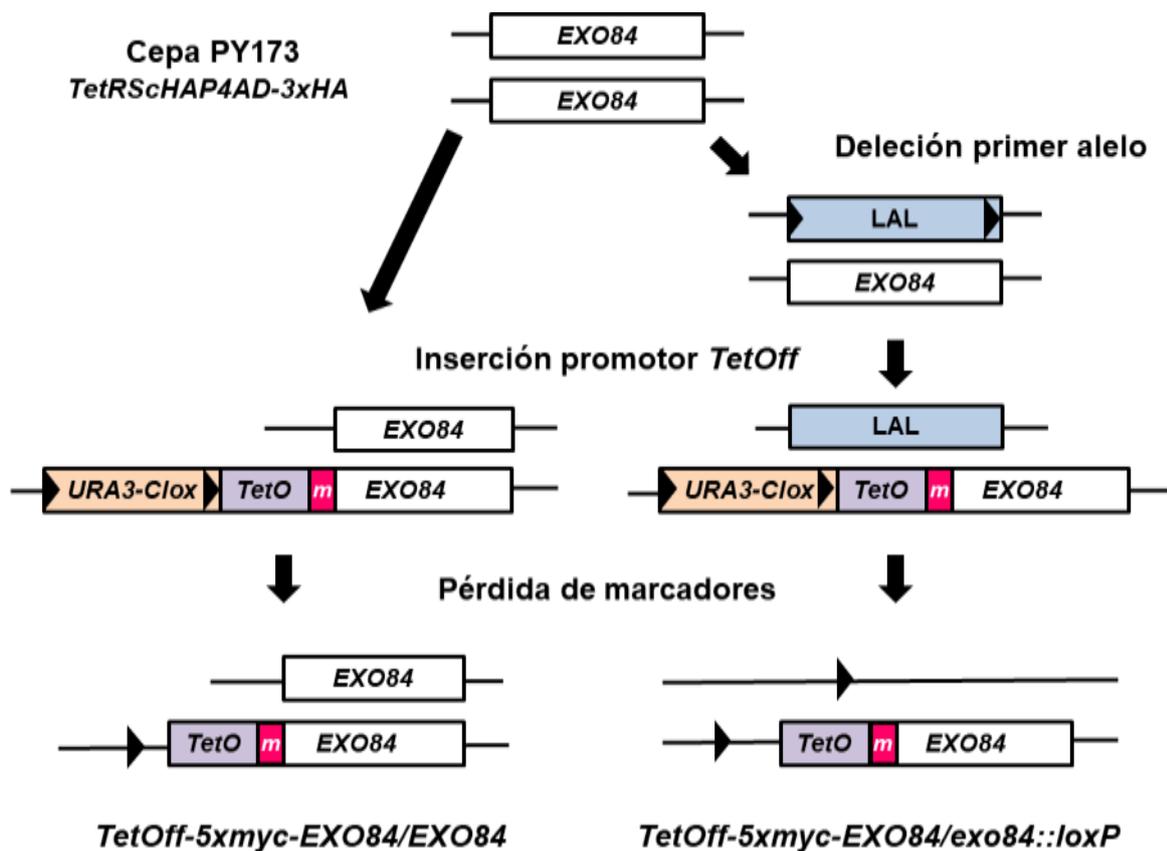


Figura 57. Esquema ilustrativo de la construcción de las cepas *TetOff-5xmyc-EXO84/exo84::loxP* y *TetOff-5xmyc-EXO84/EXO84* en fondo genético PY173. Se indica el promotor regulable por doxiciclina (*TetO*), el epítipo 5xmyc (*m*) y la secuencia repetida *loxP* (triángulo negro), así como los distintos marcadores usados. Ver texto para detalles. Cepas *TetOff-5xmyc-EXO84/exo84::loxP* (OL3196) y *TetOff-5xmyc-EXO84/EXO84* (OL3104).

obtener derivados isogénicos auxotróficos que permitieran su posterior uso en nuevas rondas de transformación. De este modo, se obtuvieron las cepas *TetOff-5xmyc-EXO84/exo84::loxP* y *TetOff-5xmyc-EXO84/EXO84*.

Antes de continuar con la construcción de las cepas que portaran los alelos fosfomimético y fosfodeficiente de *EXO84* insertados en el genoma, se procedió a comprobar que el sistema funcionaba correctamente y que el alelo regulado se apagaba al añadir doxiciclina al medio de cultivo. Dado que *EXO84* es un gen esencial, se utilizó la cepa *TetOff-5xmyc-EXO84/exo84::loxP* para realizar una cinética de crecimiento en presencia o ausencia de doxiciclina. La cepa se incubó en medio YEPD a 28°C durante 15 horas en ambas condiciones, y en ese momento se realizaron diluciones de ambos cultivos para continuar analizando su crecimiento. Como se observa en la Figura 58, a partir de las 15 horas de incubación con doxiciclina, la cepa *TetOff-5xmyc-EXO84/exo84::loxP* detiene su crecimiento, mientras que el cultivo sin la droga continua creciendo exponencialmente. Se fijaron células a las 23

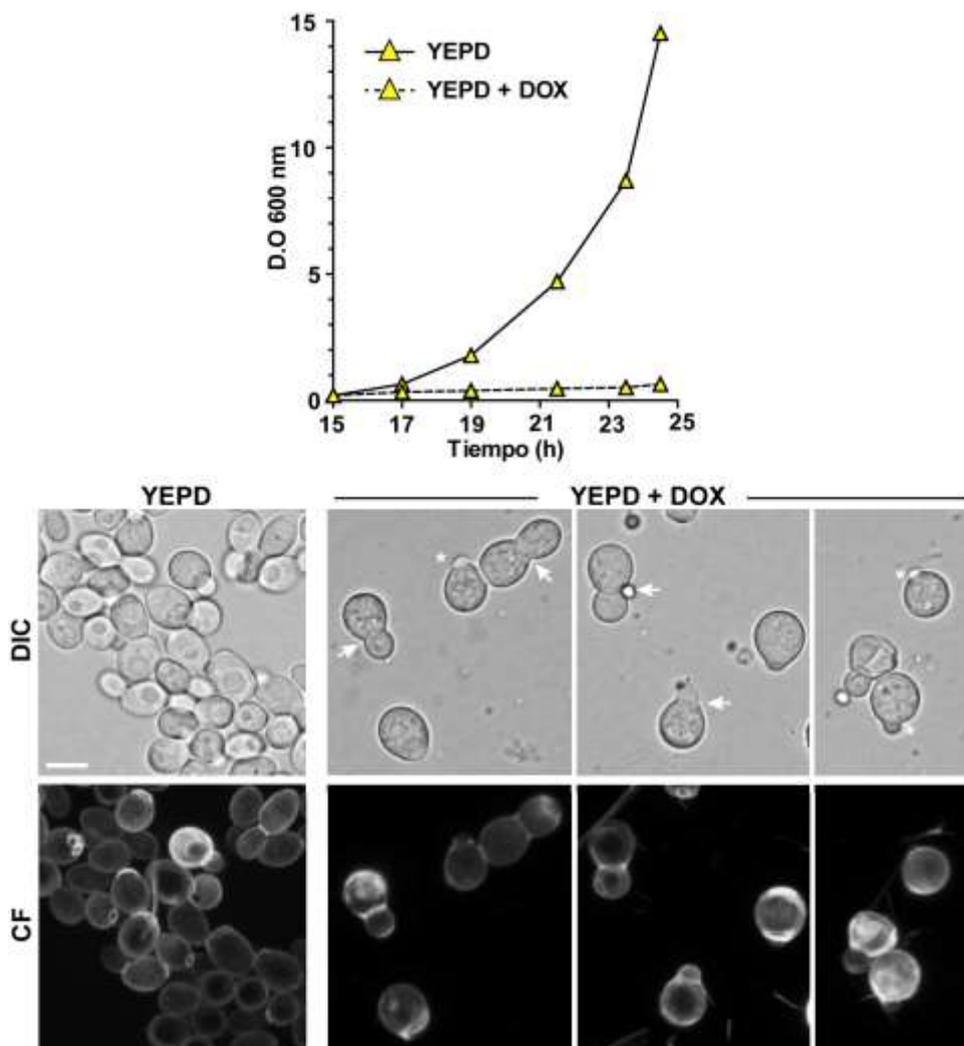


Figura 58. Crecimiento de la cepa *TetOff-5xmyc-EXO84/exo84::loxP* con y sin doxiciclina. El mutante condicional se incubó en YEPD o YEPD + doxiciclina durante 15 horas a 28°C antes de diluir los cultivos en el mismo medio para determinar la tasa de crecimiento con el promotor *TetOff* encendido (YEPD) o apagado (YEPD + DOX). En la parte inferior se muestran imágenes representativas de microscopía de contraste interferencial (DIC) o teñidas con calcoflúor (CF) de la morfología de las células crecidas durante 23 horas en ambos medios. Las flechas indican cuellos engrosados y los asteriscos yemas pequeñas. Barra de escala, 5 μ m. Cepa *TetOff-5xmyc-EXO84/exo84::loxP* (OL3196).

Resultados

horas y se tiñeron con calcoflúor para su análisis mediante microscopía de fluorescencia. En la Figura 58 se muestra la morfología de la cepa en ambas condiciones, y como puede observarse, tras el apagado del promotor las células se vuelven más redondeadas, con cuellos engrosados, y muchas células tienen yemas muy pequeñas, mientras que con el promotor encendido las células presentan una morfología similar a la de la cepa silvestre. Estos resultados indican que la regulación del alelo condicional *TetOff-5xmyc-EXO84* funciona correctamente en presencia o ausencia de doxiciclina, por lo que se continuó con la construcción de las cepas con mutaciones en los posibles sitios de fosforilación de Cbk1.

Para ello, se generaron los plásmidos que contenían los alelos *exo84-3A* y *exo84-3E* por mutagénesis dirigida secuencial, ya que los tres sitios se encuentran muy separados en la proteína (S118, T418 y S511) (Figura 59); ver detalles en Materiales y Métodos. Una vez construidos, se amplificó la región que contenía cada una de las versiones del gen *exo84* mutado y el marcador reciclable *URA3-Clox* con oligonucleótidos específicos para dirigir su integración en el locus *EXO84* del genoma de la cepa *TetOff-5xmyc-EXO84/EXO84*, con la intención de construir las cepas mutantes condicionales *TetOff-5xmyc-EXO84/exo84-3A* y *TetOff-5xmyc-EXO84/exo84-3E*. Estas construcciones permitían apagar la expresión del alelo silvestre y estudiar los efectos de las mutaciones durante el crecimiento en forma de levaduras o hifas, cuando eran la única fuente de Exo84 en la célula. Sin

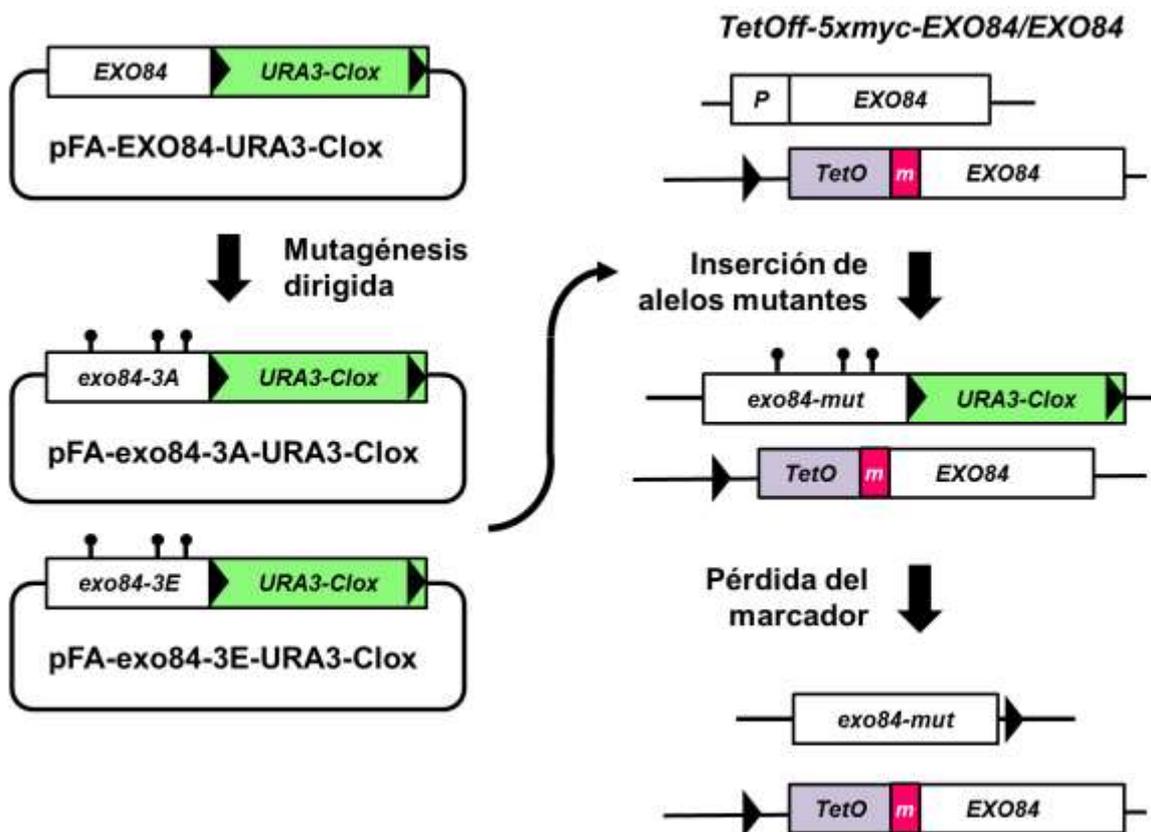


Figura 59. Esquema de las construcciones utilizadas para insertar las distintas mutaciones de *EXO84* en el genoma de la cepa *TetOff-5xmyc-EXO84/EXO84*. Se generaron las mutaciones *exo84-3A* y *exo84-3E* mediante mutagénesis dirigida a partir del plásmido pFA-EXO84-URA3-Clox. Los fragmentos que contenían las distintas mutaciones se transformaron en la cepa *TetOff-5xmyc-EXO84/EXO84* (OL3104). Se indica el promotor regulable por doxiciclina (*TetO*), el epítipo *5xmyc* (m), la secuencia repetida *loxP* (triángulo negro) y las mutaciones *exo84-3A* y *exo84-3E* (*exo84-mut*), así como los distintos marcadores usados. Ver texto para detalles.

embargo, tras numerosos intentos de insertar el casete mutante en el locus *EXO84*, no se consiguió que ninguna de las dos mutaciones se integrara correctamente en el genoma de *C. albicans*. Por ello, se pensó que una de las posibilidades para explicar esta dificultad para construir las cepas deseadas podría ser debida al hecho de que las proteínas mutantes fueran incapaces de soportar la viabilidad de las células, o incluso estuvieran funcionando como alelos dominantes letales, ya que las transformaciones siempre se realizaron con el promotor *TetOff* encendido. Alternativamente, el defecto podría ser debido a que la recombinación genética en el locus *EXO84*, por alguna razón desconocida, es menos frecuente que en otros locus del genoma.

Para comprobar si alguna de las dos posibilidades era la verdadera, se decidió cambiar la estrategia para la integración de los alelos mutantes y elegir otro locus diferente del genoma para su inserción. Recientemente, se ha descrito que el locus *NEUT5L* es una región neutra del genoma que permite la integración eficiente de ADN exógeno y la expresión de genes a niveles similares a su expresión en el locus nativo. Además, no se han detectado defectos de crecimiento o filamentación en las condiciones probadas tras la interrupción de una copia del locus *NEUT5L* (Gerami-Nejad *et al.*, 2013). Por tanto, la región codificante del gen *EXO84* que contenía las mutaciones fosfomimética y fosfodeficiente se clonó en el vector pDIS-URA3-Clox (Dueñas-Santero *et al.*, 2019) junto con su promotor nativo amplificado a partir del genoma mediante ensamblaje. Además, se construyó otro

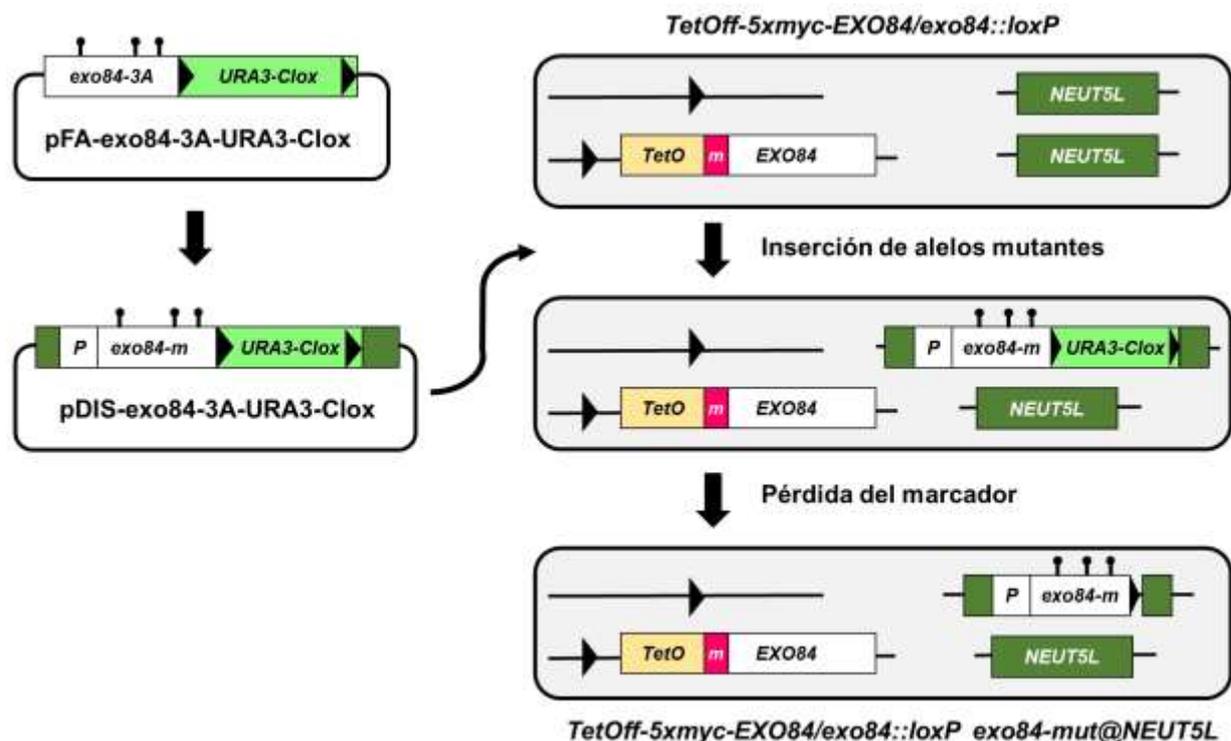


Figura 60. Esquema de la estrategia usada para insertar las distintas mutaciones de *EXO84* en el locus *NEUT5L* de la cepa *TetOff-5xmyc-EXO84/exo84::loxP*. Las mutaciones *exo84-3A* y *exo84-3E* se transfirieron desde los plásmidos pFA-*exo84-3A-URA3-Clox* y pFA-*exo84-3E-URA3-Clox* al vector pDIS-URA3-Clox (en la Figura se muestra únicamente el que contiene las mutaciones fosfodeficientes) bajo el control del promotor nativo del gen *EXO84* (P). Estos plásmidos se utilizaron para insertar los distintos alelos en el locus *NEUT5L* de la cepa *TetOff-5xmyc-EXO84/exo84::loxP* (OL3196). Se indica el promotor regulable por doxicilina (*TetO*), el epítipo *5xmyc* (m), la secuencia repetida *loxP* (triángulo negro) y las mutaciones *exo84-3A* y *exo84-3E* (*exo84-m*), así como los distintos marcadores usados. Ver texto para detalles.

Resultados

plásmido que contenía la secuencia silvestre de *EXO84* para utilizar como control. Los plásmidos resultantes (pDIS-EXO84-URA3-Clox, pDIS-exo84-3A-URA3-Clox y pDIS-exo84-3E-URA3-Clox) se utilizaron para transformar la cepa *TetOff-5xmyc-EXO84/exo84::loxP* e insertar los distintos alelos en el locus *NEUT5L* (Figura 60). En este caso sí se obtuvieron transformantes que contenían las distintas versiones del gen *EXO84* insertadas en el genoma, lo que descarta que las dos mutaciones funcionen como alelos dominantes negativos y apunta a la posibilidad de que hubiera problemas de recombinación en el locus *EXO84* cuando se usó la estrategia anterior. Una vez confirmada la presencia de las mutaciones en el locus *NEUT5L* por secuenciación, se procedió a inducir la pérdida del marcador URA3-Clox para generar finalmente las tres cepas isogénicas *TetOff-5xmyc-EXO84/exo84::loxP EXO84@NEUT5L/NEUT5L*, *TetOff-5xmyc-EXO84/exo84::loxP exo84-3A@NEUT5L/NEUT5L* y *TetOff-5xmyc-EXO84/exo84::loxP exo84-3E@NEUT5L/NEUT5L*, que para simplificar denominaremos *EXO84*, *exo84-3A* y *exo84-3E*, mientras que su parental *TetOff-5xmyc-EXO84/exo84::loxP* será *exo84Δ*.

4.2. Caracterización del fenotipo de las cepas mutantes durante el crecimiento levaduriforme.

Una vez construidas las cepas apropiadas, se procedió a caracterizar el efecto de las distintas mutaciones en el crecimiento de levaduras y durante la filamentación. En primer lugar, se analizó el efecto en levaduras determinando su tasa de crecimiento en presencia o ausencia de doxiciclina. Para ello, las cuatro cepas se inocularon en medio YEPD o YEPD + Doxiciclina y se incubaron durante 15 horas, momento en el que se realizaron diluciones de los cultivos en el mismo medio y se analizó su crecimiento midiendo la D.O. a 600 nm a lo largo del tiempo.

En ausencia de doxiciclina todas las cepas presentaron un crecimiento similar, no habiendo diferencias significativas entre ellas; las tres cepas mutantes presentaron un crecimiento similar al de la cepa silvestre (Figura 61A). Sin embargo, tras la incubación en presencia de doxiciclina sí se observaron diferencias de crecimiento. Como se mostró en la Figura 58, el mutante *exo84Δ* cesaba su crecimiento en estas condiciones, mientras que las cepas que contenían el alelo silvestre o el alelo *exo84-3A* insertado en el locus *NEUT5L* continuaban creciendo de forma similar, aunque menos que en presencia de la droga. Es interesante que el mutante que contenía el alelo *exo84-3E* presentaba una velocidad de crecimiento ligeramente superior a la de las otras dos cepas (Figura 61A). Para analizar su morfología, se fijaron muestras tras 23 horas de incubación en presencia o ausencia de doxiciclina, se tiñeron con calcoflúor y se analizaron por microscopía de fluorescencia. Como se muestra en la Figura 61B, la morfología de las cuatro cepas con el promotor *TetOff* encendido fue similar, con células levaduriformes elongadas típicas de *C. albicans*. Cuando se apagó el promotor, las células del mutante *exo84Δ* tenían la morfología descrita anteriormente, y las células silvestres *EXO84* tenían una morfología similar a la observada con el promotor encendido. Algo parecido ocurría en la cepa que portaba el alelo *exo84-3E*. En el caso del mutante *exo84-3A*, a pesar de crecer de forma similar a la cepa silvestre (Figura 61A), era posible observar algunas células más grandes y redondeadas que las de la cepa silvestre, pero no llegaban a parecerse a las del mutante *exo84Δ*.

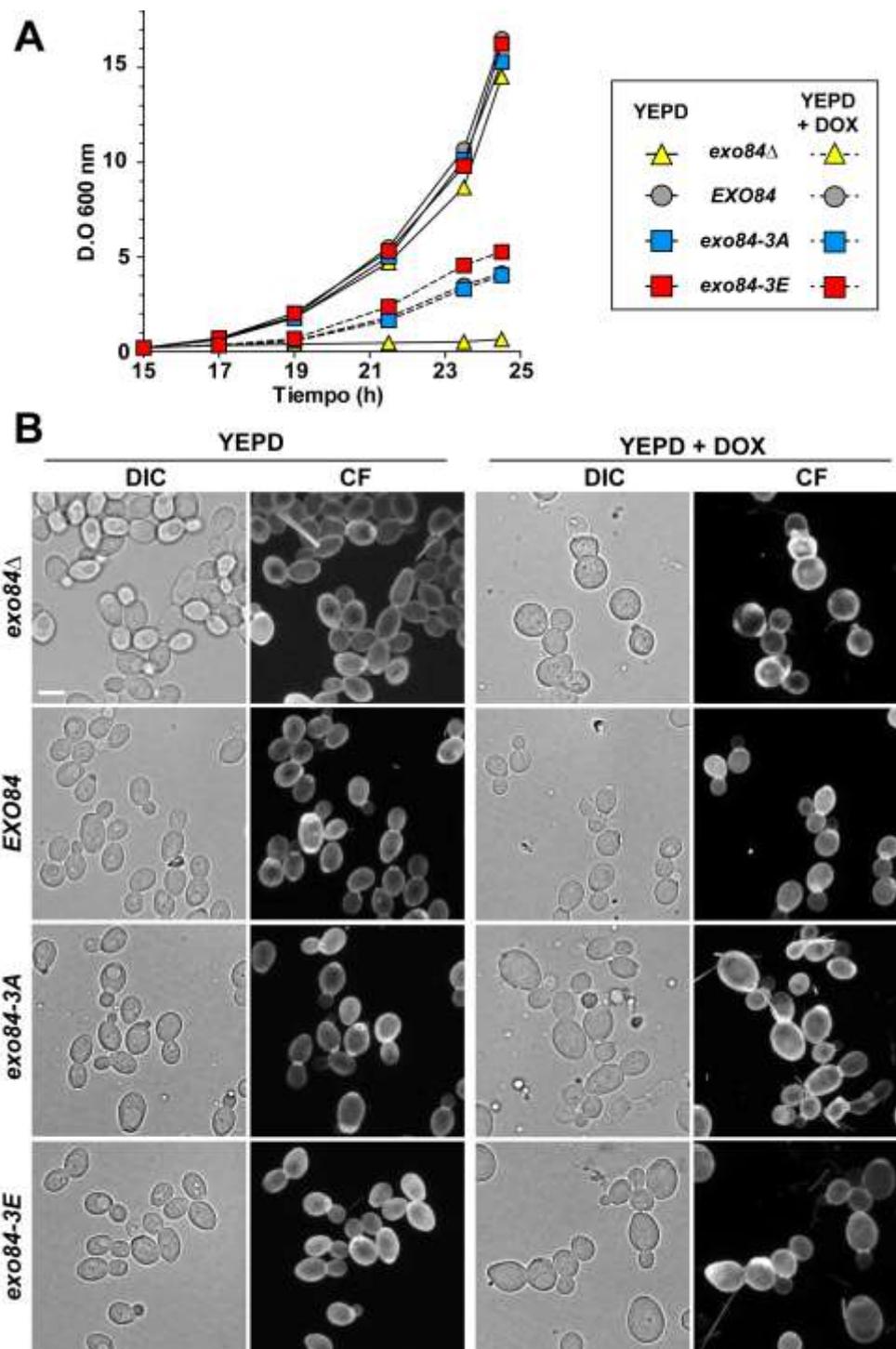


Figura 61. Crecimiento de las cepas que contienen mutaciones en los posibles sitios de fosforilación por Cbk1 en Exo84 en presencia o ausencia de Doxiciclina. (A). Curva de crecimiento de las cepas *TetOff-5xmyc-EXO84/exo84::loxP* (OL3196; *exo84Δ*), *TetOff-5xmyc-EXO84/exo84::loxP EXO84@NEUT5L/NEUT5L* (OL3211; *EXO84*), *TetOff-5xmyc-EXO84/exo84::loxP exo84-3A@NEUT5L* (OL3212; *exo84-3A*) y *TetOff-5xmyc-EXO84/exo84::loxP exo84-3E@NEUT5L* (OL3214; *exo84-3E*) en YEPD con o sin doxiciclina. Las distintas cepas se incubaron en YEPD o YEPD + doxiciclina durante 15 horas a 28°C antes de diluir los cultivos en los mismos medios para determinar la tasa de crecimiento de las distintas cepas con el promotor *TetOff* encendido (YEPD) o apagado (YEPD + DOX). **(B)** Imágenes representativas de microscopía de contraste interferencial (DIC) o teñidas con calcoflúor (CF) de la morfología de las células incubadas durante 23 horas en ambos medios. Barra de escala, 5 μm.

Resultados

4.3. Caracterización del fenotipo de las cepas mutantes durante el crecimiento hifal.

También se analizó la morfología de las hifas tras apagar el promotor *TetOff*. Para ello, las cepas *exo84-3A* y *exo84-3E*, junto con el control silvestre *EXO84* y el mutante nulo *exo84Δ*, se incubaron en YEPD con doxiciclina durante 15 horas antes de transferirlas al mismo medio

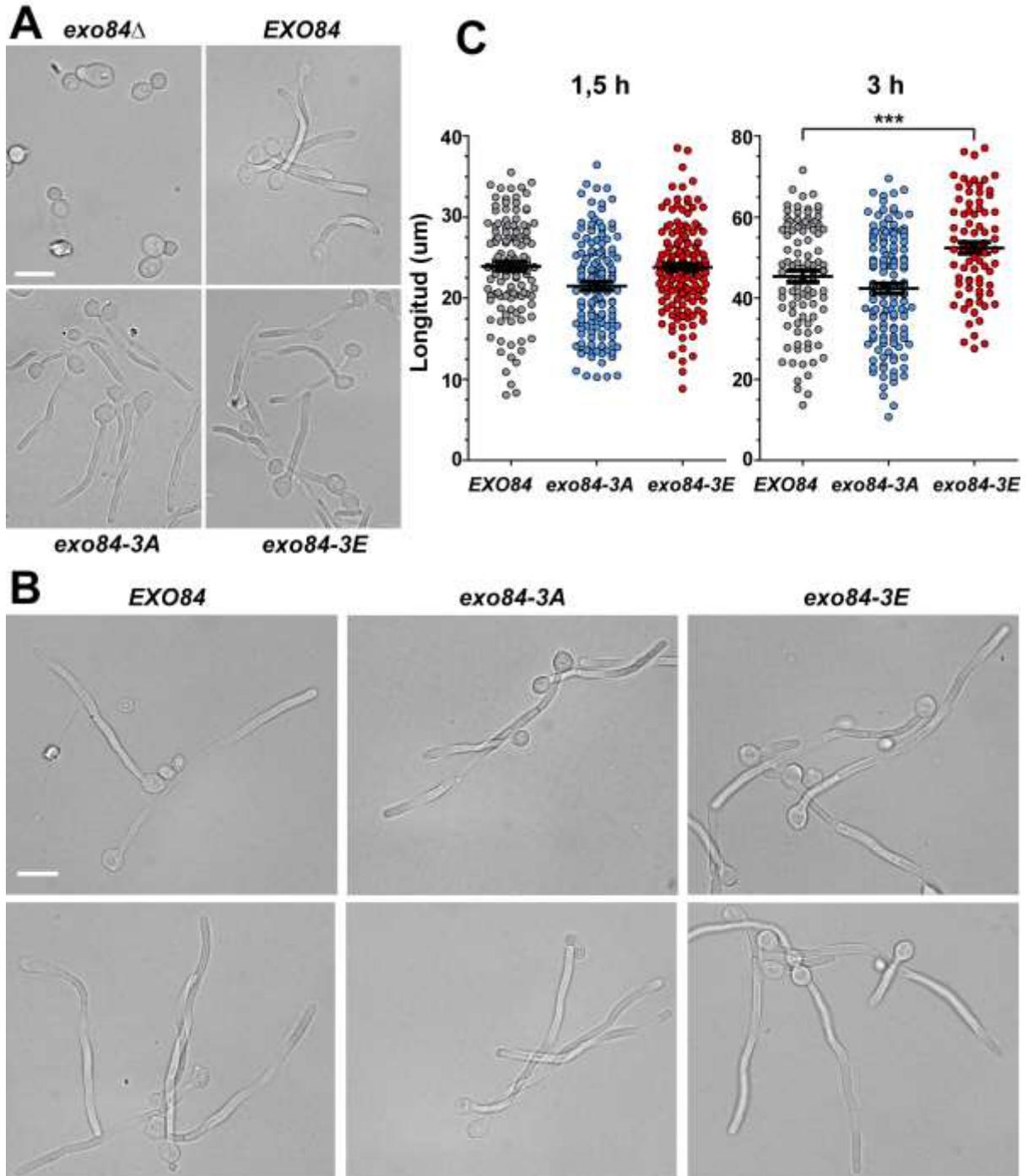


Figura 62. Morfología de las hifas que contienen mutaciones en los posibles sitios de fosforilación por Cbk1 en Exo84 en presencia de Doxiciclina. Imágenes de microscopía de contraste interferencial (DIC) representativas de la morfología de las hifas de las cepas *TetOff-5xmyc-EXO84/exo84::loxP* (OL3196; *exo84Δ*), *TetOff-5xmyc-EXO84/exo84::loxP EXO84@NEUT5L* (OL3211; *EXO84*), *TetOff-5xmyc-EXO84/exo84::loxP exo84-3A@NEUT5L/NEUT5L* (OL3212; *exo84-3A*) y *TetOff-5xmyc-EXO84/exo84::loxP exo84-3E@NEUT5L* (OL3214; *exo84-3E*) incubadas a 37°C en YEPD con suero al 10% y doxiciclina durante 1,5 horas (**A**) o 3 horas (**B**). Barra de escala, 10 μm. (**C**) Longitud media ± SEM de las hifas a las 1,5 y 3 horas de inducción de la filamentación. Los 3 asteriscos indican una diferencia estadísticamente significativa ($p=0,0006$, *unpaired t-test*).

conteniendo suero al 10% y se incubaron a 37°C durante 1,5 y 3 horas, momento en que se tomaron muestras y se fijaron para su observación al microscopio. El análisis microscópico de las distintas cepas mostró que no existían grandes diferencias morfológicas entre las cuatro cepas ni a las 1,5 horas (Figura 62A) ni a las 3 horas (Figura 62B) de inducción de la filamentación. En todos los casos, las hifas presentaban paredes laterales paralelas sin engrosamientos apicales, indicación de que las mutaciones en los sitios de fosforilación no alteran gravemente su patrón de crecimiento.

Para profundizar un poco más en la caracterización de estas cepas, se determinó la longitud de las cuatro cepas. Los resultados se muestran en la Figura 62C y, como puede observarse, a la hora y media de filamentación no existen diferencias significativas entre la longitud media las hifas de las cuatro cepas. Sin embargo, a las 3 horas, las hifas del mutante *exo84-3E* son significativamente más largas que las de la cepa silvestre y el mutante *exo84-3A* (52,41 μm frente a 45,34 μm y 42,37 μm , respectivamente). Estos resultados indican que la presencia de cargas negativas en los tres sitios mutados favorece el crecimiento de las hifas en las etapas tardías de la filamentación.

Discusión

1. Función de la NDR kinasa Cbk1 en la fase de mantenimiento del crecimiento hifal en *C. albicans*.

1.1. La importancia del crecimiento polarizado.

El objetivo principal del presente trabajo es profundizar en el estudio de los mecanismos por los que la NDR kinasa Cbk1 regula el crecimiento polarizado, usando como modelo de estudio el desarrollo de las hifas en *C. albicans*. El crecimiento polarizado es la base sobre la que se asientan los procesos morfológicos de todas las células, tanto procariotas como eucariotas, lo que les permite adoptar una forma única y diferente de otras células. En ausencia de crecimiento polarizado, todas las células serían esferas perfectas, similar a lo que ocurre en mutantes incapaces de polarizar su crecimiento. Este proceso permite establecer dominios funcionales especializados en la célula gracias a una distribución asimétrica de proteínas y ARNs, y todas las células han desarrollado distintas maquinarias moleculares para dirigir el crecimiento a un punto concreto de la superficie celular, tanto en respuesta a señales externas como internas. Esta capacidad es fundamental para el desarrollo y función de células especializadas, para la formación de tejidos y de órganos en organismos pluricelulares.

En el reino de los hongos, el crecimiento celular polarizado es un comportamiento esencial en varios procesos celulares, como la gemación, la formación de proyecciones celulares necesarias para la conjugación (*shmoos*) o para el desarrollo de las hifas (Pruyne y Bretscher, 2000). El crecimiento polarizado de los hongos se produce por la inserción de material nuevo en la membrana plasmática a través de la ruta secretora y por la remodelación de la pared celular. Dicho crecimiento puede desencadenarse por señales internas, como la progresión del ciclo celular, o por señales externas, que incluyen cambios en el entorno o la presencia de feromonas. La presencia de una señal externa desencadena el crecimiento polarizado, que típicamente anula o enmascara el crecimiento dictado por una señal interna. Los principales ejemplos de crecimiento polarizado mediado por señales externas son la formación de los *shmoos* en *S. cerevisiae* y *S. pombe* o de las hifas en hongos filamentosos, incluidos *Neurospora crassa*, *Aspergillus nidulans* y *C. albicans* (Bassilana *et al.*, 2020; Biswas *et al.*, 2007; Xie y Miao, 2021).

El factor central para el establecimiento de la polaridad celular y para romper la simetría celular es la GTPasa Cdc42, muy conservada entre diferentes especies de levaduras y que comparten un 80% de similitud con el Cdc42 humano (Chiou *et al.*, 2017; Goryachev y Leda, 2017). En *S. cerevisiae*, Cdc42 se activa a través de un bucle de retroalimentación positiva que involucra a la PAK kinasa y al GEF Bem1 para lograr acumulación local de Cdc42-GTP en el sitio de la membrana destinado a ser polarizado (Chiou *et al.*, 2017; Miller *et al.*, 2020). Cdc42-GTP recluta y concentra a las forminas Bni1 y Bnr1, que organizan los cables de actina polarizados desde el punto de crecimiento para el transporte de vesículas hacia esa zona, así como a la maquinaria de exocitosis, lo que facilita la liberación de su contenido en el incipiente punto de crecimiento (Bi y Park, 2012; Howell y Lew, 2012; Miller *et al.*, 2020).

El desarrollo hifal y el alargamiento progresivo de las hifas de hongos filamentosos están asociados con su patogenicidad durante la invasión de tejidos en mamíferos y plantas, como se ha

Discusión

descrito para *C. albicans* y *A. gossypii* (Desai, 2018; Kohli *et al.*, 2008; Noble *et al.*, 2017). La formación de hifas es impulsada principalmente por el ensamblaje de cables de actina polarizado hacia la punta y por la exocitosis (Sudbery, 2011; Xie *et al.*, 2020). Durante el mantenimiento posterior del crecimiento de las hifas, las vesículas de secreción se depositan en una región cercana a la punta llamada Spitzenkörper (Jones y Sudbery, 2010), que sirve como centro de suministro de vesículas al ápice dependiente de los cables de actina (Taheri-Talesh *et al.*, 2012). El polarisoma, por su parte, es un complejo macromolecular que comprende cinco subunidades y participa en múltiples actividades celulares, siendo esencial para el crecimiento polarizado (Xie *et al.*, 2020; Xie y Miao, 2021).

En todas las células eucariotas, las kinasas de la familia NDR (*Nuclear Dbf2-Related*)/LATS (*Large Tumour Suppressor*) son los efectores finales de rutas de transducción de señales que regulan tanto la polaridad celular como el ciclo celular (Hergovich, 2016; Hergovich *et al.*, 2006). El objetivo principal de esta memoria ha sido la caracterización de la función de la NDR kinasa Cbk1 de *C. albicans* que, como se ha comentado en la Introducción, es el efector final de la ruta RAM (*Regulation of Ace2 and Morphogenesis*), también conocida como ruta MOR (*MORphogenesis-related NDR kinase network*), que es necesaria para el crecimiento hifal y para la formación de *biofilms* (Gutiérrez-Escribano *et al.*, 2012; Maerz y Seiler, 2010; Saputo *et al.*, 2012; Song *et al.*, 2008). En levaduras existen dos NDR kinasas que se encargan de coordinar los eventos finales del ciclo celular con la morfogénesis en respuesta a señales intracelulares, conocidas como Cbk1 y Dbf2/20 en *S. cerevisiae* y *C. albicans* (Figura 12) y Orb6 y Sid2 en *S. pombe*.

1.2. Función de Cbk1 en las dos etapas del proceso de filamentación.

Estudios de diversos laboratorios indican que, en *C. albicans*, Cbk1 es necesaria para coordinar la separación celular con el final de la mitosis, y juega un papel esencial en el inicio de la filamentación y el crecimiento polarizado de las hifas (Greig *et al.*, 2015; Gutiérrez-Escribano *et al.*, 2011; Lee *et al.*, 2015; Song *et al.*, 2008). También regula otros procesos como la formación de proyecciones sexuales (Liang *et al.*, 2020) y, mediante un análisis de haploinsuficiencia, Saputo y colaboradores (2016) han puesto de manifiesto que interacciona funcionalmente con una variedad de vías y procesos, incluida la ruta PKA/AMPC, el ciclo celular, la mitosis y la polaridad celular (a través de proteínas relacionadas con Cdc42).

Como se comentó en la Introducción, Cbk1 presenta una función dual durante el desarrollo hifal en *C. albicans*. En las etapas iniciales, es necesaria para inactivar a la proteína de unión de ARNs Ssd1, permitiendo la traducción de un grupo de proteínas necesarias para la emergencia y formación del tubo germinativo. Una vez que se produce la primera mitosis y se forma el septo que separa el compartimento basal del apical, Cbk1 se necesita para el mantenimiento de un crecimiento polarizado robusto, y esta función es independiente de Ssd1 (Rojo-Domínguez, 2018) (Figura 16). El presente trabajo parte de una colaboración con el laboratorio de Dr. Jaime Correa en la Universidad de Extremadura (UNEX) para caracterizar la función de Cbk1 durante el mantenimiento del crecimiento polarizado de las hifas. En su laboratorio se construyeron dos alelos mutantes de Cbk1, que han sido unas herramientas esenciales para estudiar la función de esta kinasa durante la filamentación. Uno de ellos es el mutante *cbk1-KD/cbk1Δ* (*Kinase-Dead*), que presenta un fenotipo similar al del mutante

cbk1 $\Delta\Delta$, pero que es capaz de filamentar cuando se elimina la proteína Ssd1. El segundo es el mutante condicional *cbk1-as/cbk1* Δ (*Analog-Sensitive*), cuya actividad kinasa puede ser inhibida rápidamente por adición del análogo de ATP 1NM-PP1.

Utilizando microscopía de alta resolución a lo largo del tiempo, en el presente trabajo hemos utilizado ambos mutantes para profundizar en el estudio de la función de Cbk1 en el desarrollo hifal de *C. albicans*. Nuestros resultados confirman que su actividad kinasa es más importante para el crecimiento de las hifas tras la formación del primer septo, e indican que en el desarrollo de las hifas existen dos fases diferentes, una primera antes del ensamblaje del anillo de septinas que es independiente de Cbk1 (la tasa de crecimiento de las hifas *CBK1/cbk1* Δ y *cbk1-KD/cbk1* Δ es similar, Figura 21), y una segunda fase tras la síntesis del septo que sí es completamente dependiente de Cbk1. En esta fase, la diferencia de crecimiento entre ambas cepas es significativa, y mientras que en la cepa silvestre se produce un incremento en la velocidad de crecimiento (de 0,282 a 0,363 $\mu\text{m}/\text{min}$), en el mutante carente de actividad kinasa se produce una disminución (de 0,203 a 0,156 $\mu\text{m}/\text{min}$). Además, en este mutante el compartimento apical comienza a ensancharse perdiendo la morfología típica de las hifas. Estos resultados sugieren que existen distintos mecanismos que controlan el crecimiento y la secreción polarizada hacia la punta de las hifas durante las dos etapas de crecimiento, una primera no dependiente de Cbk1 seguida de una fase dependiente de Cbk1.

Estas observaciones se confirmaron cuando se utilizó el mutante condicional *cbk1-as/cbk1* Δ para determinar la tasa de crecimiento apical en presencia o ausencia del análogo 1NM-PP1, mediante microscopía a lo largo del tiempo. La velocidad de crecimiento en presencia de solvente fue de 0,1433 $\mu\text{m}/\text{min}$, que se redujo a la tercera parte (0,0427 $\mu\text{m}/\text{min}$) tras la inhibición de la actividad kinasa. En este caso no fue posible determinar el crecimiento antes y después del ensamblaje del primer anillo de septinas, pues su síntesis no era sincrónica en todas las hifas y la inhibición de la actividad kinasa ocurría rápidamente tras la adición de 1NM-PP1, momento en el que comenzaba a producirse el engrosamiento del compartimento apical. Una pregunta interesante que queda por resolver es si la inhibición de Cbk1 únicamente produce una pérdida del crecimiento apical o si también se detiene el crecimiento celular. En los experimentos realizados, hemos determinado la tasa de crecimiento midiendo la longitud de las hifas en cada tiempo, lo que permite determinar la velocidad de elongación de la punta de la hifa, que es claramente inferior tras la inhibición de la actividad kinasa (una media de 16 μm en 100 minutos frente a 5 μm respectivamente, Figura 22B), pero esto no es una indicación de que el crecimiento celular se detenga, pues las hifas se engruesan en ausencia de la actividad kinasa. Para contestar a esta pregunta sería necesario, en el futuro, medir el volumen de los compartimentos apicales mediante microscopía tridimensional.

La existencia de dos etapas de crecimiento durante el desarrollo hifal, una independiente de Cbk1 seguida de otra dependiente de Cbk1, es similar a lo descrito previamente para la subunidad del exocisto Sec3 (Li *et al.*, 2007). Los mutantes *sec3* Δ forman tubos germinativos más o menos normales hasta la formación del primer anillo de septinas y a partir de ahí experimentan un cambio repentino de crecimiento de apical a isotrópico, lo que resulta en la formación de compartimentos apicales globulares. Esto llevó a proponer que el desarrollo de las hifas de *C. albicans* ocurre en dos fases: una

Discusión

fase independiente de Sec3 seguida de una fase dependiente de Sec3. Además, la delección de las septinas no esenciales *CDC10* o *CDC11* restaura el crecimiento polarizado de las hifas *sec3 $\Delta\Delta$* . Estos autores propusieron que, durante la formación del tubo germinativo, las septinas que están en la punta de este atraen la exocitosis hacia esta zona, en un proceso que no necesita a Sec3. Más tarde, cuando se forma el primer anillo de septinas cerca de la punta, en las hifas silvestres se pondría en marcha un mecanismo que dirige la exocitosis al ápice y que anula la capacidad intrínseca de los anillos de septinas para atraer la exocitosis, siendo este nuevo mecanismo dependiente de Sec3. En ausencia de Sec3, el mecanismo no estaría operativo y el anillo de septinas atraería la exocitosis hacia él, causando un crecimiento abombado.

Nuestros resultados indican que, en este hipotético mecanismo que restringe la exocitosis al anillo de septinas, también está implicada la NDR quinasa Cbk1, que podría ser esencial para fosforilar algunas de las proteínas implicadas en polaridad o secreción, modificando su comportamiento o función a un “modo específico de hifas” que favorece el crecimiento altamente polarizado frente al patrón de crecimiento específico de levaduras. Por ello, cabe preguntarse qué proteínas podría estar regulando Cbk1 en este proceso, y lo más lógico es pensar que deben ser algunos de los componentes de la maquinaria de polaridad o secreción, implicados en mantener focalizado el crecimiento hacia el ápice de la hifa. Algunas de estas proteínas podrían ser las que se recogen en la Figura 18 y que contienen numerosos sitios de fosforilación por esta quinasa, como el componente del polarisoma Spa2, la proteína Bni4 necesaria para la síntesis de quitina o los reguladores de GTPasas como Rga2, Lrg1 o Rom2.

1.3. Cbk1 regula la localización de proteínas clave en el crecimiento polarizado.

Para profundizar en el estudio de los mecanismos a través de los cuales la quinasa Cbk1 regula el crecimiento polarizado en la fase de mantenimiento del crecimiento hifal, se analizó qué ocurriría con la localización de algunas proteínas clave que regulan este proceso tras la inhibición de la actividad kinasa, mediante experimentos de microscopía a lo largo del tiempo.

El regulador principal del crecimiento polarizado en las hifas de *C. albicans* es la GTPasa Cdc42, cuya dinámica es muy diferente en levaduras y en hifas. Durante el crecimiento de las levaduras, Cdc42 activo alterna su localización de apical a isotrópica dependiendo de la fase del ciclo celular, mientras que en las hifas Cdc42-GTP se mantiene focalizado en la zona apical, observándose también de forma transitoria en los anillos de septinas durante la formación del septo (Corvest *et al.*, 2013). Es interesante destacar que Cdc42 presenta un posible sitio de fosforilación por Cbk1, que además se localiza en el denominado “*Rho insert*”, una región que distingue a las Rho GTPasas de las demás proteínas de la superfamilia Ras, y que se ha implicado en la señalización intracelular de la GTPasa activa asociada a la membrana (Wennerberg y Der, 2004). Esto sugiere que su dinámica y su función podrían estar reguladas por Cbk1. Cuando se analizó la localización de Cdc42 activo usando el dominio CRIB (*Cdc42 Rac Interactive Binding*) de la proteína Gic2 de *S. cerevisiae*, adaptado para *C. albicans*, fusionado a la GFP (Corvest *et al.*, 2013) en el mutante condicional *cbk1-as*, se comprobó que la actividad kinasa de Cbk1 es necesaria para mantener su polarización. En presencia del análogo 1NM-PP1, Cdc42-GTP se localizaba en el ápice de la hifa, aunque de forma menos focalizada, y se

dispersaba por las paredes laterales (Figura 24), lo que en último término producía su ensanchamiento. Esto sugiere que Cbk1 se necesita para mantener al Cdc42 activo concentrado en la punta de la hifa, aunque esta regulación podría ser indirecta a través de sus GAPs o GEFs, que también son posibles dianas. Resultados preliminares de nuestro laboratorio indican que la cepa *cdc42-S135A*, que contiene la mutación del posible sitio de fosforilación (HRQKLS) a alanina, produce hifas más cortas que las de la cepa silvestre, lo que apuntaría a una posible regulación directa de Cdc42 por Cbk1 durante el crecimiento hifal (E. Dueñas-Santero, comunicación personal).

En la regulación del crecimiento polarizado de las hifas también están involucradas otras estructuras como el polarisoma, el Spitzenkörper y el aparato secretor, que se encuentran principalmente localizados en el ápice. El polarisoma está formado por las proteínas Spa2, Bud6, Aip5, Pea2 y la formina Bni1, que nuclea los cables de actina (Xie *et al.*, 2020; Xie y Miao, 2021), y de ellas la más estudiada en *C. albicans* es Spa2. Células carentes de *SPA2* presentan tubos germinativos más anchos y cortos que los de la cepa silvestre (Zheng *et al.*, 2003). En *C. albicans*, Spa2 se regula de manera diferente en función de la morfología. En levaduras, la regulación del polarisoma es similar a la de *S. cerevisiae*, dependiente del ciclo celular, y se distribuye por toda la superficie celular de la yema hasta la formación del septo, momento en el que se trasloca a esta región (Zheng *et al.*, 2003). Por el contrario, durante el crecimiento en forma de hifas, se produce una reorganización del polarisoma, que se concentra en el punto del córtex donde va a emerger el tubo germinativo y, posteriormente, se mantiene en el ápice de la hifa de manera independiente del ciclo celular (Crampin *et al.*, 2005; Zheng *et al.*, 2003).

Esta diferente localización está regulada por fosforilación, ya que se ha demostrado que Spa2 es un sustrato de Cdc28, asociado primero a la ciclina Clb2 y más tarde a la ciclina específica de hifas Hgc1, siendo esta fosforilación necesaria para su localización en los sitios de crecimiento polarizado (Wang *et al.*, 2016). Además, su localización también depende de Mob2, el co-activador de Cbk1, ya que en un mutante hipomorfo *mob2-4A* (que contiene mutaciones en cuatro sitios de fosforilación por Cdc28), la proteína Spa2 permanece en el córtex celular pero pierde su polarización (Gutiérrez- Escribano *et al.*, 2011). Spa2 es una proteína muy grande, de 1466 aa, que no presenta dominios conservados excepto en el extremo N-terminal, donde se localiza un dominio *GIT_SHD* (*Spa2 Homology Domain*, *IPR013724*) entre las posiciones 37 y 117. Las proteínas GIT son proteínas integradoras de señales con función activadora de GTPasas, y están involucradas en la organización del citoesqueleto en zonas de crecimiento activo. Es interesante que los cuatro posibles sitios de fosforilación por Cbk1/Mob2 en Spa2 se localizan inmediatamente después de este dominio (S121, S143, S153 y S163), en una región variable entre distintos hongos y levaduras, y además son específicos del género *Candida* (no estando presentes en *S. cerevisiae*), lo que sugiere que su fosforilación podría ser importante para el crecimiento hifal.

Cuando se analizó la localización de Spa2 en el mutante *cbk1-as/cbk1Δ*, se comprobó que la actividad kinasa de Cbk1 es esencial para el mantenimiento del polarisoma en el ápice de la hifa, como se ha observado previamente (Rojo-Domínguez, 2018). Cuando la kinasa estaba activa, Spa2 se localizaba continuamente en el ápice de la hifa, y durante la formación del septo era posible observarla

Discusión

transitoriamente en esta región, pero incluso en estos momentos el polarisoma apical permanecía ensamblado en la punta, confirmando que su asociación con esta región es independiente del ciclo celular. Por el contrario, tras la inactivación de la kinasa por adición de 1NM-PP1, Spa2 lentamente desaparecía del ápice hasta desensamblarse completamente. Durante la formación del septo, Spa2 se concentraba en el plano de división transitoriamente, para volver a acumularse en el ápice de la hifa o en el ápice y en el córtex de la célula subapical al acabar la citoquinesis. Sin embargo, a partir de este momento, el crecimiento de la punta o del compartimento subapical tenía las características típicas del crecimiento levaduriforme, ya que se dispersaba por todo el córtex apical en lugar de mantenerse focalizado, y la célula comenzaba a ensancharse, formando una yema apical. Estos resultados son una indicación clara de que la actividad kinasa de Cbk1 es esencial para que Spa2 (y por tanto el polarisoma) adopte una conformación específica de hifas, necesaria para mantener el crecimiento polarizado independiente del ciclo celular. Es posible que la fosforilación de los cuatro sitios cerca del dominio *GIT_SHD* sean necesarios para marcar a Spa2 y adopte una configuración específica de hifas, necesaria para mantener su asociación con la punta de la hifa de manera independiente del ciclo celular. Cuando se inactiva la kinasa Cbk1, alguna fosfatasa debe eliminar esta marca en Spa2, promoviendo la disociación del polarisoma de la punta, de tal manera que cuando vuelve a asociarse con el córtex ya lo hace con las características típicas del polarisoma de levaduras. Por tanto, será muy interesante construir un mutante en estos cuatro sitios (*spa2-S121A-S143A-S153A-S163A*) y analizar el fenotipo de las hifas y la localización del polarisoma para confirmar esta hipótesis.

1.4. Cbk1 y la exocitosis.

La secreción polarizada hacia las zonas de crecimiento es otro proceso esencial para el crecimiento de las hifas. Recientemente se ha descrito que el aparato secretor en *C. albicans* presenta una organización diferente al de hongos filamentosos, y se organiza en distintos dominios. Desde la envoltura nuclear emergen las membranas del retículo endoplásmico en forma de láminas paralelas que se extienden por la mayor parte de la longitud de la hifa. En la región subapical existe una región de membranas en forma de láminas más cortas sin una orientación aparente, con la organización típica del aparato de Golgi. Finalmente, en el ápice se encuentra el Spitzenkörper, compuesto por vesículas secretoras de tamaño uniforme (Weiner *et al.*, 2019). Esta organización hace que el transporte de vesículas en *C. albicans* sea de corto alcance, entre el Spitzenkörper y la membrana plasmática, a diferencia de hongos filamentosos y muchas células eucariotas altamente polarizadas en las que el transporte de vesículas tiene lugar a lo largo de la hifa y depende del citoesqueleto.

En *C. albicans*, por tanto, las vesículas portadoras de nuevos materiales, como membranas y enzimas implicados en la síntesis de pared celular necesarios para la expansión de la membrana, se acumulan inicialmente en el Spitzenkörper, desde donde son reclutadas por el polarisoma para ser transportadas hacia la superficie celular y fusionarse finalmente con la membrana plasmática gracias a la acción del exocisto y de las proteínas SNARE (Jones y Sudbery, 2010).

El exocisto es un complejo proteico octamérico esencial en el paso final de la secreción polarizada, facilitando el anclaje (*tethering*) de las vesículas secretoras a la membrana plasmática. Una vez ancladas, la fusión de la membrana de la vesícula con la membrana plasmática depende de las

proteínas SNARE, que se localizan tanto en la cara externa de las vesículas (v-SNAREs) como en la cara interna de la membrana plasmática (t-SNAREs). Cuando las v-SNAREs interactúan con las t-SNAREs se produce la fusión de ambas membranas y su contenido se libera en el punto de fusión (revisado en Risselada y Mayer, 2020; Yang y Margam, 2021).

En este trabajo hemos estudiado la dinámica del exocisto usando las subunidades Exo84 y Sec3 marcadas con GFP en la cepa *cbk1-as/cbk1Δ* inactivando la kinasa una vez que se ha iniciado la formación del tubo germinativo. Los resultados obtenidos con ambas subunidades son similares, e indican que cuando Cbk1 está activa, el exocisto se localiza de manera continua en forma de medialuna en la punta de las hifas, desaparece transitoriamente de la punta (o su intensidad se reduce considerablemente) y se localiza en el plano de división de la hifa durante la citoquinesis para volver a posicionarse en el ápice y continuar con el crecimiento apical. Este comportamiento es ligeramente distinto al descrito previamente, donde se mostró que durante la formación del septo es posible visualizar a Exo84 simultáneamente en el plano de división y en la punta de la hifa (Caballero-Lima y Sudbery, 2014), aunque en esos experimentos no se usó microscopía a lo largo del tiempo. No es posible saber si las diferencias se deben a la diferente técnica usada o al diferente fondo genético. El mutante *cbk1-as/cbk1Δ*, incluso en ausencia de la droga, tiende a presentar un fenotipo similar al que se observa en presencia de 1NM-PP1 en un porcentaje variable de hifas, lo que indica que es menos activo que la proteína silvestre Cbk1, y esta menor actividad kinasa podría producir una despolarización temporal del exocisto localizado en el ápice de la hifa, explicando que no aparezca simultáneamente en ambas localizaciones en nuestros experimentos.

Tras la inhibición de la actividad de Cbk1, tanto Sec3-GFP como Exo84-GFP desaparecían rápidamente de la zona apical y volvían a detectarse cuando se asociaban al anillo de septinas durante la citoquinesis. Una vez concluida la formación del septo, el exocisto retornaba de manera dispersa a la punta de las hifas, que comenzaban a ensancharse generando una yema apical como se ha comentado anteriormente, y en ocasiones también se acumulaba en los compartimentos subapicales activando la formación de yemas laterales. Estos datos son indicativos de que la actividad kinasa de Cbk1 es necesaria para mantener la polarización del exocisto en el ápice de la hifa de forma continuada.

En *C. albicans*, de todas las subunidades del exocisto, Exo84 es la única que presenta sitios posibles de fosforilación por Cbk1, que se localizan a lo largo de la proteína (Figura 19), por lo que una hipótesis muy atractiva es que la NDR kinasa regule la localización del exocisto a través de esta subunidad. Además, estudios previos han demostrado que Exo84 es fosforilado por Cdc28-Hgc1 y esta fosforilación es necesaria para una extensión hifal eficiente (Caballero-Lima y Sudbery, 2014). Exo84 contiene tres sitios completos de fosforilación por Cdc28, uno de los cuales se localiza dentro del dominio PH (S384) y los otros dos lo flanquean (S256 y T488). Un mutante que contiene la variante *exo84-3A* (S256A, S384A y T488A, que denominaremos *exo84-3A^{CDK}* para distinguirla de las mutaciones en los sitios de fosforilación por Cbk1 construidos en este trabajo) tiene graves defectos en el crecimiento, mientras que la que contiene el alelo *exo84-2A^{CDK}* (S256A y S384A) presenta un aumento significativo en el número de pseudohifas y algunas tienen un tubo germinativo corto que se

Discusión

engruesa en la punta con un crecimiento menos polarizado. Además, las hifas, morfológicamente normales, crecen a una tasa que se aproxima a la mitad que la de hifas silvestres. Por el contrario, el mutante *exo84-3E^{CDK}* (S256E, S384E y T488E) sólo tiene un defecto leve en el fenotipo de las hifas, por lo que propusieron que, en *C. albicans*, la fosforilación de Exo84 por Cdc28-Hgc1 es necesaria para el crecimiento polarizado eficiente de las hifas (Caballero-Lima y Sudbery, 2014).

Basándonos en estos resultados, se decidió hacer una caracterización preliminar de la importancia de los tres posibles sitios de fosforilación por Cbk1 en la función del exocisto de *C. albicans*, uno de los cuales también se localiza dentro del dominio PH. Para ello, se construyeron cepas condicionales que tenían un alelo *EXO84* bajo el control de un promotor regulable por tetraciclina (*TetOff*), de tal manera que cuando se apagaba su expresión, la única copia de *EXO84* que contenían eran las sustituciones en cada uno de los posibles sitios de fosforilación por Cbk1 a alanina *exo84-3A* (*exo84-S118A*, *T418A* y *S511A*) o ácido glutámico *exo84-3E* (*exo84-S118E*, *T418E* y *S511E*). Durante el crecimiento en forma de levaduras, cuando se apagaba la expresión del alelo silvestre, ambas cepas mutantes presentaban una mezcla de células normales y células de mayor tamaño que la cepa silvestre en proporciones variables. Es interesante que, durante la filamentación, los efectos de las mutaciones en los sitios de fosforilación por Cbk1 son los opuestos a los descritos para los sitios de fosforilación por Cdc28-Hgc1. Así, las hifas del mutante *exo84-3A* tenían una apariencia normal y eran indistinguibles de las hifas silvestres por su aspecto y tamaño, a diferencia de las producidas por el mutante *exo84-3A^{CDK}*, que son más cortas y anormales. Por el contrario, las hifas del mutante *exo84-3E* eran más largas y gruesas que las de la cepa silvestre, mientras que las del mutante *exo84-3E^{CDK}* no presentan defectos morfológicos apreciables. Esto podría indicar que la fosforilación en los sitios de Cbk1 no es esencial para el crecimiento de las hifas, pero la fosforilación constante de estos sitios aumenta la tasa de crecimiento polarizado, quizás por aumentar la velocidad de fusión de las vesículas con la membrana plasmática. En vista de estos resultados preliminares, será necesario confirmar que su fosforilación depende realmente de Cbk1 y cómo afectan ambas mutaciones a la localización del exocisto. También sería interesante construir un mutante que combine las seis mutaciones en la misma proteína (*exo84-6A* y *exo84-6E*) para analizar los efectos en la tasa de crecimiento de las hifas.

Además del exocisto, Cbk1 podría regular la exocitosis y secreción a través de la sintaxina Sso2, una de las t-SNAREs que se encuentra repartida por toda la superficie de la membrana celular. Esto se debe a que recientemente se ha demostrado que Sec3, además de su función como componente del polarisoma también está implicado en la formación del complejo SNARE en *S. cerevisiae* (Yue *et al.*, 2017). Esta proteína contiene una región N-terminal auto-inhibitoria que se asocia con su dominio SNARE e impide la interacción con otras SNAREs. Cuando interacciona con la proteína Sec3 se produce un cambio conformacional que la activa, permitiendo su unión con la t-SNARE Sec9 para formar el heterodímero funcional que interacciona con las v-SNAREs de las membranas de las vesículas secretoras (Yue *et al.*, 2017). SSO2 es un gen esencial en *C. albicans* y cuando se reprime su expresión durante el crecimiento hifal con un promotor regulado, genera hifas con las puntas abombadas similares a las del mutante *sec3 Δ* y a las del mutante *cbk1-as/cbk1 Δ* tras la formación del primer septo (Bernardo *et al.*, 2014).

Sso2 también es una posible diana de Cbk1, ya que contiene un posible sitio de fosforilación por Cbk1 en el extremo N-terminal auto-inhibitorio (T117), por lo que también podría estar bajo la regulación de Cbk1. La inhibición de la actividad kinasa del mutante *cbk1-as/cbk1Δ* no alteraba la localización de Sso2, que seguía estando distribuido a lo largo de toda la membrana plasmática en las hifas (datos no mostrados), pero no podemos descartar que Cbk1 esté fosforilando a Sso1 únicamente en el ápice de los filamentos (donde se localiza Cbk1) para modular la interacción de la sintaxina Sso2 con Sec9, haciendo más eficiente la formación del complejo t-SNARE funcional.

1.5. Cbk1 y la endocitosis.

La endocitosis se produce en puntos concretos de la membrana plasmática y es clave para regular su composición. Durante este proceso, las células recolectan material extracelular y proteínas de superficie asociadas a la membrana plasmática, como receptores, canales y proteínas de señalización, y las empaquetan en vesículas que entran en el citosol. Estas vesículas se fusionan con otros compartimentos celulares internos, lo que permite el reciclaje o la degradación de su contenido. La maquinaria molecular implicada en este proceso es muy compleja y requiere de al menos 50 componentes proteicos diferentes que se ensamblan en un punto concreto de la membrana plasmática, en una ruta jerárquica y ordenada temporalmente (revisado en Goode *et al.*, 2015). Estas proteínas promueven el reconocimiento y la agrupación de receptores, la remodelación de la membrana y el ensamblaje, siendo finalmente la actina el motor que genera fuerza para impulsar la invaginación de la membrana y la escisión de la vesícula. La actina se concentra en los sitios de endocitosis formando estructuras asociadas a la membrana plasmática denominadas parches corticales de actina, por lo que son un buen indicador para estudiar el proceso de endocitosis.

En *C. albicans*, la proteína Abp1 se localiza en la zona apical de la hifa y se encuentra asociada a los parches de actina, por lo que se ha usado como marcador para estudiar su localización (Martin *et al.*, 2007). En este trabajo la hemos usado unida a GFP para estudiar la dinámica y la localización de los parches de actina en hifas y su dependencia de la actividad kinasa de Cbk1. Nuestros resultados indican que la actividad de esta NDR kinasa es esencial para el mantenimiento de los parches de actina en la región apical de las hifas, pues tras la adición del análogo de ATP se despolarizaban y su número se reducía, incluso llegando a desaparecer completamente en los primeros minutos tras la inhibición. Este hecho ocurría en un gran porcentaje de las hifas analizadas, aunque no hemos cuantificado el número de parches de actina presentes en las hifas en presencia de DMSO o de 1NM-PP1, porque el número de planos capturados (3 planos en Z separados por 0,5 μm) en los experimentos de *time-lapse* no cubren todo el grosor de la hifa. Cuando se ensamblaban de nuevo a tiempos más tardíos del desarrollo hifal, se comportaban como lo harían en levaduras, reactivando el crecimiento de yemas apicales o laterales, como se ha comentado para otros marcadores de polaridad.

Una pregunta que también queda en el aire es si, tras la inhibición de la actividad kinasa de Cbk1, se produce el completo desensamblaje de la maquinaria de endocitosis de la membrana o únicamente se produce la disociación de Abp1-GFP de la actina presente en los parches. Para responderla, será necesario usar otros marcadores de endocitosis, como algunas de las proteínas que se ensamblan en las etapas iniciales del proceso antes que la actina, como Sla2 o Ede1 (Gale *et al.*,

Discusión

2009; Martin *et al.*, 2007). Además, será necesario comprobar que la desaparición de los parches de actina corticales resulta en una disminución de la tasa de endocitosis en ausencia de actividad kinasa Cbk1. Para ello, deberían utilizarse dos colorantes diferentes. El *Lucifer Yellow* es una molécula fluorescente que se usa como marcador de endocitosis de la fase fluida, ya que es internalizado y se acumula en la vacuola (Basrai *et al.*, 1990). El colorante anfifílico FM4-64 se utiliza para estudiar la internalización de membranas, ya que tiñe la membrana plasmática y luego se integra en vesículas endocíticas que finalmente acaban en la membrana vacuolar (Crampin *et al.*, 2005). El uso de estos dos colorantes permitirá analizar el tráfico endocítico antes y después de la inhibición de Cbk1 durante el desarrollo de las hifas.

Otra pregunta interesante es qué ocurre con los cables de actina que se organizan desde el polarisoma por la formina Bni1 y contribuyen al transporte de las vesículas desde el Spitzenkörper hasta la membrana plasmática. El marcador usado en este trabajo para marcar la actina es la proteína Abp1, que se une a la actina de los parches, pero no a la que polimeriza en forma de cables. Para estudiar si la inhibición de Cbk1 también produce una desorganización de los cables de actina será necesario usar un marcador diferente como *LifeAct*. Este marcador ha sido utilizado con éxito en numerosos sistemas y consiste en una fusión de los 17 primeros aa de la proteína Abp140 de *S. cerevisiae* con la GFP (Riedl *et al.*, 2008).

1.6. Cbk1 y la asimetría celular durante el crecimiento hifal.

En *C. albicans*, la división celular es asimétrica tanto en levaduras como en hifas, ya que la célula madre y la hija tienen distinto comportamiento tras la citoquinesis. En levaduras, por ejemplo, la célula apical (hija) activa la expresión de los genes específicos de hijas (DSEs) gracias a la acumulación asimétrica de Ace2 en su núcleo, mientras que esto no ocurre en la célula subapical (madre) (Figura 63). Durante la filamentación, la célula subapical o madre detiene el ciclo celular tras la citoquinesis y se queda bloqueada en fase G1, mientras que la célula apical (hija) continúa creciendo y dividiéndose, alargando el filamento (Gow y Gooday, 1987). Esta asimetría celular hace que haya una distribución asimétrica de algunos factores de transcripción, como el represor Nrg1, que se acumula en los núcleos subapicales haciendo que la expresión de los genes específicos de hifas (HSGs) ocurra mayoritariamente en el compartimento apical (Bermejo-Pulido, 2016) o Ace2, que se acumula de forma inversa. Dado que durante el crecimiento hifal, la kinasa Cbk1 se localiza altamente polarizada en el ápice de las hifas (Figura 63), nuestro modelo de trabajo es que se generaría un gradiente de actividad de Cbk1 desde la punta, que es necesario o contribuye a crear la asimetría entre los compartimentos apical y subapical.

En este trabajo hemos caracterizado la localización del factor de transcripción Ace2 durante el crecimiento de las hifas, ya que en trabajos anteriores existía una cierta controversia sobre si su localización está restringida al núcleo de la célula apical (Bharucha *et al.*, 2011) o se distribuye tanto en el núcleo de la célula apical como en el de la subapical (Calderón-Noreña *et al.*, 2015; Kelly *et al.*, 2004). Nuestro trabajo demuestra claramente que se localiza en ambos compartimentos pero de manera asimétrica, acumulándose preferentemente en la célula apical. También hemos demostrado que Cbk1 es responsable de generar este patrón asimétrico, pues tras inhibir su actividad se pierde la

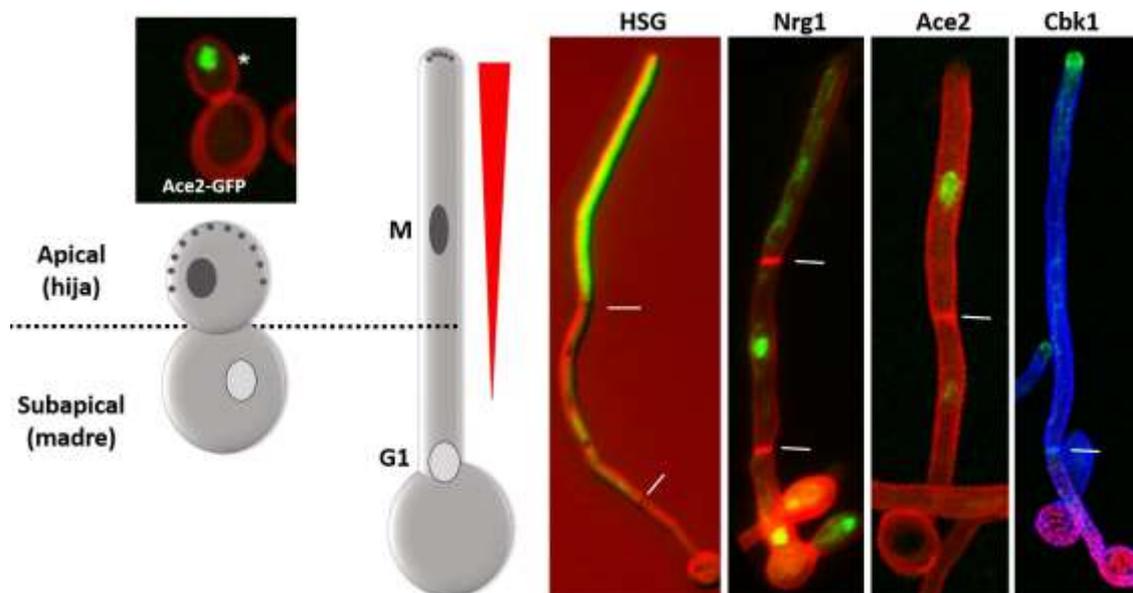


Figura 63. La división celular en *C. albicans* es asimétrica. Tanto en levaduras como en hifas, la división celular genera dos células con comportamientos diferentes. En levaduras, el factor de transcripción Ace2 se acumula en el núcleo apical (célula hija) mediante un mecanismo que depende de la fosforilación por la kinasa Cbk1. Durante la filamentación, la mitosis también es asimétrica y genera dos núcleos diferentes: la célula subapical deja de crecer y queda bloqueada en G1 mientras que la apical sigue creciendo de forma hiperpolarizada y progresando a lo largo del ciclo celular. Esto hace que los HSGs se expresen mayoritariamente en el compartimento apical, y también existe una distribución asimétrica de algunos factores de transcripción como Nrg1, que se acumula en los núcleos subapicales, o Ace2 que lo hace en el apical. La NDR kinasa Cbk1 en hifas se localiza en el córtex de la célula apical, altamente polarizada (verde), por lo que podría generar un gradiente de actividad kinasa responsable de la asimetría. Las líneas blancas marcan la posición de los septos (Imágenes de HSGs y Nrg1 tomadas de Bermejo-Pulido 2015. La imagen de Cbk1 muestra Cbk1-GFP y Sur7-mCherry en hifas teñidas con calcoflúor).

asimetría y Ace2 pasa a localizarse en ambas células con una intensidad de fluorescencia similar. Por tanto, al menos en el caso de Ace2, la hipótesis del gradiente de actividad de Cbk1 necesario para la asimetría sí parece ser cierta, y lo mismo ocurre en levaduras, por lo que Cbk1 parece ser el responsable de la localización asimétrica de Ace2 en ambas morfologías.

Una consecuencia de la inhibición de la actividad de Cbk1 es que, tras la formación del septo, en muchos casos se produce una gemación lateral en los compartimentos subapicales de las hifas, lo que indica que el bloqueo del ciclo celular de estas células ha desaparecido y se reactiva su crecimiento. Esto indica que la actividad kinasa de Cbk1, directa o indirectamente, es necesaria para mantener el bloqueo del ciclo de las células subapicales (Rojo-Domínguez, 2018), fosforilando diferencialmente algún sustrato hasta ahora desconocido que para la progresión del ciclo celular en unas células mientras que permite que continúe el crecimiento en otras.

Recientemente, se ha propuesto un posible candidato que estaría implicado en el bloqueo del ciclo en el compartimento subapical y al mismo tiempo sería el encargado de suprimir la transición de hifas a levaduras, y ese candidato es el factor de transcripción Ace2 (Wakade *et al.*, 2020). Estos autores han demostrado que un conjunto significativo de genes está regulado positivamente en ausencia de Ace2, lo que sugiere que funciona directa o indirectamente como un represor de la expresión génica durante el crecimiento de las hifas. Al mismo tiempo, los dos sitios de fosforilación por Cbk1 que rodean al NES de Ace2 son necesarios para su función y cuando se mutan a alanina (el

Discusión

mutante *ace2-2A*) se producen defectos en la separación celular durante el crecimiento en forma de levaduras y también un aumento en la formación de yemas laterales en las hifas. En base a estos resultados, han propuesto un modelo en el que una de las funciones del eje Cbk1-Ace2 sería la de suprimir la transición de hifas a levaduras (Figura 15).

Los datos de la localización de Ace2 en presencia o ausencia de la actividad de Cbk1 presentados en este trabajo no parecen apoyar la idea de que Ace2 funcione como un represor, ya que su abundancia es mayor en el núcleo apical que en el subapical, lo cual resultaría en una mayor represión de los HSGs en el último compartimento de la hifa en lugar de en los basales. Además, tras la inhibición de la actividad de Cbk1, Ace2 se distribuye uniformemente en los dos compartimentos al tiempo que se activa la gemación lateral de las hifas, lo que tampoco concuerda con que funcione como un represor. Una posibilidad es que exista una fosforilación diferencial de Ace2 en ambos compartimentos dependiente de Cbk1, y esto genere una diferente función de Ace2 en cada célula o le permita interactuar de forma diferencial con otros factores de transcripción. De hecho, se ha descrito que el factor Efg1 compite con Ace2 por la unión a los promotores de los genes necesarios para la separación celular reprimiendo su expresión en hifas, y que esto depende de la fosforilación de Efg1 por el complejo Cdc28-Hgc1 (Wang *et al.*, 2009). Por tanto, no podemos descartar completamente que Ace2 funcione como represor, ya que podría interactuar de forma diferente con los promotores de algunos genes dependiendo de su estado de fosforilación. Alternativamente, la diferencia podría ser debida a los distintos medios usados en ambos estudios, ya que los experimentos de Wakade y colaboradores fueron realizados en medio Spider mientras que en los nuestros hemos usado suero al 10% y 37°C como inductor de la filamentación, y se ha descrito que Ace2 es necesario para la formación de filamentos normales en medio Spider, pero es prescindible cuando se usa suero como inductor (Kelly *et al.*, 2004), aunque Cbk1 es necesario para la formación de filamentos en ambas condiciones.

Para profundizar en el estudio de la función de Ace2 durante el crecimiento hifal en presencia de suero y evaluar si la hipótesis de que Ace2 funciona como represor de la gemación lateral es cierta, se delecionaron los dos alelos de *ACE2* en la cepa *cbk1-as/cbk1Δ*. Si Ace2 funcionara como un represor de la gemación lateral, cabría esperar que su ausencia aumentara el número de yemas laterales que se observan en el mutante *cbk1-as/cbk1Δ* tras la inhibición de la actividad kinasa. Los resultados obtenidos en nuestras condiciones de filamentación no parecen apoyar esta posibilidad, ya que en el mutante doble *cbk1-as/cbk1Δ ace2ΔΔ* no se observó un aumento en la frecuencia de gemación, sino más bien lo contrario, ya que este mutante produce mayoritariamente yemas apicales en presencia del análogo debido al cambio del patrón de crecimiento descrito del mutante *cbk1-as/cbk1Δ*. Sorprendentemente, observamos que la longitud de las hifas era considerablemente menor en las cepas sin Ace2 que en la control, lo que indica que en ausencia de la actividad de Cbk1 el factor de transcripción Ace2 es necesario para un crecimiento apical robusto. Ace2, por tanto, es relevante para el crecimiento polarizado de las hifas cuando carecen de la actividad kinasa de Cbk1. Ya que el mutante *ace2ΔΔ* filamta normalmente en medio con suero y sus hifas son similares a las de la cepa silvestre (Calderón-Noreña *et al.*, 2015), es posible que en ausencia de la fosforilación dependiente de Cbk1, Ace2 esté induciendo la expresión de algunos genes que en condiciones normales no hace, y

cuyos productos activarían el crecimiento de las hifas.

Un dato que hay que considerar es que los resultados observados en la cepa *cbk1-as/cbk1Δ ace2ΔΔ* estaban parcialmente oscurecidos por el hecho de que la delección de *ACE2* resulta en un defecto en la separación de las células de levaduras, por lo que cuando se induce la filamentación la observación microscópica de hifas completas es difícil. Por ello, se trató de construir una cepa en la que la expresión de *ACE2* estuviera regulada por un promotor condicional que permitiera apagar su expresión en el momento deseado para evitar la formación de grumos. En esta cepa, también se planteó aumentar la expresión del alelo sensible al análogo de *CBK1*, ya que incluso en ausencia de 1NM-PP1 algunas de las hifas presentan un fenotipo mutante, indicación de que su actividad kinasa es menor que la de la proteína silvestre. Desafortunadamente, el promotor elegido para aumentar la expresión del alelo *cbk1-as* (el promotor *MET3p* regulable por metionina) ha resultado funcionar peor que el promotor nativo de *CBK1* durante la inducción de la filamentación, ya que sus hifas tienen el fenotipo del mutante, por lo que no se continuó con la construcción de esta cepa. En el futuro, será interesante tratar de mejorar su diseño utilizando un promotor más fuerte, aunque sea constitutivo, como por ejemplo el promotor del gen *TDH3* (Nobile *et al.*, 2008).

En resumen, nuestros resultados avalan la hipótesis de que Cbk1 es necesario para generar la asimetría durante la división de las hifas, contribuyendo a la acumulación mayoritaria del factor de transcripción Ace2 en el núcleo apical, pero no apoyan la idea de que Ace2 esté funcionando como un represor de la transición hifa a levadura en las condiciones utilizadas en nuestros experimentos, ya que:

1. Ace2 se acumula mayoritariamente en el compartimento apical que continúa creciendo activamente, en lugar de en el subapical que se bloquea en G1. Esta distribución es la contraria a la que se espera para un represor, que debería ser más abundante en los compartimentos subapicales, como ocurre con Nrg1, que se acumula en todos los núcleos salvo en el apical (Bermejo-Pulido, 2016). A pesar de ello, no podemos descartar que la pequeña fracción del núcleo subapical actúe como un represor y tenga una función diferente a la que desempeña en el apical debido a una fosforilación diferencial dependiente de Cbk1 o a alguna otra kinasa que esté activa en la célula subapical.
2. La inhibición de la actividad kinasa de Cbk1 conduce a una distribución simétrica de Ace2 en los núcleos apical y subapical, pero esto no reduce la frecuencia de formación de yemas laterales, lo que sería esperable si funcionara como represor de esta transición morfológica.
3. La delección de *ACE2* no produce un aumento en el número de yemas laterales cuando se inhibe la actividad del mutante *cbk1-as/cbk1Δ*.

1.7. Cbk1 y las GTPasas de la familia Rho.

Rho4 es una Rho GTPasa de la familia Rho. Las proteínas de esta familia funcionan como interruptores moleculares que controlan vías de transducción de señales en las células eucariotas, teniendo un estado inactivo cuando se unen a GDP y otro activo unido a GTP (revisado en Hall, 2012; Pérez y Rincón, 2010). El cambio conformacional inducido por la unión a GTP promueve una

Discusión

interacción con sus proteínas diana (efectores), lo que genera una respuesta celular. Una de las funciones más conservadas de las Rho GTPasas desde levaduras a humanos es la de controlar el citoesqueleto de actina, aunque, además promueven otra amplia gama de actividades celulares. En levaduras existen seis Rho GTPasas, de Rho1 a Rho5 y Cdc42, que desempeñan funciones diferentes.

Rho4 es una proteína no esencial en hongos y levaduras, aunque su función varía de unos organismos a otros. La delección de *RHO4* en *S. cerevisiae* o *A. gossypii* no produce ningún fenotipo claro (Matsui y Toh, 1992; Wendland *et al.*, 2000). Por el contrario, la delección de los homólogos en *S. pombe* o en *N. crassa* indica que, en estos organismos, está implicada en la septación. En *N. crassa*, la delección de *rho-4* anula la formación del septo, mientras que el alelo activo dominante produce numerosos septos muy próximos (Rasmussen y Glass, 2005). En la levadura de fisión *S. pombe*, Rho4 participa en la morfología celular, en la formación del septo y en la integridad de la pared celular y se ha demostrado que regula la secreción polarizada de las glucanasas Eng1 y Agn1 durante la separación celular (Santos *et al.*, 2003; Santos *et al.*, 2005), siendo también necesaria para la localización del exocisto en el plano de división (Pérez *et al.*, 2015). Los mutantes *rho4Δ* presentan el fenotipo de células encadenadas incapaces de separarse (Santos *et al.*, 2003) que se suprimen por sobreexpresión de las glucanasas Eng1 o Agn1 y tienen un septo secundario excesivamente engrosado, lo que sugiere que también regula la formación del septo (Nakano *et al.*, 2003).

En *C. albicans*, la delección de *RHO4* produce un fenotipo similar al observado en *S. pombe*, con defectos en separación celular que se corrigen por sobreexpresión de la endoglucanasa *ENG1*, pero no por sobreexpresión de la quitinasa *CHT3* (Dünkler y Wendland, 2007). Por tanto, parece que la función de Rho4 durante la separación celular se encuentra conservada entre *S. pombe* y *C. albicans*. Durante el crecimiento en forma de levaduras, Rho4 se localiza en el cuello y, basado en esta observación, Dünkler y Wendland (2007) propusieron que su función sería la de establecer un nuevo eje de polaridad regulado por el ciclo celular, necesario para atraer a las vesículas de secreción hacia esta nueva región de crecimiento que aportan el material necesario para la síntesis del septo. En hifas, la cepa *rho4ΔΔ* no tiene defectos en la capacidad de respuesta a suero ni en la separación celular, comportándose como la cepa silvestre, posiblemente debido a que la punta de la hifa y el sitio de formación del septo no compiten por el mismo conjunto de proteínas implicadas en polaridad o vesículas secretoras al ser mayor la distancia entre estos dos puntos que la distancia entre la punta de la yema y el cuello en levaduras (Dünkler y Wendland, 2007).

Como se ha comentado en apartados anteriores, Rho4 presenta 3 posibles sitios de fosforilación por Cbk1 que se localizan muy próximos en una región desorganizada cerca del extremo C-terminal (S274, S278 y S292; Figura 19) y que además son específicos del género *Candida*, no estando presentes en *S. cerevisiae*, *S. pombe* o *A. gossypii*, lo que sugiere que podrían desempeñar alguna función regulatoria específica de *Candida*. Por ello, se decidió generar mutantes en esos tres sitios fosfoaceptores para analizar si estos desempeñan algún papel durante el desarrollo hifal.

Como primera aproximación al estudio de la importancia de estos sitios, se construyó un mutante *rho4ΔΔ* en el que poder estudiar los fenotipos generados por las mutaciones en los sitios

fosfoaceptores. En este mutante, inicialmente se confirmó que existía un defecto de separación similar al descrito previamente, formando grupos de células (Dünkler y Wendland, 2007). En *C. albicans*, las septinas actúan como proteínas de andamiaje para reclutar otras proteínas a la región del cuello de la célula y así asegurar la morfogénesis y la citoquinesis (Warenda y Konopka, 2002). Ya que Rho4 se localiza en el lugar de formación del septo de división, al igual que el anillo de septinas, se contempló la opción de que los defectos en separación de las levaduras *rho4ΔΔ* pudieran deberse a un ensamblaje defectuoso del anillo de septinas. Sin embargo, aunque en *S. pombe* la localización del exocisto y las septinas depende de Rho4 (Pérez *et al.*, 2015), no ocurre lo mismo en *C. albicans*, ya que no se observaron diferencias significativas en el ensamblaje de los anillos de septinas, tanto sencillos como dobles, lo que posiblemente sea debido al diferente patrón de división entre ambas levaduras. Mientras que en *C. albicans* el anillo de septinas se ensambla al inicio del ciclo celular y marca el punto de emergencia de la yema, en *S. pombe* se ensambla al final de mitosis en el centro de la célula, momentos antes del proceso de la citoquinesis y la separación celular.

Es interesante que las levaduras de los mutantes *rho4-3A/rho4Δ* y *rho4-3E/rho4Δ* recapitulan el defecto del mutante nulo *rho4ΔΔ*, presentando un mayor número de grupos de células que la cepa silvestre. Este defecto es incluso más severo en el mutante *rho4-3E/rho4Δ* que en el mutante *rho4ΔΔ*, lo que podría ser una indicación de que durante el crecimiento en forma de levaduras estos sitios están preferentemente defosforilados, aunque dado que la cepa *rho4-3A/rho4Δ* también presenta el mismo defecto es difícil de interpretar el resultado, y podría ser debido a que ambas mutaciones alteran la estructura de esta región, que se encuentra cerca del sitio de prenilación de la proteína afectando a su función o a su localización.

Cuando analizamos la localización de la proteína Rho4 marcada con GFP usando el promotor *MAL2p* durante el crecimiento levaduriforme, pudimos comprobar que se localizaba transitoriamente en el plano división junto a las septinas cuando el anillo comenzaba a duplicarse, como se ha descrito previamente (Dünkler y Wendland, 2007). Sin embargo, Rho4 también se localizaba en el córtex celular, tanto de la célula madre como de la hija, en forma de puntos o parches corticales, algunos de los cuales eran altamente dinámicos y otros se mantenían un poco más tiempo asociados a la membrana. Esta localización cortical no ha sido descrita previamente, quizás debido a su alto dinamismo y a la mayor sensibilidad de las cámaras actuales. Las proteínas mutantes GFP-*rho4-3A* y GFP-*rho4-3E* tenían una distribución similar, localizándose en el plano de división y también en el córtex celular asociados a la membrana plasmática, de forma similar a la proteína silvestre, aunque en el caso del mutante fosfomimético los parches corticales eran más difusos que en las otras dos proteínas. Además, las mutaciones afectaban claramente al tiempo de llegada de las proteínas al septo, que en el caso de la proteína silvestre ocurría casi simultáneamente con el momento en el que el anillo de septinas comienza a duplicarse mientras que las proteínas *rho4-3A* y *rho4-3E* se asociaban al anillo de septinas unos 10 minutos antes de su duplicación y se mantenían en esta zona más tiempo que la proteína silvestre, especialmente en el caso de *rho4-3A*. Estos resultados parecen indicar que la fosforilación de estos tres sitios contribuye a regular la asociación/disociación de Rho4 con el anillo de septinas, aunque de nuevo no es fácil sacar conclusiones puesto que ambas tienen un efecto similar en lugar de opuesto, como cabría esperar.

Discusión

Dado que nuestro interés se centra en el estudio del crecimiento polarizado y de su regulación por Cbk1, se analizó la función de Rho4 en hifas. Como se ha descrito previamente, los mutantes *rho4 $\Delta\Delta$* no presentaron defectos significativos en la respuesta al suero o en el crecimiento de las hifas, aunque hemos podido demostrar que Rho4 también participa en el proceso de separación de las hifas, utilizando al mutante *sep7 $\Delta\Delta$* como herramienta para su análisis.

En hifas, los anillos de septinas permanecen ensamblados en el plano de división tras la citocinesis al tiempo que la degradación del septo se inhibe (Sudbery *et al.*, 2004; Sudbery, 2011). Durante la filamentación, los anillos de septinas adquieren un estado específico de hifas caracterizado por la presencia de un núcleo estable compuesto por las septinas Sep7, Cdc3 y Cdc12 y una alta tasa de intercambio de Cdc10 con el citoplasma (González-Novo *et al.*, 2008). Esta modificación de la dinámica de los anillos depende de la septina Sep7 y de la ciclina específica de hifas Hgc1, y está estrechamente relacionada con la inhibición de la separación celular. Se ha demostrado que el intercambio de Cdc10 inhibe la translocación de algunos activadores de la separación celular a la región del septo durante el crecimiento en forma de hifas. Este es el caso de la fosfatasa Cdc14, que se localiza en el septo en las levaduras pero no en las hifas, y la translocación de Cdc14 al septo es una señal necesaria para activar el programa de separación celular mediado por el factor de transcripción Ace2 (Clemente-Blanco *et al.*, 2006).

Los mutantes *sep7 $\Delta\Delta$* son capaces de formar hifas, pero activan prematuramente la separación celular en hifas y los cuerpos celulares se separan del resto del filamento (González-Novo *et al.*, 2008). Esto se debe a que la ausencia de Sep7 hace que se pierda la dinámica de Cdc10 y los anillos de septinas adquieren las características propias de los de levaduras, reclutando a Cdc14 al septo. La utilización del mutante *sep7 $\Delta\Delta$* , que activa la separación de los compartimentos hifales, nos permitió demostrar que Rho4 también participa en la separación en hifas sin afectar al crecimiento apical continuo característico de este morfotipo de *C. albicans*. Las proteínas rho4-3A y rho4-3E también corrigen ese defecto, aunque un poco peor en el caso del mutante fosfomimético, lo que de nuevo parece indicar que su fosforilación desempeña un papel en la regulación de la función de Rho4 en hifas.

Un fenotipo interesante que hemos observado durante la filamentación es que las hifas que contienen la variante rho4-3E son más largas y anchas que las de las cepas que contienen la forma rho4-3A o la proteína silvestre. Además, la proteína GFP-rho4-3E parece ser más abundante en la membrana plasmática que rho4-3A y también se detecta en numerosas estructuras membranosas en el citoplasma a lo largo de las hifas (comparar las imágenes de GFP-rho4-3A y GFP-rho4-3E de las Figuras 55 y 56). Estos dos hechos sugieren que la fosforilación de estos tres sitios podría promover la asociación de la proteína con las membranas del aparato secretor que se localiza a lo largo de la hifa (Weiner *et al.*, 2019), favoreciendo el crecimiento altamente polarizado de este morfotipo, posiblemente atrayendo las vesículas de secreción hacia el ápice con mayor eficiencia que las otras dos proteínas.

También hemos encontrado diferencias en la localización de Rho4 durante el desarrollo hifal con respecto a observaciones anteriores. Se ha descrito que en *C. albicans*, Rho4 se localiza en los septos de las hifas, pudiendo encontrarse en varios de ellos al mismo tiempo y no es detectable asociado a la

membrana (Dünkler y Wendland, 2007). Sin embargo, en nuestros experimentos de microscopía a lo largo del tiempo con GFP-Rho4 hemos encontrado que su asociación con los septos es transitoria, como ocurre en levaduras, y al mismo tiempo también se localiza en el ápice de las hifas de forma altamente polarizada, lo que de nuevo sugiere que podría desempeñar algún papel en el tráfico de vesículas necesarias para el crecimiento apical de las hifas.

Los resultados de la microscopía a lo largo del tiempo obtenidos en cepas que contenían las proteínas rho4-3A y rho4-3E también mostraron que se localizaban de forma transitoria en el septo de las hifas, desapareciendo al completarse la citoquinesis. En estas condiciones de crecimiento, su asociación con el anillo de septinas no depende de los sitios de fosforilación, ya que ambas proteínas llegan de forma similar a la proteína silvestre, en el momento en el que ocurre la duplicación del anillo de septinas. Sin embargo, el tiempo de permanencia fue significativamente mayor en el mutante fosfomimético rho4-3A que en las otras dos proteínas. Por tanto, en este trabajo demostramos que el tiempo de asociación de la proteína Rho4 con el septo de las hifas parece depender de la fosforilación y defosforilación de los tres sitios mutados. Es interesante que, tanto en levaduras como en hifas, el tiempo de permanencia del mutante fosfodeficiente en el plano de división es mayor que la proteína silvestre, lo que sugiere que la fosforilación de estos sitios promueve su disociación de la zona del septo en ambas condiciones de crecimiento, al tiempo que su fosforilación sería necesaria para la localización apical en la membrana, como se ha comentado anteriormente. Sin embargo, la localización de Rho4 en ambos compartimentos no es dependiente de Cbk1, ya que no se ve alterada gravemente cuando se inhibe la actividad kinasa de Cbk1 en el mutante *cbk1-as/cbk1Δ*. A pesar de ello, en este mutante podrían existir defectos sutiles en el tiempo de asociación al anillo de septinas o en el tiempo de permanencia que será necesario analizar con detalle mediante experimentos de microscopía a lo largo del tiempo.

Cuando se analizó la movilidad electroforética de las distintas versiones, se comprobó que Rho4 podría sufrir una fosforilación diferencial en función de su morfología, ya que en levaduras presenta una menor movilidad electroforética que en hifas. Será necesario comprobar si esta fosforilación depende directamente de la kinasa Cbk1 tanto en hifas como en levaduras mediante el estudio de la movilidad electroforética en una cepa *cbk1ΔΔ* o en el mutante *cbk1-as/cbk1Δ* en presencia o ausencia del inhibidor de su actividad.

Conclusiones

Conclusiones

1. El ensamblaje del primer anillo de septinas durante el desarrollo hifal de *C. albicans* marca el final de la fase de germinación, que es independiente de la NDR kinasa Cbk1, y el inicio de la fase de elongación apical, en la que la tasa de crecimiento aumenta de forma dependiente de su actividad kinasa.
2. Durante la fase de elongación apical, la actividad kinasa es necesaria para mantener al polarisoma y al exocisto concentrados en la zona de crecimiento de las hifas, así como de los parches de actina implicados en la endocitosis, aunque no afecta directamente a la localización polarizada de Cdc42 activo.
3. La subunidad del exocisto Exo84 contiene 3 sitios consenso de fosforilación por Cbk1 que no son esenciales para el crecimiento filamentosos en *C. albicans*, pero cuya fosforilación podría contribuir a mantener una elongación apical eficiente, aumentando la tasa de crecimiento polarizado.
4. La kinasa de Cbk1 también contribuye a generar la asimetría celular tras la mitosis, tanto en levaduras como en hifas, siendo necesaria para la acumulación del factor de transcripción Ace2 en el núcleo de la célula apical. En ausencia de la actividad de Cbk1, Ace2 contribuye al mantenimiento del crecimiento polarizado de los compartimentos hifales.
5. La represión de la transición hifa-levadura al inicio de la filamentación depende de Cbk1, pero no de Ace2 cuando se usa suero bovino como inductor.
6. La GTPasa Rho4 es necesaria para la separación celular tras la citoquinesis tanto en levaduras como en hifas. Se localiza en el córtex celular durante todo el ciclo celular y en la región del septo de forma transitoria durante la citoquinesis. Los tres sitios de fosforilación por Cbk1 regulan el patrón temporal de asociación con el anillo de septinas.
7. Los sitios de fosforilación por Cbk1 también son importantes para su función en la regulación de la separación celular tanto en levaduras como en las hifas cuando se reactiva el ciclo celular en los compartimentos subapicales. La presencia de cargas negativas en estos sitios también favorece el crecimiento de las hifas.

Materiales y Métodos

1. Microorganismos utilizados.

Para el desarrollo de este trabajo de investigación se utilizó el hongo *Candida albicans* como microorganismo modelo. Los estudios descritos de morfogénesis y polaridad celular se realizaron con cepas derivadas del fondo genético BWP17 (Wilson *et al.*, 1999), cuyas características genéticas y procedencia aparecen detalladas en la Tabla 1.

Las células de *Escherichia coli* empleadas para la clonación molecular y como hospedadoras de los plásmidos utilizados proceden de la cepa DH5 α . También se usó la cepa comercial *XL 1-Blue SuperComp Cells* (Agilent) para la obtención de plásmidos construidos por mutagénesis dirigida en el gen *EXO84*.

La conservación de las cepas de levaduras se realizó a -80°C en crioviales con glicerol al 15%, mientras que las cepas bacterianas fueron conservadas en glicerol al 50%.

2. Medios de cultivo y condiciones de crecimiento.

Los medios de cultivo se prepararon con agua mili-Rho y se esterilizaron en autoclave. Así mismo, los medios sólidos se hicieron agregando agar al 2% a los medios líquidos correspondientes.

- Crecimiento de *C. albicans*.

Para el crecimiento en forma de levadura, las células se incubaron a 28°C y se utilizaron los medios YEPD (Bacto Peptona 2%, dextrosa 2% y extracto de levaduras 1%) o medio mínimo YNB (dextrosa 2% y Yeast Nitrogen Base 6,7%), suplementado con aminoácidos según los requerimientos de cada cepa, a concentraciones finales de 40 mg/L para arginina e histidina y de 80 mg/L para uridina.

Para el crecimiento hifal, las células se incubaron a 37°C en medio YEPD o YNB con suero fetal bobino al 10%.

La inhibición de *cbk1-as* se realizó incubando los cultivos celulares en YEPD o YNB con una concentración de 25 μ M de 1NM-PP1 (*ChemCruz*) disuelto en DMSO.

La regulación de *Exo84* mediante la adición de tetraciclina se realizó incubando las células en YEPD con una concentración de 25 mg/ml de doxiciclina.

- Crecimiento de *E. coli*.

Los cultivos bacterianos de *E. coli* crecieron a 37°C en medio LB (Luria Bertani), compuesto por bactotripton a 1%, extracto de levadura al 0,5% y cloruro de sodio al 1%. La selección de clones se realizó mediante siembra en LB suplementado con 100 μ g/ml de ampicilina.

3. Procedimientos generales de clonación molecular.

3.1 Obtención de ADN plasmídico.

Para la extracción de ADN plasmídico de *E. coli*, se empleó el kit comercial de lisis alcalina (*NucleoSpin® Plasmid kit, Macherey-Nagel™*) purificando los extractos mediante columnas con membranas especializadas de gel de sílica según las indicaciones del fabricante.

3.2. Obtención de ADN genómico de *C. albicans*.

Para aislar el ADN de alto peso molecular se usó el método de extracción fenólica con lisis mecánica. Para ello se inocularon 5 ml de YEPD con las células de levadura y se incubó toda la noche a 28°C. Tras recuperar las células por centrifugación, se resuspendieron en 0,2 ml de Tampón de rotura (Tritón X-100 2%, SDS 1%, NaCl 100 mM, Tris-HCl pH 8,0 10 mM y EDTA 1 mM), 0,2 ml fenol-cloroformo-isoamílico (25:24:1) y 0,3 gr de bolitas de vidrio (0,4 mm; *Sigma-Aldrich*); esta mezcla se agitó 4 minutos en vórtex a máxima potencia. Al finalizar la ruptura, se añadieron 0,2 ml de TE 1X a las células rotas y se separó la fase acuosa de la fenólica centrifugando 5 minutos a 13000 rpm. La fase acuosa fue transferida a un nuevo tubo que contenía 1 ml de etanol al 100% para después centrifugar 2 minutos a 13000 rpm. El precipitado se resuspendió en 400 µl de TE 1X y fue tratado con 30 µg de ARNasa, 15 minutos a 37°C. A continuación, se añadieron 10 µl de acetato de amonio 2,5 M y 1 ml de etanol al 100% y se mezclaron por inversión para precipitar el DNA que fue concentrado por centrifugación a 13000 rpm durante 2 minutos y secado a temperatura ambiente hasta la total evaporación del etanol, para ser resuspendido finalmente en 0,1 ml de TE 1X.

3.3. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

La amplificación de fragmentos de ADN se hizo mediante la reacción en cadena de la polimerasa en un termociclador Minicicler™ (*MJ Research*), usando diferentes polimerasas como *KAPA HIFI* (*KAPA Biosystems*), *Platinum™ Pfx DNA Polymerase* (*Invitrogen™*), *NZYTaq II* (*Supreme NZYTaq II 2x Green Master Mix*) y *Dream Taq* (*Thermo Scientific*) según la fidelidad requerida. Para todas las enzimas, la reacción se realizó según se indicaba en las instrucciones de la casa comercial. Por lo general, el ADN fue desnaturalizado durante 5 minutos a 95°C seguido de 30-35 ciclos con los siguientes pasos: 30 segundos a 95°C, 30 segundos a la temperatura de anillamiento específica de los oligonucleótidos empleados, 1 minuto de extensión a 72°C por cada kilobase de ADN a amplificar y, para finalizar la reacción, 10 minutos de extensión a 72°C.

3.4. Manipulación del ADN y ligación.

Los fragmentos de ADN obtenidos por PCR o por tratamiento con enzimas de restricción se analizaron en geles de agarosa (*Agarose MP, Roche*) teñidos con *Midori Green Advance DNA Stain* (*Genetics*) (0,05 µl/ml) preparado en tampón TAE (Tris-acetato 40 mM, EDTA 1 mM, pH 7,5-7,8) a concentraciones que oscilaban entre 0,7 y 1,5 %, según el tamaño de los fragmentos a separar.

En todos los casos el ADN se digirió con las enzimas correspondientes siguiendo el protocolo de la casa comercial y durante al menos 15 minutos a 37°C. El aislamiento y purificación de los fragmentos específicos de ADN, obtenidos por PCR o con enzimas de restricción, se realizó con el kit *NucleoSpin® Extract II* (*Macherey-Nagel, Düren, Germany*). Para la clonación de fragmentos de ADN se usaron enzimas de restricción, así como la ligasa del fago T4 (*Roche*) y la fosfatasa alcalina (*Merck*).

Las reacciones de secuenciación para la comprobación de los plásmidos construidos se llevaron a cabo en el Servicio de Secuenciación de la Universidad de Salamanca y en el servicio de secuenciación de *Eurofins Genomic*.

3.5. Construcción de plásmidos por ensamblaje.

En ocasiones, la construcción de plásmidos con diversos insertos se realizó usando el kit de ensamblaje de ADN *NEBuilder High-Fidelity DNA Assembly (New England Biolabs)* siguiendo las instrucciones del fabricante. Para construir plásmidos con este método, es necesario utilizar oligonucleótidos que generen regiones solapantes de unos 15-20 nucleótidos entre los distintos fragmentos a ensamblar y también con el vector linealizado en el que se desean clonar. Para el diseño de los oligonucleótidos, en todos los casos se usó la herramienta *NEBuilder Assembly Tool* (<https://nebuilder.neb.com/>), que también proporciona información sobre la temperatura de anillamiento óptima para cada pareja de oligonucleótidos. Los distintos fragmentos de PCR se amplificaban a partir de ADN genómico o de plásmidos, usando la polimerasa *Q5 High-Fidelity DNA Polymerase (New England Biolabs)*. La concentración de ADN de las distintas reacciones se cuantificaba usando un Espectrofotómetro *NanoDrop™* (Thermo Scientific) y se preparaban las reacciones de ensamblaje siguiendo las instrucciones del kit, con las cantidades de vector e inserto adecuadas según el número de fragmentos a ensamblar. Las reacciones se incubaron con la *NEBuilder HiFi DNA Assembly Master Mix* en un termociclador a 50°C durante 15 minutos (si se ensamblan menos de 3 fragmentos con el vector) o durante 60 minutos (si se ensamblan más de tres fragmentos). Transcurrido el tiempo de la reacción, el producto se transformaba en células competentes de *E. coli* DH5α usando 2 µl de la reacción de ensamblaje.

3.6. Generación de mutaciones puntuales.

La construcción de las mutaciones fosfomimética y fosfodeficiente en el gen *EXO84* se realizó utilizando el kit de mutagénesis dirigida *Quikchange II Site-Directed Mutagenesis Kit (Agilent)*. Para ello, la región codificante del gen *EXO84* se clonó en el plásmido pBluescript SK⁺ (*New England Biolabs*). Este kit de mutagénesis permite introducir mutaciones en cualquier plásmido de doble cadena en una rápida reacción de tres pasos, con una alta eficiencia.

El primer paso consiste en amplificar el plásmido utilizando la ADN polimerasa *PfuUltra high-fidelity DNA polymerase*, usando cebadores que contienen las mutaciones deseadas y que anillan con las dos cadenas de ADN. Los oligonucleótidos mutagénicos amplifican ambas hebras de ADN, sin desplazamiento del cebador, generando un plásmido mutado. A continuación, se tratan las muestras con la endonucleasa de restricción *DpnI* que reconoce específicamente el ADN metilado (Gm6ATC) o hemimetilado, lo que degrada específicamente el ADN parental o los plásmidos híbridos que contienen una hebra mutada y otra silvestre. El paso final es purificar el ADN del vector que contiene las mutaciones y transformarlo mediante electroporación en células competentes de la cepa XL 1-Blue.

En nuestro caso, se utilizó el plásmido SK-EXO84 como molde para generar las versiones mutantes en dos pasos sucesivos, al estar las tres mutaciones alejadas en la secuencia. En la primera ronda se introdujeron las mutaciones en las posiciones S118 y T418 y, tras confirmar la presencia de ambas mediante secuenciación, se introdujo la última en la posición S511. Se utilizaron oligonucleótidos específicos para cada mutación diseñados con la herramienta *QuikChange Primer Design* (<https://www.agilent.com/store/primerDesignProgram.jsp>) (Tabla 2) y para la transformación se usaron células *XL 1-Blue SuperComp (Agilent)*. Los plásmidos resultantes se denominaron SK-EXO84-

3A (pC1493) y SK-EXO84-3E (pC1501).

4. Construcción de plásmidos y cepas de *C. albicans*.

La delección de genes de *C. albicans* y el marcaje con proteínas fluorescentes o epítomos se realizaron mediante PCR usando los módulos pFA y cebadores largos de 120 nucleótidos para dirigir la integración del producto de PCR al genoma de *C. albicans* (Gola *et al.*, 2003; Reijnt *et al.*, 2011; Schaub *et al.*, 2006). Los transformantes se seleccionaron en medio YNB suplementado con los aminoácidos necesarios, según sus auxotrofías, o en YEPD con nourseotricina (*clonNAT*) a una concentración final de 200 µg/ml (*Werner BioAgents*) para seleccionar cepas que contenían el marcador *SAT1*. Las cepas que contenían proteínas marcadas con alguna proteína fluorescente o epítomo se consideraban funcionales, en tanto que se observase un crecimiento normal en un fondo heterocigótico. Todas las cepas se confirmaron por PCR usando oligonucleótidos obtenidos de las casas comerciales *Biomers*, *Sigma*, *Thermo Fisher Scientific*, *Invitrogen* y *Tib Molbiol*, y/o por secuenciación.

4.1. Mutantes de delección.

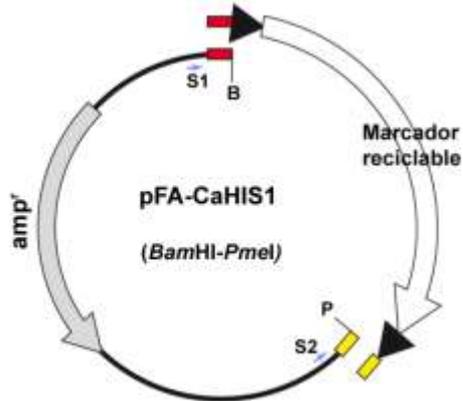
La construcción de cepas con un gen delecionado y el marcaje con proteínas fluorescentes y el epítomo *myc* en *C. albicans* se llevó a cabo mediante el sistema de plásmidos reciclables pFA-Clox (Dueñas-Santero *et al.*, 2019), una nueva colección de plásmidos para la manipulación genética en *C. albicans* que utilizan los marcadores reciclables del sistema *Cre-loxP* (Shahana *et al.*, 2014) clonado en el esqueleto del vector pFA (Gola *et al.*, 2003). Se utilizó un casete de transformación obtenido por amplificación por PCR, usando como molde el plásmido deseado, que contiene un marcador de selección flanqueado por secuencias *loxP* y oligonucleótidos de 120 pb como cebadores (100 pb del gen que se va a marcar y 20 pb de la secuencia del vector) para dirigir la integración (Figura 64A). Estas regiones de 100 pb del gen permiten la recombinación del fragmento con uno de los alelos del gen a deleccionar, sustituyendo el ORF del mismo por el marcador de selección. Para marcar proteínas con el epítomo *myc* o con proteínas fluorescentes (GFP o mCherry) se utilizó un casete de transformación obtenido por PCR amplificando con el epítomo deseado y un marcador de selección flanqueado por secuencias *loxP*, con extremos de 100 pb correspondientes al locus donde se desease integrar cada construcción (Figura 64B).

Los transformantes se seleccionaron inicialmente en placas de YNB suplementadas con los aminoácidos necesarios en función de los marcadores auxotróficos empleados o en YEPD con 200 µg/ml de nourseotricina para seleccionar las cepas *NAT1*. La fusión de la GFP o de los epítomos se comprobó mediante microscopía y Western Blot, respectivamente.

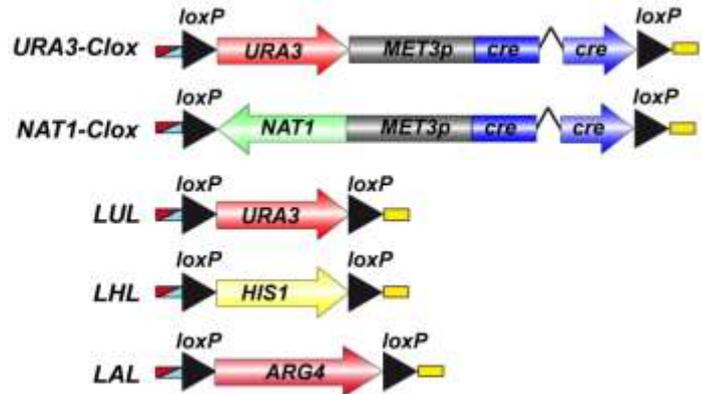
4.2. Construcción de los plásmidos pFA-RHO4-3A-ARG4 y pFA-RHO4-3E-ARG4.

Para construir mutaciones en los 3 posibles sitios de fosforilación por Cbk1 presentes en Rho4 (S274, S278 y S292), se diseñaron oligonucleótidos que portaban una mutación única en los aminoácidos de interés, en los cuales se sustituyó el codón que codifica para serina por el correspondiente a alanina para generar mutantes fosfodeficientes, o a ácido glutámico para generar mutantes fosfomiméticos.

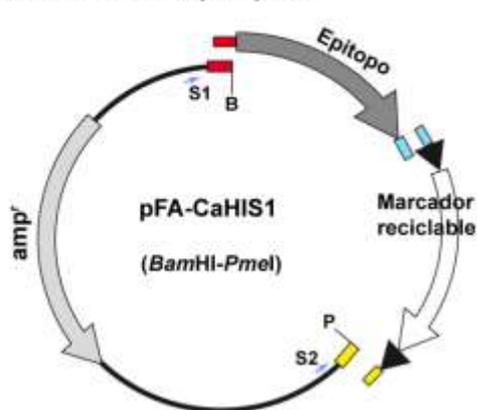
A. Casetes de deleción



Marcadores reciclables:



B. Casetes con epítomos



Epítomos

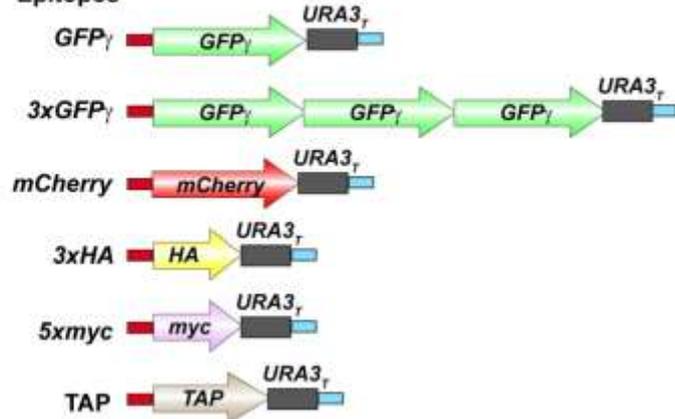


Figura 64. Estrategia utilizada para la construcción de plásmidos pFA con marcadores reciclables. (A). Construcción de plásmidos de deleción pFA. Los cinco marcadores reciclables flanqueados por las secuencias *loxP* se amplificaron con oligonucleótidos que generan extremos superpuestos con el esqueleto pFA-CaHIS1 digerido con *Bam*HI y *Pme*I. Los fragmentos amplificados se ensamblaron con el vector en 5 reacciones independientes usando el kit de ensamblaje *NEBuilder HiFi DNA Assembly*. **(B).** Construcción de plásmidos con epítomos. Los diferentes módulos de marcado (*GFP_γ*, *3xGFP_γ*, *mCherry*, *3xHA*, *5xmyc* o *TAP-TAG*) se amplificaron con oligonucleótidos que generaron extremos superpuestos con el esqueleto pFA-CaHIS1 digerido con *Bam*HI (rojo) y con el extremo 5' del módulo marcador reciclable (celestre). Los cinco marcadores reciclables

Plásmido para generar el alelo con las mutaciones fosfodeficientes. Se construyó un plásmido clonando el extremo C-terminal de *RHO4*, incluyendo parte de la región 3' UTR, delante del marcador de selección *ARG4* que contenía las mutaciones *rho4-3A*. Para ello, se linearizó el plásmido pFA-*ARG4* (Gola *et al.*, 2003) con *Bam*HI, y se generaron dos fragmentos PCR independientes con los oligonucleótidos diseñados y ADN genómico de *C. albicans* como molde. El fragmento 1, de 285 pb, contenía la secuencia de *RHO4* con las mutaciones en S274A y S278A usando los oligonucleótidos #2316 *Rho4-M1* y #2320 *Rho4-M2A*. El fragmento 2, de 504 pb, que contenía la mutación S292A, se generó usando los oligonucleótidos #2321 *Rho4-M3A* y #2319 *Rho4-M4*. El vector linearizado y los fragmentos de PCR se ensamblaron usando el kit de clonación *NEBuilder High-Fidelity DNA Assembly* (*New England Biolabs*) y el producto de la fusión se transformó en células competentes de *E. coli* DH5 α . El plásmido resultante se denominó pFA-*RHO4-3A-ARG4* (pC1453).

Plásmido para generar el alelo con las mutaciones fosfomiméticas. Usando la misma

estrategia, se construyó un plásmido similar que contenía las mutaciones *rho4-3E*. En este caso, los fragmentos de PCR se amplificaron con los oligonucleótidos #2316 *Rho4-M1* y #2317 *Rho4-M2E* (fragmento 1 de 285 pb con las mutaciones S274E y S278E) y #2318 *Rho4-M3E* y #2319 *Rho4-M4* (fragmento 2 de 504 pb, con la mutación S292E) y se ensamblaron con el vector pFA-ARG4 linealizado con *Bam*HI usando el mismo kit, generando el plásmido pFA-RHO4-3E-ARG4 (pC1439).

Para confirmar que los plásmidos pFA-RHO4-3A-ARG4 y pFA-RHO4-3E-ARG4 contenían las mutaciones deseadas, se secuenció la región codificante de *RHO4* presente en ambos.

4.3. Construcción de los plásmidos pFA-EXO84-3A-URA3-Clox y pFA-EXO84-3E-URA3-Clox.

La construcción de plásmidos que portaban mutaciones en los 3 posibles sitios de fosforilación por Cbk1 presentes en *Exo84* (S118, T418 y S511), se realizó usando el kit *QuikChange II Site-Directed Mutagenesis Kit (Agilent)* y oligonucleótidos específicos para introducir las mutaciones deseadas a alanina o a ácido glutámico. Para ello, el gen *EXO84* se clonó en el vector pBluescript SK⁺ (*New England Biolabs*) digerido con la enzima *Hind*III mediante ligación, generando el plásmido SK-EXO84 (pC1489). Las mutaciones se introdujeron usando el kit *QuikChange II Site-Directed Mutagenesis Kit (Agilent)*, como se ha comentado en el apartado 3.6, generando los plásmidos SK-EXO84-3A (pC1493) y SK-EXO84-3E (pC1501), que se secuenciaron para comprobar la presencia de las 3 mutaciones. A partir de estos plásmidos, se amplificaron fragmentos de DNA que contenían los cambios deseados, se ensamblaron con el extremo 3' del gen y la región 3'UTR en el vector pFA-URA3-Clox usando el kit *NEBuilder High-Fidelity DNA Assembly (New England Biolabs)* y se transformaron las células competentes de *E. coli*, DH5 α . Estos plásmidos se denominaron pFA-EXO84-3A-URA3-Clox (pC1515) y pFA-EXO84-3E-URA3-Clox (pC1513), que fueron nuevamente secuenciados para confirmar que contenían las mutaciones deseadas únicamente.

También se construyó una versión que contenía el gen silvestre (pFA-EXO84-URA3-Clox, pC1486), linealizando el vector pFA-URA3-Clox con *Bam*HI, y ensamblándolo con un fragmento que contenía el gen *EXO84* y la región 3'UTR obtenidos con los oligonucleótidos #2395 *EXO84A* y #2396 *EXO84B*, mediante el kit de *NEBuilder High-Fidelity DNA Assembly*.

4.4. Construcción del plásmido pFA-URA3-Clox-HOP1p-myc.

Para construir el plásmido pFA-URA3-Clox-HOP1p-myc (pC1544) que contiene el promotor *tetO-SchHOP1 (TetOff)* para sustituir el promotor de los genes deseados y regular la expresión mediante la adición de doxiciclina al medio de cultivo, se utilizó ADN genómico de la cepa P4452. Este ADN contiene el gen *MSS4* controlado por dicho promotor (Vernay *et al.*, 2012), para amplificar un fragmento de 608 pb que contenía las secuencias reguladoras. Se amplificó un segundo fragmento de ADN de 235 pb que contenía 5 repeticiones del epítipo myc (*5xmyc*) usando como molde el plásmido pFA-myc-LAL y ambos fragmentos se ensamblaron en el vector pFA-URA3-Clox digerido con *Cla*I mediante el kit *NEBuilder High-Fidelity DNA Assembly*, generando el plásmido pFA-URA3-Clox-HOP1p-myc.

4.5. Construcción de los plásmidos pDIS-URA3-Clox-EXO84-3A y pDIS-URA3-Clox-EXO84-3E.

Para insertar los alelos mutantes *exo84-3A* y *exo84-3E* en el locus *NEUT5L* (Gerami-Nejad *et al.*, 2013), se construyeron los plásmidos pDIS-URA3-Clox-EXO84-3A (pC1560) y pDIS-URA3-Clox-EXO84-3E (pC1561). Para ello, se usó de nuevo el kit *NEBuilder High-Fidelity DNA Assembly*. Se construyó un fragmento de ADN de 600 pb que contenía el promotor nativo del gen *EXO84*, obtenido por PCR desde el ADN genómico con los oligonucleótidos #2517 *DIS-EXO-1* y #2518 *DIS-EXO-2*, y otro que contenía la región codificante de *EXO84* con las mutaciones obtenido mediante la amplificación de los plásmidos pFA-EXO84-3A-URA3-Clox (pC1515) y pFA-EXO84-3E-URA3-Clox (pC1513) con los oligonucleótidos #2519 *DIS-EXO-3* y #2520 *DIS-EXO-4*. Estos fragmentos se ensamblaron en el vector pDIS-URA3-Clox (Dueñas-Santero *et al.*, 2019) linealizado con *XhoI*. La presencia de las mutaciones en los plásmidos se confirmó mediante secuenciación.

También se construyó el plásmido pDIS-URA3-Clox-EXO84 (pC1570) para usar como control silvestre. En este caso, se amplificó el gen *EXO84* con su promotor desde ADN genómico usando los oligonucleótidos #2517 *DIS-EXO-1* y #2520 *DIS-EXO-4*, y el fragmento resultante se ensambló en el vector pDIS-URA3-Clox linealizado con *XhoI*.

4.6. Inserción de las mutaciones en el genoma de *C. albicans*.

Construcción de las cepas *rho4-3A* y *rho4-3E*. La inserción de las mutaciones en el locus genómico de *RHO4* se realizó utilizando los plásmidos pFA-RHO4-3A (pC1453) y pFA-RHO4-3E (pC1439). Con el fin de sustituir el alelo silvestre por los alelos fosfodeficiente y fosfomimético, se amplificó un casete usando como molde estos plásmidos con los oligonucleótidos #2316 *Rho4-M1* y #2378 *Rho4-S2*, obteniendo una banda de 2739 pb, que se usó para transformar la cepa heterocigótica *RHO4/rho4Δ*. Los transformantes se confirmaron inicialmente mediante PCR y digestión de los fragmentos amplificados con *XbaI*, ya que la mutación en la S274 también eliminaba un sitio de corte de esta enzima (TCTAGA). Los transformantes en los que la banda no fue cortada se analizaron por secuenciación del ADN genómico para confirmar la presencia de las mutaciones en el cromosoma.

Construcción de las cepas *TetOff-myc-EXO84/EXO84* y *TetOff-myc-EXO84/exo84Δ*. Dado que *EXO84* es un gen esencial, se construyeron dos cepas que contenían uno de los alelos del gen regulado por el promotor condicional *TetOff*, para poder apagar su expresión y estudiar los efectos de las mutaciones en los sitios de fosforilación. Para ello, se usó la cepa PY173 (*ade2Δ/ade2Δ ura3Δ/ura3Δ his1Δ/his1Δ arg4Δ/arg4Δ ENO1/eno1::ENO1-tetR-SchAP4AD-3xHA-ADE2*) que contiene el transactivador (proteína de fusión entre la proteína represora de tetraciclina tetR y el dominio de activación de la proteína Hap4 de *S. cerevisiae*) insertado en el locus *ENO1* (Vernay *et al.*, 2012). A partir de esta cepa se construyeron los derivados isogénicos *TetOff-EXO84/EXO84* (OL3104) y *TetOff-EXO84/exo84::loxP* (OL3196) (Figura 57). En primer lugar, se delecionó uno de los alelos de *EXO84* mediante la inserción del marcador LAL (*ARG4* flanqueado por dos secuencias *loxP*) usando el plásmido pFA-LAL (Dueñas-Santero *et al.*, 2019), generando la cepa *exo84::LAL/EXO84* (OL3013). A continuación, se reemplazó el promotor nativo por el regulable por tetraciclina (*TetOff*) en uno de los alelos de las cepas PY173 y *exo84::LAL/EXO84* (OL3013), utilizando el plásmido pFA-URA3-Clox-

HOP1p-myc (pC1544) como molde y los oligonucleótidos #2465 *Exo84-S1* y #2507 *Exo84-S2-GFP* para amplificar un casete de 5300 pb que contenía el promotor y el marcador de selección. Una vez seleccionados los transformantes *URA3-Clox-TetOff-5xmyc-EXO84/exo84::LAL* y *URA3-Clox-TetOff-5xmyc-EXO84/EXO84*, se inocularon en medio YEPD (sin metionina ni cisteína) para activar la expresión del gen de la recombinasa *cre*, que está bajo el control del promotor MET3p e inducir la pérdida de los marcadores auxotróficos flanqueados por secuencias *loxP*. De este modo, se obtuvieron las cepas *TetOff-5xmyc-EXO84/EXO84* (OL3104) y *TetOff-5xmyc-EXO84/exo84::loxP* (OL3196).

Construcción de cepas con los alelos *exo84-3A* y *exo84-3E* insertados en su locus genómico. En una primera aproximación, se insertaron los alelos mutantes *exo84-3A* y *exo84-3E* en su locus genómico, en la cepa heterocigótica *TetOff-5xmyc-EXO84/EXO84* (OL3104), para poder apagar la expresión del alelo silvestre y analizar los fenotipos resultantes. Para ello, se amplificaron los plásmidos pFA-EXO84-3A-URA3-Clox (pC1515) y pFA-EXO84-3E-URA3-Clox (pC1513) con los oligonucleótidos #2508 *Exo84-FA-Up* y #2509 *Exo84-FA-S2*, obteniendo una banda de 6700 pb que se usó para transformar la cepa heterocigótica *TetOff-5xmyc-EXO84/EXO84* (OL3104). Los transformantes fueron analizados mediante PCR con parejas de oligonucleótidos específicas para cada uno de los alelos, que permitían identificar en cuál de los dos alelos se había producido la inserción del casete de transformación. A pesar de realizar numerosos intentos de transformación, no se consiguió insertar los alelos mutantes en su locus nativo.

Construcción de cepas con los alelos *exo84-3A* y *exo84-3E* insertados en el locus *NEUT5L*. Tras los fracasos en la construcción de las cepas deseadas, se diseñó una estrategia diferente consistente en introducir los alelos mutantes en el locus *NEUT5L*, una región neutra del genoma que permite la integración eficiente de ADN exógeno y la expresión de genes a niveles similares a su expresión en el locus nativo (Gerami-Nejad *et al.*, 2013). Para ello, se utilizaron los plásmidos pDIS-URA3-Clox-EXO84 (pC1570), pDIS-URA3-Clox-EXO84-3A (pC1560) y pDIS-URA3-Clox-EXO84-3E (pC1561), que fueron amplificados con los oligonucleótidos #2347 *NEUT5-UP* y #2348 *NEUT5-LO* para generar fragmentos de ADN de 8497 pb, usados para transformar la cepa *TetOff-5xmyc-EXO84/exo84::loxP* (OL3196). Las cepas resultantes, tras confirmar la presencia de las mutaciones por secuenciación del alelo insertado en el locus *NEUT5L*, fueron *TetOff-5xmyc-EXO84/exo84::loxP EXO84@NEUT5L* (OL3211), *TetOff-5xmyc-EXO84/exo84::loxP exo84-3A@NEUT5L* (OL3212) y *TetOff-5xmyc-EXO84/exo84::loxP exo84-3E@NEUT5L* (OL3214).

5. Transformación de *Escherichia coli*.

La transformación de las células bacterianas DH5 α se realizó mediante el protocolo descrito por Kushner (1978). Brevemente, se añadían 2 μ l de la mezcla de ligación, o de la mezcla de ensamblaje, a 100 μ l de células competentes de la cepa deseada y se incubaban 20 minutos en hielo. Posteriormente, se sometían a un choque térmico incubando a 42°C durante 1 minuto y 30 segundos, y devolviendo los tubos rápidamente al hielo. Se añadía 1 ml de medio LB líquido a las células y se incubaban durante 1 hora a 37°C. Transcurrido ese tiempo, se sembraban diferentes diluciones en placas de LB-Ampicilina (100 μ g/ml) que se incubaban 24 horas a 37°C.

Cuando se usaron las células *XL 1-Blue SuperComp Cells (Agilent)* para la transformación de los plásmidos generados por mutagénesis dirigida, se mezclaba 1µl del ADN tratado con *DpnI* con una alícuota de 50 µl de células, que se incubaban en hielo durante 30 minutos seguidos de un choque térmico a 42°C durante 45 segundos, y otros 2 minutos en hielo. Seguidamente, se añadían 0,5 ml de medio SOC precalentado a 42°C y se incubaba a 37°C durante 1 hora. Finalmente, se sembraban diferentes diluciones en placas de LB-Ampicilina.

6. Transformación de *Candida albicans*.

Se usaron 2 métodos para introducir ADN en las diferentes cepas de *C. albicans*:

Transformación con Acetato de litio. La transformación química se realizó como ha sido previamente descrito por Walther y Wendland (2003), con algunas modificaciones. Los cultivos de las cepas a transformar que habían crecido durante toda la noche se diluyeron en 25 ml de medio fresco a una densidad óptica a 600nm ($D.O_{600}$) de 0,3, y se incubaron con agitación a 28°C durante 3-4 horas hasta alcanzar una $D.O_{600}$ de 1,4-1,8. Las células se recogieron por centrifugación, se lavaron con 25 ml de agua destilada estéril y se resuspendieron en 1,5 ml de solución de acetato de litio (acetato de litio 100 mM, Tris-HCl 10 mM, EDTA 1 mM). La mezcla de transformación se hizo agregando 100 µl de células, 100 µg de ADN monocatenario (*ADN carrier*, 2 mg/ml), 1-5 µg del ADN a integrar y 600 µl de solución PEG/LiAc (PEG 4000 al 50% en solución de acetato de litio). Esta mezcla se incubó toda la noche en agitación a 28°C antes de someterla a un choque térmico a 44°C durante 15 minutos. Las células se lavaron y se sembraron en medios selectivos.

Transformación por electroporación. El protocolo de electroporación para *C. albicans* utilizado fue el descrito por Reuss y colaboradores (2004). A partir de un pre-cultivo en YEPD de *C. albicans*, se realizó una dilución a $D.O_{600}=0,2$ en 25 ml de medio fresco y se incubó con agitación a 28°C hasta alcanzar una $D.O_{600}$ entre 1,4 y 1,6. Las células se recogieron por centrifugación y se resuspendieron en 25 ml de solución de acetato de litio (acetato de litio 0,1 M, Tris-HCl 10 mM pH 7,5, EDTA 1 mM pH 8 y DTT 10 mM) donde se incubaron durante 1 hora a temperatura ambiente. Después, las células se lavaron 3 veces con agua estéril fría y una vez con sorbitol 1 M. Estas células competentes se recogieron por centrifugación y se resuspendieron en 160 µl de sorbitol 1 M. Se mezclaron 50 µl de la suspensión de células competentes con 1-5 µg de DNA y se mantuvieron en hielo 5 minutos. Entonces, se llevó a cabo la electroporación de las células competentes en un electroporador *Gene Pulser® (Biorad)* usando cubetas de 0,2 cm y 1,5 kV. Tras la electroporación, las células se lavaron con 1 ml de sorbitol 1M y se sembraron en medios selectivos.

Cuando se usaba el marcador de selección *SAT1*, las células se incubaban en 1 ml de YEPD/Sorbitol 1M a 28°C durante 2 horas con agitación antes de ser sembradas en medio YEPD, conteniendo clonNat 200 µg/ml (*Werner BioAgents*), independientemente del método usado para la transformación.

7. Extracción, detección y análisis de proteínas.

7.1 Extracción de proteínas.

Los extractos proteicos se prepararon a partir de cultivos celulares en fase de crecimiento exponencial, en medio líquido apropiado según el experimento a realizar. Se recogieron las células y se lavaron con agua estéril fría, y la extracción de proteínas se realizó mediante la precipitación con Ácido Tricloroacético (TCA), como se ha descrito previamente (Acosta *et al.*, 2011). En breve, una vez lavadas las células, se añadió 1 ml de TCA al 20% sobre los precipitados y se transfirieron a tubos de tapón de rosca previamente pesados. Se centrifugaron 1 min, se eliminó todo el sobrenadante y se volvió a pesar el tubo. La diferencia entre ambos pesos correspondía a los miligramos de células que se habían recogido en cada muestra, para determinar el volumen de *Sample Buffer* y Tris 2 M que era necesario añadir (10 μ l de *Sample Buffer* y 5 μ l de Tris 2 M por cada μ g de peso húmedo).

Después de pesar los tubos, las células se resuspendieron en 100 μ l de TCA al 20% y se dejaron en hielo. A continuación, se añadieron 200 μ l de bolas de vidrio (0,4 mm; *Sigma-Aldrich*). La rotura de las células se realizó en una *FastPrep FP120 (BIO 101 ThermoSavant)* mediante 3 pulsos de 15 segundos, a una velocidad de 5,0, dejando los tubos 1 min en hielo entre pulso y pulso. Posteriormente se realizaron agujeros en la base de los tubos con una aguja estéril, se colocaron sobre tubos nuevos y se centrifugaron 1 min a 2000 rpm. Luego se lavaron las bolas de vidrio con 200 μ l de TCA al 5% y se volvieron a centrifugar 5 min a 3000 rpm, se eliminó el sobrenadante y las proteínas precipitadas se resuspendieron en los correspondientes volúmenes de *Sample Buffer* y Tris 2M. Para finalizar, las muestras se hirvieron durante 5 min y seguidamente se centrifugaron a 13200 rpm durante 5 min. El sobrenadante se transfirió a tubos eppendorfs nuevos y se usaron 20 μ l para cada gel.

7.2. Separación electroforética e inmunodetección de proteínas (*Western Blot*).

Para el análisis mediante *Western Blot*, las proteínas fueron separadas mediante electroforesis en geles de poliacrilamida Bis-Tris NuPAGE, usando el sistema *XCell SureLock™ (Invitrogen)*. Se cargaron entre 50 y 100 μ g de cada extracto proteico en condiciones desnaturizantes, en geles del 10% Bis-Tris Acrilamida (*Invitrogen*), y se separaron mediante electroforesis a 75V constantes durante 30 minutos y después a 120V constantes. Se utilizó un tampón de electroforesis *NuPAGE™ MOPS SDS Running Buffer (Invitrogen)*.

Una vez separadas las proteínas, se transfirieron a una membrana de PVDF *P-Hybond (GE Healthcare)*, usando el sistema de transferencia *Mini-Trans-Blot (Biorad)* a 280 mA constantes durante 75 minutos en un tampón de transferencia *NuPAGE™ Transfer Buffer (Invitrogen)*. Después de la transferencia, las membranas fueron lavadas durante 10 minutos con solución PBS-T (PBS 1X, Tween 0,1%) y, posteriormente, bloqueadas durante al menos 1 hora en solución de bloqueo (leche desnatada en polvo al 5% en PBS-T). Los anticuerpos primario y secundario fueron incubados en solución de bloqueo durante al menos una hora, según las recomendaciones de cada casa comercial. La detección de los complejos antígenos-anticuerpo se realizó usando la detección de la actividad peroxidasa ligada al anticuerpo secundario mediante quimioluminiscencia. La detección de proteínas

se realizó utilizando el sustrato *Luminata Forte Western HRP* (Merck Millipore) para impresionar películas fotosensibles (*Hyperfilm™ MP*, GE Healthcare). Para la detección de proteínas marcadas con el epítipo *myc*, el anticuerpo primario utilizado fue *Rabbit anti-myc* (Sigma) a una concentración 1:2500 y el anticuerpo secundario anti-rabbit (*ECL anti-rabbit NA934*, GE Healthcare) se usó a concentración 1:5000.

8. Técnicas de microscopía.

8.1. Preparación de muestras.

Para la visualización microscópica de las muestras, las células se fijaron con formaldehído al 37% para preservar su morfología. Tras la centrifugación de los cultivos y la retirada del medio, el pellet se lavó con una solución de PBS y se incubó a temperatura ambiente durante 10 minutos en agitación. Para eliminar el formaldehído, las células se centrifugaron y se lavaron de nuevo con PBS. Por último, se resuspendieron en un volumen de PBS acorde a la cantidad de cultivo. Cuando se fijaban muestras de hifas, se llevó a cabo un tratamiento con proteinasa K (1 mg/ml) durante 20 minutos a 37°C en agitación, para degradar las adhesinas de la pared celular que inducen la aglomeración de las hifas, favoreciendo así la separación de los filamentos para la correcta caracterización fenotípica. Transcurrido este tiempo, las muestras se conservaban a 4°C hasta su visualización.

8.2. Tinción con calcoflúor.

El calcoflúor es un fluorocromo que tiñe las zonas de la pared celular ricas en quitina de *C. albicans*. Este se excita al recibir luz con una longitud de onda de 372 nm, emitiendo fluorescencia azul. El calcoflúor (*Blankophor BBH*, Bayer Corporation) se preparó a una concentración de 10 mg/ml en agua. Se filtró y se almacenó protegido de la luz. Las tinciones con este fluoróforo se realizaron añadiendo 1 µl de solución de calcoflúor por cada mililitro de muestra a observar al microscopio.

8.3. Microscopía óptica.

Las células de *C. albicans* fueron observadas en preparación húmeda en distintos microscopios, según el experimento del que se tratara. Para los casos más sencillos, se usó un microscopio Nikon Eclipse 90i equipado con una cámara ORCA-ER CCD y controlado por el software *MetaMorph®* (MDS Analytical Technologies). Para los experimentos de microscopía de fluorescencia y microscopía a lo largo del tiempo (*time-lapse*), se usó un microscopio Olympus IX81 equipado con un sistema confocal *Yokogawa Spinning Disk* (Roper Scientific), un sistema i-Las FRAP y una cámara Evolve EMCCD, controlado por *MetaMorph®* (MDS Analytical Technologies), o un Nikon Eclipse T2 con sistema Andor DragonFly Spinning Disk equipado con una cámara Sona sCMOS y controlado mediante el software Fusion 2.2. Otros programas utilizados para el procesamiento de imágenes fueron: *Fiji* (<https://imagej.net/software/fiji/>), *Imaris* (Oxford Instruments) y *Adobe® Photoshop CS6* (Adobe System, Inc).

8.3. Microscopía de fluorescencia *in vivo*.

Para la observación *in vivo* de cepas que contenían la proteína fluorescente verde (GFP) o roja (mCherry), se recogieron las células en crecimiento exponencial en medio líquido y se concentraron y se montaron en portaobjetos. Se utilizaron indistintamente los microscopios Olympus IX81 Spinning

Materiales y Métodos

Disk y Nikon-Andor DragonFly. En función del objetivo del experimento, se tomaba una única foto del plano central de la célula o bien de 3 a 12 imágenes de secciones transversales de todo el volumen celular (series en Z), con una separación de 0,3-0,5 μm , generando posteriormente la proyección máxima de todos los planos.

8.4 Microscopía confocal a lo largo del tiempo (*Time-lapse*).

Para los experimentos de *time-lapse* también se usaron células en crecimiento exponencial que se fijaban en cámaras de ocho pocillos μ -Slide 8 Well (*iBidi u-slide*), las cuales previamente habían sido recubiertas con 15 μl de lectina 5 mg/ml (*Lectin from Glycine max, Sigma*). Se inoculaba cada pocillo con 300 μl del cultivo, se dejaba fijar durante 5 minutos y se lavaba dos veces con el mismo medio. Por último, se añadían 300 μl de medio fresco sobre las células fijadas al fondo del pocillo antes de colocarlas en el microscopio. Para estos experimentos se usaron nuevamente los microscopios Olympus IX81 Spinning Disk y Nikon-Andor DragonFly, que están dotados de una campana termostaticada que permite mantener constante la temperatura de incubación.

En los experimentos en los que se usaba el mutante *cbk1-as*, una vez las células estaban fijadas en los pocillos, se añadían 150 μl de medio fresco y se colocaban las cámaras en el microscopio para buscar los campos de células deseados. Antes de iniciar el experimento, se añadían otros 150 μl de medio con 50 μM de 1NM-PP1 (concentración final 25 μM) o 150 μl de medio con 4% DMSO (concentración final 2%).

Se utilizaron los dos microscopios confocales para estos experimentos, adquiriendo imágenes cada 5 minutos, utilizando el filtro de contraste interferencial (DIC) y entre 3 y 5 imágenes de fluorescencia en el eje Z del mismo campo, con una separación de 0,5 μm entre ellas.

Tabla 1. Microorganismos utilizados en el presente trabajo.

C. albicans		
Estirpe	Genotipo	Procedencia
BWP17	<i>uraΔ::imm434/ura3Δ::imm434 his1Δ::hisG/his1Δ::hisG arg4Δ::hisG/arg4Δ::hisG</i>	Wilson <i>et al.</i> , 1999
OL2053	<i>sep7::HIS1/sep7::SAT1</i>	Stock del laboratorio
PY173	<i>ade2Δ::hisG/ade2Δ::hisG ura3::λimm434/ura3Δ::λimm434 his1Δ::hisG/his1Δ::hisG arg4Δ::hisG/arg4Δ::hisG ENO1/eno1::ENO1-tetRSchAP4AD-3xHA-ADE2</i>	Vernay <i>et al.</i> , 2012
PY452 (JC2517)	<i>ade2Δ::hisG/ade2Δ::hisG ura3::λimm434/ura3Δ::λimm434 his1Δ::hisG/his1Δ::hisG arg4Δ::hisG/arg4Δ::hisG ENO1/eno1::ENO1-tetRSchAP4AD-3xHA-ADE2 mss4::HIS1/mss4::URA3-pTetOff-MSS4</i>	Vernay <i>et al.</i> , 2012
JC1794	<i>3xmyc-CBK1::URA3/cbk1::ARG4 ssd1dd</i>	Dr. Jaime Correa (UNEX)
JC1795	<i>3xmyc-cbk1-KD::URA3/cbk1::ARG4 ssd1dd</i>	Dr. Jaime Correa (UNEX)
JC2247	<i>cbk1::ARG4/3xmyc-cbk1-as::URA3</i>	Dr. Jaime Correa (UNEX)
JC2284	<i>cbk1::ARG4/3xmyc-cbk1-as::URA3 SPA2-GFP::HIS1</i>	Dr. Jaime Correa (UNEX)
JC2332	<i>cbk1::ARG4/3xmyc-cbk1-as::URA3 EXO84-GFP::HIS1</i>	Dr. Jaime Correa (UNEX)
JC1049	<i>cbk1::ARG4/cbk1::HIS1</i>	Dr. Yue Wang
JC995	<i>ACE2-GFP::URA3 (fondo CAI4)</i>	Dr. Jaime Correa (UNEX)
Estirpe	Genotipo	Procedencia
DH5α	<i>supE44 ΔlacU169 (Φ80 lacZ ΔM15) hsdR17 recA1 endA1 gyrA96 thi-1 relA1)</i>	Stock del laboratorio
XL 1-Blue	<i>supE44 hsdR17 recA1 endA1 gyrA46 thi relA1 lac F [proAB⁺ lacI^f lacZ ΔM15 Tn10 (tet^r)]</i>	Agilent

Cepas de *C. albicans* construidas en este trabajo (Todas proceden del fondo genético BWP17 salvo OL3013, OL3196, OL3211, OL3212, OL3214 que proceden del fondo genético PY173).

Estirpe	Genotipo
OL2817	<i>rho4::loxP-HIS1-loxP/RHO4</i>
OL2820	<i>rho4::loxP-HIS1-loxP/rho4::loxP-URA3-Clox</i>
OL2821	<i>rho4::loxP-HIS1-loxP/rho4::loxP-NAT1-Clox</i>
OL2822	<i>rho4::loxP-NAT1-Clox/RHO4</i>
OL2824	<i>rho4::loxP/rho4::loxP</i>
OL2825	<i>rho4::loxP/RHO4</i>
OL2851	<i>rho4::loxP/rho4::loxP CDC12-GFPγ::loxP</i>
OL2853	<i>CDC12/CDC12-GFP::LHL</i>
OL2880	<i>sep7::LHL/SEP7 rho4::loxP/rho4::loxP</i>
OL2882	<i>sep7::LUL/SEP7 rho4::loxP/rho4::loxP</i>
OL2884	<i>SAT1-PrRHO4-GFPγ-RHO4/RHO4</i>
OL2885	<i>SAT1-PrRHO4-GFPγ-RHO4/rho4::loxP</i>
OL2887	<i>HIS1-AgTEFp-GFP-RHO4/RHO4</i>
OL2889	<i>HIS1-AgTEFp-GFP-RHO4/rho4::loxP</i>

Materiales y Métodos

OL2891	<i>sep7::LHL/sep7::LAL rho4::loxP/rho4::loxP</i>
OL2893	<i>rho4-3E::ARG4/rho4::loxP</i>
OL2894	<i>rho4-3A::ARG4/rho4::loxP</i>
OL2907	<i>HIS1-AgTEFp-GFP-RHO4/rho4::loxP CDC10/CDC10-Cherry::URA3</i>
OL2908	<i>sep7::LUL/sep7::NAT1Clox</i>
OL2909	<i>sep7::loxP/sep7::loxP</i>
OL2911	<i>CBK1/cbk1::ARG4</i>
OL2914	<i>HIS1-MAL2p-GFP-RHO4/RHO4</i>
OL2916	<i>HIS1-MAL2p-GFP-RHO4/rho4::loxP</i>
OL2918	<i>exo84::URA3-Clox/EXO84</i>
OL2920	<i>exo84::loxP/EXO84</i>
OL2922	<i>cbk1::ARG4/3xmyc-cbk1-as::URA3 HIS1-MAL2p-GFP-RHO4/RHO4</i>
OL2924	<i>HIS1-MAL2p-GFP-RHO4/rho4::loxP CDC10/CDC10-Cherry::URA3</i>
OL2926	<i>HIS1-MAL2p-GFP-rho4-3A::ARG4/rho4::loxP</i>
OL2928	<i>HIS1-MAL2p-GFP-rho4-3E::ARG4/rho4::loxP</i>
OL2953	<i>HIS1-MAL2p-GFP-rho4-3A::ARG4/rho4::loxP CDC10/CDC10-Cherry::LUL</i>
OL2954	<i>HIS1-MAL2p-GFP-rho4-3E::ARG4/rho4::loxP CDC10/CDC10-Cherry::LUL</i>
OL2955	<i>RHO4/rho4-3A::ARG4</i>
OL2956	<i>HIS1-MAL2p-GFP-RHO4/rho4::loxP sep7::LUL/SEP7</i>
OL2958	<i>HIS1-MAL2p-myc(GA)6-rho4-3A::ARG4/rho4::loxP</i>
OL2959	<i>rho4-3A::ARG4/rho4::loxP sep7::HIS1/SEP7</i>
OL2960	<i>rho4-3E::ARG4/rho4::loxP sep7::HIS1/SEP7</i>
OL2963	<i>HIS1-MAL2p-myc(GA)6-rho4-3E::ARG4/rho4::loxP</i>
OL2965	<i>HIS1-MAL2p-GFP-RHO4/rho4::loxP sep7::ARG4/SEP7</i>
OL2970	<i>cbk1::ARG4/3xmyc-cbk1-as::URA3 EXO84-GFP::HIS1/EXO84-GFP::loxP</i>
OL2972	<i>HIS1-MAL2p-myc(GA)6-RHO4/rho4::loxP</i>
OL2974	<i>rho4-3E::ARG4/rho4::loxP sep7::loxP/sep7::loxP</i>
OL2980	<i>rho4-3A::ARG4/rho4::loxP sep7::loxP/sep7::loxP</i>
OL2982	<i>HIS1-MAL2p-GFP-RHO4/rho4::loxP sep7::loxP/sep7::loxP</i>
OL2987	<i>3xmyc-CBK1::URA3/cbk1::ARG4 ssd1dd CDC10-GFP::HIS1/CDC10</i>
OL2989	<i>3xmyc-cbk1-KD::URA3/cbk1::ARG4 ssd1dd CDC10-GFP::HIS1/CDC10</i>
OL3013	<i>exo84::LAL/EXO84 ade2Δ::hisG/ade2Δ::hisG ura3::λimm434/ura3Δ:: λimm434 his1Δ::hisG/his1Δ::hisG arg4Δ::hisG/arg4Δ::hisG ENO1/eno1::ENO1-tetRSchAP4AD-3xHA-ADE2</i>
OL3021	<i>3xmyc-CBK1::URA3/cbk1::ARG4 ssd1dd SPA2-GFP::HIS1/SPA2</i>
OL3023	<i>3xmyc-cbk1-KD::URA3/cbk1::ARG4 ssd1dd SPA2-GFP::HIS1/SPA2</i>
OL3054	<i>cbk1::loxP/3xmyc-cbk1-as::URA3</i>
OL3056	<i>3xmyc-CBK1::URA3/cbk1::loxP ssd1dd</i>
OL3057	<i>3xmyc-cbk1-KD::URA3/cbk1::loxP ssd1dd</i>
OL3060	<i>cbk1::ARG4/3xmyc-cbk1-as::URA3 ACE2-GFP::HIS1/ACE2</i>

OL3061	<i>3xmyc-CBK1::URA3/cbk1::ARG4 ssd1dd ACE2-GFP::HIS1/ACE2</i>
OL3063	<i>3xmyc-cbk1-KD::URA3/cbk1::ARG4 ssd1dd ACE2-GFP::HIS1/ACE2</i>
OL3074	<i>cbk1::loxP/3xmyc-cbk1-as::URA3 ace2::loxP/ace2::loxP</i>
OL3076	<i>3myc-CBK1::URA3/cbk1::ARG4 ssd1dd CDC10-GFP::HIS1/CDC10 ABP1-Cherry-NAT1-Clox/ABP1</i>
OL3077	<i>3xmyc-CBK1::URA3/cbk1::ARG4 ssd1dd SPA2-GFP::HIS1/SPA2 CDC10-Cherry-NAT1-Clox/CDC10</i>
OL3089	<i>EXO84/URA3::Clox::TetOff-5xmyc-EXO84</i>
OL3104	<i>EXO84/lox:: TetOff-5xmyc-EXO84</i>
OL3109	<i>cbk1::LHL/CBK1 ade2ΔΔ ura3ΔΔ his1ΔΔ arg4ΔΔ ENO1/eno1::ENO1-tetRScHAP4AD-3xHA-ADE2</i>
OL3111	<i>cbk1::loxP/3xmyc-cbk1-as::URA3 CDC42</i>
OL3137	<i>cbk1::LHL/cbk1-as::LAL ade2ΔΔ ura3DD his1ΔΔ arg4ΔΔ ENO1/eno1::ENO1-tetRScHAP4AD-3xHA-ADE2</i>
OL3138	<i>cbk1-as::loxP/cbk1::loxP ade2ΔΔ ura3ΔΔ his1ΔΔ arg4ΔΔ ENO1/eno1::ENO1-tetRScHAP4AD-3xHA-ADE2</i>
OL3153	<i>SAT1-MET3p-myc-cbk1-as::loxP/cbk1::loxP ade2ΔΔ ura3ΔΔ his1ΔΔ arg4ΔΔ ENO1/eno1::ENO1-tetRScHAP4AD-3xHA-ADE2</i>
OL3159	<i>ace2::LAL/ACE2 SAT1-MET3p-myc-cbk1-as::loxP/cbk1::loxP ade2ΔΔ ura3ΔΔ his1ΔΔ arg4ΔΔ ENO1/eno1::ENO1-tetRScHAP4AD-3xHA-ADE2</i>
OL3164	<i>SAT1-MET3p-myc-cbk1-as::loxP/loxP ACE2-GFP::LAL/ACE2</i>
OL3170	<i>cbk1::loxP/myc-cbk1-as::URA3 ABP1-GFP::LHL/ABP1</i>
OL3172	<i>cbk1::loxP/myc-cbk1-as::URA3 SEC3-GFP::LHL/SEC3</i>
OL3196	<i>exo84::loxP/TetOff-5xmyc-EXO84 ade2D::hisG/ade2D::hisG ura3::λimm434/ura3D::λimm434 hisID::hisG/hisID::hisG arg4D::hisG/arg4D::hisG ENO1/enol::ENO1-tetRScHAP4AD-3xHA-ADE2</i>
OL3211	<i>NEUT5L/EXO84@NEUT5L exo84::loxP/ TetOff-5xmyc-EXO84 ade2Δ::hisG/ade2Δ::hisG ura3::λimm434/ura3Δ:: λimm434 hislΔ::hisG/hislΔ::hisG arg4Δ::hisG/arg4Δ::hisG ENO1/enol::ENO1-tetRScHAP4AD-3xHA-ADE2</i>
OL3212	<i>NEUT5L/exo84-3A @NEUT5L exo84::loxP/ TetOff-5xmyc-EXO84 ade2Δ::hisG/ade2Δ::hisG ura3::λimm434/ura3Δ:: λimm434 hislΔ::hisG/hislΔ::hisG arg4Δ::hisG/arg4Δ::hisG ENO1/enol::ENO1-tetRScHAP4AD-3xHA-ADE2</i>
OL3214	<i>NEUT5L/exo84-3E @NEUT5L exo84::loxP/ TetOff-5xmyc-EXO84 ade2Δ::hisG/ade2Δ::hisG ura3::λimm434/ura3Δ:: λimm434 hislΔ::hisG/hislΔ::hisG arg4Δ::hisG/arg4Δ::hisG ENO1/enol::ENO1-tetRScHAP4AD-3xHA-ADE2</i>

Tabla 2. Oligonucleótidos diseñados con la página web de *Agilent*, para introducir las mutaciones Alanina y Glutámico en Exo84 (Alanina: azul; Glutámico: naranja)

Núm.	Nombre	Secuencia
2397	Exo84_CBk1_1A	GCTCGTCAACATGGAAGATCTTTTGCACAAACTGGTCCAATTGAT
2398	Exo84_CBk1_1A_as	ATCAATTGGACCAGTTTGTGCAAAAGATCTTCCATGTTGACGAGC
2399	Exo84_CBk1_2A	GATCGTTATGATCATTTTGTGAAAGTTGCAGAAGCATTAAATAAAGGTAGAAA
2400	Exo84_CBk1_2A_as	TTTCTACCTTTATTAATGCTTCTGCAACTTTCACAAAATGATCATAACGATC
2401	Exo84_CBk1_3A	CTCGAGTACATTCACGTAATCGAGCACAAGATTTAGGGAATAATTTTC
2402	Exo84_CBk1_3A_as	GAAATTATCCCTAAATCTTGTGCTCGATTACGTGAATGTACTCGAG
2403	Exo84_CBk1_1E	TCAGCTCGTCAACATGGAAGATCTTTTGAACAAACTGGTCCAATTGATATGG
2404	Exo84_CBk1_1E_as	CCATATCAATTGGACCAGTTTGTTCAAAAGATCTTCCATGTTGACGAGCTGA
2405	Exo84_CBk1_2E	TGACGGATCGTTATGATCATTTTGTGAAAGTTGAGGAAGCATTAAATAAAGG
2406	Exo84_CBk1_2E_as	CCTTTATTAATGCTTCCTCAACTTTCACAAAATGATCATAACGATCCGTCA
2407	Exo84_CBk1_3E	CTGCTCGAGTACATTCACGTAATCGAGAACAAGATTTAGGGAATAATTTCA
2408	Exo84_CBk1_3E_as	TGAAATTATCCCTAAATCTTGTTCGATTACGTGAATGTACTCGAGCAG

Bibliografía

- Acosta, I., D. Ontoso, y P.A. San-Segundo. 2011. The budding yeast polo-like kinase Cdc5 regulates the Ndt80 branch of the meiotic recombination checkpoint pathway. *Mol Biol Cell*. 22:3478.
- Albuquerque, P., y A. Casadevall. 2012. Quorum sensing in fungi--a review. *Med Mycol*. 50:337.
- An, H., J.L. Morrell, J.L. Jennings, A.J. Link, y K.L. Gould. 2004. Requirements of fission yeast septins for complex formation, localization and function. *Mol Biol Cell*. 15:5551.
- Arkowitz, R.A., y M. Bassilana. 2019. Recent advances in understanding *Candida albicans* hyphal growth. *F1000Res*. 8:700.
- Ashburner, M., C.A. Ball, J.A. Blake, D. Botstein, H. Butler, J.M. Cherry, A.P. Davis, K. Dolinski, S.S. Dwight, J.T. Eppig, M.A. Harris, D.P. Hill, L. Issel-Tarver, A. Kasarskis, S. Lewis, J.C. Matese, J.E. Richardson, M. Ringwald, G.M. Rubin, y G. Sherlock. 2000. Gene ontology: tool for the unification of biology. The Gene Ontology Consortium. *Nat Genet*. 25:25.
- Avruch, J., D. Zhou, J. Fitamant, N. Bardeesy, F. Mou, y L.R. Barrufet. 2012. Protein kinases of the *Hippo* pathway: regulation and substrates. *Semin Cell Dev Biol*. 23:770.
- Bachewich, C., y M. Whiteway. 2005. Cyclin Cln3p links G1 progression to hyphal and pseudohyphal development in *Candida albicans*. *Eukaryot Cell*. 4:95.
- Baladrón, V., S. Ufano, E. Dueñas, A.B. Martín-Cuadrado, F. del Rey, y C.R. Vázquez de Aldana. 2002. Eng1p, an endo-1,3- β -glucanase localized at the daughter side of the septum, is involved in cell separation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Eukaryot Cell*. 1:774.
- Ballou, E.R., G.M. Avelar, D.S. Childers, J. Mackie, J.M. Bain, J. Wagener, S.L. Kastora, M.D. Panea, S.E. Hardison, L.A. Walker, L.P. Erwig, C.A. Munro, N.A. Gow, G.D. Brown, D.M. MacCallum, y A.J. Brown. 2016. Lactate signalling regulates fungal β -glucan masking and immune evasion. *Nat Microbiol*. 2:16238.
- Bardin, A.J., y A. Amon. 2001. Men and sin: what's the difference? *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2:815.
- Baro, B., E. Queralt, y F. Monje-Casas. 2017. Regulation of Mitotic Exit in *Saccharomyces cerevisiae*. *Methods Mol Biol*. 1505:3.
- Basrai, M.A., F. Naider, y J.M. Becker. 1990. Internalization of Lucifer Yellow in *Candida albicans* by fluid phase endocytosis. *J Gen Microbiol*. 136:1059.
- Bassilana, M., J. Blyth, y R.A. Arkowitz. 2003. Cdc24, the GDP-GTP exchange factor for Cdc42, is required for invasive hyphal growth of *Candida albicans*. *Eukaryot Cell*. 2:9.
- Bassilana, M., J. Hopkins, y R.A. Arkowitz. 2005. Regulation of the Cdc42/Cdc24 GTPase module during *Candida albicans* hyphal growth. *Eukaryot Cell*. 4:588.
- Bassilana, M., C. Puerner, y R.A. Arkowitz. 2020. External signal-mediated polarized growth in fungi. *Curr Opin Cell Biol*. 62:150.
- Bennett, R.J. 2015. The parasexual lifestyle of *Candida albicans*. *Curr Opin Microbiol*. 28:10.
- Bensen, E.S., A. Clemente-Blanco, K.R. Finley, J. Correa-Bordes, y J. Berman. 2005. The mitotic cyclins Clb2p and Clb4p affect morphogenesis in *Candida albicans*. *Mol Biol Cell*. 16:3387.
- Berman, J. 2006. Morphogenesis and cell cycle progression in *Candida albicans*. *Curr Opin Microbiol*. 9:595.
- Berman, J., y P.E. Sudbery. 2002. *Candida albicans*: a molecular revolution built on lessons from budding yeast. *Nat Rev Genet*. 3:918.
- Bermejo-Pulido, G. 2016. Mecanismos de regulación del represor Nrg1 en *Candida albicans*. Tesis Doctoral. Universidad de Extremadura (UNEX).
- Bernardo, S.M., H.S. Rane, A. Chavez-Dozal, y S.A. Lee. 2014. Secretion and filamentation are mediated by the *Candida albicans* t-SNAREs Sso2p and Sec9p. *FEMS Yeast Res*. 14:762.
- Bertin, A., M.A. McMurray, P. Grob, S.S. Park, G. Garcia, 3rd, I. Patanwala, H.L. Ng, T. Alber, J. Thorner, y E. Nogales. 2008. *Saccharomyces cerevisiae* septins: supramolecular organization of heterooligomers and the mechanism of filament assembly. *Proc Natl Acad Sci USA*. 105:8274.
- Bertin, A., M.A. McMurray, L. Thai, G. Garcia, 3rd, V. Votin, P. Grob, T. Allyn, J. Thorner, y E. Nogales. 2010. Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate promotes budding yeast septin filament assembly and organization. *J Mol Biol*. 404:711.
- Bharucha, N., Y. Chabrier-Rosello, T. Xu, C. Johnson, S. Sobczynski, Q. Song, C.J. Dobry, M.J. Eckwahl, C.P.

Bibliografía

- Anderson, A.J. Benjamin, A. Kumar, y D.J. Krysan. 2011. A large-scale complex haploinsufficiency-based genetic interaction screen in *Candida albicans*: analysis of the RAM network during morphogenesis. *PLoS Genet.* 7:e1002058.
- Bi, E., y H.O. Park. 2012. Cell polarization and cytokinesis in budding yeast. *Genetics.* 191:347.
- Bidlingmaier, S., E.L. Weiss, C. Seidel, D.G. Drubin, y M. Snyder. 2001. The Cbk1p pathway is important for polarized cell growth and cell separation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol.* 21:2449.
- Bishop, A., R. Lane, R. Beniston, B. Chapa-y-Lazo, C. Smythe, y P. Sudbery. 2010. Hyphal growth in *Candida albicans* requires the phosphorylation of Sec2 by the Cdc28-Ccn1/Hgc1 kinase. *EMBO J.* 29:2930.
- Biswas, S., P. Van Dijck, y A. Datta. 2007. Environmental sensing and signal transduction pathways regulating morphopathogenic determinants of *Candida albicans*. *Microbiol Mol Biol Rev.* 71:348.
- Blankenship, J.R., S. Fanning, J.J. Hamaker, y A.P. Mitchell. 2010. An extensive circuitry for cell wall regulation in *Candida albicans*. *PLoS Pathog.* 6:e1000752.
- Blethrow, J., C. Zhang, K.M. Shokat, y E.L. Weiss. 2004. Design and use of analog-sensitive protein kinases. *Curr Protoc Mol Biol.* Chapter 18:Unit 18.11.
- Bonhomme, J., y C. d'Enfert. 2013. *Candida albicans* biofilms: building a heterogeneous, drug-tolerant environment. *Curr Opin Microbiol.* 16:398.
- Böttcher, B., C. Pollath, P. Staib, B. Hube, y S. Brunke. 2016. *Candida* species rewired hyphae developmental programs for chlamydospore formation. *Front Microbiol.* 7:1697.
- Brace, J., J. Hsu, y E.L. Weiss. 2011. Mitotic exit control of the *Saccharomyces cerevisiae* Ndr/LATS kinase Cbk1 regulates daughter cell separation after cytokinesis. *Mol Cell Biol.* 31:721.
- Braun, B.R., D. Kadosh, y A.D. Johnson. 2001. NRG1, a repressor of filamentous growth in *C. albicans*, is down-regulated during filament induction. *EMBO J.* 20:4753.
- Bridges, A.A., y A.S. Gladfelter. 2015. Septin form and function at the cell cortex. *J Biol Chem.* 290:17173.
- Brown, J.L., M. Jaquenoud, M.P. Gulli, J. Chant, y M. Peter. 1997. Novel Cdc42-binding proteins Gic1 and Gic2 control cell polarity in yeast. *Genes Dev.* 11:2972.
- Caballero-Lima, D., I.N. Kaneva, S.P. Watton, P.E. Sudbery, y C.J. Craven. 2013. The spatial distribution of the exocyst and actin cortical patches is sufficient to organize hyphal tip growth. *Eukaryot Cell.* 12:998.
- Caballero-Lima, D., y P.E. Sudbery. 2014. In *Candida albicans*, phosphorylation of Exo84 by Cdk1-Hgc1 is necessary for efficient hyphal extension. *Mol Biol Cell.* 25:1097.
- Calderón-Noreña, D.M., A. González-Novo, S. Orellana-Muñoz, P. Gutiérrez-Escribano, Y. Arnáiz-Pita, E. Dueñas-Santero, M.B. Suárez, M.E. Bougnoux, F. del Rey, G. Sherlock, C. d'Enfert, J. Correa-Bordes, y C.R. Vázquez de Aldana. 2015. A single nucleotide polymorphism uncovers a novel function for the transcription factor Ace2 during *Candida albicans* hyphal development. *PLoS Genet.* 11:e1005152.
- Casadevall, A., y L.A. Pirofski. 2003. The damage-response framework of microbial pathogenesis. *Nat Rev Microbiol.* 1:17.
- Caudron, F., y Y. Barral. 2009. Septins and the lateral compartmentalization of eukaryotic membranes. *Dev Cell.* 16:493.
- Caviston, J.P., M. Longtine, J.R. Pringle, y E. Bi. 2003. The role of Cdc42p GTPase-activating proteins in assembly of the septin ring in yeast. *Mol Biol Cell.* 14:4051.
- Chapa y Lazo, B., S. Bates, y P. Sudbery. 2005. The G1 cyclin Cln3 regulates morphogenesis in *Candida albicans*. *Eukaryot Cell.* 4:90.
- Chen, H., X. Zhou, B. Ren, y L. Cheng. 2020. The regulation of hyphae growth in *Candida albicans*. *Virulence.* 11:337.
- Chen, X., D.J. Ebbole, y Z. Wang. 2015. The exocyst complex: delivery hub for morphogenesis and pathogenesis in filamentous fungi. *Curr Opin Plant Biol.* 28:48.
- Chiou, J.G., M.K. Balasubramanian, y D.J. Lew. 2017. Cell polarity in yeast. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 33:77.
- Chow, E.W.L., L.M. Pang, y Y. Wang. 2021. From Jekyll to Hyde: The yeast-hyphal transition of *Candida albicans*. *Pathogens.* 10:859.

- Cleary, I.A., A.L. Lazzell, C. Monteagudo, D.P. Thomas, y S.P. Saville. 2012. *BRG1* and *NRG1* form a novel feedback circuit regulating *Candida albicans* hypha formation and virulence. *Mol Microbiol.* 85:557.
- Clemente-Blanco, A., A. González-Novo, F. Machín, D. Caballero-Lima, L. Aragón, M. Sánchez, C.R. Vázquez de Aldana, J. Jiménez, y J. Correa-Bordes. 2006. The Cdc14p phosphatase affects late cell-cycle events and morphogenesis in *Candida albicans*. *J Cell Sci.* 119:1130.
- Colman-Lerner, A., T.E. Chin, y R. Brent. 2001. Yeast Cbk1 and Mob2 activate daughter-specific genetic programs to induce asymmetric cell fates. *Cell.* 107:739.
- Colombo, A.L., J.N.A. Junior, y J. Guinea. 2017. Emerging multidrug-resistant *Candida* species. *Curr Opin Infect Dis.* 30:528.
- Corvest, V., S. Bogliolo, P. Follette, R.A. Arkowitz, y M. Bassilana. 2013. Spatiotemporal regulation of Rho1 and Cdc42 activity during *Candida albicans* filamentous growth. *Mol Microbiol.* 89:626.
- Cottier, F., y R.A. Hall. 2019. Face/Off: The interchangeable side of *Candida albicans*. *Front Cell Infect Microbiol.* 9:471.
- Crampin, H., K. Finley, M. Gerami-Nejad, H. Court, C. Gale, J. Berman, y P. Sudbery. 2005. *Candida albicans* hyphae have a Spitzenkörper that is distinct from the polarisome found in yeast and pseudohyphae. *J Cell Sci.* 118:2935.
- d'Enfert, C., A.K. Kaune, L.R. Alaban, S. Chakraborty, N. Cole, M. Delavy, D. Kosmala, B. Marsaux, R. Frois- Martins, M. Morelli, D. Rosati, M. Valentine, Z. Xie, Y. Emritloll, P.A. Warn, F. Bequet, M.E. Bognoux, S. Bornes, M.S. Gresnigt, B. Hube, I.D. Jacobsen, M. Legrand, S. Leibundgut-Landmann, C. Manichanh, C.A. Munro, M.G. Netea, K. Queiroz, K. Roget, V. Thomas, C. Thorat, P. Van den Abbeele, A.W. Walker, y A.J.P. Brown. 2021. The impact of the Fungus-Host-Microbiota interplay upon *Candida albicans* infections: current knowledge and new perspectives. *FEMS Microbiol Rev.* 45:fuaa060.
- Dadar, M., R. Tiwari, K. Karthik, S. Chakraborty, Y. Shahali, y K. Dhama. 2018. *Candida albicans* - Biology, molecular characterization, pathogenicity, and advances in diagnosis and control - An update. *Microb Pathog.* 117:128.
- Dautt-Castro, M., M. Rosendo-Vargas, y S. Casas-Flores. 2021. The small GTPases in fungal signaling conservation and function. *Cells.* 10:1039.
- Davis, D. 2003. Adaptation to environmental pH in *Candida albicans* and its relation to pathogenesis. *Curr Genet.* 44:1.
- Davis, D., R.B. Wilson, y A.P. Mitchell. 2000. RIM101-dependent and-independent pathways govern pH responses in *Candida albicans*. *Mol Cell Biol.* 20:971.
- Davis, S.A., B.M. Vincent, M.M. Endo, L. Whitesell, K. Marchillo, D.R. Andes, S. Lindquist, y M.D. Burke. 2015. Nontoxic antimicrobials that evade drug resistance. *Nat Chem Biol.* 11:481.
- Desai, J.V. 2018. *Candida albicans* hyphae: from growth initiation to invasion. *J Fungi (Basel).* 4:10.
- Desai, P.R., L. van Wijlick, D. Kurtz, M. Juchimiuk, y J.F. Ernst. 2015. Hypoxia and temperature regulated morphogenesis in *Candida albicans*. *PLoS Genet.* 11:e1005447.
- Di Talia, S., H. Wang, J.M. Skotheim, A.P. Rosebrock, B. Futcher, y F.R. Cross. 2009. Daughter-specific transcription factors regulate cell size control in budding yeast. *PLoS Biol.* 7:e1000221.
- Drell, T., T. Lillsaar, L. Tummeleht, J. Simm, A. Aaspollu, E. Vain, I. Saarma, A. Salumets, G.G. Donders, y M. Metsis. 2013. Characterization of the vaginal micro- and mycobiome in asymptomatic reproductive-age Estonian women. *PLoS One.* 8:e54379.
- Duan, Y., Q. Guo, T. Zhang, Y. Meng, D. Sun, G. Luo, y Y. Liu. 2019. Cyclin-dependent kinase-mediated phosphorylation of the exocyst subunit Exo84 in late G1 phase suppresses exocytic secretion and cell growth in yeast. *J Biol Chem.* 294:11323.
- Dueñas-Santero, E., A. Santos-Almeida, P. Rojo-Domínguez, F. del Rey, J. Correa-Bordes, y C.R. Vázquez de Aldana. 2019. A new toolkit for gene tagging in *Candida albicans* containing recyclable markers. *PLoS One.* 14:e0219715.
- Duhart, J.C., y L.A. Raftery. 2020. Mob family proteins: regulatory partners in *Hippo* and Hippo-like Intracellular signaling pathways. *Front Cell Dev Biol.* 8:161.
- Dünkler, A., y J. Wendland. 2007. *Candida albicans* Rho-type GTPase-encoding genes required for polarized cell growth and cell separation. *Eukaryot Cell.* 6:844.

Bibliografía

- Ene, I.V., R.J. Bennett, y M.Z. Anderson. 2019. Mechanisms of genome evolution in *Candida albicans*. *Curr Opin Microbiol.* 52:47.
- Evangelista, M., S. Zigmund, y C. Boone. 2003. Formins: signaling effectors for assembly and polarization of actin filaments. *J Cell Sci.* 116:2603.
- Finkel, J.S., W. Xu, D. Huang, E.M. Hill, J.V. Desai, C.A. Woolford, J.E. Nett, H. Taff, C.T. Norice, D.R. Andes, F. Lanni, y A.P. Mitchell. 2012. Portrait of *Candida albicans* adherence regulators. *PLoS Pathog.* 8:e1002525.
- Gale, C.A., M.D. Leonard, K.R. Finley, L. Christensen, M. McClellan, D. Abbey, C. Kurischko, E. Bensen, I. Tzafirir, S. Kauffman, J. Becker, y J. Berman. 2009. SLA2 mutations cause SWE1-mediated cell cycle phenotypes in *Candida albicans* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiology (Reading).* 155:3847.
- Galocha, M., P. Pais, M. Cavalheiro, D. Pereira, R. Viana, y M.C. Teixeira. 2019. Divergent approaches to virulence in *C. albicans* and *C. glabrata*: two sides of the same coin. *Int J Mol Sci.* 20:2345.
- Gerami-Nejad, M., L.F. Zacchi, M. McClellan, K. Matter, y J. Berman. 2013. Shuttle vectors for facile gap repair cloning and integration into a neutral locus in *Candida albicans*. *Microbiology (Reading).* 159:565.
- Geymonat, M., S. Jensen, y L.H. Johnston. 2002. Mitotic exit: the Cdc14 double cross. *Curr Biol.* 12:R482.
- Ghannoum, M.A., R.J. Jurevic, P.K. Mukherjee, F. Cui, M. Sikaroodi, A. Naqvi, y P.M. Gillevet. 2010. Characterization of the oral fungal microbiome (mycobiome) in healthy individuals. *PLoS Pathog.* 6:e1000713.
- Gógl, G., K.D. Schneider, B.J. Yeh, N. Alam, A.N. Nguyen Ba, A.M. Moses, C. Hetenyi, A. Remenyi, y E.L. Weiss. 2015. The structure of an NDR/LATS kinase-Mob complex reveals a novel kinase-coactivator system and substrate docking mechanism. *PLoS Biol.* 13:e1002146.
- Gola, S., R. Martin, A. Walther, A. Dünkler, y J. Wendland. 2003. New modules for PCR-based gene targeting in *Candida albicans*: rapid and efficient gene targeting using 100 bp of flanking homology region. *Yeast.* 20:1339.
- Gong, T., Y. Liao, F. He, Y. Yang, D.D. Yang, X.D. Chen, y X.D. Gao. 2013. Control of polarized growth by the Rho family GTPase Rho4 in budding yeast: requirement of the N-terminal extension of Rho4 and regulation by the Rho GTPase-activating protein Bem2. *Eukaryot Cell.* 12:368.
- González-Novo, A., J. Correa-Bordes, L. Labrador, M. Sánchez, C.R. Vázquez de Aldana, y J. Jiménez. 2008. Sep7 is essential to modify septin ring dynamics and inhibit cell separation during *Candida albicans* hyphal growth. *Mol Biol Cell.* 19:1509.
- Goode, B.L., J.A. Eskin, y B. Wendland. 2015. Actin and endocytosis in budding yeast. *Genetics.* 199:315.
- Goryachev, A.B., y M. Leda. 2017. Many roads to symmetry breaking: molecular mechanisms and theoretical models of yeast cell polarity. *Mol Biol Cell.* 28:370.
- Gow, N.A., y G.W. Gooday. 1987. Cytological aspects of dimorphism in *Candida albicans*. *Crit Rev Microbiol.* 15:73.
- Gregan, J., C. Zhang, C. Rumpf, L. Cipak, Z. Li, P. Uluocak, K. Nasmyth, y K.M. Shokat. 2007. Construction of conditional analog-sensitive kinase alleles in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Nat Protoc.* 2:2996.
- Greig, J.A., I.M. Sudbery, J.P. Richardson, J.R. Naglik, Y. Wang, y P.E. Sudbery. 2015. Cell cycle-independent phospho-regulation of Fkh2 during hyphal growth regulates *Candida albicans* pathogenesis. *PLoS Pathog.* 11:e1004630.
- Guo, Y., F. Yang, y X. Tang. 2017. An overview of protein secretion in yeast and animal cells. *Methods Mol Biol.* 1662:1.
- Gutiérrez-Escribano, P., A. González-Novo, M.B. Suárez, C.R. Li, Y. Wang, C.R. Vázquez de Aldana, y J. Correa-Bordes. 2011. CDK-dependent phosphorylation of Mob2 is essential for hyphal development in *Candida albicans*. *Mol Biol Cell.* 22:2458.
- Gutiérrez-Escribano, P., U. Zeidler, M.B. Suárez, S. Bachellier-Bassi, A. Clemente-Blanco, J. Bonhomme, C.R. Vázquez de Aldana, C. d'Enfert, y J. Correa-Bordes. 2012. The NDR/LATS kinase Cbk1 controls the activity of the transcriptional regulator Bcr1 during biofilm formation in *Candida albicans*. *PLoS Pathog.* 8:e1002683.
- Haga, R.B., y A.J. Ridley. 2016. Rho GTPases: Regulation and roles in cancer cell biology. *Small GTPases.* 7:207.
- Hall, A. 2012. Rho family GTPases. *Biochem Soc Trans.* 40:1378.
- Hall, R.A., y M.C. Noverr. 2017. Fungal interactions with the human host: exploring the spectrum of symbiosis. *Curr*

- Opin Microbiol.* 40:58.
- Hayes, A.B. 1966. Chlamyospore production in *Candida albicans*. *Mycopathol Mycol Appl.* 29:87.
- Hazan, I., M. Sepulveda-Becerra, y H. Liu. 2002. Hyphal elongation is regulated independently of cell cycle in *Candida albicans*. *Mol Biol Cell.* 13:134.
- He, B., y W. Guo. 2009. The exocyst complex in polarized exocytosis. *Curr Opin Cell Biol.* 21:537.
- Heitman, J. 2006. Sexual reproduction and the evolution of microbial pathogens. *Curr Biol.* 16:R711.
- Hergovich, A. 2016. The roles of NDR protein kinases in *Hippo* signalling. *Genes (Basel).* 7:21.
- Hergovich, A., M.R. Stegert, D. Schmitz, y B.A. Hemmings. 2006. NDR kinases regulate essential cell processes from yeast to humans. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 7:253.
- Hogan, D.J., D.P. Riordan, A.P. Gerber, D. Herschlag, y P.O. Brown. 2008. Diverse RNA-binding proteins interact with functionally related sets of RNAs, suggesting an extensive regulatory system. *PLoS Biol.* 6:e255.
- Holt, L.J., B.B. Tuch, J. Villen, A.D. Johnson, S.P. Gygi, y D.O. Morgan. 2009. Global analysis of Cdk1 substrate phosphorylation sites provides insights into evolution. *Science.* 325:1682.
- Hornby, J.M., E.C. Jensen, A.D. Lisec, J.J. Tasto, B. Jahnke, R. Shoemaker, P. Dussault, y K.W. Nickerson. 2001. Quorum sensing in the dimorphic fungus *Candida albicans* is mediated by farnesol. *Appl Environ Microbiol.* 67:2982.
- Howell, A.S., y D.J. Lew. 2012. Morphogenesis and the cell cycle. *Genetics.* 190:51.
- Huang, G., Q. Huang, Y. Wei, Y. Wang, y H. Du. 2019. Multiple roles and diverse regulation of the Ras/cAMP/protein kinase A pathway in *Candida albicans*. *Mol Microbiol.* 111:6.
- Hulo, N., A. Bairoch, V. Bulliard, L. Cerutti, E. De Castro, P.S. Langendijk-Genevaux, M. Pagni, y C.J. Sigrist. 2006. The PROSITE database. *Nucleic Acids Res.* 34:D227.
- Jansen, J.M., M.F. Barry, C.K. Yoo, y E.L. Weiss. 2006. Phosphoregulation of Cbk1 is critical for RAM network control of transcription and morphogenesis. *J Cell Biol.* 175:755.
- Jansen, J.M., A.G. Wanless, C.W. Seidel, y E.L. Weiss. 2009. Cbk1 regulation of the RNA-binding protein Ssd1 integrates cell fate with translational control. *Curr Biol.* 19:2114.
- Jiménez-Gutiérrez, E., E. Alegria-Carrasco, A. Sellers-Moya, M. Molina, y H. Martín. 2020. Not just the wall: the other ways to turn the yeast CWI pathway on. *Int Microbiol.* 23:107.
- Johnson, J.M., M. Jin, y D.J. Lew. 2011. Symmetry breaking and the establishment of cell polarity in budding yeast. *Curr Opin Genet Dev.* 21:740.
- Jones, L.A., y P.E. Sudbery. 2010. Spitzenkörper, exocyst, and polarisome components in *Candida albicans* hyphae show different patterns of localization and have distinct dynamic properties. *Eukaryot Cell.* 9:1455.
- Jones, T., N.A. Federspiel, H. Chibana, J. Dungan, S. Kalman, B.B. Magee, G. Newport, Y.R. Thorstenson, N. Agabian, P.T. Magee, R.W. Davis, y S. Scherer. 2004. The diploid genome sequence of *Candida albicans*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 101:7329.
- Kadosh, D. 2019. Regulatory mechanisms controlling morphology and pathogenesis in *Candida albicans*. *Curr Opin Microbiol.* 52:27.
- Kadota, J., T. Yamamoto, S. Yoshiuchi, E. Bi, y K. Tanaka. 2004. Septin ring assembly requires concerted action of polarisome components, a PAK kinase Cla4p, and the actin cytoskeleton in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Biol Cell.* 15:5329.
- Kaksonen, M., y A. Roux. 2018. Mechanisms of clathrin-mediated endocytosis. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 19:313.
- Kaksonen, M., Y. Sun, y D.G. Drubin. 2003. A pathway for association of receptors, adaptors, and actin during endocytic internalization. *Cell.* 115:475.
- Kelly, M.T., D.M. MacCallum, S.D. Clancy, F.C. Odds, A.J. Brown, y G. Butler. 2004. The *Candida albicans* CaACE2 gene affects morphogenesis, adherence and virulence. *Mol Microbiol.* 53:969.
- Khalaf, R.A., y R.S. Zitomer. 2001. The DNA binding protein Rfg1 is a repressor of filamentation in *Candida albicans*. *Genetics.* 157:1503.
- Khan, A., M. McQuilken, y A.S. Gladfelter. 2015. Septins and generation of asymmetries in fungal cells. *Annu Rev Microbiol.* 69:487.

Bibliografía

- Kim, J.M., H.Y. Moon, D.W. Lee, H.A. Kang, y J.Y. Kim. 2021. The transcription factor Cas5 suppresses hyphal morphogenesis during yeast-form growth in *Candida albicans*. *J Microbiol.* 59:911.
- Kim, Y.J., L. Francisco, G.C. Chen, E. Marcotte, y C.S. Chan. 1994. Control of cellular morphogenesis by the Ip12/Bem2 GTPase-activating protein: possible role of protein phosphorylation. *J Cell Biol.* 127:1381.
- Klis, F.M., C.G. de Koster, y S. Brul. 2014. Cell wall-related biomarkers and bioestimates of *Saccharomyces cerevisiae* and *Candida albicans*. *Eukaryot Cell.* 13:2.
- Köhler, J.R., A. Casadevall, y J. Perfect. 2014. The spectrum of fungi that infects humans. *Cold Spring Harb Perspect Med.* 5:a019273.
- Kohli, M., V. Galati, K. Boudier, R.W. Roberson, y P. Philippsen. 2008. Growth-speed-correlated localization of exocyst and polarisome components in growth zones of *Ashbya gossypii* hyphal tips. *J Cell Sci.* 121:3878.
- Kovacs, R., y L. Majoros. 2020. Fungal quorum-sensing molecules: a review of their antifungal effect against *Candida* biofilms. *J Fungi (Basel).* 6:99.
- Krysan, D.J., F.S. Sutterwala, y M. Wellington. 2014. Catching fire: *Candida albicans*, macrophages, and pyroptosis. *PLoS Pathog.* 10:e1004139.
- Kuravi, V.K., C. Kurischko, M. Puri, y F.C. Luca. 2011. Cbk1 kinase and Bck2 control MAP kinase activation and inactivation during heat shock. *Mol Biol Cell.* 22:4892.
- Kurischko, C., H.K. Kim, V.K. Kuravi, J. Pratzka, y F.C. Luca. 2011a. The yeast Cbk1 kinase regulates mRNA localization via the mRNA-binding protein Ssd1. *J Cell Biol.* 192:583.
- Kurischko, C., V.K. Kuravi, C.J. Herbert, y F.C. Luca. 2011b. Nucleocytoplasmic shuttling of Ssd1 defines the destiny of its bound mRNAs. *Mol Microbiol.* 81:831.
- Kurischko, C., V.K. Kuravi, N. Wannissorn, P.A. Nazarov, M. Husain, C. Zhang, K.M. Shokat, J.M. McCaffery, y F.C. Luca. 2008. The yeast LATS/Ndr kinase Cbk1 regulates growth via Golgi-dependent glycosylation and secretion. *Mol Biol Cell.* 19:5559.
- Kushner, S.R. 1978. An improved method for transformation of *Escherichia coli* with ColE1 derived plasmids. *In Genetic Engineering.* H.W. Boyer y S. Nicosia, editors. Elsevier, Amsterdam. 17.
- Laabs, T.L., D.D. Markwardt, M.G. Slattery, L.L. Newcomb, D.J. Stillman, y W. Heideman. 2003. *ACE2* is required for daughter cell-specific G1 delay in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc Natl Acad Sci USA.* 100:10275.
- Labbaoui, H., S. Bogliolo, V. Ghugtyal, N.V. Solis, S.G. Filler, R.A. Arkowitz, y M. Bassilana. 2017. Role of Arf GTPases in fungal morphogenesis and virulence. *PLoS Pathog.* 13:e1006205.
- Lee, H.J., J.M. Kim, W.K. Kang, H. Yang, y J.Y. Kim. 2015. The NDR kinase Cbk1 downregulates the transcriptional repressor Nrg1 through the mRNA-binding protein Ssd1 in *Candida albicans*. *Eukaryot Cell.* 14:671.
- Levin, D.E. 2011. Regulation of cell wall biogenesis in *Saccharomyces cerevisiae*: the cell wall integrity signaling pathway. *Genetics.* 189:1145.
- Li, C.R., R.T. Lee, Y.M. Wang, X.D. Zheng, y Y. Wang. 2007. *Candida albicans* hyphal morphogenesis occurs in Sec3p-independent and Sec3p-dependent phases separated by septin ring formation. *J Cell Sci.* 120:1898.
- Li, C.R., Y.M. Wang, X. De Zheng, H.Y. Liang, J.C. Tang, y Y. Wang. 2005. The formin family protein CaBni1p has a role in cell polarity control during both yeast and hyphal growth in *Candida albicans*. *J Cell Sci.* 118:2637.
- Liang, W., G. Guan, C. Li, C.J. Nobile, L. Tao, y G. Huang. 2020. Genetic regulation of the development of mating projections in *Candida albicans*. *Emerg Microbes Infect.* 9:413.
- Lin, C.J., y Y.L. Chen. 2018. Conserved and divergent functions of the cAMP/PKA signaling pathway in *Candida albicans* and *Candida tropicalis*. *J Fungi (Basel).* 4:68.
- Lockhart, S.R., C. Pujol, K.J. Daniels, M.G. Miller, A.D. Johnson, M.A. Pfaller, y D.R. Soll. 2002. In *Candida albicans*, white-opaque switchers are homozygous for mating type. *Genetics.* 162:737.
- Loeb, J.D., M. Sepulveda-Becerra, I. Hazan, y H. Liu. 1999. A G1 cyclin is necessary for maintenance of filamentous growth in *Candida albicans*. *Mol. Cell. Biol.* 19:4019-4027.
- Lu, Y., C. Su, A. Wang, y H. Liu. 2011. Hyphal development in *Candida albicans* requires two temporally linked changes in promoter chromatin for initiation and maintenance. *PLoS Biol.* 9:e1001105.
- Luo, G., J. Zhang, F.C. Luca, y W. Guo. 2013. Mitotic phosphorylation of Exo84 disrupts exocyst assembly and

- arrests cell growth. *J Cell Biol.* 202:97.
- Maerz, S., y S. Seiler. 2010. Tales of RAM and MOR: NDR kinase signaling in fungal morphogenesis. *Curr Opin Microbiol.* 13:663.
- Magill, S.S., J.R. Edwards, W. Bamberg, Z.G. Beldavs, G. Dumyati, M.A. Kainer, R. Lynfield, M. Maloney, L. McAllister-Hollod, J. Nadle, S.M. Ray, D.L. Thompson, L.E. Wilson, y S.K. Fridkin. 2014. Multistate point-prevalence survey of health care-associated infections. *N Engl J Med.* 370:1198.
- Mallick, E.M., y R.J. Bennett. 2013. Sensing of the microbial neighborhood by *Candida albicans*. *PLoS Pathog.* 9:e1003661.
- Marquardt, J., X. Chen, y E. Bi. 2019. Architecture, remodeling, and functions of the septin cytoskeleton. *Cytoskeleton (Hoboken).* 76:7.
- Marquitz, A.R., J.C. Harrison, I. Bose, T.R. Zyla, J.N. McMillan, y D.J. Lew. 2002. The Rho-GAP Bem2p plays a GAP-independent role in the morphogenesis checkpoint. *EMBO J.* 21:4012.
- Martín-Cuadrado, A.B., J.L. Morrell, M. Konomi, H. An, C. Petit, M. Osumi, M. Balasubramanian, K.L. Gould, F. del Rey, y C.R. Vázquez de Aldana. 2005. Role of septins and the exocyst complex in the function of hydrolytic enzymes responsible for fission yeast cell separation. *Mol Biol Cell.* 16:4867.
- Martin, R., D. Hellwig, Y. Schaub, J. Bauer, A. Walther, y J. Wendland. 2007. Functional analysis of *Candida albicans* genes whose *Saccharomyces cerevisiae* homologues are involved in endocytosis. *Yeast.* 24:511.
- Martin, S.G. 2015. Spontaneous cell polarization: Feedback control of Cdc42 GTPase breaks cellular symmetry. *BioEssays.* 37:1193.
- Martin, S.W., L.M. Douglas, y J.B. Konopka. 2005. Cell cycle dynamics and quorum sensing in *Candida albicans* chlamydozoospores are distinct from budding and hyphal growth. *Eukaryot Cell.* 4:1191.
- Matsui, Y., y E.A. Toh. 1992. Yeast *RHO3* and *RHO4* ras superfamily genes are necessary for bud growth, and their defect is suppressed by a high dose of bud formation genes *CDC42* and *BEM1*. *Mol Cell Biol.* 12:5690.
- Mayer, F.L., D. Wilson, y B. Hube. 2013. *Candida albicans* pathogenicity mechanisms. *Virulence.* 4:119.
- Maza, P.K., A. Bonfim-Melo, A.C.B. Padovan, R.A. Mortara, C.M. Orikaza, L.M.D. Ramos, T.R. Moura, F.M. Soriani, R.S. Almeida, E. Suzuki, y D. Bahia. 2017. *Candida albicans*: The ability to invade epithelial cells and survive under oxidative stress is unlinked to hyphal length. *Front Microbiol.* 8:1235.
- Mazanka, E., J. Alexander, B.J. Yeh, P. Charoenpong, D.M. Lowery, M. Yaffe, y E.L. Weiss. 2008. The NDR/LATS family kinase Cbk1 directly controls transcriptional asymmetry. *PLoS Biol.* 6:e203.
- Mazanka, E., y E.L. Weiss. 2010. Sequential counteracting kinases restrict an asymmetric gene expression program to early G1. *Mol Biol Cell.* 21:2809.
- McCall, A.D., R.U. Pathirana, A. Prabhakar, P.J. Cullen, y M. Edgerton. 2019. *Candida albicans* biofilm development is governed by cooperative attachment and adhesion maintenance proteins. *NPJ Biofilms Microbiomes.* 5:21.
- McNemar, M.D., y W.A. Fonzi. 2002. Conserved serine/threonine kinase encoded by *CBK1* regulates expression of several hypha-associated transcripts and genes encoding cell wall proteins in *Candida albicans*. *J Bacteriol.* 184:2058.
- Miller, K.E., P.J. Kang, y H.O. Park. 2020. Regulation of Cdc42 for polarized growth in budding yeast. *Microb Cell.* 7:175.
- Miller, M.G., y A.D. Johnson. 2002. White-opaque switching in *Candida albicans* is controlled by mating-type locus homeodomain proteins and allows efficient mating. *Cell.* 110:293.
- Mosaddeghzadeh, N., y M.R. Ahmadian. 2021. The RHO family GTPases: mechanisms of regulation and signaling. *Cells.* 10:1831.
- Moses, A.M., J.K. Heriche, y R. Durbin. 2007. Clustering of phosphorylation site recognition motifs can be exploited to predict the targets of cyclin-dependent kinase. *Genome Biol.* 8:R23.
- Mulhern, S.M., M.E. Logue, y G. Butler. 2006. *Candida albicans* transcription factor Ace2 regulates metabolism and is required for filamentation in hypoxic conditions. *Eukaryot Cell.* 5:2001.
- Murad, A.M., P. Leng, M. Straffon, J. Wishart, S. Macaskill, D. MacCallum, N. Schnell, D. Talibi, D. Marechal, F. Tekaia, C. d'Enfert, C. Gaillardin, F.C. Odds, y A.J. Brown. 2001. *NRG1* represses yeast-hypha morphogenesis

Bibliografía

- and hypha-specific gene expression in *Candida albicans*. *EMBO J.* 20:4742.
- Nakano, K., T. Mutoh, R. Arai, y I. Mabuchi. 2003. The small GTPase Rho4 is involved in controlling cell morphology and septation in fission yeast. *Genes Cells.* 8:357.
- Nakayama, H., T. Mio, S. Nagahashi, M. Kokado, M. Arisawa, y Y. Aoki. 2000. Tetracycline-regulatable system to tightly control gene expression in the pathogenic fungus *Candida albicans*. *Infect Immun.* 68:6712.
- Nash, A.K., T.A. Auchtung, M.C. Wong, D.P. Smith, J.R. Gesell, M.C. Ross, C.J. Stewart, G.A. Metcalf, D.M. Muzny, R.A. Gibbs, N.J. Ajami, y J.F. Petrosino. 2017. The gut mycobiome of the Human Microbiome Project healthy cohort. *Microbiome.* 5:153.
- Nelson, B., C. Kurischko, J. Horecka, M. Mody, P. Nair, L. Pratt, A. Zougman, L.D. McBroom, T.R. Hughes, C. Boone, y F.C. Luca. 2003. RAM: a conserved signaling network that regulates Ace2p transcriptional activity and polarized morphogenesis. *Mol Biol Cell.* 14:3782.
- Nishida-Fukuda, H. 2019. The Exocyst: dynamic machine or static tethering complex? *BioEssays.* 41:e1900056.
- Nobile, C.J., y A.P. Mitchell. 2005. Regulation of cell-surface genes and biofilm formation by the *C. albicans* transcription factor Bcr1p. *Curr Biol.* 15:1150.
- Nobile, C.J., N. Solis, C.L. Myers, A.J. Fay, J.S. Deneault, A. Nantel, A.P. Mitchell, y S.G. Filler. 2008. *Candida albicans* transcription factor Rim101 mediates pathogenic interactions through cell wall functions. *Cell Microbiol.* 10:2180.
- Noble, S.M., B.A. Gianetti, y J.N. Witchley. 2017. *Candida albicans* cell-type switching and functional plasticity in the mammalian host. *Nat Rev Microbiol.* 15:96.
- O'Connell, C., M.T. Doolin, C. Taggart, F. Thornton, y G. Butler. 1999. Regulated nuclear localisation of the yeast transcription factor Ace2p controls expression of chitinase (*CTS1*) in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Gen Genet.* 262:275.
- Ofir, A., y D. Kornitzer. 2010. *Candida albicans* cyclin Clb4 carries S-phase cyclin activity. *Eukaryot Cell.* 9:1311.
- Otto, S.P., y T. Lenormand. 2002. Resolving the paradox of sex and recombination. *Nat Rev Genet.* 3:252.
- Pande, K., C. Chen, y S.M. Noble. 2013. Passage through the mammalian gut triggers a phenotypic switch that promotes *Candida albicans* commensalism. *Nat Genet.* 45:1088.
- Pappas, P.G., M.S. Lionakis, M.C. Arendrup, L. Ostrosky-Zeichner, y B.J. Kullberg. 2018. Invasive candidiasis. *Nat Rev Dis Primers.* 4:18026.
- Park, H.O., y E. Bi. 2007. Central roles of small GTPases in the development of cell polarity in yeast and beyond. *Microbiol Mol Biol Rev.* 71:48.
- Parker, B.W., G. Gogl, M. Balint, C. Hetenyi, A. Remenyi, y E.L. Weiss. 2020. Ndr/Lats kinases bind specific Mob-family coactivators through a conserved and modular Interface. *Biochemistry.* 59:1688.
- Pérez, P., E. Portales, y B. Santos. 2015. Rho4 interaction with exocyst and septins regulates cell separation in fission yeast. *Microbiology.* 161:948.
- Pérez, P., y S.A. Rincón. 2010. Rho GTPases: regulation of cell polarity and growth in yeasts. *Biochem J.* 426:243.
- Pesole, G., M. Lotti, L. Alberghina, y C. Saccone. 1995. Evolutionary origin of nonuniversal CUGSer codon in some *Candida* species as inferred from a molecular phylogeny. *Genetics.* 141:903.
- Polgar, N., y B. Fogelgren. 2018. Regulation of cell polarity by exocyst-mediated trafficking. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 10:a031401.
- Polke, M., y I.D. Jacobsen. 2017. Quorum sensing by farnesol revisited. *Curr Genet.* 63:791.
- Polke, M., I. Leonhardt, O. Kurzai, y I.D. Jacobsen. 2018. Farnesol signalling in *Candida albicans* - more than just communication. *Crit Rev Microbiol.* 44:230.
- Popp, C., B. Ramirez-Zavala, S. Schwanfelder, I. Kruger, y J. Morschhauser. 2019. Evolution of fluconazole-resistant *Candida albicans* strains by drug-induced mating competence and parasexual recombination. *mBio.* 10:e02740.
- Prasad, R., R. Nair, y A. Banerjee. 2019. Emerging mechanisms of drug resistance in *Candida albicans*. *Prog Mol Subcell Biol.* 58:135.
- Pruyne, D., y A. Bretscher. 2000. Polarization of cell growth in yeast. I. Establishment and maintenance of polarity

- states. *J Cell Sci.* 113:365.
- Pruyne, D., M. Evangelista, C. Yang, E. Bi, S. Zigmund, A. Bretscher, y C. Boone. 2002. Role of formins in actin assembly: nucleation and barbed-end association. *Science.* 297:612.
- Racki, W.J., A.M. Becam, F. Nasr, y C.J. Herbert. 2000. Cbk1p, a protein similar to the human myotonic dystrophy kinase, is essential for normal morphogenesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO J.* 19:4524.
- Ramage, G., S.P. Saville, B.L. Wickes, y J.L. Lopez-Ribot. 2002. Inhibition of *Candida albicans* biofilm formation by farnesol, a quorum-sensing molecule. *Appl Environ Microbiol.* 68:5459.
- Rasmussen, C.G., y N.L. Glass. 2005. A Rho-type GTPase, *rho-4*, is required for septation in *Neurospora crassa*. *Eukaryot Cell.* 4:1913.
- Reijnst, P., A. Walther, y J. Wendland. 2011. Dual-colour fluorescence microscopy using yEmCherry-/GFP-tagging of eisosome components Pil1 and Lsp1 in *Candida albicans*. *Yeast.* 28:331.
- Reuss, O., A. Vik, R. Kolter, y J. Morschhauser. 2004. The SAT1 flipper, an optimized tool for gene disruption in *Candida albicans*. *Gene.* 341:119.
- Riedl, J., A.H. Crevenna, K. Kessenbrock, J.H. Yu, D. Neukirchen, M. Bista, F. Bradke, D. Jenne, T.A. Holak, Z. Werb, M. Sixt, y R. Wedlich-Soldner. 2008. Lifeact: a versatile marker to visualize F-actin. *Nat Methods.* 5:605.
- Riquelme, M., y E. Sánchez-León. 2014. The Spitzenkörper: a choreographer of fungal growth and morphogenesis. *Curr Opin Microbiol.* 20:27.
- Risselada, H.J., y A. Mayer. 2020. SNAREs, tethers and SM proteins: how to overcome the final barriers to membrane fusion? *Biochem J.* 477:243.
- Rock, J.M., y A. Amon. 2009. The FEAR network. *Curr Biol.* 19:R1063.
- Rodrigues, C.F., y L. Cernakova. 2020. Farnesol and tyrosol: secondary metabolites with a crucial quorum-sensing role in *Candida* biofilm development. *Genes (Basel).* 11:444.
- Rodriguez, D.L., M.M. Quail, A.D. Hernday, y C.J. Nobile. 2020. Transcriptional circuits regulating developmental processes in *Candida albicans*. *Front Cell Infect Microbiol.* 10:605711.
- Rojo-Domínguez, E.P. 2018. Señalización por NDR quinasas en la interacción patógeno-hospedador. Tesis Doctoral. Universidad de Extremadura (UNEX).
- Rollenhagen, C., S. Mamtani, D. Ma, R. Dixit, S. Eszterhas, y S.A. Lee. 2020. The role of secretory pathways in *Candida albicans* pathogenesis. *J Fungi (Basel).* 6:26.
- Rosati, D., M. Bruno, M. Jaeger, J. Ten Oever, y M.G. Netea. 2020. Recurrent vulvovaginal candidiasis: An immunological perspective. *Microorganisms.* 8:144.
- Ruby, J., y J. Barbeau. 2002. The buccale puzzle: The symbiotic nature of endogenous infections of the oral cavity. *Can J Infect Dis.* 13:34.
- Sanglard, D. 2019. Finding the needle in a haystack: Mapping antifungal drug resistance in fungal pathogen by genomic approaches. *PLoS Pathog.* 15:e1007478.
- Santos, B., J. Gutiérrez, T.M. Calonge, y P. Pérez. 2003. Novel Rho GTPase involved in cytokinesis and cell wall integrity in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Eukaryot Cell.* 2:521.
- Santos, B., A.B. Martín-Cuadrado, C.R. Vázquez de Aldana, F. del Rey, y P. Pérez. 2005. Rho4 GTPase is involved in secretion of glucanases during fission yeast cytokinesis. *Eukaryot Cell.* 4:1639.
- Saputo, S., Y. Chabrier-Rosello, F.C. Luca, A. Kumar, y D.J. Krysan. 2012. The RAM network in pathogenic fungi. *Eukaryot Cell.* 11:708.
- Saputo, S., A. Kumar, y D.J. Krysan. 2014. Efg1 directly regulates ACE2 expression to mediate cross talk between the cAMP/PKA and RAM pathways during *Candida albicans* morphogenesis. *Eukaryot Cell.* 13:1169.
- Saputo, S., K.L. Norman, T. Murante, B.N. Horton, L. Diaz Jde, L. DiDone, J. Colquhoun, J.W. Schroeder, L.A. Simmons, A. Kumar, y D.J. Krysan. 2016. Complex haploinsufficiency-based genetic analysis of the NDR/Lats kinase Cbk1 provides insight into its multiple functions in *Candida albicans*. *Genetics.* 203:1217.
- Satala, D., J. Karkowska-Kuleta, A. Zelazna, M. Rapala-Kozik, y A. Kozik. 2020. Moonlighting proteins at the candidal cell surface. *Microorganisms.* 8:1046.
- Saville, S.P., A.L. Lazzell, C. Monteagudo, y J.L. Lopez-Ribot. 2003. Engineered control of cell morphology in vivo

Bibliografía

- reveals distinct roles for yeast and filamentous forms of *Candida albicans* during infection. *Eukaryot Cell*. 2:1053.
- Sbia, M., E.J. Parnell, Y. Yu, A.E. Olsen, K.L. Kretschmann, W.P. Voth, y D.J. Stillman. 2008. Regulation of the yeast Ace2 transcription factor during the cell cycle. *J Biol Chem*. 283:11135.
- Schaub, Y., A. Dunkler, A. Walther, y J. Wendland. 2006. New pFA-cassettes for PCR-based gene manipulation in *Candida albicans*. *J Basic Microbiol*. 46:416.
- Sellam, A., y M. Whiteway. 2016. Recent advances on *Candida albicans* biology and virulence. *F1000Res*. 5:2582.
- Shahana, S., D.S. Childers, E.R. Ballou, I. Bohovych, F.C. Odds, N.A. Gow, y A.J. Brown. 2014. New Clox Systems for rapid and efficient gene disruption in *Candida albicans*. *PLoS One*. 9:e100390.
- Shen, J., L.E. Cowen, A.M. Griffin, L. Chan, y J.R. Kohler. 2008. The *Candida albicans* *pescadillo* homolog is required for normal hypha-to-yeast morphogenesis and yeast proliferation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 105:20918.
- Sheu, Y.J., B. Santos, N. Fortin, C. Costigan, y M. Snyder. 1998. Spa2p interacts with cell polarity proteins and signaling components involved in yeast cell morphogenesis. *Mol Cell Biol*. 18:4053.
- Shou, W., J.H. Seol, A. Shevchenko, C. Baskerville, D. Moazed, Z.W. Chen, J. Jang, A. Shevchenko, H. Charbonneau, y R.J. Deshaies. 1999. Exit from mitosis is triggered by Tem1-dependent release of the protein phosphatase Cdc14 from nucleolar RENT complex. *Cell*. 97:233.
- Simanis, V. 2015. Pombe's thirteen - control of fission yeast cell division by the septation initiation network. *J Cell Sci*. 128:1465.
- Sinha, I., Y.M. Wang, R. Philp, C.R. Li, W.H. Yap, y Y. Wang. 2007. Cyclin-dependent kinases control septin phosphorylation in *Candida albicans* hyphal development. *Dev Cell*. 13:421.
- Song, Y., S.A. Cheon, K.E. Lee, S.Y. Lee, B.K. Lee, D.B. Oh, H.A. Kang, y J.Y. Kim. 2008. Role of the RAM network in cell polarity and hyphal morphogenesis in *Candida albicans*. *Mol Biol Cell*. 19:5456.
- Spellman, P.T., G. Sherlock, M.Q. Zhang, V.R. Iyer, K. Anders, M.B. Eisen, P.O. Brown, D. Botstein, y B. Futcher. 1998. Comprehensive identification of cell cycle-regulated genes of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* by microarray hybridization. *Mol Biol Cell*. 9:3273.
- Stark, C., B.J. Breitkreutz, T. Reguly, L. Boucher, A. Breitkreutz, y M. Tyers. 2006. BioGRID: a general repository for interaction datasets. *Nucleic Acids Res*. 34:D535.
- Sudbery, P., N. Gow, y J. Berman. 2004. The distinct morphogenic states of *Candida albicans*. *Trends Microbiol*. 12:317.
- Sudbery, P.E. 2011. Growth of *Candida albicans* hyphae. *Nat Rev Microbiol*. 9:737.
- Sullivan, D.S., S. Biggins, y M.D. Rose. 1998. The yeast centrin, Cdc31p, and the interacting protein kinase, Kic1p, are required for cell integrity. *J Cell Biol*. 143:751.
- Taff, H.T., K.F. Mitchell, J.A. Edward, y D.R. Andes. 2013. Mechanisms of *Candida* biofilm drug resistance. *Future Microbiol*. 8:1325.
- Taheri-Talesh, N., Y. Xiong, y B.R. Oakley. 2012. The functions of myosin II and myosin V homologs in tip growth and septation in *Aspergillus nidulans*. *PLoS One*. 7:e31218.
- Talapko, J., M. Juzbasic, T. Matijevic, E. Pustijanac, S. Bekic, I. Kotris, y I. Skrlec. 2021. *Candida albicans*-The virulence factors and clinical manifestations of infection. *J Fungi (Basel)*. 7:79.
- Talapko, J., y I. Skrlec. 2020. The principles, mechanisms, and benefits of unconventional agents in the treatment of biofilm infection. *Pharmaceuticals (Basel)*. 13:299.
- Tao, L., H. Du, G. Guan, Y. Dai, C.J. Nobile, W. Liang, C. Cao, Q. Zhang, J. Zhong, y G. Huang. 2014. Discovery of a "white-gray-opaque" tristable phenotypic switching system in *Candida albicans*: roles of non-genetic diversity in host adaptation. *PLoS Biol*. 12:e1001830.
- Tay, Y.D., M. Leda, C. Spanos, J. Rappsilber, A.B. Goryachev, y K.E. Sawin. 2019. Fission yeast NDR/LATS kinase Orb6 regulates exocytosis via phosphorylation of the exocyst complex. *Cell Rep*. 26:1654.
- Tcheperegine, S.E., X.D. Gao, y E. Bi. 2005. Regulation of cell polarity by interactions of Msb3 and Msb4 with Cdc42 and polarisome components. *Mol Cell Biol*. 25:8567.
- Tsui, C., E.F. Kong, y M.A. Jabra-Rizk. 2016. Pathogenesis of *Candida albicans* biofilm. *Pathog Dis*. 74:ftw018.

- Ushinsky, S.C., D. Harcus, J. Ash, D. Dignard, A. Marcil, J. Morchhauser, D.Y. Thomas, M. Whiteway, y E. Leberer. 2002. *CDC42* is required for polarized growth in human pathogen *Candida albicans*. *Eukaryot Cell*. 1:95.
- van het Hoog, M., T.J. Rast, M. Martchenko, S. Grindle, D. Dignard, H. Hogues, C. Cuomo, M. Berriman, S. Scherer, B.B. Magee, M. Whiteway, H. Chibana, A. Nantel, y P.T. Magee. 2007. Assembly of the *Candida albicans* genome into sixteen supercontigs aligned on the eight chromosomes. *Genome Biol*. 8:R52.
- van Wijlick, L., M. Swidergall, P. Brandt, y J.F. Ernst. 2016. *Candida albicans* responds to glycostructure damage by Ace2-mediated feedback regulation of Cek1 signaling. *Mol Microbiol*. 102:827.
- VandenBerg, A.L., A.S. Ibrahim, J.E. Edwards, Jr., K.A. Toenjes, y D.I. Johnson. 2004. Cdc42p GTPase regulates the budded-to-hyphal-form transition and expression of hypha-specific transcripts in *Candida albicans*. *Eukaryot Cell*. 3:724.
- Vázquez de Aldana, C.R., y J. Correa-Bordes. 2012. Integrating Cdk signaling in *Candida albicans* environmental sensing networks. In *Morphogenesis and Pathogenicity in Fungi*. Vol. 22. J. Pérez-Martín y A. Di Pietro, editors. Springer Verlag. 81.
- Vernay, A., S. Schaub, I. Guillas, M. Bassilana, y R.A. Arkowitz. 2012. A steep phosphoinositide bis-phosphate gradient forms during fungal filamentous growth. *J Cell Biol*. 198:711.
- Vicente-Soler, J., T. Soto, A. Franco, J. Cansado, y M. Madrid. 2021. The multiple functions of Rho GTPases in fission yeasts. *Cells*. 10:1422.
- Vila, T., A.S. Sultan, D. Montelongo-Jauregui, y M.A. Jabra-Rizk. 2020. Oral Candidiasis: A disease of opportunity. *J Fungi (Basel)*. 6:15.
- Villa, S., M. Hamideh, A. Weinstock, M.N. Qasim, T.R. Hazbun, A. Sellam, A.D. Hernday, y S. Thangamani. 2020. Transcriptional control of hyphal morphogenesis in *Candida albicans*. *FEMS Yeast Res*. 20:foaa005.
- Visintin, R., K. Craig, E.S. Hwang, S. Prinz, M. Tyers, y A. Amon. 1998. The phosphatase Cdc14 triggers mitotic exit by reversal of Cdk-dependent phosphorylation. *Mol Cell*. 2:709.
- Wadhwa, R., P. Pandey, G. Gupta, T. Aggarwal, N. Kumar, M. Mehta, S. Satija, M. Gulati, J.R. Madan, H. Dureja, S.R. Balusamy, H. Perumalsamy, P.K. Maurya, T. Collet, M.M. Tambuwala, P.M. Hansbro, D.K. Chellappan, y K. Dua. 2019. Emerging complexity and the need for advanced drug delivery in targeting *Candida* species. *Curr Top Med Chem*. 19:2593.
- Wakade, R.S., y D.J. Krysan. 2021. The Cbk1-Ace2 axis guides *Candida albicans* from yeast to hyphae and back again. *Curr Genet*. 67:461.
- Wakade, R.S., L.C. Ristow, M.A. Stamnes, A. Kumar, y D.J. Krysan. 2020. The Ndr/LATS Kinase Cbk1 regulates a specific subset of Ace2 functions and suppresses the Hypha-to-Yeast transition in *Candida albicans*. *mBio*. 11:e01900.
- Wall, G., D. Montelongo-Jauregui, B. Vidal Bonifacio, J.L. Lopez-Ribot, y P. Uppuluri. 2019. *Candida albicans* biofilm growth and dispersal: contributions to pathogenesis. *Curr Opin Microbiol*. 52:1.
- Walther, A., y J. Wendland. 2003. An improved transformation protocol for the human fungal pathogen *Candida albicans*. *Curr Genet*. 42:339.
- Wang, A., P.P. Raniga, S. Lane, Y. Lu, y H. Liu. 2009. Hyphal chain formation in *Candida albicans*: Cdc28-Hgc1 phosphorylation of Efg1 represses cell separation genes. *Mol Cell Biol*. 29:4406.
- Wang, H., Z.X. Huang, J.Y. Au Yong, H. Zou, G. Zeng, J. Gao, Y. Wang, A.H. Wong, y Y. Wang. 2016. CDK phosphorylates the polarisome scaffold Spa2 to maintain its localization at the site of cell growth. *Mol Microbiol*. 101:250.
- Warena, A.J., y J.B. Konopka. 2002. Septin function in *Candida albicans* morphogenesis. *Mol Biol Cell*. 13:2732.
- Weiner, A., F. Orange, S. Lacas-Gervais, K. Rechav, V. Ghugtyal, M. Bassilana, y R.A. Arkowitz. 2019. On-site secretory vesicle delivery drives filamentous growth in the fungal pathogen *Candida albicans*. *Cell Microbiol*. 21:e12963.
- Weirich, C.S., J.P. Erzberger, y Y. Barral. 2008. The septin family of GTPases: architecture and dynamics. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 9:478.
- Weiss, E.L. 2012. Mitotic exit and separation of mother and daughter cells. *Genetics*. 192:1165.
- Weiss, E.L., C. Kurischko, C. Zhang, K. Shokat, D.G. Drubin, y F.C. Luca. 2002. The *Saccharomyces cerevisiae*

Bibliografía

- Mob2p-Cbk1p kinase complex promotes polarized growth and acts with the mitotic exit network to facilitate daughter cell-specific localization of Ace2p transcription factor. *J Cell Biol.* 158:885.
- Wendland, J., Y. Ayad-Durieux, P. Knechtle, C. Rebischung, y P. Philippsen. 2000. PCR-based gene targeting in the filamentous fungus *Ashbya gossypii*. *Gene.* 242:381.
- Wennerberg, K., y C.J. Der. 2004. Rho-family GTPases: it's not only Rac and Rho (and I like it). *J Cell Sci.* 117:1301.
- Whiteway, M., y C. Bachewich. 2007. Morphogenesis in *Candida albicans*. *Annu Rev Microbiol.* 61:529.
- Willger, S.D., Z. Liu, R.A. Olarte, M.E. Adamo, J.E. Stajich, L.C. Myers, A.N. Kettenbach, y D.A. Hogan. 2015. Analysis of the *Candida albicans* phosphoproteome. *Eukaryot Cell.* 14:474.
- Williams, D.W., R.P. Jordan, X.Q. Wei, C.T. Alves, M.P. Wise, M.J. Wilson, y M.A. Lewis. 2013. Interactions of *Candida albicans* with host epithelial surfaces. *J Oral Microbiol.* 5:22434.
- Wilson, D., J.R. Naglik, y B. Hube. 2016. The missing link between *Candida albicans* hyphal morphogenesis and host cell damage. *PLoS Pathog.* 12:e1005867.
- Wilson, R.B., D. Davis, y A.P. Mitchell. 1999. Rapid hypothesis testing with *Candida albicans* through gene disruption with short homology regions. *J Bacteriol.* 181:1868.
- Wongsuk, T., P. Pumeesat, y N. Luplertlop. 2016. Fungal quorum sensing molecules: Role in fungal morphogenesis and pathogenicity. *J Basic Microbiol.* 56:440.
- Woods, B., y D.J. Lew. 2019. Polarity establishment by Cdc42: Key roles for positive feedback and differential mobility. *Small GTPases.* 10:130.
- Xie, J.L., N. Grahl, T. Sless, M.D. Leach, S.H. Kim, D.A. Hogan, N. Robbins, y L.E. Cowen. 2016. Signaling through Lrg1, Rho1 and Pkc1 governs *Candida albicans* morphogenesis in response to diverse cues. *PloS Genet.* 12:e1006405.
- Xie, J.L., L. Qin, Z. Miao, B.T. Grysb, J.C. Diaz, K. Ting, J.R. Krieger, J. Tong, K. Tan, M.D. Leach, T. Ketela, M.F. Moran, D.J. Krysan, C. Boone, B.J. Andrews, A. Selmecki, K. Ho Wong, N. Robbins, y L.E. Cowen. 2017. The *Candida albicans* transcription factor Cas5 couples stress responses, drug resistance and cell cycle regulation. *Nat Commun.* 8:499.
- Xie, Y., Z.Y. Loh, J. Xue, F. Zhou, J. Sun, Z. Qiao, S. Jin, Y. Deng, H. Li, Y. Wang, L. Lu, Y. Gao, y Y. Miao. 2020. Orchestrated actin nucleation by the *Candida albicans* polarisome complex enables filamentous growth. *J Biol Chem.* 295:14840.
- Xie, Y., y Y. Miao. 2021. Polarisome assembly mediates actin remodeling during polarized yeast and fungal growth. *J Cell Sci.* 134:jcs247916.
- Yang, Y., y N.N. Margam. 2021. Structural insights into membrane fusion mediated by convergent small fusogens. *Cells.* 10:160.
- Yano, J., J.D. Sobel, P. Nyirjesy, R. Sobel, V.L. Williams, Q. Yu, M.C. Noverr, y P.L. Fidel, Jr. 2019. Current patient perspectives of vulvovaginal candidiasis: incidence, symptoms, management and post-treatment outcomes. *BMC Womens Health.* 19:48.
- Yue, P., Y. Zhang, K. Mei, S. Wang, J. Lesigang, Y. Zhu, G. Dong, y W. Guo. 2017. Sec3 promotes the initial binary t-SNARE complex assembly and membrane fusion. *Nat Commun.* 8:14236.
- Zeng, J., S. Feng, B. Wu, y W. Guo. 2017. Polarized exocytosis. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 9:a027870.
- Zhang, J., G.A. Smolen, y D.A. Haber. 2008. Negative regulation of YAP by LATS1 underscores evolutionary conservation of the *Drosophila Hippo* pathway. *Cancer Res.* 68:2789.
- Zheng, X., Y. Wang, y Y. Wang. 2004. Hgc1, a novel hypha-specific G1 cyclin-related protein regulates *Candida albicans* hyphal morphogenesis. *EMBO J.* 23:1845.
- Zheng, X.D., R.T. Lee, Y.M. Wang, Q.S. Lin, y Y. Wang. 2007. Phosphorylation of Rga2, a Cdc42 GAP, by CDK/Hgc1 is crucial for *Candida albicans* hyphal growth. *EMBO J.* 26:3760.
- Zheng, X.D., Y.M. Wang, y Y. Wang. 2003. CaSPA2 is important for polarity establishment and maintenance in *Candida albicans*. *Mol Microbiol.* 49:1391.