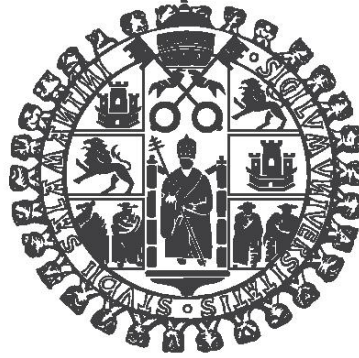


UNIVERSIDAD DE SALAMANCA

DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA Y GENÉTICA



**Caracterización fenotípica y transcripcional de
mutantes afectados en la N-glicosilación de
proteínas en el patógeno *Candida albicans***

CARLOS CÍVICOS VILLA

2014

Dr. Luis Román Fernández Lago, director del Departamento de Microbiología y Genética de la Universidad de Salamanca

CERTIFICA QUE:

La memoria titulada "Caracterización fenotípica y transcripcional de mutantes afectados en la N-glicosilación de proteínas en el patógeno *Candida albicans*." presentada por el Ldo. Carlos Cívicos Villa para optar al título de Doctor Europeus, ha sido realizada bajo la dirección de la Dra. M^a del Carmen López Cuesta y el Dr. Ángel Domínguez Olavarri en el Departamento de Microbiología y Genética de la Universidad de Salamanca.

Y para que así conste, expide y firma la siguiente certificación en Salamanca a 22 de Abril de 2014

Fdo. Dr. Luis Román Fernández Lago

Dra. M^a del Carmen López Cuesta, profesora titular de Microbiología de la Universidad de Salamanca, y el Dr. Ángel Domínguez Olavarri, Catedrático de Microbiología de la Universidad de Salamanca,

CERTIFICAN QUE:

La memoria titulada "Caracterización fenotípica y transcripcional de mutantes afectados en la N-glicosilación de proteínas en el patógeno *Candida albicans*." presentada por el Ldo. Carlos Cívicos Villa para optar al título de Doctor Europeus, ha sido realizada bajo la dirección de la Dra. M^a del Carmen López Cuesta, y del Dr. Ángel Domínguez Olavarri en el Departamento de Microbiología y Genética de la Universidad de Salamanca.

Y para autorizar su presentación y evaluación por el tribunal correspondiente firman la presente certificación en Salamanca a 22 de Abril de 2014

Fdo. Dra. M^a Del Carmen López Cuesta

Fdo. Dr. Ángel Domínguez Olavarri

Este trabajo ha sido financiado por los proyectos:

“Glycoshield: surface modulation of the fungal and host response using a genomic approach”. Proyectos de investigación en el marco de las redes del Espacio Europeo de Investigación (esquema ERA-NET). GEN2006-27775-C2-E/PAT

Junta de Castilla y León: “Histona acetiltransferasas en *Candida albicans*: efecto sobre dimorfismo y virulencia. Una aproximación Post-genómica” (SA141A08)

Y cofinanciado por:

Ayuda destinada a financiar la contratación de personal investigador de reciente titulación universitaria, en el marco de la Estrategia Regional de Investigación Científica, Desarrollo Tecnológico e Innovación 2007-2013 cofinanciadas por el Fondo Social Europeo. Junta de Castilla y León.



El futuro tiene muchos nombres. Para los débiles es lo inalcanzable. Para los temerosos, lo desconocido. Para los valientes es la oportunidad.

Hugo, Victor

AGRADECIMIENTOS

Deseo expresar mi más sincero agradecimiento a todas las personas que de una u otra forma han contribuido a la realización de este trabajo:

A mis directores M^a del Carmen y Ángel por darme la oportunidad de formar parte de su equipo, por su orientación y por su dedicación.

A todos los miembros que pertenecen o han pertenecido de una u otra forma al grupo ADO: Laura, Ahmad, Zahra, Esperanza, Juan, Azul, Adán, Cristina, Raquel, Rosario, Zuzana, Sylvia, Miguel y Javi. Por todos esos buenos y malos momentos vividos juntos. Sin vuestra ayuda y consejo, esto se habría hecho mucho más difícil.

A los miembros del grupo de trabajo "AG Ernst", por lo bien que me acogieron desde el primer hasta el último día.

A mis compañeros Laura, Nacho, Nagore, Mari y Marta por todos los ratos del café de media mañana que hemos pasado juntos en los que arreglábamos el mundo.

A todos los becarios/doctores del antiguo IMB (actual IBFG) por esas cenas multitudinarias en las que lo hemos pasado genial.

A toda la plantilla de cocina, secuenciación, proteómica, animalario, radiactivos y administración. Porque siempre habéis estado para echar una mano cuando hacía falta.

No quisiera olvidar a todas las personas ajenas a mi trabajo que me han estado apoyando en todos los momentos malos y han disfrutado conmigo los momentos buenos: Paco, Fran, Adame, Chete, Domin, Arturo, ... y un largo etcétera.

A Sonia, por haber estado en todos y cada uno de los momentos en los que la he necesitado (y en los que no), tanto en la distancia como en la cercanía: por fin Rubi!!!!

Por último a mi familia, especialmente a mis padres y a mi hermana. Porque ellos han sufrido conmigo todas y cada una de las etapas de mi vida que me han permitido llegar hasta donde estoy.

A TODOS VOSOTROS MUCHÍSMAS GRACIAS

INDICE

INTRODUCCIÓN.....	1
1.- <i>Candida albicans</i>	1
1.1.- CARACTERÍSTICAS GENERALES	1
1.2.- <i>C. albicans</i> COMO AGENTE PATÓGENO	3
1.2.1.- Antifúngicos.....	3
1.3.- VARIACIONES MORFOLÓGICAS DE <i>C. albicans</i>	6
1.4.- TRANSICIÓN LEVADURA-HIFA EN <i>C. albicans</i>	8
1.4.1.- Cambios en la polaridad durante los procesos morfogénicos	9
1.4.2.- Factores ambientales que inducen la miceliación	11
1.4.3.- Rutas de transducción de señales de la transición dimórfica.....	12
1.4.4.- Rutas de respuesta a estrés y su relación con la diferenciación morfológica.....	16
1.4.5.- Expresión génica diferencial durante la transición levadura-Hifa	18
2.- GLICOPROTEÍNAS Y PARED CELULAR	19
2.1- Quitina y glucanos.....	20
2.2.- Proteínas de la pared celular.....	21
2.2.1.- Proteínas GPI.....	21
2.2.2.- Proteínas Pir	22
2.3.- Lípidos de la pared celular	22
3.- PROCESOS DE N-GLICOSILACIÓN	23
3.1.- N-glicosilación en el RE	23
3.2.- N-glicosilación en el complejo de Golgi.....	25
3.3.- Fenotipos de los mutantes delecionados en genes que codifican manosil transferasas que actúan en el complejo de Golgi.....	28
OBJETIVOS.....	31
MATERIALES Y MÉTODOS.....	33
1.- CEPAS Y CEBADORES UTILIZADOS	33
2.- PLÁSMIDOS UTILIZADOS	35
2.1.- pGEM-T Easy	35

2.2.- pSNC1	35
2.3.- pLC14.....	36
2.4.- pAG1	36
2.5.- pBI-SM [MP K12]	37
2.6.- pMR.....	38
3.- MEDIOS DE CULTIVO Y CONDICIONES DE CRECIMIENTO	39
3.1.- Medios de cultivo de <i>C. albicans</i>	39
3.1.1.- <i>Crecimiento en forma de levadura</i>	39
3.1.2.- <i>Inducción de la formación de micelio en medio sólido</i>	40
3.1.3.- <i>Inducción de la formación de micelio en medio líquido</i>	41
3.2.- Cultivo de <i>Escherichia coli</i>	41
4.- MANTENIMIENTO DE LOS MICROORGANISMOS	42
5.- ANALISIS DE LA SENSIBILIDAD A COMPUESTOS QUE AFECTAN A LA ESTRUCTURA DE LA PARED CELULAR	42
5.1.- Análisis de sensibilidad en placa.....	42
5.2.- Ensayo de afinidad a “Alcian Blue”.....	42
5.3.- Análisis de sensibilidad a peróxido de hidrógeno.....	43
6.- ENSAYOS DE VIRULENCIA.....	43
7.- TRANSFORMACIONES	44
7.1.- Transformación de <i>E. coli</i>	44
7.2.- Transformación de <i>C. albicans</i>	44
8.- TÉCNICAS DE MANIPULACIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS	45
8.1.- Purificación de DNA plasmídico de <i>E. Coli</i>	45
8.2.- Purificación de DNA cromosómico de levaduras.....	45
8.3.- Aislamiento y purificación de RNA total de levaduras.....	46
8.4.- Valoración de la concentración de ácidos nucleicos.....	46
8.5.- Digestión de DNA con endonucleasas de restricción	47
8.6.- Electroforesis de DNA en geles de agarosa	47
8.7.- Tratamiento con fosfatasa alcalina (CIAP)	48
8.8.- Construcción de plásmidos recombinantes	48
8.9.- Reacción de amplificación de DNA (PCR)	48
8.10.- Purificación de fragmentos de DNA	49
8.11.- Secuenciación de DNA	49
8.12.- Hibridación de ácidos nucleicos.....	50
8.12.1.- <i>Marcaje radiactivo de sondas de DNA</i>	50
8.12.2.- <i>Detección de secuencias de DNA específicas (Southern-blot)</i>	50
8.12.3.- <i>Detección de secuencias específicas de RNA (Northern-blot)</i>	51

8.13.- PCR Cuantitativa.....	52
8.13.1- Preparación de la reacción.....	53
8.13.2 Cuantificación relativa frente a un gen de referencia: normalización.	53
8.13.3 Cálculo de la eficiencia mediante una dilución seriada.	54
8.13.4 Tratamiento estadístico de los datos.	55
8.13.5 Eficiencia.....	55
8.13.6 Normalización frente a actina: nivel relativo de transcripción.	55
9.- TÉCNICAS DE MANIPULACIÓN DE PROTEÍNAS.....	55
9.1.- Preparación de extractos celulares	55
9.2.- Western-blotting.....	56
10.- COMPARACIÓN DE PERFILES DE TRANSCRIPCIÓN MEDIANTE MICROMATRICES DE DNA.....	57
10.1.- Introducción	57
10.1.1.- Diseño y síntesis de oligonucleótidos.	57
10.1.2.- Impresión robótica en slides de cristal.	57
10.2.- Preparación de la sonda de cDNA marcado.....	58
10.2.1.- Aislamiento de RNA total.....	58
10.2.2.- Síntesis y purificación de cDNA marcado	58
10.2.3.- Anillamiento de primers	58
10.2.4.- Reacción de extensión	58
10.2.5.- Purificación del cDNA marcado	59
10.2.6.- Concentración	59
10.2.7.- Hibridación y lavado de micromatrices.....	60
10.3.- Adquisición de imágenes	60
10.4.- Análisis de los datos obtenidos	61
10.4.1.- Identificación de los genes expresados diferencialmente.	61
10.4.2.- Análisis de las categorías funcionales asociadas a expresión diferencial.....	63
10.4.3.- Comparación de datos de expresión diferencial en condiciones múltiples.	63
11.- OTROS PROGRAMAS DE OBTENCIÓN Y TRATAMIENTO INFORMÁTICO DE DATOS.....	64
Resultados I: El gen <i>MNN9</i> de <i>Candida albicans</i>	65
1.- ANÁLISIS BIOINFORMÁTICO DE LA SECUENCIA DEL GEN <i>MNN9</i>	65
1.1.- Análisis de la región 5' no codificante.....	65
1.2.- Análisis de la región 3' no codificante.....	66

1.3.- Estudio de la región codificante	67
1.4.- Análisis de la secuencia aminoacídica de Mnn9p.....	68
1.5.- Análisis bioinformático de la interacción de la proteína Mnn9p con otras proteínas	70
1.6.- Análisis de la sintenia de <i>MNN9</i>	70
2.- COMPROBACIÓN DE LA CEPA DELECCIONADA EN EL GEN <i>MNN9</i>	71
3.- LOCALIZACIÓN SUBCELULAR DE LA PROTEÍNA Mnn9p.....	72
4.- EFECTOS DE LA DELECCIÓN DE <i>MNN9</i> EN LA MORFOLOGÍA CELULAR Y EL CRECIMIENTO	74
4.1.- Crecimiento en medio líquido a 28°C	74
4.1.1.- Observaciones al microscopio óptico	74
4.1.2.- Curva de crecimiento en medio líquido a 28°C	75
4.2.- Crecimiento en medio sólido a 42°C.....	77
5.- EFECTO DE LA DELECCIÓN DE <i>MNN9</i> EN FILAMENTACIÓN.....	78
5.1.- Análisis de la capacidad de filamentación en medios sólidos.....	78
5.2.- Análisis de la capacidad de filamentación en medio líquido	79
5.3.- Análisis de la capacidad invasiva.....	80
5.4.- Crecimiento en condiciones de hipoxia	81
5.5.- Formación de clamidosporas.....	81
5.6.- Formación de biopelículas	82
6.- EFECTOS CAUSADOS POR LA AUSENCIA DE <i>MNN9</i> SOBRE LA INTEGRIDAD DE LA SUPERFICIE CELULAR.....	83
7.- EFECTOS CAUSADOS POR LA AUSENCIA DE <i>MNN9</i> SOBRE LA CAPACIDAD DE CRECIMIENTO A PARTIR DE DISTINTAS FUENTES DE CARBONO.....	85
8.- ESTUDIOS DE COMPLEMENTACIÓN DE <i>mnn9Δ</i>	86
9.- EFECTO DE LA DELECCIÓN DEL GEN SOBRE LA VIRULENCIA	88
10.- EFECTO DE LA DELECCIÓN DEL GEN <i>MNN9</i> SOBRE LA GLICOSILACIÓN DE UNA PROTEÍNA DE REFERENCIA	89
11.- EFECTO DE LA DELECCIÓN DEL GEN SOBRE EL ESTADO DE ACTIVACIÓN DE LAS RUTAS MAPK.....	92
12.- EXPRESIÓN DEL GEN <i>MNN9</i> EN CAI4.....	94
Resultados II: El gen <i>MNN1</i> de <i>Candida albicans</i>	95
1.- ANÁLISIS DE LA SECUENCIA DEL GEN <i>MNN1</i>	95
1.1.- Análisis de la región 5' no codificante.....	95
1.2.- Análisis de la región 3' no codificante.....	95
1.3.- Estudio de la región codificante	96

1.4.- Análisis de la secuencia aminoacídica de Mnn1p.....	98
1.5.- Análisis bioinformático de la interacción de la proteína Mnn1p con otras proteínas	100
1.6.- Análisis de la sintenia de <i>MNN1</i>	100
2.- CONSTRUCCIÓN DEL MUTANTE <i>mnn1Δ</i>	101
3.- EFECTOS DE LA DELECIÓN DE <i>MNN1</i> EN LA MORFOLOGÍA CELULAR.....	102
3.1.- Curva de crecimiento en medio líquido a 28°C.....	103
3.2.- Crecimiento en medios sólidos a 42°C.....	103
4.- EFECTO DE LA DELECIÓN DE <i>MNN1</i> EN FILAMENTACIÓN.....	103
4.1.- Análisis de la capacidad de filamentación en medios sólidos.....	103
4.2.- Análisis de la capacidad de filamentación en medio líquido	104
4.3.- Análisis de la capacidad invasiva.....	104
4.4.- Crecimiento en condiciones de hipoxia	105
4.5.- Formación de clamidosporas.....	106
5.- EFECTOS CAUSADOS POR LA AUSENCIA DE <i>MNN1</i> SOBRE LA INTEGRIDAD DE LA SUPERFICIE CELULAR	106
6.- EFECTO DE LA DELECIÓN DEL GEN SOBRE LA VIRULENCIA	108
7.- EFECTO DE LA DELECIÓN DEL GEN <i>MNN1</i> SOBRE LA GLICOSILACIÓN DE UNA PROTEÍNA DE REFERENCIA	108
8.- EFECTO DE LA DELECIÓN DEL GEN SOBRE EL ESTADO DE ACTIVACIÓN DE LAS RUTAS MAPK.....	109
 Resultados III: Perfiles transcripcionales	 111
 1.-PERFIL TRANSCRIPCIONAL DE LAS CEPAS <i>mnn9Δ</i> y <i>mnn1Δ</i>	 111
1.1.- Generalidades del perfil transcripcional del mutante <i>mnn9Δ</i>	111
1.2.- Generalidades del perfil transcripcional del mutante <i>mnn1Δ</i>	115
1.3.- Análisis de los genes diferencialmente expresados en los mutantes <i>mnn9Δ</i> y <i>mnn1Δ</i>	118
1.3.1.- Genes desregulados que codifican proteínas potencialmente <i>N-Glicosiladas</i>	118
1.3.2.- Genes desregulados implicados en <i>N-glicosilación en el complejo de Golgi</i>	119
1.3.3.- Genes desregulados que codifican proteínas asociadas a superficie celular.....	120
1.3.4.- Genes de rutas de filamentación y específicos de hifa.....	127
1.3.5.- Genes implicados en el metabolismo energético	131
1.3.6.- Visión general de los genes desregulados en varias condiciones.....	134

DISCUSIÓN.....	137
CONCLUSIONES.....	151
BIBLIOGRAFÍA.....	153
MATERIAL SUPLEMENTARIO	169
RESUMEN EN INGLÉS	171

ABREVIATURAS

5' FOA	Ácido 5-fluoroorótico
BSA	Albúmina sérica bovina
CGD	Candida Genome Database
Cy3	Cianina 3-dCTP
Cy5	Cianina 5-dCTP
DEPC	Dietilpirocarbonato
DTT	Ditiotreitol
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
et al.	Y colaboradores
GFP	Proteína verde fluorescente
IPTG	Isopropil β -D-tiogalactopiranosido
Man	Manosa
NAcGlc	N-acetilglucosamina
ORF	Fase de lectura abierta
PBS	Solución salina con tampón de fosfato
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PEG	Polietilenglicol
ruta MAPK	Ruta de proteínas quinasas activadas por mitógeno
SDS	Dodecil sulfatosódico
SGD	Saccharomyces Genome Database
SSC	Solución tampón de cloruro sódico y citrato de sodio
Tris	Tris (hidroximetil) aminometano
ufc	Unidades formadoras de colonia
vs.	<i>Versus</i> , contra
X-gal	5-bromo-4-cloro-3-indol β -D- galactósido.

INTRODUCCIÓN

1.- *Candida albicans*

1.1.- CARACTERÍSTICAS GENERALES

Los hongos son organismos ubicuos, se encuentran especies fúngicas en casi todos los hábitats. Muchas de estas especies son capaces de adaptarse a diferentes ambientes, desarrollando en un corto periodo de tiempo una respuesta transcripcional y fisiológica determinada ante un cambio de las condiciones del medio (Sudbery *et al*, 2004).

El hecho de que los hongos sean organismos eucariotas con un desarrollo sencillo y rápido y que resulten más fáciles de manipular que los organismos pluricelulares ha estimulado la utilización de algunas especies de levaduras como organismos modelo en estudios genéticos y de Biología Molecular. Especialmente este es el caso de *Saccharomyces cerevisiae*.

S. cerevisiae no es un organismo patógeno por lo que no resulta útil a la hora de analizar mecanismos de virulencia, ni presenta la plasticidad morfológica característica de otras especies fúngicas. Un hongo de gran interés para analizar ambos tipos de procesos es *Candida albicans*. Se trata de un patógeno fúngico oportunista de alta incidencia en humanos, que se utiliza en investigación con el fin de desarrollar tratamientos terapéuticos eficaces y de comprender la biología molecular de otros patógenos fúngicos virulentos cuyo manejo en el laboratorio resulta complicado. Por otra parte, *C. albicans* es capaz de crecer adoptando diferentes morfologías, según las condiciones del medio, por lo que resulta útil como modelo en estudios de diferenciación celular.

El género *Candida* engloba unas 200 especies que comparten características como reproducción asexual por gemación y ausencia de pigmentos carotenoides. Las especies del género *Candida* se incluyeron inicialmente dentro de los Deuteromycetes (hongos imperfectos) debido a que no se conocía que presentara un ciclo de reproducción sexual.

Actualmente el género *Candida* se ha incluido dentro de los ascomicetos siguiendo la siguiente clasificación (Brandt, 2002): REINO: Fungi, PHYLLUM: Ascomycota, CLASE: Hemiascomycetes, ORDEN: Saccharomycetales, FAMILIA: Candidaceae, GENERO: *Candida*.

El cambio de clasificación se justifica por diversos hallazgos. Datos de comparación de secuencias génicas indican que filogenéticamente las especies del género *Candida* están más relacionadas con los ascomicetos que con los basidiomicetos. Por otra parte, en la última década se han publicado diferentes trabajos sobre la posible existencia de un ciclo sexual en *C. albicans*. La evidencia de que esta levadura puede presentar ciclo sexual se ha

basado principalmente en el descubrimiento en esta especie de genes MTL (mating-type like) homólogos a los genes MAT (mating-type) de *S. cerevisiae* necesarios para la reproducción sexual (Tzung *et al*, 2001). Sin embargo, al no encontrarse un proceso de meiosis, un tema de debate es si estos genes MTL están implicados en procesos sexuales o bien tienen implicaciones distintas, como por ejemplo en virulencia, o regulando el "switching" blanco-opaco (Butler *et al*, 2009; Morschhäuser, 2010).

También se ha puesto de manifiesto que *C. albicans* no puede considerarse un diploide obligado ya que, aunque con una frecuencia muy baja, pueden encontrarse dentro de una población formas haploides capaces de conjugarse (Hickman *et al*, 2013).

Las especies del género *Candida* difieren en su capacidad para fermentar distintos compuestos, en la composición de los polisacáridos extracelulares, en la morfología celular y en la capacidad de formar micelio y pseudomicelio. Entre las especies del género *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. tropicalis* y *C. parapsilosis* son las especies patógenas que con más frecuencia se identifican en las infecciones por *Candida*, juntas causan el 95% de las infecciones. Aunque *C. albicans* sigue siendo el agente más común de dichas infecciones, su incidencia está disminuyendo al mismo tiempo que la frecuencia de otras especies está aumentando. Otras especies menos frecuentes, *C. krusei*, *C. lusitanae* y *C. guilliermondii*, son la causa de menos del 5% de las candidiasis invasivas (Butler *et al*, 2009).

Los rasgos más significativos de *C. albicans* son su capacidad de formar tubos germinativos y clamidosporas, seguida de su patrón de asimilación de azúcares. Se han establecido varios biotipos dentro de la especie basándose en similitudes fenotípicas y de DNA (Odds, 1988).

El hecho de ser un organismo diploide con un elevado grado de variación alélica, carente de un ciclo sexual típico (conjugación de células diploides seguida de mitosis y pérdida cromosómica en lugar de meiosis), y con un uso de codones diferente al de *S. cerevisiae* (el codón CUG es traducido por serina en lugar de leucina), ha dificultado los estudios a nivel molecular de *C. albicans*. A pesar de ello se han podido desarrollar una serie de herramientas moleculares que han permitido avanzar en las investigaciones, por ejemplo, actualmente existen cepas delecionadas en genes que sirven de marcadores, sistemas de transformación eficientes y estrategias para la deleción secuencial de genes (Fonzi & Irwin, 1993; Negredo *et al*, 1997; Morschhäuser *et al*, 1999; Wilson *et al*, 2000). Además, se ha publicado la secuencia de su genoma, y la anotación de los genes está disponible en las bases de datos <http://www.candidagenome.org/> y <http://genolist.pasteur.fr/CandidaDB/>

1.2.- *C. albicans* COMO AGENTE PATÓGENO

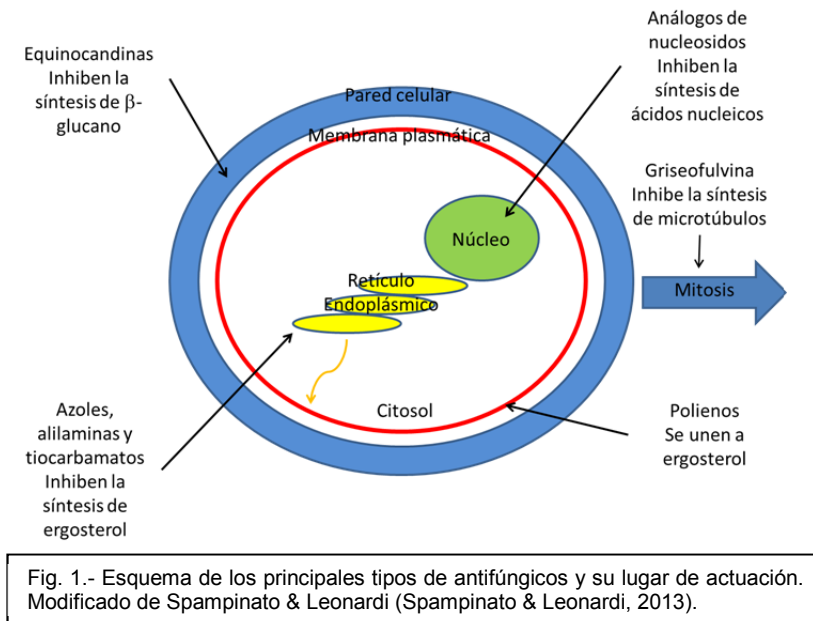
C. albicans se encuentra habitualmente como comensal inocuo en la cavidad oral y los tractos digestivos y genital de humanos y otros animales de sangre caliente, donde reside en equilibrio con la microbiota normal y con el sistema inmune del hospedador. Aunque altamente adaptada como organismo comensal, esta especie presenta un gran número de elementos virulentos que le permiten en ocasiones colonizar y producir daños directos en el hospedador (Hube & Naglik, 2001). Esta capacidad de invadir los tejidos y ocasionar infecciones sistémicas, se da cuando el hospedador presenta defectos naturales o adquiridos en su sistema inmunológico. Cuando este ocurre, y a pesar de los tratamientos agresivos con antifúngicos, el pronóstico no es bueno, alcanzándose rangos de mortalidad de alrededor del 45% en las infecciones nosocomiales (Spampinato & Leonardi, 2013).

Las patologías que puede causar *C. albicans* son de 3 tipos: cutáneas, mucosas y sistémicas. La candidiasis cutánea se desarrolla generalmente debido a la alteración de la barrera de la piel. Existen varios tipos: intertrigo, onicomycosis y granuloma candidiásico (Martínez Roig, 2003). La candidiasis de mucosas puede afectar a la mucosa oral (muguetis bucal), a la esofágica (esofagitis candidiásica), a la intestinal o a la genital. Estas infecciones responden a los antifúngicos disponibles, pero su tratamiento se ve dificultado por episodios de recurrencia en determinados pacientes (Brandt, 2002).

Las infecciones más peligrosas son las sistémicas. Se producen por invasión de uno o varios órganos internos, afectando fundamentalmente a individuos inmunocomprometidos. Su diagnóstico es difícil y su tratamiento poco eficaz (Myskowski *et al*, 1997; Brandt, 2002).

1.2.1.- Antifúngicos

Aunque los medicamentos antifúngicos utilizados en tratamientos clínicos son diversos, sólo unas pocas clases de agentes antifúngicos están disponibles para tratar las infecciones por *Candida* (Fig. 1)



1.2.1.1.- Azoles. Inhibidores de la lanosterol 14- α -demetilasa

La familia más amplia de antifúngicos es la de los azoles. Los azoles alteran la integridad de la membrana mediante la inhibición de la actividad de la lanosterol 14- α -demetilasa, enzima implicada en la biosíntesis de ergosterol (componente lipídico mayoritario de la membrana celular fúngica). El ergosterol y el colesterol tienen las suficientes diferencias estructurales para evitar que las células del hospedador sean dañadas por agentes cuya diana sea el ergosterol o componentes de su ruta de biosíntesis.

La familia de los azoles incluye imidazoles (miconazol, econazol, clotrimazol y ketoconazol) y triazoles (fluconazol, itraconazol, voriconazol y posaconazol).

Durante los últimos años el itraconazol y el fluconazol han sido el tratamiento de elección frente a candidiasis sistémicas, sin embargo se ha descrito un incremento en la resistencia a ambos en multitud de pacientes (Redding *et al*, 2003; Hof, 2006). Algunos de los mecanismos principales responsables de la resistencia a los azoles antifúngicos son:

1. Reducción de la acumulación del antifúngico en el interior celular

Se debe a la sobreexpresión de genes de bombas de expulsión como por ejemplo *CDR1* y *CDR2* (familia ABC) o *MDR1* (familia MFS).

2. Disminución de la afinidad de la droga por su sustrato

Se han descrito varias mutaciones puntuales en la lanosterol 14- α -demetilasa codificada por el gen *ERG11*.

3. Neutralización del efecto del antifúngico

Uno de los mecanismos consiste en la sobreexpresión de *ERG11* que conlleva un incremento en la diana del antifúngico. El otro, muy poco frecuente, consiste en la alteración de los últimos pasos de la síntesis de ergosterol lo cual lleva a las cepas a producir membranas carentes de ergosterol pero que contienen otros esteroides.

1.2.1.2.- Equinocandinas. Inhibidores de la síntesis de glucano

Las equinocandinas (caspofungina, micafungina y anidulafungina) son agentes antifúngicos lipopeptídicos que inhiben la síntesis de la pared fúngica mediante el bloqueo de la (1,3)- β -D-glucan sintasa. Esto conlleva la formación de una pared celular fúngica alterada, lo que resulta en un incremento de la vulnerabilidad a lisis osmótica.

Las equinocandinas son los antifúngicos recomendados como primera opción frente a candidiasis invasivas, sin embargo las resistencias están aumentando, encontrándose cepas no sólo resistentes a equinocandinas, sino también a azoles y equinocandinas (Vazquez, 2005; Balashov *et al*, 2006; Cappelletty & Eiselstein-McKitrick, 2007; Kahn *et al*, 2007; Grover, 2010). Las resistencias a equinocandinas se atribuyen a mutaciones puntuales en *FKS1* y/o *FKS2* que codifican para (1,3)- β -D-glucan sintasa.

1.2.1.3.- Polienos. Unión a ergosterol

Los polienos (nistatina y anfotericina B) se unen al ergosterol, lo cual resulta en la formación de poros que alteran la permeabilidad de la membrana produciendo la muerte celular. A pesar de haber sido utilizada durante más de 30 años, apenas se han encontrado cepas resistentes a anfotericina B. El mayor problema se debe a su toxicidad y efectos secundarios (Espinel-Ingroff, 2008; Laniado-Laborín & Cabrales-Vargas, 2009; Pemán *et al*, 2009). Las resistencias se deben a una disminución en el contenido de ergosterol de las membranas, probablemente causadas por mutaciones en *ERG3* o *ERG6* que codifican enzimas implicadas en la síntesis de ergosterol.

1.2.1.4.- Análogos de nucleósidos. Inhibición de la síntesis de DNA/RNA

Las resistencias al antifúngico flucitosina, un análogo de pirimidina (inferiores al 2%), se deben a una reducción de la acumulación del antifúngico en el interior celular causada por mutaciones puntuales en *FCY2* que codifica para la citosina permeasa y a mutaciones puntuales en *FCY1* que codifica para una citosina desaminasa, o *FUR1* que codifica para una uracilo fosforribosiltransferasa (la más común).

1.2.1.5.- Otros antifúngicos

Las alilaminas y tiocarbamatos también desorganizan la membrana celular, en este caso, mediante la inhibición de la escualeno-epoxidasa, implicada en la biosíntesis de ergosterol (Sanglard *et al*, 2009).

La griseofulvina actúa a nivel de la formación de microtúbulos, inhibiendo la mitosis en los hongos (Francois *et al*, 2005).

1.2.1.6.- Necesidad de nuevos antifúngicos

Debido al incremento en la resistencia de los hongos frente a los tratamientos actuales, se hace necesaria la búsqueda de nuevos antifúngicos o la combinación de los ya existentes de manera que sean más efectivos. Actualmente se está tratando de hallar nuevos principios activos en productos naturales (plantas, organismos marinos, etc.), o mediante síntesis orgánica o de compuestos derivados o de materiales poliméricos.

Existen 3 antifúngicos en fase de pruebas que parecen prometedores: E1210, albaconazol e isavuconazol (Schmitt-Hoffmann *et al*, 2006; Pasqualotto & Denning, 2008; Girmenia, 2009; Hata *et al*, 2011).

1.3.- VARIACIONES MORFOLÓGICAS DE *C. albicans*

Tradicionalmente se ha considerado a *C. albicans* como un hongo dimórfico por su capacidad de cambio entre la morfología de hifa y de levadura. Al igual que otras especies englobadas dentro de este grupo, es capaz de adoptar más de 2 morfologías, por lo que debería considerarse en realidad como un hongo polimórfico. *C. albicans* es capaz de crecer en forma de hifa, levadura, pseudohifa o dar lugar a la formación de clamidosporas (Fig. 2).

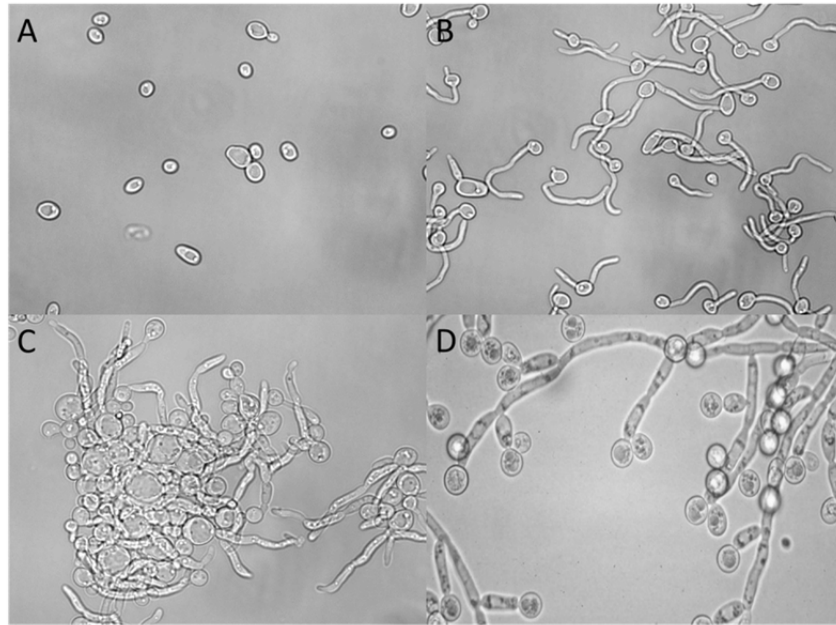


Fig 2.- Fotografías de microscopía óptica mostrando diversas formas de crecimiento de *C. albicans*: levadura (A), hifa (B), pseudohifa (C) y clamidospora (D).

Las levaduras tienen forma elipsoidal con un diámetro aproximado de $5\ \mu\text{m}$, se dividen por gemación y son más abundantes durante el crecimiento saprofítico del hongo (Odds, 1988).

Las hifas tienen forma cilíndrica con un diámetro aproximado de $2\ \mu\text{m}$, las paredes laterales se mantienen paralelas a lo largo de todo el filamento y no presentan constricciones en los septos (Sudbery *et al*, 2004).

Las pseudohifas consisten en cadenas de células alargadas que se originan mediante un proceso de gemación en el que no se llegan a separar la célula madre de la hija. A diferencia de las hifas, las paredes laterales de las pseudohifas no se mantienen paralelas por lo que muestran valores de diámetro variable, son más gruesas (con un diámetro mínimo de $2,8\ \mu\text{m}$) y presentan constricciones en los septos (Odds, 1988; Sudbery *et al*, 2004). Los filamentos que forman las pseudohifas tienden a estar muy ramificados.

En ocasiones las hifas y las pseudohifas son estructuras similares que resultan difíciles de diferenciar. Una forma clara de determinar si se trata de una u otra morfología consiste en visualizar el primer septo formado entre la levadura madre y la célula hija que aparece en primer lugar en el filamento. En el caso de las hifas este primer septo se forma dentro del tubo germinativo, mientras que en las pseudohifas se forma en el cuello entre la célula madre y la hifa (Gow *et al*, 1986; Warena & Konopka, 2002).

Debido al hecho de que las dos morfologías, hifas y pseudohifas presentan diferencias significativas y de que muy pocos de los mutantes bloqueados en la forma de pseudohifa pueden formar hifas verdaderas, se piensa que las dos morfologías son determinadas por mecanismos genéticos distintos. Sin embargo, recientemente Carlisle y Kadosh han llevado a cabo un análisis comparativo de los perfiles transcripcionales globales en un mutante que es capaz de llevar a cabo la transición de unas morfologías a otras (levadura-pseudohifa-hifa) mediante el control de la expresión del gen *UME6*, un regulador transcripcional clave de la filamentación, demostrando que los genes asociados a la morfología de pseudohifa representan un subconjunto de los que se asocian a la morfología de hifa y que dichos genes se expresan a niveles menores cuando crece en forma de pseudohifa que cuando crece en forma de hifa (Carlisle & Kadosh, 2013).

La capacidad de formar clamidosporas es una característica casi exclusiva de *C. albicans* sólo compartida por *C. dubliniensis* y algunas especies de *C. tropicalis* (Sonneborn *et al.*, 1999; Brandt, 2002). Las clamidosporas son esporas asexuales con una pared gruesa que se forman mediante el recubrimiento de las células preexistentes, tienen forma redondeada con un tamaño aproximado de 8 a 12 μm de diámetro y aparecen en las posiciones laterales o terminales de hifas y pseudohifas, sobre células suspensoras alargadas. *In vivo* rara vez se detectan estas estructuras (Cole *et al.*, 1991). En el laboratorio su formación se induce en medios sólidos pobres en nutrientes, suplementados con detergentes, en condiciones microaerófilas y a temperaturas entre 20°C y 30°C, mientras que su formación se reprime en presencia de glucosa (Brandt, 2002; Nobile *et al.*, 2003). Se conoce poco, a nivel molecular, del programa de desarrollo de clamidosporas (Staib & Morschhäuser, 2007).

Las células de *C. albicans* pueden dar lugar a la formación de biopelículas, se trata de comunidades de células organizadas en estrecha relación con la superficie sobre la cual se forman. En el caso de *C. albicans*, las biopelículas están constituidas por levaduras, hifas, pseudohifas y material extracelular (polisacáridos y proteínas) que se disponen de forma ordenada en capas. Generalmente las capas más internas están constituidas mayoritariamente por levaduras, mientras que en las más externas se encuentran las formas filamentosas. El estudio de las biopelículas de *C. albicans* posee gran interés médico dada su aparición en epitelios, catéteres y prótesis y su marcada resistencia a antifúngicos (Mishra *et al.*, 2007; ten Cate *et al.*, 2009; Mathé & Van Dijck, 2013).

1.4.- TRANSICIÓN LEVADURA-HIFA EN *C. albicans*

El cambio entre la forma de crecimiento de levadura y la de hifa puede considerarse una respuesta adaptativa por la que determinados hongos ajustan su morfología a una nueva situación ambiental. Se desarrolla por la sucesión de una serie de procesos

encadenados: percepción de un condicionante externo, traducción de la señal en un mensaje bioquímico, expresión génica diferencial y desarrollo de un patrón de crecimiento polarizado (Chio, 2004).

El inicio del desarrollo de las hifas depende por un lado de la naturaleza, el número y la intensidad de las señales ambientales y por otro de la actividad de las diferentes rutas de transducción de señales. Se han descrito una serie de condiciones ambientales que favorecen la miceliación y se han identificado gran parte de las proteínas que intervienen en la ruta de transmisión de señales. Sin embargo, la correspondencia entre los diferentes estímulos ambientales y la activación de cada una de las rutas ha podido determinarse sólo en algunos casos, mientras que en otros no queda clara. El seguimiento de la señal se complica debido a que algunas de las rutas están conectadas entre sí y a que aún no se han identificado, en muchas de las rutas, las proteínas que actúan al inicio de las mismas.

Varias vías regulan un grupo común de genes, ya que el nivel mínimo de activación necesario para la expresión de estos genes puede alcanzarse bien por una estimulación simultánea de varias rutas o bien por un alto nivel de activación de una única vía (Ernst, 2000a). A pesar de ello se han descrito genes específicos de hifa regulados exclusivamente por algunas rutas (Sharkey *et al*, 1999).

Una de las características de la transición dimórfica de *C. albicans* es el hecho de que se trata de un proceso reversible, tanto las hifas como las pseudohifas pueden dar lugar a levaduras. Este proceso está aún poco caracterizado aunque recientemente se ha publicado un estudio en el que se analiza la expresión génica diferencial global durante esta transición (Carlisle & Kadosh, 2013).

1.4.1.- Cambios en la polaridad durante los procesos morfogenéticos

Durante la división celular de las levaduras, las yemas crecen de forma polarizada hasta alcanzar un determinado tamaño, y a continuación el crecimiento pasa a ser isodiamétrico. Las hifas, en cambio, mantienen el crecimiento polarizado. El patrón de crecimiento de pseudohifas es discontinuo, alternando entre polarizado e isodiamétrico, aunque con un periodo de crecimiento polarizado mayor que el de levaduras (Sudbery *et al*, 2004; Crampin *et al*, 2005).

Los cambios en el patrón de crecimiento se relacionan con diferencias en la organización del citoesqueleto de actina.

Los cambios en la organización del citoesqueleto dependen de proteínas como las ciclinas cuya expresión y actividad está unida estrechamente al control de ciclo celular. La morfogénesis es regulada durante el ciclo celular por la quinasa Cdc28 dependiente de ciclinas (CDK). En *S. cerevisiae*, la asociación de la CDK con las ciclinas de G1 (Cln1 y Cln2)

promueve el crecimiento polarizado mientras que su asociación con las ciclinas B de G2 promueve el crecimiento isodiamétrico (Lew & Reed, 1995; Rua *et al*, 2001). La ciclina de G1 de *C. albicans*, Cln1 (Ccn1) no se requiere para iniciar el crecimiento polarizado de la hifa pero sí para mantenerlo. La ciclina Cln3 de G1 es necesaria para la gemación, pero no para la iniciación del crecimiento hifal. La ciclina Hgc1 es específica de hifas y se expresa únicamente en el ápice de la hifa en crecimiento (Wang, 2009).

La actividad de Cdc28 dirige las transiciones morfológicas y promueve el crecimiento polarizado mediante el control de los componentes del módulo que regula Cdc42. La GTPasa CaCdc42p se localiza en el polo en crecimiento y orquesta diferentes rutas que regulan la polimerización de la actina y otros procesos dependientes del citoesqueleto. El crecimiento apical requiere una activación sostenida de Cdc42 en el lugar de polarización. En *C. albicans* se ha comprobado que CaCdc42p y su factor de intercambio GDP-GTP, CaCdc24p, así como otras proteínas del módulo como CaCla4p, CaBem1p, CaCst20p, CaBem3p o CaRga1p, son necesarios para el crecimiento polarizado (Hazan & Liu, 2002; Whiteway & Oberholzer, 2004).

Además de Cdc42p, en la organización de los cables de actina participa un complejo proteico denominado polarisoma que se localiza en el ápice en crecimiento. El polarisoma está presente de forma continua en hifas. En levaduras y pseudohifas se detecta únicamente durante el crecimiento polarizado, desaparece cuando el crecimiento pasa a ser isodiamétrico y posteriormente se forma de nuevo en el cuello entre la célula madre y la célula hija, con el fin de dirigir a este punto las vesículas de secreción que contienen las enzimas necesarias para la citoquinesis (Crampin *et al*, 2005).

En hongos filamentosos una estructura denominada *Spitzenkörper*, localizada en el interior de la célula y debajo del ápice en crecimiento, se relaciona con el crecimiento polarizado extremo que presentan estas especies. Esta estructura constituye un punto de concentración de las vesículas a partir del cual son dirigidas a la superficie apical por el exocisto. Se considera que el *Spitzenkörper* dirige la polarización ya que cambios en la dirección del crecimiento de las hifas son anticipados por cambios en su posición (Crampin *et al*, 2005; Court y Sudbery, 2007).

En las hifas de *C. albicans* se ha descrito la existencia de una estructura similar al *Spitzenkörper* que coexiste con el polarisoma; en las levaduras y pseudohifas en cambio únicamente se ha detectado el polarisoma. El crecimiento apical requiere una rápida biogénesis de la pared celular, lo cual explica que alteraciones en la secreción de enzimas involucradas en su remodelación presenten defectos en la formación de hifas (Whiteway & Oberholzer, 2004).

Además de mantener una secreción polarizada en el ápice de la hifa, otra característica del crecimiento hifal es la supresión de la separación celular. En levaduras esta tiene lugar cuando el septo primario es hidrolizado por enzimas que degradan el septo (SDE). En hifas, la inhibición de la separación ocurre debido a un cambio en las propiedades del anillo de

septinas (González-Novo *et al*, 2004) y a la acción de la ciclina específica de hifas, Hgc1. Se ha propuesto que, una vez transmitida la señal de inducción de la filamentación a través de la ruta de transmisión de señales que regula la activación del factor de transcripción Efg1, este activaría la transcripción de Hgc1 que a su vez promovería la inhibición de la transcripción de las SDEs y de la liberación de Cdc14 del anillo de septinas (Clemente-Blanco *et al*, 2006), lo cual llevaría a la inhibición de la separación celular. También actuaría colaborando en el mantenimiento del crecimiento apical (Sudbery, 2011).

1.4.2.- Factores ambientales que inducen la miceliación

La combinación de varios factores es lo que determina el crecimiento en forma de levadura o en forma de hifa. En *C. albicans*, a diferencia de lo que ocurre en otros hongos dimórficos, el crecimiento en forma de hifas se desarrolla a 37°C y el levaduriforme por debajo de 30°C. Sin embargo, hay que tener en cuenta que para que sea posible la formación de hifas a 37°C debe considerarse la influencia del pH y la composición del medio.

El pH debe ser cercano a la neutralidad puesto que un pH ácido reprime el crecimiento en forma de hifas, incluso a 37°C.

Las fuentes de nitrógeno fácilmente asimilables, como las sales de amonio, favorecen el crecimiento levaduriforme mientras que fuentes difíciles de asimilar, como la prolina, favorecen el crecimiento en forma de hifas o pseudohifas (Ernst, 2000a). La presencia de glucosa a concentraciones bajas actúa como inductor de la filamentación. Sin embargo, la capacidad de inducción de la transición desciende a partir de 20 mM llegando a inhibirse a concentraciones superiores a 200mM (Hudson *et al*, 2004). Otras fuentes de carbono que inducen la formación de hifas son la NAcGlc y el manitol (Hudson *et al.*, 2004).

El suero es un potente inductor de la miceliación, su presencia puede atenuar los requerimientos de temperatura y pH, así en medios con suero a 34°C se forman auténticas hifas mientras que a esta temperatura sin suero se forman pseudohifas.

El medio Lee es un medio definido pobre en nutrientes (Lee *et al*, 1975) idóneo para los análisis morfológicos de *C. albicans*, dado que permite mantener la morfología de levadura o hifa variando únicamente un parámetro, el pH o la temperatura. En medio Lee a 37°C y pH neutro la formación de hifas se induce de forma casi inmediata, mientras que el crecimiento levaduriforme se mantiene a 28°C o a pH ácido. La adición de suero a medio Lee, a 37°C, hace que el desarrollo de las hifas se produzca de forma más acelerada, dado que este medio contiene glucosa a una concentración mayor que la del suero.

Adicionalmente se ha demostrado que un tiempo de reposo metabólico previo favorece la formación de hifas (Ernst, 2000a).

Entre las condiciones que reprimen el desarrollo de las hifas se encuentra el pH ácido, baja temperatura, alta concentración de glucosa y alta densidad de células. Cuando la concentración del inóculo excede 10^7 células/ml la germinación es inhibida incluso bajo condiciones inductoras, este efecto se debe aparentemente a la secreción de una molécula denominada farnesol que media un "sistema de sensibilidad a quórum" (Chio, 2004). Se han identificado diversos inhibidores de la filamentación como el interferón y algunos compuestos químicos (Ernst, 2000a).

Las condiciones que promueven la formación de pseudohifas no están tan definidas. Se ha demostrado que se desarrollan en condiciones de temperatura y pH intermedias a las que favorecen la formación de hifas o levaduras (aproximadamente 35°C y pH 6), y que además su formación puede inducirse por una concentración alta de fosfatos (hasta 600 mM) o por carencia de aminoácidos (Tripathi *et al*, 2002; Hornby *et al*, 2004).

Existen otras condiciones ambientales que promueven el desarrollo de formas filamentosas (hifas o pseudohifas), este es el caso del crecimiento en condiciones de anoxia, dentro de una matriz de agar (probablemente debido a la limitación de oxígeno), en contacto con macrófagos, en medio *Spider*, bajo privación de hierro o durante la infección en riñón de ratones (Sudbery *et al*, 2004).

Tabla 1.- Distintos estímulos que afectan a la filamentación.		
Factores	Forma de levadura	Formas filamentosas
Temperatura	Por debajo de 30°C	A 37°C
pH	Ácido	Cercano a 7
Fuentes de nitrógeno	Fácilmente asimilables	Difícilmente asimilables
Glucosa	Alta concentración	Baja Concentración (hasta 20 mM)
Otras fuentes de carbono		NAcGlc / Manitol
Suero		Fuerte inductor
Reposo metabólico		Favorece
Alta densidad de células	Más de 10^7 cels/ml (Farnesol)	
Anoxia		Favorece
Matriz (Embedded)		Favorece
Macrófagos		Favorece

1.4.3.- Rutas de transducción de señales de la transición dimórfica

El inicio del desarrollo de las hifas depende por un lado de la naturaleza, el número y la intensidad de las señales ambientales y por otro de la actividad de las diferentes rutas de transducción de señales. Hasta la actualidad se han descrito una serie de condiciones ambientales que favorecen la miceliación y se han identificado gran parte de las proteínas que intervienen en la ruta de transmisión de señales. Sin embargo, la correspondencia entre los diferentes estímulos ambientales y la activación de cada una de las rutas ha podido determinarse sólo en algunos casos, mientras que en otros la correspondencia no queda clara. El seguimiento de la señal se complica debido a que algunas de las rutas están

conectadas entre sí y a que aún no se han identificado, en muchas de las rutas, las proteínas que actúan al inicio de las mismas.

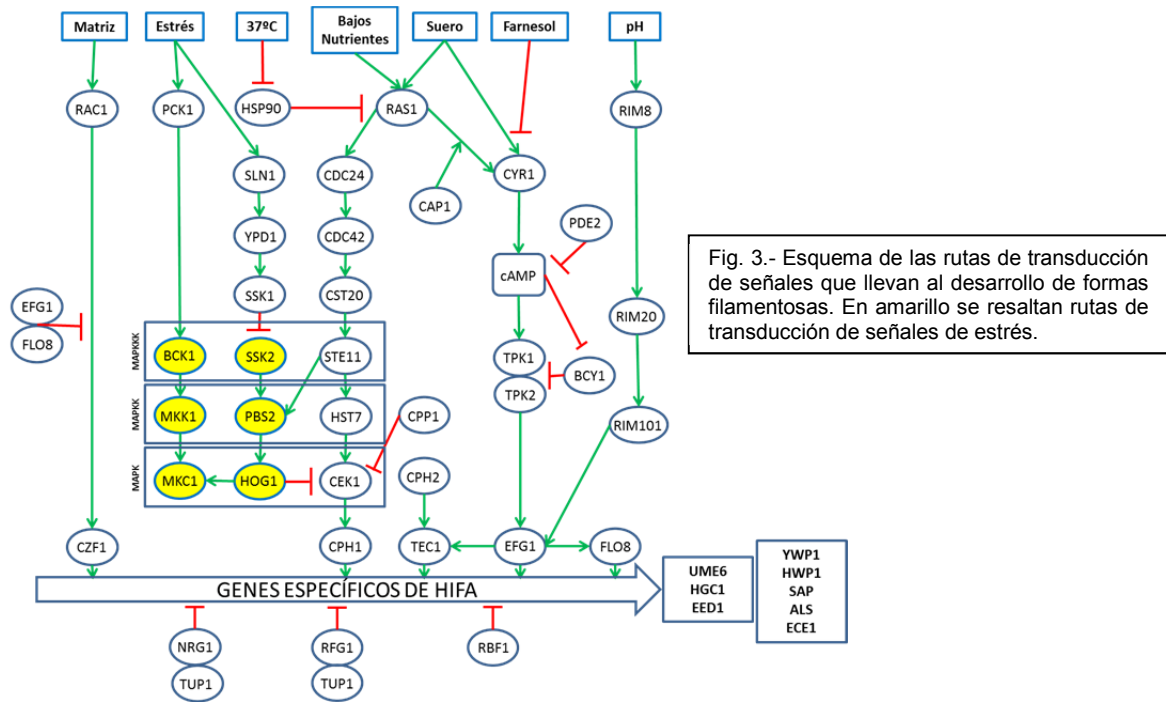
Se han descrito al menos 4 vías que inducen la formación de hifas: la ruta de proteínas quinasas activada por mitógeno vía CaCph1p (ruta MAPK), la ruta de la proteína quinasa A dependiente de cAMP mediada por CaEfg1p (ruta PKA-cAMP), la ruta de respuesta a pH a través de CaRim101p y la ruta de respuesta a una matriz extracelular mediada por CaCzf1p. Existen además varias vías represoras de la filamentación que actúan a través de CaTup1p o bien a través de CaRbf1p.

Los sistemas de transducción de señales que rigen la formación de pseudohifas no se conocen bien pero parecen compartir algunas de las rutas que controlan la formación de las hifas (Berman & Sudbery, 2002; Sudbery *et al*, 2004). A la vista de las últimas investigaciones, la idea de que compartan rutas de transducción de señales es coherente con el modelo propuesto por Carlisle y Kadosh de que los genes que se asocian de forma específica con la morfología de pseudohifa representan un subconjunto de los asociados con la morfología de hifa (Carlisle & Kadosh, 2013).

1.4.3.1.- Ruta de proteínas quinasas activadas por mitógeno (ruta MAPK)

En *S. cerevisiae* la ruta MAPK (*Mitogen Activated Protein Kinases*) activada en respuesta a feromonas, está implicada, además de en el proceso de conjugación, en el desarrollo de pseudohifas y en el crecimiento invasivo. En *C. albicans* se han identificado proteínas homólogas a las que conforman esta ruta en *S. cerevisiae* y se ha comprobado que están relacionadas con la filamentación inducida en condiciones de limitación de nutrientes (Ernst, 2000b).

La cascada MAPK en *C. albicans*, incluye las quinasas CaCst20p, CaSte11p, CaHst7p y CaCek1p (Liu, 2001). Al final de la ruta MAPK se encuentra el factor transcripcional CaCph1p (Fig. 3). Uno de los primeros elementos de esta ruta (*CaRAS1*) actúa también en la ruta de la proteína quinasa A dependiente de AMPc.



1.4.3.2.- Ruta de la proteína quinasa A dependiente de AMPc (Ruta PKA-cAMP)

La ruta PKA-cAMP juega un papel crucial en el control de la filamentación en *C. albicans*, *S. cerevisiae* y otros hongos. En *C. albicans* la actividad de esta ruta es necesaria para la filamentación bajo múltiples estímulos, como la carencia de nutrientes o la presencia de inductores como la NAcGlc o el suero (Ernst, 2000b).

Se ha propuesto que CaRas1p y CaCdc25p (un intercambiador de GDP-GTP) forman parte del sistema sensor de glucosa que activa la síntesis de cAMP y con ello la ruta PKA-cAMP (Maidan *et al*, 2005). La proteína CaCap1p interacciona con la adenilato-ciclasa CaCYR1 y facilita su activación por CaRas1p (Whiteway, 2000; Bahn & Sundstrom, 2001). La fosfodiesterasa CaPde2p interviene en la degradación de cAMP y su sobreexpresión inhibe la filamentación (Bahn *et al*, 2003). En medios inductores de la filamentación, la delección de CaPDE2 causa la formación de pseudohifas en lugar de hifas, de forma similar a lo que ocurre con la activación constitutiva de la ruta MAPK (Jung & Stateva, 2003).

El papel del cAMP es activar la proteína quinasa A (PKA), un heterotetrámero que consiste en 2 subunidades catalíticas y 2 reguladoras codificadas por CaTPK1-2 y CaBCY1 respectivamente (Sonneborn *et al*, 2000; Bockmühl *et al*, 2001; Liu, 2001; Cassola *et al*, 2004).

Al final de la ruta PKA-cAMP, actúa el factor de transcripción CaEfg1p provocando la expresión diferencial de genes específicos de filamentación. Esta proteína ha resultado ser un regulador clave de la transición dimórfica dado que interviene en la mayoría de las rutas de

señalización (Fig. 3). La cepa carente de *CaEFG1* es incapaz de formar hifas auténticas en cualquiera de los medios de inducción ensayados, salvo en condiciones de microaerofilia. CaEfg1p reconoce la secuencia TATGCATA (caja EGR). Los promotores de algunos de los reguladores de crecimiento filamentoso tales como *EFG1*, *TCC1*, *CZF1*, *TEC1*, *DEF1* y *NRG1* contienen estas cajas EGR con secuencias muy similares. Uno de los promotores diana de CaEfg1p es el de su propio gen, ejerciendo un efecto represor sobre su expresión y constituyendo por tanto un mecanismo de autorregulación negativa.

Se ha sugerido que CaFlo8p (otro factor de transcripción) podría actuar al final de la ruta PKA-cAMP junto a CaEfg1p (Cao *et al*, 2006).

Los mutantes *Caefg1*, *Cacyr1* y *CaFlo8* muestran hiperfilamentación cuando crecen dentro de una matriz de agar (medio *embedded*) por lo que se ha sugerido que en estas condiciones la ruta PKA-cAMP reprime la filamentación (Cao *et al*, 2006).

El factor de transcripción CaTec1p también está implicado en el control del crecimiento filamentoso (Schweizer *et al*, 2000). En *S. cerevisiae* la transcripción de *ScTEC1* está regulada por ScSte12p (Madhani & Fink, 1997). En *C. albicans* sin embargo, la transcripción de *CaTEC1* no es regulada por CaCph1p, homólogo de ScSte12p, sino que depende de CaEfg1p y CaCph2p (Schweizer *et al*, 2000; Liu, 2001). La acción de CaCph2p sobre la filamentación debe de producirse, al menos en parte, a través de CaTec1p (Lane *et al*, 2001b).

1.4.3.3- Otras rutas de inducción de la filamentación

En *C. albicans* el cambio de pH ácido a neutro induce la formación de hifas a 37°C. *C. albicans* posee una ruta de respuesta a pH conservada con respecto a otros hongos. El factor de transcripción CaRim101p regula la expresión de genes de respuesta a pH, al ser activado por proteólisis dependiente de las proteínas CaRim8p y CaRim20p (Fig. 3) (Ernst, 2000a; Liu, 2001; Davis, 2003).

CaRIM101 es necesario para la filamentación inducida por cambio de pH, para la activación transcripcional de genes específicos de pH alcalino y para la represión de genes que se expresan a pH ácido. El factor transcripcional CaEfg1p podría actuar por debajo de CaRim101p o bien en paralelo, regulando únicamente la filamentación por cambio de pH (Fig. 3) (Ernst, 2000b; Liu, 2001; Davis, 2003).

Cuando crece dentro de una matriz sólida, se considera una respuesta que facilita la penetración del hongo en los tejidos del hospedador. El gen *CaCZF1* no es necesario para la respuesta a estímulos como suero, pH, NAcGlc, o prolina, sino para filamentar en medio *Spider*. Es necesario para la correcta filamentación dentro del agar como respuesta al estrés mecánico (Brown *et al*, 1999) o a una baja concentración de oxígeno (Ernst, 2000b). Se ha

sugerido que CaCzf1p podría actuar liberando la represión ejercida por CaEfg1p en estas condiciones de microaerofilia (Ernst, 2000b; Liu, 2001; Giusani *et al*, 2002) (Fig. 3).

1.4.3.4.- Regulación negativa de la filamentación

Se han identificado factores de transcripción y otras proteínas implicadas en el mantenimiento del crecimiento en forma de levadura. Así, el mutante deleciónado en el gen *CaTUP1* crece en forma de pseudohifas tanto en condiciones inductoras como no inductoras de la filamentación (Braun & Johnson, 1997). La expresión de *CaTUP1* a lo largo de la transición levadura-hifa es constante (Zhao *et al*, 2002), de forma que su función represora es controlada por su asociación con otras proteínas de unión a DNA. Así, se sabe que Tup1p se asocia con los factores de transcripción Nrg1 o Rfg1 para formar distintos complejos represores (Kadosh & Johnson, 2001; Khalaf & Zitomer, 2001; Liu, 2001). Ssn6p actúa como correpresor en complejos de Tup1.

El factor transcripcional CaRbf1p representa otra ruta represora de la filamentación (Ishii *et al*, 1997; Sharkey *et al*, 1999).

Por otra parte, se ha observado que la deleción de los genes *CaRAD6* (Ernst, 2000b; Leng *et al*, 2000) y *CaRAD52* (Andaluz *et al*, 2006), implicados en el control de daños al DNA, también causa crecimiento filamentoso en medios no inductores, probablemente como consecuencia del desacoplamiento entre diferentes procesos del ciclo celular, como son la división del núcleo y la organización del citoesqueleto.

Como conclusión puede decirse que son múltiples las rutas de transmisión de señales implicadas en controlar el programa genético que lleva a la formación de hifas y que como consecuencia del rendimiento integrado de estas rutas se produce la transición dimórfica (Fig. 3).

1.4.4.- Rutas de respuesta a estrés y su relación con la diferenciación morfológica

Muchos de los estímulos que hemos mencionado como inductores de la filamentación suponen un estrés para la célula, y aunque las rutas que responden a ellos son las responsables de la inducción del cambio morfológico, otras rutas de respuesta a estímulos como estrés oxidativo u osmótico (ruta HOG) o la implicada en respuesta a daños en pared (ruta de integridad celular), interaccionan con aquellas alterando los patrones de diferenciación celular como respuesta de supervivencia (Fig.3).

Recientemente se ha propuesto que la ruta de la MAPK Cek1p podría ser la encargada de transmitir los defectos de glicosilación, ya que mutantes afectados en la O-

glicosilación (en genes *PMT*) tienen constitutivamente activada esta quinasa Cek1p (Cantero & Ernst, 2011). Un posible sensor de los defectos de glicosilación de proteínas parece ser la proteína de membrana CaMsb2p. Ésta dispara la señal (mediante la ruta Cek1 MAPK) para el mantenimiento de la integridad de la pared celular y el crecimiento filamentoso (Ernst & Pla, 2011; Szafranski-Schneider *et al*, 2012).

En *C. albicans* el sensor Ssu81p es esencial para la activación de la ruta de la MAPK Cek1p bajo condiciones que requieren crecimiento activo y remodelación de la pared celular, es un nexo de unión entre respuesta a estrés oxidativo, biogénesis de la pared celular y morfogénesis.

En *C. albicans* se han conservado la mayor parte de los componentes de las rutas de MAPK de Cek1p y Hog1p de *S. cerevisiae*, sin embargo, los sensores (Msb2p, Ssu81p y Sln1p) parecen activarse sobre todo como respuesta a estrés oxidativo, más que a estrés osmótico. Hay que tener en cuenta que los mecanismos de defensa a estrés oxidativo son de especial relevancia para la patogénesis de *Candida* (Wilson *et al*, 2009). La MAPKK que fosforila a Hog1p, (Pbs2p) puede ser activada por Ste11p que transmite la señal de los sensores Msb2p/Ssu81p, o por la rama de Sln1p del sistema de dos componentes histidina quinasa. En *C. albicans* además se ha descrito que la MAPK Hog1p participa en procesos morfogenéticos, como represor de la transición levadura-hifa y como inductor de la formación de clamidosporas (Alonso-Monge *et al*, 2003). El mecanismo exacto por el cual Hog1p reprime la formación de hifas no está claro.

La ruta de MAPK de la PKC de integridad celular (CWI) se activa en respuesta a una amplia variedad de condiciones como limitación de nutrientes, estrés oxidativo, osmótico y shock térmico (Rodríguez-Peña *et al*, 2010). En *S. cerevisiae*, estas señales son detectadas por proteínas de membrana sensoras, Mid2p, Mtl1p y la familia Wsc. La señal se transmite a través de la proteína Pkc1p que activa el módulo específico de kinasas cuya MAPK es la proteína Mkc1p, homóloga de Stl2p de *S. cerevisiae*. La fosforilación de Mkc1p depende principalmente de Pkc1p pero bajo ciertas condiciones (como en situación de estrés oxidativo) requiere la proteína Hog1p (Arana *et al*, 2005; Navarro-García *et al*, 2005), como en el caso de Stl2p (Vilella *et al*, 2005), lo que redundaría en la interconexión entre las diferentes rutas MAPK.

Los mutantes en el gen *CaMKC1* no muestran una composición de la pared celular alterada drásticamente, pero difieren de la cepa silvestre en la cantidad de manano en la superficie (Navarro-García *et al*, 1998) sin embargo, *CaMKC1* es esencial para el crecimiento invasivo en medio *Embedded* y en el proceso de formación de biofilms (Kumamoto, 2005). El papel de Mkc1p en integridad celular se ha visto reforzado con varias observaciones: así, mutantes *pmr1Δ* (defectivos en una ATPasa que transporta Ca^{2+} y Mg^{2+} al interior del complejo de Golgi necesaria para el funcionamiento de varias manosiltransferasas) que presentan defectos severos en las glicoproteínas presentes en la superficie celular, tienen

constitutivamente activada la Mkc1p (Bates *et al*, 2005). Por otra parte, varios mutantes afectados en el proceso de glicosilación de proteínas también presentan activada esta ruta (Mora-Montes *et al*, 2007; Cantero *et al*, 2007; Ernst & Pla, 2011).

1.4.5.- Expresión génica diferencial durante la transición levadura-Hifa

Se han descrito varias rutas MAPK que regulan genes cuya expresión es específica de la morfología filamentosa de *C. albicans* (HSG: *Hyphal Specific Genes*), y en general, el nivel mínimo de activación necesario para la expresión de estos genes puede alcanzarse bien por una estimulación simultánea de varias rutas o bien por un alto nivel de activación de una de ellas (Ernst, 2000a).

Algunos de los genes específicos de hifa son: *ECE1*, *HWP1*, *RBT1*, *SAP4*, *SOD5*, *ALS3*, *BMH2*, *FKH1* y *SSN6*. La expresión de muchos de estos genes depende de factores de transcripción descritos anteriormente, sin embargo, no requieren de todos, por lo que existe especificidad entre las diferentes rutas y los genes expresados diferencialmente (Sharkey *et al*, 1999). Muchos de ellos codifican glicoproteínas de pared celular, lo que sugiere que existen cambios significativos en la pared celular durante la formación de las hifas, y algunos codifican proteínas que constituyen importantes factores de virulencia (Brown & Gow, 1999). Otros, como el gen *HGC1*, codifica para una ciclina que como ya se ha comentado, permite el establecimiento y el mantenimiento del crecimiento polarizado de la hifa e impide la separación de las células después de la citocinesis (Wang, 2009).

Se han descrito, además, numerosos genes que aunque se expresan en ambas morfologías (levadura e hifa), su nivel de transcripción cambia durante la transición levadura-hifa. Entre ellos se encuentran genes que codifican proteínas que se localizan en la superficie celular como *RBT4*, *PHR1* (Porta *et al*, 1999), *CHS2* (una quitina-sintasa) (Gow *et al*, 1994) y *DDR48* (Lane *et al*, 2001, Nantel *et al*, 2002). Otros codifican proteínas que forman parte de las rutas de transducción de señales como es el caso de Efg1p, Pde2p, Ras1p y Nrg1p (Moran *et al*, 2007; Wang, 2009; Wilson *et al*, 2010; Piispanen *et al*, 2011).

El nivel de expresión de los genes HSG no ha podido ser valorado en poblaciones puras de pseudohifas de cepas silvestres de *C. albicans*, pero según los datos obtenidos por Kadosh y Johnson, y los derivados de mutantes que mantienen esta morfología, parece que la mayoría de los HSG se expresan en pseudohifas, aunque en nivel menor que en hifas (Doedt *et al*, 2004; Kadosh & Johnson, 2005). Estudios recientes han demostrado que esta transición no implica sólo la subexpresión de genes específicos de hifa, sino la expresión diferencial de genes adicionales que no habían sido descritos previamente entre los que se incluyen muchos implicados en la síntesis de proteínas (Carlisle & Kadosh, 2013).

En *C. albicans* el análisis de la regulación transcripcional a escala genómica ha sido posible a partir de la publicación de la secuencia completa del genoma de esta levadura en el año 2000 y de la anotación de sus genes a la cual contribuyó nuestro grupo de investigación (d'Enfert *et al*, 2005). En principio se dispuso de membranas (macroarrays) con sondas para aproximadamente la tercera parte de los genes de *C. albicans* y micromatrices construidos con la tecnología Affimetrix, posteriormente el desarrollo de micromatrices de DNA sobre superficie de vidrio con la totalidad de los genes de *C. albicans* y con un coste inferior al de los micromatrices de Affimetrix, ha supuesto un aumento del número de trabajos sobre la regulación de la expresión génica de *C. albicans* basados en micromatrices. Actualmente las micromatrices se construyen con sondas de oligonucleótidos de 70 bases.

Esta tecnología se está utilizando en la investigación de diferentes aspectos de la Biología de *C. albicans*, como son el estudio de las respuestas a diferentes condiciones ambientales durante el crecimiento en el laboratorio (Liu, 2001; Nantel *et al*, 2002; Kadosh & Johnson, 2005), de las rutas de regulación del proceso morfogenético (Lane *et al*, 2001a; Doedt *et al*, 2004; García-Sánchez *et al*, 2005; Bahn *et al*, 2007), de la formación de biopelículas (Srikantha *et al*, 2013), de la resistencia a drogas antifúngicas (Sellam *et al*, 2009) y de las respuestas bajo diferentes situaciones relevantes de interacción con las células del huésped tanto en condiciones *in vitro* como *in vivo* (Fradin *et al*, 2003; Lewis *et al*, 2012).

Durante la discusión del trabajo de investigación que se presenta, se comentarán los resultados más relevantes de algunos de estos estudios publicados acerca de los perfiles de expresión génica en *C. albicans*.

2.- GLICOPROTEÍNAS Y PARED CELULAR

La pared celular es vital para el crecimiento, supervivencia y morfogénesis del hongo. Las proteínas sensoras de la superficie celular permiten a los organismos responder a cambios del medio ambiente. Las proteínas tipo mucinas y otras proteínas de adhesión median las respuestas del hongo y juegan un papel crítico en la colonización de nuevos hábitats. La pared también es importante en la participación de la formación de biopelículas, que es un proceso ecológicamente importante para muchos hongos. La pared otorga propiedades de adhesión críticas para la invasión y protección frente a los mecanismos de defensa del hospedador (Chaffin, 2008).

La pared mejor estudiada es la de *S. cerevisiae* y por extensión la de todos los ascomicetos, y ente ellos *C. albicans*. Presentan una composición y estructura similares (Fig.4). Está compuesta principalmente por manoproteínas, glucanos, quitina y lípidos (Orlean, 2012). La pérdida de cualquiera de estos componentes puede afectar drásticamente al crecimiento, morfología y viabilidad del hongo.

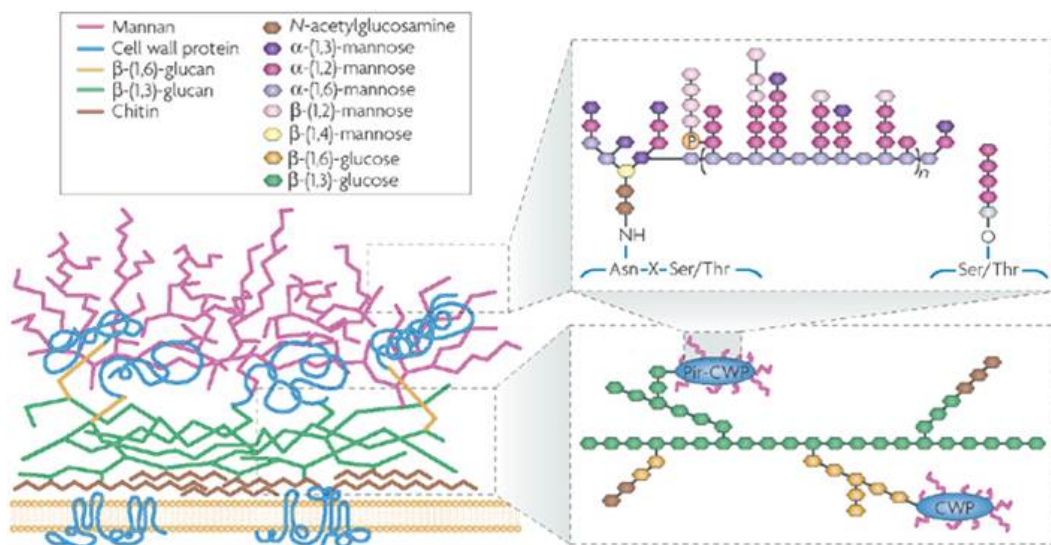


Fig. 4.- Esquema de la organización de la pared celular de *C. albicans* (Netea *et al*, 2008).

2.1- Quitina y glucanos

La quitina representa un 2-6% del peso seco de la pared de *Candida* (Ruiz-Herrera *et al*, 2006). Es sintetizada por quitin-sintasas. Las microfibrillas de quitina tienen una enorme resistencia a la tracción y contribuyen significativamente a la rigidez e integridad de la pared celular. La gran mayoría de hongos caracterizados poseen varios genes que codifican quitin-sintasas. La presencia de múltiples quitin-sintasas sugiere que pueden tener papeles redundantes pero también se sabe que diferentes quitin-sintasas se usan para producir quitina en distintas fases del ciclo celular o situaciones de estrés (Sanz *et al*, 2007; Lenardon *et al*, 2010). La pérdida de quitin-sintasas resulta en una pared celular más débil, una reducida tasa de crecimiento y una mayor lisis celular. Los inhibidores de quitina más conocidos son nikomicinas y polioxinas.

El β -glucano constituye el 54-60% del peso seco de la pared (Ruiz-Herrera *et al*, 2006). El β -1,3-glucano se encuentra como polímero ramificado (Latgé, 2007). Este polímero constituye el principal bloque de construcción de la pared, aportando elasticidad y resistencia debido a la asociación de los polímeros de glucano en forma de triple hélice. El glucano es sintetizado por la β -1,3-glucan-sintasa, enzima asociada a la membrana plasmática que posee múltiples dominios transmembrana. El gen *GSC1* de *C. albicans* codifica una subunidad esencial de la β -1,3-glucan-sintasa. El β -1,3-glucano es una diana interesante en el desarrollo de antifúngicos. Algunos ejemplos de antifúngicos centrados en el β -1,3-glucano son las equinocandinas (Chen *et al*, 2011).

El β -1,6-glucano juega un papel importante en la formación de la matriz. En *S. cerevisiae* el β -1,6-glucano forma enlaces con el β -1,3-glucano, con la quitina y con las proteínas GPI (Klis *et al*, 2006; Lesage & Bussey, 2006). Se han identificado varios genes implicados en la correcta síntesis de β -1,6-glucano en *S. cerevisiae* como *KRE5*, *BIG1* y *ROT1* (codifican proteínas que se localizan en RE y controlan el plegamiento de proteínas que salen de éste), *KRE6*, *SKN1*, *KRE9* y *KNH1* (podrían intervenir en la unión del β -1,6-glucano a la pared) y *KRE1* (requerido para alcanzar niveles normales de β -1,6-glucano). Se han encontrado genes ortólogos a todos ellos en *C. albicans*.

2.2.- Proteínas de la pared celular

Algunos autores consideran proteínas de la pared celular (Ruiz-Herrera *et al*, 2006) aquellas que poseen una señal de secreción (un péptido señal), están N- y/o O-glicosiladas, y poseen otras características específicas tales como uniones GPI o repeticiones internas (proteínas PIR). Sin embargo, se ha detectado la presencia de proteínas no canónicas (por ejemplo algunas no glicosiladas) en la pared celular (Pitarch *et al*, 2002), ninguna de estas últimas covalentemente unida a los polímeros de la pared. Así, en *C. albicans* se han encontrado en pared proteínas relacionadas con estrés (Hsp y Ssa), o proteínas metabólicas como la 3 fosfoglicerato kinasa o la enolasa (Castillo *et al*, 2008).

El análisis de proteínas extraídas de la pared celular mediante diversos tratamientos (electroforesis bidimensional, unión a anticuerpos, espectrometría de masas y análisis *in silico*) ha permitido la identificación de muchas proteínas de pared (Castillo *et al*, 2008; Chaffin, 2008; Hernández *et al*, 2010). Algunas se encuentran atrapadas en la red de polímeros de la pared y otras covalentemente unidas a ellos. Entre estas las proteínas GPI y las Pir.

2.2.1.- Proteínas GPI

Varias proteínas integrales de pared son proteínas unidas a GPI (Glicosilfosfatidilinositol), estructura glicolípídica cuya función es anclar a las proteínas a la cara externa de la membrana plasmática o unir las a los polímeros de la pared. La porción oligosacáridica del anclaje GPI se une al β -1,6-glucano (Kollár *et al*, 1997).

Estas proteínas se caracterizan por presentar en su extremo N-terminal la señal de exportación (péptido señal) y en el C-terminal, la señal de anclaje al GPI siendo además ricas en residuos de Ser y Thr que están glicosilados.

En *C. albicans* las proteínas GPI constituyen alrededor del 88% del total de las proteínas covalentemente unidas a la pared. Análisis *in silico* han sugerido que *C. albicans* podría contener entre 115 (Richard & Plaine, 2007) y 234 (Eisenhaber *et al*, 2004) ORFs codificantes para proteínas GPI. Plaine y colaboradores construyeron y analizaron 45

mutantes correspondientes a estas proteínas (Plaine *et al*, 2008) observando que 15 de ellos presentaban alterada la integridad de la pared celular y 7 de estos presentaban cambios significativos en los niveles de quitina y glucanos, concluyendo que las proteínas GPI pueden tener papeles estructurales o contribuir a la biosíntesis y ensamblaje de componentes mayoritarios de la pared celular. En relación a su función en la remodelación de la pared celular, está descrito que si se perturba la biosíntesis del lípido GPI se ve afectada la formación completa de las hifas y la virulencia (Richard *et al*, 2002; Victoria *et al*, 2010).

La extracción de las proteínas GPI de la pared mediante tratamientos con HF/piridina y posteriores análisis proteómicos ha permitido la identificación de varias proteínas GPI en *C. albicans*. Posiblemente la proteína más abundante de la pared sea Ecm33p, la cual es importante para la arquitectura de la pared y virulencia (Martinez-Lopez *et al*, 2004, 2006). Tanto en *S. cerevisiae* como en *C. albicans* la pérdida de Ecm33p induce la ruta de integridad de pared (ruta MAPK PKC) (Pardo *et al*, 2004).

Algunas proteínas GPI permiten la adhesión a los tejidos del huésped y son importantes para la formación de biopelículas: Hwp1p, Eap1p, la familia de proteínas ALS (secuencias semejantes a las aglutininas) (de Groot *et al*, 2013), floculinas como Pga24p, enzimas que intervienen en la remodelación y biosíntesis de la pared celular, las quitinasas Cht3p (Dünkler *et al*, 2005) y Cht2p, la transglicosilasa Crh11p (Pardini *et al*, 2006), Pga4p, Phr1p, Scw1p (de Groot *et al*, 2004), etc. Algunas, como Pga26p y Pga13p son importantes para la morfogénesis (Laforet *et al*, 2011; Gelis *et al*, 2012). Otras están implicadas en la adaptación al estrés oxidativo como la superóxido dismutasa (Sod4p). Todas ellas influyen en la patogénesis de este organismo. La función de otras no se conoce.

2.2.2.- Proteínas Pir

Una segunda clase de proteínas la constituye una pequeña familia de proteínas con repeticiones internas, las proteínas Pir (Protein with Internal Repeats). Estas proteínas están unidas al β -1,3-glucano de la pared y se liberan de la pared mediante tratamiento alcalino suave, algunas quedan retenidas por puentes disulfuro (Garcerá *et al*, 2003; Lesage & Bussey, 2006). Se han identificado varias proteínas Pir en *C. albicans*, como Pir2p (Kapteyn *et al*, 2000) y Pir1p/Pga29p (Martínez *et al*, 2004; de Groot *et al*, 2004).

2.3.- Lípidos de la pared celular

El fosfolipomanano (PLM) está compuesto por esfingolípidos manosilados, formados por β -1,2-manosa covalentemente unida al dominio lipídico mediante enlace fosfodiéster con una α -manosa. Mit1p es la única transferasa responsable de la adición del manano al lípido

(Mille *et al*, 2004). El PLM es completado con unidades de β -manosa por la acción de Bmt5p y Bmt6p (Mille *et al*, 2012).

3.- PROCESOS DE N-GLICOSILACIÓN

La glicosilación (junto con la fosforilación) es una de las modificaciones post-traduccionales más frecuentes y desempeña un papel importante en el desarrollo de todos los organismos (Zielinska *et al*, 2012). La mayoría de las glicoproteínas se localizan en el exterior celular (en hongos en membrana y pared celular) y en compartimentos como el RE o el CG que forman parte de los sistemas membranosos encargados de transportar las proteínas hacia el exterior. En estrecha relación con su localización, estas proteínas juegan papeles importantes en procesos extracelulares tales como la comunicación celular y el desarrollo de los órganos en organismos pluricelulares complejos y en la organización y biogénesis de la pared en levaduras.

Existen diferentes formas de glicosilación, entre las que destacan la N-glicosilación, la O-glicosilación y la unión de un anclaje GPI. Dado que el objeto de esta tesis es el estudio de mutantes afectados en N-glicosilación, nos centraremos a explicar el proceso de N-glicosilación en general y más en detalle lo que se conoce acerca de estas modificaciones en el complejo de Golgi en base a los trabajos de investigación publicados sobre *C. albicans*.

Las proteínas que van a entrar en la ruta de secreción son sintetizadas en ribosomas asociados al RE y son transferidas co-traduccionalmente al lumen donde serán modificadas. En otros casos la transferencia es post-traduccional.

3.1.- N-glicosilación en el RE

El proceso de N-glicosilación comienza en el RE con la transferencia del oligosacárido $\text{Glc}_3\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$ ("núcleo oligosacárido") desde el lípido dolicolfosfato (DoIP) a la Asn de secuencias de la proteína Asn-X-Ser/Thr, siendo X cualquier aminoácido menos prolina.

El primer paso, por lo tanto, consiste en el ensamblaje de este precursor oligosacárido sobre el lípido transportador (DoIP), que tiene lugar en la cara citoplasmática y luminal del RE (Fig. 5). Este proceso es mediado por enzimas codificadas por los genes *ALG* (Asparagine Linked Glycosylation) (Burda & Aebi, 1999).

Las unidades glucídicas: NAcGlc, Man y Glc provienen del metabolismo primario y entran en la ruta como azúcares activados. UDP-NAcGlc y GDP-Man sirven de sustrato a transferasas que actúan en la parte citoplasmática del RE, mientras que DoI-P-Man y DoI-P-Glc (generados en el citoplasma a partir de DoI-P, GDP-Man y UDP-Glc, respectivamente) se

translocan a través de la membrana y son utilizados por manosil y glucosiltransferasas orientadas al lumen del RE.

A continuación, el precursor oligosacárido es transferido por el complejo oligosacariltransferasa (OST) a los residuos de Asn de la proteína. Los genes implicados en estos primeros pasos de la N-glicosilación se detallan en la Fig. 5.

Una vez transferido, los dos residuos terminales de Glc son extraídos por glucosidasas y la chaperona calnexina (Cne1p) se une específicamente al oligosacárido $\text{Glc}_1\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$. A continuación el último residuo de Glc es extraído y la glicoproteína se libera de la calnexina si se encuentra correctamente plegada. En caso contrario se adiciona al oligosacárido una nueva Glc y de nuevo la glicoproteína entra en el ciclo de la calnexina. La entrada en el ciclo de la calnexina es un punto de control que permite redirigir a las proteínas correctamente plegadas hacia la salida al C.G., mantenerlas dentro del RE para su correcto plegamiento o para su degradación siguiendo la ruta ERAD. Después de su liberación de la calnexina, dos manosidasas (Mns1 y Mnl1/2) pueden extraer uno o dos residuos de manosas. El procesamiento de este oligosacárido es un punto de control en la biosíntesis de las N-glicoproteínas (Mora-Montes *et al*, 2007).

Es importante remarcar que no todos los sitios potenciales de N-glicosilación son glicosilados *in vivo*. Se estima que aproximadamente 2/3 de dichos sitios se glicosilan (Apweiler *et al*, 1999; Zielinska *et al*, 2010). Se ha postulado que las secuencias que rodean a los sitios de glicosilación afectan a la glicosilación. Además, la distancia a dominios transmembrana o a otros sitios de glicosilación también pueden influenciar la glicosilación (Nilsson & von Heijne, 1993).

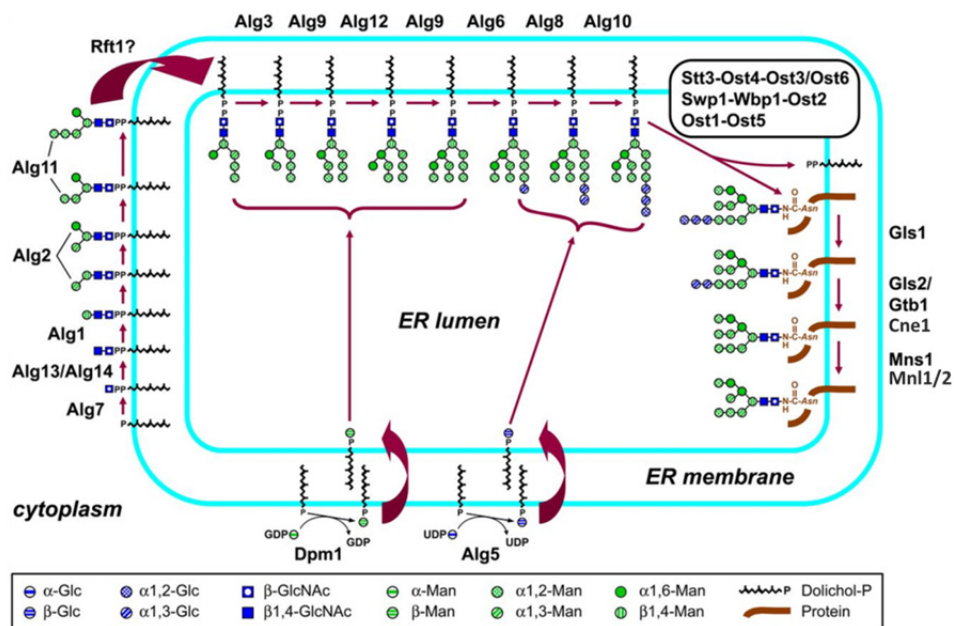


Fig. 5.- Esquema de N-glicosilación en el retículo endoplásmico. Modificado de Orlean (Orlean, 2012).

Muchas proteínas de pared contienen anclajes GPI. La unión de las proteínas nacientes a este lípido anclado en la membrana ocurre en el RE. Las proteínas GPI, además de contener en su secuencia un péptido señal que les permite entrar en el RE, contienen un péptido en su extremo C-terminal para poder unirse al lípido GPI preformado en la membrana del RE.

3.2.- N-glicosilación en el complejo de Golgi

El oligosacárido maduro $\text{Man}_8\text{GlcNAc}_2$ es similar en estructura en todos los eucariotas, sin embargo, el patrón de elaboración de las cadenas externas de N-manosas es específico de hongos.

En hongos el oligosacárido es modificado en el complejo de Golgi mediante la adición de un alto número de manosas (hasta más de 200 manosas) (Dean, 1999), y esas manoproteínas constituyen hasta un 40% del peso seco de la pared celular de la levadura.

Experimentos genéticos y bioquímicos llevados a cabo en *S. cerevisiae* han demostrado que la glicosilación en el Golgi consiste en la adición de manosas con enlaces α -1,6, α -1,2 y α -1,3 al oligosacárido y, en algunos glicanos, fosfomanosa. En los últimos años, las investigaciones realizadas en *C. albicans* han ido confirmando los resultados obtenidos con anterioridad en *S. cerevisiae* y encontrando algunas diferencias en esta levadura.

Muchas manosiltransferasas son específicas de hongos. Las manosiltransferasas actúan secuencialmente en el proceso de glicosilación, catalizando un paso concreto de la misma. La disponibilidad de las secuencias de los genomas está permitiendo descubrir que la maquinaria enzimática implicada en la glicosilación está muy conservada y que muchas manosiltransferasas son codificadas por familias de genes, es decir, hay redundancia funcional entre los miembros de una familia de genes (Hall & Gow, 2013; Bates *et al*, 2013). Los estudios se complican porque algunas familias pueden catalizar múltiples reacciones (Mora-Montes *et al*, 2010).

La adición de la primera α 1,6-manosa es catalizada por la manosiltransferasa Och1p. Como en el caso del mutante de *S. cerevisiae*, el mutante *och1* Δ de *C. albicans* carece de una cadena externa de manano, pero el núcleo oligosacárido contiene residuos adicionales de manosa (Bates *et al*, 2006). La delección de *och1* conlleva un acortamiento de las fibrillas de manano (Netea *et al*, 2006) que se pueden observar mediante microscopía electrónica en la parte más externa de la pared celular y un aumento en los niveles de quitina y glucano que da lugar a un engrosamiento de la pared celular (Bates *et al*, 2006).

La cadena se alarga en un esqueleto lineal de α 1,6-manosas formado por la acción secuencial de dos complejos enzimáticos: Manano-polimerasa I (M-Pol I) y manano-polimerasa II (M-Pol II). En el complejo M-Pol I de *S. cerevisiae* se encuentran Mnn9 y Van1, mientras que en M-Pol II se encuentran Mnn9, Anp1, Hoc1y Mnn11 (Hashimoto & Yoda, 1997; Jungmann & Munro, 1998b).

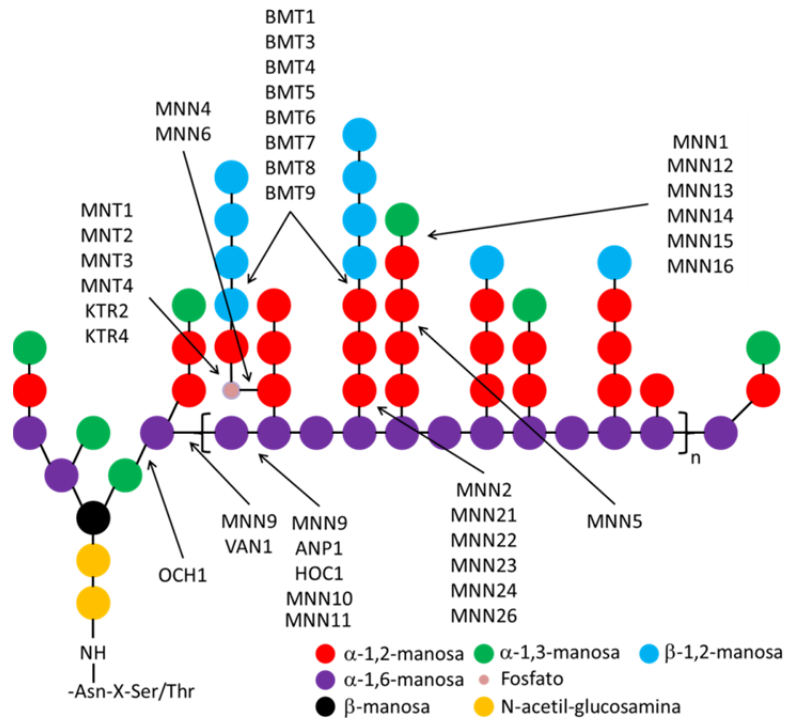


Fig. 6.- Esquema de actuación de algunos genes implicados en la extensión de la cadena externa del núcleo oligosacárido

El mutante *mnn9 Δ* de *S. cerevisiae* presenta severos defectos de glicosilación, el oligosacárido tiene una única α -1,6-manosa unida al núcleo oligosacárido de forma que la adición de α -1,6-manosas al esqueleto lineal está bloqueada, resultando en la formación de una estructura formada por $\text{Man}_{13}\text{GlcNac}_2$ (Tsai *et al*, 1984; Hernandez *et al*, 1989). Se ha descrito que la delección del ortólogo de *MNN9* en *C. albicans* tiene como consecuencia una disminución del 50% en los niveles de manano totales (Southard *et al*, 1999). Se ha propuesto que Mnn9 pudiera ser la proteína que contribuya en mayor medida a la extensión del esqueleto de α 1,6-manosa de la cadena externa del núcleo oligosacárido en *C. albicans*.

Este esqueleto es decorado a continuación con extensas ramas compuestas de α -1,2-manosas que se extienden hacia afuera del esqueleto. En *S. cerevisiae* la α -1,2-manosa inicial es transferida al esqueleto lineal de α -1,6-manosas por Mnn2 y la extensión de estas ramas con α -1,2-manosas la lleva a cabo Mnn5 (Rayner & Munro, 1998). En el genoma de *C. albicans* se ha identificado una familia de seis genes que pueden ser los ortólogos de Mnn2 y Mnn5 (Hall *et al*, 2013). La manosa inicial es transferida por Mnn2 y

Mnn26. El resto de los miembros de la familia (Mnn21, Mnn22, Mnn23, Mnn24) se requieren para la adición secuencial de α 1,2-manosas a las cadenas externas. La delección de los 6 genes de la familia causa el que únicamente esté presente en la cadena externa el esqueleto de α 1,6-manosa (Hall *et al*, 2013). Evidencias bioquímicas sugieren que Mnt5 es también necesaria para la adición de la segunda α 1,2-manosa a la cadena externa (Díaz-Jiménez *et al*, 2012), sugiriendo que puede haber cierto grado de redundancia en las rutas de biosíntesis de manano en *C. albicans*.

Tras la adición de las cadenas de α -1,2-manosa, la cadena externa se completa con la transferencia de α -1,3-manosa llevada a cabo por Mnn1 (Yip *et al*, 1994; Romero *et al*, 1999). Investigaciones muy recientes sobre la familia de genes *MNN1* de *C. albicans*, que comprende 6 miembros, han puesto de manifiesto que únicamente la delección de *MNN14* causa atenuación de la virulencia (Bates *et al*, 2013), sugiriendo cierto grado de redundancia funcional entre los diversos miembros de la familia.

A diferencia de *S. cerevisiae*, el N-manano de *C. albicans* contiene β -1,2-manosa que es transferida a la cadena externa del oligosacárido por las manosiltransferasas BMTs (BMT1, BMT3) (Mille *et al*, 2008). Las β -1,2-manosas se encuentran en cadenas oligosacáridicas unidas mediante grupos fosfato al manano sirviendo como epítipo común de los serotipos A y B de *C. albicans*. Estos oligosacáridos pueden ser liberados del resto de mananos mediante tratamiento con ácido débil (por ejemplo, 10 mM de HCl). Además, el serotipo A contiene en la fracción estable a ácido, β -1,2-manosas unidas a α -1,2-manosas. Este tipo de uniones corresponde a epítipos específicos del serotipo A. Algunos mananos de *Candida* también contienen β -1,2-manosas unidas a residuos de α -1,3-manosas (Shibata *et al*, 2007).

El β -manano se comporta como un fuerte antígeno y está implicado en adhesión celular (Han & Cutler, 1995; Dalle *et al*, 2003) por lo que tiene un papel importante en el reconocimiento por parte del sistema inmune.

Los residuos de β -1,2-manano unidos al N-glicano ramificado a través de un enlace fosfodiéster forman el fosfomanano o manano ácido-sensible. El manano extraído de *C. albicans* presenta mayor peso molecular que el extraído de *S. cerevisiae* y a diferencia de este incluye (como se ha comentado anteriormente) β -1,2-manosa así como mayores niveles de fosfomanano (Shibata *et al*, 1992). En *S. cerevisiae* se inicia la formación de la cadena de fosfomanano con la transferencia de un manosilfosfato a la cadena lateral de α -1,2-manosas mediante Mnn6 (también llamada Ktr6) (Odani *et al*, 1997). Debido al alto grado de similitud entre los miembros de la familia *KTR* y proteínas relacionadas, no se ha encontrado un claro homólogo de *KTR6* en *C. albicans* (Delic *et al*, 2013) pero los glicanos de *S. cerevisiae* y *C. albicans* están fosforilados, al contrario de lo que sucede en otras levaduras como *Kluyveromyces lactis* o *Schizosaccharomyces pombe* (Gemmill & Trimble, 1999; Jigami & Odani, 1999).

ScMNN4 codifica para un regulador positivo de *ScMNN6* (Odani *et al*, 1996). El mutante *mnn4Δ* de *C. albicans* carece de cadenas de fosfomanano aunque mantiene β -1,2-manosa en la fracción ácido-estable (Hobson *et al*, 2004; Singleton *et al*, 2005). Por otra parte, se ha sugerido que *Mnn4*, además de regular la adición de fosfomanano al α -1,2-manano, puede tener un efecto global sobre la síntesis de la fracción de manano ácido-estable (Hazen *et al*, 2007).

3.3.- Fenotipos de los mutantes delecionados en genes que codifican manosil transferasas que actúan en el complejo de Golgi.

Algunos de estos mutantes muestran fenotipos similares como son un crecimiento más lento, un incremento en el grado de floculación y cambios en la composición de la pared celular que implican no sólo una disminución del porcentaje de manano sino también un aumento de la cantidad de otros polímeros estructurales de la misma como la quitina o el glucano que puede explicarse como un mecanismo compensatorio de protección para el mantenimiento de la integridad celular. De hecho, en algunos se ha observado que presentan activada la ruta de integridad celular así como defectos en filamentación. Otro fenotipo común observado es una atenuación de la virulencia.

Sin embargo algunas mutaciones en genes individuales causan fenotipos poco o nada apreciables, esto puede explicarse por el hecho de la existencia de familias de genes cuyos miembros presentan redundancia funcional.

Tabla II.- Fenotipos de mutantes afectados en el proceso de N-glicosilación en el aparato de Golgi.

GEN	FENOTIPO					
	CRECIMIENTO Y MORFOLOGÍA	PARED CELULAR	SENSIBILIDAD	ADHESION Y FAGOCITOSIS	VIRULENCIA	REFERENCIAS
VRG4	Hifa (-) Floculación (+)	PM (-)				(Nishikawa <i>et al</i> , 2002)
CWH41	Crecimiento (-) Floculación (+) Hifa (-)	PM (-) Glucano (-) Quitina (+) Proteínas (+)	Mayor RC, CFW, SDS y antifúngicos		Murino (-)	(Mora-Montes <i>et al</i> , 2007)
ROT2	Crecimiento (-) Floculación (+)	PM (-) Manano (-) Glucano (-) Quitina (+) Proteínas (+)	Mayor RC, CFW, SDS y antifúngicos		Murino (-)	(Mora-Montes <i>et al</i> , 2007)
MNS1	Crecimiento (-) Floculación (+)	PM (-)	Mayor a RC y CFW	Macrófagos (+)	Murino (-)	(Mora-Montes <i>et al</i> , 2007; McKenzie <i>et al</i> , 2010)
OCH1	Tamaño (+) Crecimiento (-) Separación (-) Hifa (-)	PM (-) Manano (-) Quitina (+) Glucano (+)	Mayor a RC, CFW, SDS, calor y antifúngicos	Epitelio (-) Neutrófilos (-)	Murino (-)	(Bates <i>et al</i> , 2006; Sheth <i>et al</i> , 2011; Murciano <i>et al</i> , 2011)
Familia MNN1	Hifa (-) en <i>mnn14Δ</i>	PM (+) en <i>mnn14Δ</i>	Mayor a SDS y antifúngicos en <i>mnn14Δ</i>		Murino (-) en <i>mnn14Δ</i>	(Bates <i>et al</i> , 2013)
Familia MNN2	Crecimiento (-) y Floculación (+) en doble, triple, quintuple y séxtuple mutante Hifa (retraso en <i>mnn22Δ</i> , quintuple y séxtuple mutante)	N-manano (-) y PM (-) en 2Δ, 3Δ, 5Δ y 6Δ. Quitina (+)	Mayor a RC, CFW y SDS		Murino (-) <i>Galleria mellonella</i> (-)	(Bai <i>et al</i> , 2006; Hall <i>et al</i> , 2013)
MNN4	Normal	PM (-)	Normal	Neutrófilos (-) Macrófagos (-)	Normal	(Hobson <i>et al</i> , 2004; McKenzie <i>et al</i> , 2010; Sheth <i>et al</i> , 2011)
MNN9	Crecimiento (-) Floculación (+) Hifa (-)	Manano (-)	Mayor a antifúngicos	Epitelio (-)		(Southard <i>et al</i> , 1999; Murciano <i>et al</i> , 2011)
BMT1-9	Normal	Normal	Normal		Normal	(Mille <i>et al</i> , 2008)
MNT3-5	Floculación (+) en mutantes múltiples	PM (-)	Mayor a CFW, SDS y antifúngicos en mutantes múltiples	Macrófagos (-)	Murino (-) en mutantes múltiples	(Mora-Montes <i>et al</i> , 2010; McKenzie <i>et al</i> , 2010)
MIT1	Normal	PLM (nulo) PM (- β-manosa)	Mayor a calcio y SDS	Fagocitosis (+)	Murino (-)	(Mille <i>et al</i> , 2004)
PMR1	Hifa (retraso)	PM (-) O-manano (-)	Mayor a RC, CFW, SDS, calor y antifúngicos	Neutrófilos (-) Macrófagos (-)	Murino (-)	(Bates <i>et al</i> , 2005; McKenzie <i>et al</i> , 2010; Sheth <i>et al</i> , 2011)

OBJETIVOS

La pared celular de *Candida albicans* está compuesta de una capa interna de quitina y β -1,3- y β -1,6-glucanos y una capa externa rica en manoproteínas y que contribuye al 40% de la masa de la pared celular. Las manoproteínas tienen importantes funciones en los procesos de adhesión, antigenicidad, modulación de la respuesta inmune del hospedador y en el reconocimiento de este hongo por el sistema inmune innato. Variaciones en la glicosilación pueden afectar a la conformación de estas proteínas y a la abundancia relativa de las estructuras fibrilares en que se organizan algunas, llevando a cambios de hidrofobicidad en la superficie celular que pueden afectar a la virulencia. Las manoproteínas pueden, además, influir directamente en la patogenia de este microorganismo

Con objeto de profundizar en el estudio de los procesos de glicosilación y su relevancia en *C. albicans*, nos hemos propuesto caracterizar dos genes, *MNN9* y *MNN1*, que codifican manosiltransferasas cuya función, por homología con otros hongos, es adicionar manosas a las cadenas externas del oligosacárido de las N-glicoproteínas, una de ellas actúa extendiendo el esqueleto de α -1,6 -manosas y otra adicionando α -1,3 -manosas a las ramificaciones de este.

Como objetivos específicos, en este trabajo de Tesis nos hemos propuesto:

1.- Aportar datos acerca de la localización subcelular de Mnn9p en *C. albicans* mediante la construcción de la fusión *MNN9-GFP* y la observación de las cepas transformadas con ella utilizando microscopía de fluorescencia.

2.- Construir el mutante *Camnn1* Δ mediante la técnica del "Ura-Blaster".

3.- Analizar características fenotípicas de los mutantes nulos *Camnn9* Δ y *Camnn1* Δ como son la morfología que presentan las células y colonias en distintas condiciones de crecimiento, la capacidad de diferenciación en hifa y clamidosporas, de invadir el agar y de formar biopelículas, con objeto de examinar si están afectados en procesos morfogénicos.

4.- Analizar la sensibilidad de dichos mutantes a agentes que afectan a la superficie celular, con el fin de saber si presentan alteraciones que comprometen su integridad celular.

5.- Llevar a cabo análisis de virulencia en un modelo murino para determinar si las cepas mutantes *Camnn9* Δ y *Camnn1* Δ presentan defectos en virulencia.

6.- Determinar si las glicoproteínas sintetizadas por los mutantes se encuentran muy alteradas mediante el estudio de la movilidad electroforética de una proteína de referencia altamente N-glicosilada en *C. albicans*.

7.- Explorar el estado de activación de las rutas MAPK de transducción de señales de integridad celular, de filamentación y de respuesta a estrés osmótico/oxidativo en los mutantes mediante análisis tipo "Western-Blotting", con objeto de conocer si estos responden a los defectos en glicosilación a través de alguna de estas rutas.

8.- Realizar un análisis de la expresión global de genes de los mutantes *Camnn9Δ* y *Camnn1Δ* respecto a CAI4, la cepa parental, durante la fase exponencial de crecimiento y a los tiempos 15, 60 y 180 minutos de inducción de la filamentación con objeto de conocer si tienen lugar reajustes transcripcionales importantes de adaptación en diversos procesos.

MATERIALES Y MÉTODOS

1.- CEPAS Y CEBADORES UTILIZADOS

La siguiente tabla muestra los microorganismos utilizados en este trabajo y su correspondiente genotipo.

Tabla III.- Cepas utilizadas en el presente trabajo.			
Cepa	Genotipo	Cepa parental	Procedencia
SC5314	Aislado clínico		(Gillum <i>et al</i> , 1984)
CAI4	<i>ura3Δ::imm434/ura3Δ::imm434</i>	CAF 2-1	(Fonzi & Irwin, 1993)
CAMR	<i>ura3Δ::imm434/URA3</i>	CAI4	R.P.S. Rodrigues y A. Domínguez (2005)
SSCA-2 o <i>mnn9Δ</i>	<i>mnn9Δ::hisG/mnn9Δ::hisG ura3Δ::imm434/ura3Δ::imm434</i>	CAI4	(Southard <i>et al</i> , 1999)
CVM9-M9 o <i>mnn9Δ-pMNN9</i>	SSCA-2 transformada con el plásmido pMNN9	SSCA-2	Este trabajo
CVM9-R o <i>mnn9Δ-R</i>	<i>mnn9Δ::hisG/mnn9Δ::hisG ura3Δ::imm434/URA3</i>	SSCA-2	Este trabajo
CVC-GFP o CAI4-GFP	CAI4 transformada con el plásmido pCIV2	CAI4	Este trabajo
CVM9-GFP o <i>mnn9Δ-GFP</i>	SSCA-2 transformada con el plásmido pCIV2	SSCA-2	Este trabajo
CVC-HEX o CAI4-HEX1	CAI4 transformada con el plásmido <i>pHEX1-13xMYC</i>	CAI4	Este trabajo
CVM9-HEX o <i>mnn9Δ-HEX1</i>	SSCA-2 transformada con el plásmido <i>pHEX1-13xMYC</i>	SSCA-2	Este trabajo
CVM1 o <i>mnn1Δ</i>	<i>mnn1Δ::hisG/mnn1Δ::hisG ura3Δ::imm434/ura3Δ::imm434</i>	CAI4	Este trabajo
CVM1-R o <i>mnn1Δ-R</i>	<i>mnn1Δ::hisG/mnn1Δ::hisG ura3Δ::imm434/URA3</i>	CVM1	Este trabajo
CVM1-HEX o <i>mnn1Δ-HEX1</i>	<i>mnn1Δ</i> transformada con el plásmido <i>pHEX1-13xMYC</i>	CVM1	Este trabajo

La siguiente tabla muestra los cebadores utilizados en este trabajo y su secuencia.

Tabla IV.- Cebadores utilizados en el presente trabajo.

Cebador	Secuencia 5'-3'
ACT1 S1	ACAGTTTCACTACTAGTGCTG
ACT1 S2	TGTGGTGAACAATGGATG
ACT1(RT)-f	TTGGATTCTGGTGATGGTGT
ACT1(RT)-r	TGGACAAATGGTTGGTCAAG
AMH1	CCGAACATCAACCAATCGT
Ca MNN1 INNER	GTGGAGACTCGGTTTCCTCA
Ca MNN1 OUTER	GTAATGGTTTTTGAAGTCGCTAGT
Ca1548P1	GTTGATGCCGGTACCCACAGT
Ca1548P2	CAGAGGAAAACCTGAGCAATTC
Ca1548P3	CTGCAAAAATGTGCACCC
Ca1548T1	GGGTAGCCGCGGAGTAAATAGA
Ca1548T2	TGAATTGAGCTCCAGCAAGAAG
Ca1548T3	ACCGTGGTTCACGAGTA
CaMNN1-3- INNER	GGGAGTCGGGTTATTGCA
CaMNN1-3- OUTER	CTCATGCTGTTGTACCAC
CaMNN9-3- INNER	CATAGAGCATTAAATGGCTC
CaMNN9-3- OUTER	GGGTGAAAAGTGAGGAAG
HEX1 f MYC	ATCGCAGATCTTGAACAAAATGG
HEX1 r MYC	CTGGTGGATTTTAAATTAATCAC
HIS1	ACGCATAGCTATTCAGAAATCAGG
HIS2	TTTCTCCATGGTTCCAGAACAA
IP2	TTACAATCAAAGGTGGTCC
IP3	GGTACAGTTCCTCACATC

Cebador	Secuencia 5'-3'
MNN9 qf	GACATTAGACGGTGTGGTGG
MNN9 qr	CCATTTTAGCAAATCCTTCC
MNN9 reconstrucción forward	TGTTGATTGTAGCTGTTCTTCG
MNN9 reconstrucción reverse	GCTGTTGGTGGTTATAGTGATGA
MNN9-1	TCAGCAATCATGGTTCAC
MNN9-2	GTGACCAGTCAAGTCTTG
MNN9-5	CCCGGGCAGCAATCATGGTTCAC
MNN9-7	CCCGGGATTATAATGGAAAATAAG
pBI MYC f	CCGGTAACGCTCTAGGATCTGTGA
pBI MYC r	AAACGACGGCCAGTGAATCCC
pBI pCK f	CGACGGATCCACTGTATTCCA
pBI pCK r	GGTCTATCGCTAGTTTCG
PBI1	ATGCCCCGGGACAAGGGAA
PBI2	AAGGAACCGCCAGCAGGTGC
FUN12 qf	GTTCGTACCGATCCAACCA
FUN12 qr	CCAGCAGCAGTTTGACCTT
PGA62 qf	CCAGCTCAAGAAACCACTCC
PGA62 qr	AGCAACTGGGACAGCGTTAG
SSU81 qf	TTCAGTTCACCACATGTACC
SSU81 qr	GTCCTCCTCCACTACCACCA
URA1	GGATACTATCAAACAAGAGG
URA2	AATGCTGGTTGGAATGCTTA

2.- PLÁSMIDOS UTILIZADOS

2.1.- pGEM-T Easy

Vector bacteriano linealizado de 3.0 Kb (3015 pb) preparado por la casa comercial Promega a partir de la digestión con *EcoRV* del vector pGEM-5Z (f^+) y la adición de una timidina en posición 3' en cada uno de los extremos generados. La presencia de estas bases aumenta la eficiencia de ligación de productos de PCR con el vector, ya que la Taq polimerasa deja desoxiadenosinas en los extremos 3' del fragmento de DNA amplificado.

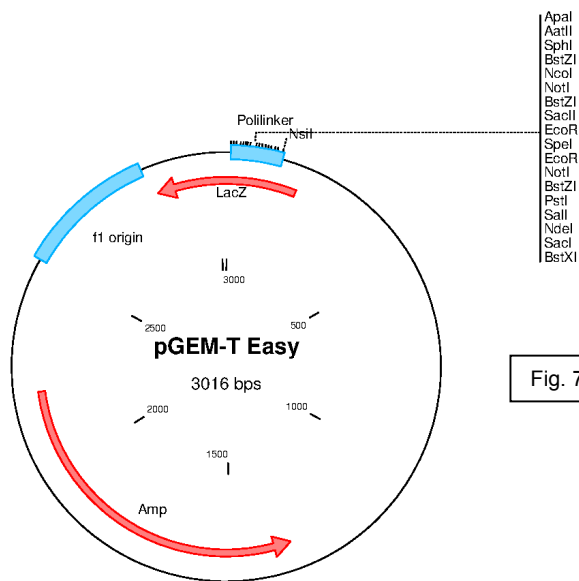


Fig. 7.- Esquema del plásmido pGEM-T Easy.

El vector pGEM-T Easy contiene el origen de replicación relajada colE1, el gen de resistencia a ampicilina, el origen de replicación del fago f1, los promotores y los puntos de inicio de la transcripción de RNA polimerasas T3 y SP6 que permiten la síntesis de RNA *in vitro* y un sitio de clonación múltiple insertado en la fase de lectura del gen que codifica el péptido α de la β -galactosidasa, permitiendo la diferenciación de los plásmidos recombinantes con inserto.

2.2.- pSNC1

Plásmido bacteriano replicativo de 7 Kb construido por la Dra. Freida Monterola (2002). Contiene el cassette *hisG-CaURA3-hisG*, introducido en el vector pBluescript KS+. Se utiliza para la construcción de plásmidos recombinantes que permiten la interrupción de genes en *C. albicans* mediante el método del "Ura-blaster" (Fonzi & Irwin, 1993).

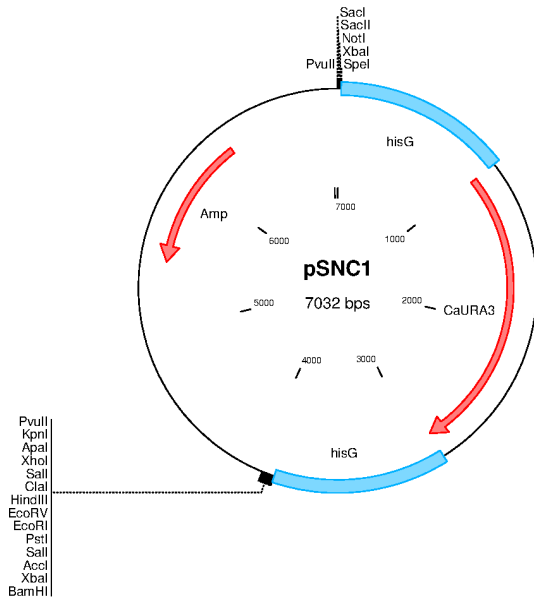
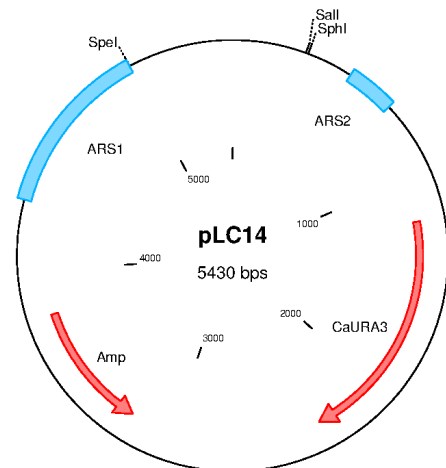


Fig. 8.- Esquema del plásmido pSNC1.

2.3.- pLC14

Plásmido replicativo de *E. coli* y *C. albicans* de 5,43 Kb construido a partir del vector pGM2 (Zaragoza *et al*, 2002). Contiene el gen *CaURA3* como marcador de selección y secuencias de replicación autónomas en *E. coli* y *C. albicans*. Ha sido utilizado en el presente trabajo para construir el plásmido pMNN9 con objeto de realizar los experimentos de complementación de la cepa delecionada en *MNN9*.

Fig. 9.- Esquema del plásmido pLC14.



2.4.- pAG1

Plásmido replicativo de *E. coli* y *C. albicans* de 10,7 Kb. Fue construido a partir del vector pIR4 en el que se clonó el gen que codifica para la GFP o proteína verde fluorescente procedente de la medusa *Aequorea victoria* (Gonzalez-Novo *et al.*, 2004). La secuencia *GFP3*

insertada se amplificó a partir del plásmido pYGF3, el cual contiene la secuencia original del gen pero modificada para optimizar su uso en *C. albicans* (Cormack *et al.*, 1997). La GFP original es una proteína de 238 aminoácidos que absorbe energía a 395 nm y emite fluorescencia a 507 nm. La secuencia modificada posee estas mismas características pero el único codón CTG presente en la ORF ha sido sustituido por TTG, con objeto de que sea traducido por *C. albicans* como leucina, que es el aminoácido presente en la secuencia original.

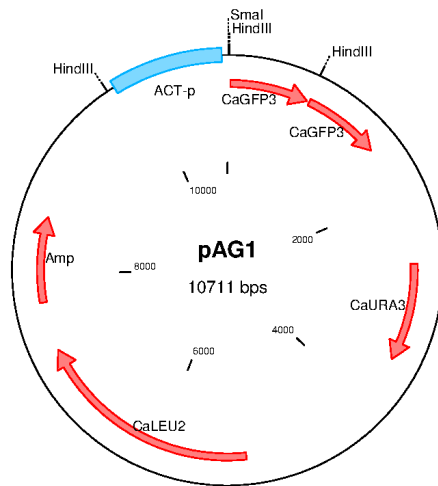


Fig. 10.- Esquema del plásmido pAG1.

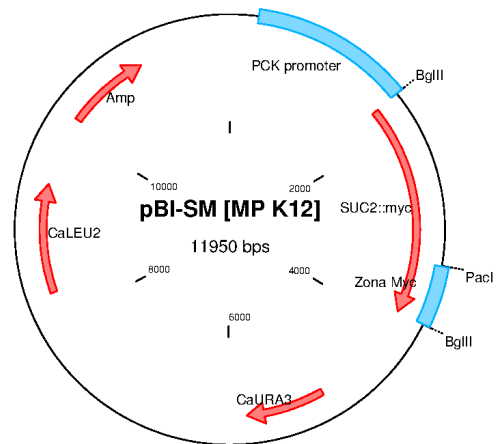
La secuencia *GFP3* fue clonada en el sitio *SmaI*, localizado detrás del promotor del gen que codifica para la actina de *C. albicans*. En el proceso de clonación se insertaron dos copias del gen *GFP3* en tándem, sin que ello afectara a la funcionalidad del plásmido, ya que la proteína de fusión únicamente llevará una copia de la *GFP*. El vector contiene además la secuencia de replicación autónoma en levaduras *ARS2*, el origen de replicación *ori1* de *E. coli*, los marcadores de selección de *C. albicans* *CaURA3* y *CaLEU2*, y el gen de resistencia a ampicilina como marcador de selección en *E. coli*. Los sitios de restricción *SmaI* y *BamHI* en el extremo 5' del gen *GFP3* permiten la inserción en fase de la secuencia (sin el codón de terminación) de la proteína a la que se desea fusionar en su extremo C-terminal la *GFP*.

2.5.- pBI-SM [MP K12]

Plásmido replicativo de *E. coli* y *C. albicans* de 11,9 Kb cedido amablemente por el Dr. Joachim Ernst. Fue construido a partir del vector pBI-1 y contiene la secuencia del gen *SUC2* en cuyo extremo C-terminal lleva fusionada la secuencia *MYC* para su detección mediante Western-blotting. Contiene el promotor de la *PCK* para permitir su expresión en medios líquidos inductores (YNB sin glucosa y con 4% de casaminoácidos como fuente de carbono). Este plásmido contiene además los genes *CaLEU2* y *CaURA3* como marcadores de selección en *C. albicans*, así como el gen de resistencia a ampicilina para su selección en *E. coli*. Contiene también los sitios de replicación autónoma *ARS1* y *ARS2* de levaduras. Este

plásmido nos ha servido como base para la construcción de otros plásmidos en los que hemos sustituido la secuencia del gen *SUC2* por la de otros genes de interés.

Fig. 11.- Esquema del plásmido pBI-SM [MP K12].

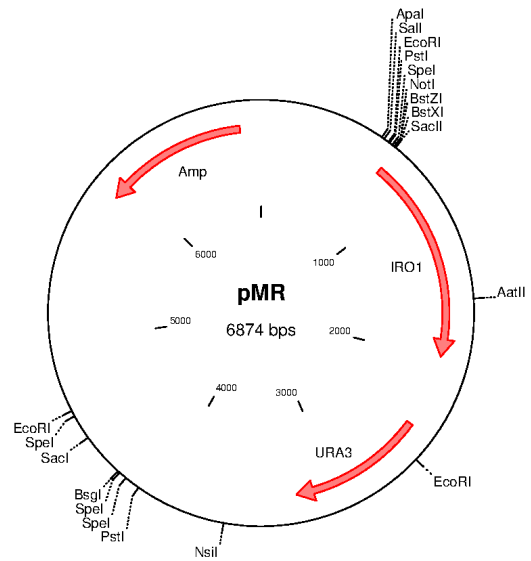


2.6.- pMR

Plásmido de 6,5 Kb replicativo en *E. Coli* construido por la Lda. Rita P. Rodrigues. Ha sido utilizado en el presente trabajo para la inserción del gen *CaURA3* en uno de los dos locus *URA3* de la cepa SSCA-2. Fue construido a partir de la clonación en el sitio *SacI* del plásmido pBluescript SK+, de un fragmento de DNA que contiene la ORF del gen *CaURA3* junto a sus secuencias promotora y terminadora (desde el nucleótido -1659 respecto al ATG inicial de *CaURA3* hasta el nucleótido 1448 respecto al codón de terminación).

Las secuencias de los extremos de dicho fragmento de DNA son homólogas a las regiones flanqueantes de la secuencia *imm434* del fago λ gt10 que substituye al gen *CaURA3* en el genoma de CAI4 (y cepas derivadas) por lo que las moléculas de DNA son dirigidas al locus correcto por recombinación homóloga. El fragmento clonado incluye la parte del gen *CaIRO1* que se deletionó junto a la secuencia *CaURA3* durante la construcción de la cepa CAI4 (Fonzi & Irwin, 1993) por lo que su inserción permite recuperar tanto la expresión del gen *CaURA3* como la del gen *CaIRO1*.

Fig. 12.- Esquema del plásmido pMR.



3.- MEDIOS DE CULTIVO Y CONDICIONES DE CRECIMIENTO

Todos los medios de cultivo se prepararon con agua destilada. Para obtener los medios sólidos se añadió agar hasta una concentración final del 2%, salvo en los casos indicados. Los medios se suplementaron con uridina hasta una concentración de 1 mM para lograr el crecimiento de los auxótrofos Ura^- de *C. albicans*. En algunos casos, a los medios utilizados para el crecimiento de levaduras, se añadió ampicilina hasta una concentración de 1 mM.

3.1.- Medios de cultivo de *C. albicans*

3.1.1.- Crecimiento en forma de levadura.

Yeast Nitrogen Base (YNB)

- Base nitrogenada de levadura sin aa (YNB w/o aa)	0,67%
- Glucosa	1%

Yeast Extract Peptone Dextrose (YEPD)

- Extracto de levadura	1%
- Glucosa	1%
- Bactopeptona	2%

Medio Lee

- SO ₄ (NH ₄) ₂	0,5%	- Glucosa	1,25%
- MgSO ₄ 7H ₂ O	0,02%	- Prolina	0,05%
- K ₂ HPO ₄	0,25%	- Biotina	0,001%
- NaCl	0,5%		

Este medio se preparó ajustando el pH a 6,8 con HCl 37% (Lee *et al.*, 1975).

YNB con 5-FOA

Este medio se utiliza para realizar deleciones según el método del "Ura-blaster" (Fonzi & Irwin, 1993). Es un medio sólido de la misma composición que el YNB, con la salvedad de que contiene ácido 5-fluoroorotico (5-FOA) a razón de 625 µg/ml.

Los cultivos en medio líquido de *C. albicans* se realizaron en matraces Erlenmeyer. El volumen del medio fue siempre inferior a un tercio del volumen del matraz. Las incubaciones se llevaron a cabo en agitadores orbitales a 200 rpm y a 28°C.

El crecimiento se determinó midiendo la absorbancia en un espectrofotómetro a una longitud de onda de 600 nm, o mediante el recuento de células en una cámara Thoma.

3.1.2.- Inducción de la formación de micelio en medio sólido

Los medios sólidos utilizados para la inducción de crecimiento filamentoso en *C. albicans* se describen a continuación. En todos los casos las células se sembraron a razón de 50 a 100 ufc por placa y se incubaron a 37°C, exceptuando el medio embedded en el que la temperatura de incubación fue de 28°C.

Spider

- Manitol	1%
- Nutrient Broth	1%
- K ₂ HPO ₄	0,2%
- Agar	2%

SLADH

- Base nitrogenada de levaduras sin aminoácidos ni sulfato amónico	0,67%
- Glucosa	2%
- Sulfato de amonio	0,05mM
- Bactoagar	2%

Medio Lee, pH 6,8: de igual composición que el descrito para levaduras pero conteniendo agar al 2% (Lee *et al.*, 1975)

Medio Lee/N-Acetilglucosamina: Medio Lee modificado en el que en lugar de glucosa se añade NAcGlc al 1,25% como fuente de carbono.

Medio Lee + Suero 4%: Medio Lee que contiene suero bovino fetal al 4%

EMBEDDED

- Extracto de levadura	1%
- Glucosa	1%
- Bactopeptona	2%
- Bactoagar	1%

La siembra en este medio fue una siembra en masa: la suspensión de células se mezcló con este medio previamente mantenido a 50°C. A continuación se vertió en placas que se dejaron solidificar y se incubaron a 28°C durante 3 días.

3.1.3.- Inducción de la formación de micelio en medio líquido

Las células se incubaron en matraces con medio Lee, pH 6,8, a 28°C y 200 rpm durante aproximadamente 16 horas. Las células en forma de levadura y en fase exponencial de crecimiento, se recogieron, lavaron y resuspendieron en agua destilada a razón de 2×10^7 células/ml. Se incubaron durante 2 horas a 28°C y 200 rpm con el fin de que la mayoría de las células completaran un ciclo de división y se estabilizaran en G1. A continuación se mantuvieron entre 24 y 48 horas a 4°C en reposo metabólico. Las células así tratadas se inocularon a una concentración de 10^7 células/ml en medio Lee precalentado a 37°C. La incubación se llevó a cabo a 37°C y 200 rpm, observándose los tubos germinativos cortos e hifas a partir de 1 y 3 horas de incubación, respectivamente. Con el fin de comprobar que la transición se producía en respuesta a las condiciones ensayadas se incubaron en paralelo células, que habían sido sometidas de igual modo a un reposo metabólico, en medio Lee, pH 6,8, a 28°C comprobándose que estas células se mantenían en forma de levaduras.

3.2.- Cultivo de *Escherichia coli*

La cepa de *E. coli* utilizada para los experimentos de clonación molecular fue DH5 α (Hanahan & Meselson, 1983). Los cultivos de *E. coli* se incubaron en medio LB a 37°C.

Medio Luria Bertani (LB)

- Extracto de levadura	0,5%
- Bactotripton	1%
- NaCl	1%

Ajustando a pH 7,4 con NaOH

Para la selección de clones resistentes a ampicilina, se añadió ésta a los medios a una concentración final de 100 μ g/ml. Con objeto de diferenciar los clones con o sin actividad β -galactosidasa (por ejemplo, con o sin inserto en el plásmido pGEM-T Easy), las células se sembraron en placas conteniendo medio sólido LB-Ampicilina suplementado con IPTG (0,5 mM) y X-Gal (0,05 mg/ml).

4.- MANTENIMIENTO DE LOS MICROORGANISMOS

Las cepas microbianas se conservaron mediante resiembras periódicas en placas de medio sólido, que tras la incubación a la temperatura adecuada se mantuvieron a 4°C. Con la finalidad de mantener las células microbianas viables durante largos periodos de tiempo, se almacenaron en viales con glicerol al 30% o 50% en ultracongeladores a -80°C.

5.- ANALISIS DE LA SENSIBILIDAD A COMPUESTOS QUE AFECTAN A LA ESTRUCTURA DE LA PARED CELULAR

5.1.- Análisis de sensibilidad en placa.

A partir de células cultivadas hasta fase exponencial de crecimiento, se prepararon suspensiones conteniendo aproximadamente 10^8 células/ml y se realizaron diluciones seriadas 1:10. Se tomaron 3 μ l de cada una de las diluciones y se sembraron en placas de medio mínimo conteniendo diferentes concentraciones de los compuestos a analizar: anfotericina B (50 μ g/ml), cafeína (10 mM), Calcofluor White (30 μ g/ml), fluconazol (2 μ g/ml), itraconazol (2 μ g/ml), NaCl (1 M), Rojo Congo (10 μ g/ml), SDS (0,005%).

Las diferencias en el crecimiento de las distintas cepas se valoraron después de 72 horas de incubación a 28°C.

5.2.- Ensayo de afinidad a “Alcian Blue”

El “Alcian Blue” es un colorante catiónico no fluorescente que se une específicamente a las cadenas de fosfomanosas presentes en la superficie celular de las levaduras (Ballou, 1990). Este ensayo permite detectar diferencias en las manoproteínas que forman parte de la pared celular.

Las células, recogidas de cultivos en fase de crecimiento exponencial, se lavaron 2 veces con HCl 0,02 N y se resuspendieron en agua a una D.O. de 2. Un mililitro de estas suspensiones se centrifugó y se resuspendió en 1,5 ml, de una solución de Alcian blue 0,005%, incubándose durante 10 min a temperatura ambiente en oscuridad. Se centrifugó 3 minutos a 13000 rpm y se midió la absorbancia de los sobrenadantes a 600 nm.

La concentración de “Alcian Blue” de cada sobrenadante se determinó por comparación con una recta patrón que permitió relacionar la concentración de colorante con la absorbancia y cuyo coeficiente de correlación fue cercano a 1,00. A partir de esta concentración se estimó el porcentaje fijado por las células considerando como 100% de

colorante no fijado a la medida del sobrenadante de una muestra en la que no se incluyeron células.

5.3.- Análisis de sensibilidad a peróxido de hidrógeno.

Se prepararon los correspondientes cultivos de *C. albicans* en 10 ml de YNB con una D.O. inicial de 0,1 y se incubaron a 28°C. Cuando alcanzaron una D.O. de 1, se preparó una dilución de cada uno de ellos a una D.O. de 0,4 en un volumen de 1 ml.

Se recogieron 10 µl de cada una de las muestras y se depositaron en forma de gota en una placa de YNB (tiempo 0), al volumen restante de muestra se le añadió H₂O₂ hasta una concentración final de 100 mM. Las células así tratadas se incubaron con agitación. A diferentes tiempos, comprendidos entre 1 y 30 minutos, se extrajeron alícuotas de 10 µl de cada una de las muestras y se fueron depositando de forma sucesiva sobre placas de YNB. Las diferencias de crecimiento se valoraron después de 3 días de incubación a 28°C.

6.- ENSAYOS DE VIRULENCIA

Se prepararon cultivos de cada una de las cepas de *C. albicans* en 100 ml de YEPD a una D.O. inicial de 0,03. Se incubaron durante 12 horas a 28°C con el fin de obtener células en forma de levadura y en fase exponencial de crecimiento. Las células se recogieron, se lavaron dos veces con PBS 1X y se resuspendieron a una concentración de 5X10⁸ células/ml en este tampón. La concentración celular de la suspensión final se verificó en una cámara Thoma y por absorbancia a 600 nm. A partir de dicha suspensión se inocularon por vía intraperitoneal 10 ratones CD1 (machos de aproximadamente 20 g de peso) con 10⁸ células de *C. albicans* cada uno. A partir del día de infección se realizó un seguimiento diario de la supervivencia de los ratones infectados que se prolongó hasta el día 31.

Diversos trabajos han advertido que las diferencias de nivel de expresión del gen *URA3* debidas a la diferente localización de este marcador en las cepas obtenidas por la técnica del "URA blaster", así como a la delección de parte del gen *CaIRO1* presente en las cepas derivadas de la CAI4, pueden afectar a la virulencia (Staab & Sundstrom, 2003; Brand *et al*, 2004; Chibana *et al*, 2005). Por todo ello, estos ensayos se realizaron utilizando cepas en las que uno de los locus *CaURA3* originales se reconstruyó introduciendo el fragmento delecionado. La cepa control fue CAMR (*ura3Δ::imm434/URA3*) obtenida previamente en nuestro laboratorio por la doctora Rita P.S. Rodrigues a partir de la cepa CAI4.

El tamaño del inóculo (10⁸ células) se determinó teniendo en cuenta análisis previos realizados en nuestro laboratorio en los que se ensayaron varias concentraciones de células de la cepa control. Ratones infectados con 10⁸ células de CAMR presentaron una disminución de la supervivencia gradual, de forma que transcurridos 10 días desde la inoculación, el

porcentaje de supervivencia era del 30% y a los 18 días no había supervivientes, por lo que se consideró una dosis apropiada para observar alteraciones en la virulencia de cepas mutantes.

7.- TRANSFORMACIONES

7.1.- Transformación de *E. coli*

El método de transformación de *E. Coli*, basado en someter a las células a choque térmico fue descrito por Kushner (1988). En el caso de que se requiriera detectar la actividad β -galactosidasa de los clones seleccionados, se añadía al medio LB con ampicilina IPTG (0,5 mM) y X-Gal (80 μ g/ml).

7.2.- Transformación de *C. albicans*

En este trabajo se ha utilizado para realizar las transformaciones de *C. albicans* el protocolo de transformación por acetato de litio descrito por (Walther and Wendland, 2003) ligeramente modificado.

Se crecieron las células en medio completo (YEPD) hasta fase estacionaria. Posteriormente se resembraron en YEPD a una D.O.₆₀₀ de 0,3 y se incubó el cultivo durante 4 horas a 28°C. Se recogieron las células por centrifugación y se lavaron con agua estéril. A continuación se resuspendieron en 1 ml de solución de LiAc (LiAc 100 mM, Tris-HCl pH 7,5 10 mM, EDTA 1 mM).

A 100 μ l de las células tratadas con la solución de LiAc, se añadió de 1 a 5 μ g de DNA (del plásmido o fragmento de DNA con el que se quería transformar las células), y 50 μ g de DNA de esperma de salmón (Clontech) previamente desnaturalizado. A continuación se añadieron 300 μ l de una solución PEG/LiAc (PEG4000 al 50% en solución de LiAc) y se mezcló brevemente en vortex. Esta mezcla se incubó desde 30 minutos a toda una noche (esto último es lo preferible) y se sometió a un choque térmico de 15 a 30 minutos a 44°C. Se recogieron las células mediante centrifugación a 13000 rpm durante 2 minutos y se resuspendieron en medio mínimo (YNB). Se sembraron en placas de medio selectivo que se incubaron a 28°C durante 4 días.

8.- TÉCNICAS DE MANIPULACIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS

8.1.- Purificación de DNA plasmídico de *E. Coli*

La obtención de DNA plasmídico a pequeña escala (cultivos de 1 a 5 ml en LB-Ampicilina) se realizó siguiendo el método de lisis alcalina (Birnboim and Doly, 1979). El sedimento de células del cultivo se resuspendió en 0,3 ml de solución P1 (Tris-HCl 50 mM, EDTA 10 mM, RNAsaA (Roche) 20 µg/ml). A continuación se añadieron 0,3 ml de solución P2 (NaOH 200 mM, SDS 1%), se agitó e incubó durante 5 minutos a temperatura ambiente. La solución alcalina se neutralizó con 0,3 ml de solución P3 (acetato potásico pH 4,8 2,5M) y se centrifugó durante 20 minutos a 13000 rpm a 4°C con el fin de sedimentar los restos celulares y el DNA cromosomal. Se recogió el sobrenadante y se trató con 0,8 volúmenes de isopropanol con objeto de precipitar el DNA plasmídico. Tras centrifugar durante 20 minutos a 4°C y 13000 rpm, el precipitado se lavó con etanol 70% y se resuspendió en agua o en tampón TE (Tris-HCl pH 7,5 50 mM y EDTA 1 mM).

Para la obtención de DNA plasmídico a gran escala (30-200 ml de cultivo) con alto grado de pureza se emplearon las columnas de intercambio iónico "Qiagen Plasmid Midi Kit" (Quiagen, Inc.), siguiendo las instrucciones del fabricante.

8.2.- Purificación de DNA cromosómico de levaduras

El aislamiento de DNA de alto peso molecular de *C. albicans* se realizó siguiendo el siguiente protocolo:

Se recogieron, por centrifugación, las células procedentes de un cultivo de 10 ml de YEPD, crecidas a 28°C hasta fase exponencial o estacionaria, se resuspendieron en 0,5 ml de agua estéril y se pasaron a un tubo eppendorf donde se volvieron a centrifugar con el fin de eliminar todo resto del sobrenadante. A continuación se añadieron 200 µl de tampón de extracción de DNA de levadura (Triton X-100 2%, SDS 1%, NaCl 100 mM, Tris-HCl 10 mM pH 8 y EDTA 1mM), 200 µl de una mezcla 1:1 fenol-cloroformo y 0,3 g de ballotini (425-600 µm de diámetro). Las células se rompieron agitando los tubos en un vortex durante 3-4 minutos y seguidamente se añadieron 200 µl de tampón TE 1X. Después de centrifugar la mezcla durante 5 minutos a la máxima velocidad, la fase acuosa se transfirió a un nuevo eppendorf donde los ácidos nucleicos se precipitaron añadiendo 1 ml de etanol absoluto. La mezcla se agitó y se mantuvo a -20°C durante al menos 30 minutos, posteriormente se centrifugó a 4°C durante 3 minutos a 13000 rpm. El precipitado se resuspendió en 400 µl de TE a los que se añadieron 30 µg de RNAsa A. La mezcla se incubó con la enzima durante 5 minutos a 37°C tras los cuales el DNA se volvió a precipitar con 1 ml de etanol absoluto y 10 µl de NH₄Ac (4M). Después de centrifugar la suspensión, el precipitado se lavó con etanol

al 70% y una vez totalmente seco se resuspendió en un volumen que osciló entre 30 y 50 μ l de agua destilada o TE 1X.

8.3.- Aislamiento y purificación de RNA total de levaduras

Las células se recogieron por centrifugación de cultivos en fase exponencial de crecimiento (1,5-1,7 D.O.₆₀₀). El sedimento de células se resuspendió en un volumen pequeño del sobrenadante y se congeló mediante inmersión en nitrógeno líquido. Las células congeladas se depositaron en cámaras de teflón junto a una bola de tungsteno, y se utilizó el "Micro-Dismembrator" a 2000 rpm durante 2 minutos para pulverizar las gotas de células congeladas. Las células pulverizadas se transfirieron a 2 eppendorfs que contenían 1 ml de TRIzol® Reagent (Invitrogen), se agitaron en vortex durante 1 minuto y se dejaron incubar a temperatura ambiente durante 5 minutos. Posteriormente se centrifugaron durante 10 minutos a 11500 rpm y el sobrenadante se transfirió a nuevos eppendorfs.

Se añadieron 0,4 volúmenes de cloroformo mezclando la muestra por inversión. Se dejaron a temperatura ambiente 3-10 minutos, y se centrifugó durante 5 minutos a 11500 rpm. Se transfirió la parte acuosa a un nuevo eppendorf (evitando la interfase) y se añadieron 0,5 volúmenes de isopropanol dejando a continuación la muestra a temperatura ambiente durante 5-15 minutos. Se centrifugó durante 10 minutos a 11500 rpm y se retiró el sobrenadante con cuidado, se lavó el pellet con 1 ml de etanol 70% frío mediante agitación en vortex y centrifugación a 11500 rpm durante 10 minutos. Finalmente, una vez retirado el sobrenadante, se secó el precipitado en una centrífuga de vacío durante 1 minuto. El pellet se resuspendió en 500 μ l de agua tratada con DEPC (libre de RNAsas), se añadieron 500 μ l de buffer LiCl, se agitó mediante vortex, y a continuación se mantuvieron las muestras a -20°C durante 1 hora con objeto de precipitar el RNA.

El precipitado se centrifugó a 13000 rpm a 4°C durante 30 minutos, se lavó el pellet con 1 ml de etanol 70% frío y se volvió a centrifugar durante 10 minutos. Se lavó con 500 μ l de etanol 70% frío y se volvió a centrifugar durante otros 10 minutos. El etanol se retiró con una pipeta y el pellet se secó manteniéndose en una centrifuga de vacío durante 5 minutos. Finalmente, el precipitado de RNA se resuspendió en 50 μ l de agua DEPC y se mantuvo a -20°C hasta su uso.

8.4.- Valoración de la concentración de ácidos nucleicos.

La concentración de DNA y RNA se determinó midiendo la absorbancia a 260 nm en un espectrofotómetro (GeneQuant (Pharmacia)) y considerando que la equivalencia de una D.O.₂₆₀ de 1 corresponde con 50 mg/ml de DNA o 40 mg/ml de RNA (Maniatis *et al.*, 1982). Cuando la concentración de DNA fue inferior a la precisada, ésta se concentró mediante evaporación en una centrífuga de vacío (SpeedVac).

De forma alternativa al espectrofotómetro, los ácidos nucleicos fueron cuantificados mediante un NanoDrop 1000 (ThermoScientific).

8.5.- Digestión de DNA con endonucleasas de restricción

El tratamiento de las muestras de DNA con las diferentes enzimas se llevó a cabo siguiendo las especificaciones de las casas comerciales (Boehringer, Promega, Fermentas), el volumen final de las reacciones osciló entre 20 y 50 μ l.

Cuando en una misma reacción se emplearon 2 enzimas de restricción para las que el tampón de mayor eficacia no era el mismo, se utilizó como tampón una mezcla de las soluciones *Carlos buffer* (CB), DTT y espermidina. Se prepararon cada una de ellas a una concentración 10X de la siguiente manera: DTT 10X (DTT 10 mM), espermidina 10X (espermidina 30 mM) y CB 10X (Tris-Acetato pH 7,5 0,33 M, acetato de magnesio 0,1 M, acetato de potasio 0,66 M pH 7,5, y BSA 1 mg/ml).

Alternativamente, y en caso de que las enzimas fueran de la misma casa comercial, se consultó vía web en la página de la compañía las condiciones óptimas de temperatura, concentración y buffer para la digestión doble.

La mezcla de reacción se incubó a la temperatura de mayor actividad de la enzima durante 1-3 horas en caso de digerir DNA plasmídico, o entre 6-12 horas en caso de digerir DNA cromosómico. El análisis de los fragmentos generados se realizó mediante electroforesis en geles de agarosa.

8.6.- Electroforesis de DNA en geles de agarosa

La migración diferencial de los fragmentos de DNA en función de su tamaño se llevó a cabo mediante electroforesis en geles de agarosa preparados a una concentración entre el 0,5% y 2% (habitualmente 0,8%), dependiendo del tamaño de los fragmentos a analizar. La agarosa se resuspendió en TAE 1X (Tris/Acetato 40 mM, EDTA 1 mM pH 8) (Maniatis *et al.*, 1982).

A la muestra se le añadió un volumen de 1/6 de tampón de carga (azul de bromofenol 0,25% p/v, xileno cianol 0,25% p/v y glicerol 30% v/v en agua destilada) para visualizar el frente de electroforesis. Las electroforesis se desarrollaron aplicando un voltaje constante que osciló entre 40 y 100 V en los diferentes experimentos.

En cada electroforesis se cargó una muestra con la mezcla de fragmentos de DNA de tamaño conocido correspondientes al marcador de peso molecular "1 Kb Plus DNA ladder" (Invitrogen). Para visualizar las bandas de DNA, se incluyó bromuro de etidio en los

geles (0,5 µg/ml), colorante fluorescente que se une a las moléculas de DNA y hace que sean visibles al exponer el gel a radiación ultravioleta. Las imágenes fueron obtenidas mediante una cámara digital (BIO-RAD) y tratadas con un programa de análisis de imagen (Quantity-One, BIO-RAD) hasta conseguir la luz y el contraste adecuados para su correcta visualización.

8.7.- Tratamiento con fosfatasa alcalina (CIAP)

Con el fin de evitar la recircularización de los vectores digeridos con una única enzima de restricción o con enzimas compatibles se sometieron a una defosforilación mediante fosfatasa alcalina

Los plásmidos se incubaron con fosfatasa alcalina (CIAP, "Calf Intestine Alkaline Phosphatase", Boehringer) en una proporción de una unidad de enzima/µg de plásmido, en tampón Tris-HCl 50 mM pH 8 a 37°C durante 30 minutos. A continuación el DNA se purificó utilizando el kit "Illustra GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit" (GE Healthcare).

8.8.- Construcción de plásmidos recombinantes

Las moléculas recombinantes se obtuvieron mediante combinación de fragmentos lineares de DNA purificados. En las reacciones de ligación se utilizó DNA ligasa del fago T4 (Boehringer) siguiendo las indicaciones de la casa comercial. Se incluyó 1 unidad de enzima en cada reacción en un volumen final de 10 µl conteniendo cantidades de DNA del vector y del inserto que oscilaron entre 0,1 y 0,5 µg. La relación molar vector/inserto que se procuró mantener habitualmente fue 1/5. La reacción se incubó durante una noche a 16°C o bien durante 2 horas a temperatura ambiente.

Los plásmidos recombinantes se recuperaron transformando células competentes de la cepa DH5α de *E. coli* con la mezcla de ligación y se comprobaron mediante su digestión con endonucleasas de restricción y posterior electroforesis en gel de agarosa.

8.9.- Reacción de amplificación de DNA (PCR)

El protocolo general consiste en preparar una mezcla tamponada, normalmente de 50 µl, que contiene MgCl₂ (2,5 mM), los 4 dNTPs (Roche) a una concentración de 200 µM, 1,5 unidades de enzima Taq polimerasa (EcoGen), entre 0,1 y 0,5 µg de DNA molde y los 2 oligonucleótidos complementarios a la secuencia que se quiere amplificar a una concentración final de 1 µM cada uno.

De forma alternativa se utilizó el kit "Illustra PureTaq Ready-To-Go PCR Beads" de GE Healthcare, que contiene el tampón, el cloruro de magnesio, los dNTPs y la enzima (todo

ello en las cantidades adecuadas en una bolita). En este caso, en cada reacción se añadió "una bolita", el DNA molde y los cebadores, completando con agua hasta un volumen final de 25 μ l.

La mezcla se sometió en un termociclador (Eppendorf) al siguiente programa: una etapa de desnaturalización del DNA (30 segundos a 95°C), un número variable de ciclos (normalmente 30) que consisten en desnaturalización (30 segundos a 95°C), anillamiento de oligonucleótidos (30 segundos a una temperatura que depende de las características de los 2 cebadores) y elongación de DNA (a 72°C, y calculando el tiempo considerando que son 30 segundos por cada 1000 nucleótidos que se quieran amplificar) y finalmente, tras los 30 ciclos, 10 minutos de elongación a 72°C y una etapa de mantenimiento a 4°C.

En ocasiones se utilizaron directamente células recogidas de colonias en la reacción de PCR. Para ello fueron previamente resuspendidas en 40 μ l de NaOH 0,02M y posteriormente tratadas con calor a 95°C durante 10 minutos. Tras otros 10 minutos de mantenimiento en hielo se tomaron 1-2 μ l para utilizar de molde en la reacción de PCR.

8.10.- Purificación de fragmentos de DNA

El aislamiento y purificación de fragmentos específicos de DNA (entre 0,2 y 5 Kb) a partir de geles de agarosa se realizó mediante la extracción del bloque de agarosa con el fragmento de interés a partir de geles bien resueltos, y se procesó la muestra con los reactivos del kit "Illustra GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit" (GE Healthcare), siguiendo las instrucciones del fabricante. Se trata de una cromatografía en la que primero el DNA es adsorbido a una matriz de sílice y después se libera en condiciones controladas.

La purificación de moléculas de DNA sintetizadas por PCR se llevó a cabo mediante el mismo kit siguiendo las instrucciones del fabricante.

8.11.- Secuenciación de DNA

La secuenciación de moléculas de DNA fue realizada en el servicio de secuenciación de DNA de la Universidad de Salamanca. El procedimiento seguido se basa en el método de terminación de cadena diseñado por Sanger y colaboradores en (Sanger *et al.*, 1977) utilizando un marcaje por fluorescencia. La inspección y el anillamiento de las secuencias obtenidas se realizó con los programas Chromas (Technelysium) y SeqMan (DNASTar, Lasergene) respectivamente.

8.12.- Hibridación de ácidos nucleicos

8.12.1.- Marcaje radiactivo de sondas de DNA

La preparación de sondas marcadas radiactivamente se realizó mediante la técnica conocida como "Random priming" (Feinberg & Vogelstein, 1983). Este procedimiento se basa en la hibridación de la molécula de DNA a marcar con una mezcla de hexanucleótidos que sirven de cebadores para la síntesis de la molécula de DNA complementaria. Mediante el fragmento Klenow de la DNA polimerasa de *E. coli*, durante la elongación se incorpora a la molécula el nucleótido radiactivo que ha sido incluido en la mezcla de reacción. Se utilizó el nucleótido ($\alpha^{32}\text{P}$) dCTP y los reactivos proporcionados en el kit comercializado por GE Healthcare "Amersham Rediprime II Random Primed Labelling System", siguiendo las instrucciones del fabricante.

8.12.2.- Detección de secuencias de DNA específicas (Southern-blot)

En primer lugar se digirió el DNA genómico de *C. albicans* (15-20 μg) con las enzimas de restricción adecuadas, a continuación se separaron los fragmentos de DNA junto a un marcador de peso molecular, mediante electroforesis en geles de agarosa al 0,8%. El DNA separado se visualizó por la incorporación en el gel de bromuro de etidio y se fotografió junto a una regla con el fin de tener una referencia que permitió posteriormente determinar el tamaño de las bandas hibridadas.

A continuación, el gel se trató sumergiéndolo de forma sucesiva en las siguientes soluciones: HCl 0,25 N, con agitación suave durante 30 minutos para romper los fragmentos de alto peso molecular de DNA en otros de menor tamaño; la solución se renovó a los 15 minutos. Seguidamente NaOH 0,5 M, NaCl 1,5 M durante 30 minutos para desnaturalizar el DNA. Finalmente se trató con Tris HCl pH 8 1 M, NaCl 1,5 M, se lavó con agua destilada para neutralizar y se realizó la transferencia (por capilaridad) del DNA a una membrana de Nylon (Hybond-N de Amersham) durante aproximadamente 12 horas a temperatura ambiente.

La transferencia de los fragmentos de DNA a la membrana de Nylon se realizó en tampón SSC 20X (NaCl 3 M, citrato- Na_3 0,3 M pH 7) siguiendo el protocolo especificado por Sambrook y colaboradores (Sambrook *et al*, 1987).

A continuación el DNA se fijó a la membrana mediante exposición a 120 mJ de luz ultravioleta (en una cámara UV Stratalinker 2400 de Stratagene) y se dejó secar durante aproximadamente 10 minutos en un horno a 80°C.

Las membranas se prehibridaron, se hibridaron (a 42°C durante 16 horas) y se lavaron siguiendo el protocolo especificado por Sambrook y colaboradores (Sambrook *et al*, 1987).

Los filtros se analizaron con el sistema de detección de radiación, captura y análisis de imágenes "BAS-1500 Storage Phosphor Imaging System" (Fujifilm). Para ello cada membrana se expuso en oscuridad a una pantalla del sistema (cubierta por una capa de fosforo fotoestimulable), durante un periodo de tiempo que osciló entre 1-12 horas. La superficie de la pantalla fue escaneada y se obtuvo una imagen que reveló la impresión causada por la radiación, permitiendo estimar el tamaño de los fragmentos de DNA que habían hibridado específicamente con la sonda.

Con el fin de obtener una imagen de mayor nitidez, las membranas se expusieron posteriormente a una película fotográfica Kodak (X-OMAT, AR) durante periodos de tiempos que oscilaron entre 1 y 14 días, según la señal radiactiva.

8.12.3.- Detección de secuencias específicas de RNA (Northern-blot)

En cada análisis tipo Northern se utilizaron 5 µg de RNA por muestra resuspendidos en 15 µl de volumen final de agua tratada con DEPC.

A cada una de las muestras se añadieron 5 µl de tampón desnaturante 5X (formamida 50%, formaldehído 16%, MOPS 5X en agua DEPC), se dejaron en hielo durante 20 minutos, se desnaturizaron a 65°C durante 10 minutos y se añadieron 4 µl de tampón de carga 6X (azul de bromofenol 0,25% p/v, xileno cianol 0,25% p/v y glicerol 30% v/v en agua destilada tratada con DEPC).

Las muestras así tratadas se sometieron a electroforesis en geles de agarosa al 1% preparados con formaldehído diluido al 1% en tampón MOPS (ácido 3-N-morfolinopropanosulfónico pH 7 0,04M, acetato sódico 0,01M, EDTA 1mM). Las electroforesis se mantuvieron durante 3 horas con una corriente constante de 80 V. Al mismo tiempo se sometió a electroforesis el RNA correspondiente al marcador de peso molecular "0,24-9,5 RNA Ladder" (Invitrogen). Todas las soluciones se prepararon con agua DEPC.

El RNA se transfirió por capilaridad a membranas de nylon (Hybond-N de Amersham) de forma similar a la transferencia de los experimentos tipo Southern-Blot, en solución SSC 20X. Una vez completada la transferencia (12 horas) el RNA se fijó a las membranas mediante exposición a 120 mJ de luz ultravioleta.

Las membranas se prehibridaron, se hibridaron y se lavaron siguiendo el protocolo especificado por Sambrook y colaboradores (Sambrook *et al*, 1987).

Los filtros se analizaron con el sistema de detección de radiación, captura y análisis de imágenes BAS-1500 Storage Phosphor Imaging System (Fujifilm). La impresión causada por la radiación de las diferentes muestras se cuantificó con el programa "Quantity One" de Biorad, lo que permitió realizar análisis comparativos de la expresión de un gen entre diferentes cepas o bajo condiciones de crecimiento diferentes. Así mismo, al igual que en los análisis tipo Southern, las membranas se expusieron a una película fotográfica Kodak (X-OMAT, AR) durante periodos de tiempo que oscilaron entre 1 y 14 días con el fin de obtener una imagen de mayor calidad.

8.13.- PCR Cuantitativa

Esta técnica se empleó para cuantificar la expresión relativa de un gen en una determinada cepa respecto a su expresión en una cepa control, creciendo ambas en las mismas condiciones (crecimiento exponencial y/o transición levadura-hifa). En primer lugar se extrajo el RNA total de las cepas a ensayar (ver protocolo de extracción de RNA).

En cada tubo de reacción se añadieron 8 μg de RNA y los siguientes componentes: DNAsa (1 μl), Buffer 10X (2 μl), agua tratada con DEPC (X μl) hasta un volumen final de 20 μl . Se mezcló con la ayuda de un vortex, se sometió a una breve centrifugación y se incubó a 37°C durante 30 minutos.

Se limpió el RNA añadiendo a la mezcla 1 ml de trizol, y 0,4 volúmenes de cloroformo. Una vez bien mezclado con la ayuda de un vortex, se centrifugó a 13000 rpm durante 10 minutos a 4°C. La fase acuosa se transfirió a un nuevo eppendorf y se le añadieron 0,5 volúmenes de isopropanol. Se incubó durante 20 minutos en hielo y se centrifugó de nuevo a 13000 rpm durante 20 minutos a 4°C. El pellet se secó y se resuspendió en 10 μl de agua DEPC incubándolo durante 15 minutos a 37°C. Se cuantificó la cantidad de RNA (se necesita al menos 1 μg para continuar con el experimento).

Posteriormente se llevó a cabo la síntesis de cDNA a partir del RNA. Para ello se prepararon 2 reacciones en paralelo por cada una de las muestras. A una de ellas no se le añade la enzima retrotranscriptasa (RT) sirviendo como control. A la muestra de RNA (1 ng - 5 μg) se le añadieron 1 μl de oligo(dT), 1 μl de dNTP Mix (10mM) y agua tratada con DEPC hasta un volumen final de 12 μl . Se calentó a 65°C durante 5 minutos y se enfrió rápidamente en hielo. Después de una breve centrifugación, que permite la mezcla de los componentes en el fondo del tubo, se añadieron: 4 μl de 5X First-Strand Buffer, 2 μl de 0,1M DTT y 1 μl de inhibidor de RNAsa. Una vez mezclado el contenido mediante suave pipeteo se incubó a 42°C durante 2 minutos, se añadió 1 μl de SuperScript II RT (al control se le añadió 1 μl de agua DEPC en lugar de esta enzima), se mezcló de nuevo por pipeteo y se incubó a 42°C durante 50 minutos. Transcurrido este tiempo se calentó a 70°C y se enfrió rápidamente en hielo durante 1-2 minutos para inactivar la enzima. Para eliminar por completo los restos de RNA se añadió 1 μl de RNAsa H y se incubó a 37°C durante 20

minutos. El cDNA obtenido de esta forma se diluyó a razón de 20:250 para su uso en posteriores reacciones.

Antes de realizar las reacciones de PCR cuantitativa se llevó a cabo un experimento de PCR convencional con cada pareja de cebadores que se iba a utilizar en el experimento de PCR cuantitativa, probando con varias concentraciones decrecientes de los mismos con objeto de conocer la concentración mínima común a todas las parejas de cebadores del experimento de amplificación.

8.13.1- Preparación de la reacción.

Todos los experimentos de RT-PCR cuantitativa se llevaron a cabo a partir de dos muestras independientes de RNA. Cada muestra de cDNA fue pipeteada por triplicado en un volumen final de 25 μ l que contenía 10 μ l de cDNA (o 10 μ l de una dilución decimal sucesiva de la dilución de cDNA obtenida anteriormente 20:250), 12,5 μ l de "SYBR Green Master Mix" y 1,25 μ l de cada cebador a la concentración anteriormente explicada (mínima común a la cual se apreciaba amplificación). Por cada muestra independiente de RNA se incluyó un control "NoRT" y un control de agua. El programa de amplificación utilizado consistió en un ciclo a 95°C durante 10 minutos, cuarenta ciclos con un paso de hibridación de 60°C de temperatura, un paso de extensión de 72°C durante 1 minuto, y un paso final a 95°C durante 1 minuto. Finalmente se sometió a 95°C durante 30 minutos para obtener la curva de disociación. El equipo utilizado fue ABI PRISM 7300 (Applied Biosystems).

8.13.2 Cuantificación relativa frente a un gen de referencia: normalización.

La cuantificación relativa se subdivide en 2 pasos; un primer paso (normalización) en el que la cuantificación es relativa a la cantidad total de RNA o a uno o varios genes de referencia. El segundo paso corresponde a la cuantificación relativa frente a un control sin tratar, o a un punto cero en el tiempo.

Se considera que el nivel de expresión de los genes de referencia es constante, incluso bajo tratamiento experimental, sin embargo, algunos autores han demostrado que su nivel de expresión varía en circunstancias determinadas. A pesar de todo se siguen utilizando como genes de referencia y sirven como control para valorar la cantidad de RNA utilizada en la transcripción reversa. Los genes de referencia son cuantificados al mismo tiempo que el/los genes diana en la PCR en tiempo real.

Partiendo de la ecuación general $N_c = N_0 (1+E)^c$ siendo " N_c " el número de copias de cDNA de un gen en el ciclo " c ", " N_0 " el número inicial de moléculas de cDNA de ese gen, " E " la eficiencia del proceso (oscila entre 0 y 1) y " c " el número de un ciclo determinado; y sabiendo que en el umbral $N_{ctT} = N_{ctR}$, donde " N_{ctT} " indica el número moléculas del gen

diana y “ N_{CtR} ” el número de moléculas del gen de referencia (Ståhlberg *et al*, 2003), se deduce lo siguiente:

$$N_{CtR} = N_{0R} (1+E_R)^{CtR}$$

$$N_{CtT} = N_{0T} (1+E_T)^{CtT}$$

$$N_{CtR} = N_{CtT}$$

$$N_{0R} (1+E_R)^{CtR} = N_{0T} (1+E_T)^{CtT}$$

$$N_{0R} / N_{0T} = (1+E_T)^{CtT} / (1+E_R)^{CtR}$$

Este modelo matemático requiere el conocimiento de la eficiencia.

8.13.3 Cálculo de la eficiencia mediante una dilución seriada.

La eficiencia en la PCR a tiempo real puede ser calculada mediante métodos directos y métodos indirectos. Entre los primeros se encuentran la determinación del incremento absoluto de la fluorescencia en las diluciones seriadas. Los métodos indirectos se basan en el ajuste de varios modelos matemáticos a la curva obtenida durante la PCR. La elección de uno u otro depende del tratamiento estadístico que se vaya a dar después a los datos obtenidos.

Partiendo de una dilución seriada en base 10, podemos construir una gráfica C_t frente a \log cDNA cuya pendiente es la eficiencia de la amplificación.

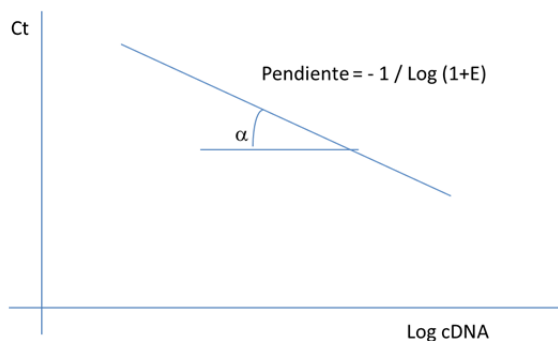


Fig. 13.- Esquema de cálculo de la eficiencia.

La relación entre ambos valores es fácilmente deducible si linearizamos la ecuación $N_{Ct} = N_0 (1+E)^{Ct}$. Esta expresión se puede escribir de forma general como $Y = AX + B$. La cantidad inicial estándar depende del investigador, por lo tanto ha de ser el término X . N_{Ct} y E son constantes. C_t es la incógnita que estamos midiendo y, en consecuencia, el término Y

$$\text{Log } N_{Ct} = \text{Log } N_0 + C_t \text{ Log } (1+E)$$

$$C_t = - [1 / \text{Log } (1+E)] \text{ Log } N_0 + [\text{Log } N_{Ct} / \text{Log } (1+E)]$$

$$Y = \quad A \quad X \quad + \quad B$$

La pendiente corresponde al término A . Despejando E obtenemos:

$$\text{Pendiente} = -1/\text{Log}(1+E)$$

$$\text{Log}(1+E) = -1/\text{Pendiente}$$

$$(1+E) = 10^{(-1/\text{Pendiente})}$$

La eficiencia de amplificación ha de ser comparable entre todos los genes analizados para obtener datos fiables.

8.13.4 Tratamiento estadístico de los datos.

Los datos crudos de C_t por triplicado, obtenidos bajo el mismo umbral, su media aritmética y la desviación estándar fueron exportados a una hoja de Excel. Aquellos valores con una desviación estándar $> 0,3$ fueron eliminados. No existe un consenso sobre la divergencia de cada C_t individual respecto del valor medio. Una desviación estándar $< 0,16$ se considera ideal, pero difícil de conseguir en la práctica. Una desviación estándar de 0,5 indica una diferencia de un ciclo entre 2 de los pocillos, es decir, en uno hay el doble de producto que en el otro. Dicha diferencia puede ser crucial.

8.13.5 Eficiencia.

Los valores medios de C_t pertenecientes a las cuatro diluciones seriadas 1/10 fueron representadas frente a unidades arbitrarias de Log cDNA. La pendiente en logaritmo neperiano se transformó a logaritmo decimal multiplicando por el factor 2,303, y a continuación se calculó la eficiencia.

8.13.6 Normalización frente a actina: nivel relativo de transcripción.

Una vez calculada la eficiencia, la normalización de la expresión de cada gen frente a la actina se llevó a cabo mediante la siguiente ecuación:

$$\text{NRT} = E_{\text{ACT}}^{(C_{t\text{ACT,media}})} / E_{\text{GEN}}^{(C_{t\text{GEN,media}})}$$

Siendo NRT el Nivel Relativo de Transcrito.

9.- TÉCNICAS DE MANIPULACIÓN DE PROTEÍNAS

9.1.- Preparación de extractos celulares

Se prepararon los cultivos en los medios adecuados y se incubaron hasta fase exponencial de crecimiento. Posteriormente se diluyeron hasta una $D.O_{.600}$ de 0,2 y se incubaron de nuevo hasta que alcanzaron una $D.O_{.600}$ de 1. Se añadieron 20 ml de cultivo a un volumen igual de agua helada manteniéndose en frío durante todo el proceso.

Después de centrifugar se recogieron las células, se lavaron con 1 ml de agua a 4°C, y se resuspendieron en 120 µl de tampón de lisis (50 mM Tris-HCl pH 7,5, 10% glicerol, 0,1% SDS, 150 mM NaCl, 50 mM NaF, 1 mM Na₃VO₄, 5 mM EDTA, 50 mM β-glicerol fosfato, 5 mM sodio pirofosfato, y coctel de inhibidores de proteasas). Se añadieron 0,5 volúmenes de ballotini y se obtuvieron los extractos mediante rotura en una Fast Prep FP120 (Savant Bio101) aplicando una intensidad de 5,5 durante 20 segundos, repitiendo este proceso 3 veces y dejando las muestras en hielo durante 1 minuto entre cada repetición.

Los extractos celulares se separaron de los ballotini mediante centrifugación, realizando una pequeña incisión en el fondo del tubo que contenía la muestra e introduciendo éste en un nuevo eppendorf. Posteriormente se clarificaron mediante centrifugación a 4°C durante 15 minutos a 13000 rpm recogándose el sobrenadante.

La concentración de proteína se cuantificó a 595 nm mediante el método de Bradford (Bradford, 1976), normalizando el blanco con tampón de lisis.

9.2.- Western-blotting

Las muestras de extractos celulares se desnaturalizaron sometiéndolas a calor (100°C durante 5-10 minutos y poniéndolas posteriormente en hielo) en tampón "Laemli" (0,0625 M Tris-HCl pH 6,8, 2% SDS, 10 mM DTT, 10% Glicerol, trazas de azul de bromofenol), a continuación se cargaron en el gel.

Los geles de poliacrilamida (el separador y el de empaquetamiento) se prepararon siguiendo el protocolo descrito por Sambrook y colaboradores (Sambrook *et al*, 1987). Se utilizó el sistema de BIO-RAD sumergiéndose los geles en tampón de electroforesis (glicina 0,2M, tris 0,025M y SDS 0,1%), y una vez cargada la muestra, se resuelven aplicando 25-30 mA durante aproximadamente 45-60 minutos.

Las proteínas se transfirieron a una membrana de PVDF (Immobilon -P Transfer Membrane, Millipore), previamente embebida en tampón de transferencia (tris 0,025M, glicina 0,2M), utilizando una cubeta de electrotransferencia (BIORAD). El proceso de transferencia se llevó a cabo durante 2 horas a 350 mA.

Una vez realizada la transferencia, la membrana se bloqueó incubándola durante 1 hora con tampón TBST (10 mM Tris-HCl pH 8, 150 mM NaCl, 0,1% Tween 20) + 5% BSA. Se lavó posteriormente 3 veces con TBST durante 10 minutos cada vez. A continuación se sumergió en la solución que contenía el anticuerpo primario diluido en TBST conteniendo 5% BSA a la dilución que recomiende la casa comercial, y se dejó incubando durante 8 horas en agitación y en frío.

Se lavó de nuevo la membrana con TBST y se incubó con el anticuerpo secundario diluido en TBST conteniendo 5% BSA a la dilución recomendada por el fabricante, en frío y en agitación durante 1 hora.

Se lavó la membrana de nuevo con TBST y se reveló, obteniéndose la señal en aquellas zonas en las que las proteínas fueron reconocidas por el anticuerpo primario. El Kit de revelado dependió del anticuerpo secundario elegido en cada ocasión. Los kits de revelado utilizados en nuestro laboratorio fueron 2: revelado mediante HRP (Amersham ECL Western Blotting Analysis System, GE Healthcare) y revelado mediante fosfatasa alcalina (CDP-Star, Roche), siguiendo en ambos casos las instrucciones del fabricante.

10.- COMPARACIÓN DE PERFILES DE TRANSCRIPCIÓN MEDIANTE MICROMATRICES DE DNA

10.1.- Introducción

10.1.1.- Diseño y síntesis de oligonucleótidos.

El desarrollo de las micromatrices de DNA de *C. albicans* se llevó a cabo por la empresa Eurogentec (Bélgica) en colaboración con el Consorcio Europeo Galar Fungail (http://www.pasteur.fr/recherche/unites/Galar_Fungail/) del que nuestro grupo de investigación formó parte. Representando 6947 ORF's fue llevado a cabo con la colaboración de los profesores Bernard Hube, Ángel Domínguez, Christophe d'Énferf, Dominique Sanglard, Alistair Brown, Neil Gow, Rajendra Prasad, Frederic Devaux y Joachim Ernst.

Estas micromatrices representan 6947 ORF's representadas por cebadores de 60 bases diseñados y producidos por EUROGENTEC. Dichos cebadores se sintetizaron utilizando el método de la fosforamidita. Por razones de compatibilidad con la superficie del slide se añadió a todos los cebadores el linker C6-NH₂ en su extremo 5'.

10.1.2.- Impresión robótica en slides de cristal.

Las micromatrices se prepararon imprimiendo los cebadores amino-modificados en cristales mediante un robot ChipWriterPro (ESII). El robot utilizó 32 pins para imprimir muestras de DNA desde placas de 384 pocillos en los slides de cristal. Todos los cebadores se imprimen por duplicado en un área de 3,2 x 1,8 cm. La micromatriz contiene 32 bloques; cada bloque contiene 416 puntos. La distancia entre puntos es de 90 a 120 micrones con un diámetro de punto de 100 micrones. Los slides pueden almacenarse a temperatura ambiente durante 3 meses sin pérdida de intensidad de señal.

Las micromatrices incluyen diluciones seriadas de Luciferasa permitiendo normalizar la señal de hibridación y evaluar el rango dinámico de los scanners. Como control negativo se incorporaron 3 cebadores distintos con 70, 50 y 30% de identidad de secuencia con genes de *Y. lipolytica* altamente expresados. Esto permite evaluar la eficiencia de hibridación y las condiciones de lavado.

10.2.- Preparación de la sonda de cDNA marcado

10.2.1.- Aislamiento de RNA total

Se realizó de la forma descrita en el apartado 8.3

10.2.2.- Síntesis y purificación de cDNA marcado

Para la síntesis de cDNA marcado, utilizamos Cianina 3-dCTP (Cy3) o Cianina 5-dCTP (Cy5). Estos fluorocromos emiten a 550 nm y 650 nm respectivamente. Se siguió el método de marcaje proporcionado en el kit "CyScribe First-Strand cDNA Labelling Kit" (GE Healthcare) cuyos pasos se describen a continuación. Se trata de una reacción de retrotranscripción durante la cual se incorporan los nucleótidos marcados durante la síntesis de cDNA.

10.2.3.- Anillamiento de primers

En primer lugar se llevó a cabo la reacción de anillamiento de los cebadores añadiendo a la muestra de RNA (que contiene entre 2,5 y 25 µg), 1 µg de "anchored oligo-dT", 1 µl de "C. albicans Specific Primer Mix" (Eurogentec) 0,1 pmol/µl y ajustándose a un volumen final de 11 µl con agua. La reacción se mezcló por suave pipeteo y se incubó a 70°C durante 5 minutos. Después se dejó enfriar a temperatura ambiente durante unos 10 minutos. Finalmente se dio "un spin" de 30 segundos para recolectar los componentes en el fondo del eppendorf.

10.2.4.- Reacción de extensión

Con objeto de realizar la reacción de extensión, se añadieron a la muestra anterior 4 µl de 5X CyScribe buffer, 2 µl de 0,1M DTT, 1 µl de dCTP nucleotide mix, 1 µl de dCTP CyDye-labeled nucleotide (Cy3 o Cy5) y por último 1 µl de CyScribe reverse transcriptase, completando un volumen de final de 20 µl. Una vez mezclados los componentes mediante agitación en vortex, se sometieron a una centrifugación de 30 segundos, y se incubaron durante 1,5 horas a 42°C. Finalmente el cDNA se colocó inmediatamente en hielo y

protegido de la luz para purificarlo a continuación (o se almacenó protegido de la luz a temperaturas de -15 a -30°C).

10.2.5.- Purificación del cDNA marcado

Con objeto de degradar el RNA se sometieron las muestras a tratamiento alcalino. Se añadieron a la muestra 2 µl de NaOH 2,5 M, se mezcló todo mediante vortex, se centrifugó durante 30 segundos y se incubó durante 15 minutos a 37°C. Posteriormente se añadieron 10 µl de HEPES 2M, se mezcló con ayuda de vortex y se centrifugó durante 30 segundos. En este paso se puede continuar con la purificación o almacenar la muestra a -20°C.

Para extraer los nucleótidos no incorporados, se utilizaron los reactivos del kit "CyScribe GFX Purification Kit" (GE Healthcare) siguiendo las instrucciones de la casa comercial. Se utilizó una columna GFX por cada muestra marcada. Se añadieron 500 µl de "Capture Buffer" a cada columna, y se transfirió el cDNA sin purificar a la columna GFX, mezclándolo todo mediante suave pipeteo. La columna se centrifugó inmediatamente a máxima velocidad durante 30 segundos y se desechó el líquido arrastrado. Se añadieron 600 µl de "Wash Buffer" y se centrifugó la columna durante 30 segundos a velocidad máxima (se repitió este paso otras 2 veces). Se colocó la columna en un nuevo eppendorf, se añadieron 60 µl de "Elution Buffer" (precalentado a 65°C para incrementar el rendimiento de recuperación) justo en el filtro cubriéndolo totalmente y se incubó a temperatura ambiente durante 1 – 5 minutos. Se centrifugó a velocidad máxima durante 1 minuto para recoger el cDNA marcado y purificado y se volvió a añadir Elution Buffer para incrementar el rendimiento en un 10%.

El cDNA sintetizado utilizando un NanoDrop 1000 (ThermoScientific). El NanoDrop nos permitió obtener las medidas de ng de cDNA sintetizado, así como de pmol de fluorocromo (Cy3 o Cy5) en la muestra. Una vez obtenidos estos datos, se calculó la frecuencia de incorporación (F.O.I.) con la siguiente fórmula:

$$\text{F.O.I.} = (\text{pmol de fluorocromo incorporado} \times 324,5) / \text{cDNA sintetizado}$$

Tras la lectura espectrofotométrica hay q recuperar la muestra. El F.O.I. ha de tener un valor comprendido entre 10 – 70 para que el experimento pueda finalizarse con éxito.

10.2.6.- Concentración

La muestra de cDNA se concentró utilizando filtros "Microcon-30" (Milipore). Se centrifugó brevemente y se introdujo en un filtro "Microcon-30" un volumen de muestra correspondiente a 65 pmol de fluorocromo. Después de centrifugar a 13000 rpm durante 3 minutos y desechar el eluido, se agitó en un vortex y se devolvió boca abajo la columna. Se

centrifugó a 13000 rpm durante 60 segundos, y el volumen recogido se ajustó a aproximadamente 5 μ l (nunca menos). Las sondas se almacenaron en frío a -20°C convenientemente protegidas de la luz en el caso de no utilizarlos inmediatamente. Nunca se deben concentrar más de 65 pmol de Cy3 o Cy5.

10.2.7.- Hibridación y lavado de micromatrices

Se desnaturalizaron 5 μ l de DNA de esperma de salmón de una solución a 10 mg/ml a 95°C durante 2 minutos y se enfriaron rápidamente en hielo durante 2 minutos. Se mezclaron el esperma de salmón desnaturalizado, 5 μ l de sonda marcada con Cy3, 5 μ l de sonda marcada con Cy5 y 40 μ l de tampón "DIG Easy Hyb" (Roche). Se desnaturalizó el cDNA incubando la mezcla durante 2 minutos a 95°C, y se enfrió en hielo. Se colocó un cubreobjetos especial, el "Lifterslip" (Erie Scientific Company), sobre el "slide" del array entre las 2 marcas. Se inyectaron los 55 μ l de mezcla por el lateral del "Lifterslip" moviendo la punta de la pipeta de arriba a abajo de forma continua para que no se formasen burbujas. El "slide" se incubó durante 12 horas a 42°C en una cámara húmeda (Corning Hybridization Chamber, Life Sciences).

Los lavados de los arrays se realizaron en tubos de 50 ml tipo "Falcon", envueltos en papel de aluminio para aislarlos de la luz, conteniendo las siguientes soluciones de lavado: A (0,2X SSC/0,1%SDS) o B (0,2X SSC) previamente filtradas. Se introdujo el "slide" en una cubeta de vidrio que contenía la solución A para retirar el "Lifterslip". Se sumergió el "slide" con la etiqueta hacia abajo en un falcon con la solución A de nuevo, se invirtió un par de veces, se traspasó a otro falcon con la misma solución y se agitó en un roller durante 5 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente se sumergió el "slide" en un falcon con la solución B, se invirtió un par de veces y se traspasó otro falcon con la misma solución, el cual se incubó durante 5 minutos a temperatura ambiente con agitación en un roller. Pasado ese tiempo se traspasó el "slide" a otro nuevo falcon con la solución B, se invirtió un par de veces, se traspasó el "slide" a un falcon vacío y se centrifugó durante 5 minutos, a 1000 rpm y 25°C. Una vez seco el "slide", se protegió de la luz y se escaneó en el Centro de Investigación del Cáncer.

10.3.- Adquisición de imágenes

La adquisición de las imágenes correspondientes a cada microarray se realizó en el Servicio de Genómica del Centro de Investigación del Cáncer (USAL-CSIC) con el escáner GenePix4000B y el programa asociado al mismo GenePix Pro 6.0 (Axon instruments Inc.). Se llevaron a cabo varios escaneados modificando los valores de fotomultiplicación (PMTs) asociados a cada fluorocromo, hasta obtener una imagen en las que las intensidades medias de ambos canales estuvieran equilibradas (ratio medio Cy5/Cy3 próximo a 1).

10.4.- Análisis de los datos obtenidos

10.4.1.- Identificación de los genes expresados diferencialmente.

Se llevó a cabo la comparación de los perfiles de transcripción de los mutantes de *C. albicans* con la cepa parental CAI4, en distintas condiciones de crecimiento.

Cada uno de los experimentos se realizó partiendo de dos clones independientes de la cepa mutada (dos replicados biológicos). El cDNA de la cepa parental se sintetizó a partir de una mezcla de RNA obtenido de diferentes clones independientes de esta cepa. El cDNA de uno de los clones del mutante se marcó además de forma inversa (dye swap). Por lo tanto, se realizaron 3 hibridaciones para cada condición estudiada. Considerando que se hibridaron 3 micromatrices y que cada gen se encuentra depositado por duplicado en cada uno de ellos, para la mayoría de genes se obtuvieron 6 datos.

Una vez adquiridas las imágenes, se realizaron con el programa informático GenePix Pro 6.0 los siguientes pasos: se asignó a cada uno de los puntos del microarray el gen correspondiente, de acuerdo al diseño del microarray, se inspeccionó visualmente la imagen etiquetando aquellos puntos cuya señal estaba ausente o era de baja calidad, se extrajeron los valores numéricos asociados a cada fluorocromo en cada gen y finalmente se obtuvo una tabla con los resultados y un informe sobre la calidad de los datos obtenidos.

Se utilizó el programa GeneSpring 5.0 para normalizar, integrar, realizar análisis de significación estadística y comparar los datos de diferentes micromatrices. Dicho análisis se llevó a cabo de la forma que se describe a continuación.

A partir de la tabla de resultados de cada microarray, facilitada por GenePix Pro 6.0, se importó en GeneSpring 5.0 la columna de los datos correspondientes a la mediana de los valores de intensidad de cada fluorocromo en los puntos donde había hibridado la sonda la sonda (columna F635 para Cy5 y F532 para Cy3) y la mediana de los valores de intensidad del fondo alrededor de cada uno de ellos (columnas B635 y B532). Además se importaron las columnas correspondientes al número de identificación del gen, al número del bloque en el que se encuentra dentro del microarray y la información correspondiente a la calidad de los datos según la inspección previa.

Tabla V.- Hibridaciones realizadas en las condiciones ensayadas.

Condición	<i>mnn9</i> Δ				<i>mnn1</i> Δ			
	NºArray	Lote	Cy3	Cy5	NºArray	Lote	Cy3	Cy5
Exponencial	31	B200H	CAI4	<i>mnn9</i> clon 1	1	I180H	CAI4	<i>mnn1</i> clon 1
	34	B200H	<i>mnn9</i> clon 1	CAI4	2	I180H	<i>mnn1</i> clon 1	CAI4
	1	K060H	CAI4	<i>mnn9</i> clon 2	3	I180H	CAI4	<i>mnn1</i> clon 2
Inducción 15m	18	K060H	CAI4	<i>mnn9</i> clon 1	10	I180H	CAI4	<i>mnn1</i> clon 2
	19	K060H	<i>mnn9</i> clon 1	CAI4	11	I180H	<i>mnn1</i> clon 2	CAI4
	20	K060H	CAI4	<i>mnn9</i> clon 2	12	I180H	<i>mnn1</i> clon 1	CAI4
Inducción 60m	9	K060H	CAI4	<i>mnn9</i> clon 2	7	I180H	CAI4	<i>mnn1</i> clon 1
	10	K060H	<i>mnn9</i> clon 1	CAI4	8	I180H	<i>mnn1</i> clon 1	CAI4
	11	K060H	CAI4	<i>mnn9</i> clon 1	9	I180H	<i>mnn1</i> clon 2	CAI4
Inducción 180m	15	K060H	CAI4	<i>mnn9</i> clon 1	4	I180H	CAI4	<i>mnn1</i> clon 1
	16	K060H	CAI4	<i>mnn9</i> clon 2	5	I180H	<i>mnn1</i> clon 1	CAI4
	17	K060H	<i>mnn9</i> clon 1	CAI4	6	I180H	<i>mnn1</i> clon 2	CAI4

Los datos se sometieron a una normalización *per spot* y *per chip* dependiente de intensidad (*Lowess*) aplicada a cada uno de los bloques del microarray. Esta normalización permite comparar los datos de los diferentes genes, tanto si proceden del mismo como de diferentes micromatrices, y al ser dependiente de intensidad, corrige las variaciones no significativas que dependen del nivel de expresión de cada gen. Esta corrección es necesaria dado que diferentes estudios de micromatrices indican que para los genes que se expresan a bajos niveles, la dispersión de los ratios mutante/control y el error asociado a las mediciones es mayor que en genes con un alto nivel de expresión. Debido a ello, variaciones que no son significativas para genes que se expresan a bajos niveles, podrían si serlo en genes con mayor nivel de expresión. Puesto que la normalización se ha aplicado a cada uno de los bloques del microarray (aplicada por grupos de impresión) ésta permite corregir variaciones debidas a defectos en la uniformidad del microarray.

La detección de genes que se expresan de forma diferencial en el mutante en cada una de las condiciones analizadas se llevó a cabo según el test estadístico de comparación de grupos "*Wilcoxon-Mann-Whitney*" y la corrección para test múltiples "*Benjamini and Hochberg FDR*" con un valor de $p \leq 0,02$. De esta forma la probabilidad de error es de un

2% del total de los genes que pasan el test. El análisis de significación se realizó sólo sobre los genes que presentaban un factor de variación mínimo de 1,5 en al menos una hibridación, este punto de corte se introdujo para controlar la astringencia de la corrección "Benjamini and Hochberg FDR", que está influenciada directamente por el número de genes (Garcia-Sanchez *et al.*, 2004).

Entre los genes seleccionados por el test se consideraron para análisis posteriores solamente aquellos que presentaron un factor de expresión diferencial mutante vs. control $\geq 1,5$, considerando la media de los 3 replicados. Por último, los genes obtenidos se separaron en genes sobreexpresados y subexpresados en el mutante respecto a la cepa control.

Se ha comprobado que este procesamiento de los datos es equivalente a realizar el análisis mediante el programa SAM ("*Significance Analysis of Microarrays*") que evalúa si el logaritmo del ratio mutante/control difiere significativamente de 0 en los replicados (Tusher *et al.*, 2001) y a continuación filtrar los genes que presentan un factor de variación mínimo de 1,5.

La anotación de los genes de *C. albicans* introducida en GeneSpring 5.0 y que se muestra en el presente trabajo se basa en la información de la base de datos CGD (<http://www.candidagenome.org/>).

10.4.2.- Análisis de las categorías funcionales asociadas a expresión diferencial.

La asignación de categorías funcionales a los genes expresados diferencialmente se realizó según la base de datos contenida en el programa informático *GeneSpring GX 7.3*.

Para determinar aquellas categorías funcionales que estaban asociadas de forma significativa a sobreexpresión o subexpresión se utilizó el programa *GO Ontology Browser* incluido en el programa *GeneSpring GX 7.3*. Estos análisis se basan en la clasificación GO (Gene Ontology) de los genes de *C. albicans*, realizada en su mayor parte por homología a otros organismos. En esta clasificación los genes se distribuyen en grupos jerárquicos según la función molecular, el proceso biológico o el componente celular en el que intervienen o del que forman parte las proteínas que codifican.

10.4.3.- Comparación de datos de expresión diferencial en condiciones múltiples.

La comparación de los datos de expresión diferencial obtenidos en diferentes condiciones se llevó a cabo mediante la clasificación de los genes en diagramas de Venn. De esta forma se detectaron los grupos de genes expresados diferencialmente en varias

condiciones de crecimiento, o en varios mutantes. Mediante análisis tipo cluster se agruparon los experimentos según la similitud de los resultados obtenidos ("Experiment Tree") o bien los genes según los patrones de expresión diferencial a lo largo de diferentes condiciones (análisis "Gene tree", cluster K-means). Los análisis se realizaron con las herramientas de cálculo disponibles en *GeneSpring GX 7.3*.

11.- OTROS PROGRAMAS DE OBTENCIÓN Y TRATAMIENTO INFORMÁTICO DE DATOS.

El análisis de las secuencias de nucleótidos se llevó a cabo con el conjunto de programas informáticas DNASTAR (Ltd. Abacus House, MANOR RD., West Ealing London W130 AS Reino Unido). Los esquemas de los plásmidos se realizaron con el programa *Clon Manager Suite 7*.

Se accedió al European Bioinformatics Institute (<http://www.ebi.ac.uk>) siempre que fue necesario obtener datos de una secuencia recogida en las bases de datos de DNA (EMBL) o proteínas (SWISS-PROT). En este mismo servidor se llevaron a cabo comparaciones de secuencias de nucleótidos y aminoácidos con otras secuencias presentes en las bases de datos mediante el programa FASTA (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/sss/fasta/>) y BLAST (<http://ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>), así como búsquedas de probables dominios funcionales comparando las secuencias de interés con la base de datos Interpro. Los anillamientos múltiples de secuencias se realizaron con el programa *ClustalW*.

La búsqueda de posibles señales de localización en las secuencias de aminoácidos se llevó a cabo mediante el programa *PSORT II prediction* (<http://psort.hgc.jp/form2.html>).

Entre las bases de datos consultados con más frecuencia se encuentran CandidaDB (<http://genolist.pasteur.fr/CandidaDB/>), CGD: the Candida Genome Database (<http://www.candidagenome.org>), y SGD: the Saccharomyces Genome Database (<http://www.yeastgenome.org/>).

Resultados I: El gen *MNN9* de *Candida albicans*.

1.- ANÁLISIS BIOINFORMÁTICO DE LA SECUENCIA DEL GEN *MNN9*.

El gen *MNN9* se localizó dentro de la secuencia completa del genoma de la cepa SC5314 de *Candida albicans*, publicada por la Universidad de Stanford (<http://sequence-www.stanford.edu/group/candida/index.html>). La ORF, de 1107 nucleótidos, codifica para una proteína de 368 aminoácidos.

La publicación del mapa físico del genoma de *C. albicans* ha permitido ubicar el gen *MNN9* en el cromosoma 3 tanto en la cepa SC5314 como en la cepa WO-1. El gen *MNN9* está flanqueado por los genes *CaCAM-1* a una distancia de 582 pb y por *CaNOG1* a una distancia de 407 pb (en 5' y 3' respectivamente).

1.1.- Análisis de la región 5' no codificante

En la región 5' no codificante de los genes se encuentran las secuencias implicadas en el control de la expresión de los mismos; entre las secuencias generales se encuentran las responsables de la interacción con la RNA polimerasa y las que determinan el sitio de inicio y la eficiencia de la transcripción (Guarente, 1984).

Las secuencias TATA reconocidas por la proteína TBP (*TATA Binding Protein*) intervienen en el ensamblaje de la RNA polimerasa II en los promotores de genes de eucariotas.

Aunque los genes que poseen cajas TATA dependen de la presencia de estas secuencias para su expresión, se han caracterizado genes que no poseen cajas TATA y que aun así interaccionan y precisan de la TBP para su expresión, se ha sugerido por ello que podrían existir diferentes mecanismos que median la unión de TBP a los promotores (Basehoar *et al.*, 2004).

El 20% de los genes de *S. cerevisiae* se podrían calificar como portadores de una caja TATA funcional. Estos genes parecen estar sujetos a mayor regulación transcripcional que el resto, y la mayor parte de ellos están implicados en la respuesta a diferentes tipos de estrés (Basehoar *et al.*, 2004).

En los 600 nucleótidos previos al codón de inicio de *MNN9* no se ha localizado ninguna secuencia que se ajuste de forma estricta a la secuencia consenso TATA(A/T)A(A/T)(A/G) definida en *Saccharomyces*, pero se han localizado hasta 8 secuencias que difieren

mínimamente de la secuencia consenso y aparecen señaladas con un fondo rojizo en la Fig. 14. De ser funcionales, la presencia de estas secuencias podría indicar que existen múltiples cajas TATA de este gen.

En la región promotora de *MNN9* se localizan además seis cajas CAAT, elemento que parece ser de gran importancia para la eficiencia de transcripción en levaduras (Dobson *et al.*, 1982), y se encuentran destacadas sobre fondo azulado en la Fig. 14. Otros motivos identificados son dos elementos CAAG (sobre fondo turquesa), y además en al menos uno de estos elementos se encuentran, aguas arriba, las regiones ricas en C y T (bloque de pirimidinas) que acompañan generalmente a una distancia aproximada de 9-12 pb a este elemento en promotores de genes altamente expresados de *S. cerevisiae* (Dobson *et al.*, 1982). En la Fig. 14 se han subrayado en verde además varias zonas ricas en timidinas y adeninas. Varios autores han sugerido que las regiones poli(A) y poli(T) contribuyen a la expresión constitutiva de los genes que las portan (Struhl, 1985; Ferguson *et al.*, 1986).

El análisis del promotor de *MNN9*, llevado a cabo con varios programas disponibles en la red, ha permitido la identificación de varias secuencias que han sido descritas en *S. cerevisiae* como potenciales sitios de unión a factores de transcripción específicos. Utilizando herramientas de la base de datos YEASTRACT (<http://www.yeasttract.com>) se han detectado posibles sitios de unión a los factores de transcripción Ash1p, Fkh1p, Fkh2p, Gcn4p, Hsf1p, Mac1p, Mot3p, Nrg1p, Rtg1p, Rtg3p, Yap1p e Yrr1p. Serían necesarios trabajos experimentales para comprobar si estos sitios son funcionales.

1.2.- Análisis de la región 3' no codificante

En la región terminadora de los genes se encuentran secuencias relacionadas con el fin de la transcripción y la maduración del RNA. Dentro de los 600 nucleótidos siguientes al codón de parada del gen *MNN9* se localizó una secuencia (señalada con un fondo verde en la Fig. 14) que podría constituir una señal de poliadenilación de acuerdo a los resultados del programa Dragon PolyA Spotter (<http://cbrc.kaust.edu.sa/dps/>).

Zaret y Sherman describieron la presencia de una secuencia tripartita en la región 3' no codificante de numerosos genes de levaduras, que precede a la señal de poliadenilación y que parece contribuir a la eficiencia de los procesos de poliadenilación y finalización de la transcripción (Zaret & Sherman, 1982). La secuencia consenso posee la siguiente estructura: STOP....región rica en T...TAG...TAGT (TATGT)...región rica en A/T...TTT.

En *MNN9* no encontramos completa la secuencia tripartita pero sí varias secuencias TAG, la secuencia TATGT, una región rica en A/T y un triplete TTT, motivos que se han destacado en la Fig. 14 sobre fondo amarillo.

1.3.- Estudio de la región codificante

En la mayoría de los genes de levaduras, el entorno del codón de inicio de la transcripción (ATG) está conservado. Cigan y Donahue comparando la secuencias de 131 genes de levaduras propusieron una secuencia consenso en torno al ATG inicial que se corresponde con (A/Y)A(A/T)AATGTCT, donde Y es una pirimidina (Cigan & Donahue, 1987). La base más conservada es la adenina en posición -3 (Dobson *et al.*, 1982). El entorno del codón de inicio de *MNN9*, AATCATGGTT, se ajusta a la secuencia consenso descrita excepto en las posiciones -1, 4 y 5. Muchos genes de *C. albicans* no presentan la secuencia consenso totalmente conservada, aunque sí la adenina en posición -3.

La fase de lectura abierta de *MNN9* no se encuentra interrumpida por intrones. En la ORF del gen *MNN9* el contenido A+T es del 65,85%, porcentaje que es superior al de C+G, lo cual está en consonancia con lo descrito para la mayoría de genes de *C. albicans* (Odds, 1988).

CGGTAAAGTTTTCAAATAAGCTTTGGGC **TATAATG**AGTACTTTT **TATAGTTT** **GCAATAGT** **TATAGTTG**AATTGATTTTGACT
 AAAATCTTAGTTATGTTGATTGTAGCTGTTCTTCGACATTGAATAAACTCAC **TATATTAC**TGTAGGAAAATGAACGAATGAA
 CGATTGAATGAATGAGAACCCTC **TATAATAA**ATTGATTGTTTTGTTGTTGTTCTTTTTTTTTGCTCGCGTGACTACTGAT
 ATGAGGCAT **CAAT**ACAT **CAAT**AGAAACACGGTTCATAA **TATAATT**GTGTAGAAATTCAACAAAGAGTGAGAGAGTGG
 CAGAAAGAAAAGGAAAAAATAATTGTTAAATAAATGTCAAAGATTTCCTCAGTTAAAA **ECCTCTTCTACA**
 ACTGAACATTTCTTGAACACTATTTGTCTTACTTTCAACGCTCCA **TATAGTTG**ATAGAT **CAAG**AGGTAGAAGGAGACTTTTC
 AAACAGTGACTAGTTCATTTTCAGTTTTCACATTATTTTAGTTGAAT **CAAT**TCGTTGTATTTTTTTTT **CAAG**GTTCAAAGT
 TACTATT **TATAAATCAAT**TCAG **CAAT** **CATG**TTCACTATAGGAATCGATACCTAAATTATATACGAAGAAAACCATAGCATT
 TTGGCTCCTACTTTATTGGTTGTGATCTACTTTTATTCTTTTCTGCCATGGGTTTCTTCAAACAAGCAGAAATATAAC
 TACAATAAAAAGAGTAGAGGATGGTTTACAAAAACAGAGATACAGTAATATTAAGATTACCTAAGAATCATATTAGTC
 ATTATGATTTGAATAAATTGACGGCATCAAAGACGCATTGAACAAAAGAGAAGAAGTGTGATCTTAACCTCAATGTCCA
 AATCTTACCTGAATATTGGGAAAAATAAAATAAACTCACCTATGACCATTGTTAATTTTCATTAGGGTTTATTTTCCCAAGAA
 CTACTCAAGGAGATGATGCTTTAAAAGAACTCGAAAATGCATTAAGAAAACGAAAAGAGAAAAACGGTTGAACCTCAA
 AAAAATCACTATTTAAGACAAGATTCCAATCTTTACAAAGTCAATTAGAAAAAGATAGACATGCATTCAAAGTCAA
 GGAAAGAAGATCAATGATGGCATTAGCAAGAACTCATTGGTTTTTCAGTACAATTTACCATCTACTTCTGGGTCTATGG
 TTGGATGCAGATATCGTTGAAACTCCAAGTACATTGATTCAAGACTTGACTGGTCAACAACAAACCCGTCGTTCCGCTAAT
 GTCCACCAAGATTATCAACCAAGATACAAAACAGCCAGACATCAGACCATACGATTCAATAATTGGGTGAAAAGTGAG
 GAAGGATTGAAATGGCTGCTAGTTTACCAGATGACGAAATATTGTCGAAGGTTATTAGAAATGGTTACTCATAGAGCA
 TTAATGGCTCATTTTACGATCCTAAAGGTGATCCAAGTACAGAAATGACATTAGACGGTGTGGTGAGGTGCAGTTATG
 GTTAAAGCTGACGTACATAGAGATGGTCCATGTTCCATCGTCCCATCTATCATTGATTGAAACGGAAGGATTGCTA
 AAATGGCAAAAAGATTAGGCTATGAAGTATATGGTTTACCAAATTAAGTTTCCATTATAATGAGTAAATCAAGTGGGG
 GACAACCAGAGAAAAGAAAAAGAAAAAGAAAAAGAAAAAGAAAAAGT **TAGT**ATCTTAGATTTTGTAAACA **TAGT**CATATCTCCATTT
 TGATATACATTTATTTTTGAAA **TAGT**TAATAATTGT **TTCATG**ATG **TAAATAATGT**AGAGTA **TATGT**GTGATACAAAG
 GGGAGACTGCTAAACTGATCTCCCATTTGAGTTTGGGTGTTTCAGTTGTACTTTATTTTATTGATAACTCCTTTGTATAGGCATC
 CCCTTAAAGACACAAAATATTACAGACAAAAAATAATTTGACAGAGAGAAAAGAGAAAAAATAATTAATCTCATCT
 CC **TATTTTTTTTTTAAAAAGGATTTA**CACAACATCATCACTATAACCACCAACAGCTACAAATAGAAATGCAACTTTCATG
 GAAGGATATACCACGGTACCTACATCTAACGA **TATGT**TAGATATAGTGTGAACCGTACCAAAGAAAAACGCCTACTGTT
 ATTAGACCAGGGTTAAGATCACTCGTATTCGTGC **TTTTTATATGAGAAAAAGTTAAATT**ACTGCTGAAGGTTTCACTGAA
 AAATTTACTGATTTGTT

Fig. 14.- Región del genoma de *C. albicans* que contiene el gen *CaMNN9*. En la región promotora se han señalado las posibles cajas TATA (con fondo rojo), varias secuencias ricas en T y en A (subrayadas en verde), y las secuencias CAAT y CAAG (sobre fondo azul y turquesa respectivamente). En la región 3' no codificante se han destacado posibles partes de la secuencia tripartita (sobre fondo amarillo) y la posible señal de poliadenilación (sobre fondo verde). El codón de inicio se encuentra resaltado con un círculo rojo, y la secuencia de la ORF se ha marcado en texto verde. El inicio y final del transcrito se ha enmarcado en flechas azules.

1.4.- Análisis de la secuencia aminoacídica de Mnn9p

La estructura primaria de la proteína codificada por el gen *MNN9* consta de 368 aminoácidos. En la tabla adjunta se muestran algunas de las características fisicoquímicas de la proteína estimadas por el programa *Editseq*, así como el número de residuos ácidos, básicos, hidrofóbicos y polares presentes en la secuencia.

Análisis CaMnn9p		Aminoácidos	Número	%
Peso molecular	42.78 kDa	Ácidos (D, E)	43	11.68
Tamaño	368 aa	Básicos (K, R)	50	13.59
Punto isoeléctrico	9.18	Hidrofóbicos (A, I, L, F, W, V)	126	34.24
Carga a pH 7	-9.093	Polares (N, C, Q, S, T, Y)	93	25.27

La comparación mediante el programa *FASTA* de la secuencia de aminoácidos de Mnn9p (cepa SC5314) con la de otras proteínas presentes en la base de datos UniProt reveló un elevado porcentaje de identidad con proteínas caracterizadas como manosiltransferasas, un 64% con Mnn9p de *S. cerevisiae*, y un 55.9% con la de *Schizosaccharomyces pombe*. Además, Mnn9p presenta un elevado grado de identidad con probables manosiltransferasas de otras especies fúngicas como *Lodderomyces elongisporus* (A5DZM7_LODEL), *Hansenula anomala* (A3F9N0_HANAN), y *Yarrowia lipolytica* (Q8X1X9_YARLI) con porcentajes de identidad del 73%, 62% y 52%, respectivamente.

La región que muestra mayor grado de identidad con las proteínas indicadas anteriormente se corresponde con el dominio Anp1 (pfam03452) localizado según *InterproScan* entre los aminoácidos 46 y 334 de Mnn9p. Esta región se ha encuadrado en el anillamiento tipo *ClustalW* con las manosiltransferasas homólogas de *S. cerevisiae*, *S. pombe* y *C. albicans* (Fig. 15).

La comparación de los dominios funcionales encontrados mediante *InterproScan* y *NCBI Conserved Domain Search* indica que la proteína Mnn9p de *C. albicans*, al igual que las proteínas homólogas de otros hongos presenta un único dominio Anp1.

La búsqueda de señales de localización subcelular mediante el programa *LOCtree*, permitió identificar en la proteína Mnn9p motivos de localización en el complejo de Golgi.

Con el programa *Motifscan* del servidor *Prosit* se localizaron dentro de la secuencia de aminoácidos de Mnn9p, posibles motivos relacionados con diferentes modificaciones postraduccionales. Se identificaron 5 posibles motivos de fosforilación por la caseína quinasa II, 3 sitios de fosforilación por la proteína quinasa C, un sitio de fosforilación por la proteína

quinasa dependiente de cAMP y cGMP, 2 de N-miristoilización y 1 sitio de fosforilación por proteínas Tirosina kinasas.

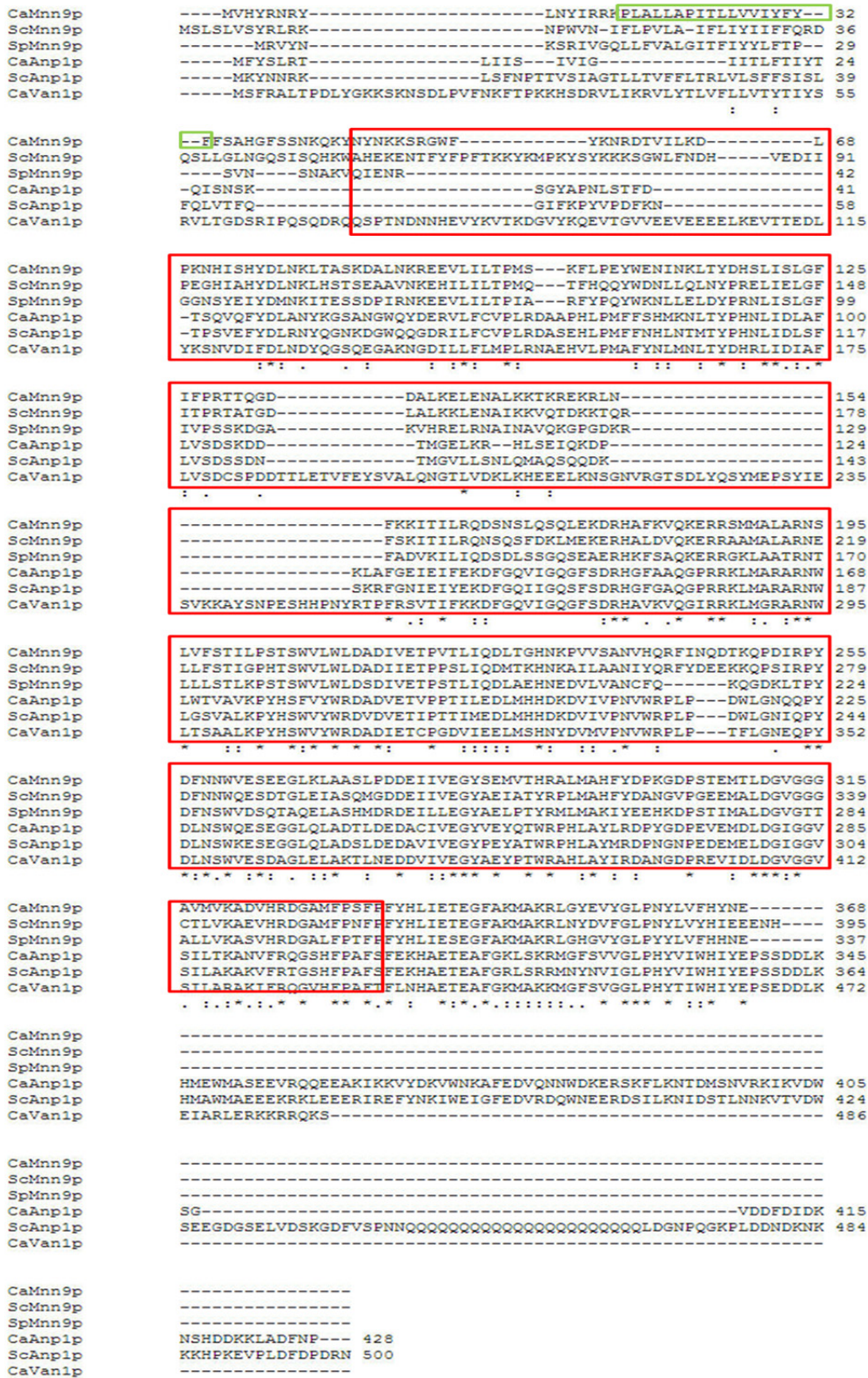


Fig. 15.- Comparación mediante *ClustalW* de las secuencias codificadas por diversos genes de la familia Anp1 de *C. albicans*, *S. cerevisiae* y *Schizosaccharomyces pombe*. El dominio Anp1 (pfam03452) se encuentra encuadrado en rojo. En verde se ha destacado la secuencia que corresponde a la región transmembrana de la proteína CaMnn9p

Presenta una región transmembrana que abarca los aminoácidos 17-39 y un péptido señal que abarca los aminoácidos 1-38.

1.5.- Análisis bioinformático de la interacción de la proteína Mnn9p con otras proteínas

El análisis informático mediante la aplicación en línea *String* 9.05 (<http://string-db.org/>) reveló que la proteína Mnn9p podría interactuar con las siguientes proteínas: Och1p, Hoc1p, Mnn11p, Van1p, Anp1p, Mnn10p y Pho88p.

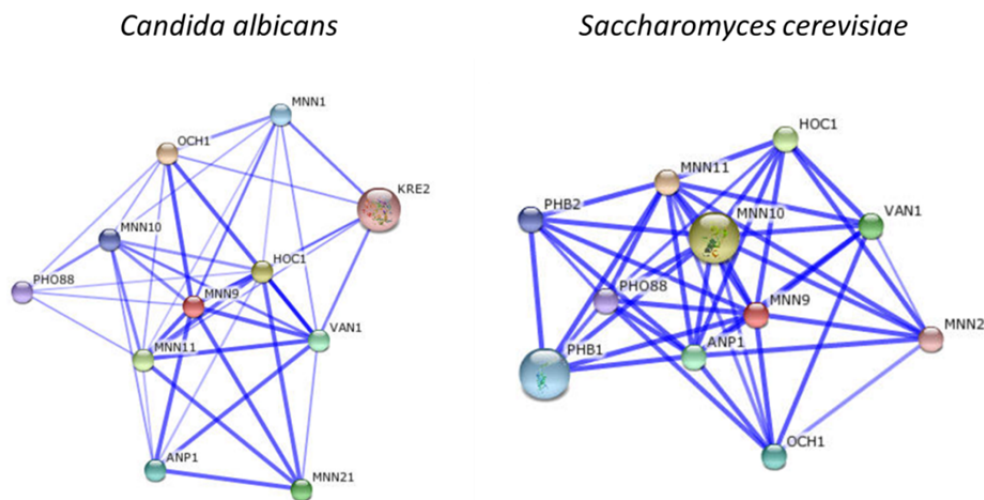


Fig. 16.- Interacciones posibles de la proteína Mnn9p con otras proteínas en *C. albicans* (izquierda) y *S. cerevisiae* (derecha). Las interacciones se han marcado con una línea azul, las asociaciones más fuertes se marcan con líneas más oscura.

Salvo Pho88p, que es un transportador de fosfato inorgánico, el resto de las proteínas anteriormente mencionadas son manosiltransferasas. En el caso de Anp1p y Van1p de *S. cerevisiae*, se ha demostrado que forman parte de 2 complejos diferentes en los cuales se encuentra la proteína ScMnn9p (Jungmann & Munro, 1998a).

1.6.- Análisis de la sintenia de MNN9

Con objeto de analizar el entorno del gen *MNN9* en diversas especies, y tratar de dilucidar una posible conservación de dicho entorno hemos utilizado dos bases de datos: Candida Gene Order Browser (<http://cgob3.ucd.ie/>) y Yeast Gene Order Browser (<http://ygob.ucd.ie/>). La primera de ellas se centra en *C. albicans* mientras que el segundo se centra en *S. cerevisiae*.

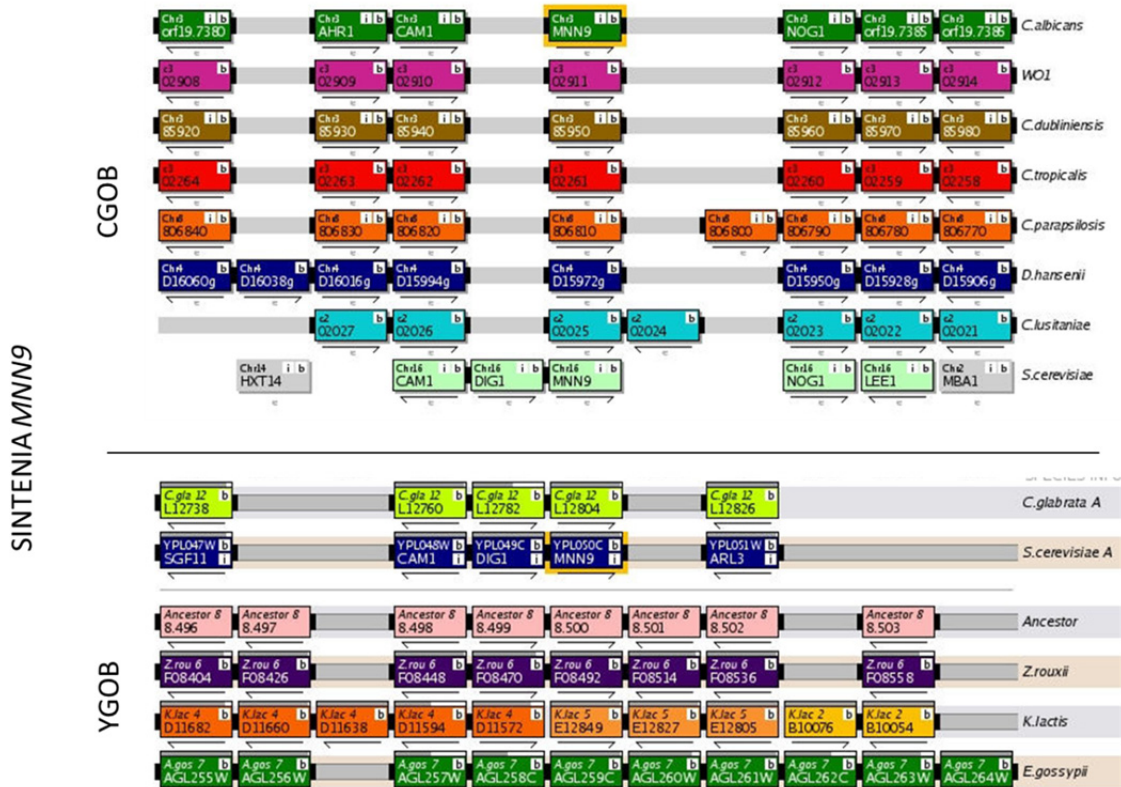


Fig 17.- En la figura se muestra el entorno del gen *MNN9* en *C. albicans* (CGOB) y en *S. cerevisiae* (YGOB). Los cuadrados del mismo color indican que los genes recuadrados pertenecen al mismo cromosoma. Las barras horizontales grises (negras junto a los recuadros) indican que los genes se encuentran adyacentes en el genoma.

Se observa que existe gran parecido en la organización de los genes entre las distintas especies de *Candida* y con *Debaryomyces hansenii* en el entorno de *MNN9*. Este parecido ya no es tan evidente al comparar el entorno en *S. cerevisiae* con el de especies de distintos géneros obtenido con ayuda de la base de datos YGOB. Se observa en el CGOB que el gen inmediatamente aguas arriba de *MNN9* (*CAM1*) se encuentra muy conservado, pero en *S. cerevisiae* existe el gen *DIG1* entre ambos. En la base de datos YGOB se observa que la especie más diferente es *Kluyveromyces lactis* presentando los genes del entorno de *ScMNN9* hasta en 3 cromosomas distintos.

2.- COMPROBACIÓN DE LA CEPA DELECCIONADA EN EL GEN *MNN9*

La cepa mutante *mnn9Δ* fue construida en el laboratorio del Dr. Philip Robbins a partir de la cepa CAI4, utilizando el método del Ura-Blaster descrito por Fonzi e Irwin (Fonzi and Irwin, 1993). Se eliminó una secuencia interna de 0.6 Kb de las dos copias de la ORF del gen *MNN9*. Dicha secuencia queda reemplazada en el mutante por el fragmento "hisG" de 1,1 Kb.

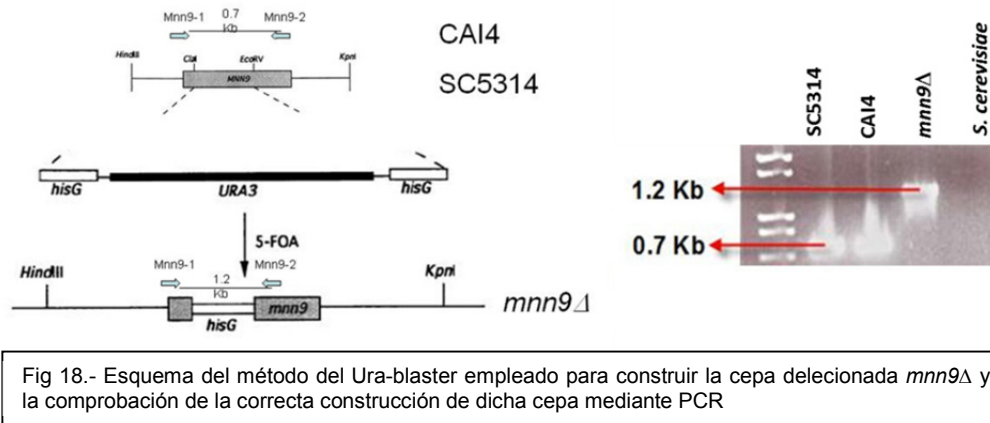


Fig 18.- Esquema del método del Ura-blaster empleado para construir la cepa delecionada *mnn9Δ* y la comprobación de la correcta construcción de dicha cepa mediante PCR

Se realizó un experimento de PCR con objeto de comprobar la cepa. Se utilizaron como cebadores los oligonucleótidos Mnn9-1 y Mnn9-2 (descritos en Materiales y Métodos) con los que se amplificó el DNA de la cepa silvestre SC5314, del parental CAI4 y del mutante *mnn9Δ*. En el esquema de la Fig. 18 se detallan los pesos moleculares que deben de tener las bandas amplificadas en cada una de las cepas así como la fotografía del gel en el que se visualizaron los productos de las PCRs. Adicionalmente se incluyó como control DNA de *S. cerevisiae*.

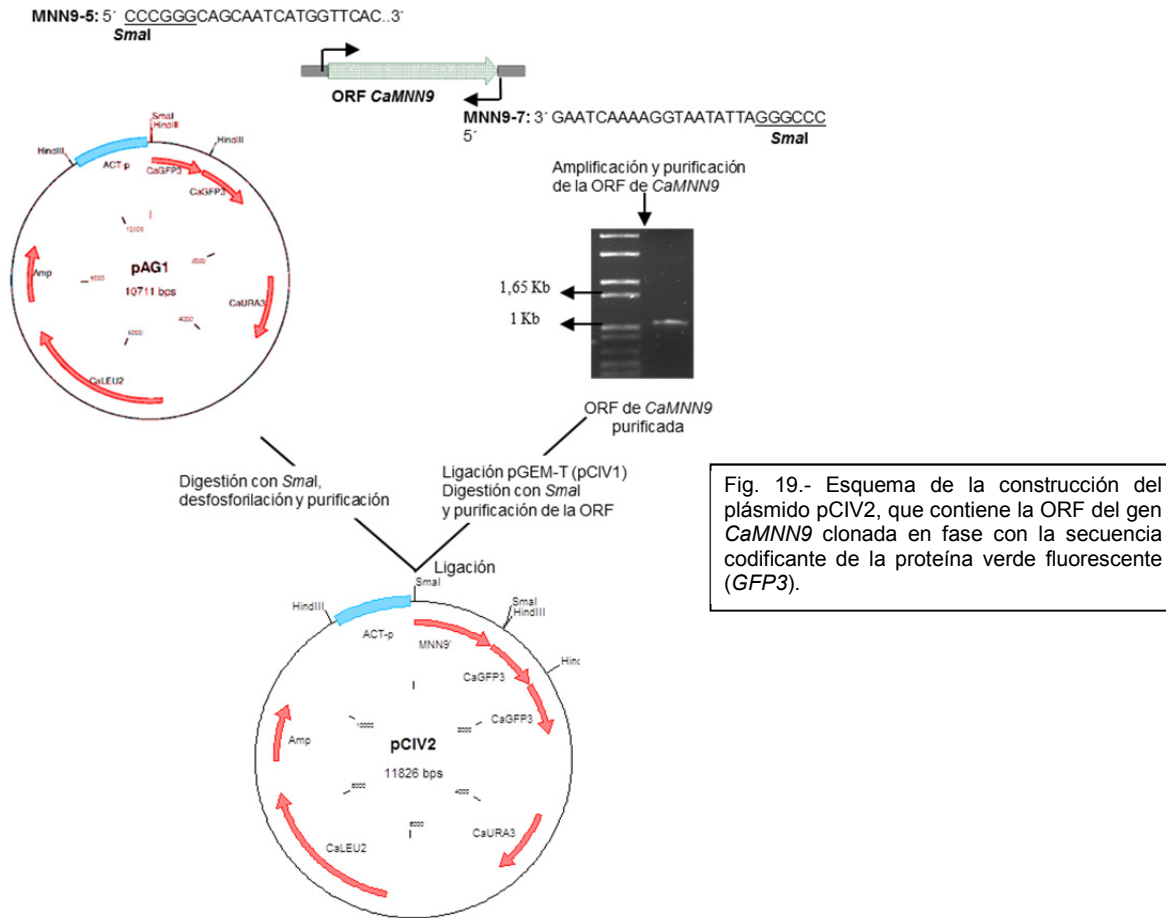
3.- LOCALIZACIÓN SUBCELULAR DE LA PROTEÍNA Mnn9p

Estudios realizados en *Saccharomyces cerevisiae* han demostrado que Mnn9p se localiza en el aparato de Golgi (Jungmann & Munro, 1998b; Okamoto *et al*, 2008). Con objeto de conocer si en *C. albicans* se ubicaba en el mismo orgánulo llevamos a cabo un experimento de localización subcelular. Los estudios experimentales se realizaron mediante fusión de la secuencia del gen *MNN9* con la de la proteína verde fluorescente (GFP) de la medusa *Aequorea victoria*. Según estudios previos, la visualización de la fluorescencia emitida por construcciones similares requiere un alto nivel de expresión de la proteína resultante, por lo que decidimos expresar la proteína de fusión bajo el control del promotor de la actina, que presenta una actividad constitutiva fuerte.

Se utilizó el vector pAG1 (Gonzalez-Novo *et al.*, 2004), descrito en Materiales y Métodos que contiene el promotor del gen de la actina y a continuación la secuencia que codifica la GFP adaptada para el uso de codones de *C. albicans* (secuencia *GFP3*).

Se obtuvo el plásmido pCIV2 en el que las secuencias *MNN9-GFP* constituyen una única fase de lectura abierta, codificando para una proteína en la que la GFP se encuentra fusionada al extremo carboxilo terminal de Mnn9p.

El vector pCIV2 se utilizó para transformar las cepas CAI4 y *mnn9Δ* dando lugar a las cepas CAI4-GFP y *mnn9Δ*-GFP respectivamente.



Se seleccionaron varios clones Ura⁺ de cada una de las transformaciones y se cultivaron durante 14 horas en YNB a 28°C. Los cultivos se refrescaron realizando una dilución 1/5 del cultivo en medio YNB y se incubaron durante 5 horas a 28°C. Se tomó una muestra de cada uno de los transformantes y se observó en un microscopio óptico DRMX (Leica) con fuente UV LEICA ebq 100, utilizando los filtros adecuados para la visualización de la fluorescencia de la GFP y del colorante Hoechst cuando fue necesario.

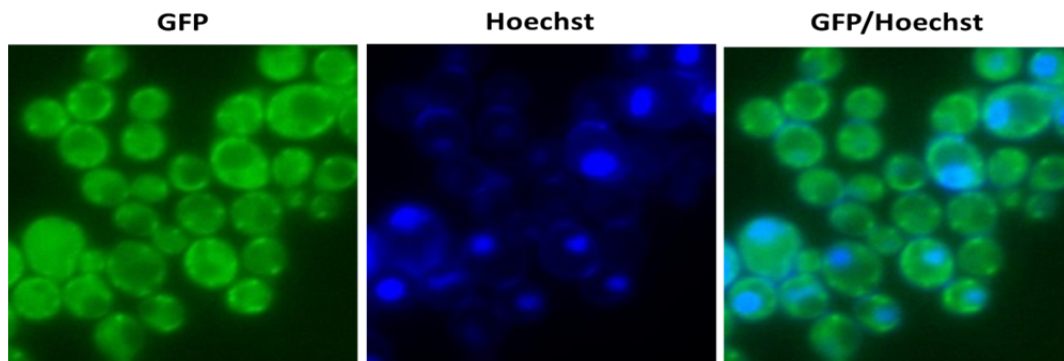


Fig 20.- Localización mediante GFP de la proteína *CaMnn9p*, en la cepa *Camnn9Δ* transformada con pCIV2. Se observan acumulaciones discretas de fluorescencia fuera del núcleo, en estructuras que parecen corresponder al aparato de Golgi.

En las cepas CAI4 (resultados no mostrados) y *mnn9* Δ transformadas con el vector pCIV2 que expresa la proteína Mnn9p fusionada a GFP se observa fluorescencia localizada en zonas discretas del citoplasma que como era de esperar parecen corresponder a estructuras del aparato de Golgi.

4.- EFECTOS DE LA DELECIÓN DE *MNN9* EN LA MORFOLOGÍA CELULAR Y EL CRECIMIENTO

Llevamos a cabo diversos análisis fenotípicos del mutante comenzando por estudiar en detalle cómo afecta la ausencia de esta proteína a la morfología y crecimiento.

Se espera que los mutantes alterados en el proceso de N-glicosilación de proteínas presenten alteraciones en la superficie celular (ver Introducción 3.3), ya que en dicha superficie abundan las proteínas glicosiladas. Para ver si nuestro mutante presentaba algún tipo de defecto externo, realizamos observaciones de su morfología.

4.1.- Crecimiento en medio líquido a 28°C

4.1.1.- Observaciones al microscopio óptico

Se cultivaron CAI4 y *mnn9* Δ en medio mínimo YNB suplementado con uridina.

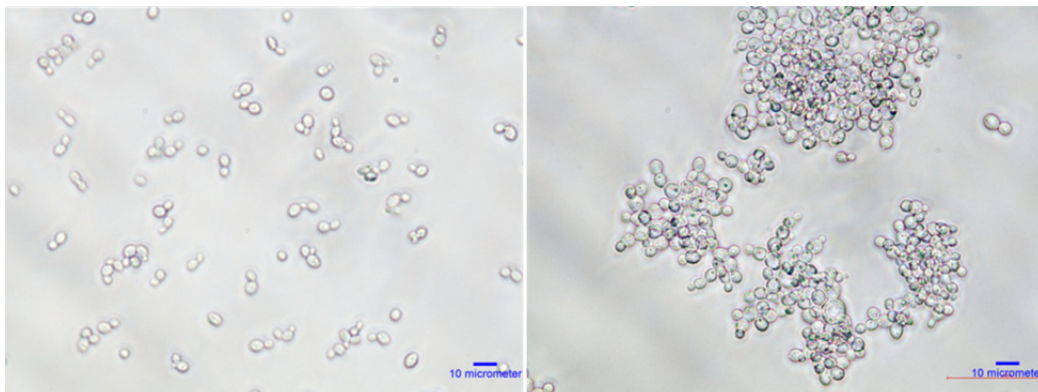
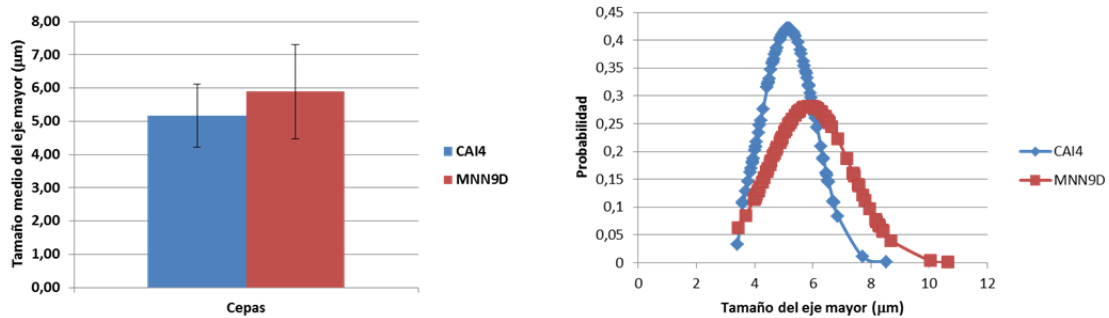


Fig 21.- Células de las cepas de CAI4 (izquierda) y *mnn9* Δ (derecha). Se puede observar la tendencia a agregarse que presentan las células de la cepa mutante *mnn9* Δ .

Las células de *mnn9* Δ recogidas de cultivos líquidos en fase exponencial de crecimiento forman agregados (Fig. 21). La observación al microscopio nos permitió apreciar que algunas de las células de la cepa *mnn9* Δ presentaban un tamaño ligeramente mayor que el de la cepa parental. Con objeto de cuantificar si el tamaño medio de una población de células mutantes era diferente al de las células silvestres se tomaron fotografías al microscopio, y con ayuda del programa *ImageJ* (<http://rsbweb.nih.gov/ij/>) se midió el

diámetro mayor de 100 células de cada una de las cepas. Los resultados obtenidos se representan en las gráficas mostradas en la Fig. 22.



El hecho de que las células tiendan a agregarse cuando crecen en cultivos líquidos debe de permitir una rápida sedimentación de las mismas cuando los cultivos se dejan en reposo. Con objeto de verificarlo, realizamos un experimento en el que se incubaron las células en medio YNB y en agitación a 28°C hasta que alcanzaron la fase exponencial de crecimiento y posteriormente los cultivos se dejaron en reposo. En la Fig. 23 se puede apreciar el aspecto de los cultivos a tiempos 0 y 5 minutos de reposo.

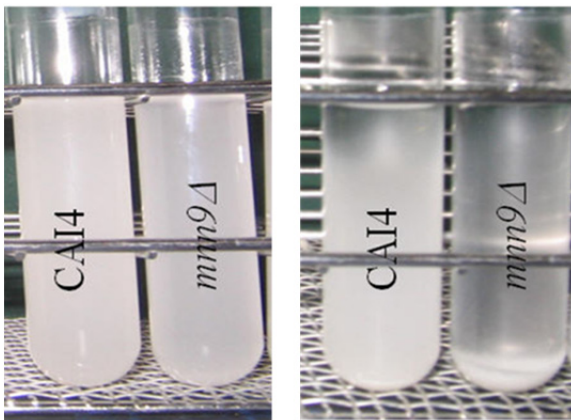


Fig 23.- Ensayo de sedimentación de las células. Las imágenes muestran el aspecto de los cultivos a los 0 (izquierda) y 5 minutos (derecha) después de haberlos mantenido en agitación.

Como se puede observar, las células del mutante sedimentan en el fondo del tubo más rápidamente que las de la cepa parental.

4.1.2.- Curva de crecimiento en medio líquido a 28°C

Debido a que las células de *mnn9Δ* se agregan es difícil hacer recuentos celulares en la cámara Thoma, por lo que para analizar el crecimiento nos propusimos determinar el peso seco de suspensiones celulares con distintas D.O.₆₀₀. En la Fig. 24 se muestran las rectas de calibrado peso seco/D.O.₆₀₀ para las cepas parental y mutante. Como se puede observar,

para una misma D.O.₆₀₀ el peso seco de las muestras de *mnn9Δ* es ligeramente mayor que el de la cepa parental.

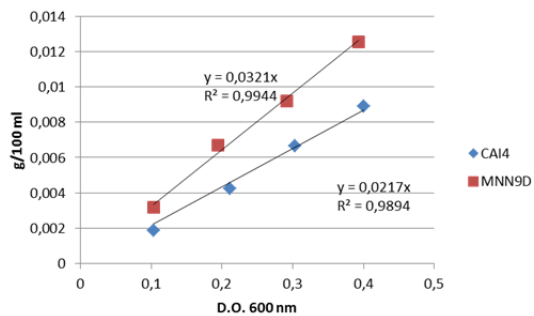


Fig 24.- Rectas de regresión de los valores del peso frente a la D.O. de suspensiones celulares de CAI4 y *mnn9Δ*.

Este resultado es lo esperado teniendo en cuenta que cuando las células se agregan las medidas de la D.O.₆₀₀ subestiman el número de células.

Como comentamos anteriormente, es complicado hacer recuentos del número de células en la cámara Thoma para el caso del mutante *mnn9Δ*. Con objeto de averiguar si se podían separar fácilmente las células agregadas, se sometieron las suspensiones celulares a un pulso de sonicación de 10 segundos al 70% de amplitud (BRANSON Digital Sonifier). La mayoría de las células de los agregados aparecían dispersas después de este tratamiento de sonicación. La adición a las muestras que se estaban observando al microscopio del colorante azul de metileno nos permitió comprobar que la integridad celular no se había visto afectada por el tratamiento ya que no se apreció ninguna célula teñida.

El recuento del número de células en la cámara Thoma después de sonicar las muestras nos permitió determinar las rectas de regresión que relacionan la concentración celular con las D.O.₆₀₀ de las suspensiones.

$$\text{CAI4:} \quad \text{N}^{\circ}\text{cels/ml} = 1 \times 10^7 \times \text{D.O.}_{600}$$

$$\text{mnn9}\Delta: \quad \text{N}^{\circ}\text{cels/ml} = 9 \times 10^6 \times \text{D.O.}_{600}$$

A la vista de los resultados, el número de células para una misma D.O.₆₀₀ es ligeramente inferior (1,11 veces) para el caso de la cepa mutante. Este resultado es coherente con el hecho de que el tamaño medio de las células de *mnn9Δ* es ligeramente superior (1,2 veces) al de las de la cepa parental.

Determinamos las curvas de crecimiento en medio líquido YNB para las 2 cepas realizando medidas de D.O.₆₀₀ de los cultivos a diferentes tiempos tras ser sonicadas las muestras.

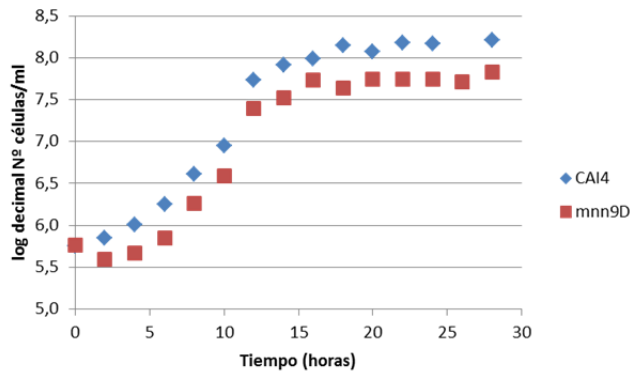


Fig 25.- Curva de crecimiento en medio mínimo líquido YNB a 28°C de las cepas CAI4 y *mnn9Δ*. La gráfica muestra el logaritmo decimal del n°cels/ml para una mejor observación de la dinámica de crecimiento de ambas cepas.

En la Fig. 25 se representan estas curvas que relacionan tiempo de incubación de los cultivos frente al número de células/ml. Estos datos se obtuvieron convirtiendo las medidas de D.O.₆₀₀ a número de células/ml mediante las fórmulas anteriormente descritas. Se observa que la cepa mutante *mnn9Δ* presenta un tiempo de generación similar al de la cepa parental (CAI4 = 102 min, *mnn9Δ* = 93 min). Sin embargo, el crecimiento alcanzado en la fase estacionaria por la cepa mutante es inferior al alcanzado por la cepa parental.

4.2.- Crecimiento en medio sólido a 42°C

Algunos mutantes que presentan defectos en el proceso de glicosilación no pueden crecer a temperaturas de 42°C. Entre ellos se encuentra el mutante *och1Δ* de *C. albicans* (Bates *et al*, 2006). Con objeto de investigar si *mnn9Δ* es capaz de crecer a 42°C realizamos ensayos de sensibilidad a exposición a esta temperatura creciendo en medio sólido (Fig. 26).

Para ello se sembraron suspensiones de concentraciones decrecientes de las cepas parental y mutante en placas de YNB con uridina o además con 1M de sorbitol y se fotografiaron después de incubarlas a las temperaturas indicadas tras 3 días de crecimiento.

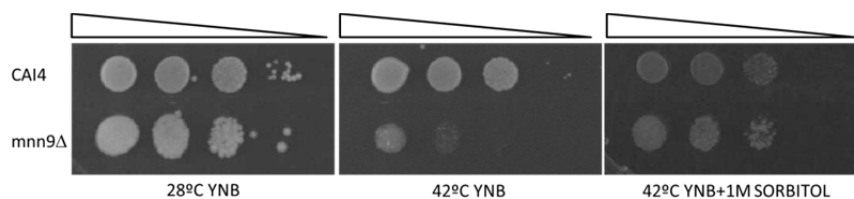


Fig 26.- Ensayo de crecimiento en placa a 42°C. La cepa mutante es más sensible que la parental a 42°C. La mayor sensibilidad a 42°C se corrige si crece en presencia de sorbitol.

Como se aprecia en la Fig 26 la cepa mutante *mnn9Δ* presenta defectos en el crecimiento a 42°C. Estos defectos se corrigen mediante la adición de sorbitol al medio.

5.- EFECTO DE LA DELECIÓN DE *MNN9* EN FILAMENTACIÓN

Nos propusimos analizar el fenotipo de filamentación del mutante en respuesta a algunos estímulos que disparan el proceso de la transición levadura-hifa en *C. albicans*.

5.1.- Análisis de la capacidad de filamentación en medios sólidos

El aspecto que presentan las colonias de *C. albicans* que se desarrollan sobre los medios sólidos que se han ensayado nos ha permitido comparar los efectos de diferentes factores sobre la capacidad de filamentación de la cepa mutante respecto a la parental. Dichos factores son: presencia de inductores (suero), fuente limitante de nitrógeno (medio SLADH), limitación de nutrientes (medio Spider) o crecimiento dentro de una matriz (medio Embedded) (Ernst, 2000b). En estas condiciones pueden manifestarse defectos en filamentación de algunos mutantes que en condiciones de inducción más potentes no se manifestarían.

La inducción de la filamentación en medios sólidos se llevó a cabo sembrando células de las diferentes cepas (entre 50 y 100 U.F.C.) en placas con los siguientes medios inductores: medio Lee con suero al 4%, SLADH, Embedded y Spider (ver materiales y métodos). Se incubaron a 37°C (embedded a 28°C) y pasados 4 días se observaron las colonias con ayuda de un estereomicroscopio. Las colonias que presentan rugosidades en la superficie y/o proyecciones alrededor, contienen mezcla de formas filamentosas (hifas y/o pseudohifas) y levaduriformes.

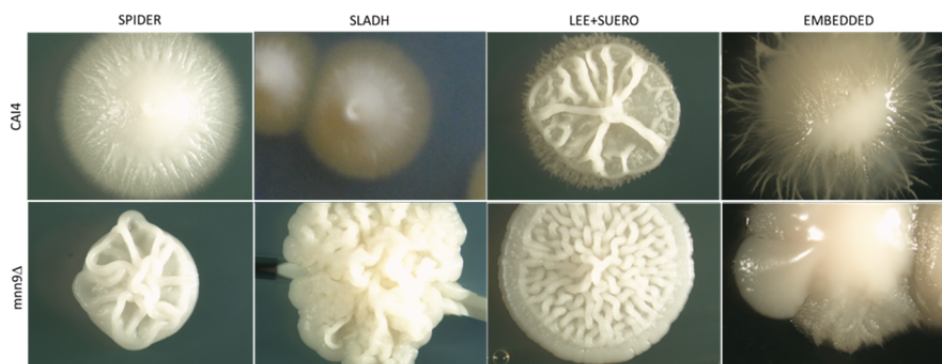


Fig 27.- Fotografías de colonias de la cepa CA14 (superior) y *mnn9Δ* (inferior) creciendo en distintos medios sólidos indicados.

Las colonias de la cepa *mnn9Δ* presentan rugosidades y proyecciones de forma similar a las de la cepa parental cuando las colonias crecen sobre medio Spider, SLADH, Lee+Suero y en las condiciones del medio Embedded.

5.2.- Análisis de la capacidad de filamentación en medio líquido

Se analizó el efecto de la delección de *MNN9* en la transición levadura-hifa comparando su comportamiento con la cepa parental CAI4 bajo condiciones de inducción de la filamentación en medio líquido. En estas condiciones la emisión del tubo germinativo comienza a observarse a los primeros tiempos de incubación a 37°C.

Como se observa en la Fig. 28, el mutante *mnn9Δ* muestra defectos en la formación de hifas.

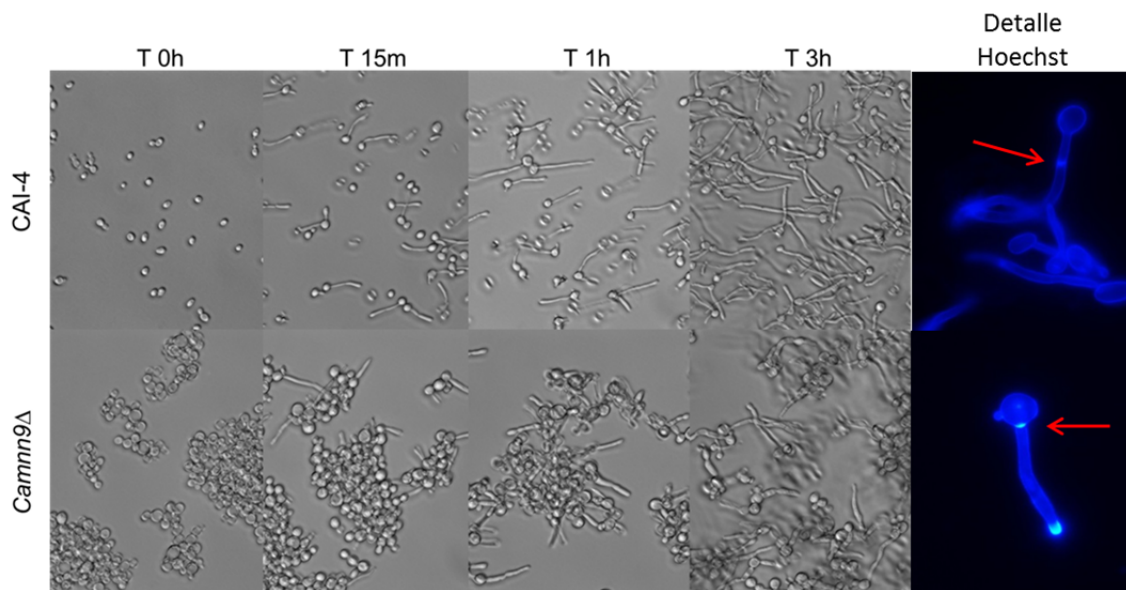
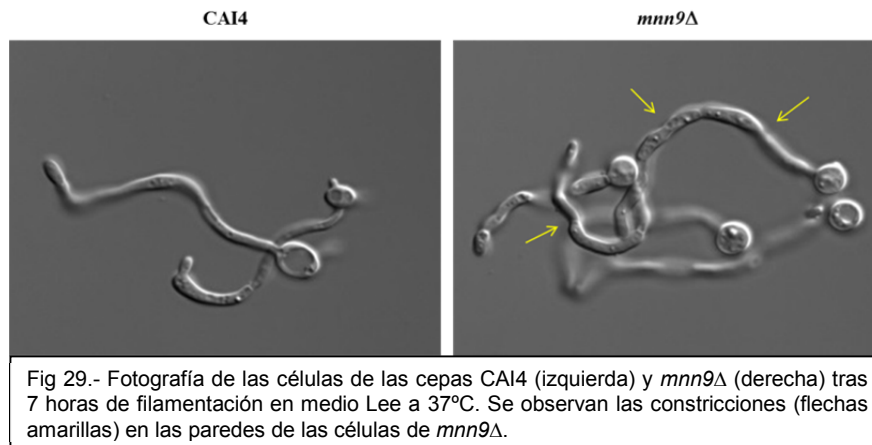


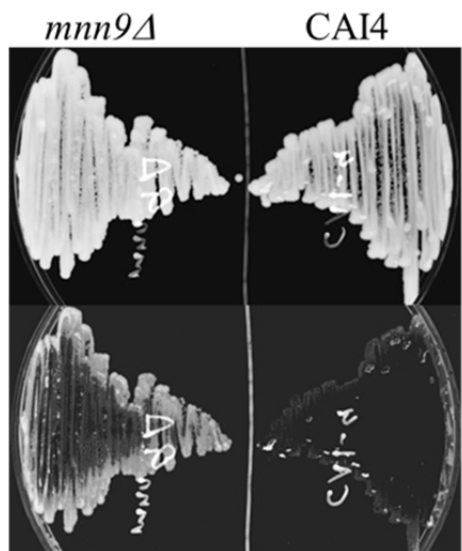
Fig 28.- Inducción en medio líquido Lee a 37°C. Fotos obtenidas a varios tiempos de incubación. Se aprecia una tinción de Hoechst (columna 5) en la que puede observarse que la cepa mutante no es capaz de formar hifas verdaderas. Las flechas rojas señalan los septos.

Las imágenes obtenidas después de la tinción con Hoechst, permitieron verificar que los filamentos formados por la cepa silvestre son hifas verdaderas mientras que los de la cepa deletada son pseudohifas. En la Fig. 28 se puede observar que el primer septo formado, visualizado debido a que el colorante Hoechst se une a la quitina, se localiza dentro del tubo germinativo en la cepa CAI4, alejado del cuello de separación de la célula madre e hija, mientras que en la cepa *mnn9Δ*, se encuentra justo en el cuello. Tal y como se indicó en la introducción, esta es una de las características que diferencia hifas de pseudohifas. También se observan las constricciones a nivel de los septos en los filamentos formados por el mutante *mnn9Δ*, mientras que la cepa parental forma hifas de paredes paralelas (Fig. 29).



5.3.- Análisis de la capacidad invasiva

Se ha descrito que tanto las hifas como las pseudohifas tienen la capacidad de invadir tejidos (Sudbery *et al.*, 2004). Con objeto de investigar si la cepa mutante se comporta de forma similar a la parental respecto a la capacidad de crecer en medios sólidos penetrando en ellos, se sembraron las cepas en placas de YNB suplementadas con uridina. Estas placas se incubaron a 28°C durante 72 horas. Pasado ese tiempo, se realizó un lavado de la superficie del agar con agua, eliminando así las células de la superficie de la placa. De esta forma, sólo permanecerán en las placas las células que hayan sido capaces, mediante crecimiento invasivo, de penetrar en el agar, mientras que las células incapaces de crecer de forma invasiva, serán retiradas en el proceso de lavado.



Como se aprecia en la Fig. 30 la cepa mutante *mnn9Δ* posee una mayor capacidad de invadir el agar que la cepa parental CAI4.

5.4.- Crecimiento en condiciones de hipoxia

Se sabe que en condiciones de hipoxia la formación de hifas en *C. albicans* está reprimida (Brown *et al*, 1999; Sonneborn *et al*, 2000). Algunos reguladores positivos de la formación de hifas en condiciones de normoxia (como Efg1p y Flo8p), también actúan como represores de la filamentación en condiciones de hipoxia (Setiadi *et al*, 2006; Stichternoth & Ernst, 2009).

Nos propusimos conocer el comportamiento de *mnn9Δ* en condiciones de hipoxia. Para ello se sembraron células de la cepa parental y de *mnn9Δ* en placas que se incubaron en un ambiente bajo en oxígeno durante toda la incubación.

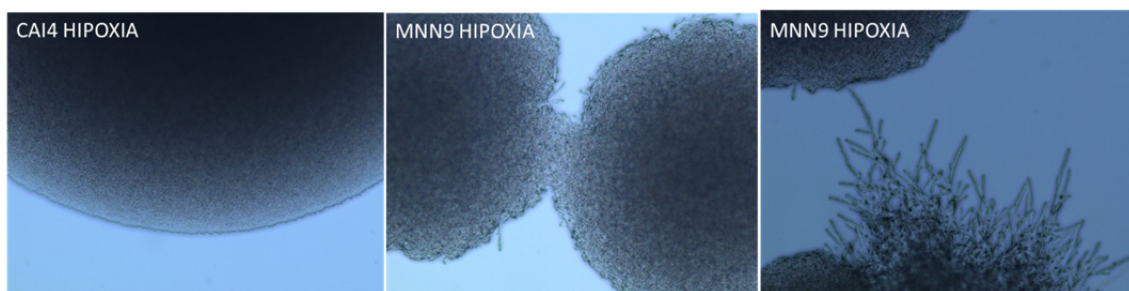


Fig 31.- Ensayos en condiciones de hipoxia a 28°C. Fotografías de microscopía de colonias de las cepas silvestre (izquierda) y mutante (centro y derecha).

Las colonias de la cepa silvestre crecen con bordes lisos en los que se aprecian únicamente células levaduriformes, mientras que la cepa mutante presenta colonias de bordes irregulares que en ocasiones contienen pseudohifas. De ello se concluye que la cepa mutante tiene alterada la ruta de señalización de hipoxia, pudiendo crecer en forma filamentosa en condiciones en las que la cepa silvestre tiene la ruta reprimida.

5.5.- Formación de clamidosporas

Otro proceso de diferenciación que es capaz de llevar a cabo *C. albicans* es la formación de clamidosporas.

Algunos mutantes de *C. albicans* presentan defectos en la formación de clamidosporas, y puesto que *mnn9Δ* presenta defectos en el proceso de la transición dimórfica quisimos averiguar si era capaz de formar clamidosporas.

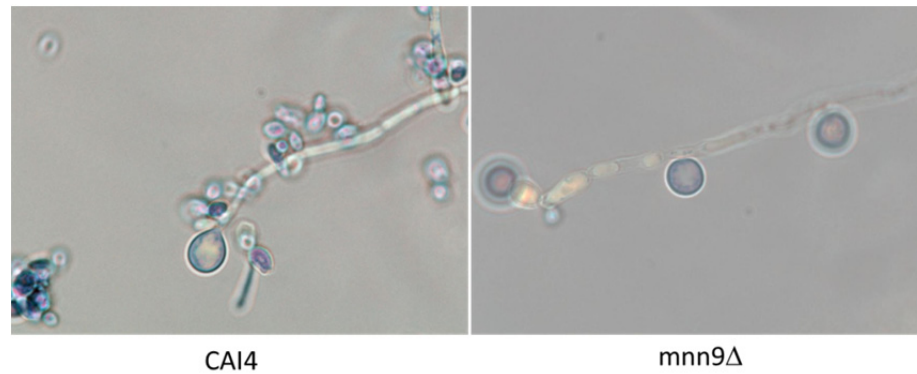


Fig 32.- Ensayos de formación de clamidosporas. Fotografías de microscopía de una muestra teñida con lactofeno-azul de bromofenol para visualizar las clamidosporas.

El mutante *mnn9Δ* es capaz de formar clamidosporas. En la Fig. 32 se muestran estas estructuras en una preparación microscópica de muestras teñidas con lactofeno-azul de bromofenol, el cual se une a la quitina de la pared celular.

5.6.- Formación de biopelículas

Un importante factor de virulencia en *C. albicans* es su capacidad para formar biopelículas sobre superficies bióticas o abióticas. En la formación, desarrollo y mantenimiento de biopelículas son factores importantes los procesos de adhesión de las células al sustrato, las interacciones entre las células y la matriz, y la capacidad de formar filamentos. Puesto que *mnn9Δ* presenta defectos morfológicos y debe de presentar alteraciones en las manoproteínas de la pared (las cuales intervienen en las interacciones célula-célula) quisimos investigar si era capaz de formar y mantener biopelículas como lo hace la cepa parental.

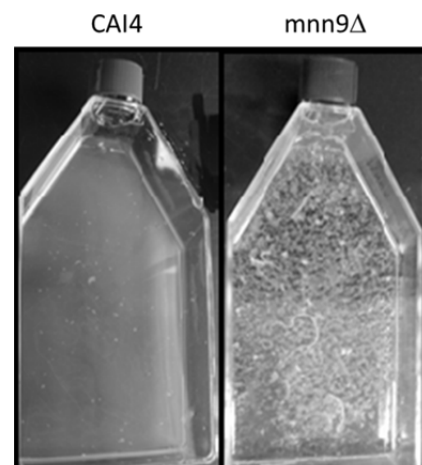


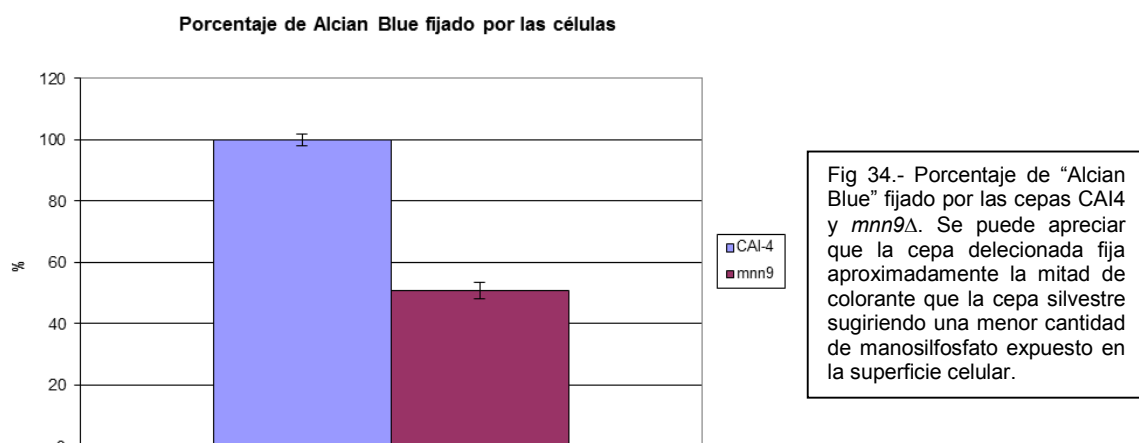
Fig. 33.- Formación de biopelículas en medio RPMI-1640 a 37°C durante 48 h con agitación suave.

Como se observa en la Fig. 33, la biopelícula formada por la cepa mutante es muy frágil y se disgrega y separa de la superficie plástica con gran facilidad como consecuencia de la agitación aplicada durante el período de incubación, hecho que no se produjo en el caso de la biopelícula formada por la cepa parental.

6.- EFECTOS CAUSADOS POR LA AUSENCIA DE *MNN9* SOBRE LA INTEGRIDAD DE LA SUPERFICIE CELULAR

Analizamos si la ausencia de Mnn9p causaba alteraciones en la superficie de las células, mediante el estudio de las propiedades de hidrofobicidad de la pared celular y de su integridad.

Se realizó un ensayo de afinidad al colorante *Alcian Blue*, un colorante catiónico que se une a las cargas negativas de la pared celular (Ballou, 1990). En levaduras, las cargas negativas de los grupos fosfato unidos a las manoproteínas de la superficie celular son las responsables de la unión de este colorante a pH ácido. Por tal motivo diferencias en la afinidad a *Alcian Blue* entre la cepa parental y mutante se asocian a alteraciones en la síntesis, la secreción o la conformación de las manoproteínas expuestas en la superficie externa de la pared celular (Odani *et al.*, 1997; Corbacho *et al.*, 2005).



Los resultados obtenidos se presentan en la Fig. 34. La cepa delecionada presenta una menor cantidad de fosfomanosas expuestas en la superficie celular que la cepa parental. En ausencia de esta manosiltransferasa (Mnn9p), las proteínas N-glicosiladas presentes en la pared celular lo están de forma anómala, y como consecuencia la estructura de la pared celular esté alterada.

Se comparó el crecimiento de las cepas CAI4 y *mnn9*Δ en presencia de compuestos que afectan a esta estructura.

Los ensayos de sensibilidad se realizaron sembrando diluciones seriadas de una suspensión celular de cada cepa en medio sólido YNB con diferentes concentraciones de los agentes a ensayar (ver Materiales y Métodos). Las diferencias de crecimiento entre las cepas se analizaron después de tres días de incubación a 28°C.

En la Fig. 35 se puede observar que la cepa delecionada presenta mayor sensibilidad a Calcofluor White y Rojo Congo, sin embargo presenta una mayor resistencia a cafeína.

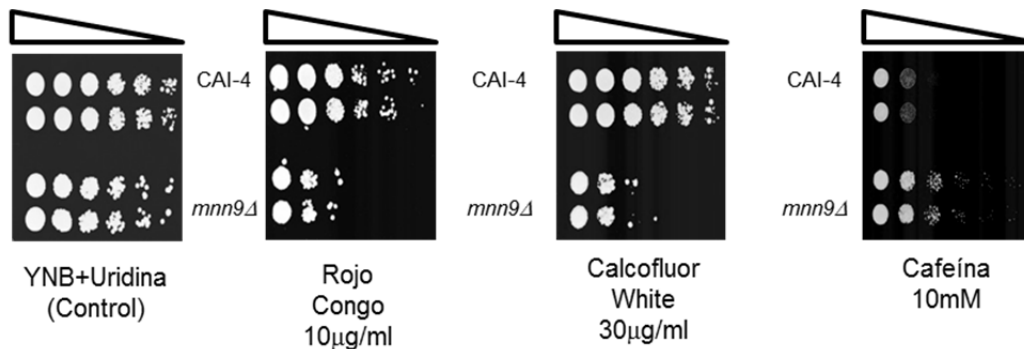


Fig 35.- Ensayo de sensibilidad frente a compuestos que afectan a la pared celular. Se observa una mayor sensibilidad de la cepa mutante frente a los compuestos Rojo Congo y Calcofluor White. Sin embargo la cepa mutante es más resistente frente a cafeína

Al analizar el comportamiento de las cepas CAI4 y *mnn9Δ* frente a la acción de distintos compuestos antifúngicos como son el fluconazol, itraconazol y anfotericina, se aprecian únicamente diferencias en el comportamiento de ambas cepas frente al itraconazol, siendo la cepa mutante más sensible a este compuesto.

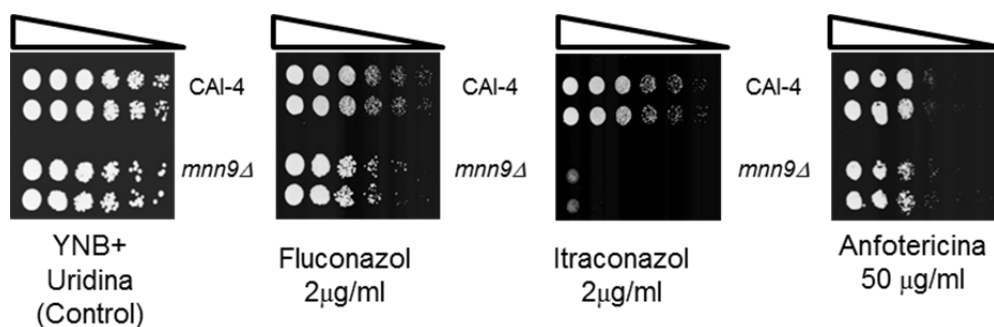


Fig 36.- Ensayo de sensibilidad frente a distintos antifúngicos. No se observan diferencias de sensibilidad entre la cepa parental y la cepa mutante frente a fluconazol ni anfotericina. Sin embargo se puede apreciar que la cepa mutante es más sensible a Itraconazol.

Se detectaron también diferencias, aunque no muy significativas, en la sensibilidad a SDS, detergente que altera la membrana plasmática. La cepa delecionada parece ser ligeramente más sensible que la cepa silvestre (ver Fig. 37). La hipersensibilidad a SDS se ha relacionado con alteraciones en la estructura de la membrana plasmática.

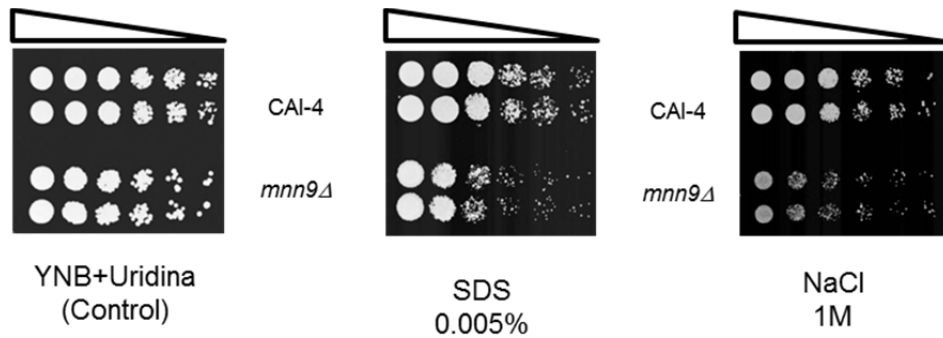


Fig 37.- Ensayos de sensibilidad. Se observa una mayor sensibilidad de la cepa mutante respecto de la parental frente a concentraciones de 1M de NaCl. El crecimiento de la cepa *mnn9Δ* es ligeramente menor que el de CAI4 en presencia de 0,005% de SDS.

Con objeto de saber si el mutante responde a estrés osmótico de forma similar a la cepa parental, analizamos el crecimiento en presencia de NaCl. Los resultados muestran que el mutante es más sensible que la cepa parental a altas concentraciones de este compuesto, lo cual podría deberse a alteraciones en la pared celular.

7.- EFECTOS CAUSADOS POR LA AUSENCIA DE *MNN9* SOBRE LA CAPACIDAD DE CRECIMIENTO A PARTIR DE DISTINTAS FUENTES DE CARBONO

La capacidad de crecer a partir de fuentes de carbono no fermentables se debe a una buena eficiencia del ciclo del glioxilato y se ha relacionado con la capacidad patogénica tanto en animales como en plantas (Piekarska *et al.*, 2008). Si el ciclo del glioxilato estuviera afectado de alguna manera en el mutante, también la virulencia podría verse comprometida. Con objeto de investigar si el mutante es capaz de crecer a partir de distintas fuentes de carbono no fermentables con igual eficiencia que la cepa silvestre, se realizaron siembras en medios sólidos conteniendo como fuentes de carbono acetato sódico, etanol o glicerol en lugar de glucosa.

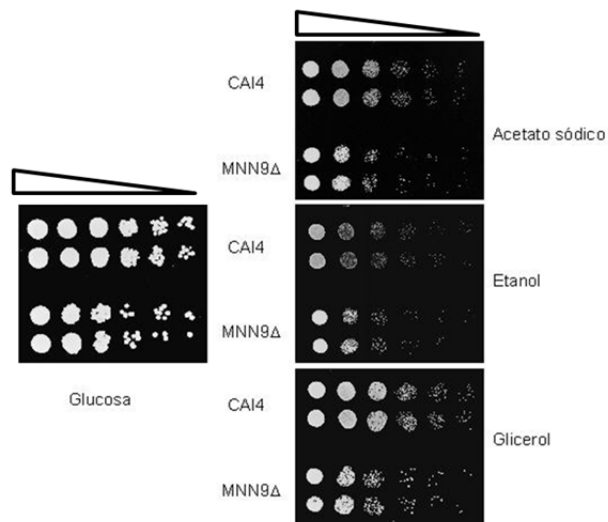


Fig 38.- Ensayos de crecimiento a partir de distintas fuentes de carbono. No se aprecian diferencias significativas entre las cepas CAI4 y *mnn9Δ*.

Como puede apreciarse en la Fig. 38, no se han encontrado diferencias significativas entre la cepa silvestre y la delecionada respecto a su capacidad de crecimiento a partir de distintas fuentes de carbono, por lo que parece que el mutante no ha perdido eficiencia en el ciclo del glioxilato.

8.- ESTUDIOS DE COMPLEMENTACIÓN DE *mnn9Δ*.

Con objeto de comprobar que los efectos observados en la cepa mutante *mnn9Δ* se deben a la deleción del gen, nos propusimos introducir el gen en la cepa mutante con objeto de comprobar la reversión de algún fenotipo.

Se construyó, a partir del plásmido pLC14 (ver Materiales y Métodos), el plásmido pMNN9 (ver Fig. 39) que contiene la ORF del gen bajo su propio promotor y se replica de forma autónoma en *C. albicans*. El vector pMNN9 se utilizó para transformar células de la cepa *mnn9Δ* dando lugar a la cepa *mnn9Δ*-pMNN9.

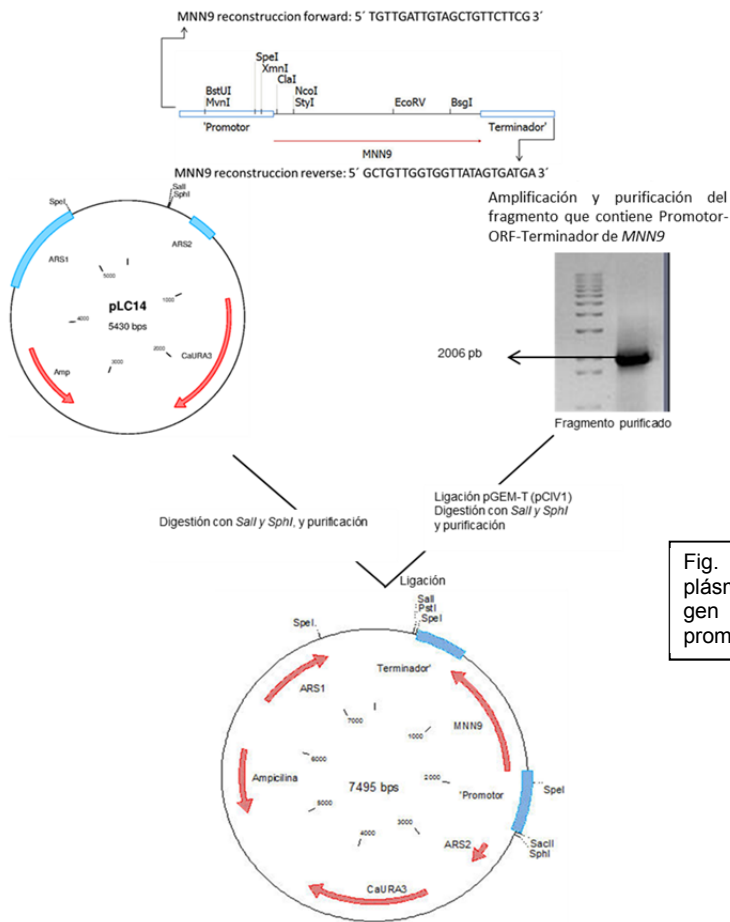


Fig. 39.- Esquema de la construcción del plásmido pMNN9, que contiene la ORF del gen *CaMnn9* bajo el control de su propio promotor.

Una vez transformada la cepa *mnn9Δ* con este plásmido se obtuvieron varios clones y se analizó el crecimiento en presencia de agentes que afectan a la superficie celular y también se realizó un ensayo de afinidad por el colorante "Alcian Blue".

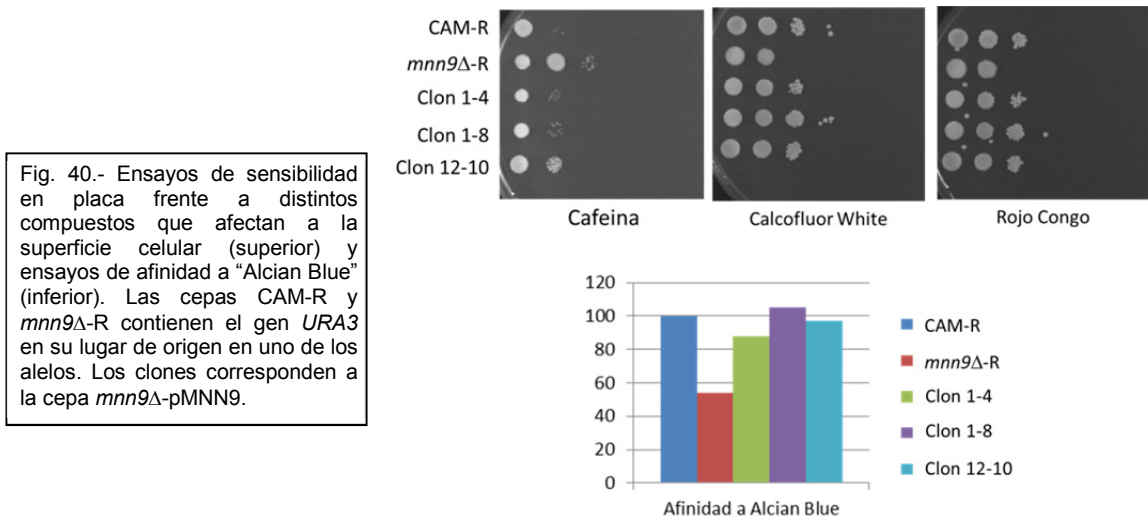


Fig. 40.- Ensayos de sensibilidad en placa frente a distintos compuestos que afectan a la superficie celular (superior) y ensayos de afinidad a "Alcian Blue" (inferior). Las cepas CAM-R y *mnn9Δ*-R contienen el gen *URA3* en su lugar de origen en uno de los alelos. Los clones corresponden a la cepa *mnn9Δ*-pMNN9.

Como se puede observar en la Fig. 40, los clones que contienen el gen recuperan los fenotipos mostrados por la cepa silvestre en los experimentos realizados.

9.- EFECTO DE LA DELECCIÓN DEL GEN SOBRE LA VIRULENCIA

Durante la construcción de la cepa mutante CAI4 se deletionó de forma no deseada un pequeño fragmento del gen *IRO1* adyacente al gen *URA3*. Esta deletión tiene como efecto una atenuación de la virulencia y por eso es necesario la reconstrucción del locus *URA3* cuando se llevan a cabo ensayos de virulencia (Chibana *et al.*, 2005). Reintegramos en su lugar de origen el fragmento que contiene el gen *URA3* en uno de los alelos de la cepa *mnn9Δ* Ura⁻. Se obtuvo la cepa *mnn9Δ-R* (*mnn9Δ::hisG/mnn9Δ::hisG, ura3Δ::imm434/URA3*) con el entorno del locus *URA3* reconstruido. Para los ensayos de virulencia se utilizó como control la cepa CAM-R (*ura3Δ::imm434/URA3*) construida en nuestro laboratorio (ver materiales y métodos) de modo similar.

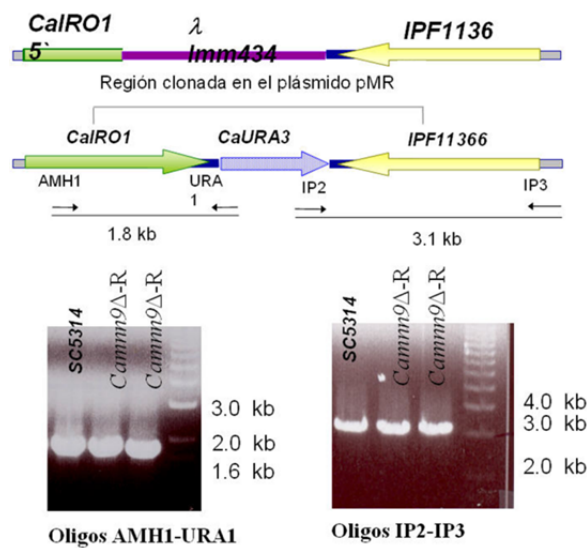


Fig 41.- Esquema y comprobación por PCR de la reconstrucción del locus *CalRO1* en la cepa deletionada *mnn9Δ*.

Con objeto de analizar la capacidad patogénica de la cepa mutante en un modelo de infección sistémico murino se infectaron diez ratones CD1 con 10^8 o 5×10^8 células tanto del mutante Ura⁺ reconstruido como de la cepa control CAM-R, y se determinó la supervivencia de los mismos a lo largo de varios días. En la Fig. 42 se muestran los resultados obtenidos.

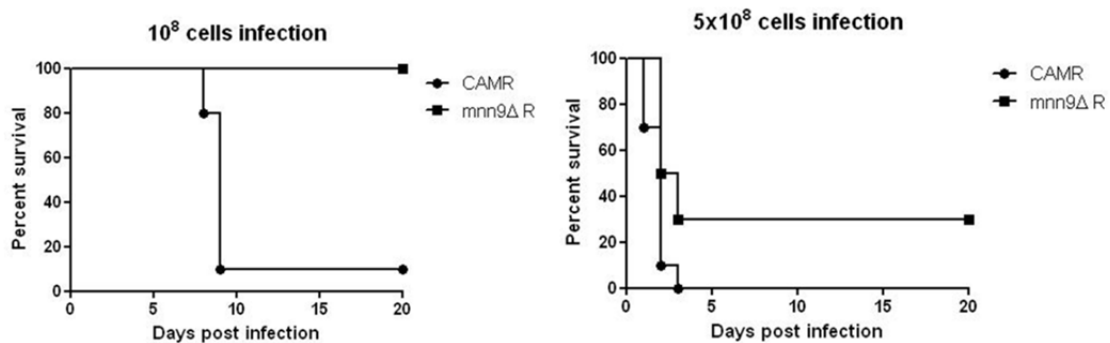


Fig 42.- Gráficas de supervivencia de ratones infectados con las cepas CAMR y *mnn9Δ-R* reconstruida en una de las copias de *URA3*. Las dosis de infección fueron de 10^8 células/ml (izquierda) y 5×10^8 células/ml (derecha).

Los resultados de los experimentos de infección de ratones muestran que la cepa mutante *mnn9Δ Ura⁺ (mnn9Δ-R)* presenta una virulencia atenuada en relación a la cepa parental. Este fenotipo, junto con el hecho de que no se han identificado homólogos en mamíferos de miembros de la familia del gen *MNN9*, hace de él una atractiva diana para el desarrollo de nuevas drogas antifúngicas.

10.- EFECTO DE LA DELECCIÓN DEL GEN *MNN9* SOBRE LA GLICOSILACIÓN DE UNA PROTEÍNA DE REFERENCIA

Con objeto de investigar el efecto que tiene la ausencia de la proteína Mnn9p de *C. albicans* sobre la estructura de las cadenas oligosacáridicas de las proteínas, decidimos comparar el tamaño molecular de una proteína de referencia sintetizada por el mutante con el tamaño de dicha proteína sintetizada por la cepa parental, mediante el análisis de sus respectivas movilidades electroforéticas en un gel de acrilamida.

Nos propusimos tomar como referencia la proteína β -N-acetilhexosaminidasa codificada por el gen *HEX1* de *Candida albicans*. Hex1p es una proteína altamente N-glicosilada (Cannon *et al*, 1994). Para ello construimos el plásmido pHEX1-13xMYC (derivado del pBI-SM [MP K12], ver "Materiales y métodos") que contiene la ORF de *HEX1* de *C. albicans* en fase con el epítipo *MYC* y bajo el promotor de la *PCK*. El plásmido se introdujo en cada una de las cepas, mutante y parental dando lugar a las cepas *mnn9Δ-HEX1* y *CAI4-HEX1* respectivamente. La expresión de la proteína se indujo siguiendo el protocolo descrito en "Materiales y métodos".

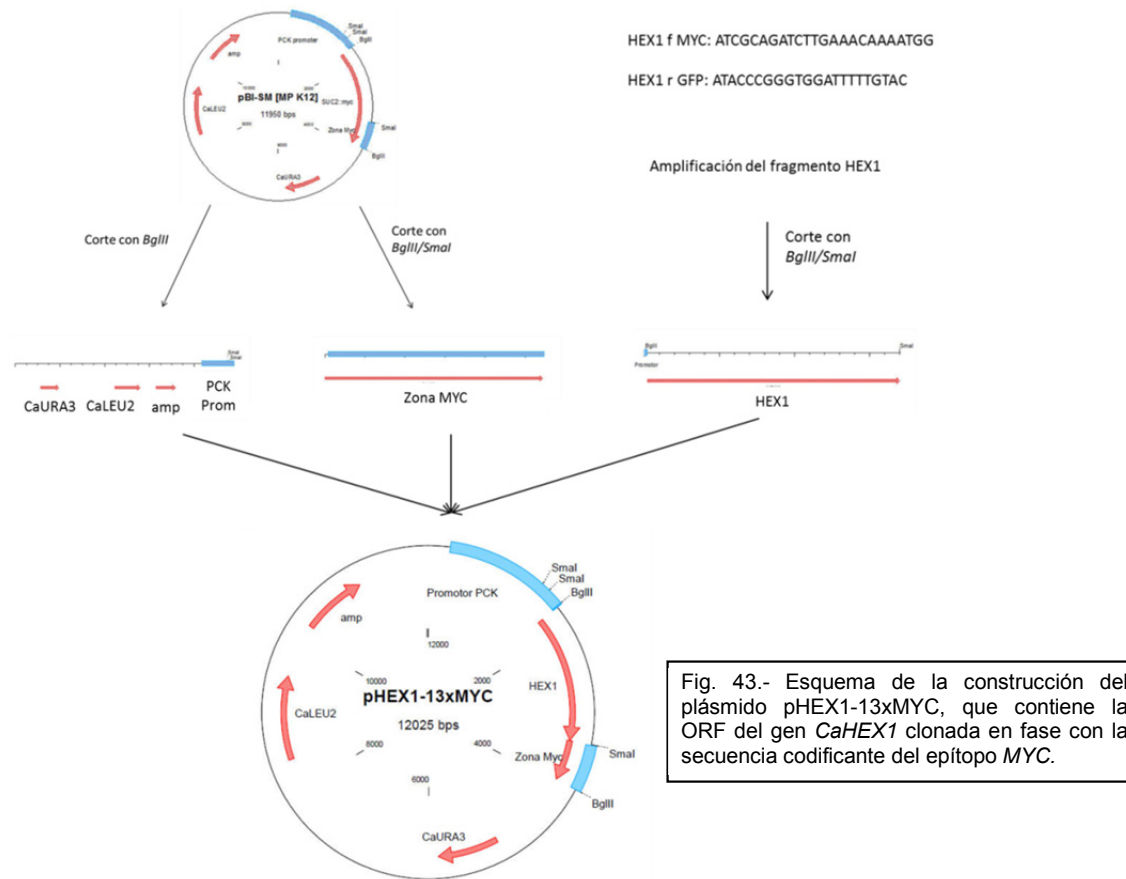


Fig. 43.- Esquema de la construcción del plásmido pHEX1-13xMYC, que contiene la ORF del gen *CaHEX1* clonada en fase con la secuencia codificante del epítipo MYC.

En la Fig. 44 se muestra el resultado de uno de los experimentos llevados a cabo. No se pudieron observar diferencias significativas en el tamaño de las bandas obtenidas a partir de los extractos de CAI4 y *mnn9Δ*. En el caso de las muestras tratadas con la endoH la banda presenta una mayor movilidad como cabe esperar de una proteína que contiene cadenas oligosacáridicas unidas mediante enlaces N-glicosídicos. El peso molecular de la proteína tratada con endoH es mayor de lo esperado si se encontrara totalmente desglucosilada (el esperado es de aproximadamente 64 KDa de acuerdo con el peso molecular de la secuencia deducida de aminoácidos y de lo verificado experimentalmente por Cannon y colaboradores) (Cannon *et al*, 1994).

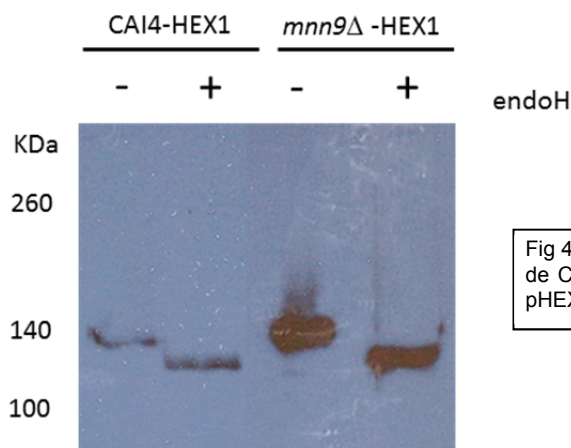


Fig 44.- Western-blotting de los extractos celulares de CAI4 y *mnn9Δ* transformadas con el plásmido pHEX1-13xMyc, sin tratar y tratadas con endoH

Con el fin de profundizar en el análisis realizamos 2 electroforesis bidimensionales con un rango de pH en la primera dimensión de 3-5,6, una con la muestra de extractos del mutante y otra con la de la cepa parental. Pudimos apreciar en ambos casos un único spot y ambos migraban en un lugar diferente de los geles.

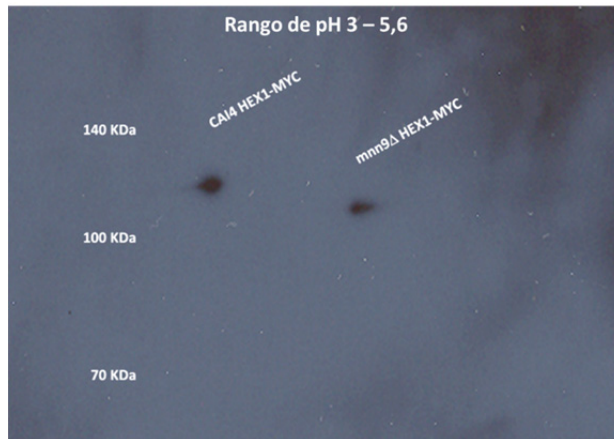


Fig 45.- Electroforesis bidimensional de la proteína HEX1p-MYC de las cepas CAI4-HEX1 y *mnn9Δ*-HEX1 resueltas en un mismo gel.

En la Fig. 45 se muestra el "Western-blotting" revelado con anticuerpos antiMYC de una electroforesis bidimensional en la que se migraron juntas muestras de extractos de CAI4-HEX1 y de *mnn9Δ*-HEX1. La proteína Hex1p sintetizada por el mutante presenta un pI más cercano a la neutralidad que la sintetizada por la cepa parental y un tamaño menor al de esta. Estos resultados indican que el mutante *mnn9Δ* glicosila de forma anómala las glicoproteínas.

Teniendo en cuenta que la glicoproteína sintetizada por CAI4 presenta un peso molecular aproximado de 125 KDa (Fig.44 y Cannon y col., 1994) y que Hex1p totalmente desglicosilada tiene un peso molecular de 64 KDa, estimamos que la porción glucídica de la glicoproteína sintetizada por CAI4 es de 61 KDa. Ya que Hex1p presenta 7 sitios potenciales de N-glicosilación y el peso molecular estimado para cada núcleo oligosacárido ($\text{Man}_8\text{NAcGlc}_2$) es de 1,88 KDa, si estuvieran glicosilados los 7 sitios potenciales, cada cadena oligosacárida contendría aproximadamente 38 manosas en las extensiones N-oligosacáridicas externas (una molécula de man tiene un peso molecular de 0,18 KDa).

La glicoproteína Hex1p sintetizada por *mnn9Δ* es de aproximadamente 110 KDa (Fig. 45), por lo que estimamos que presenta unas 83 manosas menos que en el caso de la proteína sintetizada por la cepa parental, es decir, aproximadamente unas 12 manosas menos que la de la cepa parental en las cadenas externas N-oligosacáridicas suponiendo que todos los sitios potenciales de glicosilación sean glicosilados.

El mayor pI de la proteína sintetizada por *mnn9Δ* respecto a la sintetizada por la cepa parental, puede deberse a una menor presencia de grupos fosfato, lo cual es coherente

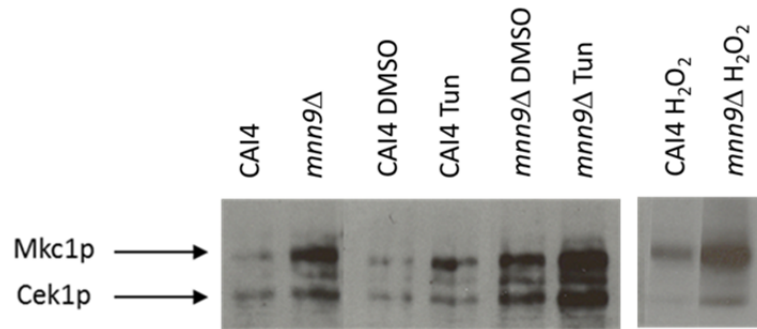
con el hecho de que las células *mnn9Δ* presentan una superficie más hidrofóbica que las de la cepa parental (Fig. 34).

11.- EFECTO DE LA DELECIÓN DEL GEN SOBRE EL ESTADO DE ACTIVACIÓN DE LAS RUTAS MAPK

Análisis recientes están poniendo de manifiesto que algunos mutantes de *C. albicans* afectados en la síntesis de glicoproteínas tienen alteradas algunas rutas de MAP Kinasas de transmisión de señales (Ernst & Pla, 2011). Nos propusimos investigar el estado de activación de las MAPK: Mkc1p, Cek1p y Hog1p en el mutante *mnn9Δ*, las cuales son componentes de las rutas de respuesta a defectos en integridad celular, a estímulos que disparan el crecimiento filamentoso, y a estrés oxidativo, respectivamente. Por otra parte, las 3 participan en la arquitectura de la pared celular.

En la Fig. 46 se muestra el resultado del Western blotting realizado para conocer el estado de activación de la MAPK Mkc1p de la ruta de integridad celular utilizando un anticuerpo (Phospho-p44/42 MAPK (Erk1/2)(Thr202/Tyr204), Cell Signaling Technology) que reconoce la forma fosforilada de esta proteína. El anticuerpo utilizado detecta también la forma fosforilada de la MAPK Cek1p. Además de los extractos de células de la cepa parental (CAI4) y del mutante, se incluyeron muestras de células de cultivos a los que se añadió tunicamicina a una concentración de 20 $\mu\text{g/ml}$, 3 h antes de ser recogidas. La tunicamicina es un inhibidor de la biosíntesis del núcleo oligosacárido que se adiciona a las N-glicoproteínas por lo que bloquea el proceso de formación de estas. A los cultivos control correspondientes a estos experimentos se les añadió la misma cantidad de DMSO que a los tratados con tunicamicina ya que se tiene que utilizar como disolvente de esta. En todos los carriles se añadió la misma cantidad de proteína (50 μg) y se monitorizó realizando una tinción con el colorante de Ponceau de la membrana una vez realizada la transferencia (datos no mostrados). Se pueden apreciar dos bandas de pesos moleculares que corresponden a la proteína fosforilada de 59KDa, Mkc1p y de 49KDa, Cek1p. En todos los experimentos realizados se apreció una mayor cantidad de Mkc1p fosforilado en el mutante *mnn9Δ* que en la cepa parental en condiciones de crecimiento en ausencia de estrés. Estos resultados indican que el mutante presenta activada de forma constitutiva la ruta de integridad celular. El tratamiento con DMSO no altera la intensidad de las bandas detectadas en las muestras de *mnn9Δ* y CAI4, sin embargo, tanto la cepa parental como el mutante responden al tratamiento con tunicamicina activando esta ruta. En el caso del mutante la intensidad de ambas bandas es mucho mayor cuando las células han sido tratadas con este inhibidor de la glicosilación, indicando que, aunque la ruta Mkc se encuentra activada de forma constitutiva en el mutante *mnn9Δ*, este es capaz de detectar y transmitir a través de esta ruta las alteraciones más drásticas causadas por el crecimiento en presencia del inhibidor. Parece que esta activación se aprecia también para el caso de la proteína Cek1p, y esta también es capaz de responder frente al estímulo causado por la tunicamicina.

Fig 46.- Activación de la ruta de integridad celular en *mnn9Δ*. Western blotting de extractos de las cepas *mnn9Δ* y CAI4, sin tratar y tratadas con tunicamicina y H₂O₂. Se utilizó el anticuerpo Phospho-p44/42 MAPK (Erk1/2)(Thr202/Tyr204) que detecta la forma fosforilada de Mkc1p (banda de 59KDa) y de Cek1p (banda de 49KDa).



Se sabe que el H₂O₂ estimula la fosforilación de Mkc1p. Como se puede observar en la Fig. 46 el análisis de las células a las que se trató con H₂O₂ durante 10 minutos mostró que el mutante responde a este estrés activando Mkc1p.

Ya que el estrés oxidativo induce en el mutante una activación más fuerte de la MAPK Mkc1p que en la cepa parental, quisimos investigar si la ruta HOG, la cual media la respuesta a daños causados por el estrés oxidativo además de los causados por el estrés osmótico (Alonso-Monge y col., 2003; San José y col., 1996), se encontraba constitutivamente activada en el mutante. Para ello realizamos un experimento tipo western blotting (Fig. 47) en el que analizamos muestras de extractos de células del mutante *mnn9Δ* y de la cepa parental recogidas de cultivos en fase exponencial de crecimiento y muestras de células de estas cepas tratadas con H₂O₂ 10 mM durante 10 min, con objeto de disponer de controles en los que la ruta debe de estar activada. Utilizamos un anticuerpo policlonal (Phospho-p38 MAP Kinase (Thr180/Tyr182) Antibody, Cell Signaling Technology) dirigido contra la proteína p38 fosforilada de humanos, un homólogo de la MAP Kinasa Hog1, que reconoce el motivo fosforilado en Thr180/Tyr182 de la MAP Kinasa. En los extractos de células de la cepa parental tratadas con H₂O₂ detectamos una banda de aproximadamente 43 KDa que apenas aparecía en las células no tratadas. Sin embargo, en las células del mutante no tratadas se detectó esta banda indicando que el mutante presenta niveles basales de Hog1p fosforilado. El mutante tiene aún capacidad de responder a estímulos de estrés oxidativo, activando de forma más intensa esta ruta, ya que se detecta una mayor cantidad de Hog1p fosforilado en las muestras de extractos del mutante tratadas con H₂O₂.

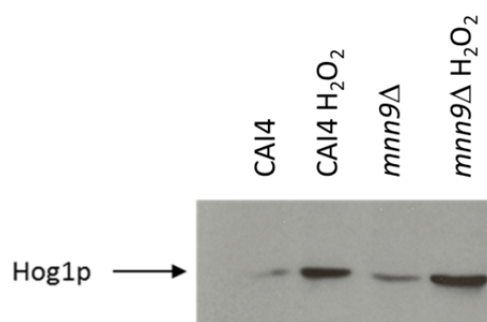


Fig 47.- Activación de la ruta de HOG en *mnn9Δ*. Western blotting de extractos de las cepas *mnn9Δ* y CAI4, sin tratar y tratadas con H₂O₂. Se utilizó el anticuerpo Phospho p38 que detecta la forma fosforilada de Hog1p (banda de 43KDa).

12.- EXPRESIÓN DEL GEN *MNN9* EN CAI4

El mutante *mnn9* Δ es incapaz de formar verdaderas hifas en condiciones de inducción en medio Lee a 37°C. Nos propusimos investigar si en estas condiciones se producía una variación en la expresión del gen. Para ello realizamos un experimento de PCR cuantitativa que nos permitió determinar el nivel relativo de expresión de *MNN9* en la cepa CAI4 respecto a la actina en distintas condiciones (crecimiento exponencial y tiempos 15, 60 y 180m de inducción de la filamentación).

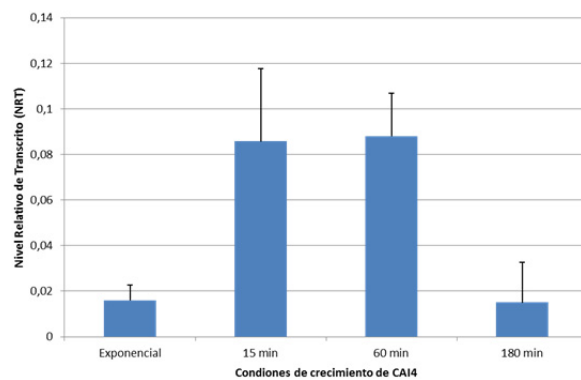


Fig 48.- Expresión del gen *MNN9* (nivel relativo de transcrito respecto a actina) en fase exponencial de crecimiento y durante la inducción de la filamentación (15, 60 y 180 minutos).

Se puede apreciar que la expresión de *MNN9* es mayor a tiempos 15 y 60 minutos de inducción de la filamentación, y por lo tanto sería de esperar que a estos tiempos encontráramos un mayor número de genes desregulados en el mutante respecto a la cepa parental. En el análisis de la expresión global de genes mediante micromatrices (Resultados III) se observa que es el caso de los 15 minutos, pero no de los 60, siendo este además el que menos genes desregulados tiene de todas las condiciones ensayadas.

Resultados II: El gen *MNN1* de *Candida albicans*.

1.- ANÁLISIS DE LA SECUENCIA DEL GEN *MNN1*.

El gen *MNN1* se localizó dentro de la secuencia completa del genoma de la cepa SC5314 de *Candida albicans*, publicada por la Universidad de Stanford (<http://sequence-www.stanford.edu/group/candida/index.html>). Se identificó la ORF19.4279 de 2403 nucleótidos que codifica para una proteína de 800 aminoácidos. Basándose en su homología con el gen *MNN1* de *S. cerevisiae*, esta secuencia ha sido anotada como *MNN1* en diferentes bases de datos de *C. albicans*.

El gen *MNN1* se localiza en el cromosoma 5 tanto en la cepa SC5314 como en la cepa WO-1 de *C. albicans*.

El gen *MNN1* está flanqueado por la orf19.4278 a una distancia de 715 pb y por la orf19.4280 a una distancia de 2700 pb.

1.1.- Análisis de la región 5' no codificante

En los 600 nucleótidos previos al codón de inicio de *MNN1* se han localizado 7 cajas TATA según el programa *HcTATA* (http://zeus2.itb.cnr.it/~webgene/wwwHC_tata.html) que difieren mínimamente de la secuencia consenso (tres de ellas dentro de los 200 pb aguas arriba del ATG) y aparecen señaladas con un fondo rojizo en la Fig. 49.

En la región promotora de *MNN1* se localizan además tres cajas CAAT (destacadas sobre fondo azulado en la Fig. 49). Otros motivo identificado es un elemento CAAG (sobre fondo turquesa). En la Fig. 49 se han subrayado en verde además varias zonas ricas en timidinas y adeninas.

Utilizando herramientas de la base de datos YEASTRACT (<http://www.yeasttract.com>) se han detectado posibles sitios de unión a los factores de transcripción Ash1p, Azf1p, Fkh1p, Fkh2p, Gis1p, Gln3p, Mot3p, Msn2p, Msn4p, Nrg1p, Rph1p, Ndt80p, Sum1p, Rlm1p, Ste12p, Tec1p y Yap1p.

1.2.- Análisis de la región 3' no codificante

Dentro de los 600 nucleótidos siguientes al codón de parada del gen *MNN1* se localizaron 3 secuencias (señaladas con un fondo verde en la Fig. 49) que podrían constituir

señales de poliadenilación de acuerdo a los resultados del programa Dragon PolyA Spotter (<http://cbrc.kaust.edu.sa/dps/>).

En *MNN1* no encontramos completa la secuencia tripartita pero sí varias secuencias TAG, la secuencia TATGT, una región rica en A/T y tripletes TTT, motivos que se han destacado en la Fig. 49 sobre fondo amarillo.

1.3.- Estudio de la región codificante

El entorno del codón de inicio de *MNN1*, TGAAATGATT, se ajusta a la secuencia consenso descrita excepto en las posiciones -3, 4 y 5. En la mayoría de genes de *C. albicans* se encuentra conservada la A de -3, hecho que no se cumple en el entorno de *MNN1*.

La fase de lectura abierta de *MNN1* no se encuentra interrumpida por intrones. En la ORF del gen *MNN1* el contenido A+T es del 66,8%, porcentaje superior al de C+G, lo cual corresponde a lo descrito para la mayoría de genes de *C. albicans* (Odds, 1988).

ACAGTGAGACCAAAAGAATGACA **CAAT** AGTTAAGATTTATGCATGTTCTTTAATTTGGGTAGCTTAATTCTT
 TTTATAAATG ATTTGCTTACTTATTTATTTATTTATTTATTTCTT **CAAT** TTTA **GCTATTTATA** GAAGAAATA
 GTAAAAGAGTAAACAA **CCTATATTAAGA** GGGGGAGGGGGGGGAGTTTTGATTAGTCTATGTTGCTGAA
CTATCAATA CAGCATACAGTCTTGAATTGAACAAAAATAGGCTTACATGTATTGGTTATCTTGCTCCTGCATC
 ATCTTTTGTAAACAAAATAATCTACAGTGGCTGTTAATAATGTTTCAAA **CAAG** GCTTAAACAGTTGTAAGAT
 TTTTAAAAAAGACCAGGCACAAATGGTTAGGGTTAAAAAATTTCTATACCTCCTATTTTT **CATATCATG**
ATTTACATGAATAATTTTAGAA **AATATAAAAT** AGATACTTAGACCTTCTCTTTCTTTCTTTTAAAAATAAT
 CTTTCTTTTAGAAAAGAGTCTTTATTGAAGTTGTTGAAATATT **TATAAAAA** ATATCTTAGTGAATTGTATGAGT
 TTTCTCTGAA **ATG** ATTCAAAAAC TAATTAAGAATAGACAACGCCTGAAATGGGTTCTATTCAACGGTGCATC
 ATTATGGATATTTTTCATCCTAGATTTTCATGAATTCAAATTATTACAACACGGAAAGCCATATACTGTCAATTC
 CATTATAACGTATATGACAATCTACATGAGGAAACCGAGTCTCCACCGAAATCTGCCTGTGCATCGTCATTAC
 TCGAACCTTCAACAAATCAACAACTAGCGACTTCAAAAACCATTTACTTTACAAATCGTTAATAAGCAGTCT
 ATCCGAACTACCAAAACAAAAGATTAAACTCAAATCTATGATGACATTTTCAGCAATCATAAA
 CTTGAGACAGTTTGGGAACATTGTCTTCAAAGAGAGATGTGATTTGTATTCAAAAATGTTTCGCTGAA
 GATGTGAACCTGGCATTCAACCCTGATACAAGGTATGATGCATTTTGATAAAAAACACTAAAGAGTTCAAA
 GACTTTATCAAAGTGAAGAAGCTAGTTATACAAGAAAAGTTTGACAAGATGAAGAAAAAATTCAAAGAAG
 AAGATTATAATAGAGAATTGAGCAAATTAAGAAATCTATGTTACTGATTTCTGAATGAAAAATTTGAACA
 AGAGATTGAAAATCGATTATCAACTTTTAGAATCTTCAATAAATGCTATATAACAAACGACGAAACTCCTCAAA
 TCAACAAGATCAACCAATTATCACTAATCAACAAAAGTTAGTCCAAGATATTCATCGTGATGAAAGTGGA
 TTTTACAAGAGTAAAATAGATAAATTAAGTTAAACAAACAAAGGAAGCTTTGGTTGATTTGATGGTTACTAA
 ATCATCGACATTTGAACATAGAGTTTACCCTGGATATCCAAGGAATACCCAGTATATGAACGATGGACAGG
 CAAAGTTTATCATGAGCCACCAATTTATGAAATTTGAATCATGATCCAATGCAAAAACTCCTAAAAA
 ATCCAACAATCAACAATGCTGCTCAGCCATTTTAAACAATTTAAAATAAATTCATGGTAGAGGGATA
 GTTTAACTATTGGGAATCAACATTCTGACTATGCTGTGAGTTAATTCATTTGTTACGAGCTTTGGATAACA
 AATTACCTATACAAATGTTTATTATGACGATGTTAATGAAGAATCAAACGGAAAATAGTCACTGCTGCACA
 AGAAGATTTCCGATCTTACCACATTCATTTGAAAAAGTTGCCATTTATTTGGTGATAAGTATATCAATCCC
 AAGGTAAGGATTGCAACCACAAGAAGTTTGGTTGTGAATGCCTATAATCCATTCATAAAAAATATCGTG
 GGAAATTTCTCGATTCCGTAATAAATATTGGCTAGTTGTTCAATCTTTTAGTGAGTTTATGTTGATTGAC
 GTTGATACTGTTTAAATGCAACCTCCAGAATATTTCTCCAATTGAAAAATATCAACAACCTGGAACCTATTT
 TTTCAAAGATCGATCAGTTTGGCAAAGAAGAACAGTGGAGGATGGTAAGTTTTTGAACGAATGGGTCAT
 CAACAGTCGACCAATGATGTTTATGATATCCATAATGACAAATATACTACCACAAGAGAATATTAGAGG
 ATTGCAACATTATATGGAGTCGGGGTTGGTGATGATCAATAAAGATAAACATTTGAATCAATCTTAATGATC
 ACACAAATTAATCTTATAGGACCCATTACAGGGAAAGTTGGGGTGATAAAGAGTTATTCTGGTTAGGATTT
 GCCATTAATGGTGATGAAGAATATTTTATGATGACAATTTGCAGCCGCAATGGTGAGTTGACTCCGCCA
 CAAGACCGATCCCGCAAAGATGGGACATGGCATTCAAAAAGAAATTTGTTCAACCGACCCAGGACATG
 TCAGTGGAGATGACAATCAGTTTATTATGGATAATCAGGGTTCCGTTTCTGTCAAGCAGATGAAGT
 TAATTTGAAAAAGAGGCCGAAAAAGAAAACCTGTTAAAACATTTACACACAGCAGACCAGTTTAGAACT
 TTTTATTATAATCCATTAAGAATAACTCATGCTGTTGTACCACCATTAGATCAAGATTTGCAAGATCGTAAAAA
 TGCTATGGATGAACCACTAGCGGATGTTATGGGAGTCGGGTTATTGCAAAGATATATGGTGTGCTTA
 CTCAAGTGTGGTGGGCCA AAAAGCGTCTGATGAAAAGGATGACACAGTAGATAACAATGAAACTAAA
 GATAACACGTTAGATGGTATATTGGTGAATATAATCAAGATGAAATAGCCTGTTTAAATTTTTGGGTGACAT
 TTGGGTAGGCACGGAGTAA **TAG** AGTATCAACTAATA **TAG** **TAG** **TAGTAATAAATT** **AATAG** **TAG** **TAGATAATA**
GT GTTGCTTAATC **ATTATAAAGTAATTA** **CT** **TATGT** TATACC **TTT** GATACAAGCCACTAACCAACCATCCAA
 CCATCCAACCAACACCCGTTGCCA **TAGTTT** GAAAAACCA **TTT** GACAACCAAT **TAG** AATGGTCGTGTGTGAT
AGT AAAGAAAACGGAGCAGTTGGG **TTTTTTTTT** TCCAATCTATGCACGCCCTAAAAAAAAGTTGAT **TTT** CT
 TCAATTC AATTC AATTC AAAGGGCAAAAAAACCATCATCTAACAACAACAACCTCATTACAACCTCATCTC
 AATCCATTCTA **TTTCTTT** ATATCAATCACAACCAATAT **CAATCAACT** GTGATCATTATCATCAAGAACAGA
 AGAAAGACTTGGAATTCATTAC **TAGTTTAA** **TTTTT** TTGCTATCAAACA **TTTTTTTT** **TTTT** TTCGTG
 AACAACTCTGTAAGTG **TTT** ATATCTATATACGATCTAAA **TTTTTTTTTT** TAATTA **TTT** TTATAATA **TTT**
 GATTCTTGATATA **TTT** ACAC **TTT** CCCCT **TTT**

Fig. 49.- Región del genoma de *C. albicans* que contiene el gen *CaMNN1*. En la región promotora se han señalado las posibles cajas TATA (con fondo rojo), varias secuencias ricas en T y en A (subrayadas en verde), y las secuencias CAAT y CAAG (sobre fondo azul y turquesa respectivamente). En la región 3' no codificante se han destacado posibles partes de la secuencia tripartita (sobre fondo amarillo) y la posible señal de poliadenilación (sobre fondo verde). El codón de inicio se encuentra resaltado con un círculo rojo, y la secuencia de la ORF se ha marcado en texto verde.

1.4.- Análisis de la secuencia aminoacídica de Mnn1p

La estructura primaria de la proteína codificada por el gen *MNN1* consta de 800 aminoácidos. En la tabla adjunta se muestran algunas de las características fisicoquímicas de la proteína estimadas por el programa *Editseq*, así como el número de residuos ácidos, básicos, hidrofóbicos y polares presentes en la secuencia.

Tabla VII.- Características de la proteína Mnn1p				
Análisis CaMnn1p		Aminoácidos	Número	%
Peso molecular	94.28 kDa	Ácidos (D, E)	108	13.50
Tamaño	800 aa	Básicos (K, R)	101	12.63
Punto isoeléctrico	6.46	Hidrofóbicos (A,I,L,F,W,V)	245	30.63
Carga a pH 7	-2.88	Polares (N,C,Q,S,T,Y)	238	29.75

La comparación de la secuencia de aminoácidos de Mnn1p (cepa SC5314) con la de otras proteínas presentes en la base de datos UniProt reveló una identidad del 29% con Mnn1p de *S. cerevisiae*.

La región que muestra mayor grado de identidad con las proteínas manosiltransferasas se corresponde con el dominio mannosyl_trans3 (pf11051) localizado según *InterproScan* entre los aminoácidos 357 y 652 de Mnn1p. Esta región se ha señalado en la Fig. 50 en la que se muestra el análisis tipo *ClustalW* de algunas manosiltransferasas homólogas de *S. cerevisiae* y *C. albicans*.

La comparación de los dominios funcionales encontrados mediante *InterproScan* y *NCBI Conserved Domain Search* indica que las proteínas Mnn1p de *C. albicans* y homólogas de otros hongos presentan un único dominio α -manosiltransferasa.

La búsqueda de señales de localización subcelular mediante el programa LOctree, permitió identificar en la proteína Mnn1p motivos de localización en el complejo de Golgi.

Con el programa *Motifscan* del servidor *Prosit* se localizaron dentro de la secuencia de aminoácidos de Mnn1p, posibles motivos relacionados con diferentes modificaciones postraduccionales. Se identificaron 12 posibles motivos de fosforilación por la caseína quinasa II, 9 sitios de fosforilación por la proteína quinasa C, un sitio de fosforilación por la proteína quinasa dependiente de cAMP y cGMP, 2 sitios de fosforilación por proteínas Tirosina kinasas, 2 de miristoilización y 4 de glicosilación.

Presenta una región transmembrana que abarca los aminoácidos 13-30 y un péptido señal que abarca los aminoácidos 1-33.

De los productos de los 6 genes miembros de la familia *MNN1* de *C. albicans* el mayor porcentaje de similitud es del 43,8% con Mnn12p (Bates *et al*, 2013)

1.5.- Análisis bioinformático de la interacción de la proteína Mnn1p con otras proteínas

Las interacciones con otras proteínas han sido estudiadas con ayuda de la aplicación en línea *String 9.05* (<http://string-db.org/>), pero la proteína mnn1p no ha sido estudiada lo suficientemente a fondo como para poder asegurar ningún tipo de interacción. Sin embargo, parece que podría interactuar con las proteínas que se muestran en la Fig. 51.

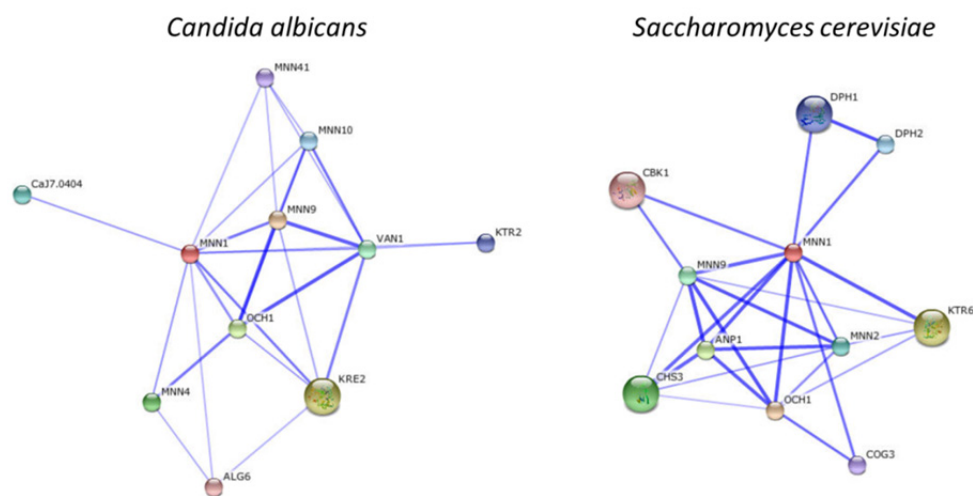


Fig. 51.- Interacciones posibles identificadas mediante análisis bioinformático de la proteína Mnn1p con otras proteínas en *C. albicans* (izquierda) y *S. cerevisiae* (derecha). Las interacciones se han marcado con una línea azul, las asociaciones más fuertes se marcan con líneas más oscuras.

1.6.- Análisis de la sintenia de *MNN1*

Analizamos el entorno del gen *MNN1* de la misma forma que hicimos en el caso del gen *MNN9*.

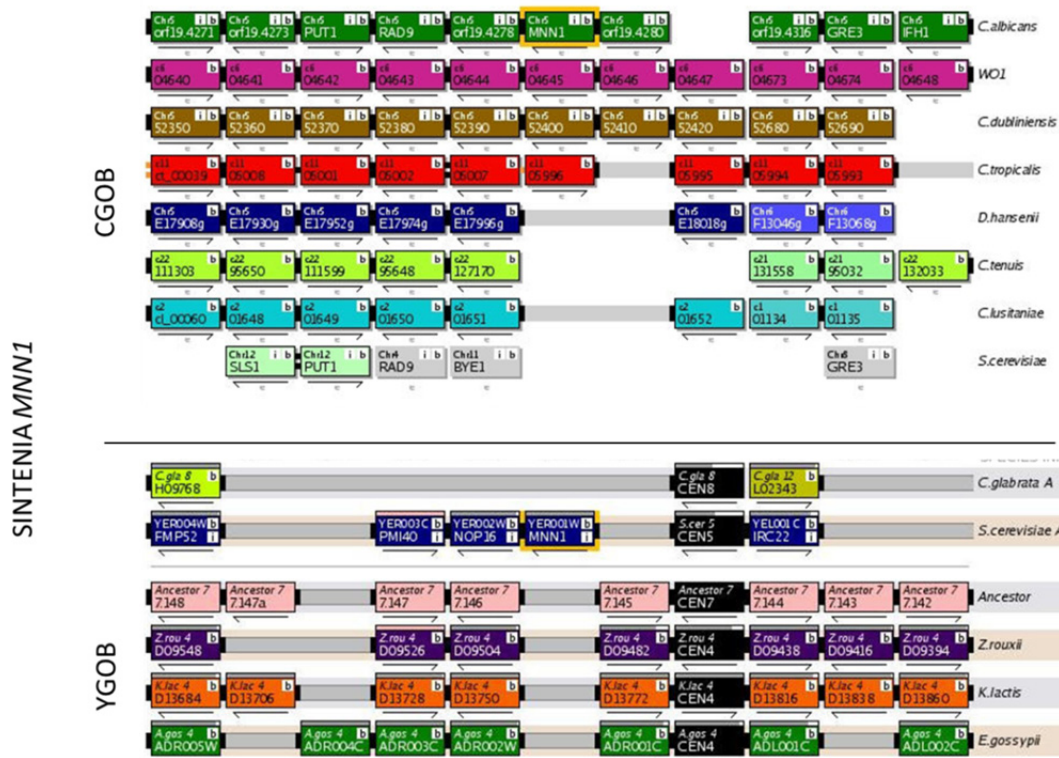


Fig 52.- En la figura se muestra el entorno del gen *MNN9* en *C. albicans* (CGOB) y en *S. cerevisiae* (YGOB). Los cuadrados del mismo color indican que los genes recuadrados pertenecen al mismo cromosoma. Las barras horizontales grises (negras junto a los recuadros) indican que los genes se encuentran adyacentes en el genoma.

Al igual que ocurre para el gen *MNN9*, el entorno del gen *MNN1* presenta gran parecido al comparar distintas especies del género *Candida*, pero al comparar con especies de otros géneros (con ayuda de la base de datos YGOB) se observan diferencias muy marcadas en el entorno de este gen.

2.- CONSTRUCCIÓN DEL MUTANTE *mnn1Δ*

La cepa mutante *mnn1Δ* se construyó a partir de la cepa CAI4 mediante el método del Ura-blaster (Fonzi and Irwin, 1993).

Se eliminó la secuencia de nucleótidos comprendida entre la base -4 hasta la base +2385 respecto al ATG de inicio de *MNN1*. Dicha secuencia fue reemplazada en las 2 copias del mutante por el fragmento hisG de 1,1 Kb.

Para ello subclonamos parte de la región promotora (614 pb) y terminadora (648 pb) en el plásmido pSNC1 (ver materiales y métodos) mediante cebadores que crean nuevos sitios de restricción con objeto de facilitar la clonación en pSNC1:

- Ca1548P1: GTTGATGCCGGGTACCCACAGT (*KpnI*)
 Ca1548P2: CAGAGGAAAACTCGAGCAATTC (*XhoI*)
 Ca1548T1: GGGTAGCCGCGGAGTAAATAGA(*SacII*)
 Ca1548T2: TGAATTGAGCTCCAGCAAGAAG (*SacI*)

Se comprobó previamente que las ORF que flanquean a *MNN1* están lo suficientemente alejadas para no ser alteradas en la cepa delecionada.

Para comprobar la correcta construcción del mutante, llevamos a cabo un experimento de "Southern-blotting" en el que el DNA de las cepas se digirió con la enzima *ScaI* (ver Fig. 53). La sonda utilizada se sintetizó mediante PCR utilizando los cebadores Ca1548T1 y Ca1548T3 que amplifican en la cepa CAI4 un fragmento de 682 pb de longitud.

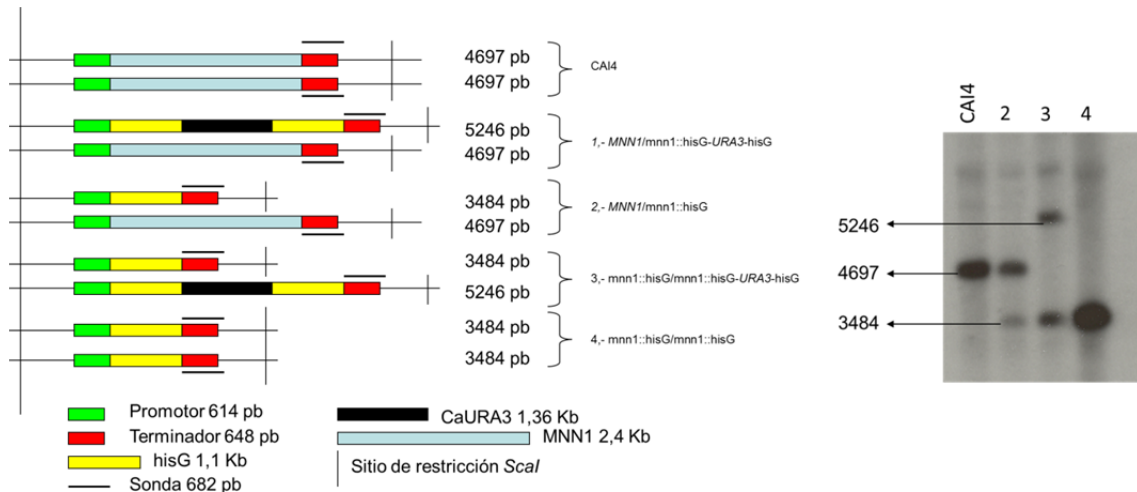


Fig. 53.- Esquema del locus *MNN1* en las distintas cepas generadas durante la deleción de las 2 copias del gen (izquierda) y revelado de un Southern-blotting (derecha) que muestra la correcta construcción de la cepa mutante.

3.- EFECTOS DE LA DELECCIÓN DE *MNN1* EN LA MORFOLOGÍA CELULAR

Se cultivaron CAI4 y *mnn1Δ* en medio mínimo YNB suplementado con uridina.

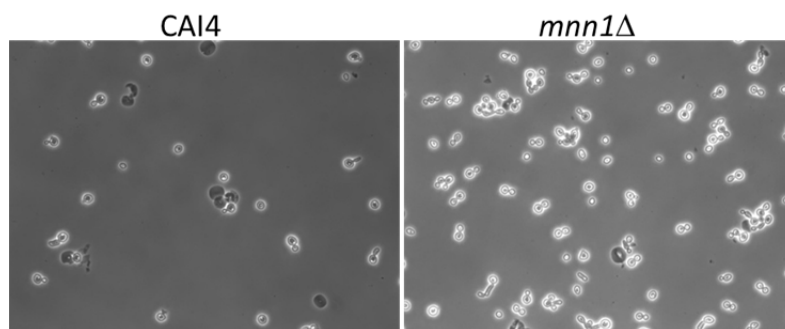


Fig 54.- Células de las cepas de CAI4 (izquierda) y *mnn1Δ* (derecha).

No se observó ninguna diferencia en la morfología de las células del mutante respecto a la cepa parental al microscopio óptico. No se observaron diferencias respecto al tamaño de las células, ni se observó que se agregaran como ocurre en el caso de *mnn9Δ*.

3.1.- Curva de crecimiento en medio líquido a 28°C

Las curvas de crecimiento en YNB con uridina a 28°C de la cepa mutante y parental se muestran en la Fig. 55.

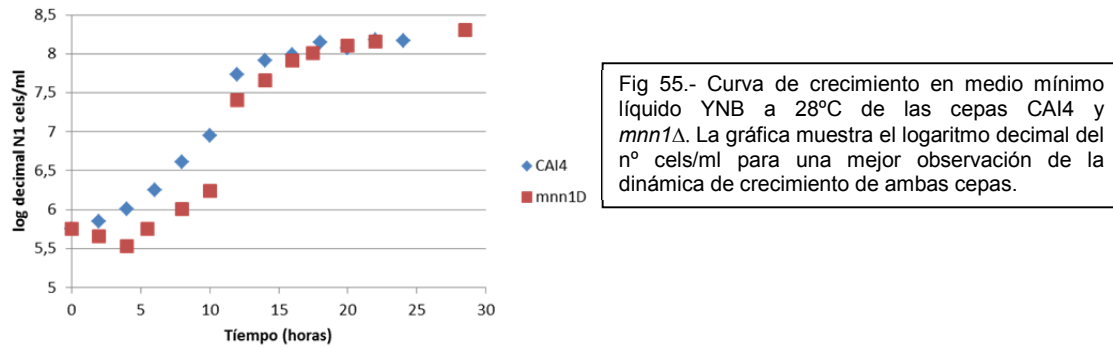


Fig 55.- Curva de crecimiento en medio mínimo líquido YNB a 28°C de las cepas CAI4 y *mnn1Δ*. La gráfica muestra el logaritmo decimal del nº cells/ml para una mejor observación de la dinámica de crecimiento de ambas cepas.

Las curvas de crecimiento son similares, presentando ambas cepas un tiempo de generación similar (CAI4 = 102 min, *mnn1Δ* = 99 min), y alcanzando niveles similares de D.O.₆₀₀ en fase estacionaria.

3.2.- Crecimiento en medios sólidos a 42°C

Nos propusimos investigar si el mutante presenta fenotipo de sensibilidad a altas temperaturas.

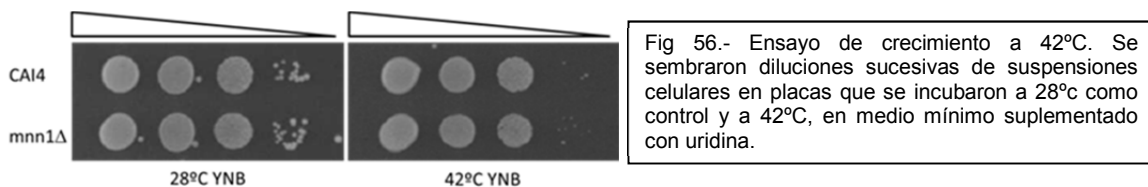


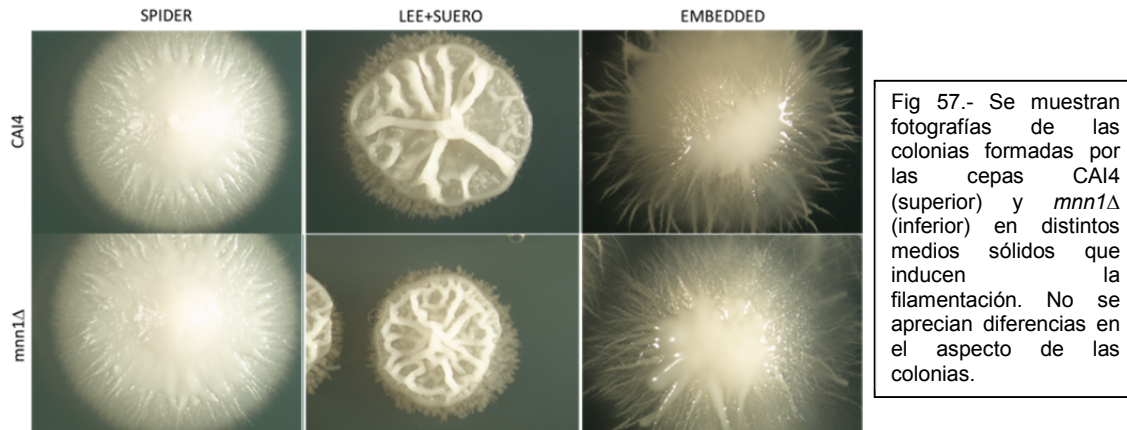
Fig 56.- Ensayo de crecimiento a 42°C. Se sembraron diluciones sucesivas de suspensiones celulares en placas que se incubaron a 28°C como control y a 42°C, en medio mínimo suplementado con uridina.

Comprobamos que la cepa *mnn1Δ* no presenta defectos en el crecimiento a 42°C.

4.- EFECTO DE LA DELECCIÓN DE *MNN1* EN FILAMENTACIÓN

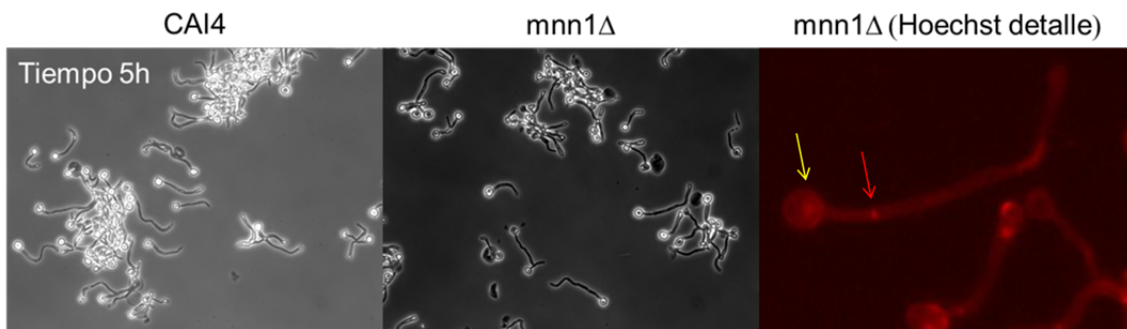
4.1.- Análisis de la capacidad de filamentación en medios sólidos

Como se observa en la Fig. 57 no se apreciaron diferencias en el aspecto de las colonias de la cepa mutante y parental creciendo en los medios sólidos ensayados inductores de la filamentación.



4.2.- Análisis de la capacidad de filamentación en medio líquido

La cepa mutante, de forma similar a la cepa silvestre es capaz de formar hifas verdaderas en medio Lee líquido a 37°C (Fig. 58).



En el panel del extremo derecho se muestra una fotografía de las células de *mnn1Δ* teñidas con Hoechst, en la que se puede apreciar que el mutante es capaz de llevar a cabo la inducción de la filamentación y que además (al contrario que la cepa mutante *mnn9Δ*) es capaz de formar verdaderas hifas. Puede apreciarse en el detalle de la tinción con Hoechst que los filamentos de *mnn1Δ* presentan el primer septo dentro del tubo germinativo y alejado del cuello.

4.3.- Análisis de la capacidad invasiva

Con objeto de investigar si la cepa mutante se comporta de forma similar a la parental respecto a la capacidad de crecer en medios sólidos penetrando en ellos, se procedió de la misma forma que para el caso del mutante *mnn9Δ*.

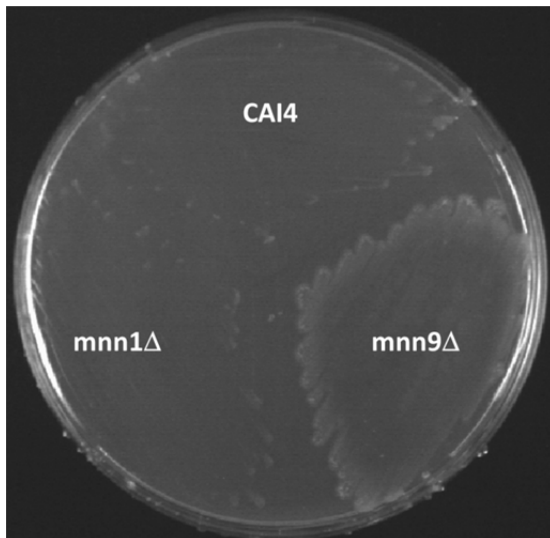


Fig 59.- Ensayo de invasividad. Placa después del proceso de lavado mediante el que se retiran las células que no han invadido el agar.

Como se aprecia en la Fig. 59 las células de la cepa mutante *mnn1Δ* no invaden el agar en estas condiciones y son retiradas de la placa en el proceso de lavado de forma similar a como ocurre con las células de la cepa silvestre. Se observa en la placa que el mutante *mnn9Δ* presenta mayor capacidad invasiva.

4.4.- Crecimiento en condiciones de hipoxia

Hemos realizado experimentos de crecimiento en condiciones de hipoxia procediendo de igual forma y con el mismo objetivo que para el caso del mutante *mnn9Δ*.

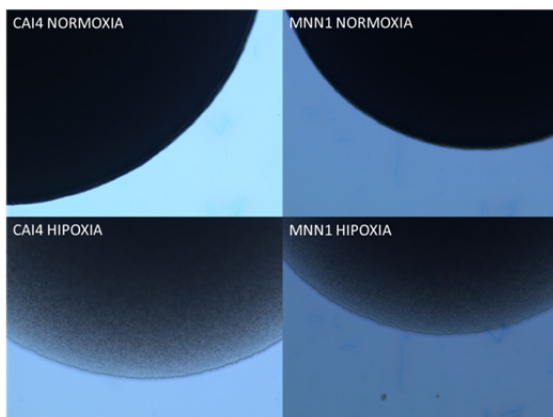
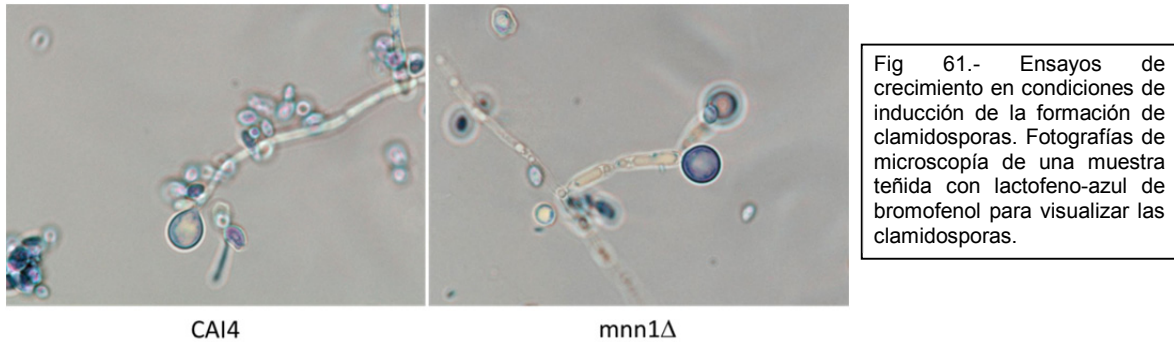


Fig 60.- Ensayos hipoxia a 28°C. Fotografías de microscopía de colonias de las cepas silvestre (izquierda) y mutante (derecha) en condiciones de normoxia (superior) e hipoxia (inferior).

Se aprecia que tanto las colonias de la cepa silvestre como las de la cepa mutante crecen con bordes lisos y células levaduriformes tanto en condiciones de normoxia como de hipoxia, lo cual indica que el crecimiento en hipoxia no se ve afectado por la delección de *MNN1*.

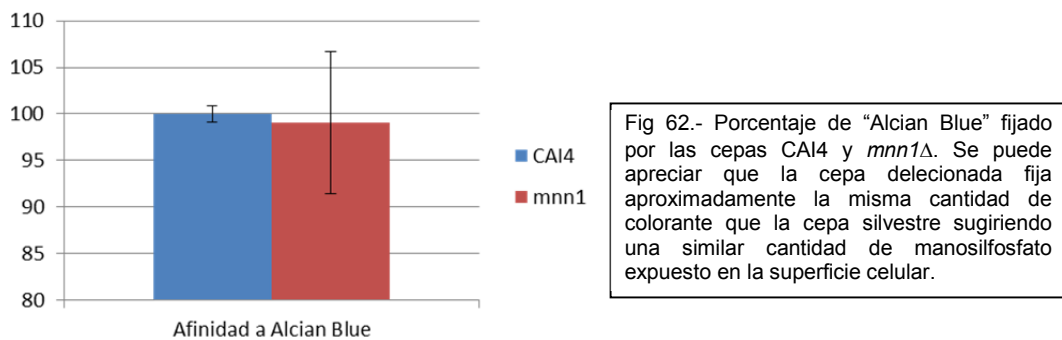
4.5.- Formación de clamidosporas

Investigamos si la cepa mutante era capaz de llevar a cabo la diferenciación en clamidosporas comprobando que la delección de *MNN1* no afectaba este proceso (Fig. 61).



5.- EFECTOS CAUSADOS POR LA AUSENCIA DE *MNN1* SOBRE LA INTEGRIDAD DE LA SUPERFICIE CELULAR

En primer lugar, y con el fin de determinar si el mutante presenta alteraciones de la estructura de la pared celular, se llevó a cabo un ensayo de afinidad a *Alcian Blue*.



Estos resultados indican que la cepa delecionada presenta una cantidad de cadenas de fosfomanosas expuestas en la superficie celular muy similar a la cepa silvestre. De esto se deduce que la ausencia de ésta manosiltransferasa apenas altera la estructura de las manoproteínas de superficie celular.

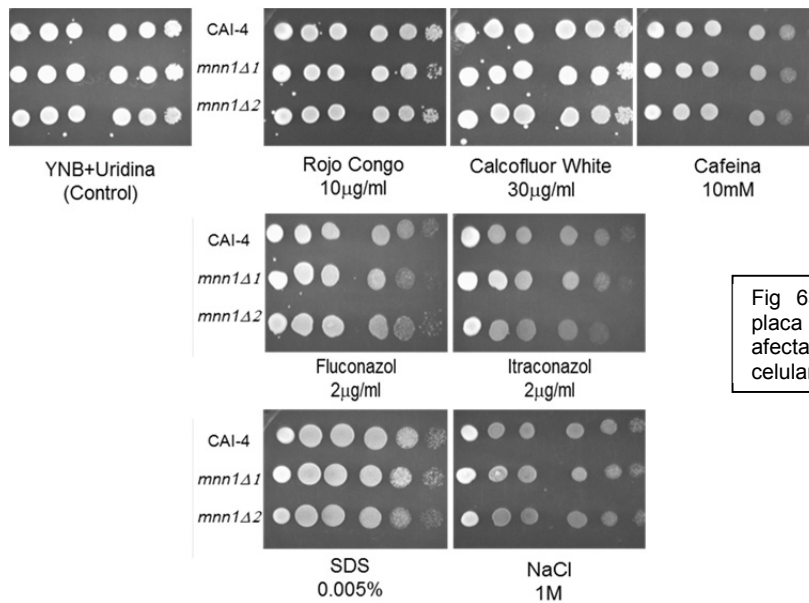


Fig 63.- Ensayos de sensibilidad en placa frente a distintos compuestos que afectan a la integridad de la superficie celular.

Con el fin de analizar con más detalle los posibles efectos de la deleción en la estructura de la pared celular, se comparó el crecimiento de las cepas CAI4 y *mnn1Δ* en presencia de compuestos que alteran esta estructura.

En la Fig. 63 se puede observar que la cepa delecionada presenta una sensibilidad similar a Calcofluor White, Rojo Congo y cafeína.

El hecho de que la sensibilidad frente a estos compuestos sea similar, sugiere una escasa alteración en la estructura de la pared celular.

Al analizar el comportamiento de las cepas CAI4 y *mnn1Δ* frente a la acción de distintos compuestos antifúngicos como son el fluconazol e itraconazol, no se aprecian variaciones en el comportamiento de ambas cepas. Esto sugiere que la cepa *mnn1Δ* no presenta deficiencias en la síntesis de ergosterol.

Tampoco se detectaron diferencias en la sensibilidad frente a SDS, detergente que altera la membrana plasmática. La hipersensibilidad a SDS se ha relacionado con alteraciones en la estructura de la membrana plasmática y también con alteraciones de su composición.

Con objeto de saber si el mutante presenta alteraciones en respuesta a estrés osmótico analizamos el crecimiento en presencia de NaCl. Los resultados muestran que el mutante presenta una sensibilidad a este compuesto similar a la cepa parental.

6.- EFECTO DE LA DELECIÓN DEL GEN SOBRE LA VIRULENCIA

Con objeto de poder realizar ensayos de virulencia del mutante, se construyó la cepa *mnn1Δ-R* siguiendo los mismos pasos que los realizados para la construcción de *mnn9Δ-R*. Para los ensayos de virulencia se utilizó como cepa control la cepa virulenta CAM-R (*ura3Δ::imm434/URA3*) construida en nuestro laboratorio (ver materiales y métodos).

Se infectaron diez ratones CD1 con 10^8 células tanto del mutante Ura⁺ reconstruido como de la cepa control CAM-R, y se determinó la supervivencia de los mismos a lo largo de varios días. En la Fig. 64 se muestran los resultados obtenidos:

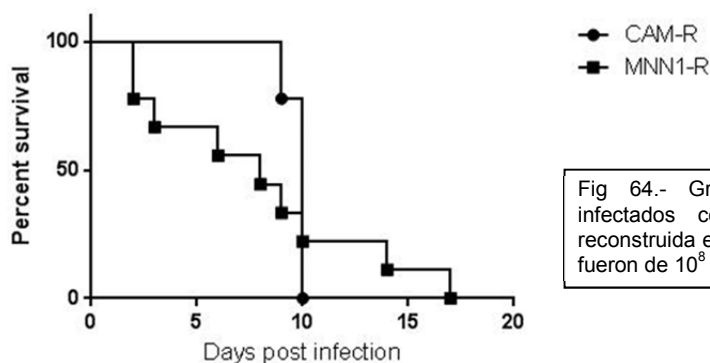


Fig 64.- Gráfica de supervivencia de ratones infectados con las cepas CAMR y *mnn1Δ-R* reconstruida en el locus *URA3*. Las dosis de infección fueron de 10^8 células/ml.

El mutante *mnn1Δ-R* muestra una capacidad patogénica similar a la de la cepa control.

7.- EFECTO DE LA DELECIÓN DEL GEN *MNN1* SOBRE LA GLICOSILACIÓN DE UNA PROTEÍNA DE REFERENCIA

Con objeto de comprobar si la cepa mutante llevaba a cabo la glicosilación de forma correcta, decidimos realizar experimentos de "Western-blotting" de las cepas silvestre y mutante transformadas con un plásmido que contenía la proteína de referencia Hex1p, unida al epítipo MYC.

En dichos experimentos se trataron en paralelo muestras de los extractos proteicos de las cepas transformadas con la enzima "endoglicosidasa H".

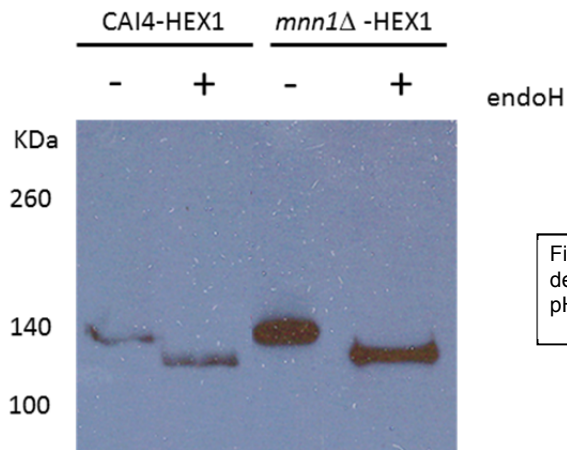


Fig 65.- Electroforesis de los extractos celulares de CAI4 y *mnn1Δ* transformadas con el plásmido pHEX1-13xMyc, sin tratar y tratadas con endoH

No se aprecian diferencias en la glicosilación de la proteína sintetizada por la cepa mutante *mnn1Δ* y la cepa parental.

8.- EFECTO DE LA DELECCIÓN DEL GEN SOBRE EL ESTADO DE ACTIVACIÓN DE LAS RUTAS MAPK

Nos propusimos investigar el estado de activación de las MAPK: Mkc1p, Cek1p y Hog1p en el mutante *mnn1Δ*. Como se ha comentado, son componentes de las rutas de respuesta a defectos en integridad celular, a estímulos que disparan el crecimiento filamentoso, y a estrés oxidativo, respectivamente. Por otra parte, las 3 participan en la arquitectura de la pared celular.

En el mutante *mnn1Δ* se activa Hog1p en respuesta al estrés oxidativo impuesto por la presencia de H₂O₂ de forma similar a como sucede en la cepa parental (Fig. 66 panel izquierdo).

En los extractos de *mnn1Δ* se aprecia una mayor cantidad de Mkc1p fosforilada (banda de 59 KDa) en comparación a los de CAI4, tanto en el caso de células crecidas sin estrés como en el caso de células tratadas con tunicamicina. La intensidad de la banda en extractos de *mnn1Δ* sin tratar es similar a la correspondiente de CAI4 tratada con tunicamicina. De estos resultados se concluye que la ruta de integridad celular mediada por Mkc1p se encuentra activada de forma constitutiva a un cierto nivel y que el mutante sometido a estrés por tratamiento con tunicamicina aún puede responder activando más esta ruta. No hay variación en los niveles de Cek1p fosforilada en extractos de la cepa mutante respecto a la silvestre.

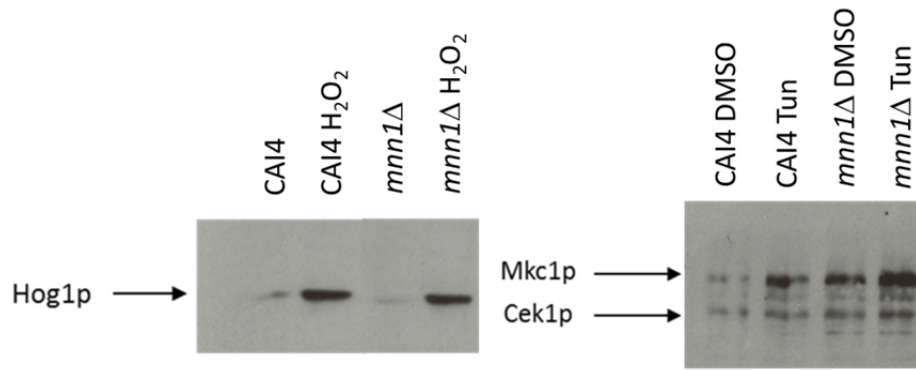


Fig 66.- Revelado de Western-blotting con anticuerpos que reconocen Hog1p, Mkc1p y Cek1p en sus formas fosforiladas.

Para asegurarnos de que la carga fuera la misma en todos los carriles, se llevaron a cabo tinciones de las membranas de transferencia con Ponceau (resultados no mostrados).

Resultados III: Perfiles transcripcionales

1.-PERFIL TRANSCRIPCIONAL DE LAS CEPAS *mnn9Δ* y *mnn1Δ*.

1.1.- Generalidades del perfil transcripcional del mutante *mnn9Δ*

Como en cualquier proceso celular, el proceso de glicosilación de proteínas requiere, además de la expresión de genes que codifican específicamente para él, el control coordinado de otros muchos genes. Con objeto de profundizar en los cambios transcripcionales que le permiten a la cepa *mnn9Δ* sobrevivir a los defectos en la glicosilación de proteínas, nos propusimos obtener información acerca de los genes cuya expresión varía en ausencia de Mnn9p, para lo cual llevamos a cabo un análisis comparativo, mediante micromatrices, del perfil transcripcional del mutante *mnn9Δ* respecto al de la cepa parental, CAI4 durante el crecimiento exponencial como levadura y a 3 tiempos (15, 60 y 180 minutos) de inducción de la transición levadura-hifa en medio Lee a 37°C.

En la Fig. 67 se muestra la morfología que presentan las células en los cultivos realizados en las condiciones indicadas y de los que se recogieron las muestras para la comparación de los perfiles de transcripción *mnn9Δ* vs. CAI4. En las fotografías se aprecian las diferencias existentes en la morfología entre ambas cepas en condiciones de inducción de la filamentación.

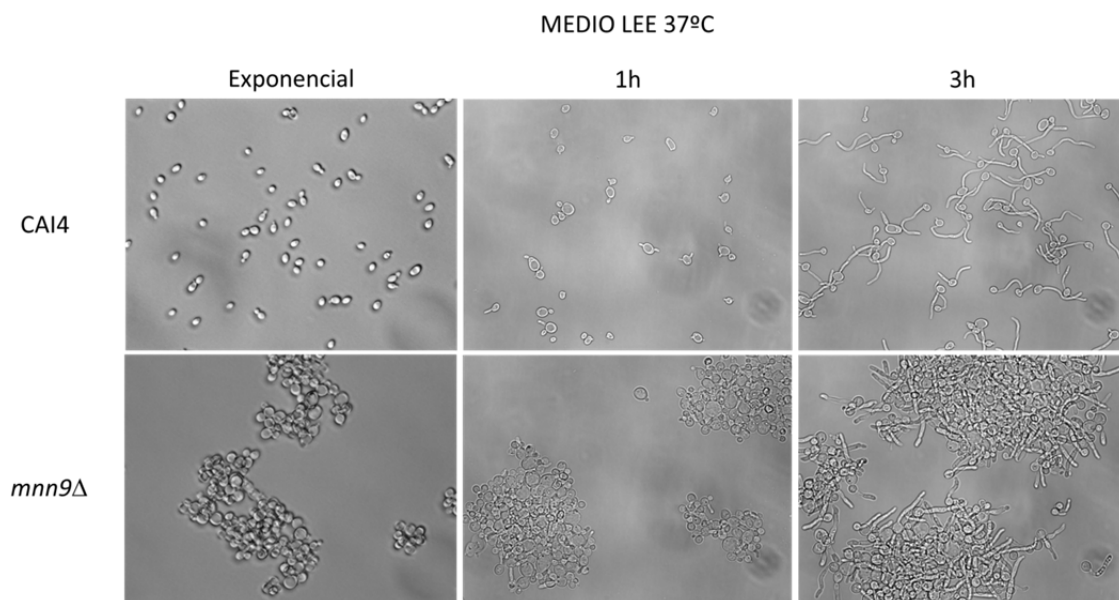
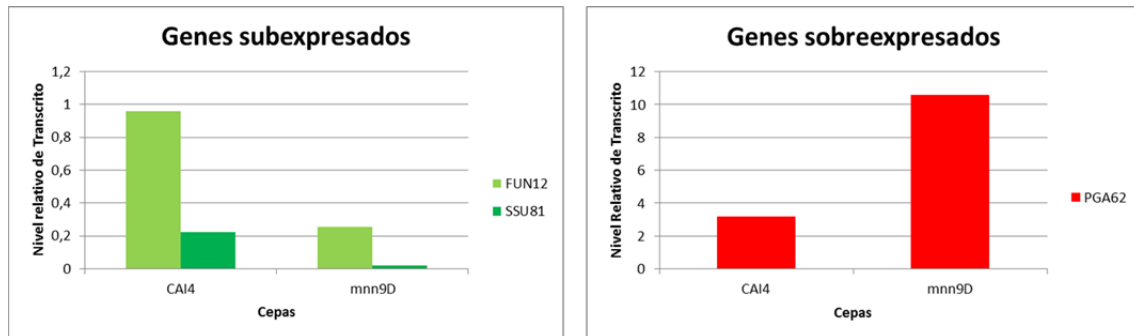


Fig 67.- Fotografías de microscopía de células de CAI4 (superior) y *mnn9Δ* (inferior) durante la fase exponencial de crecimiento a 28°C y a tiempos 1 y 3 horas de inducción de filamentación a 37°C.

Los genes expresados de forma diferencial en cada condición se pusieron de manifiesto siguiendo los pasos descritos en "Materiales y Métodos". Entre los genes

identificados se consideraron sólo aquellos que presentaban un factor medio de variación mutante vs. parental $\geq 1,5$ filtro comúnmente empleado en publicaciones sobre micromatrices.

La fiabilidad de los datos obtenidos se comprobó analizando la expresión de alguno de los genes mediante experimentos de RT-PCR. En la Fig. 68 se muestran los datos obtenidos de la expresión mediante micromatrices y de los obtenidos mediante RT-PCR para 3 genes.



	Array	qPCR
PGA62	8,881	10,58
SSU81	0,298	0,1
FUN12	0,114	0,263

Fig 68.- Gráficas que indican el nivel relativo de transcritos de genes subexpresados (superior izquierda) y sobreexpresados (superior derecha) en el mutante *mnn9Δ* en fase exponencial de crecimiento. En el recuadro inferior se muestran los valores obtenidos para dichos genes tanto en los experimentos de RT-PCR como en los de micromatrices.

Se ha descrito que durante la construcción de algunas cepas mutantes han tenido lugar grandes reordenamientos cromosomales tales como aneuploidias (Arbour *et al*, 2009) que se han puesto de manifiesto durante los análisis de expresión génica globales. La inspección visual de los perfiles del transcriptoma realizados en distintas condiciones comparando la cepa mutante *mnn9Δ* con la cepa silvestre nos ha permitido descartar esta posibilidad ya que la distribución de los genes sobreexpresados y subexpresados parece uniforme a lo largo de todos los cromosomas. En la Fig 69 se muestra como ejemplo el perfil del transcriptoma obtenido a los 15 minutos de inducción de la transición

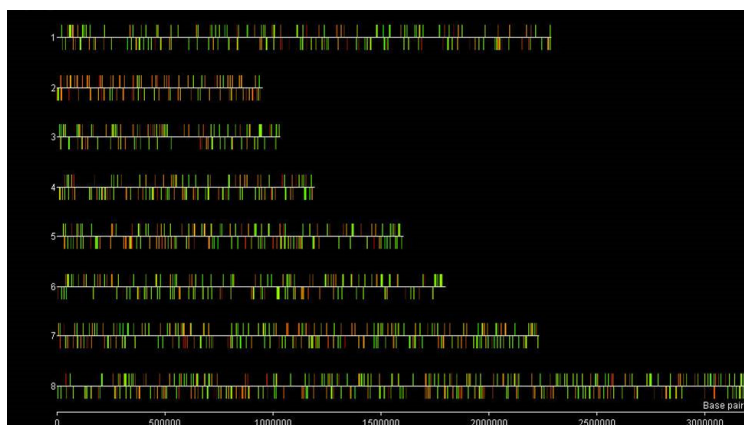
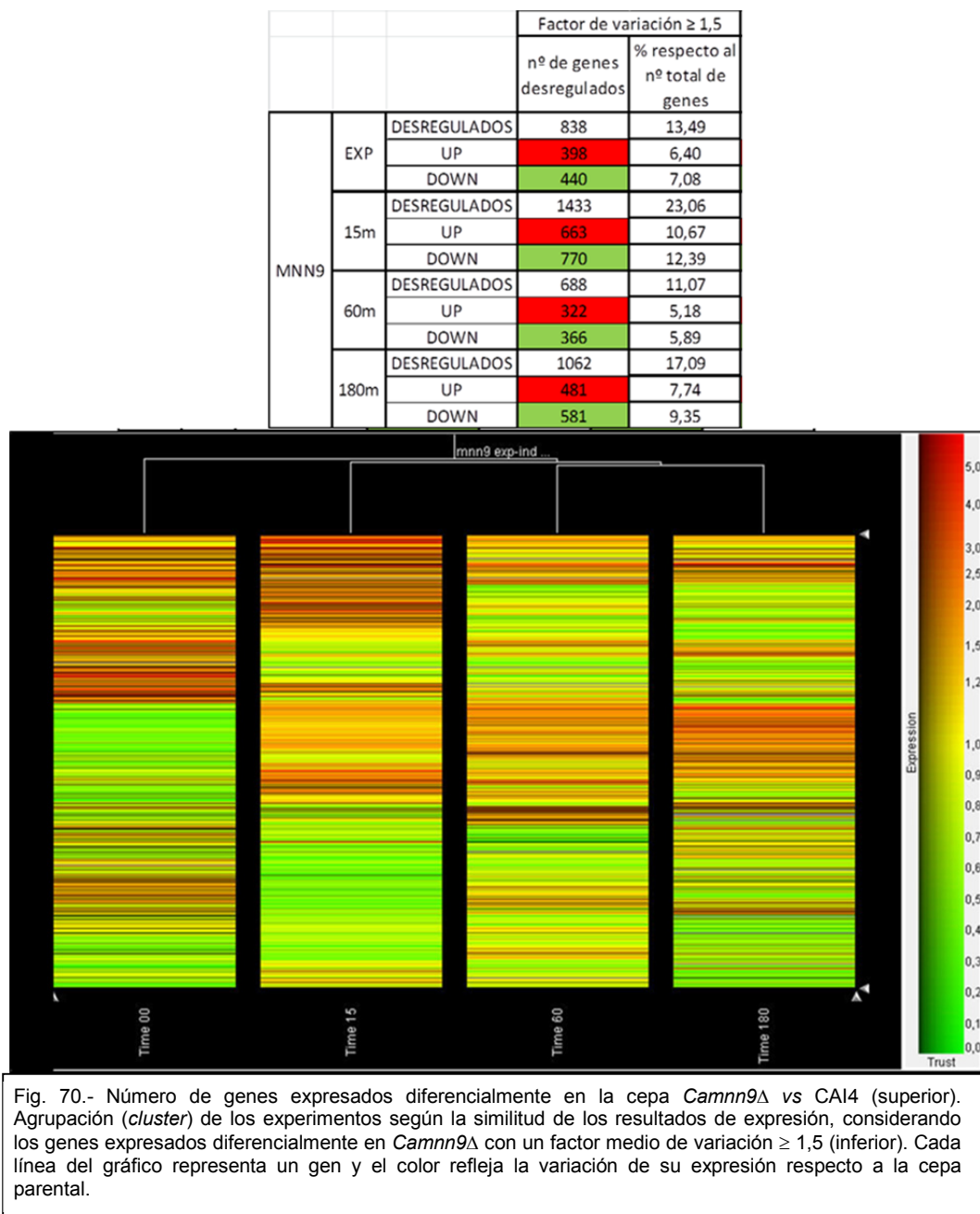


Fig 69.- Genes desregulados en el mutante *mnn9Δ* a los 15 minutos de inducción de la transición levadura-hifa. Las líneas horizontales blancas representan los cromosomas, las verticales coloreadas en rojo los genes sobreexpresados, y en verde los subexpresados.

En la Fig. 70 se indica el número de genes expresados diferencialmente en cada condición. El nombre de los genes, descripción y factor de variación se detallan en los archivos del material suplementario (S.I).

Se realizó un primer análisis tipo cluster de los datos con objeto de comparar los perfiles de expresión obtenidos en las 4 condiciones. El dendrograma, en la parte superior de la Fig. 70, representa la similitud entre los experimentos. Como se puede apreciar, por un lado se encuentra el perfil en fase exponencial de crecimiento levaduriforme y por otro lado agrupados por orden cronológico los distintos tiempos de inducción.



Durante el crecimiento en medio Lee a 28°C el mutante presenta desregulados un 13,49 del total de genes (6214 genes descritos en la base de datos CGD). Con el fin de averiguar si la delección de *MNN9* afecta de forma específica la regulación de determinados procesos biológicos, se identificaron las categorías y subcategorías funcionales que aparecían sobrerrepresentadas, es decir aquellos grupos funcionales cuyos genes se encuentran en las listas de genes diferencialmente expresados en un número superior al que cabría esperar si se tratara de una distribución al azar. Para estos análisis tuvimos en cuenta aquellos genes desregulados con un factor de variación medio $\geq 1,5$ con objeto de identificar las categorías funcionales más afectadas por la ausencia de *Mnn9p*.

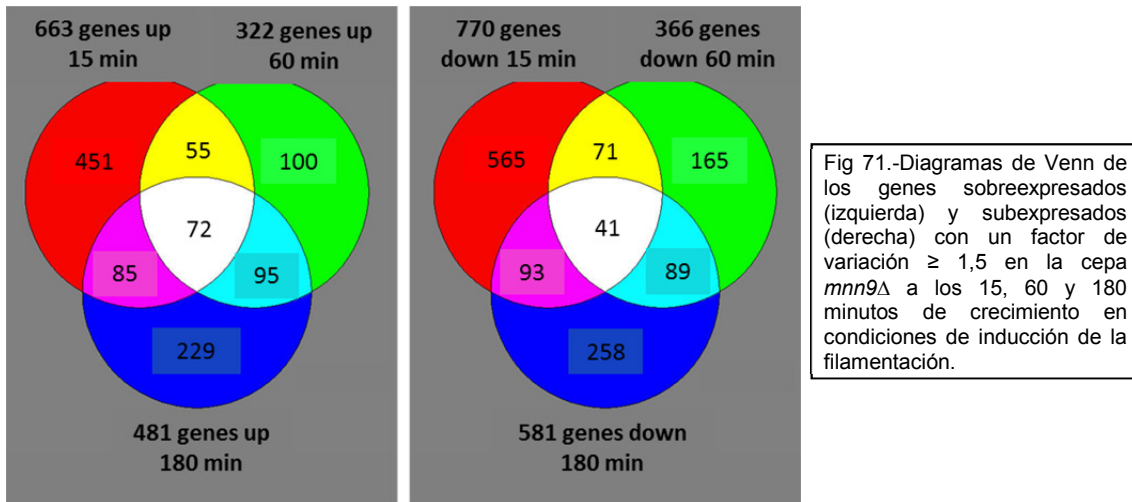
Tabla VIII.- Categorías funcionales estadísticamente sobrerrepresentadas en el mutante *mnn9Δ* durante la fase exponencial de crecimiento en forma de levadura teniendo en cuenta aquellos genes desregulados con un factor de variación $\geq 1,5$. La columna GO indica el número de la categoría según la web AmiGO. La columna genes desregulados/genes categoría indica el número de genes desregulados en nuestro mutante/número de genes incluidos en cada categoría funcional.

	Sobreexpresados			Subexpresados		
	GO	Descripción	Genes desregulados/genes categoría	GO	Descripción	Genes desregulados/genes categoría
<i>mnn9Δ</i> exponencial	44419	Interacción entre organismos	28/232	42254	Biogénesis de ribosomas	34/154
	7155	Adhesión celular	12/70	50896	Respuesta a estímulos	73/714
	9628	Respuesta a estímulos abióticos	48/514			
	31505	Organización y biogénesis de la pared celular	18/143			

Durante la inducción, se observan también diferencias de expresión de genes individuales entre tiempos sucesivos (Fig. 70). Esta variación refleja la modulación de la expresión que sufren numerosos genes al inicio de la formación de hifas. En *C. albicans* diversos autores han descrito que la mayor parte de los genes cuya expresión varía durante la inducción de la miceliación son modulados de forma transitoria (Nantel *et al*, 2002).

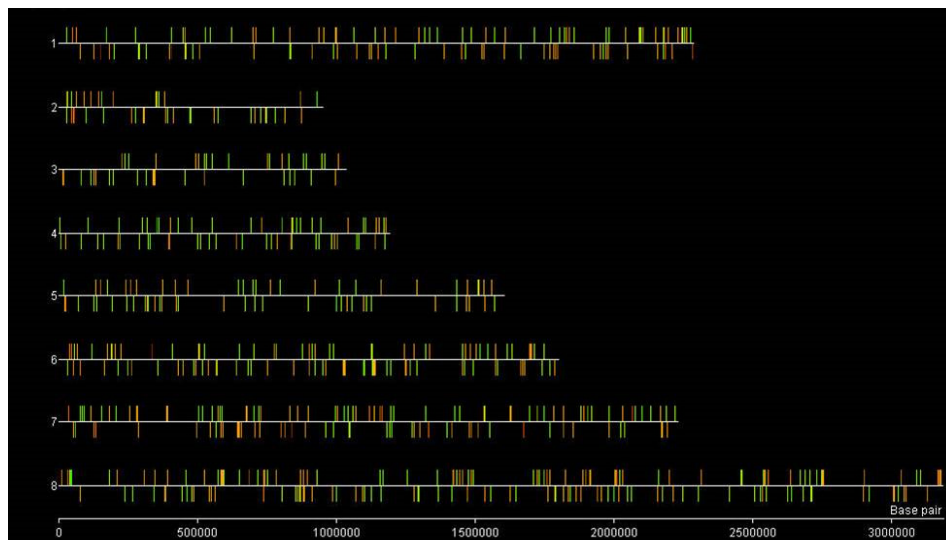
Con objeto de conocer el número de genes que se sobreexpresan o se subexpresan comunes a los 3 tiempos de la inducción analizamos los datos mediante diagramas de Venn.

Se ha observado que en los 72 genes sobreexpresados comunes se encuentra estadísticamente sobrerrepresentada la categoría de "Metabolismo energético", mientras que en los 41 genes subexpresados comunes se encuentra estadísticamente sobrerrepresentadas las categorías de "Formación de biopelículas".



1.2.- Generalidades del perfil transcripcional del mutante *mnn1* Δ

Analizamos los datos obtenidos del mutante *mnn1* Δ de manera similar a lo indicado para el mutante *mnn9* Δ .



En el mutante *mnn1* Δ existe una distribución homogénea de los genes sobre y subexpresados en todos los cromosomas por lo que no parece haber diferencias respecto a la cepa parental en el número de cromosomas.

En la Fig. 73 se indica el número de genes expresados diferencialmente en cada condición siguiendo los criterios de expresión diferencial con una variación $\geq 1,5$. El nombre

de los genes, descripción y factor de variación se detallan en los archivos del material suplementario (S.II).

Los datos correspondientes a las 4 condiciones analizadas se agruparon por la similitud de los resultados obtenidos mediante análisis tipo *cluster* comprobándose que los experimentos se distribuyen como cabría esperar, por un lado los datos de crecimiento exponencial a 28°C y por otro los 3 tiempos de inducción de la transición a 37°C, estos últimos ordenados de forma cronológica.

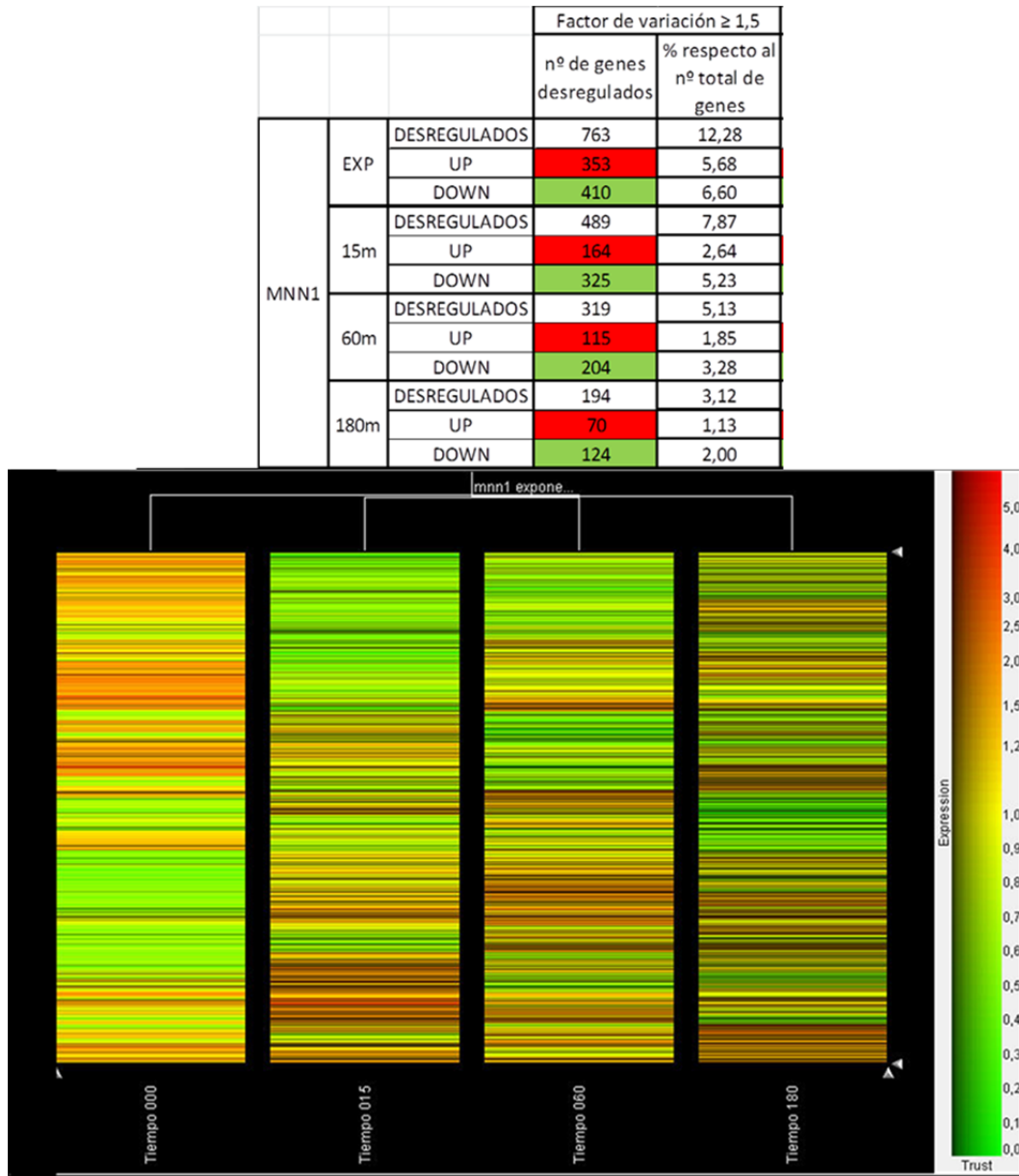


Fig. 73.- Número de genes expresados diferencialmente en la cepa *Camn1* (superior). Agrupación (*cluster*) de los experimentos según la similitud de los resultados de expresión, considerando los 1477 genes expresados diferencialmente en *Camn1* con un factor medio de variación $\geq 1,5$ (inferior). Cada línea del gráfico representa un gen y el color refleja la variación de su expresión respecto a la cepa parental.

El número de genes sobre y subexpresados en cada condición con un factor de variación $\geq 1,5$ se muestra en la Fig. 73.

Considerando un factor de variación de expresión $\geq 1,5$ en *mnn1Δ* respecto a CAI4 se analizaron las categorías sobrerrepresentadas durante el crecimiento en fase exponencial a 28°C (Tabla IX).

Tabla IX.- Categorías funcionales estadísticamente sobrerrepresentadas en el mutante *mnn1Δ* durante la fase exponencial de crecimiento en forma de levadura teniendo en cuenta aquellos genes desregulados con un factor de variación $\geq 1,5$. La columna GO indica el número de la categoría según la web AmiGO. La columna genes desregulados/genes categoría indica el número de genes desregulados en nuestro mutante/número de genes incluidos en cada categoría funcional.

<i>mnn1Δ</i> exponencial	Sobreexpresados			Subexpresados		
	GO	Descripción	Genes desregulados/genes categoría	GO	Descripción	Genes desregulados/genes categoría
	19752	Metabolismo de ácidos carboxílicos	46/233	Nada destacable		
	44248	Catabolismo celular	48/274			

Mediante el análisis comparativo del transcriptoma de la cepa *mnn1Δ* vs. CAI4 en tres tiempos diferentes de la transición dimórfica, en medio Lee a 37°C, se trató de determinar los genes relacionados con morfogénesis cuya expresión es alterada por la delección del gen *MNN1*.

Los datos de los genes expresados diferencialmente en cada uno de los tiempos de la inducción se analizaron mediante diagramas de Venn con objeto de conocer el número de genes diferencialmente expresados que comparte cada condición.

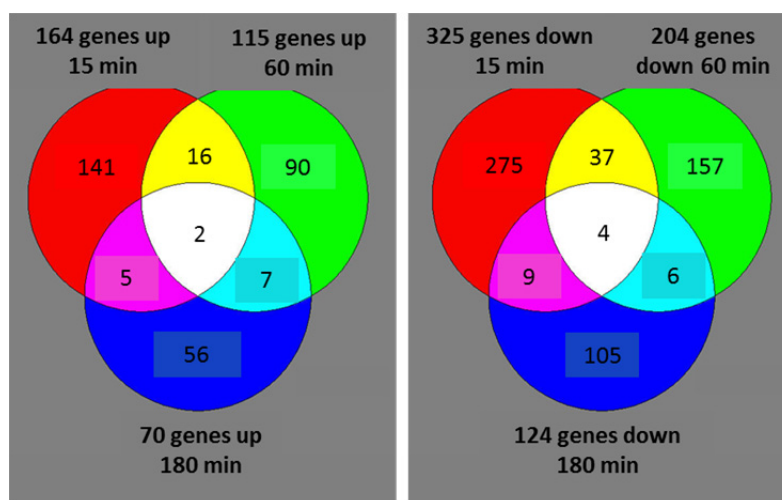


Fig 74.-Diagramas de Venn de los genes sobreexpresados (izquierda) y subexpresados (derecha) con un factor de variación $\geq 1,5$ en la cepa *mnn1Δ* durante la inducción de la filamentación.

Dado el bajo número de genes desregulados comunes, no se pueden hacer análisis de categorías funcionales estadísticamente sobrerrepresentadas. Los 2 genes comunes

sobreexpresados son *ECE1* y *orf19.3607*. Los genes subexpresados comunes son *HBR2*, *PES1*, *NDH51* y *orf19.2439.1*.

1.3.- Análisis de los genes diferencialmente expresados en los mutantes *mnn9Δ* y *mnn1Δ*.

Antes de analizar en detalle algunas de las categorías funcionales sobrerrepresentadas y ya que los mutantes que estamos caracterizando están afectados en la N-glicosilación de proteínas, nos planteamos investigar si dentro de los genes diferencialmente expresados se encuentra un porcentaje significativo de genes que codifican para proteínas N-glicosiladas.

1.3.1.- Genes desregulados que codifican proteínas potencialmente N-Glicosiladas

No encontramos una lista de genes definidos como codificantes de proteínas que se encuentren N-glicosiladas en *C. albicans*. Zielinska y colaboradores (Zielinska *et al*, 2012) han llevado a cabo un estudio a gran escala de los sitios N-glicosilados de las proteínas de diversos organismos mediante espectrometría de masas. A partir de los datos experimentales obtenidos en *S. cerevisiae* por estos autores, identificamos los genes ortólogos de *Candida* que, presumiblemente, codifican para N-glicoproteínas. Esta lista contiene 211 genes (correspondiendo al 3,4% del número total de genes de *C. albicans*). En la tabla se detalla el número de estos genes desregulados en los mutantes *mnn9Δ* y *mnn1Δ*, el número total de genes desregulados en cada una de las condiciones ensayadas, y los porcentajes correspondientes. En Material Suplementario se detallan los genes y sus valores de sobreexpresión o subexpresión en los mutantes (S. III).

Tabla X.- Se detalla el número de estos genes desregulados en los mutantes *mnn9Δ* y *mnn1Δ*, el número total de genes desregulados en cada una de las condiciones ensayadas, y los porcentajes correspondientes

	<i>mnn9Δ</i>				<i>mnn1Δ</i>			
	N-Glicoproteínas	Totales desregulados	%	p-valor	N-Glicoproteínas	Totales desregulados	%	p-valor
Exponencial	26	838	3,1	0,07	30	763	3,9	0,05
15 min	60	1433	4,2	0,01	13	489	2,6	0,07
60 min	27	688	3,9	0,06	11	319	3,4	0,12
180 min	36	1.062	3,4	0,07	9	194	4,6	0,09

No parece haber ninguna sobrerrepresentación de este grupo de genes que codifican proteínas N-glicosiladas entre los genes diferencialmente expresados en los mutantes. Los p-valores obtenidos utilizando la fórmula de distribución hipergeométrica (Tavazoie *et al*, 1999) no son significativos, exceptuando el correspondiente a los datos de *mnn9Δ* creciendo en condiciones de inducción de la filamentación a los 15 min, aunque el valor no es altamente significativo.

1.3.2.- Genes desregulados implicados en N-glicosilación en el complejo de Golgi

Con objeto de averiguar si la ausencia de las manosiltransferasas Mnn9p y Mnn1p en los respectivos mutantes pudiera ser compensada mediante la sobreexpresión de otros genes que codifican para manosiltransferasas en el complejo de Golgi, hemos analizado los datos de expresión diferencial de los genes implicados en la N-glicosilación de proteínas en este orgánulo (ver tabla XI y Fig. 75).

En *mnn9* Δ durante la fase exponencial de crecimiento ninguno de los genes que codifican para α -1,6-manosiltransferasas aparece sobreexpresado, sin embargo, se observa la sobreexpresión de los genes *MNN22* y *BMT4* (que codifican para una α -1,2 y una β -1,2-manosiltransferasas, respectivamente). Estos resultados sugieren que los defectos en las glicoproteínas sintetizadas por el mutante pueden deberse a la extensión del esqueleto externo de α -1,6-manosa, que podría ser más corto, y a la de las ramas laterales con manosas unidas por los otros tipos de enlaces, que pudieran ser más largas.

Tabla XI.- Algunos de los genes desregulados en los mutantes <i>mnn9</i> Δ y <i>mnn1</i> Δ que codifican proteínas implicadas en la N-glicosilación de proteínas en el complejo de Golgi.									
Calb	mnn9 exp	mnn9 15	mnn9 60	mnn9 180		mnn1 exp	mnn1 15	mnn1 60	mnn1 180
ANP1		0,259					1,777		
BMT1				0,578					
BMT4	1,783								
BMT6		4,851	1,649	2,514		0,534			
HOC1		0,526							
KTR2		0,483							
MNN1		1,962	3,498	3,995					
MNN10			1,522	2,114					
MNN14		1,619							
MNN15		1,934							
MNN21		0,662							
MNN22	1,868	3,572	2,72	2,361					
MNN23		2,243					0,63		
MNN24		2,841							
MNN26		1,731		1,521					
MNN4		1,884							
MNN9	0,308		0,276	0,313					
MNT2		0,551					1,577		
MNT3		0,596				0,653		0,55	
OCH1				1,599					

Durante la inducción de la filamentación en *mnn9Δ*, cabe destacar la sobreexpresión de varios genes de las familias *MNN2* (α -1,2-manosiltransferasas) y *MNN1* (α -1,3-manosiltransferasas) y otros genes como *BMT6* (β -1,2-manosiltransferasa). Las mayores variaciones se encuentran a los 15 min de la inducción.

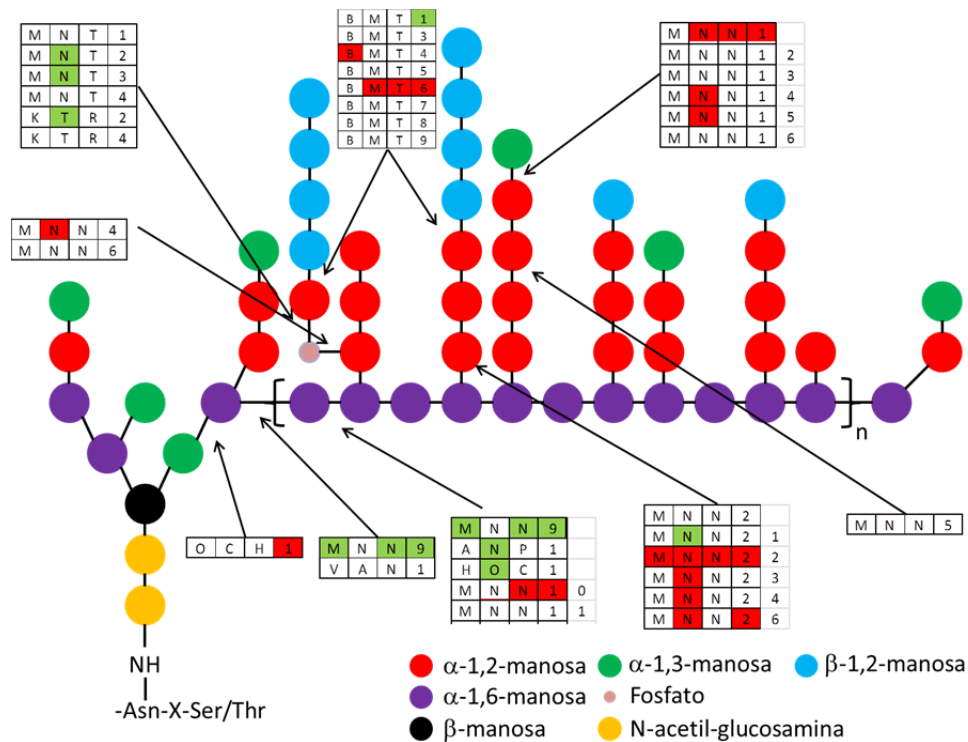


Fig 75.- Esquema de los genes implicados en la N-glicosilación en el complejo de Golgi y su expresión en el mutante *mnn9Δ* durante el crecimiento exponencial y los tiempos 15, 60 y 180 minutos de inducción. Cada gen está dividido en 4 cuadros correspondientes a cada uno de los tiempos analizados en las micromatrices y que de izquierda a derecha son: fase exponencial de crecimiento levaduriforme y tiempos 15, 60 y 180 minutos de inducción. Los cuadros rojos significan sobreexpresión en la cepa *Camnn9Δ* respecto a la cepa silvestre, los cuadros verdes subexpresión y los cuadros blancos expresión similar.

1.3.3.- Genes desregulados que codifican proteínas asociadas a superficie celular

Debido a que la mayoría de las glicoproteínas se localizan en compartimentos extracelulares, los defectos en las glicoproteínas sintetizadas por los mutantes deben afectar a la organización de las estructuras externas de la célula, pared y membrana, por lo que comenzamos analizando los datos de expresión diferencial en los mutantes de genes asociados a superficie celular. A continuación identificamos aquellos de los que se ha informado que su expresión también se altera cuando la célula se somete a otros tipos de estrés.

Para ello, en primer lugar elaboramos una lista de genes que incluían los de las categorías "Cell Surface" (GO0009986) y "Cell Wall" (GO0005618) especificados en la página web "The Gene Ontology AmiGO" (<http://amigo.geneontology.org/cgi-bin/amigo/go.cgi>) para *C. albicans*, los genes que codifican proteínas GPI especificados por Richard y Plaine (Richard & Plaine, 2007) y los genes que codifican proteínas de pared y membrana celular identificadas mediante análisis proteómicos y descritas por Chaffin (Chaffin, 2008) y Vialás y colaboradores (Vialás *et al*, 2012), siendo el total de genes en la lista así elaborada de 372 (el 6% del total de genes de *C. albicans*). A esta lista la denominamos "Genes asociados a superficie" (Ver "Material Suplementario" S. IV donde se detallan los genes con los datos de expresión diferencial de los mutantes en todas las condiciones analizadas). Con objeto de estar seguros de que en esta lista se encuentran la mayor parte de las proteínas identificadas por otros investigadores como de superficie (de membrana y pared celular) en *C. albicans*, contrastamos con nuestra lista algunas de las publicadas. Verificamos, por ejemplo, que en ella están incluidos los genes correspondientes a proteínas descritas como proteínas de superficie "Bona fide" identificadas en preparaciones de proteínas de paredes celulares de *C. albicans* extraídas por varios métodos y publicadas por el grupo de Sentandreu (Castillo *et al*, 2008).

De este grupo de genes asociados a superficie (372 en total), 83 se encuentran desregulados en *mnn9Δ* creciendo como levadura. Corresponde a un 22,2% de la lista de estos 373 genes y a un 9,9 % de los genes desregulados en el mutante en esta condición. De los 83, 51 se encuentran sobreexpresados y 32 subexpresados. En el mutante *mnn1Δ* encontramos durante el crecimiento levaduriforme, 50 desregulados (un 13,4% de la lista y un 6,5% de los desregulados en esta condición), encontrándose 38 sobreexpresados y 12 subexpresados.

Estos datos indican que del total de genes desregulados en *mnn9Δ*, creciendo como levadura, hay un porcentaje altamente significativo, el 9,9% (con un p-valor de $5,9 \times 10^{-7}$, calculado utilizando la fórmula de distribución hipergeométrica) de genes que codifican proteínas de superficie. En el caso del mutante *mnn1Δ* este porcentaje no es tan significativo (con un p-valor de 0,05).

1.3.3.1.- Genes desregulados en los mutantes que también se desregulan en otras condiciones de estrés

Investigamos en la bibliografía si la expresión de estos genes asociados a superficie desregulados en *mnn9Δ* y *mnn1Δ* también variaba cuando la célula se somete a un estrés en pared como el producido por la presencia de caspofungina o el debido a la exposición a altas temperaturas.

Bruno y colaboradores han definido un grupo central de 38 genes que codifican proteínas de pared que se desregulan en presencia de caspofungina (Bruno *et al*, 2006), la

cual actúa inhibiendo la síntesis del β -1,3-glucano. Observamos que 10 de estos genes mostraban una expresión alterada en *mnn9* Δ en fase exponencial levaduriforme, coincidiendo todos (excepto *MET3*) con la desregulación de sobre o subexpresión mostrada por las células en presencia de este antifúngico (Ver Tabla XII). Representa un porcentaje que aunque no altamente, es significativo (con un p-valor de 0,016).

CRH11, *PGA13* y *PNG2* se encuentran sobreexpresados en *mnn9* Δ en todas las condiciones (excepto *PGA13* a los 180 min de inducción) y su sobreexpresión se asocia a la necesidad de una remodelación de la pared. *CRH11* codifica para una posible transglicosilasa de quitina localizada en pared. Se induce en situaciones de estrés como la exposición a drogas que afectan a la superficie celular (Liu *et al*, 2005; Sorgo *et al*, 2011) o en mutantes afectados en transporte vesicular (Liu *et al*, 2013). *PGA13* se induce cuando los protoplastos se encuentran regenerando la pared (Castillo *et al*, 2006; Mora-Montes *et al*, 2010) y contribuye a la síntesis de la misma (Gelís *et al*, 2012). *PNG2* codifica para una enzima que extrae glicanos unidos con enlace N-glicosídicos a las proteínas, que se induce también en situaciones de estrés en pared y en condiciones de hipoxia (Bruno *et al*, 2006).

Durante la inducción de la transición además se sobreexpresan otros genes de este grupo central de respuesta a estrés por caspofungina, como *DDR48* y *ECM331*. Se ha descrito que Ddr48p está implicada en respuestas a cambios ambientales (Cleary *et al*, 2012).

Estos resultados reflejan que el mutante *mnn9* Δ presenta estrés en superficie.

En *mnn1* Δ el número de genes que presentan alteración en la expresión (de este grupo central de respuesta a caspofungina), en exponencial es de 6 y considerando todas las condiciones, es de aproximadamente la mitad que en el caso de *mnn9* Δ y además los niveles de variación son bastante menores en la mayor parte de los casos.

Tabla XII.- Algunos de los genes asociados a superficie desregulados en crecimiento levaduriforme en los mutantes *mnn9Δ* y *mnn1Δ*. Se indican aquellos cuya expresión varía con el tratamiento con caspofungina (Bruno *et al*, 2006), o por exposición a 42°C (Heilmann *et al*, 2013)

Calb	Descripción	mnn9 exp	mnn1 exp	Caspof. (Bruno)	Temp. (Heilmann)
ALS3	Adhesina de la familia de las glicoproteínas ALS	93,56	1,916		v
ALS2	Adhesina de la familia de las glicoproteínas ALS	56,27			v
RBT5	Glicoproteína GPI	22,22			v
PGA6	Proteína GPI	22,07	0,607		
ALS4	Adhesina de la familia de las glicoproteínas ALS	21,33			v
PGA62	Proteína GPI. Inducida durante la regeneración de pared	8,881			
PGA54	Proteína GPI. Inducida durante la formación de hifas	8,573			
PGA13	Proteína de pared de unión a GPI, similar a las mucinas	7,502	1,878	v	
SSR1	Proteína de pared asociada a b-glucano. Papel estructural	7,419			v
orf19.675	Posible proteína de pared. Inducida en hipoxia	6,172		v	
PGA38	Proteína GPI. Reprimida durante regeneración de pared	4,575			
PIR1	Glicoproteína estructural de la pared celular.	4,398			v
CRH11	Proteína de pared de unión a GPI, Potencial transglicosilasa de quitina	3,821		v	v
PGA23	Proteína GPI	2,966			
orf19.7104	Similar a mucinas	2,693			
PGA4	Proteína GPI de pared, posible b-1,3-glucanosiltransferasa	2,647			v
AAF1	Confiere propiedades de floculación y adherencia	2,587		v	
PNG2	Posible glucanasa; Su expresión aumenta en hipoxia	2,557	2,299	v	
SAP9	Glicoproteína GPI ; aspartil proteínasa;	2,501			v
TOS1	Proteína similar a a-aglutinina	2,065			v
FGR41	Proteína GPI. Implicada en crecimiento filamentoso	2,013			
ECM33	Proteína GPI. Biogénesis de la pared celular	1,648			v
orf19.5267	Proteína de pared	0,583		v	
orf19.2846	Transcripción regulada durante filamentación	0,521		v	
RHD3	Proteína GPI. Subexpresada durante filamentación	0,516			v
PGA45	Proteína de pared de unión a GPI	0,205		v	
MET3	Posible ATP sulfurilasa	0,0486		v	
FET33	Posible oxidorreductasa de Fe	0,0367		v	
STP4	Factor de transcripción		2,123	v	
DDR48	Proteína asociada a estrés inmunogénico. Esencial para el crecimiento filamentoso		1,914	v	
HWP1	Proteína de pared de hifa		1,714		
PHR2	Glicosidasa. Papel en estructura de pared. Regulado por Rim101p		1,589		v
PGA1	Proteína GPI. Inducida durante regeneración de pared. Requerida para adhesión		0,652		
DFG5	Manoproteína de pared y membrana. Posible transductor de señales		0,593		
ECM331	Proteína de pared de unión a GPI. Inducida en hipoxia		0,506	v	v
PGA33	Proteína GPI		0,428		
PGA7	Proteína GPI. Precursor de antígeno de superficie de hifa. Inducida durante regeneración de pared		0,42		
PGA56	Proteína GPI. Inducida durante la filamentación y regeneración de pared		0,349		
YWP1	Proteína de pared y secretada. Implicada en adhesión		0,269	v	v

El grupo de Klis (Heilmann *et al*, 2013) ha investigado los cambios que se producen en el proteoma de la pared cuando las células crecen a temperaturas de 42°C. Algunas de las proteínas cuya abundancia en pared cambia como consecuencia de este tipo de estrés ya habían sido identificadas en otros tipos de estrés como la exposición a drogas antifúngicas como fluconazol o caspofungina. De las 25 proteínas que identificaron en este estudio, los genes correspondientes a 12 de ellas se encuentran desregulados en el mutante *mnn9Δ* en fase exponencial de crecimiento levaduriforme, 11 de ellos sobreexpresados. En *mnn1Δ* se encuentran únicamente 4 genes, 2 de ellos sobreexpresados (Tabla XII).

Cabe destacar la sobreexpresión en *mnn9Δ*, al igual que en el caso de estrés por temperatura, y a altos niveles diferenciales de expresión, de 3 miembros de la familia ALS de adhesinas y *SSR1* y *PIR1* (que codifican para proteínas estructurales de pared, (Garcerá *et al*, 2005)). *PIR1* está implicado en la regeneración y organización de la pared celular y en las uniones del β-1,3 glucano (Martínez *et al*, 2004). También sobreexpresa *SAP9* que codifica una aspartil proteasa implicada en el mantenimiento de la integridad celular y en adhesión (Albrecht *et al*, 2006), *ECM33* (implicado también en integridad celular) y *PGA4* (codifica para una posible β-glucanosiltransferasa).

En resumen, el elevado número de este grupo de genes desregulados en *mnn9Δ* (un porcentaje altamente significativo, con un p-valor de $2,7 \times 10^{-5}$) sugiere que la respuesta a defectos en glicosilación debidos a la ausencia de este gen comparte muchas características de la respuesta de supervivencia a elevadas temperaturas.

1.3.3.2.- Remodelación y biosíntesis de la pared celular.

Es posible que la presencia en la pared de proteínas alteradas en el componente glucídico impida la correcta interacción y cohesión entre los componentes, lo cual puede disparar mecanismos compensatorios que lleven a la remodelación de los componentes estructurales. De hecho, entre los genes descritos en el apartado anterior que se desregulan en situaciones de estrés se encuentran genes implicados en la remodelación de la pared celular como *CRH11*, *PNG2* y *PGA13*. En la Tabla XIII se muestran los valores de expresión diferencial obtenidos de genes relacionados con estas funciones de remodelación y biosíntesis de pared.

El β-1,3 glucano constituye el esqueleto central de la pared al cual se unen los demás componentes. Aunque los genes *GSL1*, *GSL2* que codifican para subunidades de la β-1,3 glucan-sintasa no se encuentran desregulados en los mutantes, *GSC1* (de igual función), se encuentra sobreexpresado en fase exponencial en *mnn9Δ*. También se encuentra sobreexpresado en fase exponencial *RHO1*, que codifica para una GTPasa que regula la síntesis de este polímero y el gen *XOG1* que codifica para una enzima que hidroliza este polímero de β-1,3 glucano. De las proteínas relacionadas con la biosíntesis de quitina

(codificadas por los 8 genes *CHS*) hay que destacar la sobreexpresión en *mnn9Δ* de cuatro de ellos en alguno de los tiempos de la diferenciación levadura-hifa. Otros genes desregulados en *mnn9Δ* codifican para enzimas que modifican los polímeros de la pared, así *PGA4* (glucanosiltransferasa), *UTR2* (transglicosilasa de quitina), *PHR2* (glicosidasa de glucano) y *SUN41* (glucán hidrolasa).

Tabla XIII.- Genes desregulados en los mutantes *mnn9Δ* y *mnn1Δ* relacionados con la biosíntesis de glucano y quitina.

Calb	Descripción	mnn9 exp	mnn9 15m	mnn9 60m	mnn9 180m	mnn1 exp	mnn1 15m	mnn1 60m	mnn1 180m
CHS1	Quitín-sintasa			2,234					
CHS2	Quitín-sintasa				2,126				
CHS4	Activador de la quitín-sintasa						2,234		
CHS7	Proteína requerida para la actividad de CHS3p		1,712	1,511	1,552				
CHS8	Quitín-sintasa requerida para la síntesis de largas fibrillas de quitina		2,739	1,915					
CHT2	Quitinasa				0,462				
CRH11	Proteína GPI. Glicosil-hidrolasa	3,821	9,532	1,551	2,515				
GSC1	Subunidad de la b-1,3-glucan-sintasa. Disminuye su expresión durante la transición levadura-hifa	2,657	0,469						
PGA13	Proteína GPI. Inducida durante la regeneración de pared	7,502	26,93	14,4		1,878			
PGA4	Proteína GPI. b-1,3-glucanosiltransferasa	2,647							
PHR2	Glicosidasa. Papel en estructura de la pared		4,35		2,826	1,589			
PNG2	N-glucanasa	2,557	10,39	4,35	3,661	2,299			
RHO1	Regula la síntesis de b-1,3-glucano y se une a Gsc1p	2,217	0,625	0,599	0,421				
SUN41	Glicosidasa de pared. Requerida para la separación celular. Inducida en hifa		0,519	0,378	0,368			1,692	1,612
UTR2	Proteína GPI. Glicosilasa. Papel en adhesión. Inducida durante la regeneración de pared		2,353	1,539					
XOG1	Exo-1,3-b-glucanasa	1,78	2,478				0,452		

1.3.3.3.- Genes relacionados con floculación y adhesión.

Varios de los genes asociados a superficie que se sobreexpresan con altos niveles de expresión diferencial en *mnn9Δ* durante el crecimiento exponencial levaduriforme codifican para proteínas con funciones en adhesión y floculación. Tres miembros de la familia de los genes ALS que codifican para adhesinas se sobreexpresan en *mnn9Δ*: *ALS2* y *ALS4* con funciones en adhesión a superficies abióticas, y *ALS3* (un gen que se induce en la cepa silvestre durante la transición levadura-hifa). También se sobreexpresan *PGA62* y *AAF1*. La proteína Pga62p tiene características de una floculina (Flo1p en *S. cerevisiae*) y se induce en presencia de antifúngicos. La expresión de los genes *AAF1* y de *MSB1* de *C. albicans* en *S. cerevisiae* aumenta la adherencia a células epiteliales y la floculación. El gen *MSB1* se encuentra muy sobreexpresado durante el crecimiento como levadura. CaMsb1p no contiene un péptido señal, se ha sugerido que puede regular la expresión de factores de adhesión (Li & Palecek, 2005). Ninguno de los miembros de las familias HWP e IFF con características de

adhesinas (de Groot *et al*, 2013) se encuentran desregulados en *mnn9* Δ durante el crecimiento como levadura.

En *mnn1* Δ durante el crecimiento exponencial levaduriforme únicamente se sobreexpresan *ALS3*, aunque con valores muy inferiores a los observados en *mnn9* Δ , y *HWP1*.

Tabla XIV.- Genes desregulados en los mutantes <i>mnn9</i> Δ y <i>mnn1</i> Δ , en condiciones de crecimiento levaduriforme, relacionados con floculación y adhesión.			
Calb	Descripción	<i>mnn9</i> exp	<i>mnn1</i> exp
AAF1	Incrementa adherencia y floculación	2,587	
ALS2	Papel en adhesión y formación de biofilms	56,27	
ALS3	Adhesina	93,56	1,916
ALS4	Papel en adhesión	21,33	
HWP1	Proteína de pared de la hifa		1,714
PGA62	Proteína GPI. Inducida en regeneración de pared	8,881	
MSB1	Posible regulador de la transcripción con papel en adhesión	9,125	
BCR1	Factor de transcripción requerido para la formación de biofilm. Regula genes asociados a pared celular	1,728	

BCR1, que se encuentra sobreexpresado durante el crecimiento levaduriforme en *mnn9* Δ , es uno de los reguladores de la formación de biopelículas mejor caracterizado. Este gen regula la expresión de adhesinas como las codificadas por los genes *ALS* y *HWP1*, las cuales median interacciones entre las células durante la formación de biopelículas (Finkel & Mitchell, 2011).

1.3.3.4.- Sensores de defectos en pared

En la Tabla XV se muestran los valores de expresión diferencial de genes que codifican proteínas sensoras de defectos en pared. La familia de los genes *WSC* se encuentra sobreexpresada en *mnn9* Δ . Estos genes codifican para proteínas sensoras de alteraciones en pared y membrana (Bermejo *et al*, 2010; Rodicio, 2010; Wilk *et al*, 2010; Cruz *et al*, 2013). Se sabe que en *S. cerevisiae* *Wsc1p* es un sensor localizado en la membrana citoplasmática que detecta daños en pared y transmite la señal a la ruta de integridad celular a través de la *GTPasa Rho1p* (Philip & Levin, 2001). En *mnn1* Δ a nivel transcripcional sólo se detecta sobreexpresión de *WSC4* a los 15 min de la inducción.

El gen *MSB2* se sobreexpresa en el mutante *mnn9* Δ durante el crecimiento exponencial, sin embargo, a los 15 y 60 min de la inducción de la filamentación se encuentra subexpresado. Las investigaciones apuntan a que en *C. albicans* *Msb2p* puede sentir los defectos en la N-glicosilación de proteínas y transmitir esta señal a través de la ruta de filamentación llevando a la fosforilación (activación) de la MAPK de esta ruta, *Cek1p*. Como

consecuencia de esto se desreprime la transcripción de *PMT1* (Cantero & Ernst, 2011). *SSU81* (homólogo de *SHO1* de *S. cerevisiae*) codifica para una proteína de membrana que coopera con Msb2p controlando la activación de Cek1p de la ruta de filamentación (Román et al, 2009b; Szafranski-Schneider et al, 2012; Swidergall et al, 2013)

DFG5 codifica para una proteína N-glicosilada de superficie que se induce durante la diferenciación morfológica. Es un posible sensor de la ruta de filamentación. Se encuentra sobreexpresada a los 15 min de la inducción.

DFI1 codifica para una manoproteína N-glicosilada unida a la pared celular que promueve el crecimiento invasivo dependiente de la activación de Cek1p en condiciones de crecimiento dentro de una matriz. Se sobreexpresa durante el crecimiento exponencial y a los 15 min de inducción en *mnn9Δ*.

Tabla XV.- Algunos de los genes desregulados en los mutantes *mnn9Δ* y *mnn1Δ* que codifican proteínas sensoras de estrés en membrana y pared.

Calb	Descripción	mnn9 Exp	mnn9 15m	mnn9 60m	mnn9 180m	mnn1 Exp	mnn1 15m	mnn1 60m	mnn1 180m
WSC1	Proteína de superficie	2,993							
WSC2	Posible proteína de respuesta a estrés de integridad celular	2,993							
WSC4	Posible proteína de respuesta a estrés de integridad celular. Transcripción específica del tipo celular "White"		1,795		2,181		2,234		
MSB2	Miembro de la familia de las mucinas. Posible sensor de daño en pared. Requerido para la fosforilación de Cek1p	2,331	0,313	0,456					
SSU81	Proteína de membrana. Sensor de estímulos que activan rutas MAPK			2,92	2,205	0,189		1,584	
DFG5	Glicoproteína posible sensor de ruta de filamentación		1,56			0,593			
DFI1	Glicoproteína que promueve el crecimiento invasivo	1,792	1,545						

1.3.4.- Genes de rutas de filamentación y específicos de hifa

Nos propusimos analizar los datos de expresión diferencial de los genes que actúan en las cascadas de señalización de la filamentación y de los genes específicos de hifa (HSG), con objeto de encontrar una posible explicación para el fenotipo de crecimiento en forma de pseudohifa que presenta el mutante *mnn9Δ* durante la inducción de la transición, e intentar identificar si alguno de los genes desregulados en estas condiciones también se desregula durante el crecimiento exponencial. Por otra parte, la comparación de los datos correspondientes a los dos mutantes (*mnn9Δ* y *mnn1Δ*) servirá de ayuda en la interpretación de los resultados.

En la Fig. 76 se esquematizan los resultados obtenidos para el mutante *mnn9Δ*. Durante la inducción a 37°C en medio Lee observamos la sobreexpresión de *HSP90* y de *NRG1*, que codifican para proteínas represoras de la formación de hifas, por lo que el hecho de que estos genes estén activados en el mutante podría ser causa de que no pueda diferenciarse como verdadera hifa.

Varios genes de las rutas de transducción de señales que intervienen en la activación de genes específicos de hifas están reprimidos en algún momento de la inducción en *mnn9Δ*. Así, de la ruta MAPK mediada por el AMPc (ruta PKA), *RAS1* (se encuentra subexpresado a los tres tiempos de inducción analizados), así como *CAP1*, *CYR1* y *TPK1* (los 3 genes a los 15 minutos). Sin embargo, el gen *TPK2* que codifica otra isoforma con actividad catalítica de la PKA, se encuentra sobreexpresado a los 15 min de la inducción. El gen *EFG1*, que codifica para el factor de transcripción final de esta ruta, no muestra variaciones en el mutante *mnn9Δ* en sus niveles de transcripción, sin embargo, el gen *FLO8* (codifica para un factor de transcripción), una diana de esta ruta PKA que regula la transcripción de un subgrupo de genes regulados por *EFG1* (Cao *et al*, 2006) se encuentra subexpresado a los 15 min de la inducción. También se encuentra subexpresado a ese tiempo el gen *TEC1* que codifica para un factor de transcripción y que es regulado también por Efg1p (Lassak *et al*, 2011).

La ruta MAPK de filamentación cuyo factor de transcripción final es Cph1p también tiene varios genes subexpresados en el mutante *mnn9Δ* durante la inducción de la transición morfológica, principalmente a los 15 min, así los genes *RAS1*, *CDC42*, *HST7*, *CEK1* y el gen *CPH1*. Por lo tanto, en estas condiciones de inducción, esta ruta se encuentra reprimida a nivel transcripcional en el mutante en relación con la cepa parental.

La ruta que regula la filamentación en condiciones de inclusión en una matriz sólida mediada por el factor de transcripción Czf1p, también se encuentra reprimida transcripcionalmente en el mutante durante el crecimiento en condiciones de inducción en medio líquido a 37°C. El gen *CZF1* se encuentra subexpresado en el mutante *mnn9Δ* a los 15 min y los genes *DCK1*, *RAC1* y *LMO1* que codifican para proteínas que interactúan entre ellas y están implicadas en este proceso, también se encuentran subexpresados al menos a dos de los tiempos de inducción analizados (ver Material Suplementario S. V).

Algunos genes de la ruta implicada en la transición morfológica mediada por pH también se encuentran alterados en el mutante en condiciones de inducción a 37°C a pH 6,8. Así, el gen *DFG5* que codifica para una proteína N-glicosilada de pared y membrana, implicada en la diferenciación a pH alcalino, se encuentra sobreexpresado a los 15 min (Ver Material Suplementario S. V) y *RIM20*, que codifica para una proteína que facilita el corte proteolítico de *RIM101*, está sobreexpresado a dos tiempos de la inducción. Sin embargo, *RIM101*, que codifica para el factor de transcripción de esta ruta, se encuentra subexpresado en este mutante.

Los datos de expresión diferencial de los genes de las rutas de MAPKs de respuesta a estrés mediadas por las MAPK Hog1p y Mkc1p indican que durante la inducción de la transición se subexpresan varios de ellos en *mnn9Δ* en alguno de los tiempos analizados incluidos los correspondientes a estas MAPK. En crecimiento exponencial únicamente se ha detectado la sobreexpresión de un gen correspondiente a la ruta de integridad celular (*BCK1*).

Cabe destacar de estos análisis que de los genes de esta lista (ver Material Suplementario S. V) que se subexpresan en *mnn9Δ* durante la transición morfológica, en *mnn1Δ* o no varía su expresión respecto a la cepa parental, o en alguno de los tiempos analizados se encuentran sobreexpresados. Una excepción es el gen *CZF1* el cual se encuentra ligeramente subexpresado a dos tiempos de la inducción. Por otra parte, los represores de la filamentación, *HSP90* y *NRG1* que se encuentran sobreexpresados en *mnn9Δ*, están subexpresados a los 60 min en *mnn1Δ*.

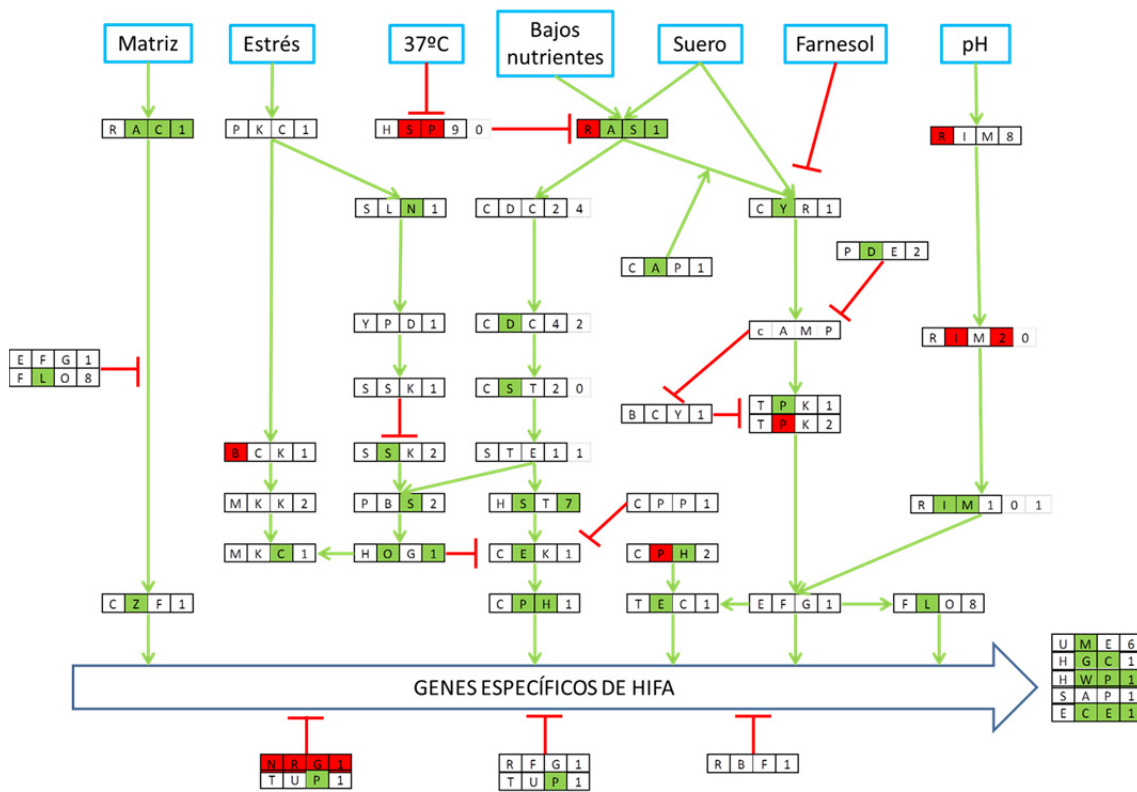


Fig76.- Esquema de las rutas implicadas en la expresión de genes específicos de hifa. Cada gen está dividido en 4 cuadrados, correspondientes a cada uno de los tiempos analizados en las micromatrices y que de izquierda a derecha son: fase exponencial de crecimiento y tiempos 15, 60 y 180 minutos de inducción. Los colores rojo y verde significan sobreexpresión y subexpresión, respectivamente, en la cepa *Camnn9Δ* respecto a la cepa silvestre.

Puesto que las rutas implicadas en el proceso de la transición morfológica se encuentran reprimidas en el mutante *mnn9Δ* respecto a la cepa parental, decidimos analizar los datos obtenidos de estos experimentos para algunos de los genes que se inducen durante

la transición levadura-hifa y que se asocian a la morfología de hifa (referidos por los investigadores como *Hyphal Specific Genes* o HSG).

Analizamos la expresión diferencial en los mutantes *mnn9Δ* y *mnn1Δ* respecto a la cepa parental, de una lista de genes HSG publicada en la revisión de Sudbery de 2011 (Sudbery, 2011). En la Tabla XVI se detallan los datos de algunos de estos genes. Los datos de todos ellos se adjuntan en la lista "Lista de genes HSG" del Material Suplementario S. VI.

En *mnn9Δ* se encuentran subexpresados, en al menos uno de los tres tiempos analizados, 18 de los 39 genes de esta lista. Entre ellos, *ALS3*, *HWP1* y *ECE1*, que se encuentran subexpresados en *mnn9Δ* respecto a la cepa parental a los tres tiempos de la inducción, mientras que en *mnn1Δ* se encuentran sobreexpresados. La expresión de estos genes durante la diferenciación depende parcialmente del factor de transcripción Ume6p cuyo gen se encuentra subexpresado a los 15 min en *mnn9Δ*. Otro gen regulado por Ume6p es *HYR1* el cual también se subexpresa en *mnn9Δ*.

Tabla XVI.- Algunos de los genes específicos de hifa (HSG's) desregulados en los mutantes *mnn9Δ* y *mnn1Δ*.

Calb	Descripción	mnn9 exp	mnn9 15m	mnn9 60m	mnn9 180m	mnn1 exp	mnn1 15m	mnn1 60m	mnn1 180m
orf19.86	Posible glutation-peroxidasa		2,36		1,83		1,711		
SOD5	Superóxido-dismutasa. Protección frente a estrés oxidativo. Inducida en crecimiento en forma de hifa y estrés		2,112	0,381					
DDR48	Proteína inmunogénica asociada a estrés. Regulada en crecimiento filamentoso		17,01	2,829	4,203	1,914	0,395		
CDC10	Septina requerida para morfología de hifa. Papel en virulencia		0,655	0,561					2,699
RBT4	Requerida para virulencia. No requerida para filamentación. Se localiza en la punta de las hifas	3,68	0,648					3,574	
RD11	Su mutación afecta al crecimiento filamentoso.		0,471	0,474					
ALS3	Adhesina. Papel en adhesión epitelial e invasividad endotelial. Promueve la formación de biofilms	93,56	0,437	0,149	0,224	1,916	1,546	1,735	
UME6	Factor de transcripción requerido para la extensión de hifas y virulencia.		0,433						
SEC24	Posible papel en transporte RE-Golgi. Inducida en filamentación		0,392				0,615		
HGC1	Ciclina específica de G1		0,312	0,607			1,942		2,233
HWP1	Proteína de hifa. Papel en virulencia		0,188	0,34	0,513	1,714	3,368		
ECE1	Función desconocida. Expresión específica de hifa. Regulada por Rfg1p, Nrg1p, Tup1p, Cph1p, Efg1p y Hog1p. Puede contribuir a la formación de biofilms.		0,127	0,245	0,469		2,643	2,197	1,508
RBT1	Proteína de pared. Requerida para virulencia. Inducida en hifas.		0,108	0,378		1,521			
DEF1	Requerida para el crecimiento filamentoso. Regulada en hifas			0,649		1,74	2,947		
IHD1	Proteína GPI de función desconocida. Inducida en hifas			0,438	0,236			7,417	
HYR1	Proteína GPI. Inducida en hifas.			0,042					

El gen que codifica para la ciclina específica de hifas, *HGC1*, se encuentra subexpresado a los 15 y 60 min en *mnn9Δ* mientras que está sobreexpresada a dos de los tiempos de inducción analizados en el mutante *mnn1Δ*.

Muy pocos genes de esta lista de HSG se encuentran sobreexpresados durante la inducción en *mnn9Δ*. Caben destacar los genes *DDR48* y *SOD5* (este sólo a los 15 min de la inducción). Se trata de dos genes que se inducen durante la diferenciación a hifa y que se asocian a protección frente a estrés.

La regulación del ciclo celular es un evento que gobierna el proceso de polarización y diferenciación morfológica durante la transición levadura-hifa. Observamos que el gen que codifica para la ciclina específica de hifas Hgc1p se encuentra subexpresado en *mnn9Δ* en condiciones de inducción, por lo que nos propusimos investigar si otros genes de ciclinas se encuentran desregulados en los mutantes.

Como se aprecia en la Tabla XVII, varios genes de ciclinas se encuentran sobreexpresados en el mutante *mnn9Δ* en fase exponencial de crecimiento, incluyendo ciclinas de fase G1 (*CCN1*, *CLN3*) y de fase G2 (*CLB4*). Muchas de ellas se encuentran diferencialmente sobreexpresadas a varios tiempos de la inducción, como *PCL1*, *CCN1* y *CLN3*. Como se ha comentado, el gen específico de hifa *HGC1* se encuentra subexpresado en los primeros tiempos en condiciones de inducción de la transición en este mutante, mientras que en *mnn1Δ* se sobreexpresa.

Tabla XVII.- Algunos de los genes que codifican para ciclinas en *C. albicans* y que se encuentran desregulados en los mutantes *mnn9Δ* y *mnn1Δ*.

Calb	Descripción	mnn9 exp	mnn9 15	mnn9 60	mnn9 180	mnn1 exp	mnn1 15	mnn1 60	mnn1 180
CLG1	Su transcripción es regulada durante la transición levadura-hifa	4,257			0,361				
PCL1	Su expresión se induce en crecimiento filamentosos	4,091	3,241	2,016	2,281	0,537			
PCL5	Ciclina de PHO85	2,287							
CCN1	Ciclina de G1; requerida para el mantenimiento (no iniciación) del crecimiento en forma de hifa	3,475	2,965						
CLN3	Ciclina de G1; su falta impide la gemación y causa defectos en el crecimiento en forma de hifa	2,377	2,995	1,648					
CLB4	Ciclina de G2	1,731							
HGC1	Ciclina de G1 específica de hifa implicada en la morfogénesis de hifas		0,312	0,607			1,942		2,233

1.3.5.- Genes implicados en el metabolismo energético

Se ha descrito la importancia del metabolismo central del carbono en los procesos morfogénicos y en virulencia en *C. albicans*. Hemos analizado los datos de expresión diferencial de los genes implicados en el metabolismo energético, en los mutantes respecto a la cepa parental en condiciones de crecimiento como levadura y en los tres tiempos de

inducción de la transición morfológica. En las tablas de la Fig. 77 se muestran los genes implicados en este proceso que se encuentran desregulados en los mutantes *mnn1Δ* y *mnn9Δ*.

Se ha sugerido que durante la inducción de la filamentación se produce un aumento en la expresión de los genes de la glicolisis. Nosotros observamos que en el caso del mutante *Camnn9Δ* prácticamente todos los genes de la glicolisis se encuentran sobreexpresados con niveles diferenciales muy acusados a los 15 min de la inducción de la transición y muchos de ellos también, aunque con niveles diferenciales más bajos, a los 60 y 180 min. Esto sucede con todos los genes que codifican para las enzimas que permiten la degradación de la Glu-6P hasta acetaldehído, siendo, por orden, *PGI1*, *PFK1* y *PFK2*, *FBA1*, *TDH3*, *PGK1*, *GPM1*, *ENO1*, *CDC19* y *PDC11*. Lo mismo sucede con los genes *ADH1* y *ADH5*, cuyas enzimas transforman el acetaldehído en etanol. Cabe resaltar que las enzimas de los dos primeros pasos (*PGI1*, *PFK1* y *PFK2*) se encuentran también sobreexpresadas durante el crecimiento exponencial en forma de levadura. Los genes que codifican para el metabolismo del glucógeno también se encuentran sobreexpresados en *Camnn9Δ*: *GSY1*, que codifica para la sintasa de glucógeno, durante el crecimiento exponencial (glucogenogénesis) y *GPH1*, que codifica una glucógeno fosforilasa (glucogenolisis) durante la inducción de la filamentación. Además, los genes que transforman la Glc en trehalosa (*TPS1-3*) también se encuentran sobreexpresados en este mutante.

La mayor parte de los genes de la glucolisis que acabamos de describir y de los que codifican para las enzimas del metabolismo del glucógeno y trehalosa, y el gen *RHR2* de la ruta de síntesis de glicerol, se sobreexpresan en el mutante *Camnn1Δ* durante el crecimiento en fase levaduriforme.

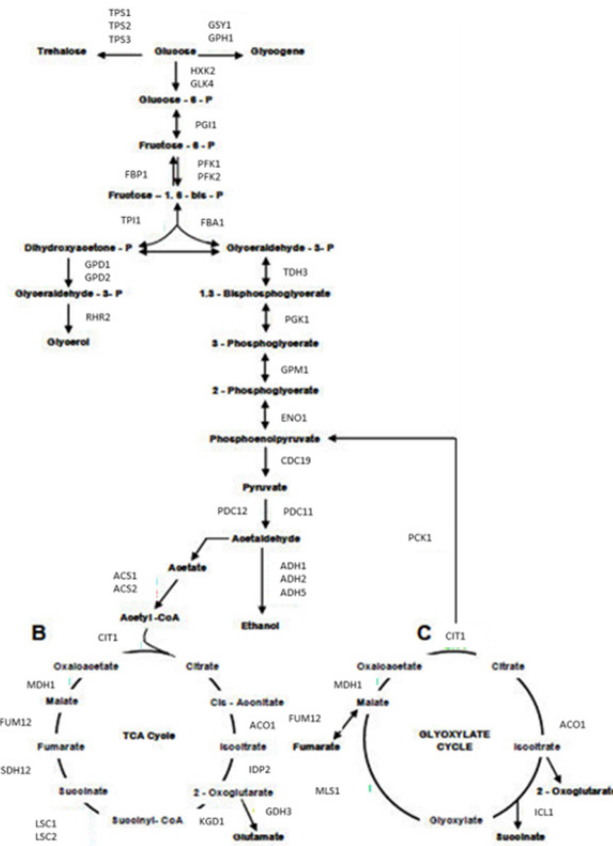
Respecto a las enzimas que degradan el acetaldehído mediante el ciclo de Krebs, en el caso del mutante *mnn9Δ* algunas de ellas se encuentran subexpresadas en alguno de los tiempos de la inducción. Por orden de actuación se encuentran: *ACS2*, *CIT1*, *ACO1*, *KGD1*, *SDH12* y *MDH1*. Del ciclo del glioxilato, *MLS1* se encuentra sobreexpresado a los 15 min de la inducción.

En *mnn1Δ* muchos de estos genes del ciclo de Krebs se sobreexpresan durante el crecimiento levaduriforme.

En resumen, los datos indican que existe una activación transcripcional de la ruta de la glucolisis, durante el crecimiento en forma levaduriforme en *mnn1Δ* y fundamentalmente en condiciones de inducción de la transición en *mnn9Δ*.

En *mnn1Δ* también parece activarse durante la fase de crecimiento levaduriforme la ruta de degradación del ciclo de Krebs, mientras que en *mnn9Δ* esta ruta parece estar más apagada transcripcionalmente en condiciones de inducción. En el caso de *mnn9Δ* la activación

del ciclo del glioxilato puede reflejar la necesidad de suministrar intermediarios del ciclo de Krebs.



Calb	mnn9 exp	mnn9 15	mnn9 60	mnn9 180	Calb	mnn1 exp	mnn1 15	mnn1 60	mnn1 180
TPS1	1,728	2,215	1,515		TPS1	1,905	0,521		
TPS2	1,552				TPS2			2,113	
TPS3		1,757			TPS3				
GSY1	4,33				GSY1	2,189	0,563		0,65
GPH1		7,872	2,451	2,044	GPH1	2,224	0,599		
GLK4					GLK4			2,221	0,488
PGI1	1,555	4,949	1,69		PGI1		0,545		
PFK1	1,675	7,894	2,13	1,641	PFK1	1,923			
PFK2	2,06	6,128	2,36	2,326	PFK2	2,269	0,629		
FBP1					FBP1				
TP11		11,13			TP11	2,211	0,401		
GPD1					GPD1		0,378		
GPD2					GPD2			1,515	2,463
RHR2			1,915		RHR2	2,887			
FBA1		15,25	2,545		FBA1	1,974	0,452		
TDH3		15,95			TDH3	1,712			
PGK1		4,841	2,478	1,73	PGK1	1,659	0,535		
GPM1		3,184			GPM1	1,65	0,471		
ENO1		20,37	2,118		ENO1	1,778	0,442		
CDC19		15,62			CDC19	2,56	0,417	0,594	
PDC11		14,76			PDC11	1,536	0,643		
PDC12					PDC12				
ADH1		9,381	2,663	4,23	ADH1			2,196	
ADH2					ADH2				
ADH5	2,759	5,766	2,174		ADH5	1,518			
ACS1			2,342		ACS1				
ACS2	0,446	0,529	0,475	0,497	ACS2	1,67	0,55		
CIT1		0,0553			CIT1				
ACO1			0,57	0,397	ACO1	1,919			
IDP2		1,517	0,417	0,188	IDP2				1,847
KGD1		0,425		0,656	KGD1	1,85	1,687		
LSC1	0,605				LSC1	0,326			
LSC2					LSC2	0,455			
SDH12			0,56	0,5	SDH12	1,539		0,621	
orf19.1480		0,232			orf19.1480				0,35
FUM12					FUM12	0,607		2,013	
ICL1					ICL1				
MLS1		2,442			MLS1			1,997	
MDH1			0,442		MDH1	1,849			
PCK1		2,167	0,415	0,332	PCK1	2,656			1,539

Fig 77.- Esquema de las rutas de obtención de energía (superior). Las tablas muestran la expresión de los genes implicados en dichas rutas en el mutante *mnn1Δ* y *mnn9Δ* durante el crecimiento en fase exponencial y los tiempos 15, 60 y 180 min de inducción de la filamentación.

1.3.6.- *Visión general de los genes desregulados en varias condiciones*

Los análisis de expresión diferencial presentados hasta el momento nos han permitido comprobar que, en general, el perfil transcripcional de los mutantes en las distintas condiciones es un reflejo de los fenotipos que presentan. Con objeto de poder profundizar en las respuestas transcripcionales de estos mutantes a los defectos en las N-glicoproteínas que sintetizan, parece interesante abordar estos análisis investigando los genes que se encuentran desregulados en varias condiciones.

Puesto que *mnn9Δ* es el que presenta más variación en fenotipos y en el transcriptoma respecto a la cepa parental, nos centramos en este mutante.

1.3.6.1- *Genes sobreexpresados en *mnn9Δ* durante el crecimiento levaduriforme y al menos a dos tiempos de inducción de la filamentación.*

En Material Suplementario S. VII se presenta la lista de estos genes. Entre ellos se encuentran:

- a) Genes asociados a superficie que ya se han comentado en apartados anteriores (*ALS2*, *ALS4*, *PGA13*, *PGA62*, *CRH11* y *PNG2*) y que tienen funciones en adhesión, estructurales y/o remodelación de la superficie celular. Otros de estos genes asociados a superficie son *CSP37* y *DAG7* los cuales carecen de homólogos en *S. cerevisiae*, *YCF1*, un posible transportador de membrana y la orf19.1691 que codifica para una proteína localizada en membrana.
- b) Genes que codifican para proteínas chaperonas que probablemente se localizan en la superficie celular: *HSP70*, *HSP104* y la orf19.251.
- c) Genes que codifican proteínas del metabolismo como *ADH5*, *PFK1*, *PFK2*, *PGI1* y *TPS1*.
- d) Genes implicados en biosíntesis de proteínas N-glicosiladas: *MNN22* (α -1,2 manosiltransferasa del C.G.) y *CWH8* (fosfatasa de dolicolpírofosfato).
- e) Genes que codifican ciclinas: *PCL1* y *CLN3*.
- f) Genes que codifican para factores de transcripción: *NRG1*, que regula genes específicos de hifa. Cabe resaltar el gen *CRZ2*, el cual codifica para un posible factor de transcripción que presenta un péptido señal y 5 sitios potenciales de N-glicosilación

(según el programa NetNGlyc <http://www.cbs.dtu.dk/services/NetNGlyc/>) por lo que pudiera ser una proteína de secreción.

- g) Genes que no presentan una clara homología con genes de *S. cerevisiae*. Entre ellos, las orf19.2959.1 y orf19.6920, que se han descrito como inducidas por hipoxia y durante la formación de biopelículas, respectivamente.

1.3.6.2- Genes subreexpresados en mnn9Δ en al menos tres condiciones.

Dentro de este grupo caben destacar:

- a) Genes que se subexpresan en todas las condiciones de inducción de la filamentación y su expresión no varía durante el crecimiento exponencial, como los genes *HWP1*, *ECE1*, *ALS1* y *SUN41* que codifican proteínas de membrana específicas de hifa, los genes *DCK1* y *RAC1* que codifican GTPasas que activan el crecimiento filamentoso y el factor de transcripción *BRG1*, cuya activación transcripcional es necesaria para inducir la transición levadura-hifa.
- b) Genes que se subexpresan en todas las condiciones de inducción de la filamentación y se sobreexpresan durante el crecimiento exponencial, como los genes *ALS3* (proteína de superficie de la familia de las adhesinas), *RHO1* y *RAS1* que codifican GTPasas que intervienen en rutas de señalización de MAPK y las orf19.79 y orf19.1486.

DISCUSIÓN

Candida albicans es un hongo dimórfico oportunista y uno de los patógenos fúngicos más importantes de humanos. Se considera un modelo interesante en la investigación de los procesos de diferenciación celular y en la búsqueda de antifúngicos.

La pared celular es el primer punto de contacto con el huésped y juega un papel muy importante en procesos como plasticidad morfológica, adhesión y virulencia. Considerando que la zona más externa de esta estructura se encuentra enriquecida en manoproteínas, nos hemos propuesto estudiar dos mutantes afectados en la N-glicosilación en *Candida albicans* con objeto de analizar las alteraciones fenotípicas y transcripcionales que les permiten adaptarse y sobrevivir con defectos en este proceso y profundizar en el conocimiento de la importancia de la N-glicosilación en la morfogénesis y virulencia de este hongo.

Hemos caracterizado los genes *CaMNN9* y *CaMNN1* que codifican para las enzimas α -1,6 y α -1,3-manosiltransferasas, respectivamente, que actúan en el complejo de Golgi. La primera de ellas actúa en uno de los primeros pasos de la ruta en el complejo del Golgi y se encarga de extender el esqueleto de α -1,6-manosas del núcleo oligosacárido de las proteínas N-glicosiladas, mientras que la segunda se encarga de las últimas modificaciones de las ramas que surgen de dicho esqueleto.

En *C. albicans* existen varios miembros de las familias a las que estos genes pertenecen. Bates y colaboradores acaban de publicar un trabajo acerca de la familia de los genes *MNN1* (Bates *et al*, 2013). Dicha familia comprende 6 miembros, siendo uno de ellos *MNN1*. En este trabajo demuestran que la delección de cualquiera de sus seis miembros, excepto del *MNN14*, no causa cambios significativos en los fenotipos de morfología, resistencia a condiciones de estrés y virulencia de las cepas, sugiriendo que existe redundancia funcional entre los miembros de esta familia. Los experimentos de caracterización fenotípica del mutante *Camnn1* Δ presentados en este trabajo de Tesis confirman los resultados observados por estos autores, otros de nuestros resultados ponen de manifiesto algunas alteraciones que presenta este mutante.

En el genoma de *C. albicans* existen también genes que codifican enzimas α -1,6-manosiltransferasas que, por homología con los de *S. cerevisiae*, se piensa que están presentes en el complejo de Golgi al igual que la enzima Mnn9p. Entre ellos están *OCH1*, *HOC1*, *ANP1*, *VAN1*, *MNN10* y *MNN11*. El mutante *Camnn9* Δ , cuya caracterización presentamos en este trabajo, fue construido en el laboratorio de Robbins (Southard *et al*, 1999) donde observaron que presentaba algunas diferencias fenotípicas respecto a la cepa parental. Por lo tanto, es evidente que la función realizada por *MNN9* no es suplida por ninguno de los otros genes que codifican α -1,6-manosiltransferasas. En este trabajo de Tesis presentamos evidencias de la implicación e importancia de *CaMNN9* en morfogénesis, glicosilación y virulencia.

La ORF del gen *CaMNN9* es de 1107 pb, no se encuentra interrumpida por intrones y codifica para una proteína de 368 aminoácidos. La proteína CaMnn9 presenta un elevado grado de identidad (64%) con la de *S. cerevisiae*. Hemos puesto de manifiesto que el origen del transcrito se sitúa a -214pb respecto del ATG inicial y el gen se transcribe hasta +113pb respecto del codón STOP.

Experimentos de RT-PCR nos han permitido comprobar que en la cepa silvestre la expresión de *CaMNN9* aumenta durante los tiempos 15 y 60 minutos de inducción de la transición levadura-hifa y vuelve a los 180 minutos a los niveles de expresión que presenta durante la fase exponencial del crecimiento en forma de levadura (Fig. 48). Estos experimentos ponen de manifiesto que este gen es regulado transcripcionalmente durante la inducción de la filamentación y sugieren por ello que su función puede ser importante en este proceso de diferenciación.

El análisis bioinformático reveló que las proteínas CaMnn9p y ScMnn9p pueden interactuar con las enzimas α -1,6-manosiltransferasas anteriormente citadas. Como se ha comentado en la introducción, se ha comprobado experimentalmente que ScMnn9p forma complejos con alguna de ellas (Jungmann & Munro, 1998b). También CaMnn9p podría interactuar con una α -1,2-manosiltransferasa (Kre2p o Mnt2p).

Los datos de expresión génica diferencial de *Camnn9 Δ* vs. la cepa parental muestran que ninguno de los genes que codifican para estas proteínas α -1,6-manosiltransferasas del complejo de Golgi presenta alterada su expresión durante el crecimiento levaduriforme. Durante el proceso de transición dimórfica, dos de estos genes, *OCH1* y *MNN10* presentan sobreexpresión sugiriendo que en estas condiciones de inducción de la filamentación el mutante podría compensar la ausencia de la α -1,6-manosiltransferasa Mnn9p con otra de función similar, por ejemplo, Mnn10p, que actúa en el mismo complejo que Mnn9p. Durante el crecimiento en forma de levadura, dos genes, *MNN22* y *BMT4*, que codifican una α -1,2-manosiltransferasa y una β -1,2-manosiltransferasa, respectivamente, se sobreexpresan en *mnn9 Δ* sugiriendo que las cadenas externas de las glicoproteínas sintetizadas por el mutante podrían contener más manosas unidas con este tipo de enlaces y menos α -1,6-manosas. En definitiva, es probable que *mnn9 Δ* module la estructura glicosídica de las glicoproteínas y, aunque las manosiltransferasas sean muy específicas y actúen de forma secuencial, sea capaz, en ausencia de Mnn9p, de seguir alargando la cadena externa con manosas (Fig. 78).

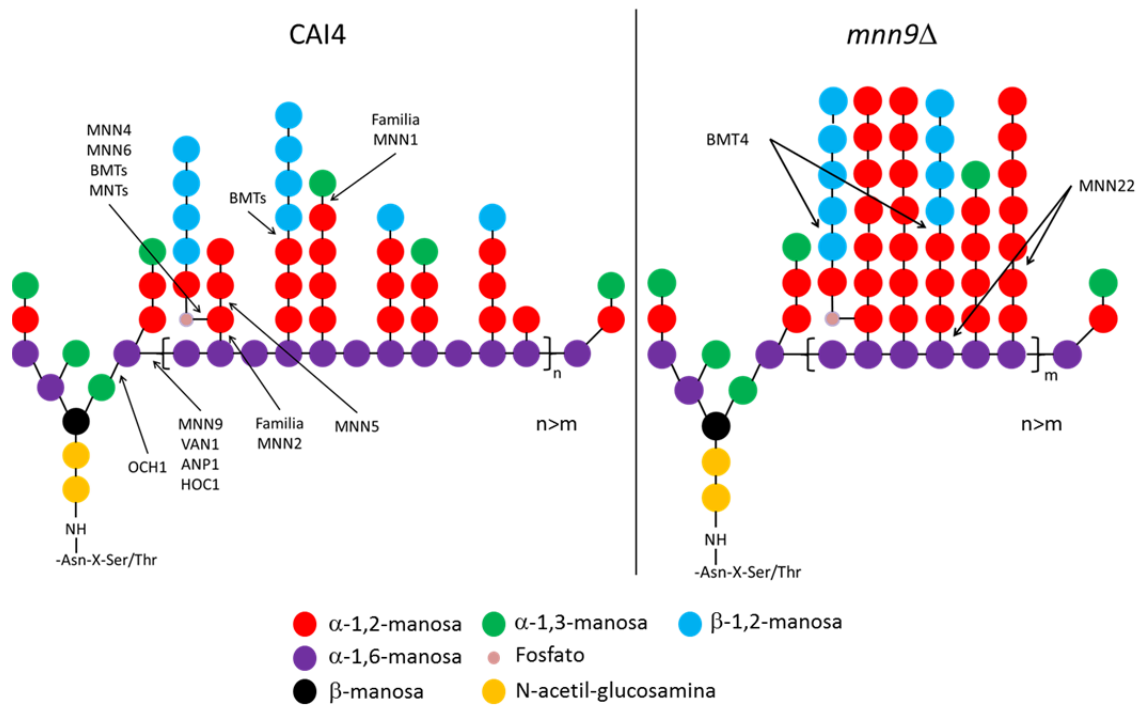


Fig 78.- Estructura glucídica hipotética de una glicoproteína sintetizada por el mutante *mnn9Δ* comparándola con la sintetizada por la cepa WT.

Los resultados de los experimentos realizados para conocer el estado de glicosilación de una proteína de referencia sintetizada por *mnn9Δ* (Hex1p fusionada al epítipo MYC con objeto de poder identificarla mediante experimentos de "Western-blotting") apoyan esta idea, ya que indican que las diferencias en el peso molecular de esta glicoproteína respecto a la sintetizada por la cepa parental, no es muy grande y que la proteína sintetizada por *mnn9Δ*, aunque defectuosa, contiene manosas que extienden el núcleo oligosacárido. La diferencia entre Hex1p glicosilado por la cepa parental y el mutante es de aproximadamente 12 manosas menos en cada una de las cadenas externas oligosacáridicas en el caso del mutante suponiendo que todos los sitios potenciales de glicosilación estén glicosilados (Fig. 45).

Durante la inducción de la transición, varía la expresión diferencial de un número mayor de genes que codifican manosiltransferasas que durante el crecimiento exponencial en forma de levadura (Fig. 75). Es posible que durante el cambio morfológico exista una regulación transcripcional de estos genes, como hemos demostrado que ocurre para el gen *MNN9* (Fig. 48), y los datos reflejen reajustes en el mutante.

Las observaciones al microscopio de fluorescencia de la proteína de fusión Mnn9p-GFP expresada en *C. albicans*, indican que se localiza fuera del núcleo, en estructuras que parecen corresponder con el complejo de Golgi (Fig. 20). La conclusión de que la proteína Mnn9p de *C. albicans* se localiza en el complejo de Golgi está avalada también por el hecho de que la proteína Mnn9p de *S. cerevisiae* se localiza en este orgánulo (Jungmann & Munro, 1998b).

Muchas características morfológicas que hemos observado en el mutante *Camnn9Δ* también se han observado en otros mutantes delecionados en genes implicados en glicosilación (Hall & Gow, 2013) (Tabla II), por ejemplo, las células levaduriformes del mutante *Caoch1Δ* también presentan un tamaño ligeramente mayor y otros como *Camnn2Δ* tienden a agregarse en medio líquido. La característica del mutante *mnn9Δ* de agregarse y flocular más rápidamente que la cepa parental (Fig. 21 y Fig. 23) puede deberse a un aumento en su superficie de proteínas que se han descrito que contribuyen a la capacidad de adhesión a otras células. De hecho, hemos observado que durante el crecimiento levaduriforme *mnn9Δ* presenta sobreexpresados a altos niveles, genes que codifican proteínas con estas características (Tabla XIV) como *PGA62*, homólogo al gen *FLO1* de *S. cerevisiae* (Goossens & Willaert, 2010), *AAF1* (Li & Palecek, 2005) y varios miembros de la familia ALS (*ALS2* y *ALS4* en todas las condiciones ensayadas y *ALS3* durante el crecimiento exponencial) (Groot *et al.*, 2013). Se ha demostrado que la sobreexpresión de algunos de estos genes de *C. albicans* en células de *S. cerevisiae* aumenta la adhesión entre ellas y a superficies abióticas (Nobbs *et al.*, 2010).

Se ha descrito que la regulación transcripcional de algunos de estos genes de adhesinas específicos de hifas como *ALS3* se encuentra bajo el control del factor de transcripción Bcr1p (Bastidas *et al.*, 2009). La sobreexpresión del gen *BCR1* en *mnn9Δ* durante el crecimiento como levadura podría contribuir al aumento en la expresión de algunos de estos genes.

Aunque las células de *Camnn9Δ* tienden a agregarse cuando se encuentran en medios líquidos, estas se separan fácilmente mediante tratamientos de sonicación suaves, indicando que no se debe a que presenten defectos en citocinesis, como se ha descrito que sucede en algunos mutantes de glicosilación, como el mutante *mnn9Δ* de *S. cerevisiae* (Schmidt *et al.*, 2005), sino a que las células presentan una fuerte capacidad de adherencia de unas a otras.

La cinética de crecimiento de *Camnn9Δ* en un medio rico líquido a 28°C es similar a la de la cepa parental (Fig. 25) sin embargo, es incapaz de crecer a 42°C (Fig. 26). El crecimiento a altas temperaturas se recupera añadiendo un estabilizador osmótico (glicerol) al medio. Otros mutantes de glicosilación como *och1Δ* presentan este fenotipo el cual pone en evidencia que las células presentan alteraciones en pared que en condiciones de estrés por temperatura se agravan haciéndolas más sensibles a la lisis osmótica.

Hemos puesto de manifiesto que *mnn9Δ* es más sensible a los colorantes Calcofluor White y Rojo Congo (Fig. 35). El Calcofluor White impide el ensamblaje de microfibrillas de polímeros de la pared, interfiriendo en la organización supramolecular de la pared celular (Murgui *et al.*, 1985) y mutantes con elevados niveles de quitina u otros defectos adicionales de la pared celular (Ram *et al.*, 1994) presentan hipersensibilidad a este compuesto. Hemos

detectado que este mutante sobreexpresa genes como *CHR11* que codifica una enzima que modifica la quitina sugiriendo que el mutante presenta modificaciones en este polímero, lo cual puede explicar la mayor sensibilidad a compuestos que interfieren con este componente. De hecho, otros investigadores han puesto de manifiesto que presenta elevados niveles de quitina (Kapteyn *et al*, 2000).

Los experimentos de afinidad a Alcian Blue indican que la superficie de las células de *mnn9Δ* es más hidrofóbica que la de la cepa parental (Fig 34). Esto podría deberse a que la cantidad de fosfomanano expuesto en la superficie celular sea menor. Hemos puesto en evidencia que la glicoproteína tomada como referencia, Hex1p, sintetizada por este mutante es de menor peso molecular que la nativa y es más hidrofóbica (Fig 45), por lo que nuestros resultados aportan nuevas evidencias de que el mutante *mnn9Δ* presenta defectos en las proteínas glicosiladas, lo cual contribuye a que la superficie de sus células sea más hidrofóbica. Southard y colaboradores han estimado que *mnn9Δ* presenta aproximadamente la mitad del contenido de manano que la cepa silvestre (Southard *et al.*, 1999).

Estos defectos en pared podrían dejar más expuesta la membrana plasmática. Los azoles (fluconazol e itraconazol) ejercen su efecto actuando en la ruta de biosíntesis del ergosterol. El mutante *mnn9Δ* es más sensible a itraconazol que la cepa parental, pero la sensibilidad frente a fluconazol no es tan clara (Fig. 36). La diferencia en la sensibilidad frente a ambos azoles podría deberse a diferencias en la accesibilidad de estos compuestos a sus dianas debido a diferencias en la permeabilidad de la pared y/o membrana del mutante respecto a la cepa parental.

Se comprobó que la introducción del gen *MNN9* en el mutante restaura los fenotipos mostrados por la cepa parental, indicando que las alteraciones de la cepa mutante se deben a la ausencia de este gen (Fig. 40).

Investigamos el estado de activación de rutas de señalización celular con objeto de conocer si el mutante responde a través de ellas al estrés que supone la presencia de los defectos observados en la formación de la pared. Encontramos que las MAPK de las rutas de integridad de la pared celular, y la de respuesta en *C. albicans* a estrés osmótico y oxidativo (Mkc1p y Hog1p, respectivamente) se encuentran en sus formas fosforiladas en mayor cantidad en el mutante *mnn9Δ* que en la cepa parental en condiciones de crecimiento en ausencia de estrés adicional (Fig. 46 y Fig. 47). La cantidad de ambas proteínas fosforiladas aumenta en presencia de un estrés adicional (como exposición a tunicamicina o a H₂O₂) en las células, indicando que *mnn9Δ* presenta aún capacidad de respuesta de ambas rutas. Estos resultados indican que el mutante presenta una activación basal constitutiva de ambas rutas como respuesta de adaptación de este mutante a los defectos de glicosilación.

Durante el crecimiento exponencial el mutante *mnn9Δ* presenta sobreexpresados genes de la familia *WSC* (*WSC1* y *WSC2*) que codifican proteínas de membrana que se han

descrito como sensoras de estrés en pared en levaduras (Jendretzki *et al*, 2011; Cruz *et al*, 2013). Estas proteínas podrían estar transmitiendo la señal de defectos en glicosilación a través de la GTPasa Rho1p a la ruta de integridad celular (CWI), al igual que sucede en *S. cerevisiae*. En coherencia con esta idea está el hecho de que en estas condiciones dos genes de esta ruta de integridad, *RHO1* y *BCK1* se encuentran sobreexpresados.

En el caso del mutante *mnn1Δ* hemos observado que también la ruta de integridad celular se encuentra activada a ciertos niveles y que también tiene capacidad de responder activando a mayores niveles la proteína Mck1p en presencia de un estrés adicional (Fig. 66), sin embargo, no hemos detectado una activación basal de la ruta HOG en este mutante. El mutante *mnn1Δ* no presenta variaciones en la expresión de los genes de la familia *WSC*, excepto *WSC4* que está sobreexpresado a los 15 minutos de inducción. Este gen *WSC4* también se encuentra sobreexpresado en condiciones de inducción de la filamentación en *mnn9Δ* por lo que parece que en estas condiciones este es el miembro de la familia *WSC* que pudiera responder a los defectos en glicosilación.

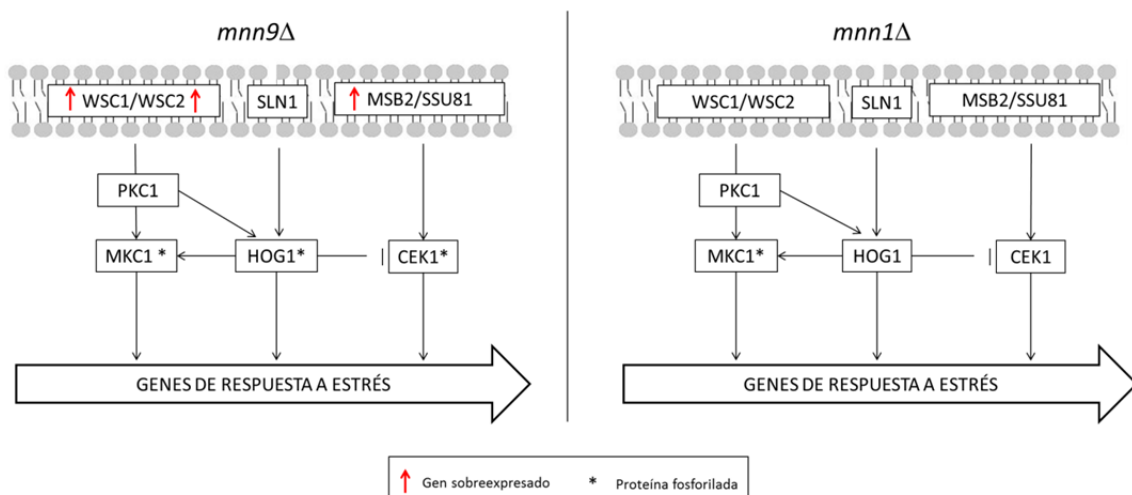


Fig 79.- Esquema simplificado de activación de genes de rutas MAPK de transmisión de señales durante el crecimiento levaduriforme en los mutantes *mnn9Δ* (izquierda) y *mnn1Δ* (derecha)

En algunos mutantes de N-glicosilación en los que se han realizado este tipo de ensayos se ha observado que la ruta de integridad celular se encuentra activada (por ejemplo en *och1Δ*, (Bates *et al*, 2006) y en mutantes carentes de las α -glucosidasas, (Mora-Montes *et al*, 2007)). En algunos de ellos también se ha observado activación de la MAPK Cek1p, como por ejemplo en *och1Δ*. También esta ruta de filamentación mediada por Cek1p se ha encontrado activada en ciertos mutantes alterados en O-glicosilación de *C. albicans* como *pmt1Δ* y *pmt4Δ* y se ha propuesto que la respuesta más específica de las células a defectos en O-glicosilaciones es la activación de esta ruta Cek (Cantero & Ernst, 2011). Además se ha observado que el bloqueo simultáneo de la N- y O-glicosilación activa fuertemente esta ruta (Ernst & Pla, 2011). Por otra parte, se ha descrito que las proteínas de membrana citoplasmática, Msb2p y Sho1p (Ssu81p), actúan como sensoras de defectos en glicosilación activando esta ruta Cek1p de filamentación (Román *et al*, 2009a) y que una de

las dianas de esta ruta es el gen *PMT1*, implicado en la O-glicosilación. Así, defectos en glicosilación detectados por Msb2p inducen la fosforilación de Cek1p y la desrepresión de *PMT1* (Cantero & Ernst, 2011).

Respecto a la activación por fosforilación de Cek1p, nuestros resultados muestran que esto sucede en *mnn9Δ* pero no en *mnn1Δ* (Fig. 46 y Fig. 66). Durante el crecimiento en fase de levadura en *mnn9Δ* se encuentran sobreexpresados los genes *MSB2* y *PMT1*, ambos con niveles de desregulación superiores a 2, respaldando el dato de que la fosforilación basal de Cek1p esté sucediendo en este mutante.

Nuestros resultados sugieren que la respuesta a leves defectos en N-glicosilación (provocada por la delección del gen *MNN1*) es la activación basal de la ruta de integridad de la pared y que mayores defectos en pared (debidos a la delección de *MNN9*) disparan además, la ruta HOG y la ruta de filamentación de Cek1p. Este hallazgo de que defectos en N-glicosilación en *C. albicans* pueden ser sobrellevados en el mutante *mnn9Δ* mediante una modulación de la actividad de la ruta HOG está en consonancia con lo que se sabe acerca de que en esta levadura, la ruta HOG no es sólo responsable de la acumulación de glicerol y de la supervivencia en medios con alta osmolaridad, sino que, además, participa en la arquitectura de la pared (Alonso-Monge *et al*, 1999).

Hemos demostrado que *mnn9Δ* presenta mayor capacidad de invadir una matriz de agar que la cepa parental cuando crece a 28°C sobre un medio sólido rico (Fig 59), condiciones que no inducen filamentación. Cuando *C. albicans* crece sobre una superficie sólida de agar en condiciones que promueven la formación de filamentos (37°C), en las células se activa la ruta de MAPK de integridad celular (Kumamoto, 2005); también se ha descrito que la ruta Cek juega un papel importante en el crecimiento invasivo (Csank *et al*, 1998). La activación constitutiva de estas rutas en *mnn9Δ* creciendo a 28°C podría facilitar el que desarrolle filamentos que penetren en el agar. Por otra parte, hemos detectado que sobreexpresa el gen *DFI1* que codifica para una glicoproteína que promueve el crecimiento invasivo (Tabla XIII), por lo que esto también podría contribuir a este fenotipo. *Camnn1Δ* no manifiesta esta capacidad invasiva a 28°C aunque presenta activada también de forma constitutiva la ruta de integridad celular (Fig. 66).

El análisis de los perfiles transcripcionales globales de los dos mutantes nos ha permitido descartar la posibilidad de que durante su construcción se hubieran producido alteraciones cromosomales (Fig. 69 y Fig.72) como la pérdida o ganancia de algún cromosoma (aneuploidias). Recientemente se está poniendo de manifiesto que esto sucede en cepas expuestas a condiciones de estrés o durante la construcción de algunos mutantes debido a la plasticidad genómica de *C. albicans* y su capacidad de adaptación y supervivencia (Arbour *et al*, 2009; Selmecki *et al*, 2010).

Durante el crecimiento en fase levaduriforme a 28°C el porcentaje de genes desregulados del conjunto del genoma con niveles de expresión diferencial, con respecto a la cepa parental, iguales o superiores a 1,5, es superior en el caso del mutante *mnn9Δ* en relación a *mnn1Δ*. Pero son mayores las diferencias entre los dos mutantes, en el porcentaje de genes desregulados durante el crecimiento en condiciones que inducen la transición levadura-hifa (Fig. 73). Estos resultados son coherentes teniendo en cuenta las diferencias fenotípicas que presenta *mnn9Δ* respecto a la cepa parental, al contrario de lo que sucede en *mnn1Δ*. Durante la exposición de los resultados de los experimentos de expresión global diferencial de genes, se puede apreciar que el análisis comparativo de las alteraciones en los transcriptomas de estos mutantes afianza las conclusiones y sugerencias que se derivan de los resultados obtenidos.

La mayoría de las proteínas de superficie están asociadas a glúcidos por enlaces O o N, formando glicoproteínas. Durante el crecimiento exponencial levaduriforme, un porcentaje significativo de los genes desregulados en *mnn9Δ* respecto a la cepa parental codifican para proteínas que se encuentran en la superficie de la célula (membrana citoplasmática y/o pared celular), no sucede lo mismo en el caso de *mnn1Δ*.

Algunos de estos genes de proteínas de pared se ha descrito que también se desregulan cuando las células son tratadas con caspofungina (Tabla X) y, en general, del mismo modo, muchos de ellos se desreprimen (Bruno *et al*, 2006), otros de ellos (Tabla X) se ha descrito que se desregulan también cuando las células crecen a elevadas temperaturas (Heilmann *et al*, 2013). Sin embargo, no todos los genes que se desregulan en respuesta a estas dos condiciones de estrés se desregulan también en *mnn9Δ* a 28°C. Estos resultados muestran que el mutante presenta alteraciones en la pared celular que suponen un estrés para la célula y sugieren que distintos tipos de estrés inducen una respuesta de remodelación de la pared algo diferente, aunque algunos de los genes que modulan sean comunes. Así, por ejemplo, *CRH11*, que codifica una proteína potencial transglicosilasa de quitina, se encuentra sobreexpresada en todas las condiciones en el mutante *mnn9Δ* y se sobreexpresa también en presencia de caspofungina y a altas temperaturas (Tabla X).

Entre las proteínas localizadas en la superficie celular cuyos genes se desregulan como consecuencia de la ausencia de Mnn9p (Tabla X) se encuentran proteínas implicadas en la biosíntesis, organización y mantenimiento de la integridad de la pared celular como la proteína Pga13p que contribuye a reforzar la pared (Gelis *et al*, 2012), Pir1p que confiere rigidez a la pared (Martínez *et al*, 2004), Ssr1p con función estructural (Garcerá *et al*, 2003, 2005) o Ecm33p de mantenimiento de la pared (Martínez-Lopez *et al*, 2004).

También se encuentran proteínas que modifican polímeros, como Crh11p y Utr2p (transglicosilasas de quitina) (Pardini *et al*, 2006) y enzimas relacionadas con la hidrólisis de glucanos como Xog1p (β -1,3-glucanasa). Relacionadas con la síntesis de glucano: Pga4p, una β -1, 3 glucanosiltransferasa homóloga de *GAS5* de *S. cerevisiae*; Gsc1p, homóloga a

Fks1p de *S. cerevisiae*, subunidad principal de la glucánsintasa y Rho1p, cuyos genes se sobreexpresan durante el crecimiento exponencial. En *S. cerevisiae*, la actividad de la β -1,3-glucán sintasa se encuentra bajo el control de Rho1p la cual interactúa no sólo con esta enzima sino también con la proteína quinasa C de la ruta de integridad celular activándola (Pontón, 2008). Nuestros resultados apuntan a que en *mnn9* Δ creciendo como levadura tiene lugar un aumento de la proteína y actividad de Rho1p en respuesta a defectos en glicosilación que puede ser la causa del aumento en la transcripción de *GSC1* y de la activación de la ruta de integridad celular.

Es de resaltar que, aunque algunos de los genes relacionados con la síntesis de quitina se encuentran sobreexpresados en *mnn9* Δ (Tabla XI) durante la inducción de la filamentación (como *CSH8*, que codifica para una quitínsintasa), ninguno de ellos muestra variación detectable ($>$ de 1,5 en *mnn9* Δ vs. CAI4) en la expresión durante el crecimiento exponencial como levadura, lo cual sería de esperar teniendo en cuenta que se ha demostrado que *mnn9* Δ presenta niveles de quitina de 2 a 3 veces superiores a los de la cepa parental (Kapteyn *et al*, 2000).

Los resultados muestran que en las condiciones de inducción de filamentación de nuestros ensayos, *mnn9* Δ responde en algunos casos sobreexpresando a mayores niveles ciertos genes (Tabla XI) como aquellos implicados en la remodelación de la pared (como *CHS8* y *CHS7*, *PNG2*, *PGA13*, o *CRH11*) o en otros casos, como ocurre con genes específicos de hifa (por ejemplo, *ALS3*, *HWP1*, *ECE1*) es incapaz de activar su transcripción a los niveles que lo hace la cepa parental, encontrándose subexpresados en el mutante (Tabla XV).

Muy pocos de todos estos genes de superficie celular se encuentran desregulados en *mnn1* Δ y si lo están, los niveles de variación son mucho menores; es el caso de *PGA13* y *ALS3* durante el crecimiento exponencial (Tabla X y Tabla XI). Estos resultados, junto con el hecho de que no es más sensible que la cepa parental a los agentes que alteran la integridad celular (Fig. 63) indican que el mutante *mnn1* Δ no presenta alteraciones estructurales importantes en la pared. Aun así, nuestros experimentos indican que presenta activada a un nivel basal la quinasa de la ruta de integridad celular, Mkc1p (Fig. 66) lo cual es coherente con la idea de que la célula responde en primer lugar mediante modificaciones postraduccionales que son respuestas modulables a corto plazo y cuando requiere que la respuesta sea permanente tienen lugar reajustes transcripcionales importantes.

En condiciones de inducción de la transición morfológica, los datos de expresión diferencial global de genes del mutante *mnn9* Δ muestran que existen defectos en la regulación de la transcripción de los genes de las rutas que transmiten las señales de inducción de la filamentación, subexpresándose muchos de ellos principalmente a los 15 min de la inducción, indicando que los defectos en glicosilación en este mutante con alteraciones importantes en la pared apagan estas rutas a nivel transcripcional, lo cual explica que los genes específicos de hifas (incluidos los que codifican proteínas de pared), el factor de

transcripción Ume6p y la ciclina Hgc1p, se encuentren subexpresados en *mnn9Δ* respecto a la cepa parental (Tabla XV).

En *mnn1Δ*, la mayor parte de estos genes implicados en la diferenciación morfológica no presentan variaciones de expresión respecto a la cepa parental (ver Material Suplementario S.V), como es el caso de *UME6*, un factor transcripcional clave de filamentación (Banerjee *et al*, 2013), de los genes de la ruta de filamentación (*CDC42*, *HST7*, *CEK1*, *CPH1*), de la ruta PKA dependiente de AMPc (*RAS1*, *CYR1*, *TPK1*, *FLO8*) o de la ruta inducida por pH (*RIM8*, *RIM20*, *RIM101*). Algunos incluso, en vez de subexpresarse se encuentran sobreexpresados, como por ejemplo *HGC1* y genes específicos de hifa como *ECE1*, *ALS3* y *HWP1*.

En consonancia con estos resultados, los represores de la filamentación *HSP90* y *NRG1* se encuentran sobreexpresados en *mnn9Δ* mientras que en *mnn1Δ* se encuentran incluso subexpresados en algún tiempo de la diferenciación (Ver Material Suplementario S.V).

En conjunto, estos datos explican el hecho de que *mnn9Δ* sea incapaz de inducir la diferenciación a verdadera hifa mientras que el mutante *mnn1Δ* si lo sea y sugieren que para que suceda en este último es necesario que algunos genes implicados en el proceso, como *HGC1*, la ciclina específica de hifa, se transcriban a mayores niveles.

Otros resultados interesantes de estos experimentos son la sobreexpresión de varias ciclinas en el mutante *mnn9Δ* (Tabla XVI). Probablemente el aumento en la expresión de ciclinas en la fase exponencial de crecimiento refleje la necesidad de estimular el avance a través del ciclo celular y le permita así paliar los defectos que pudieran ralentizarlo y sea la explicación de que, aun presentando defectos, este mutante tenga un tiempo de generación similar a la cepa parental (Fig. 25). Así mismo, durante el crecimiento en forma de pseudohifa también puede requerir, por el mismo motivo, un aumento en la actividad de las ciclinas. La subexpresión de la ciclina específica de hifa *HGC1* en los primeros momentos de la inducción está en sintonía con la incapacidad de *mnn9Δ* para llevar a cabo la diferenciación a hifa verdadera.

Respecto a los resultados de expresión diferencial de genes relacionados con el metabolismo energético (Fig. 77), hemos observado que en el mutante *Camnn9Δ*, durante la inducción de la transición morfológica principalmente, se sobreexpresan genes implicados en glicolisis y fermentación. Puesto que parece haber una mayor actividad del flujo glicolítico durante el crecimiento como hifa (Han *et al*, 2011), nuestros resultados indican que *mnn9Δ* responde a los estímulos de inducción de la filamentación manteniendo estas rutas de glicolisis y fermentación aún más activas. En estas condiciones de crecimiento, es de destacar que subexpresa varios genes del ciclo de Krebs, del metabolismo oxidativo y

mantiene activo el ciclo del glioxilato (necesario éste para suplir de intermediarios a la célula, sobre todo cuando aquel se apaga).

Camnn1Δ presenta durante la fase de crecimiento como levadura, una activación transcripcional de los genes de todas estas rutas catabólicas, sugiriendo que, en estas condiciones, puede necesitar más energía para crecer al mismo ritmo que la cepa parental.

Los genes implicados en el metabolismo de los polímeros de reserva glucógeno y trehalosa se encuentran sobreexpresados en *Camnn9Δ* en todas las condiciones y durante el crecimiento en forma de levadura en *Camnn1Δ*. La activación del metabolismo de polímeros de reserva es un reflejo de una situación de estrés.

Uno de los hallazgos interesantes de este trabajo desde el punto de vista de su posible aplicación práctica es el haber demostrado que la cepa mutante *mnn9Δ* es menos virulenta que la cepa parental; la cepa *mnn1Δ* se comporta de forma similar a la cepa silvestre (Fig. 42). Puesto que no se han encontrado ortólogos en humanos, la proteína CaMnn9p podría ser una buena diana para el diseño de drogas contra este patógeno. Este fenotipo es común a otros mutantes con defectos en glicosilación (Bates *et al*, 2006; Hall & Gow, 2013) (Tabla II).

La atenuación de la virulencia que presenta *mnn9Δ* puede deberse a muchas causas. Una de ellas puede ser la incapacidad del mutante de formar hifas verdaderas, que conlleva además, la subexpresión de genes específicos de hifa que se sabe que juegan papeles importantes en la formación de biopelículas como *HWP1* (Tabla. XV). Su ausencia podría explicar el que el mutante no forme una biopelícula consistente como hemos puesto de manifiesto que sucede (Fig. 33), contribuyendo esta característica a la atenuación de su capacidad de virulencia.

Otra de las causas puede ser el aumento de determinantes antigénicos expuestos en la superficie de las células de *mnn9Δ* respecto a las de la parental. Nuestros resultados indican que en *mnn9Δ* se sobreexpresan varios genes cuyos productos se han descrito como antigénicos y que se localizan en la superficie de la célula, entre ellos *ENO1*, *CRH11*, *HSP70*, *DDR48*, *RBT4* y *XOG1*. La mayor abundancia de estas proteínas podría llevar, durante la infección, a desencadenar una respuesta inmunológica más fuerte por parte del huésped. También es posible, como se ha especulado que puede suceder en mutantes como *och1Δ* o en mutantes en genes de la familia *mnn2Δ* (Hall *et al*, 2013) que presentan bajo contenido en mananos en sus paredes, que el aumento de los determinantes antigénicos se deba a una mayor exposición de polímeros como quitina o glucanos en la superficie celular.

En apoyo de la hipótesis de que el aumento de determinantes antigénicos puede ser la causa de la atenuación de la virulencia de *mnn9Δ*, está la evidencia experimental de que este mutante induce, durante la infección de células epiteliales orales, una mayor producción

de citocinas por parte de estas células del huésped, que la cepa silvestre (Murciano *et al*, 2011).

Entre los genes que se sobreexpresan en el mutante *mnn9Δ* en todas o en tres de las cuatro condiciones de crecimiento analizadas y con niveles de desregulación elevados, se encuentran genes que codifican proteínas de secreción (contienen un péptido señal según los análisis bioinformáticos) como las adhesinas codificadas por *ALS2*, *ALS4* y *PGA62*, los cuales presentan sitios potenciales de N-glicosilación, o proteínas implicadas en la remodelación de la pared celular como los genes *CRH11* o *PGA13*, y también genes de función desconocida como *DAG7* o las ORFs *orf19.2959.1* y *orf19.6920*. Es probable que estos genes sean dianas de rutas de señalización que permitan a *mnn9Δ* llevar a cabo mecanismos que compensen los defectos de su pared celular y mecanismos de protección, por ejemplo, el mantenerse adheridas las células unas a otras puede protegerlas frente a agresiones externas.

Uno de los genes sobreexpresados, *CRZ2*, codifica un posible factor de transcripción con dedos de zinc que presenta las características de contener un posible péptido señal y 5 posibles sitios de N-glicosilación. Nuestra hipótesis es que podría tratarse de un sensor de defectos en N-glicosilación. Defectos de glicosilación de esta proteína podrían provocar su liberación de la membrana plasmática y/o favorecer su procesamiento lo que le permitiría actuar como factor de transcripción y activar genes diana como los anteriormente mencionados (*ALS2*, *ALS4*, *PGA62*, *CRH11*, etc.) e incluso autorregular la transcripción de su propio gen.

Otro de los genes sobreexpresados en todas las condiciones analizadas es el factor de transcripción *NRG1*. En la cepa silvestre la transcripción de este gen se apaga durante la transición levadura-hifa, por lo que se postula que la presencia de este represor durante el crecimiento como levadura impide la diferenciación en ausencia de estímulos adecuados. Nuestra hipótesis es que la sobreexpresión de *NRG1* en *mnn9Δ* creciendo como levadura puede ser una señal del estado de estrés que presenta este mutante y la abundancia de este represor asegura que en presencia de estímulos se impida la transición levadura-hifa.

En la Fig. 80 se presenta un esquema de la hipótesis que proponemos acerca de lo que puede estar sucediendo en la cepa parental y en el mutante en condiciones de crecimiento como levadura y de inducción de la filamentación, teniendo en cuenta algunos de los resultados obtenidos de la expresión diferencial de genes. En los paneles se representa, en la membrana plasmática, el hipotético sensor de defectos en glicosilación que podría ser Crz2p, el cual en el mutante *mnn9Δ* se encontraría en mayor abundancia y activado de forma que permitiría la desrepresión de genes diana de respuesta a defectos en glicosilación, entre los que cabe destacar *ALS2*, *ALS4*, *CRH11*, *PGA13* y *PNG2*. El gen *NRG1* podría activarse también en respuesta a este factor de transcripción, así como el propio gen, *CRZ2*. Esto explicaría que todos estos genes se encuentren sobreexpresados en *mnn9Δ* en todas las condiciones. La parte superior de cada panel representa lo que se sabe acerca del efecto

represor de *NRG1* sobre los genes que se expresan únicamente en hifa (específicos de hifa, HSG) y del factor de transcripción Brg1p, un fuerte activador de la filamentación que contribuye a que en condiciones de inducción disminuya el transcrito de *NRG1* (Kadosh, 2013). Durante el crecimiento como levadura estos genes HSG no se expresan en ninguna de las cepas debido a la presencia del represor Nrg1p y a la ausencia de Brg1p. Durante la inducción, al contrario de lo que sucede en la cepa silvestre, los genes HSG tampoco se expresan en *mnn9Δ* debido a la presencia de Nrg1p y además en éste, *BRG1* tampoco se expresa. Niveles basales de activación de Hog1p podrían ser la causa de la represión de *BRG1*, según han postulado Su y colaboradores (Su *et al*, 2013). Hemos detectado niveles basales de fosforilación de Hog1p en *mnn9Δ* durante el crecimiento como levadura; podría suceder también durante el crecimiento en condiciones de inducción de la filamentación (no incluido en el esquema de la figura).

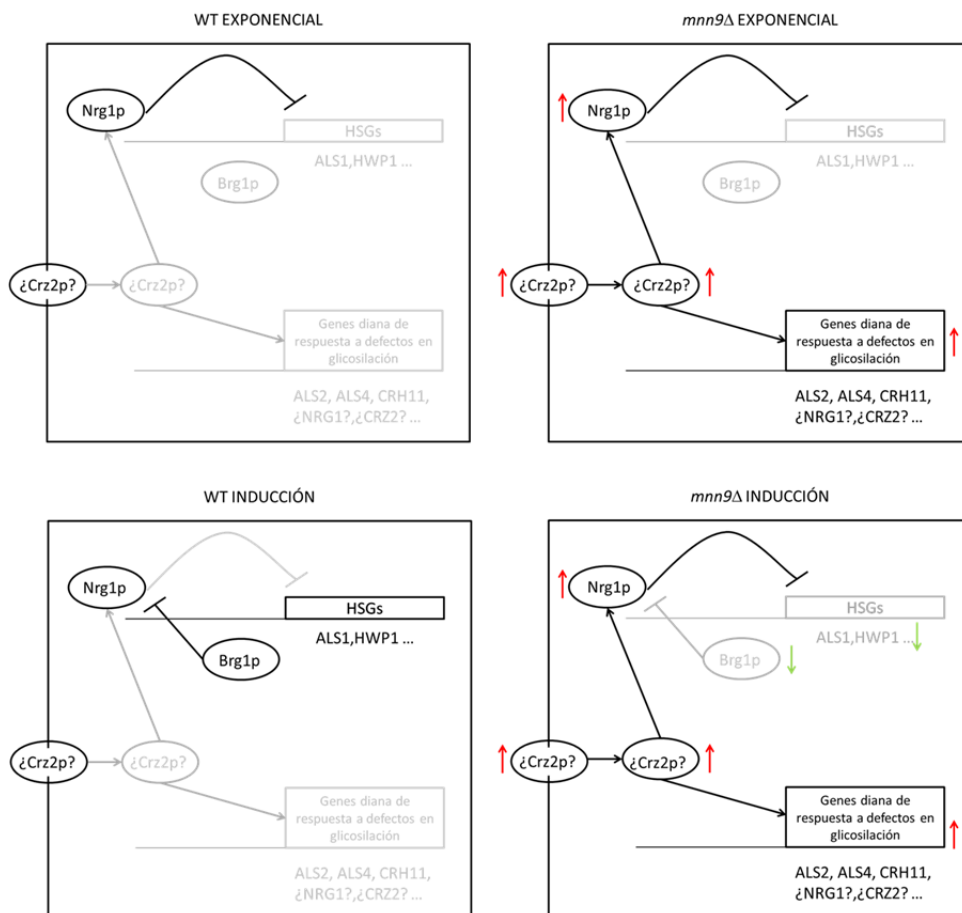


Fig 80.- Hipótesis de actuación de *Crz2p*, un posible sensor de defectos en glicosilación, en las cepas silvestre (izquierda) y *mnn9Δ* (derecho) en condiciones de crecimiento levaduriforme (superior) y durante la inducción de la filamentación (inferior).

Durante el crecimiento levaduriforme, en *mnn1Δ* se encuentra sobreexpresado con valores de 1,6 el gen *CRZ2* (en *mnn9Δ* los valores son de 6) y algunos de los genes diana propuestos como de respuesta a defectos en glicosilación como *PGA13* y *PNG2*. Sin embargo, no se encuentra sobreexpresado en ninguna condición el gen *NRG1*. En *mnn1Δ* es probable

que los defectos en glicosilación provoquen únicamente una leve activación del sensor, insuficiente para impedir el bloqueo de la transición levadura-hifa.

CONCLUSIONES

Las siguientes conclusiones han sido elaboradas teniendo en cuenta los resultados obtenidos en los ensayos fenotípicos y transcripcionales en los mutante *Camnn9Δ* y *Camnn1Δ*:

1.- Mediante microscopía hemos observado la proteína de fusión CaMnn9p-GFP en zonas discretas del citoplasma excluidas del núcleo y vacuolas. Este resultado y el hecho de que la proteína homóloga de *S. cerevisiae* se encuentre en el complejo de Golgi nos permiten concluir que la proteína CaMnn9p se localiza también en este orgánulo.

2.- La transcripción del gen *MNN9* se encuentra regulada durante el proceso de la transición levadura-hifa. Aumenta durante los primeros momentos de inducción de la filamentación (15 y 60 minutos), disminuyendo después a los niveles presentados durante el crecimiento levaduriforme.

3.- *Camnn9Δ* está afectado parcialmente en los procesos de glicosilación de proteínas. La glicoproteína Hex1p sintetizada por este mutante es de menor tamaño que la sintetizada por la cepa parental aunque contiene manosas en las cadenas externas oligosacáridicas, probablemente debido al aumento de la transcripción de genes de α -1,2 y β -1,2-manosiltransferasas. También es más hidrofóbica, al igual que lo es la superficie de las células de *Camnn9Δ*.

4.- El transcriptoma de *Camnn9Δ* refleja una situación de estrés en pared. Una de las categorías sobrerrepresentadas en los análisis es la de biogénesis y organización de la pared celular. Los fenotipos de mayor sensibilidad de este mutante a agentes que perturban la integridad de la superficie celular también indican que presenta alteraciones en ella.

5.- *Camnn9Δ* responde a defectos en la N-glicosilación de proteínas activando a niveles basales las MAPK de las rutas de integridad celular, la ruta de filamentación mediada por Cek1p y la ruta HOG. *Camnn1Δ* únicamente presenta activada la primera de ellas. Ambos tienen capacidad de respuesta frente a estímulos. La activación transcripcional en *Camnn9Δ* de genes que codifican glicoproteínas sensoras como las Wscp y Msb2p puede ser la causa de la activación de las dos primeras rutas durante el crecimiento levaduriforme.

6.- El perfil transcripcional de *Camnn9Δ* está en sintonía con características fenotípicas como la tendencia de las células a agregarse y la incapacidad de diferenciarse en hifas verdaderas. *Camnn9Δ* sobreexpresa genes que codifican adhesinas y en condiciones de inducción de la transición levadura-hifa presenta subexpresados genes de las rutas de filamentación, como *RAS1*, *CPH1* y *UME6* y muchos genes específicos de hifa, como *HGC1* y *HWP1*. Además, sobreexpresa represores de la filamentación como *NRG1* y *HSP90*. En relación a estos fenotipos, no hemos detectado diferencias en *Camnn1Δ* respecto a la cepa parental, estando su transcriptoma en consonancia con ello.

7.- Durante el crecimiento como levadura, en *Camnn1Δ* y en *Camnn9Δ* se encuentran sobreexpresados genes implicados en el metabolismo de polímeros de reserva (como *TPS1* y *GSY1*) lo cual refleja una respuesta a una situación de estrés.

8.- *Camnn9Δ* forma biopelículas frágiles y presenta una capacidad de virulencia atenuada en un modelo murino de infección sistémica. La sobreexpresión de genes en este mutante que codifican antígenos de superficie podría contribuir a aumentar las defensas del hospedador y por lo tanto a su mayor vulnerabilidad. El mutante *Camnn1Δ* presenta una capacidad de virulencia similar a la cepa parental.

BIBLIOGRAFÍA

- Albrecht A, Felk A, Pichova I, Naglik JR, Schaller M, de Groot P, Maccallum D, Odds FC, Schäfer W, Klis F, Monod M & Hube B (2006) Glycosylphosphatidylinositol-anchored proteases of *Candida albicans* target proteins necessary for both cellular processes and host-pathogen interactions. *J. Biol. Chem.* **281**: 688–94
- Alonso-Monge R, Navarro-García F, Molero G, Diez-Orejas R, Gustin M, Pla J, Sánchez M & Nombela C (1999) Role of the mitogen-activated protein kinase Hog1p in morphogenesis and virulence of *Candida albicans*. *J. Bacteriol.* **181**: 3058–68
- Alonso-Monge R, Navarro-García F, Román E, Negrodo AI, Eisman B, Nombela C & Pla J (2003) The Hog1 mitogen-activated protein kinase is essential in the oxidative stress response and chlamydospore formation in *Candida albicans*. *Eukaryot. Cell* **2**: 351–61
- Andaluz E, Ciudad T, Gómez-Raja J, Calderone R & Larriba G (2006) Rad52 depletion in *Candida albicans* triggers both the DNA-damage checkpoint and filamentation accompanied by but independent of expression of hypha-specific genes. *Mol. Microbiol.* **59**: 1452–72
- Apweiler R, Hermjakob H & Sharon N (1999) On the frequency of protein glycosylation, as deduced from analysis of the SWISS-PROT database. *Biochim. Biophys. Acta* **1473**: 4–8
- Arana DM, Nombela C, Alonso-Monge R & Pla J (2005) The Pbs2 MAP kinase kinase is essential for the oxidative-stress response in the fungal pathogen *Candida albicans*. *Microbiology* **151**: 1033–49
- Arbour M, Epp E, Hogues H, Sellam A, Lacroix C, Rauceo J, Mitchell A, Whiteway M & Nantel A (2009) Widespread occurrence of chromosomal aneuploidy following the routine production of *Candida albicans* mutants. *FEMS Yeast Res.* **9**: 1070–7
- Bahn Y-S, Molenda M, Staab JF, Lyman CA, Gordon LJ & Sundstrom P (2007) Genome-wide transcriptional profiling of the cyclic AMP-dependent signaling pathway during morphogenic transitions of *Candida albicans*. *Eukaryot. Cell* **6**: 2376–90
- Bahn Y-S, Staab J & Sundstrom P (2003) Increased high-affinity phosphodiesterase PDE2 gene expression in germ tubes counteracts CAP1-dependent synthesis of cyclic AMP, limits hypha production and promotes virulence of *Candida albicans*. *Mol. Microbiol.* **50**: 391–409
- Bahn YS & Sundstrom P (2001) CAP1, an adenylate cyclase-associated protein gene, regulates bud-hypha transitions, filamentous growth, and cyclic AMP levels and is required for virulence of *Candida albicans*. *J. Bacteriol.* **183**: 3211–23
- Bai C, Xu X-L, Chan F-Y, Lee RTH & Wang Y (2006) MNN5 encodes an iron-regulated alpha-1,2-mannosyltransferase important for protein glycosylation, cell wall integrity, morphogenesis, and virulence in *Candida albicans*. *Eukaryot. Cell* **5**: 238–47
- Balashov S V, Park S & Perlin DS (2006) Assessing resistance to the echinocandin antifungal drug caspofungin in *Candida albicans* by profiling mutations in FKS1. *Antimicrob. Agents Chemother.* **50**: 2058–63
- Banerjee M, Uppuluri P, Zhao XR, Carlisle PL, Vipulanandan G, Villar CC, López-Ribot JL & Kadosh D (2013) Expression of UME6, a key regulator of *Candida albicans* hyphal development, enhances biofilm formation via Hgc1- and Sun41-dependent mechanisms. *Eukaryot. Cell* **12**: 224–32
- Bastidas RJ, Heitman J & Cardenas ME (2009) The protein kinase Tor1 regulates adhesin gene expression in *Candida albicans*. *PLoS Pathog.* **5**: e1000294

- Bates S, Hall RA, Cheetham J, Netea MG, MacCallum DM, Brown AJ, Odds FC & Gow NA (2013) Role of the *Candida albicans* MNN1 gene family in cell wall structure and virulence. *BMC Res. Notes* **6**: 294
- Bates S, Hughes HB, Munro C a, Thomas WPH, MacCallum DM, Bertram G, Atrih A, Ferguson M a J, Brown AJP, Odds FC & Gow N a R (2006) Outer chain N-glycans are required for cell wall integrity and virulence of *Candida albicans*. *J. Biol. Chem.* **281**: 90–8
- Bates S, MacCallum DM, Bertram G, Munro CA, Hughes HB, Buurman ET, Brown AJP, Odds FC & Gow NAR (2005) *Candida albicans* Pmr1p, a secretory pathway P-type Ca²⁺/Mn²⁺-ATPase, is required for glycosylation and virulence. *J. Biol. Chem.* **280**: 23408–15
- Berman J & Sudbery PE (2002) *Candida Albicans*: a molecular revolution built on lessons from budding yeast. *Nat. Rev. Genet.* **3**: 918–30
- Bermejo C, García R, Straede A, Rodríguez-Peña JM, Nombela C, Heinisch JJ & Arroyo J (2010) Characterization of sensor-specific stress response by transcriptional profiling of *wsc1* and *mid2* deletion strains and chimeric sensors in *Saccharomyces cerevisiae*. *OMICs* **14**: 679–88
- Bockmühl DP, Krishnamurthy S, Gerads M, Sonneborn A & Ernst JF (2001) Distinct and redundant roles of the two protein kinase A isoforms Tpk1p and Tpk2p in morphogenesis and growth of *Candida albicans*. *Mol. Microbiol.* **42**: 1243–57
- Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**: 248–54
- Brand A, MacCallum DM, Brown AJP, Gow NAR & Odds FC (2004) Ectopic expression of URA3 can influence the virulence phenotypes and proteome of *Candida albicans* but can be overcome by targeted reintegration of URA3 at the RPS10 locus. *Eukaryot. Cell* **3**: 900–9
- Brandt ME (2002) *Candida* and Candidiasis. *Emerg. Infect. Dis.* **8**: 876a–876
- Braun BR & Johnson AD (1997) Control of filament formation in *Candida albicans* by the transcriptional repressor TUP1. *Science* **277**: 105–9
- Brown AJ & Gow NA (1999) Regulatory networks controlling *Candida albicans* morphogenesis. *Trends Microbiol.* **7**: 333–8
- Brown DH, Giusani a D, Chen X & Kumamoto C a (1999) Filamentous growth of *Candida albicans* in response to physical environmental cues and its regulation by the unique CZF1 gene. *Mol. Microbiol.* **34**: 651–62
- Bruno VM, Kalachikov S, Subaran R, Nobile CJ, Kyrtatsous C & Mitchell AP (2006) Control of the *C. albicans* cell wall damage response by transcriptional regulator Cas5. *PLoS Pathog.* **2**: e21
- Burda P & Aebi M (1999) The dolichol pathway of N-linked glycosylation. *Biochim. Biophys. Acta* **1426**: 239–57
- Butler G, Rasmussen MD, Lin MF, Santos MAS, Sakthikumar S, Munro CA, Rheinbay E, Grabherr M, Forche A, Reedy JL, Agrafioti I, Arnaud MB, Bates S, Brown AJP, Brunke S, Costanzo MC, Fitzpatrick DA, de Groot PWJ, Harris D, Hoyer LL, et al (2009) Evolution of pathogenicity and sexual reproduction in eight *Candida* genomes. *Nature* **459**: 657–62
- Cannon RD, Niimi K, Jenkinson HF & Shepherd MG (1994) Molecular cloning and expression of the *Candida albicans* beta-N-acetylglucosaminidase (HEX1) gene. *J. Bacteriol.* **176**: 2640–7

- Cantero PD & Ernst JF (2011) Damage to the glycoshield activates PMT-directed O-mannosylation via the Msb2-Cek1 pathway in *Candida albicans*. *Mol. Microbiol.*: 1–11
- Cantero PD, Lengsfeld C, Prill SK-H, Subanović M, Román E, Pla J & Ernst JF (2007) Transcriptional and physiological adaptation to defective protein-O-mannosylation in *Candida albicans*. *Mol. Microbiol.* **64**: 1115–28
- Cao F, Lane S, Raniga PP, Lu Y, Zhou Z, Ramon K, Chen J & Liu H (2006) The Flo8 transcription factor is essential for hyphal development and virulence in *Candida albicans*. *Mol. Biol. Cell* **17**: 295–307
- Cappelletty D & Eiselstein-McKittrick K (2007) The echinocandins. *Pharmacotherapy* **27**: 369–88
- Carlisle PL & Kadosh D (2013) A genome-wide transcriptional analysis of morphology determination in *Candida albicans*. *Mol. Biol. Cell* **24**: 246–60
- Cassola A, Parrot M, Silberstein S, Magee BB, Passeron S, Giasson L & Cantore ML (2004) *Candida albicans* lacking the gene encoding the regulatory subunit of protein kinase A displays a defect in hyphal formation and an altered localization of the catalytic subunit. *Eukaryot. Cell* **3**: 190–9
- Castillo L, Calvo E, Martínez AI, Ruiz-Herrera J, Valentín E, Lopez JA & Sentandreu R (2008) A study of the *Candida albicans* cell wall proteome. *Proteomics* **8**: 3871–81
- Castillo L, Martínez AI, Garcerá A, García-Martínez J, Ruiz-Herrera J, Valentín E & Sentandreu R (2006) Genomic response programs of *Candida albicans* following protoplasting and regeneration. *Fungal Genet. Biol.* **43**: 124–34
- Ten Cate JM, Klis FM, Pereira-Cenci T, Crielaard W & de Groot PWJ (2009) Molecular and cellular mechanisms that lead to *Candida* biofilm formation. *J. Dent. Res.* **88**: 105–15
- Chaffin WL (2008) *Candida albicans* cell wall proteins. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **72**: 495–544
- Chen SC-A, Slavin MA & Sorrell TC (2011) Echinocandin antifungal drugs in fungal infections: a comparison. *Drugs* **71**: 11–41
- Chibana H, Uno J, Cho T & Mikami Y (2005) Mutation in IRO1 tightly linked with URA3 gene reduces virulence of *Candida albicans*. *Microbiol. Immunol.* **49**: 937–9
- Chio (2004) Morphogenesis in *C. albicans* in Pathogenic fungi Structural Biology and taxonomy San-Blas G & Calderone R (eds) Caister Academic Press
- Cigan AM & Donahue TF (1987) Sequence and structural features associated with translational initiator regions in yeast--a review. *Gene* **59**: 1–18
- Cleary IA, Macgregor NB, Saville SP & Thomas DP (2012) Investigating the Function of Ddr48p in *Candida albicans*. **11**: 718–724
- Clemente-Blanco A, González-Novo A, Machín F, Caballero-Lima D, Aragón L, Sánchez M, de Aldana CRV, Jiménez J & Correa-Bordes J (2006) The Cdc14p phosphatase affects late cell-cycle events and morphogenesis in *Candida albicans*. *J. Cell Sci.* **119**: 1130–43
- Crampin H, Finley K, Gerami-Nejad M, Court H, Gale C, Berman J & Sudbery P (2005) *Candida albicans* hyphae have a Spitzenkörper that is distinct from the polarisome found in yeast and pseudohyphae. *J. Cell Sci.* **118**: 2935–47
- Cruz S, Muñoz S, Manjón E, García P & Sanchez Y (2013) The fission yeast cell wall stress sensor-like proteins Mtl2 and Wsc1 act by turning on the GTPase Rho1p but act independently of the cell wall integrity pathway. *Microbiologyopen* **2**: 778–94

- Csank C, Schröppel K, Leberer E, Harcus D, Mohamed O, Meloche S, Thomas DY & Whiteway M (1998) Roles of the *Candida albicans* mitogen-activated protein kinase homolog, Cek1p, in hyphal development and systemic candidiasis. *Infect. Immun.* **66**: 2713–21
- d'Enfert C, Goyard S, Rodriguez-Arnaveille S, Frangeul L, Jones L, Tekaiia F, Bader O, Albrecht A, Castillo L, Dominguez A, Ernst JF, Fradin C, Gaillardin C, Garcia-Sanchez S, de Groot P, Hube B, Klis FM, Krishnamurthy S, Kunze D, Lopez M-C, et al (2005) CandidaDB: a genome database for *Candida albicans* pathogenomics. *Nucleic Acids Res.* **33**: D353–7
- Dalle F, Jouault T, Trinel PA, Esnault J, Mallet JM, d'Athis P, Poulain D & Bonnin A (2003) Beta-1,2- and alpha-1,2-linked oligomannosides mediate adherence of *Candida albicans* blastospores to human enterocytes in vitro. *Infect. Immun.* **71**: 7061–8
- Davis D (2003) Adaptation to environmental pH in *Candida albicans* and its relation to pathogenesis. *Curr. Genet.* **44**: 1–7
- Dean N (1999) Asparagine-linked glycosylation in the yeast Golgi. *Biochim. Biophys. Acta* **1426**: 309–22
- Delic M, Valli M, Graf AB, Pfeffer M, Mattanovich D & Gasser B (2013) The secretory pathway: exploring yeast diversity. *FEMS Microbiol. Rev.* **37**: 872–914
- Díaz-Jiménez DF, Mora-Montes HM, Hernández-Cervantes A, Luna-Arias JP, Gow NAR & Flores-Carreón A (2012) Biochemical characterization of recombinant *Candida albicans* mannosyltransferases Mnt1, Mnt2 and Mnt5 reveals new functions in O- and N-mannan biosynthesis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **419**: 77–82
- Doedt T, Krishnamurthy S, Bockmühl DP, Tebarth B, Stempel C, Russell CL, Brown AJP & Ernst JF (2004) APSES proteins regulate morphogenesis and metabolism in *Candida albicans*. *Mol. Biol. Cell* **15**: 3167–80
- Dünkler A, Walther A, Specht CA & Wendland J (2005) *Candida albicans* CHT3 encodes the functional homolog of the Cts1 chitinase of *Saccharomyces cerevisiae*. *Fungal Genet. Biol.* **42**: 935–47
- Eisenhaber B, Schneider G, Wildpaner M & Eisenhaber F (2004) A sensitive predictor for potential GPI lipid modification sites in fungal protein sequences and its application to genome-wide studies for *Aspergillus nidulans*, *Candida albicans*, *Neurospora crassa*, *Saccharomyces cerevisiae* and *Schizosaccharomyces pombe*. *J. Mol. Biol.* **337**: 243–53
- Ernst JF (2000a) Regulation of dimorphism in *Candida albicans*. *Contrib. Microbiol.* **5**: 98–111
- Ernst JF (2000b) Transcription factors in *Candida albicans* - environmental control of morphogenesis. *Contrib. Microbiol.* **5**: 98–111
- Ernst JF & Pla J (2011) Signaling the glycoshield: maintenance of the *Candida albicans* cell wall. *Int. J. Med. Microbiol.* **301**: 378–83
- Espinel-Ingroff A (2008) Mechanisms of resistance to antifungal agents: yeasts and filamentous fungi. *Rev. Iberoam. Micol.* **25**: 101–6
- Feinberg AP & Vogelstein B (1983) A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. *Anal. Biochem.* **132**: 6–13
- Finkel JS & Mitchell AP (2011) Genetic control of *Candida albicans* biofilm development. *Nat. Rev. Microbiol.* **9**: 109–18

- Fischer-Parton S, Parton RM, Hickey PC, Dijksterhuis J, Atkinson HA & Read ND (2000) Confocal microscopy of FM4-64 as a tool for analysing endocytosis and vesicle trafficking in living fungal hyphae. *J. Microsc.* **198**: 246–59
- Fonzi WA & Irwin MY (1993) Isogenic strain construction and gene mapping in *Candida albicans*. *Genetics* **134**: 717–28
- Fradin C, Kretschmar M, Nichterlein T, Gaillardin C, d'Enfert C & Hube B (2003) Stage-specific gene expression of *Candida albicans* in human blood. *Mol. Microbiol.* **47**: 1523–43
- Francois IEJA, Aerts AM, Cammue BPA & Thevissen K (2005) Currently used antimycotics: spectrum, mode of action and resistance occurrence. *Curr. Drug Targets* **6**: 895–907
- Garcerá A, Castillo L, Martínez AI, Elorza M V, Valentín E & Sentandreu R (2005) Anchorage of *Candida albicans* Ssr1 to the cell wall, and transcript profiling of the null mutant. *Res. Microbiol.* **156**: 911–20
- Garcerá A, Martínez AI, Castillo L, Elorza MV, Sentandreu R & Valentín E (2003) Identification and study of a *Candida albicans* protein homologous to *Saccharomyces cerevisiae* Ssr1p, an internal cell-wall protein. *Microbiology* **149**: 2137–45
- García-Sánchez S, Mavor AL, Russell CL, Argimon S, Dennison P, Enjalbert B & Brown AJP (2005) Global roles of Ssn6 in Tup1- and Nrg1-dependent gene regulation in the fungal pathogen, *Candida albicans*. *Mol. Biol. Cell* **16**: 2913–25
- Gelis S, de Groot PWJ, Castillo L, Moragues M-D, Sentandreu R, Gómez M-M & Valentín E (2012) Pga13 in *Candida albicans* is localized in the cell wall and influences cell surface properties, morphogenesis and virulence. *Fungal Genet. Biol.* **49**: 322–31
- Gemmill TR & Trimble RB (1999) Overview of N- and O-linked oligosaccharide structures found in various yeast species. *Biochim. Biophys. Acta* **1426**: 227–37
- Gillum AM, Tsay EY & Kirsch DR (1984) Isolation of the *Candida albicans* gene for orotidine-5'-phosphate decarboxylase by complementation of *S. cerevisiae* ura3 and *E. coli* pyrF mutations. *Mol. Gen. Genet.* **198**: 179–82
- Girmeria C (2009) New generation azole antifungals in clinical investigation. *Expert Opin. Investig. Drugs* **18**: 1279–95
- Giusani AD, Vines M & Kumamoto CA (2002) Invasive filamentous growth of *Candida albicans* is promoted by Czf1p-dependent relief of Efg1p-mediated repression. *Genetics* **160**: 1749–53
- González-Novo A, Jiménez J, García MJ, Ríos-Serrano I, Pla J, Jiménez A & Sánchez-Pérez M (2004) Dynamics of CaCdc10, a septin of *Candida albicans*, in living cells and during infection. *Int. Microbiol.* **7**: 105–12
- Goossens K & Willaert R (2010) Flocculation protein structure and cell-cell adhesion mechanism in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnol. Lett.* **32**: 1571–85
- Gow NA, Henderson G & Gooday GW (1986) Cytological interrelationships between the cell cycle and duplication cycle of *Candida albicans*. *Microbios* **47**: 97–105
- Gow NA, Robbins PW, Lester JW, Brown AJ, Fonzi WA, Chapman T & Kinsman OS (1994) A hyphal-specific chitin synthase gene (CHS2) is not essential for growth, dimorphism, or virulence of *Candida albicans*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **91**: 6216–20

- De Groot PWJ, Bader O, de Boer AD, Weig M & Chauhan N (2013) Adhesins in human fungal pathogens: glue with plenty of stick. *Eukaryot. Cell* **12**: 470–81
- De Groot PWJ, de Boer AD, Cunningham J, Dekker HL, de Jong L, Hellingwerf KJ, de Koster C & Klis FM (2004) Proteomic analysis of *Candida albicans* cell walls reveals covalently bound carbohydrate-active enzymes and adhesins. *Eukaryot. Cell* **3**: 955–65
- Grover ND (2010) Echinocandins: A ray of hope in antifungal drug therapy. *Indian J. Pharmacol.* **42**: 9–11
- Hall RA, Bates S, Lenardon MD, Maccallum DM, Wagener J, Lowman DW, Kruppa MD, Williams DL, Odds FC, Brown AJP & Gow NAR (2013) The Mnn2 mannosyltransferase family modulates mannoprotein fibril length, immune recognition and virulence of *Candida albicans*. *PLoS Pathog.* **9**: e1003276
- Hall RA & Gow NAR (2013) Mannosylation in *Candida albicans*: role in cell wall function and immune recognition. *Mol. Microbiol.*
- Han T-L, Cannon RD & Villas-Bôas SG (2011) The metabolic basis of *Candida albicans* morphogenesis and quorum sensing. *Fungal Genet. Biol.* **48**: 747–63
- Han Y & Cutler JE (1995) Antibody response that protects against disseminated candidiasis. *Infect. Immun.* **63**: 2714–9
- Hanahan D & Meselson M (1983) Plasmid screening at high colony density. *Methods Enzymol.* **100**: 333–42
- Hashimoto H & Yoda K (1997) Novel membrane protein complexes for protein glycosylation in the yeast Golgi apparatus. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **241**: 682–6
- Hata K, Horii T, Miyazaki M, Watanabe N-A, Okubo M, Sonoda J, Nakamoto K, Tanaka K, Shirotori S, Murai N, Inoue S, Matsukura M, Abe S, Yoshimatsu K & Asada M (2011) Efficacy of oral E1210, a new broad-spectrum antifungal with a novel mechanism of action, in murine models of candidiasis, aspergillosis, and fusariosis. *Antimicrob. Agents Chemother.* **55**: 4543–51
- Hazan I & Liu H (2002) Hyphal tip-associated localization of Cdc42 is F-actin dependent in *Candida albicans*. *Eukaryot. Cell* **1**: 856–64
- Hazen KC, Singleton DR & Masuoka J (2007) Influence of outer region mannosylphosphorylation on N-glycan formation by *Candida albicans*: normal acid-stable N-glycan formation requires acid-labile mannosylphosphate addition. *Glycobiology* **17**: 1052–60
- Heilmann CJ, Sorgo AG, Mohammadi S, Sosinska GJ, de Koster CG, Brul S, de Koning LJ & Klis FM (2013) Surface stress induces a conserved cell wall stress response in the pathogenic fungus *Candida albicans*. *Eukaryot. Cell* **12**: 254–64
- Hernández ML, Ximénez-Embún P, Martínez-Gomariz M, Gutiérrez-Blázquez MD, Nombela C & Gil C (2010) Identification of *Candida albicans* exposed surface proteins in vivo by a rapid proteomic approach. *J. Proteomics* **73**: 1404–9
- Hernandez LM, Ballou L, Alvarado E, Tsai PK & Ballou CE (1989) Structure of the phosphorylated N-linked oligosaccharides from the mnn9 and mnn10 mutants of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* **264**: 13648–59
- Hickman MA, Zeng G, Forche A, Hirakawa MP, Abbey D, Harrison BD, Wang Y-M, Su C, Bennett RJ, Wang Y & Berman J (2013) The “obligate diploid” *Candida albicans* forms mating-competent haploids. *Nature* **494**: 55–9

- Hobson RP, Munro CA, Bates S, MacCallum DM, Cutler JE, Heinsbroek SEM, Brown GD, Odds FC & Gow NAR (2004) Loss of cell wall mannosylphosphate in *Candida albicans* does not influence macrophage recognition. *J. Biol. Chem.* **279**: 39628–35
- Hof H (2006) A new, broad-spectrum azole antifungal: posaconazole--mechanisms of action and resistance, spectrum of activity. *Mycoses* **49 Suppl 1**: 2–6
- Hornby JM, Dumitru R & Nickerson KW (2004) High phosphate (up to 600 mM) induces pseudohyphal development in five wild type *Candida albicans*. *J. Microbiol. Methods* **56**: 119–24
- Hube B & Naglik J (2001) *Candida albicans* proteinases: resolving the mystery of a gene family. *Microbiology* **147**: 1997–2005
- Hudson DA, Sciascia QL, Sanders RJ, Norris GE, Edwards PJB, Sullivan PA & Farley PC (2004) Identification of the dialysable serum inducer of germ-tube formation in *Candida albicans*. *Microbiology* **150**: 3041–9
- Ishii N, Yamamoto M, Yoshihara F, Arisawa M & Aoki Y (1997) Biochemical and genetic characterization of Rbf1p, a putative transcription factor of *Candida albicans*. *Microbiology* **143** (Pt 2): 429–35
- Jendretzki A, Wittland J, Wilk S, Straede A & Heinisch JJ (2011) How do I begin? Sensing extracellular stress to maintain yeast cell wall integrity. *Eur. J. Cell Biol.* **90**: 740–4
- Jigami Y & Odani T (1999) Mannosylphosphate transfer to yeast mannan. *Biochim. Biophys. Acta* **1426**: 335–45
- Jung WH & Stateva LI (2003) The cAMP phosphodiesterase encoded by CaPDE2 is required for hyphal development in *Candida albicans*. *Microbiology* **149**: 2961–76
- Jungmann J & Munro S (1998a) Multi-protein complexes in the cis Golgi of *Saccharomyces cerevisiae* with α -1,6-mannosyltransferase activity. Available at: <http://www.nature.com/emboj/journal/v17/n2/pdf/7590760a.pdf> [Accessed May 1, 2013]
- Jungmann J & Munro S (1998b) Multi-protein complexes in the cis Golgi of *Saccharomyces cerevisiae* with α -1,6-mannosyltransferase activity. *EMBO J.* **17**: 423–34
- Kadosh D (2013) Shaping up for battle: morphological control mechanisms in human fungal pathogens. *PLoS Pathog.* **9**: e1003795
- Kadosh D & Johnson AD (2001) Rfg1, a protein related to the *Saccharomyces cerevisiae* hypoxic regulator Rox1, controls filamentous growth and virulence in *Candida albicans*. *Mol. Cell. Biol.* **21**: 2496–505
- Kadosh D & Johnson AD (2005) Induction of the *Candida albicans* filamentous growth program by relief of transcriptional repression: a genome-wide analysis. *Mol. Biol. Cell* **16**: 2903–12
- Kahn JN, Garcia-Effron G, Hsu M-J, Park S, Marr KA & Perlin DS (2007) Acquired echinocandin resistance in a *Candida krusei* isolate due to modification of glucan synthase. *Antimicrob. Agents Chemother.* **51**: 1876–8
- Kapteyn JC, Hoyer LL, Hecht JE, Müller WH, Andel A, Verkleij AJ, Makarow M, Van Den Ende H & Klis FM (2000) The cell wall architecture of *Candida albicans* wild-type cells and cell wall-defective mutants. *Mol. Microbiol.* **35**: 601–11
- Khalaf RA & Zitomer RS (2001) The DNA binding protein Rfg1 is a repressor of filamentation in *Candida albicans*. *Genetics* **157**: 1503–12

- Klis FM, Boorsma A & De Groot PWJ (2006) Cell wall construction in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* **23**: 185–202
- Kollár R, Reinhold BB, Petráková E, Yeh HJ, Ashwell G, Drgonová J, Kapteyn JC, Klis FM & Cabib E (1997) Architecture of the yeast cell wall. Beta(1-->6)-glucan interconnects mannoprotein, beta(1-->3)-glucan, and chitin. *J. Biol. Chem.* **272**: 17762–75
- Kumamoto CA (2005) A contact-activated kinase signals *Candida albicans* invasive growth and biofilm development. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **102**: 5576–81
- Laforet L, Moreno I, Sánchez-Fresneda R, Martínez-Esparza M, Martínez JP, Argüelles J-C, de Groot PWJ & Valentín-Gomez E (2011) Pga26 mediates filamentation and biofilm formation and is required for virulence in *Candida albicans*. *FEMS Yeast Res.* **11**: 389–97
- Lane S, Birse C, Zhou S, Matson R & Liu H (2001a) DNA array studies demonstrate convergent regulation of virulence factors by Cph1, Cph2, and Efg1 in *Candida albicans*. *J. Biol. Chem.* **276**: 48988–96
- Lane S, Zhou S, Pan T, Dai Q & Liu H (2001b) The basic helix-loop-helix transcription factor Cph2 regulates hyphal development in *Candida albicans* partly via TEC1. *Mol. Cell. Biol.* **21**: 6418–28
- Laniado-Laborín R & Cabrales-Vargas MN (2009) Amphotericin B: side effects and toxicity. *Rev. Iberoam. Micol.* **26**: 223–7
- Lassak T, Schneider E, Busmann M, Kurtz D, Manak JR, Srikantha T, Soll DR & Ernst JF (2011) Target specificity of the *Candida albicans* Efg1 regulator. *Mol. Microbiol.* **82**: 602–18
- Latgé J-P (2007) The cell wall: a carbohydrate armour for the fungal cell. *Mol. Microbiol.* **66**: 279–90
- Lee KL, Buckley HR & Campbell CC (1975) An aminoacid liquid synthetic medium for the development of mycelial and yeast forms of *Candida albicans*. *Saboureadia* **13**: 148–153
- Lenardon MD, Munro CA & Gow NAR (2010) Chitin synthesis and fungal pathogenesis. *Curr. Opin. Microbiol.* **13**: 416–23
- Leng P, Sudbery PE & Brown AJ (2000) Rad6p represses yeast-hypha morphogenesis in the human fungal pathogen *Candida albicans*. *Mol. Microbiol.* **35**: 1264–75
- Lesage G & Bussey H (2006) Cell wall assembly in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **70**: 317–43
- Lew DJ & Reed SI (1995) Cell cycle control of morphogenesis in budding yeast. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **5**: 17–23
- Lewis LE, Bain JM, Lowes C, Gillespie C, Rudkin FM, Gow NAR & Erwig L-P (2012) Stage specific assessment of *Candida albicans* phagocytosis by macrophages identifies cell wall composition and morphogenesis as key determinants. *PLoS Pathog.* **8**: e1002578
- Li F & Palecek SP (2005) Identification of *Candida albicans* genes that induce *Saccharomyces cerevisiae* cell adhesion and morphogenesis. *Biotechnol. Prog.* **21**: 1601–9
- Liu H (2001) Transcriptional control of dimorphism in *Candida albicans*. *Curr. Opin. Microbiol.* **4**: 728–35
- Liu TT, Lee REREB, Barker KS, Lee E, Wei L, Homayouni R & Rogers PD (2005) Genome-Wide Expression Profiling of the Response to Azole , Polyene , Echinocandin , and Pyrimidine Antifungal Agents in *Candida albicans* Supplemental material Genome-Wide Expression Profiling

- of the Response to Azole , Polyene , Echinocandin , and Pyrimi. *Antimicrob. Agents Chemother.* **49**: 2226–36
- Liu Y, Solis N V, Heilmann CJ, Phan QT, Mitchell AP, Klis FM & Filler SG (2013) Role of Retrograde Trafficking in Stress Response, Host Cell Interactions, and Virulence of *Candida albicans*. *Eukaryot. Cell*
- Madhani HD & Fink GR (1997) Combinatorial control required for the specificity of yeast MAPK signaling. *Science* **275**: 1314–7
- Maidan MM, De Rop L, Serneels J, Exler S, Rupp S, Tourneau H, Thevelein JM & Van Dijck P (2005) The G protein-coupled receptor Gpr1 and the Galpha protein Gpa2 act through the cAMP-protein kinase A pathway to induce morphogenesis in *Candida albicans*. *Mol. Biol. Cell* **16**: 1971–86
- Martínez AI, Castillo L, Garcerá A, Elorza M V, Valentín E & Sentandreu R (2004) Role of Pir1 in the construction of the *Candida albicans* cell wall. *Microbiology* **150**: 3151–61
- Martínez-Lopez R, Monteoliva L, Díez-Orejas R, Nombela C & Gil C (2004) The GPI-anchored protein CaEcm33p is required for cell wall integrity, morphogenesis and virulence in *Candida albicans*. *Microbiology* **150**: 3341–54
- Martínez-Lopez R, Park H, Myers CL, Gil C & Filler SG (2006) *Candida albicans* Ecm33p is important for normal cell wall architecture and interactions with host cells. *Eukaryot. Cell* **5**: 140–7
- Mathé L & Van Dijck P (2013) Recent insights into *Candida albicans* biofilm resistance mechanisms. *Curr. Genet.* **59**: 251–64
- McKenzie CGJ, Koser U, Lewis LE, Bain JM, Mora-Montes HM, Barker RN, Gow NAR & Erwig LP (2010) Contribution of *Candida albicans* cell wall components to recognition by and escape from murine macrophages. *Infect. Immun.* **78**: 1650–8
- Mille C, Bobrowicz P, Trinel P-A, Li H, Maes E, Guerardel Y, Fradin C, Martínez-Esparza M, Davidson RC, Janbon G, Poulain D & Wildt S (2008) Identification of a new family of genes involved in beta-1,2-mannosylation of glycans in *Pichia pastoris* and *Candida albicans*. *J. Biol. Chem.* **283**: 9724–36
- Mille C, Fradin C, Delplace F, Trinel P-A, Masset A, François N, Coddeville B, Bobrowicz P, Jouault T, Guerardel Y, Wildt S, Janbon G & Poulain D (2012) Members 5 and 6 of the *Candida albicans* BMT family encode enzymes acting specifically on β -mannosylation of the phospholipomannan cell-wall glycosphingolipid. *Glycobiology* **22**: 1332–42
- Mille C, Janbon G, Delplace F, Ibata-Ombetta S, Gaillardin C, Strecker G, Jouault T, Trinel P-A & Poulain D (2004) Inactivation of CaMIT1 inhibits *Candida albicans* phospholipomannan beta-mannosylation, reduces virulence, and alters cell wall protein beta-mannosylation. *J. Biol. Chem.* **279**: 47952–60
- Mishra NN, Prasad T, Sharma N, Payasi A, Prasad R, Gupta DK & Singh R (2007) Pathogenicity and drug resistance in *Candida albicans* and other yeast species. A review. *Acta Microbiol. Immunol. Hung.* **54**: 201–35
- Mora-Montes HM, Bates S, Netea MG, Castillo L, Brand A, Buurman ET, Díaz-Jiménez DF, Jan Kullberg B, Brown AJP, Odds FC & Gow N a R (2010) A multifunctional mannosyltransferase family in *Candida albicans* determines cell wall mannan structure and host-fungus interactions. *J. Biol. Chem.* **285**: 12087–95
- Mora-Montes HM, Bates S, Netea MG, Díaz-Jiménez DF, López-Romero E, Zinker S, Ponce-Noyola P, Kullberg BJ, Brown AJP, Odds FC, Flores-Carreón A & Gow NAR (2007) Endoplasmic reticulum

- alpha-glycosidases of *Candida albicans* are required for N glycosylation, cell wall integrity, and normal host-fungus interaction. *Eukaryot. Cell* **6**: 2184–93
- Moran GP, MacCallum DM, Spiering MJ, Coleman DC & Sullivan DJ (2007) Differential regulation of the transcriptional repressor NRG1 accounts for altered host-cell interactions in *Candida albicans* and *Candida dubliniensis*. *Mol. Microbiol.* **66**: 915–29
- Morschhäuser J (2010) Regulation of white-opaque switching in *Candida albicans*. *Med. Microbiol. Immunol.* **199**: 165–72
- Morschhäuser J, Michel S & Staib P (1999) Sequential gene disruption in *Candida albicans* by FLP-mediated site-specific recombination. *Mol. Microbiol.* **32**: 547–56
- Murciano C, Moyes DL, Runglall M, Islam A, Mille C, Fradin C, Poulain D, Gow NAR & Naglik JR (2011) *Candida albicans* cell wall glycosylation may be indirectly required for activation of epithelial cell proinflammatory responses. *Infect. Immun.* **79**: 4902–11
- Myskowski PL, White MH & Ahkami R (1997) Fungal disease in the immunocompromised host. *Dermatol. Clin.* **15**: 295–305
- Nantel A, Dignard D, Bachewich C, Harcus D, Marcil A, Bouin A-P, Sensen CW, Hogues H, van het Hoog M, Gordon P, Rigby T, Benoit F, Tessier DC, Thomas DY & Whiteway M (2002) Transcription profiling of *Candida albicans* cells undergoing the yeast-to-hyphal transition. *Mol. Biol. Cell* **13**: 3452–65
- Navarro-García F, Alonso-Monge R, Rico H, Pla J, Sentandreu R & Nombela C (1998) A role for the MAP kinase gene MKC1 in cell wall construction and morphological transitions in *Candida albicans*. *Microbiology* **144** (Pt 2): 411–24
- Navarro-García F, Eisman B, Fiuza SM, Nombela C & Pla J (2005) The MAP kinase Mkc1p is activated under different stress conditions in *Candida albicans*. *Microbiology* **151**: 2737–49
- Negredo A, Monteoliva L, Gil C, Pla J & Nombela C (1997) Cloning, analysis and one-step disruption of the ARG5,6 gene of *Candida albicans*. *Microbiology* **143** (Pt 2): 297–302
- Netea MG, Brown GD, Kullberg BJ & Gow NAR (2008) An integrated model of the recognition of *Candida albicans* by the innate immune system. *Nat. Rev. Microbiol.* **6**: 67–78
- Netea MG, Gow NAR, Munro CA, Bates S, Collins C, Ferwerda G, Hobson RP, Bertram G, Hughes HB, Jansen T, Jacobs L, Buurman ET, Gijzen K, Williams DL, Torensma R, McKinnon A, MacCallum DM, Odds FC, Van der Meer JWM, Brown AJP, et al (2006) Immune sensing of *Candida albicans* requires cooperative recognition of mannans and glucans by lectin and Toll-like receptors. *J. Clin. Invest.* **116**: 1642–50
- Nilsson IM & von Heijne G (1993) Determination of the distance between the oligosaccharyltransferase active site and the endoplasmic reticulum membrane. *J. Biol. Chem.* **268**: 5798–801
- Nishikawa A, Poster JB, Jigami Y & Dean N (2002) Molecular and phenotypic analysis of CaVRG4, encoding an essential Golgi apparatus GDP-mannose transporter. *J. Bacteriol.* **184**: 29–42
- Nobbs AH, Vickerman MM & Jenkinson HF (2010) Heterologous expression of *Candida albicans* cell wall-associated adhesins in *Saccharomyces cerevisiae* Reveals differential specificities in adherence and biofilm formation and in binding oral *Streptococcus gordonii*. *Eukaryot. Cell* **9**: 1622–34
- Nobile CJ, Bruno VM, Richard ML, Davis DA & Mitchell AP (2003) Genetic control of chlamydospore formation in *Candida albicans*. *Microbiology* **149**: 3629–37

- Odani T, Shimma Y, Tanaka A & Jigami Y (1996) Cloning and analysis of the MNN4 gene required for phosphorylation of N-linked oligosaccharides in *Saccharomyces cerevisiae*. *Glycobiology* **6**: 805–10
- Odani T, Shimma Y, Wang XH & Jigami Y (1997) Mannosylphosphate transfer to cell wall mannan is regulated by the transcriptional level of the MNN4 gene in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett.* **420**: 186–90
- Odds FC (1988) *Candida and candidosis: a review and bibliography*. 2nd edition.
- Okamoto M, Yoko-o T, Miyakawa T & Jigami Y (2008) The cytoplasmic region of alpha-1,6-mannosyltransferase Mnn9p is crucial for retrograde transport from the Golgi apparatus to the endoplasmic reticulum in *Saccharomyces cerevisiae*. *Eukaryot. Cell* **7**: 310–8
- Orlean P (2012) Architecture and Biosynthesis of the *Saccharomyces cerevisiae* Cell Wall. *Genetics* **192**: 775–818
- Pardini G, De Groot PWJ, Coste AT, Karababa M, Klis FM, de Koster CG & Sanglard D (2006) The CRH family coding for cell wall glycosylphosphatidylinositol proteins with a predicted transglycosidase domain affects cell wall organization and virulence of *Candida albicans*. *J. Biol. Chem.* **281**: 40399–411
- Pardo M, Monteoliva L, Vázquez P, Martínez R, Molero G, Nombela C & Gil C (2004) PST1 and ECM33 encode two yeast cell surface GPI proteins important for cell wall integrity. *Microbiology* **150**: 4157–70
- Pasqualotto AC & Denning DW (2008) New and emerging treatments for fungal infections. *J. Antimicrob. Chemother.* **61 Suppl 1**: i19–30
- Pemán J, Cantón E & Espinel-Ingroff A (2009) Antifungal drug resistance mechanisms. *Expert Rev. Anti. Infect. Ther.* **7**: 453–60
- Philip B & Levin DE (2001) Wsc1 and Mid2 are cell surface sensors for cell wall integrity signaling that act through Rom2, a guanine nucleotide exchange factor for Rho1. *Mol. Cell. Biol.* **21**: 271–80
- Piispanen AE, Bonnefoi O, Carden S, Deveau A, Bassilana M & Hogan DA (2011) Roles of Ras1 membrane localization during *Candida albicans* hyphal growth and farnesol response. *Eukaryot. Cell* **10**: 1473–84
- Pitarch A, Sánchez M, Nombela C & Gil C (2002) Sequential fractionation and two-dimensional gel analysis unravels the complexity of the dimorphic fungus *Candida albicans* cell wall proteome. *Mol. Cell. Proteomics* **1**: 967–82
- Plaine A, Walker L, Da Costa G, Mora-Montes HM, McKinnon A, Gow NAR, Gaillardin C, Munro CA & Richard ML (2008) Functional analysis of *Candida albicans* GPI-anchored proteins: roles in cell wall integrity and caspofungin sensitivity. *Fungal Genet. Biol.* **45**: 1404–14
- Pontón J (2008) [The fungal cell wall and the mechanism of action of anidulafungin]. *Rev. Iberoam. Micol.* **25**: 78–82
- Porta A, Ramon AM & Fonzi WA (1999) PRR1, a homolog of *Aspergillus nidulans* palF, controls pH-dependent gene expression and filamentation in *Candida albicans*. *J. Bacteriol.* **181**: 7516–23
- Rayner JC & Munro S (1998) Identification of the MNN2 and MNN5 mannosyltransferases required for forming and extending the mannose branches of the outer chain mannans of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* **273**: 26836–43

- Redding SW, Kirkpatrick WR, Saville S, Coco BJ, White W, Fothergill A, Rinaldi M, Eng T, Patterson TF & Lopez-Ribot J (2003) Multiple patterns of resistance to fluconazole in *Candida glabrata* isolates from a patient with oropharyngeal candidiasis receiving head and neck radiation. *J. Clin. Microbiol.* **41**: 619–22
- Reynaga-Peña CG, Gierz G & Bartnicki-Garcia S (1997) Analysis of the role of the Spitzenkörper in fungal morphogenesis by computer simulation of apical branching in *Aspergillus niger*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **94**: 9096–101
- Richard M, Iyata-Ombetta S, Dromer F, Bordon-Pallier F, Jouault T & Gaillardin C (2002) Complete glycosylphosphatidylinositol anchors are required in *Candida albicans* for full morphogenesis, virulence and resistance to macrophages. *Mol. Microbiol.* **44**: 841–53
- Richard ML & Plaine A (2007) Comprehensive analysis of glycosylphosphatidylinositol-anchored proteins in *Candida albicans*. *Eukaryot. Cell* **6**: 119–33
- Rodicio R (2010) Together we are strong — cell wall integrity sensors. *Yeast*: 531–540
- Rodríguez-Peña JM, García R, Nombela C & Arroyo J (2010) The high-osmolarity glycerol (HOG) and cell wall integrity (CWI) signalling pathways interplay: a yeast dialogue between MAPK routes. *Yeast* **27**: 495–502
- Román E, Alonso-Monge R, Gong Q, Li D, Calderone R & Pla J (2009a) The Cek1 MAPK is a short-lived protein regulated by quorum sensing in the fungal pathogen *Candida albicans*. *FEMS Yeast Res.* **9**: 942–55
- Román E, Cottier F, Ernst JF & Pla J (2009b) Msb2 signaling mucin controls activation of Cek1 mitogen-activated protein kinase in *Candida albicans*. *Eukaryot. Cell* **8**: 1235–49
- Romero PA, Lussier M, Véronneau S, Sdicu AM, Herscovics A & Bussey H (1999) Mnt2p and Mnt3p of *Saccharomyces cerevisiae* are members of the Mnn1p family of alpha-1,3-mannosyltransferases responsible for adding the terminal mannose residues of O-linked oligosaccharides. *Glycobiology* **9**: 1045–51
- Rua D, Tobe BT & Kron SJ (2001) Cell cycle control of yeast filamentous growth. *Curr. Opin. Microbiol.* **4**: 720–7
- Ruiz-Herrera J, Elorza MV, Valentín E & Sentandreu R (2006) Molecular organization of the cell wall of *Candida albicans* and its relation to pathogenicity. *FEMS Yeast Res.* **6**: 14–29
- Sambrook J, Fritsch EF & Maniatis T (1987) *Molecular cloning: a laboratory manual* 2nd ed. Cold Spring Harbor, N.Y.: Cold Spring Harbor Laboratory Press
- Sanglard D, Coste A & Ferrari S (2009) Antifungal drug resistance mechanisms in fungal pathogens from the perspective of transcriptional gene regulation. *FEMS Yeast Res.* **9**: 1029–50
- Sanz M, Valle R & Roncero C (2007) Promoter heterozygosity at the *Candida albicans* CHS7 gene is translated into differential expression between alleles. *FEMS Yeast Res.* **7**: 993–1003
- Schmidt M, Strenk ME, Boyer MP & Fritsch BJ (2005) Importance of cell wall mannoproteins for septum formation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* **22**: 715–23
- Schmitt-Hoffmann A, Roos B, Heep M, Schleimer M, Weidekamm E, Brown T, Roehrl M & Beglinger C (2006) Single-ascending-dose pharmacokinetics and safety of the novel broad-spectrum antifungal triazole BAL4815 after intravenous infusions (50, 100, and 200 milligrams) and oral administrations (100, 200, and 400 milligrams) of its prodrug, BAL8557, in healthy. *Antimicrob. Agents Chemother.* **50**: 279–85

- Schweizer A, Rupp S, Taylor BN, Röllinghoff M & Schröppel K (2000) The TEA/ATTS transcription factor CaTec1p regulates hyphal development and virulence in *Candida albicans*. *Mol. Microbiol.* **38**: 435–45
- Sellam A, Tebbji F & Nantel A (2009) Role of Ndt80p in sterol metabolism regulation and azole resistance in *Candida albicans*. *Eukaryot. Cell* **8**: 1174–83
- Selmecki A, Forche A & Berman J (2010) Genomic plasticity of the human fungal pathogen *Candida albicans*. *Eukaryot. Cell* **9**: 991–1008
- Setiadi ER, Doedt T, Cottier F, Noffz C & Ernst JF (2006) Transcriptional response of *Candida albicans* to hypoxia: linkage of oxygen sensing and Efg1p-regulatory networks. *J. Mol. Biol.* **361**: 399–411
- Sharkey LL, McNemar MD, Saporito-Irwin SM, Sypherd PS & Fonzi WA (1999) HWP1 functions in the morphological development of *Candida albicans* downstream of EFG1, TUP1, and RBF1. *J. Bacteriol.* **181**: 5273–9
- Sheth CC, Hall R, Lewis L, Brown AJP, Odds FC, Erwig LP & Gow NAR (2011) Glycosylation status of the *C. albicans* cell wall affects the efficiency of neutrophil phagocytosis and killing but not cytokine signaling. *Med. Mycol.* **49**: 513–24
- Shibata N, Hisamichi K, Kikuchi T, Kobayashi H, Okawa Y & Suzuki S (1992) Sequential nuclear magnetic resonance assignment of beta-1,2-linked mannoooligosaccharides isolated from the phosphomannan of the pathogenic yeast *Candida albicans* NIH B-792 strain. *Biochemistry* **31**: 5680–6
- Shibata N, Suzuki A, Kobayashi H & Okawa Y (2007) Chemical structure of the cell-wall mannan of *Candida albicans* serotype A and its difference in yeast and hyphal forms. *Biochem. J.* **404**: 365–72
- Singleton DR, Masuoka J & Hazen KC (2005) Surface hydrophobicity changes of two *Candida albicans* serotype B mnn4delta mutants. *Eukaryot. Cell* **4**: 639–48
- Sonneborn A, Bockmühl DP & Ernst JF (1999) Chlamydospore formation in *Candida albicans* requires the Efg1p morphogenetic regulator. *Infect. Immun.* **67**: 5514–7
- Sonneborn A, Bockmühl DP, Gerads M, Kurpanek K, Sanglard D & Ernst JF (2000) Protein kinase A encoded by TPK2 regulates dimorphism of *Candida albicans*. *Mol. Microbiol.* **35**: 386–96
- Sorgo AG, Heilmann CJ, Dekker HL, Bekker M, Brul S, de Koster CG, de Koning LJ & Klis FM (2011) Effects of fluconazole on the secretome, the wall proteome, and wall integrity of the clinical fungus *Candida albicans*. *Eukaryot. Cell* **10**: 1071–81
- Southard SB, Specht C a, Mishra C, Chen-Weiner J & Robbins PW (1999) Molecular analysis of the *Candida albicans* homolog of *Saccharomyces cerevisiae* MNN9, required for glycosylation of cell wall mannoproteins. *J. Bacteriol.* **181**: 7439–48
- Spampinato C & Leonardi D (2013) *Candida* infections, causes, targets, and resistance mechanisms: traditional and alternative antifungal agents. *Biomed Res. Int.* **2013**: 204237
- Srikantha T, Daniels KJ, Pujol C, Kim E & Soll DR (2013) Identification of genes upregulated by the transcription factor Bcr1 that are involved in impermeability, impenetrability, and drug resistance of *Candida albicans* a/ α biofilms. *Eukaryot. Cell* **12**: 875–88
- Staab JF & Sundstrom P (2003) URA3 as a selectable marker for disruption and virulence assessment of *Candida albicans* genes. *Trends Microbiol.* **11**: 69–73

- Ståhlberg A, Aman P, Ridell B, Mostad P & Kubista M (2003) Quantitative real-time PCR method for detection of B-lymphocyte monoclonality by comparison of kappa and lambda immunoglobulin light chain expression. *Clin. Chem.* **49**: 51–9
- Staib P & Morschhäuser J (2007) Chlamydospore formation in *Candida albicans* and *Candida dubliniensis*--an enigmatic developmental programme. *Mycoses* **50**: 1–12
- Stichternoth C & Ernst JF (2009) Hypoxic adaptation by Efg1 regulates biofilm formation by *Candida albicans*. *Appl. Environ. Microbiol.* **75**: 3663–72
- Su C, Lu Y & Liu H (2013) Reduced TOR signaling sustains hyphal development in *Candida albicans* by lowering Hog1 basal activity. *Mol. Biol. Cell* **24**: 385–97
- Sudbery P, Gow N & Berman J (2004) The distinct morphogenic states of *Candida albicans*. *Trends Microbiol.* **12**: 317–24
- Sudbery PE (2011) Growth of *Candida albicans* hyphae. *Nat. Rev. Microbiol.* **9**: 737–48
- Swidergall M, Ernst AM & Ernst JF (2013) *Candida albicans* mucin Msb2 is a broad-range protectant against antimicrobial peptides. *Antimicrob. Agents Chemother.* **57**: 3917–22
- Szafranski-Schneider E, Swidergall M, Cottier F, Tielker D, Román E, Pla J & Ernst JF (2012) Msb2 shedding protects *Candida albicans* against antimicrobial peptides. *PLoS Pathog.* **8**: e1002501
- Tavazoie S, Hughes JD, Campbell MJ, Cho RJ & Church GM (1999) Systematic determination of genetic network architecture. *Nat. Genet.* **22**: 281–5
- Tripathi G, Wiltshire C, Macaskill S, Tournu H, Budge S & Brown AJP (2002) Gcn4 co-ordinates morphogenetic and metabolic responses to amino acid starvation in *Candida albicans*. *EMBO J.* **21**: 5448–56
- Tsai PK, Frevert J & Ballou CE (1984) Carbohydrate structure of *Saccharomyces cerevisiae* mnn9 mannoprotein. *J. Biol. Chem.* **259**: 3805–11
- Tzung KW, Williams RM, Scherer S, Federspiel N, Jones T, Hansen N, Bivolarevic V, Huizar L, Komp C, Surzycki R, Tamse R, Davis RW & Agabian N (2001) Genomic evidence for a complete sexual cycle in *Candida albicans*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **98**: 3249–53
- Vazquez JA (2005) Anidulafungin: a new echinocandin with a novel profile. *Clin. Ther.* **27**: 657–73
- Vialás V, Perumal P, Gutierrez D, Ximénez-Embún P, Nombela C, Gil C & Chaffin WL (2012) Cell surface shaving of *Candida albicans* biofilms, hyphae, and yeast form cells. *Proteomics* **12**: 2331–9
- Victoria GS, Kumar P & Komath SS (2010) The *Candida albicans* homologue of PIG-P, CaGpi19p: gene dosage and role in growth and filamentation. *Microbiology* **156**: 3041–51
- Vilella F, Herrero E, Torres J & de la Torre-Ruiz MA (2005) Pkc1 and the upstream elements of the cell integrity pathway in *Saccharomyces cerevisiae*, Rom2 and Mtl1, are required for cellular responses to oxidative stress. *J. Biol. Chem.* **280**: 9149–59
- Wang Y (2009) CDKs and the yeast-hyphal decision. *Curr. Opin. Microbiol.* **12**: 644–9
- Warena AJ & Konopka JB (2002) Septin function in *Candida albicans* morphogenesis. *Mol. Biol. Cell* **13**: 2732–46

- Whiteway M (2000) Transcriptional control of cell type and morphogenesis in *Candida albicans*. *Curr. Opin. Microbiol.* **3**: 582–8
- Whiteway M & Oberholzer U (2004) *Candida* morphogenesis and host-pathogen interactions. *Curr. Opin. Microbiol.* **7**: 350–7
- Wilk S, Wittland J, Thywissen A, Schmitz H-P & Heinisch JJ (2010) A block of endocytosis of the yeast cell wall integrity sensors Wsc1 and Wsc2 results in reduced fitness in vivo. *Mol. Genet. Genomics* **284**: 217–29
- Wilson D, Fiori A, Brucker K De, Dijck P Van & Stateva L (2010) *Candida albicans* Pde1p and Gpa2p comprise a regulatory module mediating agonist-induced cAMP signalling and environmental adaptation. *Fungal Genet. Biol.* **47**: 742–52
- Wilson D, Thewes S, Zakikhany K, Fradin C, Albrecht A, Almeida R, Brunke S, Grosse K, Martin R, Mayer F, Leonhardt I, Schild L, Seider K, Skibbe M, Slesiona S, Waechter B, Jacobsen I & Hube B (2009) Identifying infection-associated genes of *Candida albicans* in the postgenomic era. *FEMS Yeast Res.* **9**: 688–700
- Wilson RB, Davis D, Enloe BM & Mitchell AP (2000) A recyclable *Candida albicans* URA3 cassette for PCR product-directed gene disruptions. *Yeast* **16**: 65–70
- Yip CL, Welch SK, Klebl F, Gilbert T, Seidel P, Grant FJ, O'Hara PJ & MacKay VL (1994) Cloning and analysis of the *Saccharomyces cerevisiae* MNN9 and MNN1 genes required for complex glycosylation of secreted proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **91**: 2723–7
- Zaragoza O, de Virgilio C, Ponton J & Gancedo C (2002) Disruption in *Candida albicans* of the TPS2 gene encoding trehalose-6-phosphate phosphatase affects cell integrity and decreases infectivity. *Microbiology* **148**: 1281–1290
- Zaret KS & Sherman F (1982) DNA sequence required for efficient transcription termination in yeast. *Cell* **28**: 563–73
- Zhao R, Lockhart SR, Daniels K & Soll DR (2002) Roles of TUP1 in switching, phase maintenance, and phase-specific gene expression in *Candida albicans*. *Eukaryot. Cell* **1**: 353–65
- Zielinska DF, Gnad F, Schropp K, Wiśniewski JR & Mann M (2012) Mapping N-glycosylation sites across seven evolutionarily distant species reveals a divergent substrate proteome despite a common core machinery. *Mol. Cell* **46**: 542–8
- Zielinska DF, Gnad F, Wiśniewski JR & Mann M (2010) Precision mapping of an in vivo N-glycoproteome reveals rigid topological and sequence constraints. *Cell* **141**: 897–907

MATERIAL SUPLEMENTARIO

- S.I.- Genes desregulados en *Camnn9*Δ.

- S.II.- Genes desregulados en *Camnn1*Δ.

- S.III.- Genes que codifican proteínas N-glicosiladas en *S. cerevisiae*. (Zielinska *et al*, 2012)
 - 2.- Sus homólogos en *C. albicans* desregulados en *Camnn9*Δ.
 - 3.- Sus homólogos en *C. albicans* desregulados en *Camnn1*Δ.

- S.IV.-
 - 1.- Genes asociados a superficie celular. (Ver Apartado 1.3.3 de “Resultados 3”)
 - 2.- Genes asociados a superficie celular desregulados en *Camnn9*Δ.
 - 3.- Genes asociados a superficie celular desregulados en *Camnn1*Δ.

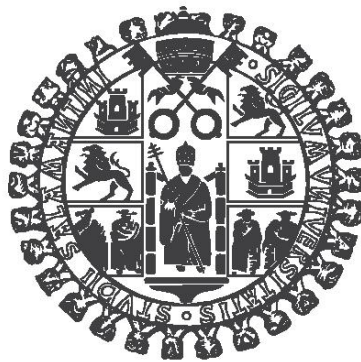
- S.V.-
 - 1.- Genes de transducción de señales de filamentación y de estrés.
 - 2.- Genes de estas rutas desregulados en *Camnn9*Δ.
 - 3.- Genes de estas rutas desregulados en *Camnn1*Δ.

- S.VI.-
 - 1.- Genes específicos de hifa (HSG). (Sudbery, 2011)
 - 2.- Genes específicos de hifa (HSG) desregulados en *Camnn9*Δ.
 - 3.- Genes específicos de hifa (HSG) desregulados en *Camnn1*Δ.

- S.VII
 - 1.- Genes sobreexpresados en exponencial y al menos 2 condiciones de inducción en *Camnn9*Δ.
 - 2.- Genes subexpresados en exponencial y al menos 2 condiciones de inducción en *Camnn9*Δ.
 - 3.- Genes sobreexpresados en exponencial y al menos 2 condiciones de inducción en *Camnn1*Δ.
 - 4.- Genes subexpresados en exponencial y al menos 2 condiciones de inducción en *Camnn1*Δ.

UNIVERSITY OF SALAMANCA

DEPARTMENT OF MICROBIOLOGY AND GENETICS



**Phenotypical and transcripcional
characterization of mutants affected in
protein N-glycosylation in the pathogen
*Candida albicans***

**CARLOS CÍVICOS VILLA
2014**

Index

INTRODUCTION	1
1.- <i>Candida albicans</i>	1
1.1.- GENERAL CHARACTERISTICS	1
1.2.- <i>Candida albicans</i> AS A PATHOGEN	2
1.3.- MORPHOLOGICAL FORMS OF <i>C. albicans</i>	2
1.4.- MORPHOLOGICAL TRANSITION IN <i>C. albicans</i>	3
1.4.1.- Polarity changes during morphological transition	4
1.4.2.- Environmental cues inducing hyphal growth	4
1.4.3.- Signal transduction pathways involved in the dimorphic transition	5
1.4.4.- Stress response pathways and their relationship to the morphological transition	7
1.4.5.- Genome-wide transcriptional analysis of dimorphic transition	8
2.- GLYCOPROTEINS AND THE CELL WALL	9
2.1- Chitin and glucans	10
2.2.- Cell wall proteins	10
2.2.1.- GPI proteins	10
2.2.2.- Pir proteins	11
2.3.- Cell wall lipids	11
3.- N-GLYCOSYLATION PROCESSES	11
3.1.- N-glycosylation in the ER	11
3.2.- N-glycosylation in the Golgi apparatus	13
3.3.- The mannosyltransferase mutants acting in the Golgi apparatus	15
OBJECTIVES	19
MATERIALS AND METHODS	21
1.- STRAINS AND PRIMERS	21
2.- PLASMIDS	22
2.1.- pSNC1	22
2.2.- pLC14	23
2.3.- pAG1	23

2.4.- pBI-SM [MP K12]	23
2.5.- pMR.....	23
3.- MEDIA AND GROWTH CONDITIONS.....	24
4.- VIRULENCE ASSAYS	24
5.- NUCLEIC ACID MANIPULATION TECHNIQUES.....	24
5.1.- Yeast total RNA isolation and purification	24
5.2.- Quantitative PCR.....	25
6.- COMPARISON OF TRANSCRIPTION PROFILES USING DNA MICROARRAYS	26
6.1.- Introduction	26
6.1.1.- <i>Primer design and synthesis</i>	26
6.2.- cDNA-labelled probe preparation	26
6.2.1.- <i>Total RNA isolation</i>	26
6.2.2.- <i>Labelled cDNA synthesis</i>	26
6.2.5.- <i>Labelled cDNA purification</i>	26
6.3.- Image acquisition.....	27
6.4.- Data analysis	27
6.4.1.- <i>Identification of differentially expressed genes</i>	27
RESULTS 1: Phenotypic studies of <i>mnn9Δ</i> and <i>mnn1Δ</i>	31
1.- SUBCELLULAR LOCALIZATION OF Mnn9p	31
2.- <i>Camnn1Δ</i> CONSTRUCTION	31
3.- EFFECTS OF GENE DELETION ON CELLULAR MORPHOLOGY AND GROWTH..	32
3.1.- Growth in liquid media at 28°C	32
3.1.1.- <i>Optical microscopy</i>	32
4.- EFFECTS OF GENE DELETIONS ON FILAMENTATION.....	33
4.2.- Filamentation in liquid media	34
4.3.- Invasiveness assays	35
4.4.- Biofilm formation	35
5.- EFFECT OF GENE DELETION ON CELL SURFACE INTEGRITY. COMPLEMENTATION ASSAYS.	36
6.- EFFECT OF GENE DELETIONS ON VIRULENCE	38
7. EFFECT OF <i>MNN9</i> DELETION ON THE GLYCOSYLATION OF A REFERENCE PROTEIN	38
8.- EFFECT OF GENE DELETIONS ON THE ACTIVATION OF MAPK PATHWAYS....	39
9.- <i>CaMNN9</i> GENE EXPRESSION IN CAI4	41

RESULTS 2: <i>mnn9</i> Δ and <i>mnn1</i> Δ transcriptional profiling	43
1.-TRANSCRIPTIONAL PROFILE OF <i>Camnn9</i> Δ and <i>Camnn1</i> Δ	43
1.1.- Generalities of <i>mnn9</i> Δ and <i>mnn1</i> Δ transcriptional profiles	43
1.2.- Analysis of differentially expressed genes in <i>mnn9</i> Δ and <i>mnn1</i> Δ	45
1.2.1.- <i>Deregulated genes coding for potentially N-glycosylated proteins</i>	45
1.2.2.- <i>Genes involved in N-glycosylation in the Golgi apparatus</i>	46
1.2.3.- <i>Genes coding for cell surface-associated proteins</i>	47
1.2.4.- <i>Filamentation pathways and hypha-specific genes</i>	53
1.2.5.- <i>Genes involved in energy metabolism</i>	56
1.2.6.- <i>Overview of deregulated genes in various conditions</i>	57
DISCUSSION.....	61
CONCLUSIONS.....	71

INTRODUCTION

1.- *Candida albicans*

1.1.- GENERAL CHARACTERISTICS

Fungi are eukaryotic organisms with a rapid and simple development, which makes them easier to manipulate than other pluricellular organisms. This has stimulated the use of some yeasts as model organisms for molecular biology and genetics studies. This is the case of *Saccharomyces cerevisiae*.

S. cerevisiae is a nonpathogenic yeast that does not show morphological plasticity. *Candida albicans* is, by contrast, an opportunistic high-rate human pathogen used in research to develop effective therapeutic treatments and to shed light on the molecular biology of other fungal pathogens which are harder to handle in the lab. Furthermore, *C. albicans* is able to grow adopting different morphologies, depending on the environment, and hence is useful as a model to study cellular differentiation processes.

The genus *Candida* is comprised of more than 150 disparate yeast species. The majority of *Candida* spp. are environmental saprophytes, and only a few of these have been associated with human colonization or infection. *Candida albicans* is a common human commensal and is often referred to as the most pathogenic fungal species, as it is responsible for most cases of candidiasis, although other species, such as *Candida glabrata*, *Candida tropicalis*, and *Candida parapsilosis*, can also cause infection. The most significant characteristics of *C. albicans* are its ability to form germ tubes and chlamydospores, and its sugar assimilation pattern (Odds, 1988).

C. albicans is a diploid organism with a high degree of allelic variation, a lack of a typical sexual cycle (mating of diploid cells, mitosis, and chromosomal loss instead of meiosis), and a different codon usage than in *S. cerevisiae* (the CUG codon is translated as serine instead of leucine), and these characteristics have impaired molecular studies in the species. However, some molecular tools have been developed; for example, there are strains with deletions in marker genes, efficient systems for transformations, strategies for deleting genes, etc. (Fonzi & Irwin, 1993; Morschhäuser *et al*, 1999; Negredo *et al*, 1997; Wilson *et al*, 2000). In addition, its genome sequence has been published, and gene annotation is available at databases <http://www.candidagenome.org/> and <http://genolist.pasteur.fr/CandidaDB/>. Recently it has been constructed stable haploid strains with multiple auxotrophies that will facilitate molecular and genetic analyses of this important pathogen (Hickman *et al*, 2013).

1.2.- *Candida albicans* AS A PATHOGEN

C. albicans is usually found as a harmless commensal in the oral cavity and intestinal and genital tracts of humans and other hot-blooded species, where it lives in harmony with the normal microbiota and with the host immune system. Although it is highly adapted as a commensal organism, this species shows a high number of virulent elements that allows it to colonize the host (Hube & Naglik, 2001) causing systemic infections in patients with weakened or immature immune systems. When this happens, and in spite of aggressive antifungal treatments, the prognosis is not good, mortality rates of about 45% being reached in nosocomial infections (Spampinato & Leonardi, 2013).

1.3.- MORPHOLOGICAL FORMS OF *C. albicans*

Owing to its capacity to switch between the yeast and hyphal morphologies, *C. albicans* has traditionally been considered a dimorphic fungus, however *C. albicans* is able to grow in the yeast, hyphal, pseudohyphal or chlamydo-spore forms (Fig. E1) so it should be considered polymorphic.

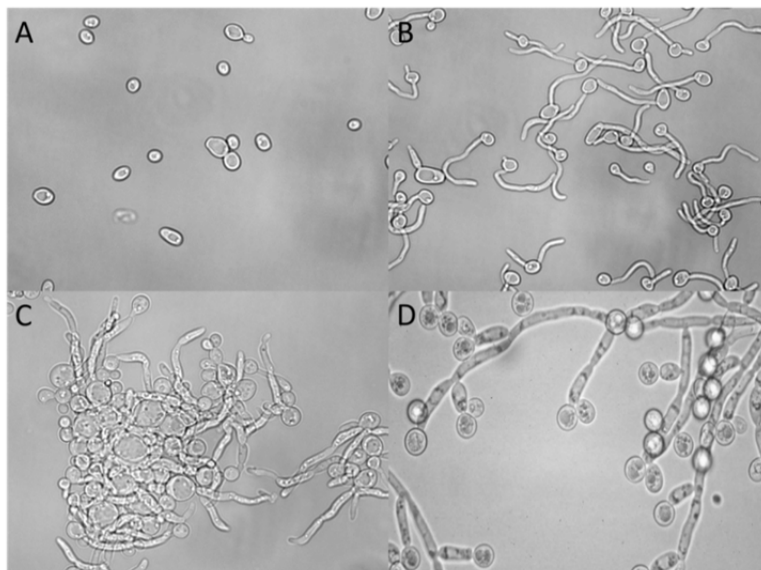


Fig E1.- Light microscopy photographs showing different growth forms of *C. albicans*: yeast (A), hypha (B), pseudohypha (C) and chamydo-spore (D).

Yeasts are ellipsoidal, with a diameter of about 5 μm ; they divide by budding and are more abundant during saprophytic fungal growth (Odds, 1988).

Hyphal cells are cylindrical with a diameter of about 2 μm ; their lateral walls are parallel along the filament and they do not show any septum constrictions (Sudbery *et al*, 2004).

Pseudohyphal cells are chains of elongated cells originated by a budding process in which the mother and daughter cells are unable to separate. Unlike hyphal cells, pseudohyphal lateral walls are not parallel, so their diameter varies; they are thicker (minimum diameter of 2.8 μm) and they have constrictions at the septa (Odds, 1988; Sudbery *et al*, 2004). Pseudohyphal filaments tend to be highly branched.

The ability to form chlamydo spores is nearly exclusive to *C. albicans* and it is only shared with *C. dubliniensis* and some *C. tropicalis* species (Brandt, 2002; Sonneborn *et al*, 1999). Chlamydo spores are large, spherical asexual spores with a thick wall; they have an average diameter of 8 – 12 μm , and they are located in lateral positions or at the end of hyphal and pseudohyphal cells on elongated suspensor cells. They are hardly ever detected *in vivo* (Cole *et al.*, 1991). At molecular level, little is known about development program of chlamydo spores (Staib & Morschhäuser, 2007).

C. albicans can also form biofilms, an organized cell community in tight relation. Biofilms are formed by yeasts, hypha, pseudohypha and extracellular material (proteins and polysaccharides) arranged in layers. Generally, the inner layer is made up of yeasts and the outer layers are made of filamentous cells. Studies on biofilms in *C. albicans* are of medical interest due to their presence in catheters and prostheses and due to their resistance to antifungals (ten Cate *et al*, 2009; Mishra *et al*, 2007; Mathé & Van Dijck, 2013).

1.4.- MORPHOLOGICAL TRANSITION IN *C. albicans*

The transition between the yeast and hyphal forms of growth can be considered as an adaptive response through which some fungi adjust their morphology to a new environment. This process is mediated by perception of a signal, translation of the signal to a biochemical stimulus, differential genetic expression and a polarized growth development (Chio, 2004).

Several pathways regulate a common set of genes, and the minimum activation level needed for the expression of these genes can be reached either by the stimulation of many pathways or by strong activation of a single pathway (Ernst, 2000a).

One characteristic of the morphological transition in *C. albicans* is the fact that it is a reversible process: both hyphae and pseudohyphae can shift to the yeast form. This process has not been further characterized, although recently a study showing global differential gene expression during the shift has been published (Carlisle & Kadosh, 2013).

1.4.1.- Polarity changes during morphological transition

The alternation of polarized growth with isotropic growth that characterizes the yeast mode of proliferation is replaced by the essentially permanently polarized apical growth of the hyphal cell. Cdc42p is central regulator of a complex of proteins required for proper polarized growth. In addition to Cdc42, another Rho GTPase, Rac1p, appears to function in hyphal growth in fungi. In *C. albicans*, Rac1p and its GEF, Dck1p, are essential for filamentation induced under embedded conditions (Basilana & Arkowitz, 2006).

Cell cycle regulators also play important roles in transition between the yeast and hyphal states, for example the specific hyphae cyclin Hgc1p is required for the germ tube initiation (Wang, 2009).

1.4.2.- Environmental cues inducing hyphal growth

In *C. albicans*, unlike other dimorphic fungi, hyphal growth develops at 37°C while below 30°C the yeast form develops. For correct hyphal formation at 37°C, a pH of around 7 and the composition of the environment must be taken into account.

Easily assimilated nitrogen sources, such as ammonium salts, enhance the yeast growth form while nitrogen sources that are difficult to assimilate, such as proline, enhance hyphal or pseudohyphal growth (Ernst, 2000a). The presence of glucose at low concentrations acts as an inducer of filamentation. Other carbon sources that enhance hyphal formation are NAcGlc and mannitol (Hudson *et al.*, 2004).

Serum is a potent inducer of transition and its presence can attenuate the requirements of pH and temperature. In media containing serum at 34°C, hyphal cells are developed, while at the same temperature without serum pseudohyphal cells are developed.

Lee medium is a nutrient-poor medium (Lee *et al.*, 1975) that is suitable for the morphologic analysis of *C. albicans* because it allows the yeast or hyphal morphology to be preserved simply by changing the pH or temperature. In Lee medium at 37°C and neutral pH hyphal formation is induced nearly automatically, while at 28°C or acid pH yeast growth is maintained. The addition of serum to Lee medium at 37°C makes hyphal development occur faster. Additionally it has been shown that a previous metabolic repose enhances hyphal formation (Ernst, 2000a).

Pseudohyphal filamentation conditions are not well defined. It has been shown that pseudohyphae develop at intermediate pH and at intermediate temperatures between the optimal ones for the growth of yeast and hyphal cells (around 35°C and pH 6), and that their

development can be induced by a high phosphate concentration (up to 600 mM) or by the absence of amino acids (Hornby *et al*, 2004; Tripathi *et al*, 2002).

There are Other environmental conditions also enhance the development of filamentous forms. This is the case of hypoxic conditions, such as in the interior of an agar matrix, contact with macrophages, Spider medium, iron depletion and in kidney infections in mice (Sudbery *et al*, 2004).

Table EI.- Distinct stimuli affecting filamentation.		
Cues	Yeast	Filaments
Temperature	Below 30°C	37°C
pH	Acid	Around 7
Nitrogen source	Easy to assimilate	Difficult to assimilate
Glucose	High concentration	Low concentration (to 20 mM)
Other carbon sources		NAcGlc / Mannitol
Serum		Strong inducer
Metabolic rest		Enhances
High cell density	More than 10 ⁷ cells/ml (Farnesol)	
Anoxia		Enhances
Matrix (Embedded)		Enhances
Macrophages		Enhance

1.4.3.- Signal transduction pathways involved in the dimorphic transition

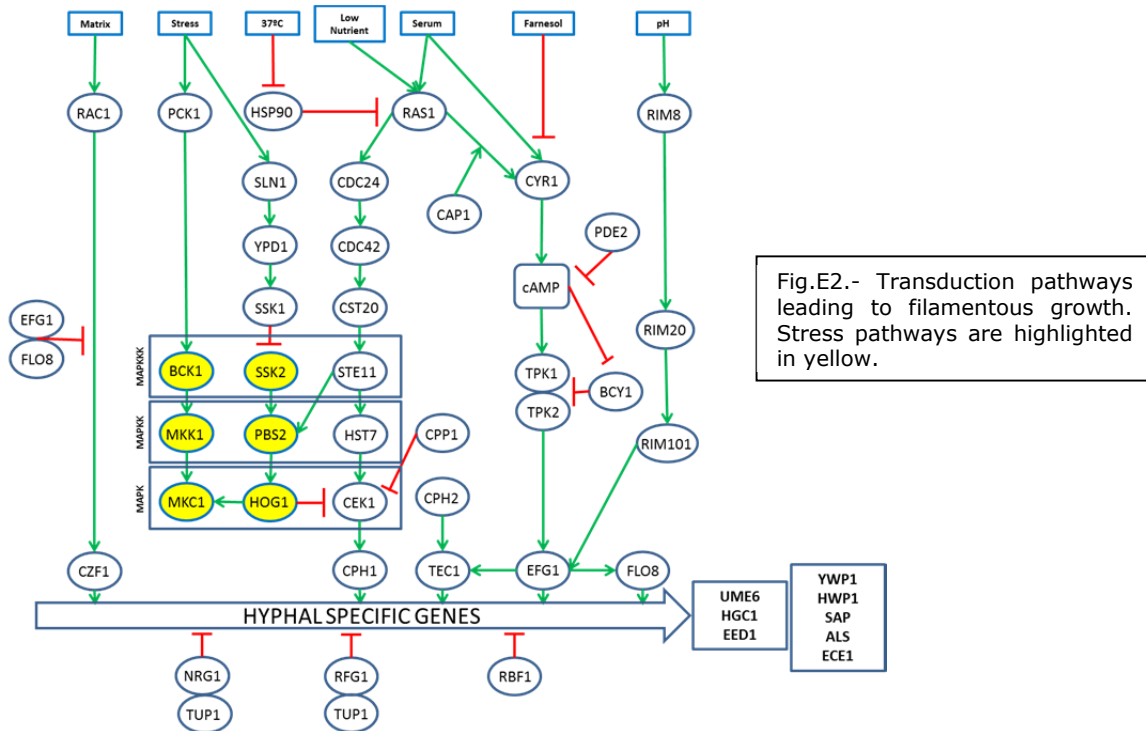
Four hypha-inducing pathways have been described: the mitogen-activated kinase pathway via Cph1p (MAPK pathway); the cAMP-dependent kinase A pathway via Efg1p (PKA-cAMP pathway); the pH response pathway via Rim101p, and the extracellular matrix response pathway via Czf1p. The repressor pathways act mainly through Tup1p or Rbf1p.

The signal transduction pathways that regulate pseudohyphal formation are not well established, but they seem to share some pathways controlling hypha formation (Berman & Sudbery, 2002; Sudbery *et al*, 2004). Recent research has shown that the idea of sharing transduction signals is consistent with the model suggested by Carlisle and Kadosh, in which genes specifically associated with the pseudohyphal form are merely a subgroup of those associated with the hyphal form (Carlisle & Kadosh, 2013).

1.4.3.1.- The MAPK pathway

In *S. cerevisiae* the MAPK (*Mitogen Activated Protein Kinases*) pathway, activated in response to pheromones, is involved in the mating process, pseudohyphal development and invasive growth. In *C. albicans* proteins homologous to those conforming this pathway in *S.*

Cerevisiae have been identified and it has been observed that they are involved in filamentation under nutrient starvation conditions (Fig E2) (Ernst, 2000b).



1.4.3.2. The PKA-cAMP pathway

The PKA-cAMP pathway plays a crucial role in the control of filamentation in *C. albicans*, *S. cerevisiae* and other fungi. In *C. albicans*, this pathway is needed for filamentation under many stimuli, such as nutrient starvation or the presence of an inducer such as NAcGlc or serum (Fig E2), (Ernst, 2000b).

1.4.3.3- Other pathways

In *C. albicans* the acid-to-neutral pH change induces hyphal formation at 37°C. *C. albicans* has a conserved pathway with other fungi. The transcription factor Rim101p regulates gene expression in response to pH and is activated by proteolysis, dependent on Rim8p and Rim20p proteins. The Efg1p transcription factor is able to act below or in parallel with Rim101p (Fig. E2) (Davis, 2003; Ernst, 2000b; Liu, 2001).

Invasive growth occurs during infection of a host or during growth in contact with semisolid agar medium. *CZF1* is not necessary for a response to serum, pH, NAcGlc or proline, but for filamentation in Spider medium. It is necessary for correct filamentation inside agar as a response to mechanical stress (Brown *et al*, 1999) or to a low oxygen concentration (Ernst, 2000b). It has been suggested that Czf1p could act by releasing the

repression due to Efg1p under such microaerophilic conditions (Ernst, 2000b; Giusani *et al*, 2002; Liu, 2001) (Fig. E2).

1.4.3.4.- Repression of filamentation

The transcription factors and other proteins involved in the growth and maintenance of the yeast form have been identified. Thus, the *tup1Δ* mutant grows as pseudohyphae in filamentation-inducing and non-inducing environments (Braun & Johnson, 1997). It is known that Tup1p is associated with the Nrg1p or Rfg1p transcription factors to create repressor complexes (Kadosh & Johnson, 2001; Khalaf & Zitomer, 2001; Liu, 2001). Ssn6p acts as a co-repressor in Tup1p complexes. The Rbf1p transcription factor represents another filament repression pathway (Ishii *et al*, 1997; Sharkey *et al*, 1999).

It has also been observed that the deletion of *RAD6* (Ernst, 2000b; Leng *et al*, 2000) and *RAD52* (Andaluz *et al*, 2006), involved in DNA damage control, also causes filament growth in non-inducing media, probably as a consequence of the decoupling of different cellular processes, such as nucleus division and cytoskeletal organization.

As a In conclusion, there are several signal transduction pathways involved in the control of the genetic program leading to hyphal formation, and the dimorphic switch occurs as a consequence of the integrated performance of these pathways (Fig. E2).

1.4.4.- Stress response pathways and their relationship to the morphological transition

Other pathways such as the response to the oxidative or osmotic stress pathways (HOG pathway) or the cell wall damage pathway (cellular integrity pathway) interact with the filamentation pathways by altering cellular differentiation patterns as a survival response (Fig. E2).

It has recently been proposed that MAPK Cek1p could be responsible for transmitting glycosylation defects, since O-glycosylation-affected mutants (*PMT* genes) have this Cek1p kinase activated constitutively (Cantero & Ernst, 2011). A possible sensor for these glycosylation defects seems to be the membrane protein Msb2p. This protein triggers the signal (through the Cek1p MAPK pathway) for cell wall integrity maintenance and filamentous growth (Ernst & Pla, 2011; Szafranski-Schneider *et al*, 2012).

In *C. albicans* most *S. cerevisiae* components of the MAPK Cek1p and Hog1p pathways are conserved. However, the sensors (Msb2p, Ssu81p and Sln1p) seem to be activated mainly as a response to oxidative stress rather than to osmotic stress. Oxidative stress defense mechanisms are relevant for *Candida* pathogenesis (Wilson *et al*, 2009). In *C.*

albicans it has been described that MAPK Hog1p participates in morphogenetic processes as a repressor of the dimorphic switch and as an inducer of chlamyospore formation (Alonso-Monge *et al*, 2003).

The cell wall integrity MAPK is activated in response to a wide variety of conditions such as nutrient starvation, oxidative stress, and osmotic and heat shock stress (Rodríguez-Peña *et al*, 2010). In *S. cerevisiae*, the membrane proteins, Mid2p and Wsc1p, act as the main sensors of this pathway (Rodríguez-Peña, 2010). Under cell wall stress conditions, for instance caused by treatments with Congo red, Calcofluor white, heat shock or glucan synthase inhibitors (echinocandins), these sensors interact with the GEF Rom2p, activating the small GTPase Rho1p, which then activates Pkc1p. The main role of activated Pkc1p is to trigger the specific MAPK module of this pathway. In *C. albicans*, this is carried out by phosphorylation of Bck1p that activates a Mkk1p, which finally phosphorylate the MAPK Mkc1p (Heilmann *et al.*, 2013). However, *MKC1* is essential for invasive growth in embedded media and in the process of biofilm formation (Kumamoto, 2005). Several glycosylation mutants have Mkc1p activated (Mora-Montes *et al*, 2007; Cantero *et al*, 2007; Ernst & Pla, 2011).

1.4.5.- Genome-wide transcriptional analysis of dimorphic transition

Many metabolic pathways that regulate a common set of genes have been described, and in general the lowest level for activation can be reached either by simultaneous stimulation of many pathways or by a strong stimulation of a single pathway (Ernst, 2000a).

Some genes whose expression is specific to filamentous cells have been identified in *C. albicans* (HSG: *Hyphal Specific Genes*). Some of them are *ECE1*, *HWP1*, *RBT1*, *SAP4*, *SOD5*, *ALS3*, *BMH2*, *FKH1* and *SSN6*. The expression of many of these genes depends on previously described transcription factors, but not all of them are required so there is specificity between the pathways and the differentially expressed genes (Sharkey *et al*, 1999). Many of them encode cell wall glycoproteins, suggesting that significant changes occur in the cell wall during hypha formation, and some of them encode proteins that are important virulence factors (Brown & Gow, 1999). Others, such as *HGC1*, encode a cyclin that allows the establishment and maintenance of polarized hyphal growth and prevents cell separation after cytokinesis (Wang, 2009).

Descriptions have also been made of many genes that, despite their expression in both morphologies (yeast and hypha), undergo changes in their transcription levels during the yeast-to-hypha switch. Among them there are genes that encode proteins located at the cell surface, such as *RBT4*, *PHR1* (Porta *et al*, 1999), *CHS2* (chitin-synthase, (Gow *et al*, 1994)) and *DDR48* (Lane *et al*, 2001, Nantel *et al*, 2002). Others code for proteins that are part of signal transduction pathways, such as the case of Efg1p, Pde2p, Ras1p and Nrg1p (Wang *et al*, 2009; Wilson *et al*, 2010; Piispanen *et al*, 2011; Moran *et al*, 2007).

It has not been possible to quantify the expression level of these genes in pure wild-type strain pseudohyphal populations of *C. albicans*, but according to the data reported by Kadosh and Johnson and those derived from mutants with this morphology, it seems that most HSG are expressed in pseudohypha, although at lower levels than in hypha (Doedt *et al*, 2004; Kadosh & Johnson, 2005). Recent studies have shown that this morphological switch does not involve only the under-expression of hypha-specific genes but also a differential expression of additional genes that have not been described previously. Among these, many are involved in protein synthesis (Carlisle & Kadosh, 2013).

2.- GLYCOPROTEINS AND THE CELL WALL

The cell wall is vital for fungal growth, survival and morphogenesis. Cell wall sensor proteins allow responses to environmental changes. Mucin-type proteins and other adhesion proteins mediate the fungal response and play an important role in the colonization of new habitats. The cell wall is also important in biofilm formation, which is an ecologically important process for many fungi. The cell wall provides critical adhesion properties for invasion and protection against host defense mechanisms (Chaffin, 2008).

The best studied cell wall is that of *S. cerevisiae* and the cell walls of ascomycota, among them *C. albicans* (Fig. E3), have been studied in depth. They have similar compounds and structures. The cell wall mainly consist of mannoproteins, glucans, chitin and lipids (Orlean, 2012). The loss of any of these compounds may affect fungal growth, morphology and viability to a drastic extent.

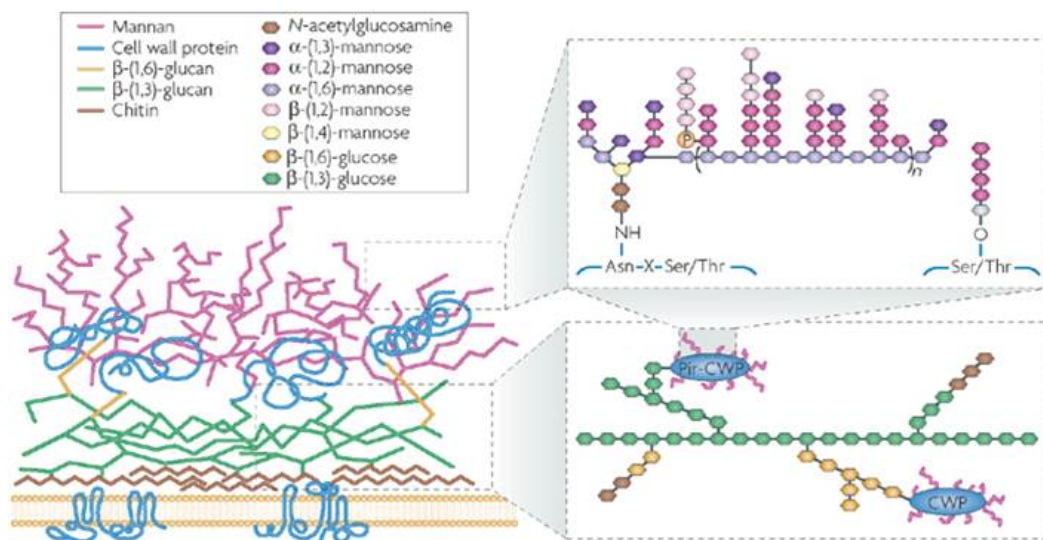


Fig. E3.- The structure of the *Candida albicans* cell wall (Netea *et al*, 2008).

2.1- Chitin and glucans

Chitin represents 2-6% of the *Candida* cell wall (Ruiz-Herrera *et al*, 2006). It is synthesized by chitin synthase. Chitin microfibrills have great resistance to traction and contribute significantly to cell wall rigidity and integrity. Most fungi characterized so far have many genes encoding chitin synthase. The presence of multiple chitin synthases suggests that they may have redundant roles, but it is also known that different chitin synthases are used to produce chitin during the different phases of the cell cycle or when the cell is in stress situations (Sanz *et al*, 2007; Lenardon *et al*, 2010).

β -glucan constitutes 54-60% of the cell wall. *C. albicans* cell wall consists of approximately 60% β -glucan (Ruiz-Herrera *et al*, 2006). β -1,3-glucan is found as a branched polymer (Latgé, 2007). β -1,3-glucan is the main cell wall construction block, conferring elasticity and resistance. Glucan is synthesized by a β -1,3-glucan synthase, a membrane-associated enzyme with multiple transmembrane domains. The *C. albicans* *GSC1* gene encodes the β -1,3-glucan synthase catalytic subunit.

β -1,6-glucan plays an important role in matrix formation. In *S. cerevisiae* β -1,6-glucan is linked to β -1,3-glucan, chitin and GPI proteins (Klis *et al*, 2006; Lesage & Bussey, 2006). Many genes involved in β -1,6-glucan synthesis have been identified in *S. cerevisiae*, such as *KRE5*, *BIG1* and *ROT1* (they encode proteins located in the ER which control the correct folding of proteins exiting the ER), *KRE6*, *SKN1*, *KRE9* and *KNH1* (they may act in the β -1,6-glucan linkage to the cell wall) and *KRE1* (required for normal levels of β -1,6-glucan to be reached). All of them have their orthologues in *C. albicans*.

2.2.- Cell wall proteins

2.2.1.- GPI proteins

The majority of the cell wall proteins are GPI proteins that are covalently bound to β -1,6-glucan (Kollár *et al*, 1997).

In silico analyses have suggested that *C. albicans* may contain between 115 (Richard & Plaine, 2007) and 234 (Eisenhaber *et al*, 2004) ORFs coding for GPI proteins.

Some GPI proteins allow adhesion to host tissues and are important for biofilm formation, while others are involved in adaptation to oxidative stress, and yet others have unknown functions. All of them have their own influence in pathogenesis.

2.2.2.- Pir proteins

A second class of proteins constitutes a small family with internal repeats: Pir (Proteins with Internal Repeats). These proteins are attached to cell wall β -1,3-glucan and are released by mild alkaline treatment. Some of them are retained by disulfide bonds (Garcerá *et al*, 2003; Lesage & Bussey, 2006).

2.3.- Cell wall lipids

Phospholipomannan (PLM) consists of mannosylated sphingolipids, formed by β -1,2-mannose covalently attached to the lipid domain through a phosphodiester bond with an α -mannose. Mit1p is the only transferase responsible for the addition of the mannan to the lipid (Mille *et al*, 2004). The PLM is then completed with β -mannose units thanks to the actions of Bmt5p and Bmt6p (Mille *et al*, 2012).

3.- N-GLYCOSYLATION PROCESSES

Glycosylation (together with phosphorylation) is one of the most frequent post-translational modifications, and it plays an important role in the development of all organisms (Zielinska *et al*, 2012). Most glycoproteins are localized outside the cell (in fungi, they are in the cell wall and membrane) and in compartments such as the ER and the Golgi apparatus, which are part of the membrane systems that are responsible for protein transport to the outer cell layers. Closely related to their localization, these proteins play important roles such as in cellular communication, organ development (in pluricellular organisms) and cell wall biogenesis and organization in yeasts.

There are many types of glycosylation, the most important being N-glycosylation, O-glycosylation and/or GPI anchoring. Since the objective of this thesis is to study N-glycosylation mutants, we shall focus on the explanation of N-glycosylation processes in general, and more specifically on what is known about these modifications in the Golgi apparatus based on other investigations performed in *C. albicans*.

3.1.- N-glycosylation in the ER

The N-glycosylation process begins in the ER with the transfer of $\text{Glc}_3\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$ (oligosaccharide core) from the lipid dolicholphosphate (DoIP) to the Asn residue of Asn-X-Ser/Thr sequences of the protein, X being any amino acid except proline.

The first steps consist of the assembly of this oligosaccharide precursor on the transporter lipid (DoIP), which takes place at the luminal and cytoplasmic sides of the ER

(Fig. E4). This process is mediated by enzymes encoded by *ALG* genes (Asparagine-Linked Glycosylation) (Burda & Aebi, 1999).

Then, the oligosaccharide precursor is transferred by an oligosaccharyltransferase (OST) complex to the Asn residues of the protein. The genes involved in these first steps of N-glycosylation are detailed in Fig. E4.

Once transferred, both Glc residues are cleaved by glucosidases and the chaperone calnexine (Cne1p) binds specifically to the oligosaccharide $\text{Glc}_1\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$. Then the last Glc residue is cleaved and the glycoprotein is released from calnexine if it is correctly folded. Otherwise a new Glc is added to the oligosaccharide and the glycoprotein reenters the calnexin cycle. The entry in this calnexin cycle is a checkpoint that allows redirection of correctly folded proteins to the Golgi apparatus, or keeps the unfolded proteins inside the ER for correct folding or degradation through ERAD pathway. After protein liberation from calnexin, two mannosidases (Mns1 y Mnl1/2) can cleave one or two mannose residues. The oligosaccharide processing is a checkpoint in N-glycosylation biosynthesis (Mora-Montes *et al*, 2007).

It is remarkably that not all N-glycosylation potential sites are glycosylated *in vivo*. About 2/3 of those sites are thought to be glycosylated (Zielinska *et al*, 2010; Apweiler *et al*, 1999). It has been postulated that the sequences surrounding glycosylation sites affect glycosylation. Moreover, the distance to transmembrane domains or to other glycosylation sites may also have influence in glycosylation (Nilsson & von Heijne, 1993).

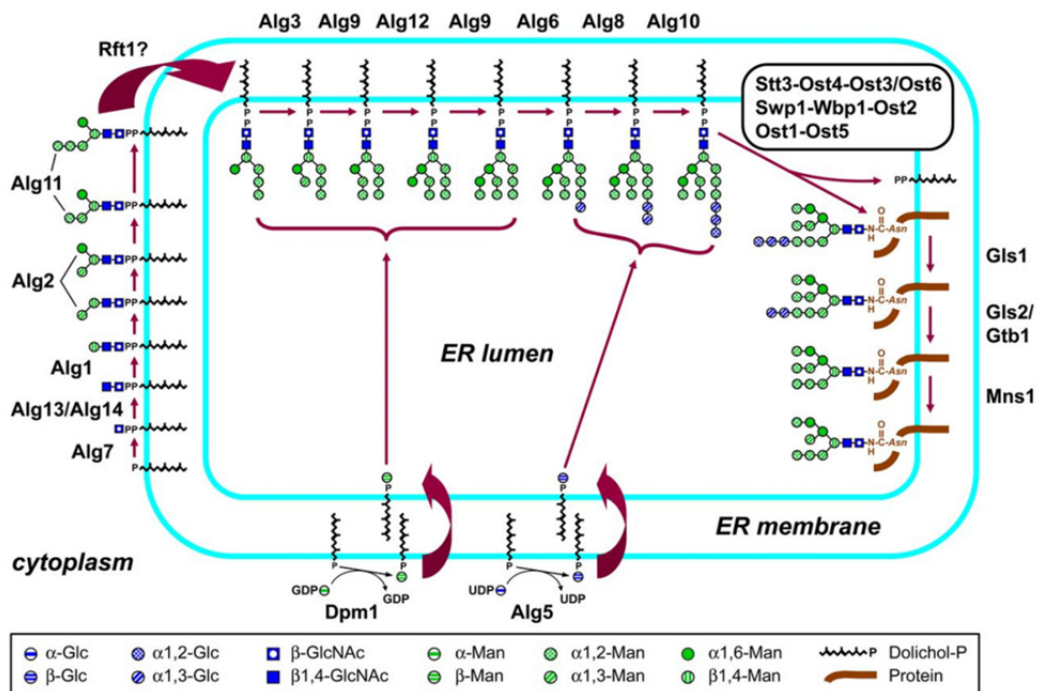


Fig. E4.- N-glycosylation in the ER scheme. Modified from (Orlean, 2012).

3.2.- N-glycosylation in the Golgi apparatus

The mature oligosaccharide $\text{Man}_8\text{GlcNAc}_2$ is structurally similar in all eukaryotes, however, the N-mannose outer chain elaboration pattern is fungal specific.

In fungi the oligosaccharide is modified in the Golgi apparatus by adding a high number of mannoses (about 200) (Dean, 1999), and these mannoproteins constitute about 40% of the yeast cell wall dry weight.

Many mannosyltransferases are fungal specific. They act sequentially in N-glycosylation process, catalyzing a concrete step. Many of them are encoded by gene families, and there is functional redundancy between family members (Hall & Gow, 2013; Bates *et al*, 2013). Studies are further complicated because some families may catalyze multiple reactions (Mora-Montes *et al*, 2010).

The addition of the first α 1,6-mannose is catalyzed by Och1p mannosyltransferase (Fig E5). As in the case of *S. cerevisiae*, *och1* Δ mutant in *C. albicans* lacks the outer mannan chain, but the oligosaccharidic core has additional mannose residues (Bates *et al*, 2006).

The initial α -1,6-mannose is elongated into an α -1,6-mannose backbone created by the sequential action of two enzymatic complexes: Mannan-polymerase I (M-Pol I) and mannan-polymerase II (M-Pol II). In M-Pol I complex of *S. cerevisiae* are Mnn9p and Van1p, while in M-Pol II are Mnn9p, Anp1p, Hoc1p and Mnn11p (Hashimoto & Yoda, 1997; Jungmann & Munro, 1998).

The *mnn9* Δ mutant of *S. cerevisiae* shows severe glycosylation defects; the oligosaccharide has a sole α -1,6-mannose linked to the oligosaccharide core so that further α -1,6-mannose addition to the backbone is blocked, resulting in the formation of a structure composed by $\text{Man}_{13}\text{GlcNAc}_2$ (Tsai *et al*, 1984; Hernandez *et al*, 1989). It has been described that *MNN9* orthologous deletion in *C. albicans* has diminished its total cell wall mannan levels by around 50% (Southard *et al*, 1999). It has been proposed that Mnn9p could be the protein that contributes the most to the α -1,6-mannose backbone of the outer core in *C. albicans*.

This backbone is further decorated with many branches composed of α -1,2-mannoses extending outside the backbone. In *S. cerevisiae* initial α -1,2-mannose is transferred to the lineal α -1,6-mannose backbone by Mnn2p and the extension of these branches with α -1,2-mannoses is carried out by Mnn5p (Rayner & Munro, 1998). In *C. albicans* genome a family with six members that may be orthologous to *MNN2* and *MNN5* has been identified (Hall *et al*, 2013). The initial mannose is transferred by Mnn2p and Mnn26p. The rest of the family members (Mnn21, Mnn22, Mnn23, and Mnn24) are required for

sequential addition of α 1,2-mannoses to the outer chain. Biochemical evidences suggest that Mnt5p is also necessary for the addition of the second α 1,2-mannose to the outer chain (Díaz-Jiménez *et al*, 2012), suggesting that it may be a certain redundancy degree in this mannan biosynthesis pathway in *C. albicans*.

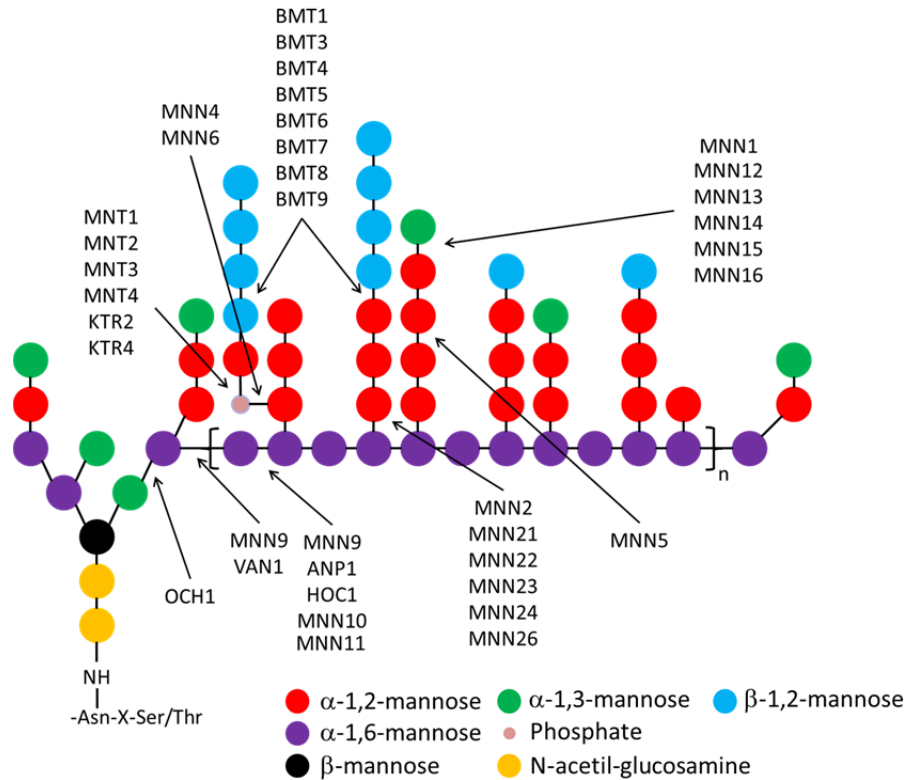


Fig. E5.- Scheme of the action of some genes involved in outer chain extension

After α -1,2-mannose chain addition, the outer chain is completed by α -1,3-mannose transfer carried out by Mnn1p (Yip *et al*, 1994; Romero *et al*, 1999). Recent investigations about *MNN1* family in *C. albicans*, have discovered that it comprises 6 members, and that just *MNN14* deletion causes virulence attenuation (Bates *et al*, 2013), suggesting a certain degree of functional redundancy between the family members.

Unlike *S. cerevisiae*, *C. albicans* N-mannan contains β -1,2-mannose which is transferred to the outer chain by BMT mannosyltransferases (Bmt1p, Bmt3p) (Mille *et al*, 2008). β -1,2-mannoses are found in oligosaccharidic chains attached by phosphate groups to the mannan acting as a common epitope for serotypes A and B in *C. albicans*. These oligosaccharides can be released from the rest of the mannans through a weak acid treatment (10mM HCl). In addition, in its acid stable fraction the A serotype contains, β -1,2-mannoses attached to α -1,2-mannoses. Some *Candida* mannans also have β -1,2-mannoses linked to α -1,3-mannoses residues (Shibata *et al*, 2007).

β -mannan acts as a strong antigen and is involved in cellular adhesion (Dalle *et al*, 2003; Han & Cutler, 1995). Hence, it has a vital role in immune system recognition.

β -1,2-mannan phosphodiester bound branched N-glycan linked residues form the phosphomannan or the acid-sensitive mannan. *C. albicans* extracted mannan shows a higher molecular weight than that extracted from *S. cerevisiae* and unlike this one it has β -1,2-mannose and a higher level of phosphomannose (Shibata *et al.*, 1992). In *S. cerevisiae* phosphomannan chain is initiated by the transfer of a mannosylphosphate to an α -1,2-mannoses lateral chain by Mnn6p (also known as Ktr6p) (Odani *et al*, 1997). Due to the high similarity degree between *KTR* family members and related proteins, there has not been found a clear homologue of *KTR6* in *C. albicans* (Delic *et al*, 2013) but *S. cerevisiae* and *C. albicans* glycans are phosphorylated unlike other yeasts such as *Kluyveromyces lactis* or *Schizosaccharomyces pombe* (Gemmill & Trimble, 1999; Jigami & Odani, 1999).

ScMNN4 encodes a positive regulator of *ScMNN6* (Odani *et al*, 1996). *mnn4 Δ* mutant in *C. albicans* lacks phosphomannan chains although it keeps β -1,2-mannose in the acid-stable fraction (Hobson *et al*, 2004; Singleton *et al*, 2005). On the other hand, it has been suggested that Mnn4p not only regulates the addition of α -1,2-mannan to the phosphomannan, but it may also have a global effect over the acid-stable mannan fraction (Hazen *et al*, 2007).

3.3.- The mannosyltransferase mutants acting in the Golgi apparatus

A description of mannosyltransferase mutant phenotypes are shown in Table EII (Hall & Gow, 2013). Mutants lacking mannosyltransferases show similar phenotypes such as slow growth rate, increment in flocculation degree and cell wall composition changes that involve not only a diminish in mannan percentage but an increase in other structural polymers amount such as chitin or glucan that may be explained as a compensatory mechanism to protect cell wall integrity. In fact, in some of them an activation of cell wall integrity pathway as well as defects in filamentation have been observed. Other common phenotype observed is a reduced virulence.

However, some individual gene mutations cause phenotypes harder to appreciate. This could be explained by the existence of families whose members have functional redundancy.

Table EII.- Phenotypes of Golgi apparatus N-glycosylation-affected mutants

GENE	PHENOTYPE					
	GROWTH AND MORPHOLOGY	CELL WALL	SENSITIVITY	ADHESION AND PHAGOCYTOSIS	VIRULENCE	REFERENCES
VRG4	Hypha (-) Flocculation (+)	PM (-)				(Nishikawa <i>et al</i> , 2002)
CWH41	Growth (-) Flocculation (+) Hypha (-)	PM (-) Glucan (-) Chitin (+) Proteins (+)	More to RC, CFW, SDS and antifungals		Murine (-)	(Mora-Montes <i>et al</i> , 2007)
ROT2	Growth (-) Flocculation (+)	PM (-) Mannan (-) Glucan (-) chitin (+) Proteins (+)	More to RC, CFW, SDS and antifungals		Murine (-)	(Mora-Montes <i>et al</i> , 2007)
MNS1	Growth (-) Flocculation (+)	PM (-)	More to RC and CFW	Macrophages (+)	Murine (-)	(Mora-Montes <i>et al</i> , 2007; McKenzie <i>et al</i> , 2010)
OCH1	Size (+) Growth (-) Separation (-) Hypha (-)	PM (-) Mannan (-) Chitin (+) Glucan (+)	More to RC, CFW, SDS, heat and antifungals	Epithelium (-) Neutrophils (-)	Murine (-)	(Bates <i>et al</i> , 2006; Sheth <i>et al</i> , 2011; Murciano <i>et al</i> , 2011)
Family MNN1	Hypha (-) in <i>mnn14Δ</i>	PM (+) in <i>mnn14Δ</i>	More to SDS and antifungals in <i>mnn14Δ</i>		Murine (-) in <i>mnn14Δ</i>	(Bates <i>et al</i> , 2013)
Family MNN2	Growth (-) and Flocculation (+) in double, triple, quintuple and sextuple mutant Hypha (delay in <i>mnn22Δ</i> , quintuple and sextuple mutants)	N-mannan (-) and PM (-) in double, triple, quintuple y sextuple. Chitin (+)	More to RC, CFW and SDS		Murine (-) <i>Galleria mellonella</i> (-)	(Hall <i>et al</i> , 2013; Bai <i>et al</i> , 2006)
MNN4	Normal	PM (-)	Normal	Neutrophils (-) Macrophages (-)	Normal	(McKenzie <i>et al</i> , 2010; Hobson <i>et al</i> , 2004; Sheth <i>et al</i> , 2011)
MNN9	Growth (-) Flocculation (+) Hypha (-)	Mannan (-)	More to antifungals	Epithelium (-)		(Southard <i>et al</i> , 1999; Murciano <i>et al</i> , 2011)
BMT1-9	Normal	Normal	Normal		Normal	(Mille <i>et al</i> , 2008)
MNT3-5	Flocculation (+) in multiple mutants	PM (-)	More to CFW,SDS and antifungals in multiple mutants	Macrophages (-)	Murine (-) in multiple mutants	(Mora-Montes <i>et al</i> , 2010; McKenzie <i>et al</i> , 2010)
MIT1	Normal	PLM (null) PM (- β- mannose)	More to calcium and SDS	Phagocytosis (+)	Murine (-)	(Mille <i>et al</i> , 2004)
PMR1	Hypha (delay)	PM (-) O-mannan (-)	More to RC, CFW, SDS, heat and antifungals	Neutrophils (-) Macrophages (-)	Murine (-)	(Bates <i>et al</i> , 2005; Sheth <i>et al</i> , 2011; McKenzie <i>et al</i> , 2010)

OBJECTIVES

The specific aims of this Thesis are:

- 1.- To construct a *Camnn1* Δ mutant using the "Ura-blaster" method.
- 2.- To analyze the phenotypic characteristics of the null mutants *Camnn9* Δ and *Camnn1* Δ and their sensitivity to cell wall-perturbing agents.
- 3.- To perform virulence assays to determine whether both mutants show defects in virulence.
- 4.- To determine the alteration in the glycosylation pattern of a reference glycoprotein synthesized by the mutants .
- 5.- To explore the activation level of the cell integrity, filamentation and osmotic/oxidative stress MAPK signal transduction pathways in the mutants.
- 6.- To perform a global expression analysis of *Camnn9* Δ and *Camnn1* Δ vs. CAI4 during yeast growth and filamentation.

MATERIALS AND METHODS

In this summary, we describe the most relevant techniques used.

1.- STRAINS AND PRIMERS

The following table shows the strains used in this work and their genotype.

Strain	Genotype	Parental strain	Source
SC5314	Clinical isolate		(Gillum <i>et al</i> , 1984)
CAI4	<i>ura3Δ::imm434/ura3Δ::imm434</i>	CAF 2-1	(Fonzi & Irwin, 1993)
CAMR	<i>ura3Δ::imm434/URA3</i>	CAI4	R.P.S. Rodrigues y A. Dominguez (2005)
SSCA-2 or <i>mnn9Δ</i>	<i>mnn9Δ::hisG/mnn9Δ::hisG ura3Δ::imm434/ura3Δ::imm434</i>	CAI4	(Southard <i>et al</i> , 1999)
CVM9-M9 or <i>mnn9Δ</i> -pMNN9	SSCA-2 transformed with pMNN9	SSCA-2	This work
CVM9-R or <i>mnn9Δ</i> -R	<i>mnn9Δ::hisG/mnn9Δ::hisG ura3Δ::imm434/URA3</i>	SSCA-2	This work
CVC-GFP or CAI4-GFP	CAI4 transformed with pCIV2	CAI4	This work
CVM9-GFP or <i>mnn9Δ</i> -GFP	SSCA-2 transformed with pCIV2	SSCA-2	This work
CVC-HEX or CAI4-HEX1	CAI4 transformed with <i>pHEX1-13xMYC</i>	CAI4	This work
CVM9-HEX or <i>mnn9Δ</i> -HEX1	SSCA-2 transformed with <i>pHEX1-13xMYC</i>	SSCA-2	This work
CVM1 or <i>mnn1Δ</i>	<i>mnn1Δ::hisG/mnn1Δ::hisG ura3Δ::imm434/ura3Δ::imm434</i>	CAI4	This work
CVM1-R or <i>mnn1Δ</i> -R	<i>mnn1Δ::hisG/mnn1Δ::hisG ura3Δ::imm434/URA3</i>	CVM1	This work

The next table shows the primers used in this work and their sequences.

Table EIV.- Primers used in this work

Primer	Sequence 5'-3'	Primer	Sequence 5'-3'
ACT1 S1	ACAGTTTCACTACTAGTGCTG	MNN9 qf	GACATTAGACGGTGTGGTGG
ACT1 S2	TGTGGTGAACAATGGATG	MNN9 qr	CCATTTTAGCAAATCCTTCC
ACT1(RT)-f	TTGGATTCTGGTGATGGTGT	MNN9 reconstruction forward	TGTTGATTGTAGCTGTTCTTCG
ACT1(RT)-r	TGGACAAATGGTTGGTCAAG	MNN9 reconstruction reverse	GCTGTTGGTGGTTATAGTGATGA
AMH1	CCGAACATCAACCAATCGT	MNN9-1	TCAGCAATCATGGTTCAC
Ca MNN1 INNER	GTGGAGACTCGGTTTCCTCA	MNN9-2	GTGACCAGTCAAGTCTTG
Ca MNN1 OUTER	GTAAATGGTTTTTGAAGTCGCTAGT	MNN9-5	CCCGGGCAGCAATCATGGTTCAC
Ca1548P1	GTTGATGCCGGTACCCACAGT	MNN9-7	CCCGGGATTATAATGGAAAATAAG
Ca1548P2	CAGAGGAAAACCTCAGCAATTC	pBI MYC f	CCGGTAACGCTCTAGGATCTGTGA
Ca1548P3	CTGCAAAAATGTTGCACCC	pBI MYC r	AAACGACGGCCAGTGAATTCCC
Ca1548T1	GGGTAGCCGCGGAGTAAATAGA	pBI pPCK f	CGACGGATCCACTGTATTCCA
Ca1548T2	TGAATTGAGCTCCAGCAAGAAG	pBI pPCK r	GGTCTATCGCTAGTTTCG
Ca1548T3	ACCGGTGGTTCACGAGTA	PBI1	ATGCCCCCGGGACAAGGGAA
CaMNN1-3-INNER	GGGAGTCGGGTTATTGCA	PBI2	AAGGAACCGCCAGCAGGTGC
CaMNN1-3-OUTER	CTCATGCTGTTGTACCAC	FUN12 qf	GTTCTGACCGATCCAACCA
CaMNN9-3-INNER	CATAGAGCATTAAATGGCTC	FUN12 qr	CCAGCAGCAGTTTGACCTT
CaMNN9-3-OUTER	GGGTCGAAAGTGAGGAAG	PGA62 qf	CCAGCTCAAGAAACCACTCC
HEX1 f MYC	ATCGCAGATCTTGAACAAAATGG	PGA62 qr	AGCAACTGGGACAGCGTTAG
HEX1 r MYC	CTGGTGGATTTTAAATTAATCAC	SSU81 qf	TTCAGTTCACCACATGTACC
HIS1	ACGCATAGCTATTCAGAAATCAGG	SSU81 qr	GTCCTCCTCCACTACCACCA
HIS2	TTTCTCCATGGTTTCCAGAACAA	URA1	GGATACTATCAAACAAGAGG
IP2	TTACAATCAAAGGTGGTCC	URA2	AATGCTGGTTGGAATGCTTA
IP3	GGTACAGTTCCTCACATC		

2.- PLASMIDS

2.1.- pSNC1

A bacterial replicative plasmid constructed by Doctor Freida Monterola (2002) was used. It contains the *hisG-CaURA3-his G* cassette, inserted in pBluescript KS+ vector (Fonzi & Irwin, 1993).

2.2.- pLC14

It was described by Zaragoza (Zaragoza *et al*, 2002).

2.3.- pAG1

It was kindly provided by Gonzalez-Novo (Gonzalez-Novo *et al.*, 2004).

2.4.- pBI-SM [MP K12]

The *E. coli* and *C. albicans* replicative plasmid of 11.9 Kb was kindly provided by Dr. Joachim Ernst. It was constructed from pBI-1 and it contains the *SUC2* gene sequence in which the C-terminal region is fused with the MYC sequence for detection by western blot.

2.5.- pMR

E. coli replicative plasmid of 6.5 Kb constructed by Rita P. Rodrigues. This plasmid was used for *CaURA3* insertion in its original locus

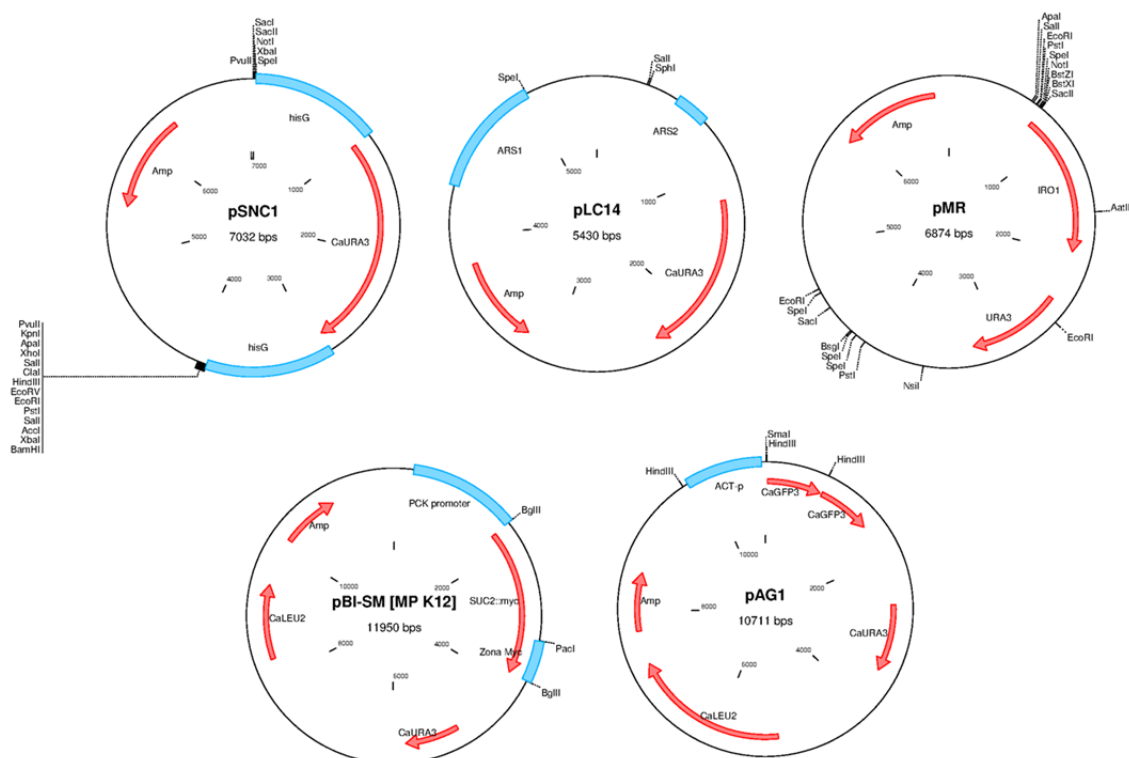


Fig E6.- Plasmids used in this work

3.- MEDIA AND GROWTH CONDITIONS

All media were prepared with distilled water. To obtain solid media, agar was added up to a final concentration of 2%, except in the cases indicated. The media were supplemented with 1mM uridine to allow Ura⁻ auxotrophic strain growth.

4.- VIRULENCE ASSAYS

Cultures of each *C. albicans* strain were grown in 100 ml of YEPD at 28°C until exponential growth phase. Cells were harvested, washed twice with 1X PBS and resuspended in this buffer. The final cellular concentration was verified both with a Thoma camera and by absorbance at 600 nm. Ten CD1 mice (males about 20 g weight) were inoculated intraperitoneally with 10⁸ *C. albicans* cells each. Mouse survival was monitored daily for 31 days since the day of infection.

Many authors have warned that differences in the expression of the *URA3* gene due to different locations of this marker in strains obtained by the URA blaster method, as well as the *IRO1* deletion present in CAI4-derived strains, may alter virulence (Brand *et al.*, 2004; Chibana *et al.*, 2005; Staab and Sundstrom, 2003). Accordingly, these experiments were carried out using strains in which one of their original *URA3* loci had been reconstructed. CAMR (*ura3Δ:imm434/URA3*) the control strain, was obtained previously from CAI4 at our lab by Rita P.S. Rodrigues.

5.- NUCLEIC ACID MANIPULATION TECHNIQUES

5.1.- Yeast total RNA isolation and purification

Cells were harvested from exponential-phase cultures (1.5-1.7 O.D.₆₀₀). The pellet was resuspended in a small volume of supernatant and frozen in liquid nitrogen. Frozen cells were deposited in Teflon chambers together with a tungsten ball, and a "Micro-Dismembrator" was used at 2000 rpm for 2 minutes to grind the frozen cells. Ground cells were transferred to 1 ml TRIzol® Reagent (Invitrogen), vortexed for 1 minute, and incubated at room temperature for 5 minutes. They were then centrifuged for 10 minutes at 11500 rpm and the supernatant was transferred to new Eppendorf tubes.

Chloroform (0.4 volumes) was added, mixing the sample by inversion. After 3-10 minutes of incubation at room temperature, the sample was centrifuged for 5 minutes at 11500 rpm. The aqueous phase was transferred to a new Eppendorf tube and 0.5 volumes of isopropanol was added, incubating the sample for 5-15 minutes at room temperature. It was then centrifuged at 11500 rpm for 10 minutes and the supernatant was carefully discarded.

The pellet was washed with 1 ml of cold 70% ethanol, vortexed, and centrifuged at 11500 rpm for 10 minutes. The supernatant was discarded and the pellet was dried for 1 minute in a vacuum centrifuge. The dried pellet was resuspended in 500 μ l of DEPC-treated water (RNase free) and 500 μ l LiCl buffer was added and the mixture was vortexed and kept at -20°C for 1 hour to allow the RNA to precipitate.

The precipitate was centrifuged at 13000 rpm at 4°C for 30 minutes. The pellet was washed with 1 ml of cold 70% ethanol and then centrifuged again for 10 minutes. It was next washed with 500 μ l of cold 70% ethanol and centrifuged again for 10 minutes. The ethanol was discarded and the pellet was dried in a vacuum centrifuge for 5 minutes. Finally, the RNA precipitate was resuspended in 50 μ l of DEPC-treated water and was stored at -20°C.

5.2.- Quantitative PCR

RNA was extracted as previously described. 8 μ g RNA was added to each reaction tube, after which the following components were added: DNase (1 μ l), 10X Buffer (2 μ l), DEPC-treated water (X μ l) up to a 20- μ l final volume. The mixture was then vortexed, centrifuged briefly, and incubated at 37°C for 30 minutes.

RNA was isolated by adding 1 ml TRIzol and 0.4 volumes of chloroform. Once mixed by vortexing, the sample was centrifuged for 10 minutes at 4°C, and the aqueous phase was transferred to a new tube to which 0.5 volumes of isopropanol was added. It was incubated for 20 minutes on ice and centrifuged for 20 minutes at 4°C. The pellet was dried and resuspended in 10 μ l of DEPC-treated water, incubating for 15 minutes at 37°C. The RNA was quantified (at least 1 μ g needed).

Then, cDNA synthesis from RNA was performed. For this, 2 reactions were carried out in parallel for each sample. One of them lacked retrotranscriptase (RT) and was used as a control. 1 μ l oligo(dT), 1 μ l dNTP Mix (10mM) and DEPC water were added to the RNA sample (1 ng - 5 μ g) up to a final volume of 12 μ l. This was incubated at 65°C for 5 minutes and rapidly frozen on ice. After a brief centrifugation, 4 μ l 5X First-Strand Buffer, 2 μ l 0.1M DTT and 1 μ l of RNase inhibitor were added. The reaction was mixed by pipetting and incubated at 42°C for 2 minutes. Then, 1 μ l of SuperScript II RT was added (the control tube lacked RT but 1 μ l of DEPC-treated water was added). The sample was mixed again by pipetting and incubated at 42°C for 50 minutes. It was then heated to 70°C and quickly chilled on ice for 1-2 minutes to inactivate the enzyme. To completely eliminate RNA, 1 μ l of RNase H was added and the reaction was incubated at 37°C for 20 minutes. The cDNA obtained was diluted 20:250 for later use.

Before starting the qPCR reactions, a conventional PCR experiment was carried out with each primer pair. Many decreasing concentrations were tested to determine the common minimum concentration of all the primer pairs that led to amplification.

6.- COMPARISON OF TRANSCRIPTION PROFILES USING DNA MICROARRAYS

6.1.- Introduction

6.1.1.- Primer design and synthesis

The development of *C. albicans* DNA microarrays was carried out by Eurogentec in collaboration with The Galar Fungail European Consortium (http://www.pasteur.fr/recherche/unites/Galar_Fungail/).

These microarrays contain 6947 ORF's represented by 60-bp primers designed and produced by EUROGENTEC. These primers were synthesized using the phosphoramidite method. For reasons of compatibility with the slide surface, the linker C6-NH₂ was added to all primers at their 5' end.

6.2.- cDNA-labelled probe preparation

6.2.1.- Total RNA isolation

This was performed as described previously.

6.2.2.- Labelled cDNA synthesis

For labelled cDNA synthesis, we used Cyanine 3-dCTP (Cy3) or Cyanine 5-dCTP (Cy5). These fluorochromes emit at 550 nm and 650 nm respectively. The labelling protocol provided in the "CyScribe First-Strand cDNA Labelling Kit" (GE Healthcare) by the manufacturer was followed.

6.2.5.- Labelled cDNA purification

In order to degrade the RNA, samples were subjected to alkaline treatment. 2 µl of 2.5 M NaOH was added, and they were vortexed, centrifuged for 30 seconds, and incubated at 37°C for 15 minutes. Then, 10 µl of 2M HEPES was added and the samples were vortexed and centrifuged for 30 seconds.

To extract unincorporated nucleotides the "CyScribe GFX Purification Kit" (GE Healthcare) was used, following the manufacturer's instructions.

Synthesized cDNA and fluorochrome were quantified using a NanoDrop 1000 device (ThermoScientific).

6.3.- Image acquisition

Each microarray image acquisition was carried out at the Genomics Service at the Cancer Research Center (USAL-CSIC) with a GenePix4000B scanner and its associated software (GenePix Pro 6.0). Many scans were performed, modifying the photomultiplication values (PMTs) to obtain images in which the mean intensities for both channels were balanced (mean ratio Cy5/Cy3 about 1).

6.4.- Data analysis

6.4.1.- *Identification of differentially expressed genes*

A comparison of transcription profiles was carried out between *C. albicans* mutants and the CAI4 wild-type under different growth conditions.

Each experiment was performed with two independent clones of each mutant strain (two biological replicates). Wild-type cDNA was synthesized from an RNA mix obtained from independent clones of this strain. The cDNA from one of the mutant clones was labelled inversely (dye swap). Thus, 3 hybridizations were performed for each condition. Considering that 3 microarrays were hybridized and that each gene was duplicated on each slide, most of the genes are represented 6 times in each experiment.

Table EV.- Different hybridizations and conditions tested

Condition	Camnn9 Δ				Camnn1 Δ			
	Nº Array	Batch	Cy3	Cy5	Nº Array	Batch	Cy3	Cy5
Exponential	31	B200H	CAI4	mnn9 clone 1	1	I180H	CAI4	mnn1 clone 1
	34	B200H	mnn9 clone 1	CAI4	2	I180H	mnn1 clone 1	CAI4
	1	K060H	CAI4	mnn9 clone 2	3	I180H	CAI4	mnn1 clone 2
Induction 15m	18	K060H	CAI4	mnn9 clone 1	10	I180H	CAI4	mnn1 clone 2
	19	K060H	mnn9 clone 1	CAI4	11	I180H	mnn1 clone 2	CAI4
	20	K060H	CAI4	mnn9 clone 2	12	I180H	mnn1 clone 1	CAI4
Induction 60m	9	K060H	CAI4	mnn9 clone 2	7	I180H	CAI4	mnn1 clone 1
	10	K060H	mnn9 clone 1	CAI4	8	I180H	mnn1 clone 1	CAI4
	11	K060H	CAI4	mnn9 clone 1	9	I180H	mnn1 clone 2	CAI4
Induction 180m	15	K060H	CAI4	mnn9 clone 1	4	I180H	CAI4	mnn1 clone 1
	16	K060H	CAI4	mnn9 clone 2	5	I180H	mnn1 clone 1	CAI4
	17	K060H	mnn9 clone 1	CAI4	6	I180H	mnn1 clone 2	CAI4

Once acquired, the images were analyzed with GenePix Pro 6.0 software. Each microarray spot was assigned to a specific gene; the image was scanned visually to deselect low quality or absent spots; the numerical values associated with each fluorochrome were extracted and finally a table with the results and quality of the data was obtained.

GeneSpring 5.0 software was used to normalize, integrate, statistically analyze and compare the different microarrays data.

The data were subjected to *per spot* and *per chip* intensity-dependent normalization (*Lowess*) applied to each microarray block.

The detection of differential gene expression in each condition was performed using the "*Wilcoxon-Mann-Whitney*" statistical group comparison test and the "*Benjamini and Hochberg FDR*" multiple test correction, with a p-value $\leq 0,02$. These analyses were only performed with genes whose fold-change was ≥ 1.5 in at least one hybridization (Garcia-Sanchez *et al.*, 2004).

Materials and Methods

Among the selected genes, only those whose average fold-change for the three replicates was ≥ 1.5 were considered. The genes obtained as described were then classified as up- or downregulated in the mutant.

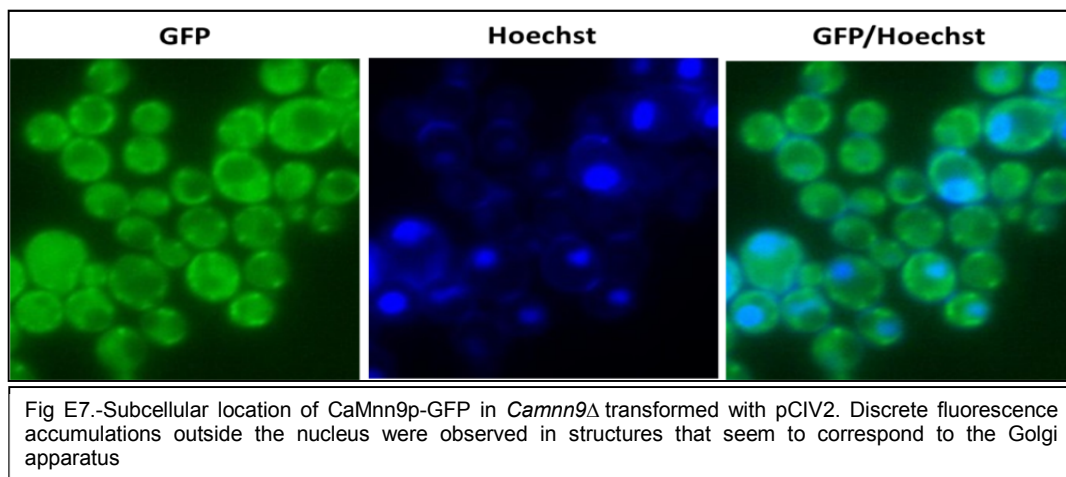
The *C. albicans* gene annotation introduced in GeneSpring 5.0 software and shown in this work is based in the information from the CGD database (<http://www.candidagenome.org/>).

RESULTS 1: Phenotypic studies of *mnn9* Δ and *mnn1* Δ .

1.- SUBCELLULAR LOCALIZATION OF Mnn9p

Previous studies in *Saccharomyces cerevisiae* showed that ScMnn9p was located in the Golgi apparatus (Jungmann & Munro, 1998; Okamoto *et al*, 2008). In order to determine the location of the CaMnn9p, *MNN9* was tagged at the C-terminus with GFP. For this aim, a fragment containing the Ca*MNN9-GFP* sequences was cloned into pAG1, generating replicative plasmid pCIV2 in which the tagged allele was under control of the actin promoter.

Cells containing Ca*MNN9-GFP* were grown on a YPD agar, scraped off the plate and observed with a DRMX (Leica) light microscope with a LEICA ebq 100 UV source, using adequate filters to visualize GFP and Hoechst fluorescence (Fig E7).



In CAI4 (results not shown) and *mnn9* Δ transformed with the pCIV2, GFP fluorescence was observed in discrete cytoplasmic areas excluded from the nucleus and in vacuoles and that seemed to correspond (as expected) to the Golgi apparatus.

2.- *Camnn1* Δ CONSTRUCTION

The *Camnn1* Δ mutant strain was constructed from CAI4 using the Ura-blaster method (Fonzi and Irwin, 1993). The nucleotide sequence from -4 to +2385 from the *MNN1* initial ATG was deleted. To check the correct construction of a *mnn1* Δ mutant we performed a Southern blotting experiment.

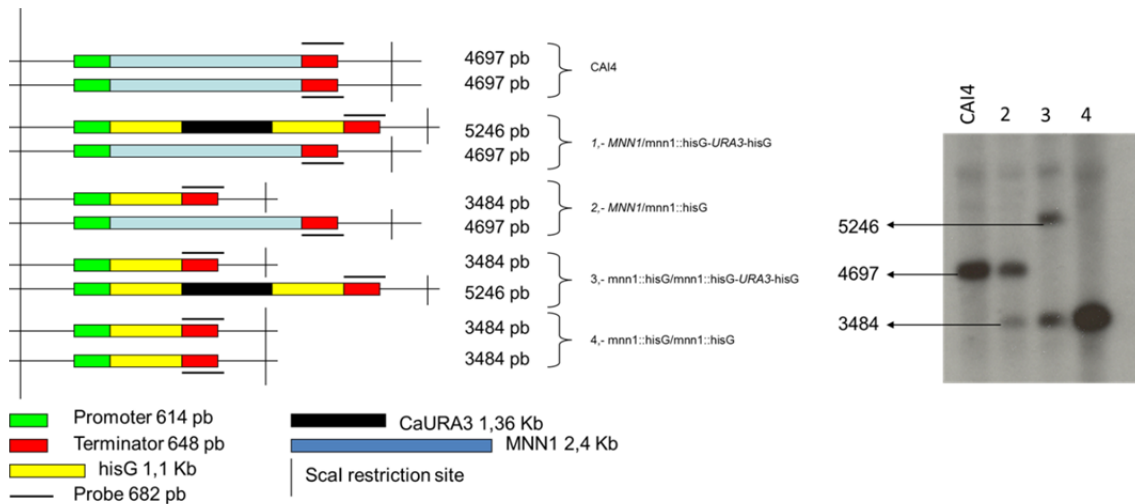


Fig.E8.-*MNN1* locus scheme in different strains generated during the deletion of both gene copies (left). Southern-blotting development showing the correct mutant strain construction (right)

3.- EFFECTS OF GENE DELETION ON CELLULAR MORPHOLOGY AND GROWTH

3.1.- Growth in liquid media at 28°C

3.1.1.-Optical microscopy

The CAI4 and *mnn9*Δ strains were cultured in YNB minimum liquid medium supplemented with uridine.

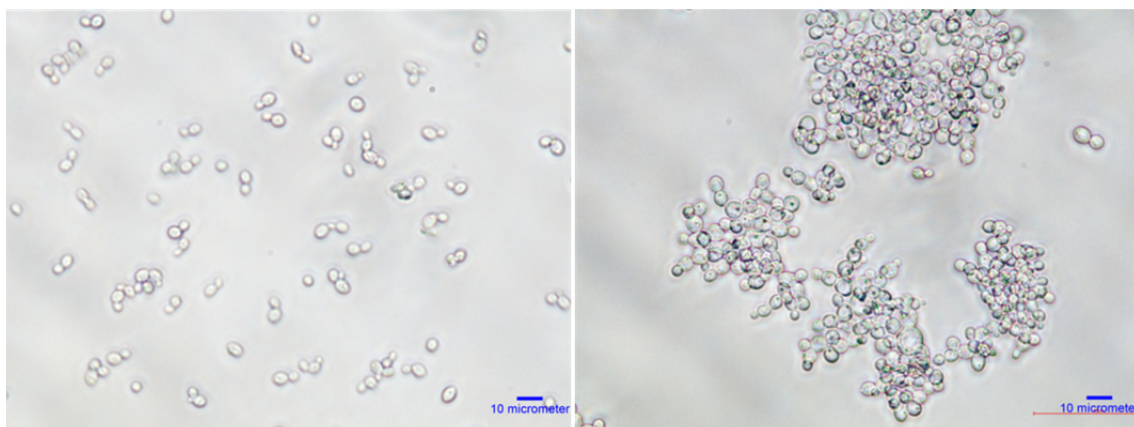


Fig E9.- CAI4 cells (left) and *mnn9*Δ cells (right). It can be observed cell aggregates in the culture of *mnn9*Δ.

*Camnn9*Δ cells form aggregates (Fig E9). Microscopic observation revealed that some *mnn9*Δ cells were slightly larger than wild-type cells. The *Camnn1*Δ cells did not show any morphological differences with CAI4.

In order to investigate if the average size of the *mnn9* Δ cells were different from the size of the wild-type cells, photomicrographs were taken with *ImageJ* (<http://rsbweb.nih.gov/ij/>) software, and the diameters of 100 cells from each strain were measured.

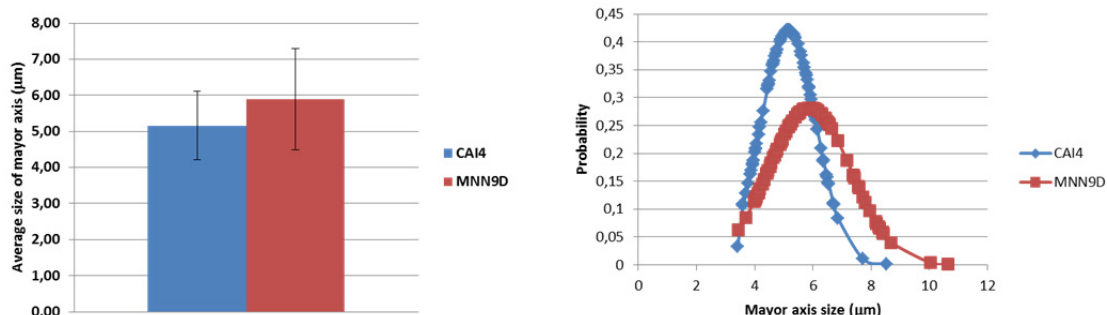


Fig E10.- Average size (left) and individual cell sizes (right) of CAI4 and *mnn9* Δ cells. The average size of the mutant cells is greater.

The fact that *mnn9* Δ cells tend to form clumps when growing in liquid culture medium should make them sediment rapidly after stopping agitation. To check this, we performed an experiment in which cells were cultured up to the exponential phase and then stopped the agitation. We observed that mutant cells sediment faster than wild-type cells (Fig E11).

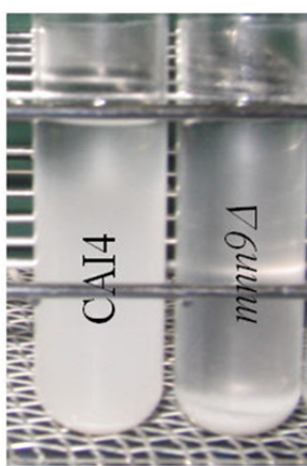
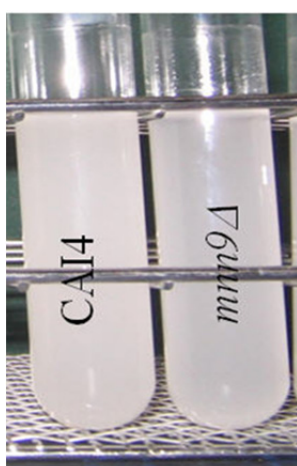


Fig E11.- Sedimentation assay. Images show cultures at 0 (left) and 5 (right) minutes after agitation

4.- EFFECTS OF GENE DELETIONS ON FILAMENTATION

We attempted to analyze the filamentation phenotype in both mutants in response to stimuli that trigger the yeast-to-hypha transition in *C. albicans*.

4.2.- Filamentation in liquid media

We checked the morphology of the mutant and wild-type cells under filamentous growth-inducing conditions in liquid media. Under these conditions, germ tube emission was observed during the first moments of incubation at 37°C. As shown in Fig E12, *mnn9Δ* exhibits defects in hypha formation.

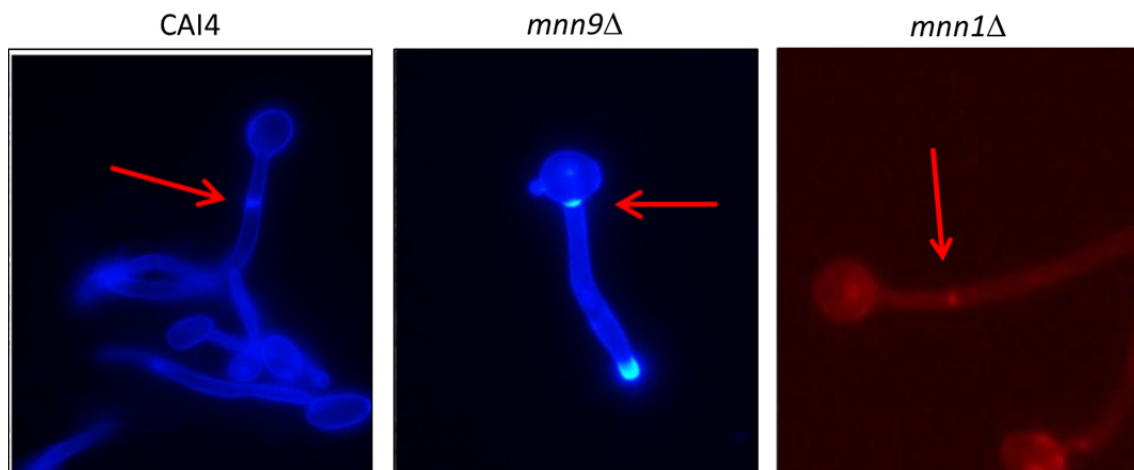


Fig E12.- Growth in Lee liquid medium at 37°C. Cells stained with Hoechst are shown. Like CAI4, the *mnn1Δ* mutant is able to form true hyphae while *mnn9Δ* form pseudohyphae. Red arrows show septa.

The images obtained after Hoechst staining confirmed that the *mnn1Δ* and CAI4 filaments were true hyphae, while in *mnn9Δ* the filaments were pseudohyphae. The first septum localized inside the germ tube, away from the neck in CAI4 and *mnn1Δ*, while in the *mnn9Δ* strains it is localized on the neck separating mother and daughter cells. A constriction at septum level can also be observed in the *mnn9Δ* cells while the *mnn1Δ* and CAI4 cell walls are parallel (Fig E13).

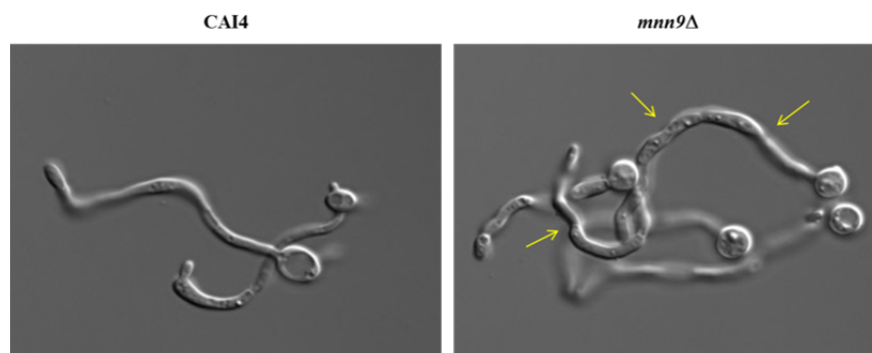


Fig E13.- Micrographs of CAI4 (left) and *mnn9Δ* (right) after 7 hours of filamentation. Constrictions (yellow arrows) are marked in cell walls

4.3.- Invasiveness assays

It has been described that both hyphal and pseudohyphal cells are able to invade host tissues (Sudbery *et al.*, 2004). In order to investigate whether mutant strains behaved similarly to the wild type regarding their ability to grow by penetrating solid media, we plated the strains on uridine-supplemented YNB plates. They were incubated for 72 hours and then gently washed with water to remove surface cells.

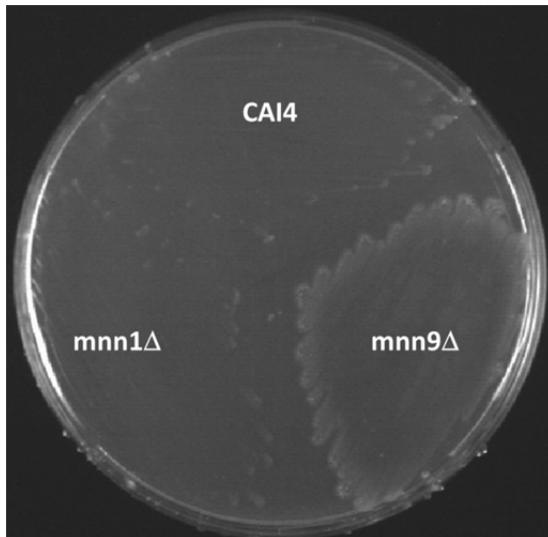


Fig E14.- Invasiveness assay. Plate after washing

As shown in figure E14, the *mnn9Δ* strain was able to grow by invading the agar plate while the wild-type and *mnn1Δ* was not.

4.4.- Biofilm formation

An important virulence factor in *C. albicans* is its ability to form biofilms on biotic or abiotic surfaces. During the development and maintenance of biofilms, processes of cell adhesion to the substrate, matrix-cell interactions and filament formation are very important. Since *mnn9Δ* has morphological defects and should have alterations in its cell wall mannoproteins, we attempted to investigate whether it was able to form biofilm in the same way as the wild-type strain.

Camnn9Δ displayed a severe defect in biofilm formation compared to wild-type strain (Fig E15). Biofilm was fragile and it was easily separated from the plastic surface as a consequence of the agitation applied during the incubation period, unlike the wild-type strain.

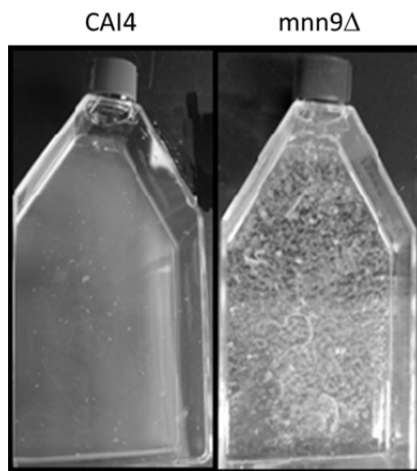


Fig E15.- Biofilm formation in RPMI-1640 medium at 37°C for 48 hours with gentle shaking.

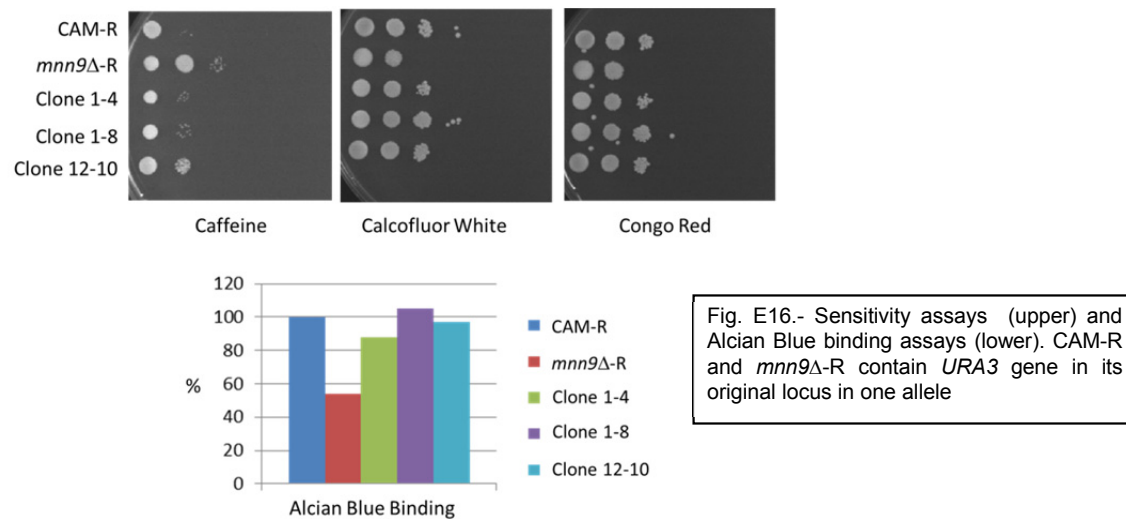
5.- EFFECT OF GENE DELETION ON CELL SURFACE INTEGRITY. COMPLEMENTATION ASSAYS.

In addition to analyzing the consequences of *mnn1Δ* and *mnn9Δ* deletions in morphogenetic processes, we analyzed whether the mutants have altered the cell surface integrity.

We performed an *Alcian Blue* binding assay to check if the mutants show any alterations in the mannoproteins exposed on the external surface of the cell wall. Differences in *Alcian Blue* binding assays are related to the synthesis, secretion or conformation of mannoproteins (Odani *et al.*, 1997; Corbacho *et al.*, 2005).

The results obtained are shown in figure E17. The *Camnn9Δ* strain shows 50% of *Alcian Blue* binding compared to CAI4, suggesting a mannosylphosphorylation defect on the mutant cell surface.

To determine the effect of *MNN9* deletion on cell wall integrity, the *mnn9Δ* and CAM-R strains were grown in the presence of a range of compounds associated with cell wall defects.



Sensitivity assays were performed by plating serial dilutions of a cellular suspension of each strain on solid-medium plates. Growth was checked after 3 days of incubation at 28°C.

The mutant strain was more sensitive to Calcofluor White and Congo Red than CAM-R, but it was also more resistant to caffeine.

We tested *mnn9Δ* and CAI-4 strains against antifungal treatments such as fluconazole, itraconazole and amphotericin. We observed that the *mnn9Δ* strain was more sensitive to itraconazole than CAI-4.

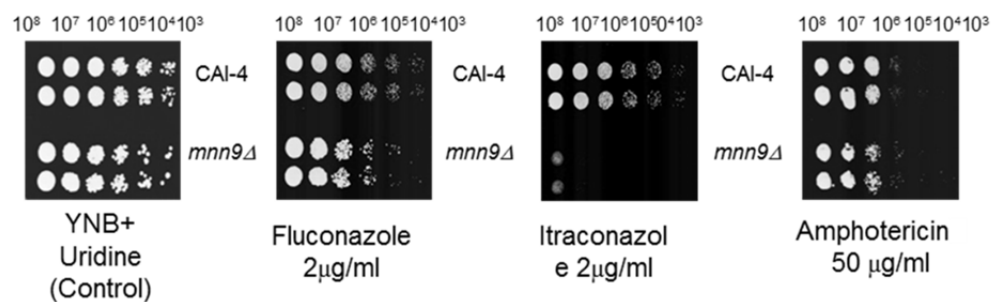


Fig E17.- Sensitivity assays to antifungals

Camnn1Δ did not show any difference against any of the compounds tested, suggesting that its surface integrity was not compromised.

In order to check that the effects observed in the *mnn9Δ* mutant were due to *MNN9* gene deletion, we attempted to reintroduce the *MNN9* gene in the mutant strain and test if wild-type phenotypes were rescued.

The pMNN9 plasmid was constructed from the pLC14 vector. It contains the *MNN9* ORF under the expression of its own promoter and it is able to replicate autonomously in *C. albicans*. pMNN9 was used to transform *mnn9* Δ . Once *mnn9* Δ had been transformed with pMNN9, many transformants were checked their phenotypes in the presence of certain cell surface-disturbing agents, and in an Alcian Blue binding assay. As seen in figure E16, the clones containing the pMNN9 plasmid were able to restore wild-type (CAM-R) phenotypes.

6.- EFFECT OF GENE DELETIONS ON VIRULENCE

In order to analyze the pathogenicity of the mutant strains in a murine model, 10 CD1 mice were infected with 10^8 or 5×10^8 cells and their survival curve was determined over 20 days.

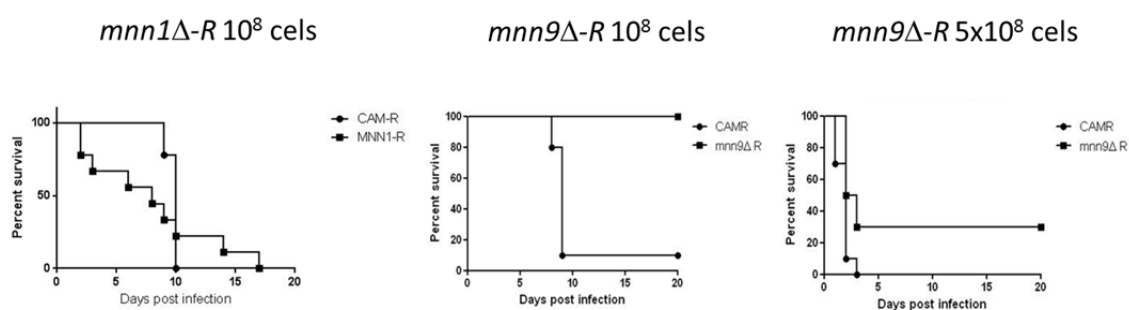


Fig E18.- Survival of mice infected with CAM-R, *mnn1* Δ -R and *mnn9* Δ -R

The *mnn9* Δ strain was less virulent than the wild-type, although it was not completely avirulent. The behavior of *Camnn1* Δ was similar to that of the wild-type.

7. EFFECT OF *MNN9* DELETION ON THE GLYCOSYLATION OF A REFERENCE PROTEIN

The reference protein used in these experiments was Hex1p, which is a heavily glycosylated protein in *C. albicans* (Cannon *et al*, 1994). We constructed a pHEX1-13xMYC plasmid from pBI-SM [MP K12]. pHEX1-13xMYC contains the *HEX1* ORF in-phase with the MYC epitope (allowing detection by western blotting) under the *PCK* promoter. The plasmid was introduced into *mnn9* Δ and CAI4.

One-dimensional electrophoretic analysis revealed no detectable differences in the molecular weights of Hex1p proteins synthesized by CAI4, *mnn1* Δ and *mnn9* Δ strains transformed with pHEX1-13xMYC (data not shown). To improve our analysis, we performed a two-dimensional electrophoresis with a pH range between 3-5.6 (Fig E19).

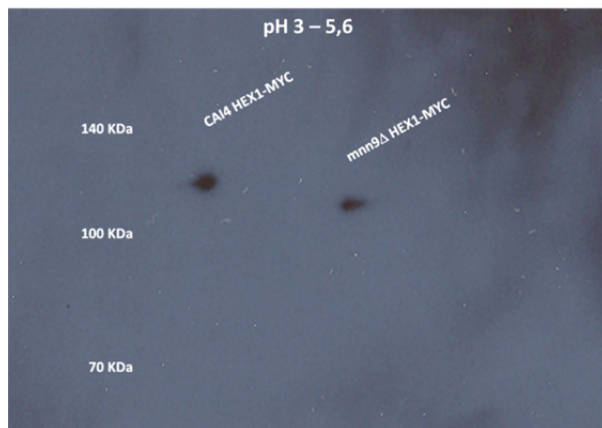


Fig E19.- Bidimensional electrophoresis of CAI4 and *mnn9Δ* total protein extracts running in the same gel. The image shows a western blot development with anti-Myc antibody detecting Hex1p synthesized by both mutants.

The Hex1p of *mnn9Δ* mutant had an increased electrophoretic mobility and showed to be more hydrophobic than that synthesized by CAI4, indicating that *mnn9Δ* synthesizes proteins with N-glycosylation defects (Fig E19).

8.- EFFECT OF GENE DELETIONS ON THE ACTIVATION OF MAPK PATHWAYS

Recent analyses performed in *C. albicans* mutants affected in glycoprotein synthesis have shown that they have altered stress MAPK signaling pathways (Ernst & Pla, 2011). We investigated the activation of Mkc1p, Cek1p and Hog1p in mnn9 -mutants.

Figure E20 shows a western blotting experiment in which Mkc1p was detected in its phosphorylated form. The antibody used also detected the phosphorylated form of Cek1p. In addition to the wild-type and mutant proteins we added extracts of cells treated with tunicamycin (an inhibitor of the oligosaccharide core synthesis). Extracts of cells treated with DMSO were also added as a control for tunicamycin-treated cells (DMSO is used to dissolve tunicamycin). All lanes were charged with 50 μg of total protein and checked by Ponceau staining (results not shown).

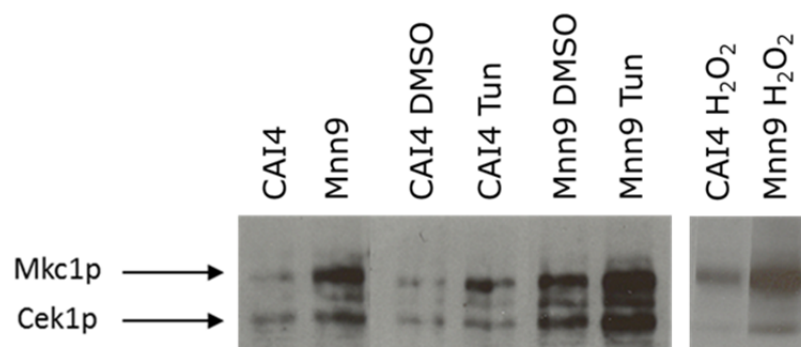
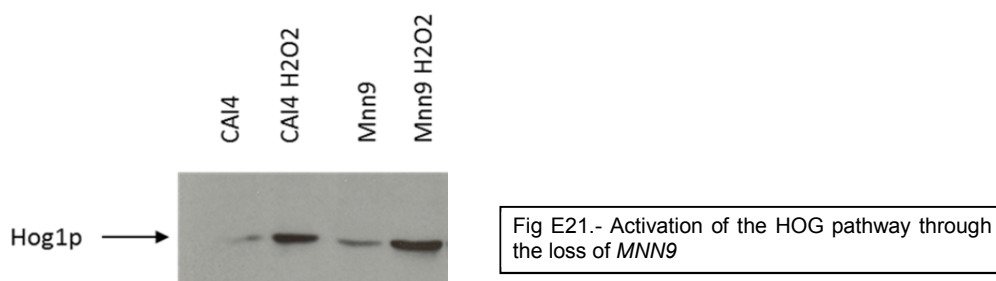


Fig E20.- Activation of the cell wall integrity pathway through the loss of *MNN9*

It can be observed that in the absence of stress, *mnn9Δ* has a higher amount of phosphorylated Mkc1p than the wild-type. These results indicate that the mutant has constitutively activated the cell wall integrity pathway. Both CAI4 and *mnn9Δ* strains are able to respond to tunicamycin treatment by activating Mkc1p. Although Mkc1p is activated in the absence of stress in *mnn9Δ*, this strain is able to respond to stress situations by increasing the amount of phosphorylated Mkc1p.

Figure E20 shows that H₂O₂ stimulates Mkc1p phosphorylation. Since oxidative stress is able to activate Mkc1p, we wished to investigate whether the Hog1p pathway, which mediates the oxidative and osmotic stress response (Alonso-Monge *et al*, 2003), was also constitutively activated in *mnn9Δ*. We performed a western blotting assay to detect phosphorylated Hog1p in *mnn9Δ* and CAI4 cells treated with or without H₂O₂.



Untreated mutant cells had higher levels of phosphorylated Hog1p than CAI4. However the mutant was still able to respond to oxidative stress by increasing Hog1p phosphorylation.

We performed the same type of experiments with the *mnn1Δ* strain.

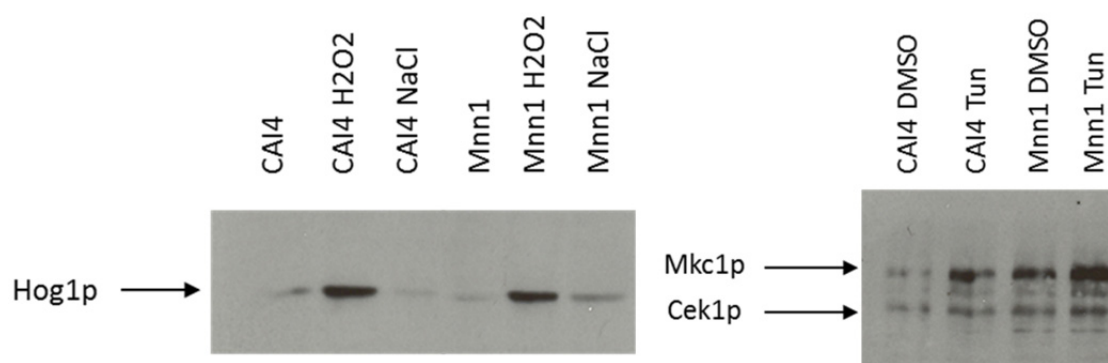


Fig E22.- Activation of HOG pathway (left) and cell wall integrity pathway (right) through the loss of *MNN1*

In *mnn1Δ*, Hog1p is activated in response to H₂O₂, similarly to wild-type cells. Phosphorylated Mkc1p intensity in untreated *mnn1Δ* cells was similar to that of CAI4-treated

cells, suggesting that *mnn1* Δ has the Mkc1p pathway activated constitutively, although it can respond to stress signals.

9.- CaMNN9 GENE EXPRESSION IN CAI4

Camnn9 Δ is unable to form true hyphae under induction conditions at 37°C. We attempted to discover whether under these conditions *MNN9* expression was regulated. We performed a quantitative PCR experiment to study the relative expression of the *MNN9* gene in the CAI4 strain at different times of filamentation induction (exponential growth and at 15, 60 and 180 minutes of induction).

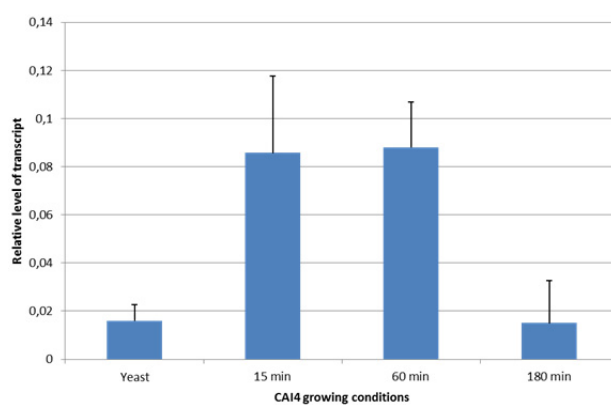


Fig E23.- *MNN9* gene expression in the CAI4 strain during yeast growth and at 15, 60 and 180 minutes of filamentation induction

It can be observed that *MNN9* expression was higher at 15 and 60 minutes of filamentation induction, and therefore more effects should be expected at these times in the mutant strain.

RESULTS 2: *mnn9* Δ and *mnn1* Δ transcriptional profiling

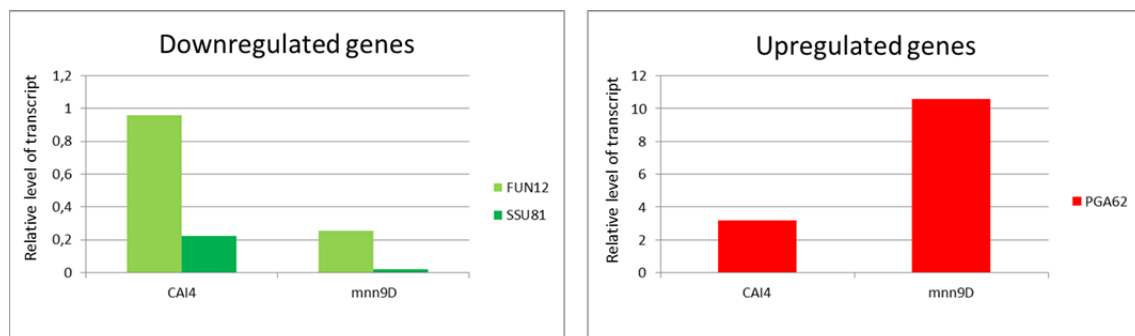
1.-TRANSCRIPTIONAL PROFILE OF *Camnn9* Δ and *Camnn1* Δ .

1.1.- Generalities of *mnn9* Δ and *mnn1* Δ transcriptional profiles

In order to study the transcriptional changes produced in both mutants we performed microarrays of *mnn9* Δ and *mnn1* Δ vs. CAI4 during exponential growth and at 15, 60 and 180 minutes of the dimorphic shift at 37°C.

Differentially expressed genes in each condition were obtained as previously described. Among the genes identified we only considered those whose mutant vs. wild type fold-change was ≥ 1.5 .

To check whether the data obtained with the microarray analyses were reliable, we analyzed the expression of some genes up- and downregulated in *mnn9* Δ by qPCR. The up- and downregulation results coincide with the microarray data.



	Array	qPCR
PGA62	8,881	10,58
SSU81	0,298	0,1
FUN12	0,114	0,263

Fig E24.- Downregulated (upper left) and upregulated (upper right) genes checked by qPCR in *mnn9* Δ during yeast growth. Values obtained for those genes in microarrays and qPCR assays (below)

In figure E25 the number of differentially expressed genes for each mutant and condition are shown. The name, description and fold-change of each are detailed in Supplementary Material.

A cluster-type analysis was performed in order to compare the different expression profiles for each condition in each mutant. The dendrogram in the upper part of the bottom of figure represent the similarity between different experiments.

mnn9Δ VS CAI4

mnn1Δ VS CAI4

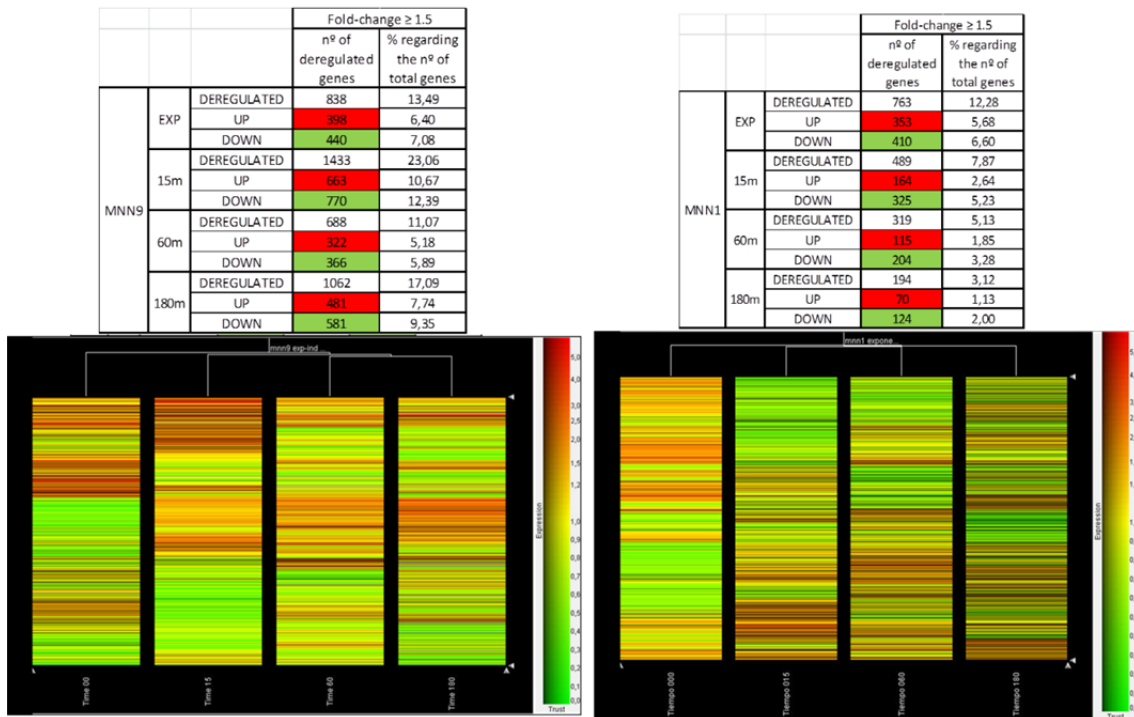


Fig. E25.- Number of differentially expressed genes in *mnn9Δ* (upper left) and *mnn1Δ* (upper right) under different conditions. Cluster analysis of differentially expressed genes in *mnn9Δ* (lower left) and *mnn1Δ* (lower right) according to their expression values.

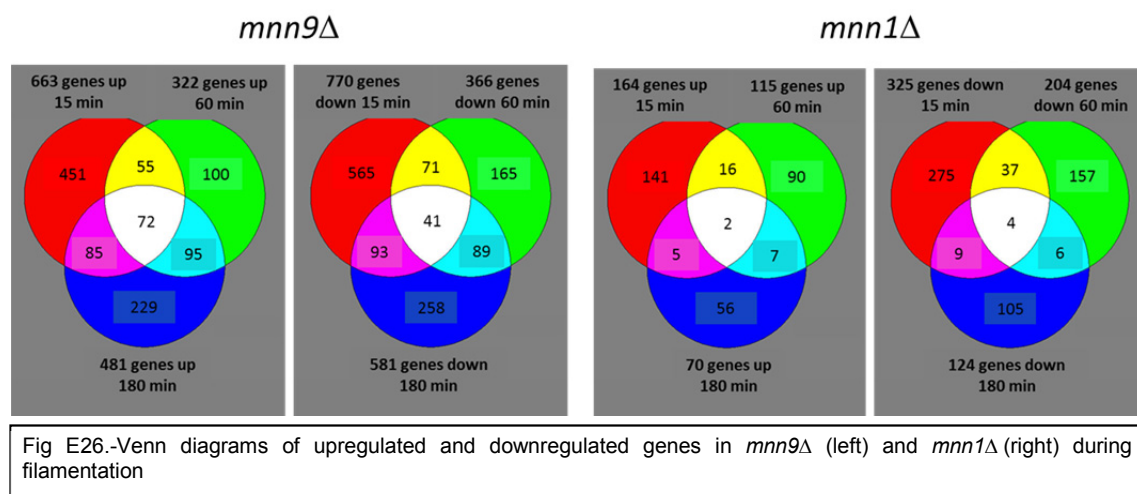
During growth at 28°C in Lee medium, 13.4% of the total number of *mnn9Δ* genes were deregulated while for *mnn1Δ* this value was 12.2% (Fig E25). We identified overrepresented functional categories.

Table EVI.- Statistically overrepresented functional categories in both mutants during yeast growth

	Upregulated			Downregulated		
	GO	Description	Genes deregulated/gene category	GO	Description	Genes deregulated/gene category
<i>mnn9Δ</i> exponential	44419	Interaction between organisms	28/232	42254	Ribosome biogenesis	34/154
	7155	Cell adhesion	12/70	50896	Response to stimuli	73/714
	9628	Response to abiotic stimuli	48/514			
	31505	Cell wall organization and biogenesis	18/143			

<i>mnn1Δ</i> exponential	Upregulated			Downregulated		
	GO	Description	Genes deregulated/gene category	GO	Description	Genes deregulated/gene categories
	19752	Carboxylic acid metabolism	46/233	Nothing to remark		
44248	Cellular catabolism	48/274				

In order to calculate the number of common genes up or downregulated between the three induction times we analyzed the data using Venn diagrams.



1.2.- Analysis of differentially expressed genes in *mnn9Δ* and *mnn1Δ*

As our mutants are defective in protein N-glycosylation, we investigated if among the differentially expressed genes we could find a significant percentage of them coding for N-glycosylated proteins.

1.2.1.- Deregulated genes coding for potentially N-glycosylated proteins

We have been unable to find a list of genes coding for N-glycosylated proteins in *C. albicans*. Zielinska et al. (Zielinska *et al*, 2012) have carried out mass spectrometry experiments of N-glycosylation sites in proteins of many organisms. From their experimental data obtained for *S. cerevisiae* we identified a list of orthologous genes in *C. albicans* that coded for potentially N-glycosylated proteins. This list contains 211 genes (3.4% of *C. albicans* genes). In the Table EVII the number of these deregulated genes in *mnn9Δ* and *mnn1Δ* mutants is detailed.

Table EVII.- Deregulated genes coding for glycoproteins in *mnn9Δ* and *mnn1Δ*, number of total deregulated genes in each mutant and condition tested, and their correspondent percentages.

	<i>mnn9Δ</i>				<i>mnn1Δ</i>			
	N-Glycoproteins	Deregulated	%	p-value	N-Glycoproteins	Deregulated	%	p-value
Yeast	26	838	3,1	0,07	30	763	3,9	0,05
15 min	60	1433	4,2	0,01	13	489	2,6	0,07
60 min	27	688	3,9	0,06	11	319	3,4	0,12
180 min	36	1.062	3,4	0,07	9	194	4,6	0,09

It does not seem to be any overrepresentation of genes coding for N-glycosylated proteins among the differentially expressed genes in *mnn9Δ* or *mnn1Δ*. The p-values obtained using the hypergeometric distribution (Tavazoie *et al*, 1999) are not significant, except data obtained for *mnn9Δ* at 15 minutes of induction (although p-value 0.01 is not highly significant).

1.2.2.- Genes involved in N-glycosylation in the Golgi apparatus

In order to investigate whether the functions performed by deleted genes are supplemented by the overexpression of other genes, we performed expression analyses of genes involved in protein N-glycosylation.

During yeast growth, it was observed that in *mnn9Δ* there were no deregulated gene coding for α -1,6-mannosyltransferases that could supply Mnn9p loss. We observed the overexpression of *MNN22* and *BMT4* (encoding an α -1,2 and a β -1,2-mannosyltransferase, respectively). These results suggest that *mnn9Δ* could synthesize shorter α -1,6-mannose chains with longer branches in comparison with parental strain.

During filamentation, the upregulation of some members of the MNN2 family (α -1,2-mannosyltransferases) and MNN1 family (α -1,3-mannosyltransferases) and other genes such as *BMT6* (β -1,2-mannosyltransferase) is remarkable.

Table EVIII.- Deregulated genes involved in N-glycosylation in *mnn9Δ* and *mnn1Δ*.

Calb	mnn9 Yeast	mnn9 15	mnn9 60	mnn9 180	mnn1 Yeast	mnn1 15	mnn1 60	mnn1 180
ANP1		0.259				1.777		
BMT1				0.578				
BMT4	1.783							
BMT6		4.851	1.649	2.514	0.534			
HOC1		0.526						
KTR2		0.483						
MNN1		1.962	3.498	3.995				
MNN10			1.522	2.114				
MNN14		1.619						
MNN15		1.934						
MNN21		0.662						
MNN22	1.868	3.572	2.72	2.361				
MNN23		2.243				0.63		
MNN24		2.841						
MNN26		1.731		1.521				
MNN4		1.884						
MNN9	0.308		0.276	0.313				
MNT2		0.551				1.577		
MNT3		0.596			0.653		0.55	
OCH1				1.599				

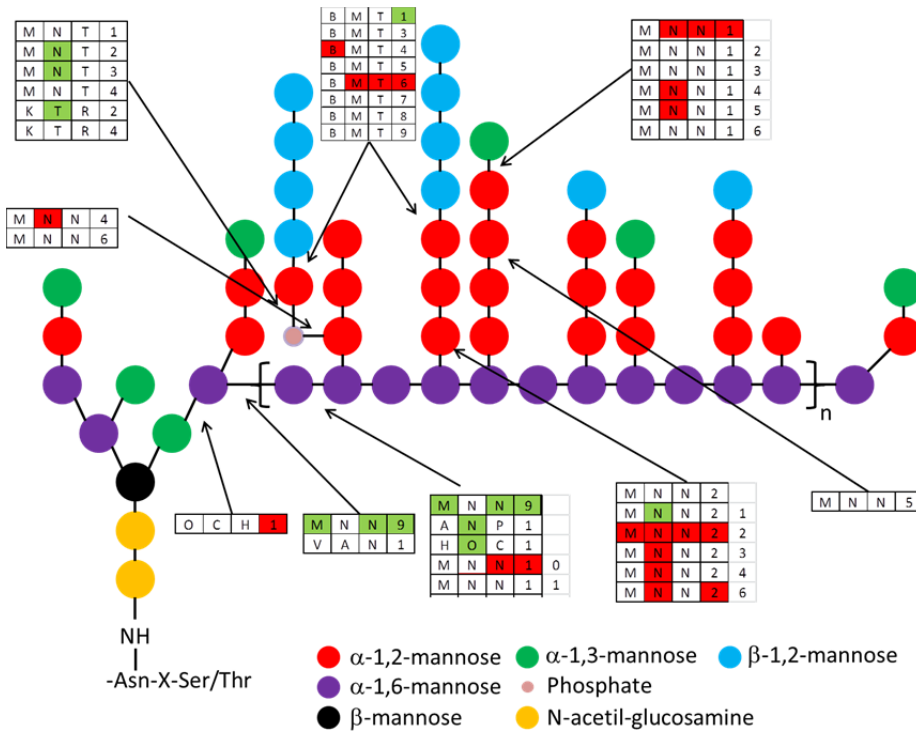


Fig E27.- Genes involved in N-glycosylation in the Golgi apparatus and their expression in *mnn9* Δ during yeast growth and at 15, 60 and 180 minutes of induction. Each gene is divided into 4 squares representing each time analyzed, from left to right: yeast growth, 15, 60 and 180 minutes of induction. Red squares mean upregulation; green squares downregulation, and white squares depict an expression similar to that of the wild-type strain.

1.2.3.- Genes coding for cell surface-associated proteins

Most glycoproteins are located at extracellular compartments. Defects in glycoproteins synthesized by *mnn9* Δ or *mnn1* Δ may affect the organization of cell wall and membrane.

We created a gene list including the "Cell surface" (GO0009986) and "Cell wall" (GO0005618) categories on the "Gene Ontology AmiGo" web page (<http://amigo.geneontology.org/cgi-bin/amigo/go.cgi>) for *Candida* and other genes that encode cell wall and membrane proteins identified by Chaffin, Vialás, and Richard and Plaine (Chaffin, 2008; Richard & Plaine, 2007; Vialás et al., 2012).

From Of this list of 373 genes (6% of the whole *Candida* genome), 83 were deregulated in *mnn9* Δ (9.9% of total deregulated genes in *mnn9* Δ , 22.2% of the list elaborated) growing in a yeast form, 51 being upregulated and 32 downregulated. These data reflect that among deregulated genes in *mnn9* Δ , there is a significant percentage (with a p-value of 5.9×10^{-7}) of genes coding for surface proteins.

1.2.3.1.- Genes deregulated under stress conditions

We searched for genes that changed their expression profiles when cells were brought under stress conditions such as caspofungin or high temperature.

Bruno et al. defined a group of 38 proteins encoding cell wall proteins that are deregulated in the presence of caspofungin (Bruno et al., 2006), which inhibits β -1,3-glucan synthesis. We observed 10 of these genes (Table EIX) deregulated in *mnn9* Δ during yeast growth (p-value of 0.016).

CRH11, *PGA13* and *PNG2* are upregulated in *mnn9* Δ . Its upregulation is associated to cell wall remodeling. *CRH11* is coding for a chitin transglycosydase (T. T. Liu et al., 2005; Y. Liu et al., 2013; Sorgo et al., 2011), *PGA13* is induced when protoplasts are regenerating their cell wall (Castillo et al., 2006; Gelis et al., 2012; Mora-Montes et al., 2010) and *PNG2* encodes for an enzyme that removes glucans from proteins (Bruno et al., 2006).

Our results showed that *mnn9* Δ was cell-wall stressed

Genes with altered expression in *mnn1* Δ , considering all conditions, accounted for about half of those present in *mnn9* Δ and in most cases their fold-change levels were much lower.

Table EIX.- Some deregulated genes in *mnn9Δ* and *mnn1Δ* during yeast growth including GPI proteins (Richard & Plaine, 2007), caspofungin stress (Bruno et al., 2006) and high-temperature stress genes (Heilmann et al., 2013).

Calb	Description	mnn9 yeast	mnn1 yeast	Bruno (Casp)	Heilmann (Temp)
ALS3	ALS family adhesin	93.56	1.916		v
ALS2	ALS family adhesin	56.27			v
RBT5	GPI Glycoprotein	22.22			v
PGA6	GPIProtein	22.07	0.607		
ALS4	ALS family adhesin	21.33			v
PGA62	GPI Protein. Cell wall regeneration induced	8.881			
PGA54	GPI Protein. Hyphal formation induced	8.573			
PGA13	GPI Protein, mucin-like	7.502	1.878	v	
SSR1	b-glucan-associated protein. Structural role	7.419			v
orf19.675	Possible cell wall protein. Hypoxia-induced	6.172		v	
PGA38	GPI Protein. Cell wall regeneration repressed	4.575			
PIR1	Cell wall structural glycoprotein	4.398			v
CRH11	GPI Protein. Chitin transglycosidase	3.821		v	v
PGA23	GPI Protein	2.966			
orf19.7104	Mucin-like	2.693			
PGA4	GPI Protein, possible b-1,3-glucanosyltransferase	2.647			v
AAF1	Involved in flocculation and adherence	2.587		v	
PNG2	Possible glucanase; expression increased during hypoxia	2.557	2.299	v	
SAP9	GPI Glycoprotein ; aspartylproteinase	2.501			v
TOS1	a-agglutinin-like	2.065			v
FGR41	GPI Protein. Involved in filamentous growth	2.013			
ECM33	GPI Protein	1.648			v
orf19.5267	Cell wall protein	0.583		v	
orf19.2846	Transcription-regulated during filamentation	0.521		v	
RHD3	GPI Protein. Downregulated during filamentation	0.516			v
PGA45	GPI Protein	0.205		v	
MET3	Possible ATP sulfurylase	0.048 6		v	
FET33	Possible iron oxidoreductase	0.036 7		v	
STP4	Transcription factor		2.123	v	
DDR48	Immunogenic stress-associated protein. Essential for filamentous growth		1.914	v	
HWP1	Hyphal cell wall protein		1.714		
PHR2	Glycosidase. Involved in cell wall structure. Rim101p-regulated		1.589		v
PGA1	GPI Protein. Cell wall regeneration induced. Required for adhesión		0.652		
DFG5	Cell wall and membrane mannoprotein. Possible signal transducer		0.593		
ECM331	GPI Protein. Hypoxia-induced		0.506	v	v
PGA33	GPI Protein		0.428		
PGA7	GPI Protein. Hyphal Surface antigen precursor. Cell wall regeneration induced		0.42		
PGA56	GPI Protein. Cell wall regeneration- and filamentation-induced		0.349		
YWP1	Cell wall and secreted protein. Involved in adhesion		0.269	v	v

Heilmann et al. (Heilmann et al., 2013) investigated cell wall proteome changes when cells were grown at 42°C. Twenty five proteins were identified in their work. Some of these proteins have already been identified in other stress situations, such as in the use of antifungal drugs. Twelve of these proteins were deregulated in *mnn9Δ* while four were deregulated in *mnn1Δ* (Table EIX).

In *mnn9Δ* we found upregulated 3 members of ALS family adhesins as well as *SSR1* and *PIR1* (Garcerá et al., 2005). *PIR1* is involved in organization and remodeling of the cell wall and in β -1,3-glucan binding (Martínez et al., 2004). We also found upregulated *SAP9* coding for an aspartyl protease involved in cell wall integrity and adhesion (Albrecht et al., 2006), *ECM33* involved in cell wall integrity and *PGA4* coding for a β -glucanosyltransferase.

The elevated number of these deregulated genes group in *mnn9Δ* (12 of the 25 described by Heilmann, with a p-value of $2,7 \times 10^{-5}$) suggests that the response to defects in glycosylation due to the lack of *MNN9* shares characteristics with survival at high temperature.

1.2.3.2.- Cell wall remodeling and biosynthesis

Proteins altered in the N-linked glycan may prevent the correct interactions and cohesion of cell wall components, which may trigger compensatory mechanisms involving structural remodeling. Among the genes described in the previous section, some are involved in cell wall remodeling. β -1,3 glucan constitutes the central cell wall backbone to which the rest of the components are linked. *GSC1* (coding for a β -1,3 glucan-synthase subunit) and *RHO1* (coding for a GTPase that regulates β -1,3 glucan synthesis) are upregulated during yeast growth in *mnn9Δ*. *XOG1* coding for an enzyme of β -1,3-glucan hydrolysis is also upregulated. *CHS7* (required for *CHS3* activity) and *CHS8* (chitin synthase) upregulation in *mnn9Δ* during the yeast-hypha transition is significant among the proteins related to chitin biosynthesis. Other deregulated genes involved in cell wall polymer modifications are *PGA4* (glucanosyltransferase), *UTR2* (chitin transglycosidase), *PHR2* (glucan glycosidase) and *SUN41* (glucan hydrolase).

Table EX.- Some deregulated genes in *mnn9* Δ and *mnn1* Δ involved in glucan and chitin biosynthesis

Calb	Description	mnn9 Yeast	mnn9 15m	mnn9 60m	mnn9 180m	mnn1 Yeast	mnn1 15m	mnn1 60m	mnn1 180m
CHS1	Chitin synthase			2.234					
CHS2	Chitin synthase				2.126				
CHS4	Chs3 chitin synthase activator						2.234		
CHS7	Required for Chs3p activity		1.712	1.511	1.552				
CHS8	Chitin synthase required for chitin fibril synthesis		2.739	1.915					
CHT2	Chitinase				0.462				
GSC1	β -1,3-glucansynthase subunit. mRNA decreases during dimorphic shift	2.657	0.469						
SUN41	Glucan- hydrolase required for cell separation		0.519	0.378	0.368			1.692	1.612
XOG1	Exo-1,3- β -glucanase,	1.78	2.478				0.452		
PDI1	Disulfurisomerase	1.754	1.758			1.635			2.384
RHO1	GTPase required for β -1,3-glucan synthesis	2.217	0.625	0.599	0.421				

1.2.3.3.- Flocculation- and adhesion-related genes

Genes involved in adhesion and flocculation were deregulated with high fold-change values during yeast growth in *mnn9* Δ . Three ALS family members coding for adhesins are upregulated in *mnn9* Δ : *ALS2* and *ALS4* (abiotic surface adhesion) and *ALS3* (induced in the wild-type during filamentation). We also found *PGA62* and *AAF1* to be upregulated. Pga62p has flocculin characteristics (Flo1p in *S. cerevisiae*) and CaAAF1 orthologue expression in *S. cerevisiae* increases epithelial cell adherence and flocculation (Li & Palecek, 2005).

In *mnn1* Δ during yeast growth we only found *ALS3* (although with lower fold-change levels than in *mnn9* Δ) together with *HWP1* to be upregulated.

Table EXI.- Flocculation- and adhesion-related deregulated genes in *mnn9* Δ and *mnn1* Δ during yeast growth.

Calb	Description	mnn9 yeast	mnn1 yeast
AAF1	Enhances flocculation and adherence	2.587	
ALS2	Involved in adhesion and biofilm formation	56.27	
ALS3	Adhesin	93.56	1.916
ALS4	Involved in adhesion	21.33	
HWP1	Hyphal cell wall protein		1.714
PGA62	GPI protein. Cell wall regeneration-induced	8.881	

1.2.3.4. Sensors of cell wall defects

Genes coding for deregulated sensors in *mnn9Δ* are described in the table EXII. The WSC family is upregulated in *mnn9Δ*. These genes encode cell wall stress sensors (Bermejo et al., 2010; Cruz, Muñoz, Manjón, García, & Sanchez, 2013; Rodicio, 2010; Wilk, Wittland, Thywissen, Schmitz, & Heinisch, 2010). It is known that in *S. cerevisiae* Wsc1p is a membrane-spanning sensor that detects cell wall damage and transmits the signal to Rho1p through the cell wall integrity pathway (Philip & Levin, 2001).

MSB2 is upregulated in *mnn9Δ* during yeast growth. However, during 15 and 60 minutes of induction it is downregulated. Previous research suggests that Msb2p is able to sense N-glycosylation defects and transmit this signal by Cek1p phosphorylation. As a consequence, *PMT1* transcription is derepressed (Cantero et al., 2007).

SSU81 (*ScSHO1*) encodes for a membrane protein which controls, together with Msb2p, Cek1p activation (Román, Cottier, Ernst, & Pla, 2009; Swidergall, Ernst, & Ernst, 2013; Szafranski-Schneider et al., 2012).

DFG5 encodes an N-glycosylated surface protein induced during the morphological shift. It is a possible sensor of the filamentation pathway. It is upregulated at 15 min of induction.

DFI1 encodes an N-glycosylated mannoprotein linked to the cell wall that promotes Cek1p-dependent invasive growth under matrix-embedded conditions. It is upregulated during the yeast growth and during 15 minutes of induction in *mnn9Δ*.

Table EXII.- Some deregulated genes in *mnn9Δ* and *mnn1Δ* coding for cell wall and membrane stress sensors. Genes regulated by the pathways in which these sensors act (*)

Calb	Description	mnn9 Yeast	mnn9 15m	mnn9 60m	mnn9 180m	mnn1 Yeast	mnn1 15m	mnn1 60m	mnn1 180m
WSC1	Surface protein	2.993							
WSC2	Possible cell wall integrity stress response protein	2.993							
WSC4	Possible cell wall integrity stress response protein		1.795		2.181		2.234		
MSB2	Mucin family member. Possible cell wall damage sensor. Required for Cek1p phosphorylation	2.331	0.313	0.456					
SSU81	Membrane protein. MAPK pathway sensor			2,92	2,205	0,189		1,584	
DFG5	Possible filamentation pathway sensor glycoprotein		1.56			0.593			
DFI1	Glycoprotein involved in invasive growth	1.792	1.545						
RHO1(*)	b-1,3-glucan synthase activity regulating enzyme	2.217	0.625	0.599	0.421				
PMT1(*)	O-glycosylation mannosyltransferase	2.566					1.709		

1.2.4.- Filamentation pathways and hypha-specific genes

We attempted to analyze the differential expression data of the genes involved in filamentation signalling pathways and hypha-specific genes (HSG) in order to find a possible explanation for the pseudohyphal growth phenotype in *mnn9Δ*. Furthermore we surmised that a comparison of the data for both mutants should help us to interpret the results.

Fig E28 shows several of the transduction pathway genes involved in hypha-specific gene activation that are deregulated at some point during *mnn9Δ* induction. We observed *HSP90* and *NRG1* to be upregulated, both coding for filamentation repressors. The fact that these two genes were upregulated may be the cause of the lack of true hypha formation in *mnn9Δ*.

Most genes involved in filamentation pathway signal transduction were downregulated at least once during hyphal induction. AMPc-mediated MAPK (PKA pathway) genes such as *RAS1*, *CAP1*, *CYR1* and *TPK1* were downregulated. However, *EFG1* (the final transcription factor of this pathway) showed no alterations in its expression level, but *FLO8* (coding for a transcription factor), which regulates a subgroup of genes also regulated by *EFG1* (Cao *et al*, 2006), was downregulated at 15 minutes. *TEC1* (transcription factor regulated by Efg1p) (Lassak *et al*, 2011) was also downregulated at 15 minutes.

The MAPK filamentation pathway, whose final transcription factor is Cph1p, was also downregulated in *mnn9Δ*, mainly for 15 minutes. *RAS1*, *CDC42*, *HST7*, *CEK1* and *CPH1* were downregulated.

The solid matrix filamentation pathway mediated by Czf1p was also downregulated in *mnn9Δ*. *CZF1* was downregulated at 15 minutes and *DCK1*, *RAC1* and *LMO1*, coding for proteins involved in this pathway, were also downregulated (Supplementary Material).

Some genes involved in pH-mediated filamentation were also deregulated in *mnn9Δ* during dimorphic shift at 37°C at pH6.8. *DFG5* coding for an N-glycosylated protein involved in differentiation at alkaline pH was downregulated at 15 minutes, and *RIM20* coding for a protein that mediates proteolytic activation of Rim101p is upregulated at two points during dimorphic shift. However, *RIM101*, the transcription factor of this pathway, is downregulated in *mnn9Δ*.

Differential expression data of genes involved in stress response MAPK pathways mediated by Hog1p and Mkc1p show that during dimorphic shift many of these genes are downregulated.

In *mnn1Δ* it was significant that regarding the genes downregulated in *mnn9Δ* during the morphological shift their expression was either the same as the wild-type or they were

upregulated, according to the notion that *mnn1Δ* is able to form true hypha, while *mnn9Δ* is not.

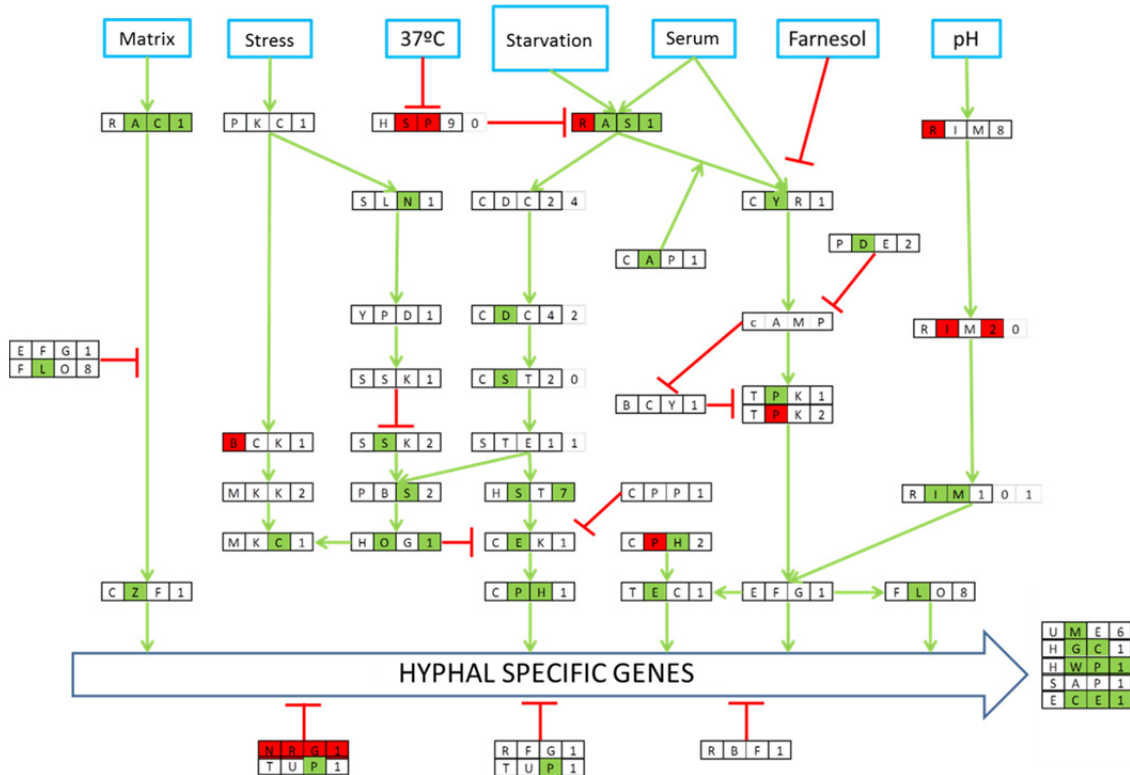


Fig E28.- Hypha-specific gene transduction pathways in *mnn9Δ*. Each gene is divided into 4 squares representing each analyzed time, from left to right: yeast growth, 15, 60 and 180 minutes of induction. Red squares mean upregulation; green squares downregulation, and white squares depict a similar expression to that observed in the wild-type strain

Since the pathways involved in the morphologic transition were repressed in *mnn9Δ* we decided to analyze the data obtained from these experiments for some genes that are induced during the yeast-to-hypha transition and that are associated with hyphal morphology genes in the wild-type strain.

In both mutants we analyzed the differential expression of hypha-specific genes published in a list by Sudbery et al. (Sudbery, 2011). Table EXIV details some of these genes. All these genes are in Supplementary Material.

ALS3, *HWP1* and *ECE1* were downregulated in *mnn9Δ* throughout all induction times, but they were upregulated in *mnn1Δ*. The expression of these genes partially depends on Ume6p transcription factor expression, which was downregulated during 15 minutes in *mnn9Δ*. Another Ume6p-regulated gene is *HYR1*, which was also downregulated in *mnn9Δ*.

The gene coding for hypha-specific cyclin, *HGC1*, was downregulated at 15 and 60 minutes in *mnn9Δ* while it was upregulated at two induction times in *mnn1Δ*.

Only a few genes in the list were upregulated during *mnn9* Δ induction, such as *DDR48* and *SOD5* (only at 15 minutes). These two genes are induced during hyphal differentiation and are associated with protection against stress.

Table EXIV.- Hypha-Specific Genes deregulated in *mnn9* Δ and *mnn1* Δ .

Calb	Description	mnn9 Yeast	mnn9 15	mnn9 60	mnn9 180	mnn1 Yeast	mnn1 15	mnn1 60	mnn1 180
orf19.86	Possible glutathione-peroxidase		2.36		1.83		1.711		
SOD5	Superoxide-dismutase. Protection against oxidative stress. Stress and hyphal induced		2.112	0.381					
DDR48	Stress associated immunogenic protein. Filamentation regulated		17.01	2.829	4.203	1.914	0.395		
CDC10	Septin required for hyphal morphology. Role in virulence.		0.655	0.561					2.699
RBT4	Required for virulence, not for filamentation. Localized at hyphal tips	3.68	0.648					3.574	
RD11	Mutation affects filamentous growth. Nrg1p- and Tup1p-regulated		0.471	0.474					
ALS3	Adhesin. Role in adhesion and invasiveness. Involved in biofilm formation	93.56	0.437	0.149	0.224	1.916	1.546	1.735	
UME6	Transcription factor required for hyphal extension and virulence. Nrg1p, Tup1p and Rfg1p regulated		0.433						
SEC24	Possible role in ER-Golgi transport. Filamentation-induced		0.392				0.615		
HGC1	G1 specific cyclin		0.312	0.607			1.942		2.233
HWP1	Hyphal protein. Role in virulence		0.188	0.34	0.513	1.714	3.368		
ECE1	Unknown function. Hypha-specific expression. Rfg1p-, Nrg1p-, Tup1p-, Cph1p-, Efg1p- and Hog1p-regulated. May contribute to biofilm formation		0.127	0.245	0.469		2.643	2.197	1.508
RBT1	Cell wallprotein. Required for virulence. Tup1p repressed. Hypha -induced. Rfg1p- and Rim101p-regulated		0.108	0.378		1.521			
DEF1	Required for filamentous growth. Hypha-regulated			0.649		1.74	2.947		
IHD1	Unknown function GPI protein			0.438	0.236			7.417	
HYR1	GPI Protein. Hypha-induced			0.042					

Cell cycle regulation takes place during polarization and morphological differentiation processes. We observed that the gene coding for the hypha-specific cyclin, Hgc1p, was downregulated in *mnn9* Δ during induction and hence we decided to investigate whether other cyclin-encoding genes were deregulated in *mnn9* Δ and *mnn1* Δ mutants.

As shown in table EXV, many cyclin genes were upregulated in *mnn9* Δ during exponential growth, including G1-phase cyclins (*CCN1*, *CLN3*) and G2-phase cyclin (*CLB4*).

CCN1 and *CLN3* were upregulated during induction. As previously stated, the hypha-specific gene *HGC1* was downregulated during the first moments of induction while it was upregulated in *mnn1Δ*. It has been described that most of the cyclins shown in Table EXV have an effect on filamentous growth.

Table EXV.- Some deregulated genes coding for cyclins in *mnn9Δ* and *mnn1Δ*.

Calb	Description	mnn9 Yeast	mnn9 15	mnn9 60	mnn9 180	mnn1 Yeast	mnn1 15	mnn1 60	mnn1 180
CLG1	Transcription regulated during dimorphic shift	4.257			0.361				
PCL1	Expression induced during filamentous growth	4.091	3.241	2.016	2.281	0.537			
PCL5	PHO85 cyclin	2.287							
CCN1	G1 cyclin; required for hyphal growth maintenance (not initiation)	3.475	2.965						
CLN3	G1 cyclin; lack causes hyphal growth defects	2.377	2.995	1.648					
CLB4	G2cyclin	1.731							
HGC1	Hypha-specific G1 cyclin involved in hyphal morphogenesis		0.312	0.607			1.942		2.233

1.2.5.- Genes involved in energy metabolism

The importance of carbon metabolism in morphogenetic and virulence processes in *C. albicans* has been reported previously. Here we analyzed the differential expression data corresponding to genes involved in energy metabolism under the different conditions tested. Fig. E29 shows the genes involved in this process that were deregulated in the mutants.

It has been suggested that during the morphological shift an increase occurs in glycolysis gene expression. We observed that in *mnn9Δ* nearly all the glycolysis genes were upregulated, with very high fold-change levels at 15 minutes, and many of them also at 60 and 180 minutes (although with lower fold-change levels). This was the case of all genes coding for enzymes allowing Glu6P to be degraded into acetaldehyde: *PGI1*, *PFK1* y *PFK2*, *FBA1*, *TDH3*, *PGK1*, *GPM1*, *ENO1*, *CDC19* and *PDC11*. The same was found for *ADH1* and *ADH5*, whose enzymes transform acetaldehyde into ethanol. Genes encoding enzymes that catalyze the transformation of glucose into glycogen were also upregulated. In addition, genes transforming glucose into trehalose were also upregulated in the mutant.

Most glycolytic genes described above and those coding for enzymes that transform glucose into glycogen and trehalose, together with *RHR2* (glycerol biosynthesis) were upregulated in *mnn1Δ* during yeast growth. However, the expression of most of them was slightly lower in *mnn1Δ* than in the wild-type at 15 minutes and remained unvaried for 60 and 180 minutes.

Some of the enzymes that degrade acetaldehyde in the TCA cycle were downregulated at some induction times in *mnn9Δ*: *ACS2*, *CIT1*, *ACO1*, *KGD1*, *SDH12* and *MDH1*. *MLS1* (glyoxylate cycle) was upregulated at 15 minutes. However, their expression showed no changes during yeast growth, except *ACS2*, whose expression was also lower.

In *mnn1Δ* we found *ACS2*, *ACO1*, *KGD1*, *SDH12* and *MDH1* to be upregulated during yeast growth.

The data show a transcriptional activation in the glycolytic flow during yeast growth in *mnn1Δ*, and mainly during hyphal growth in *mnn9Δ*.

In *mnn1Δ* the TCA cycle seemed to be activated during yeast growth, while in *mnn9Δ* this pathway seemed to be downregulated transcriptionally during hyphal growth. In *mnn9Δ* the activation of glycolytic flow may reflect the need to supply TCA cycle intermediates.

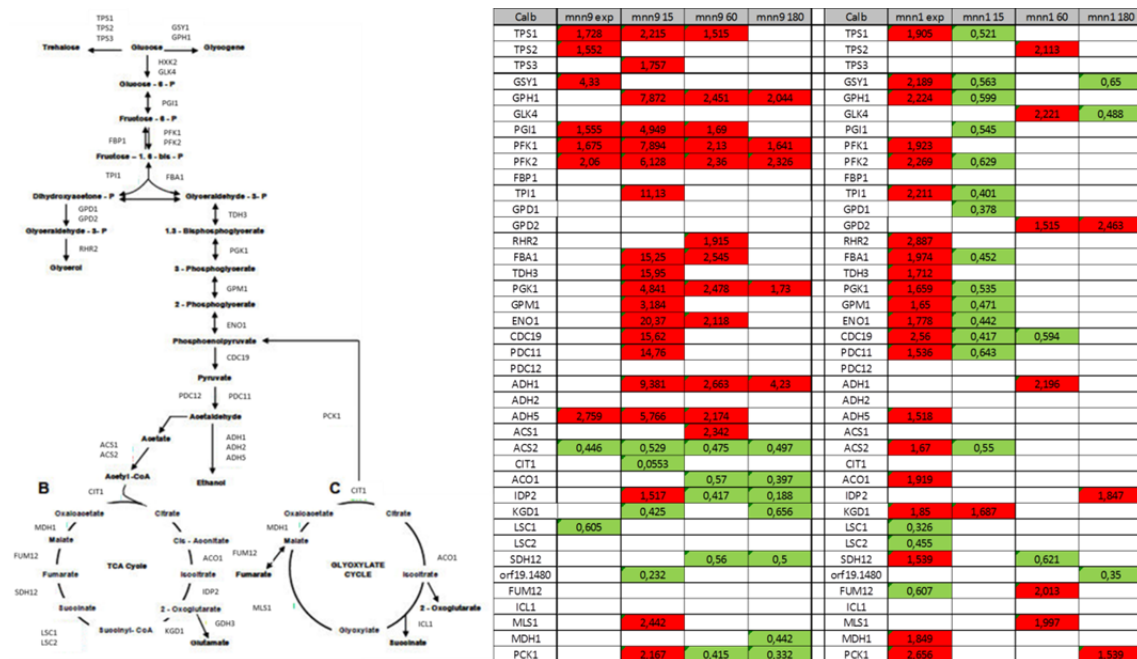


Fig E29.- Energy metabolism pathways (left) and genes involved, with their expression values in *mnn1Δ* and *mnn9Δ*.

1.2.6.- Overview of deregulated genes in various conditions

Differential expression analyses presented so far have allow us to show that, in general, transcriptional data are in accordance with the phenotypes presented by both fumate in the conditions. In order to further investigate the mutant responses to N-

glycosylation defects, it is interesting to know those genes deregulated in more than one condition.

We focus in *mnn9Δ* as it is the mutant that shows more phenotypical and transcriptional variations compared to wild type.

1.2.6.1.- Upregulated genes in *mnn9Δ* during yeast growth and at least during two times of dimorphic shift

In Supplementary Material we have attached a complete list of these genes. Among them we found:

a.- Genes coding for cell surface associated proteins already mentioned in previous chapters (*ALS2, ALS4, PGA13, PGA62, CRH11* and *PNG2*) with adhesion, structural and/or remodeling function. Other genes of this group are *CSP37* and *DAG7* (without homologous in *S. cerevisiae*), *YCF1* (possible membrane transporter) and *orf19.1691* coding for a membrane protein.

b.- Genes coding for chaperones that are probably located in the cell surface: *HSP70, HSP104* and *orf19.251*.

c.- Genes coding for metabolism proteins, such as *ADH5, PFK1, PFK2, PGI1* AND *TPS1*.

d.- Genes involved in biosynthesis of N-glycosylated proteins: *MNN22* (α-1,2-mannosyltransferase) and *CWH8* (dolicholpyrophosphate phosphatase).

e.- Genes coding for cyclins: *PCL1* and *CLN3*

f.- Genes coding for transcription factors: *NRG1*, that regulates hypha-specific. *CRZ2*, coding for a putative transcription factor with a signal peptide and 5 potential N-glycosylated sites (analyzed with NetNGlyc <http://www.cbs.dtu.dk/services/NetNGlyc/>).

g.- Genes without a clear homology with *S. cerevisiae*. Among them, *orf19.2959.1* (induced during hypoxia) and *orf19.6920* (induced during biofilm formation).

1.2.6.2.- Downregulated genes in *mnn9Δ* in at least three conditions

Among these genes we find:

a.- Genes downregulated during dimorphic shift and whose expression does not change during yeast growth: *HWP1, ECE1, ALS1* and *SUN41* coding for hypha-specific membrane

proteins; *DCK1* and *RAC1* coding for GTPases that activate filamentous growth; and transcription factor *BRG1* whose transcriptional activation is necessary for dimorphic shift.

b.- Genes downregulated during dimorphic shift and upregulated during yeast growth: *ALS3* (adhesin family cell surface protein), *RHO1* and *RAS1* coding for GTPases involved in MAPK signaling pathways and *orf19.79* and *orf19.1486*.

DISCUSSION

We have characterized the *CaMNN9* and *CaMNN1* genes, coding for α -1,6 and α -1,3-mannosyltransferase enzymes, respectively, that act in the Golgi apparatus. The first one is involved in one of the first steps in the Golgi apparatus; it is responsible for extending the α -1,6-mannose backbone of the oligosaccharide core in N-glycosylated proteins, while the second one is responsible for the final modifications of the branches arising from the backbone.

In *C. albicans* there are many members of the families to which these genes belong. Bates et al. have recently published a work about the *MNN1* family (Bates et al, 2013). This family contains 6 members, one of them being *MNN1*. In that work, the authors show that the deletion of any member of the family, except *MNN14*, does not cause any significant changes in morphology, resistance to stress or the virulence profile, suggesting that there is functional redundancy among family members. Phenotypic characterization experiments in *Camnn1* Δ carried out in the work leading to this Thesis confirm those results.

In the *C. albicans* genome there are also genes coding for α -1,6-mannosyltransferases that (thanks to homology studies with *S. cerevisiae*) are thought to be present in the Golgi apparatus such as *Mnn9p*. Among them are *OCH1*, *HOC1*, *ANP1*, *VAN1*, *MNN10* and *MNN11*. *Camnn9* Δ , whose characterization is described here, was constructed in Robbins' laboratory (Southard et al, 1999), where the authors observed that it showed some phenotypic differences with the wild-type strain. It is therefore clear that the function of *MNN9* is not supplied by any of the other α -1,6-mannosyltransferases.

The *CaMNN9* ORF is 1107 bp in length, is not interrupted by introns, and encodes a protein of 368 amino acids. *CaMnn9p* shows a high degree of identity (64%) with *ScMnn9p*. We have shown that transcript origin is located at -214bp from the initial ATG, and the gene is transcribed up to +113 bp from the STOP codon. This gene is regulated transcriptionally during induction and this suggests that its function may be important for this process.

The RT-PCR experiments performed revealed that *MNN9* expression is increased at 15 and 60 minutes of filamentation (Fig E23). These experiments suggest that this gene is regulated transcriptionally during filamentation and that it is important in the differentiation process.

Bioinformatics analysis showed that *CaMnn9p* and *ScMnn9p* interact with α -1,6-mannosyltransferases. It has been checked experimentally that *ScMnn9p* can form complexes with them (Jungmann & Munro, 1998). *CaMnn9p* may also interact with an α -1,2-mannosyltransferase (*Kre2p* or *Mnt2p*).

The differential gene expression data of *Camnn9Δ* vs. the wild-type show that the expression of genes coding for α -1,6-mannosyltransferases in the Golgi apparatus is not altered during yeast growth. During the dimorphic shift, two of them -*OCH1* and *MNN10*- are upregulated, suggesting that during the dimorphic shift the mutant may compensate the absence of α -1,6-mannosyltransferase Mnn9p with another of similar function, such as Mnn10p, acting in the same complex as Mnn9p. During yeast growth, two genes -*MNN22* and *BMT4*, respectively coding for an α -1,2-mannosyltransferase and for a β -1,2-mannosyltransferase - are upregulated in the mutant, suggesting that the glycoprotein outer chains synthesized by *Camnn9Δ* may contain more β -linked mannose and less α -1,6-linked mannose. It is likely that the mutant would modulate the N-glycan linked residues from glycoproteins and, although mannosyltransferases are very specific and act sequentially, in the absence of Mnn9p other enzymes may be able to extend the outer chain with more mannoses (Fig E30).

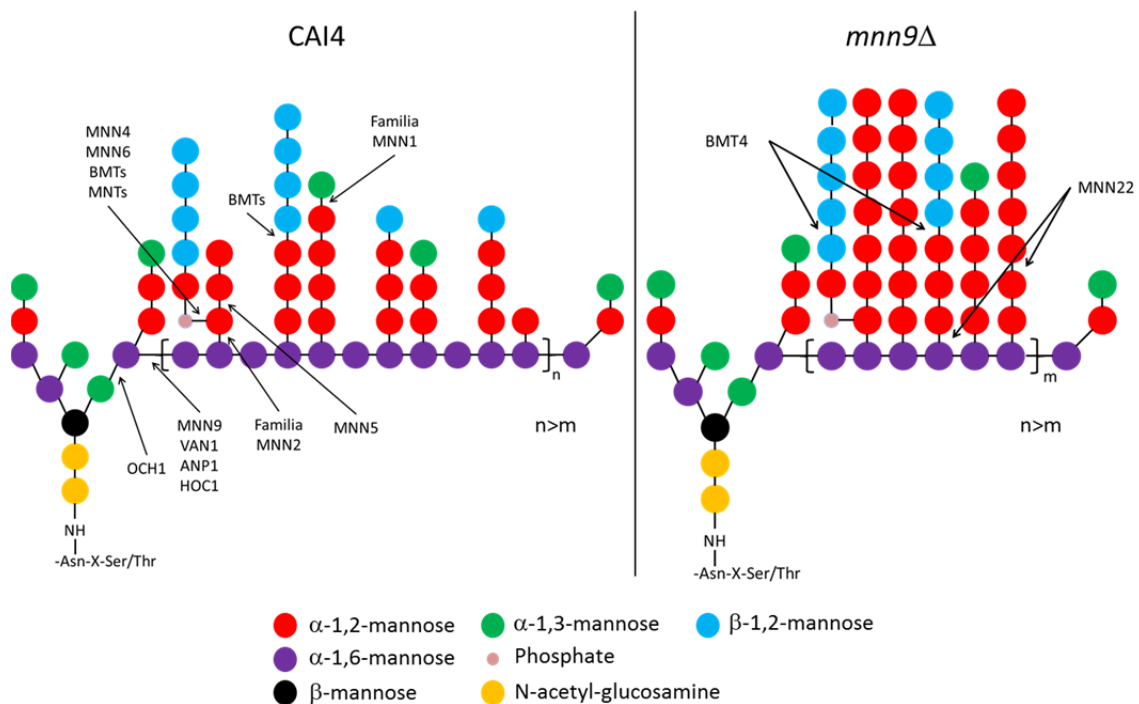


Fig E30.- Hypothetical structure of a glycoprotein synthesized by *mnn9Δ* mutant compared with a protein synthesized by the wild type

Experiments performed to determine the degree of glycosylation of a reference protein (Hex1p fused to the *MYC* epitope) support the above theory, showing that molecular weight differences in the N-glycan linked residues in comparison with the wild-type are not significant, and that the protein synthesized by the mutant, although defective, contains mannoses that extend the oligosaccharide core (Fig E19).

During the dimorphic shift, we detected more changes in the differential expression of genes coding for mannosyltransferases than during yeast growth (Fig E27). It is possible that during the dimorphic shift a transcriptional regulation of these genes occurs, as we observed for *MNN9* (Fig E23), and the data indeed reflect readjustments in the mutant.

Fluorescence microscopy observation of Mnn9p-GFP revealed that it was localized outside the nucleus in structures that seem to correspond to the Golgi apparatus (Fig E7). This is consistent with the fact that ScMnn9p is localized in the Golgi apparatus (Jungmann & Munro, 1998).

Many morphological characteristics observed in *Camnn9Δ* have also been found in other mutants deleted in N-glycosylation-involved genes (Hall & Gow, 2013) (Table EII). For example, *Caoch1Δ* yeast cells are slightly larger and other mutants such as *Camnn2Δ* tend to grow as clumps in liquid media. Clumpy growth and flocculation may be due to an increase in the cellular surface of proteins, reported to contribute to adhesion to other cells. In fact, we observed that during yeast growth there were high fold-change upregulated genes coding for proteins with these characteristics (Table EXI), such as *PGA62*, homologous to *ScFLO1* (Goossens & Willaert, 2010), *AAF1* (Li & Palecek, 2005), and many ALS family members (*ALS2*, *ALS3* and *ALS4*) (Grootet *et al.*, 2013). It has been shown that heterologous expression of some of these *C. albicans* genes in *S. cerevisiae* cells enhances cell-cell and cell-surface adhesion (Nobbs *et al.*, 2010).

Although *mnn9Δ* cells tend to form aggregates when growing in liquid media, they are easily separated by mild sonication, indicating that such clumping is not due to cytokinesis defects, as has been described to occur in some glycosylation mutants (Schmidt *et al.*, 2005), but to the fact that cells show a strong capacity to adhere one to each other.

The growth kinetics of the mutant in rich liquid media is similar to the wild-type, but the mutant is unable to grow at 42°C. High-temperature growth was recovered by adding an osmotic stabilizer to the media (glycerol). Other glycosylation mutants such as *och1Δ* display this phenotype, which shows that alterations to the cell wall under temperature stress conditions are enhanced, rendering the cells more sensitive to osmotic lysis.

We have shown that *mnn9Δ* is more sensitive to Calcofluor White and Congo Red staining (Fig E16). Calcofluor White prevents the assembly of cell wall polymer microfibrils, interfering in cell wall supramolecular organization (Murgui *et al.*, 1985) and mutants with a high level of chitin or other cell wall defects (Ram *et al.*, 1994) show hypersensitivity to this compound. This mutant overexpresses *CRH11*, which codes for an enzyme that modifies chitin, and this may explain the increased sensitivity to compounds interfering with this component. It has been shown that *mnn9Δ* has high chitin levels (Kapteyn *et al.*, 2000).

Alcian Blue binding assays showed that the surface of *mnn9Δ* cells was more hydrophobic than that of the wild-type cells (Fig E16). This may be due to the lower amount of phosphomannan exposed at their cell surface. We have shown that in this mutant Hex1p glycosylation has a lower molecular weight and is more hydrophobic (Fig E19), which is consistent with the fact that *mnn9Δ* is altered in protein glycosylation. Southard et al. have estimated that the amount of mannan in *mnn9Δ* in *C. albicans* is approximately half that seen in the wild-type (Southard et al, 1999).

These cell wall defects may expose the plasmatic membrane. Azoles (fluconazole and itraconazole) have an effect in the ergosterol biosynthesis pathway. The *Camnn9Δ* mutant is more sensitive to itraconazole than the wild-type, but its sensitivity to fluconazole is not as patent (Fig E17). The difference between both azoles may be due to cell wall and/or membrane permeability to these compounds in the mutant.

It was observed that the introduction of the *MNN9* complemented the phenotypes shown by the wild-type, indicating that the alterations in the mutant were due to the absence of the gene (Fig E16).

We also investigated the activation of cellular signalling pathways in order to determine whether *mnn9Δ* was able to respond to cell wall formation stresses. We found that MAPK of the cell wall integrity and osmotic and oxidative stress (Mkc1p and Hog1p respectively) pathways were phosphorylated in higher amounts in *mnn9Δ* than in the wild-type strain when grown in the absence of further stresses (Fig E20 and Fig E21). The amount of both phosphorylated proteins was increased under additional stress (such as tunycamicin or H₂O₂), indicating that *mnn9Δ* was still able to respond to both pathways. These results suggest that the mutant shows a constitutive basal activation of both pathways as a response to glycosylation defects.

During yeast growth *mnn9Δ* show overexpressed WSC family genes (*WSC1* and *WSC2*), coding for membrane proteins described as cell wall stress sensors in yeasts (Jendretzki et al, 2011; Cruz et al, 2013). These proteins may be transmitting the glycosylation defect signal through Rho1p GTPase to the cell wall integrity pathway (as occurs in *S. cerevisiae*). In support of this idea is the fact that under these conditions two genes of this integrity pathway are upregulated (*RHO1* and *BCK1*).

In *mnn1Δ* we observed that the cell integrity pathway was active at certain levels and it was also able to respond to further stress by a stronger activation of Mkc1p (Fig E22). However, we failed to detect a basal activation of Hog1p. *Camnn1Δ* did not show any variation in the WSC family members (except for the upregulation of *WSC4* at 15 minutes of induction).

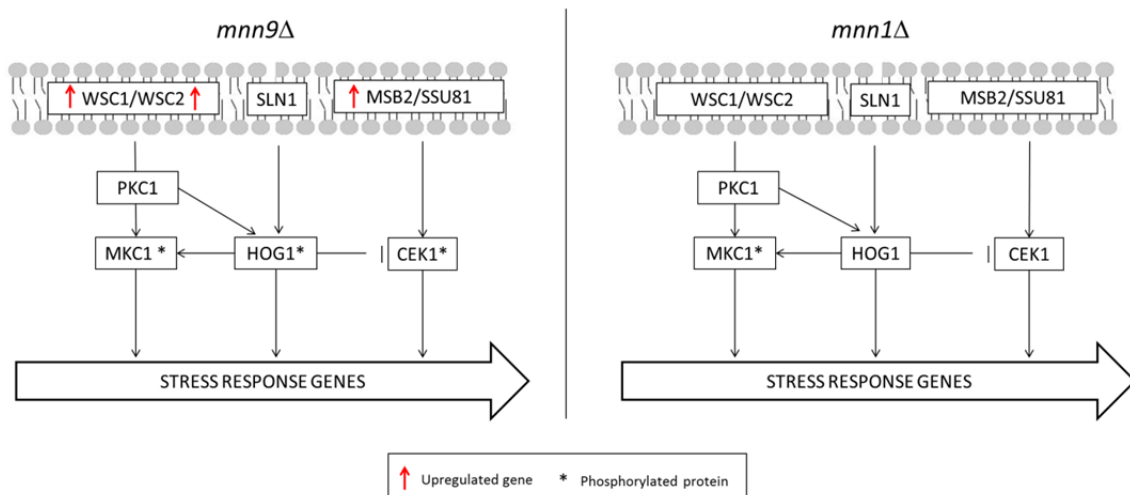


Fig E31- Simplified scheme of stress response genes during yeast growth in *mnn9Δ* (left) and *mnn1Δ* (right)

In the N-glycosylation mutants in which these assays have been performed it has been observed that the cell integrity pathway is active (for example in *och1Δ*, and mutants lacking α -glucosidases) (Bates *et al*, 2006; Mora-Montes *et al*, 2007). In some studies, the authors also reported the activation of the Cek1p filamentation pathway, as in *och1Δ*. This Cek1p pathway has also been found to be activated in some O-glycosylation-altered mutants in *C. albicans*, such as *pmt1Δ* and *pmt4Δ*, and it has been proposed that the most specific response to O-glycosylation defects is activation of the Cek pathway (Cantero & Ernst, 2011). It has been observed that simultaneous blockage of N- and O-glycosylation strongly activates this pathway (Ernst & Pla, 2011). Moreover, it has been described that cytoplasmic membrane proteins, Msb2p and Sho1p, act as glycosylation defect sensors by activating the Cek1p filamentation pathway (Román *et al*, 2009a) and that one target of this pathway is *PMT1*, involved in O-glycosylation. The N-glycosylation defects detected by Msb2p induce Cek1p phosphorylation and *PMT1* is derepressed (Cantero & Ernst, 2011).

Regarding the activation of Cek1p, our results show that this occurs in *mnn9Δ* but not in *mnn1Δ* (Fig E20, Fig E21 and Fig E22). During *mnn9Δ* yeast growth, we found *MSB2* and *PMT1* to be upregulated, with a fold-change greater than 2; this is consistent with the fact that basal Cek1p phosphorylation is taking place in the mutant.

Our results suggest that the response to low glycosylation defects (as in *mnn1Δ*) is basal activation of the cell wall integrity pathway, and more marked defects (as in *mnn9Δ*) also trigger the HOG and Cek1 pathways. These findings that N-glycosylation defects can be felt through the HOG pathway are consistent with the fact that this pathway is not only responsible for glycerol accumulation and survival in high-osmolarity media but is also involved in cell wall architecture (Alonso-Monge *et al*, 1999).

Camnn9Δ shows a higher ability to invade an agar matrix than the wild-type when grown at 28°C in rich media. When *C. albicans* grows on a solid agar surface under filamentation conditions (37°C), the cell wall integrity MAPK is activated (Kumamoto, 2005). It has also been described that the Cek pathway plays an important role in invasiveness (Csank *et al*, 1998). Constitutive activation of both pathways in *mnn9Δ* may facilitate filament development, allowing agar penetration. We also detected the upregulation of *DFI1*, coding for a glycoprotein involved in invasive growth (Table EXII).

Analysis of the global transcriptional profile of both mutants allowed us to discard the possibility that during their construction chromosomal alterations, such as a gain or loss of a chromosome (aneuploidy), occur. Recently, it has been shown that this is the case of strains exposed to stress conditions or during the construction of some mutants due to *C. albicans* genomic plasticity and its ability to survive and adapt (Arbour *et al*, 2009; Selmecki *et al*, 2010).

During yeast growth at 28°C, the percentage of deregulated genes with a differential expression level equal to or above 1.5, is higher in *mnn9Δ* than in *mnn1Δ*. The differences between both mutants regarding the percentage of deregulated genes during hyphal growth are more pronounced (Fig E25). These results are in accordance with the phenotypic differences shown by *mnn9Δ* but not by *mnn1Δ*. Comparative analysis of the transcriptome alterations of our mutants reinforces the conclusions and suggestions inferred from the results obtained.

A high number of surface proteins are N- or O-glycosylated. During yeast growth, a significant percentage of *mnn9Δ* deregulated genes code for cell surface proteins (membrane or cell wall). This is not case of *mnn1Δ*.

Some of these genes coding for cell wall proteins have also been described to be deregulated when cells are treated with caspofungin (Table EIX) and, in general, many of them are upregulated (Bruno *et al*, 2006). Others (Table EIX) have been reported to be deregulated when cells are grown at high temperatures (Heilmann *et al*, 2013). However, not all genes deregulated in these two conditions are also deregulated in *mnn9Δ* at 28°C. These results show that the mutant undergoes cell wall alterations that are a stress for the cell and suggest that different types of stress induce a slightly different cell wall response, although some of the deregulated genes are common for both. For example, *CRH11* encodes a potential chitin transglycosylase protein that is upregulated under all the conditions tested in *mnn9Δ* and that is also upregulated in the presence of high temperatures or caspofungin.

Among the cell surface-located proteins whose genes are deregulated as a consequence of the absence of Mnn9p (Table EIX), we found proteins involved in the cell wall biosynthesis, organization and the maintenance of integrity, such as Pga13p (Gelís *et al*,

2012), Pir1p (Martínez *et al*, 2004), Ssr1p (Garcerá *et al*, 2003, 2005) and Ecm33p (Martinez-Lopez *et al*, 2004).

There are also proteins involved in polymer modifications, such as Crh11p and Utr2p (Pardini *et al*, 2006), and glucan hydrolysis-related enzymes, such as Xog1p. Regarding glucan synthesis, we found Pga4p, Gsc1p and Rho1p to be upregulated during yeast growth.

Our results show that during filamentation, *mnn9* Δ upregulates certain genes such as those involved in cell wall remodeling (Table EX) (*CHS8*, *CHS7*, *PNG2*, *PGA13*, *CRH11* and *DDR48*) or downregulates others involved in hyphal differentiation (Table EXII) (*ALS3*, *HWP1* or *ECE1*).

A few of these cell surface genes are deregulated in *mnn1* Δ , and those which are deregulated show a low fold-change; this is the case of *PGA13* and *ALS3* (Table EIX and Table EX) during yeast growth. These results, together with the fact that it is not more sensitive than the wild-type strain to cell wall-perturbing agents, show that *mnn1* Δ does not display important cell wall structural alterations. However, our experiments show that in this mutant the cell wall integrity pathway kinase Mkc1p is activated at basal levels (Fig E22), which is consistent with the idea that the cell responds first through posttranslational modifications, which are short-term modulated responses, and later, when the cell requires a more permanent response, important transcriptional readjustments take place.

During hyphal growth, the global differential expression in *mnn9* Δ shows that there are defects in the transcriptional regulation of the filament induction pathway genes, most of which were downregulated at 15 minutes of induction, indicating that glycosylation defects in this mutant shut down these pathways at transcriptional level. This explains why hypha-specific genes (including cell wall protein genes), the Ume6p transcription factor, and Hgc1p cyclin are downregulated in *mnn9* Δ (Table EXII).

In *mnn1* Δ , most genes involved in dimorphic shift do not show any variations compared to the parental strain (Supplementary Material S.V), such as *UME6*, a filamentation transcriptional factor (Banerjee *et al*, 2013), filamentation pathway genes (*CDC42*, *HST7*, *CEK1*, *CPH1*), the PKA pathway genes (*RAS1*, *CYR*, *TPK1*, *FLO8*) or the pH-induced pathway genes (*RIM8*, *RIM20*, *RIM101*). Some are upregulated, e.g., *HGC1* and hypha-specific genes such as *ECE1*, *ALS3* and *HWP1*.

Consistent with these results, the filamentation repressors *HSP90* and *NRG1* are upregulated in *mnn9* Δ while they are downregulated or show no change in *mnn1* Δ during differentiation.

Together, these results explain why *mnn9Δ* is unable to induce true hypha filamentation while *mnn1Δ* is able to accomplish this, and they suggest that some genes involved in this process such as *HGC1*, encoding cyclin, must be transcribed at higher levels.

Another interesting observation in these experiments is the upregulation of many cyclins in *mnn9Δ* (Table EXV). The increase in cyclin expression during yeast growth probably reflects the need to stimulate progress through the cell cycle and to allow the defects that may slow it down to be overcome. This shows why, even with defects, this mutant has a similar growth rate to that of the wild-type strain. During pseudohyphal growth, an increase in cyclin activity may be required for the same reasons. The downregulation of hypha-specific cyclin *HGC1* observed during the early induction times is in accordance with the inability to grow as true hyphae exhibited by *mnn9Δ*.

Bearing in mind the results concerning differential gene expression with respect to energy metabolism (Fig E29), we observed that -mainly during filamentation- in *mnn9Δ* the genes involved in glycolysis and fermentation are upregulated. Since there seems to be a higher glycolytic activity during hyphal growth (Han *et al*, 2011), our results indicate that *mnn9Δ* tries to keep glycolysis and fermentative pathways active during filamentation, just as the wild-type strain does. Under these growth conditions, it is significant that many TCA cycle and oxidative metabolism genes are downregulated and the glyoxylate cycle is kept active (needed to supply intermediates to the cell).

However, *mnn1Δ* does not keep these pathway genes as transcriptionally active as the wild-type strain during filamentation (Fig E29). During yeast growth, *mnn1Δ* shows a transcriptional activation of these catabolic pathways, suggesting the need of more energy for growth at wild-type rates under these conditions.

The genes involved in reserve polymer synthesis (glycogen, trehalose and glycerol) are upregulated during yeast growth in *mnn1Δ*, and under all conditions in *mnn9Δ* (except the *RHR2* gene involved in glycerol biosynthesis). Our results suggest that during yeast growth our mutants develop more active glycolysis, fermentative metabolism and reserve polymer synthesis pathways as a response to stress situations.

One of the most interesting findings, from a practical point of view, of this work is that *mnn9Δ* was less virulent than the wild-type, unlike what happens in *mnn1Δ* (Fig E18). Since no orthologues have been found in humans, CaMnn9p may be a good target for the design of antifungal drugs against this pathogen. This phenotype is common to other glycosylation-defective mutants (Bates *et al*, 2006; Hall & Gow, 2013).

The attenuation in virulence shown by *mnn9Δ* may be due many phenomena. One of them may be the inability of the mutant to form true hyphae, leading to the downregulation of hypha-specific genes known to play a vital role in biofilm formation, such as *HWP1* (Table

EXIV). The absence of *HWP1* may explain why the mutant is unable to form a consistent biofilm, helping to attenuate virulence.

Another reason may be an increase in antigenic determinants exposed at the *mnn9Δ* surface. Our results point to the upregulation of many genes (Supplementary Material) whose products have been described as antigenic and that are located at the cellular surface, such as *ENO1*, *CRH11*, *HSP70*, *DDR48*, *RBT4* and *XOG1*. The greater abundance of these proteins during infection may trigger a stronger immunological response. It is also possible that, as believed to occur in *och1Δ* or in *mnn2Δ* family mutants (Hall *et al*, 2013), which have low amounts of mannans in their cell wall, the increase in antigenic determinants due to chitin or glucan exposure at the cell surface may be the cause of this attenuation in virulence.

In accordance with the above, evidence has been found that during oral epithelial cell invasion this mutant induces a higher cytokine production than the wild-type strain (Murciano *et al*, 2011).

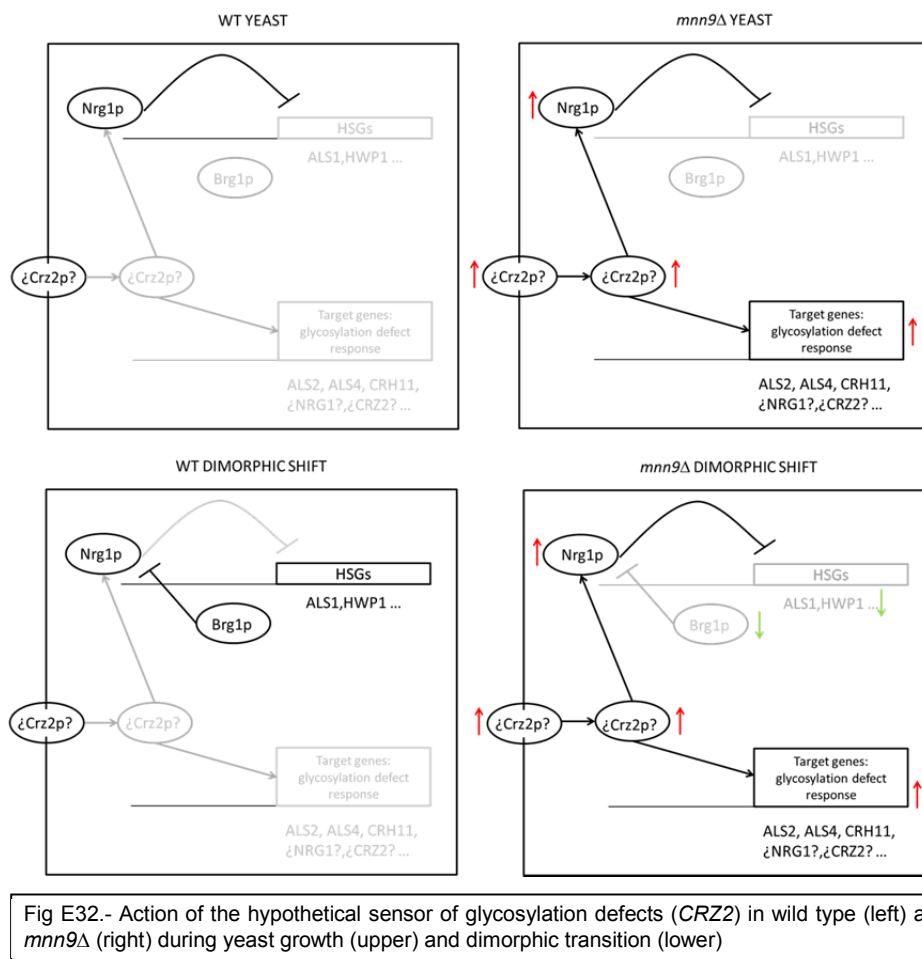
Among the upregulated genes in three or four conditions tested in *mnn9Δ* with a high fold-change, we found genes coding for secretion proteins (carrying a signal peptide), such as *ALS2*, *ALS4* and *PGA62* adhesins, or genes coding for proteins involved in cell-wall remodeling, such as *CRH11* or *PGA13*, and also genes with unknown function such as *DAG7*, *orf19.2959.1* and *orf19.6920*. It is possible that these genes may be the targets of signaling pathways that allow *mnn9Δ* to compensate its cell wall and protection mechanisms defects.

One of the upregulated genes, *CRZ2*, encodes a putative zinc-finger transcription factor containing a possible signal peptide and 5 N-glycosylation sites. Our hypothesis is that it may be an N-glycosylation defect sensor. Glycosylation defects in Crz2p may release it from the membrane and/or promote its cleavage, allowing its action as a transcription factor to activate target genes such as *ALS2*, *ALS4*, *PGA62*, *CRH11*, ...) or its own transcription.

Another gene upregulated in all the conditions assayed is the *NRG1* transcription factor. In the wild-type strain, its transcription is not active during the dimorphic shift. It is thought that the presence of this repressor during yeast growth impairs differentiation in the absence of stimuli. Our hypothesis is that *NRG1* upregulation in *mnn9Δ* growing as yeast may be a signal of the stress situation in this mutant, and that the abundance of this repressor ensures the impairment of the dimorphic shift in the presence of stimuli.

Fig. E32 represents a scheme of what may be happening in the wild-type and *mnn9Δ* strains during yeast growth and the dimorphic shift according to our hypothesis, bearing in mind some of our results. The hypothetical sensor of glycosylation defects (Crz2p) is upregulated and more active in the mutant, allowing the derepression of target glycosylation defect genes such as *ALS2*, *ALS4*, *CRH11*, *PGA13* and *PNG2*. *NRG1* and *CRZ2* itself may be activated as a response to Crz2p. This may explain why all these genes are upregulated in

mnn9Δ under all conditions. The figure shows what is known about the repressor effect of *NRG1* on HSG and what is known about the Brg1p factor, a filamentation activator that diminishes the *NRG1* transcript during the dimorphic shift (Kadosh, 2013). During yeast growth, these HSG are not expressed in the wild-type and neither in *mnn9Δ* due to the presence of Nrg1p and the absence of Brg1p. During the dimorphic shift, HSG genes are not expressed in *mnn9Δ* owing to the presence of Nrg1p and the absence of Brg1p. Basal activation of Hog1p may be the cause of *BRG1* repression (Su *et al*, 2013). We detected basal levels of Hog1p phosphorylation in *mnn9Δ* during yeast growth, and this may also be happening during the dimorphic shift



In *mnn1Δ* during yeast growth, we found *CRZ2* to be upregulated with a fold-change of 1.6 (in *mnn9Δ* the fold-change was 6) and some target genes of Crz2p involved in glycosylation defects such as *PGA13* and *PNG2* were also upregulated. However, *NRG1* was not found to be upregulated under any of the conditions tested. It is possible that mild glycosylation defects in *mnn1Δ* could produce a slight activation of the sensor, although insufficient to prevent dimorphic shift blockage.

CONCLUSIONS

The following conclusions can be drawn in light of the results obtained during the phenotypic and transcriptional assays carried out in *Camnn9Δ* and *Camnn1Δ*:

1.- We observed that the CaMnn9p-GFP fusion protein is located in discrete portions of the cytoplasm, excluded from the nucleus and vacuoles. This result, together with the fact that the *S. cerevisiae* homologous protein is located in the Golgi apparatus, allows us to conclude that the CaMnn9p protein is also located in this organelle.

2.- *CaMNN9* transcription is regulated during the yeast-hypha transition process. It increases during the first moments of filamentation (15 and 60 minutes), thereafter decreasing at 180 minutes to the initial levels observed during yeast growth.

3.- *Camnn9Δ* is affected in protein glycosylation processes. The Hex1p glycoprotein synthesized by this mutant has a lower molecular weight than in the wild-type, although it contains external oligosaccharide chains, probably due to an increase in the transcription of α -1,2 and β -1,2-mannosyltransferases. It is also more hydrophobic, like the *Camnn9Δ* cell surface.

4.- The *Camnn9Δ* transcriptome reflects a cell-wall stress situation. One of the overrepresented categories obtained during its analysis was cell-wall biogenesis and organization. The phenotypes shown by this mutant, exhibiting a greater sensitivity to cell wall-perturbing agents, also indicate cell-wall alterations.

5.- *Camnn9Δ* responds to protein N-glycosylation defects by activating at basal levels the MAPK of the cell-wall integrity, filamentation and HOG pathways. In *Camnn1Δ*, only the cell-wall integrity pathway is activated. Both mutants have the ability to respond to stimuli. Transcriptional activation in *Camnn9Δ* of sensor glycoprotein-coding genes such as *WSC* and *MSB2* may be the reason for the activation of the cell-wall integrity and filamentation pathways during yeast growth.

6.- The *Camnn9Δ* transcriptional profile is consistent with its phenotypic characteristics, such as cell aggregation and an inability to form true hyphae. *Camnn9Δ* upregulates genes coding for adhesins, and during yeast-hypha induction it downregulates the genes involved in the filamentation pathway, such as *RAS1*, *CPH1* and *UME6*, and many hypha-specific genes such as *HGC1* and *HWP1*. This mutant also upregulates filamentation repressors, such as *NRG1* and *HSP90*. Regarding these

phenotypes, we did not detect any difference between *Camnn1Δ* and the wild-type, the transcriptome of *Camnn1Δ* being in accordance with these results.

7.- During yeast growth, both mutants upregulate the genes involved in reserve polymer metabolism (as *TPS1* and *GSY1*), reflecting a stress situation.

8.- *Camnn9Δ* forms fragile biofilms and its virulence capacity in a murine systemic infection model is attenuated. Upregulation of cell-surface antigenic genes in this mutant may contribute to its higher vulnerability to host defenses. *Camnn1Δ* virulence is similar to that of the wild-type.