



**VNiVERSiDAD
D SALAMANCA**

CAMPUS DE EXCELENCIA INTERNACIONAL

Departamento de Microbiología y Genética

**Respuesta a defectos en las primeras
etapas de la N-glicosilación de proteínas
en *Candida albicans***

Laura Durán Prieto

2015

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

CERTIFICA QUE:

La memoria titulada: “Respuesta a defectos en las primeras etapas de la N-glicosilación de proteínas en *Candida albicans*” presentada por la Lda. Laura Durán Prieto para optar al título de Doctor, 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 que así conste, expide y firma la presente certificación en Salamanca a 1 de septiembre de 2015.

Fdo. Dr. Luis Román Fernández Lago

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

CERTIFICAN QUE:

La memoria titulada: “Respuesta a defectos en las primeras etapas de la N-glicosilación de proteínas en *Candida albicans*” presentada por la Lda. Laura Durán Prieto para optar al título de Doctor, ha sido realizada bajo la dirección del Dr. Ángel Domínguez Olavarri y de la Dra. M^a del Carmen López Cuesta 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 1 de septiembre de 2015.

Fdo. Dr. Ángel Domínguez Olavarri

Fdo. Dra. M^a del Carmen López Cuesta

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” (SA 141A08).

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 cofinanciada por el Fondo Social Europeo y la Junta de Castilla y León.

Dedicado a mi padre

“Ningún mar en calma hizo experto al marinero”

Agradecimientos

A unas horas de depositar la memoria de mi tesis doctoral, escribo estas líneas con un sentimiento de satisfacción y felicidad por cerrar esta etapa, pero también de nostalgia. A lo largo de estos años, la sombra constante de la tesis ha acompañado a mi historia vital, a veces tan cerca que parecían formar una misma silueta. No puedo evitar recordar emocionada a todos los que habéis estado a mi lado durante estos años y habéis hecho posible que llegase hasta aquí:

A mis directores Ángel y M^a del Carmen, más que mis jefes de laboratorio habéis sido mis maestros. Gracias por el esfuerzo y el tiempo que habéis dedicado para que yo me formase y pudiese terminar este trabajo. Os estoy profundamente agradecida.

A todos los compañeros del grupo ADO: Carlos, Ahmad, Zahra, Azul, Adán, Cristina, Raquel, Rosario, Zuzana, Miguel y Javi. Ha sido un placer coincidir con vosotros, formais parte de esta tesis. También quiero agradecer a los miembros del antiguo IMB (actual IBFG) y del departamento de Microbiología y Genética de esta universidad por estar siempre dispuestos a ayudar. A Carlos, Nagore, Nacho, Marta y Mari por compartir conmigo ese cafecito con pincho de todas las mañanas.

Al Dr. David Soll de la Universidad de Iowa, por haberme abierto las puertas de su laboratorio durante unos meses. Gracias a todos todos los miembros de su grupo, en especial a Claude Pujol, encontrarte fue un gran regalo.

A los profesores del máster de “Análisis Avanzado de Datos Multivariantes”, ver la ciencia desde los ojos de un estadístico me ha ayudado a crecer como científica.

A Sara, David y Diego, creo firmemente que la familia es la mejor escuela. Gracias por enseñarme que las cosas que tienen sentido son aquellas que emocionan. Sara, en los momentos malos recordé que “yo tenía un plan”.

A mis padres, a vosotros os debo todo lo que soy. Gracias Papá por creer en mí siempre y enseñarme que todo es posible cuando lo intentas de verdad. Sé que hoy estás orgulloso de mí. Mamá, no recuerdo un solo momento en el que no hayas estado cerca cuando te he necesitado, gracias por escucharme hasta cuando te hablaba de levaduras y genes...

A Luis y Ezequiel, llegué a esta ciudad siendo una niña, gracias por acompañarme y quererme durante estos años. Sin vosotros, hoy no sería la mujer que soy.

A Blanquita, gracias por entender lo que necesitaba sin ni siquiera pedírtelo. Sin tu ayuda durante estos últimos meses hubiese sido imposible terminar este trabajo.

A mi hija Lucía, sin duda tu llegada ha supuesto mi mayor reto y mi mayor aprendizaje. Gracias por enseñarme qué es lo realmente importante en la vida.

A Alejandro, gracias por apoyarme, entenderme y quererme. ¡Ah! y también por todas las noches en las que me has acompañado al laboratorio a horas intempestivas...

Finalmente quiero dar las gracias a Dios, por haberos puesto a todos en mi camino.

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN	1
1. <i>Candida albicans</i>	1
1.1 Posición taxonómica y características generales	1
1.2 El genoma de <i>C. albicans</i>	1
1.4 Plasticidad morfológica	3
1.4.1 Características de las diferentes morfologías	3
1.4.2 Procesos morfogenéticos	5
1.5 <i>C. albicans</i> como agente patógeno	7
1.5.1 Factores de virulencia en <i>C. albicans</i>	8
1.5.2 Antifúngicos contra <i>C. albicans</i>	9
1.6 <i>C. albicans</i> como modelo de estudio	10
2. Pared celular y glicoproteínas	11
2.1 Función de las glicoproteínas	13
3. Glicosilación de proteínas	14
3.1 N-Glicosilación en <i>S. cerevisiae</i>	14
3.2 Glicosilación en <i>C. albicans</i> y su implicación en morfogénesis y virulencia	18
3.3 <i>ALG5</i>	19
3.4 <i>ALG9</i>	20
3.5 Enfermedades originadas por defectos en glicosilación: CDGs	20
4. Control de calidad de glicoproteínas en el retículo endoplásmico	21
4.1 Control de calidad y glicosilación de proteínas	21
4.2 Respuesta celular a defectos en el plegamiento de proteínas: <i>ERAD</i> (<i>ER-associated degradation</i>) y <i>UPR</i> (<i>Unfolded Protein Response</i>)	25
4.3 <i>UPR</i> en mamíferos	28
5. Rutas MAPK y adaptación a estrés en RE	28
5.1 Ruta SAPK activada por estrés	29
5.2 Ruta HOG y estrés en RE	32
6. Cambios en el número de cromosomas: Aneuploidía	34
6.1 Aneuploidía en microorganismos patógenos eucariotas como mecanismo de adaptación	34
6.2 Respuesta fenotípica a la aneuploidía	36
6.3 Respuesta transcripcional a la aneuploidía	37
6.4 Aneuploidía y cáncer	38
OBJETIVOS	39
MATERIALES Y MÉTODOS	41
1. Microorganismos y oligonucleótidos utilizados	43
2. Plásmidos utilizados	45
2.1 pAG1	45
2.2 pMR	45
2.3 pBI-SM	46
2.4 pNIM	47
3. Medios de cultivo y condiciones de crecimiento	47
3.1 Medios y condiciones de cultivo para el crecimiento de <i>C. albicans</i>	48
3.1.1 Crecimiento en forma de levadura	48

3.1.2 Crecimiento en forma de hifa	48
3.1.3 Crecimiento en condiciones de hipoxia	49
3.1.4 Inducción de la formación de clamidosporas	49
3.2 Medios y condiciones de cultivo para el crecimiento de <i>E. coli</i>	49
4. Análisis del crecimiento en presencia de compuestos que producen alteraciones en funciones celulares	50
5. Ensayo de afinidad a <i>Alcian Blue</i>	50
6. Microscopía	51
6.1 Estereomicroscopía	51
6.2 Microscopía óptica	51
7. Tinciones	51
7.1 Tinción con Hoechst	51
7.2 Tinción con lactofenol-azul algodón	51
8. Ensayos de virulencia	52
9. Técnicas de manipulación de proteínas	52
9.1 Preparación de extractos celulares	52
9.2 Detección de proteínas específicas: <i>Western blot</i>	53
10. Transformaciones	54
10.1 Transformación de <i>E. coli</i>	54
10.2 Transformación de <i>C. albicans</i>	54
11. Técnicas de manipulación de ácidos nucleicos	55
11.1 Purificación de ácidos nucleicos	55
11.1.1 Purificación de DNA plasmídico de <i>E. coli</i>	55
11.1.2 Purificación de DNA genómico de levaduras	55
11.1.3 Purificación de RNA total de levaduras	56
11.1.4 Purificación de fragmentos de DNA	56
11.2 Valoración de la concentración de ácidos nucleicos	56
12.3 Reacción de amplificación de DNA (PCR)	57
11.4 Electroforesis en geles de agarosa	57
11.5 Secuenciación de DNA	58
11.6 Digestión con endonucleasas de restricción y tratamiento con la fosfatasa alcalina	58
11.7 Ligación de fragmentos de DNA	58
11.8 Hibridación de ácidos nucleicos	59
11.8.1 Marcaje radiactivo de sondas de DNA	59
11.8.2 Detección de secuencias de DNA específicas: <i>Southern blot</i>	59
11.8.3 Detección de secuencias de RNA específicas: <i>Northern blot</i>	60
12. Determinación del origen y final del transcrito (5' y 3' RACE)	61
12.1 5' RACE: Determinación del origen de transcripción de un gen	61
12.2 3' RACE: Determinación del final de transcripción de un gen	62
13. PCR cuantitativa	63
13.1 Tratamiento del RNA y síntesis de cDNA	64
13.2 Reacción de PCR a tiempo real	65
13.3 Análisis cuantitativo de los resultados	67
14. Comparación de perfiles de transcripción mediante <i>microarrays</i> de cDNA	67
14.1 Características de los <i>microarrays</i> utilizados	68
14.2 Aislamiento de RNA total	68
14.3 Síntesis de cDNA marcado y purificación	68
14.4 Hibridación, lavado y escaneado de los <i>microarrays</i>	69
14.5 Análisis de los datos obtenidos	70

RESULTADOS	70
1. Análisis de la secuencia de los genes <i>ALG5</i> y <i>ALG9</i> de <i>C. albicans</i>, de las regiones intergénicas y de las proteínas que codifican	73
1.1 Secuencias codificantes y heterozigosidad	73
1.2 Análisis filogenético de las proteínas	77
1.3 Búsqueda de dominios funcionales	77
1.4 Análisis bioinformático de la interacción de las proteínas Alg5p y Alg9p con otras proteínas	78
1.5 Análisis bioinformático de la sintenia	79
1.6 Secuencias intergénicas	81
1.6.1 Determinación del origen y final de los transcritos	81
1.6.2 Análisis bioinformático de los promotores	83
2. Análisis de la expresión de los genes <i>ALG5</i> y <i>ALG9</i>	84
3. Construcción de las cepas mutantes delecionadas en el gen <i>ALG5</i> y <i>ALG9</i> en <i>C. albicans</i>	85
3.1 Comprobación de la cepa mutante <i>alg5Δ</i>	85
3.2 Comprobación de la cepa mutante <i>alg9Δ</i>	86
3.3 Secuenciación del entorno del locus de los genes <i>ALG5</i> y <i>ALG9</i> en los mutantes <i>alg5Δ</i> y <i>alg9Δ</i> , respectivamente	88
4. Localización subcelular de la proteína Alg5p	94
5. Caracterización fenotípica de los mutantes <i>alg5Δ</i> y <i>alg9Δ</i>	96
5.1 Crecimiento y morfología	96
5.1.1 Tasa de crecimiento	96
5.1.2 Morfología levaduriforme	97
5.1.3 Floculación y adherencia	98
5.2 Procesos morfogenéticos	100
5.2.1 Filamentación en medios sólidos	100
5.2.2 Filamentación en medios líquidos	103
5.2.3 Formación de clamidosporas	104
5.3 Sensibilidad de los mutantes frente a compuestos que afectan la viabilidad celular	105
5.3.1 Sensibilidad a azoles	105
5.3.2 Sensibilidad a compuestos que alteran a la pared celular	105
5.3.3 Sensibilidad a estrés oxidativo	106
6. Glicosilación de proteínas en los mutantes <i>alg5Δ</i> y <i>alg9Δ</i>	107
6.1 Afinidad a Alcian blue	107
6.2 Glicosilación de una proteína de referencia	107
7. Virulencia en los mutantes <i>alg5Δ</i> y <i>alg9Δ</i>	109
8. Estudio transcripcional de los mutantes <i>alg5Δ</i> y <i>alg9Δ</i>	111
8.1 Análisis del transcriptoma global de los mutantes <i>alg5Δ</i> y <i>alg9Δ</i> y de células tratadas con tunicamicina	111
8.1.1 Análisis de los grupos de genes enriquecidos estadísticamente dentro de los genes cuya expresión se encuentra alterada en los mutantes <i>alg5Δ</i> y <i>alg9Δ</i> y en células tratadas con tunicamicina mediante la herramienta <i>Funspec</i>	114
8.1.3 Principales grupos de genes expresados diferencialmente en los mutantes <i>alg5Δ</i> y <i>alg9Δ</i> y bajo tratamiento con tunicamicina	116
8.1.4 Búsqueda de motivos UPRE (<i>Unfolded Protein Response Elements</i>) en genes sobreexpresados en los mutantes <i>alg5Δ</i> y <i>alg9Δ</i>	120
8.2 Regulación transcripcional de genes <i>ALG</i> en los mutantes <i>alg5Δ</i> y <i>alg9Δ</i>	121

9. Mecanismos de adaptación en los mutantes <i>alg5Δ</i> y <i>alg9Δ</i>	122
9.1 Activación transcripcional de genes de respuesta a proteínas mal plegadas (<i>Unfolded Protein Response</i>)	122
9.2 Activación de rutas MAP Kinasas	124
9.3 Cambios en la ploidía	125
9.3.1 Investigación de la posible pérdida de cromosomas mediante el análisis de <i>SNP-RFLPs</i>	129
9.3.2 Investigación de la posible ganancia de cromosomas mediante PCR semicuantitativa	132
9.3.3 Complementación de la delección de <i>ALG9</i>	133
9.3.4 ¿La delección del gen <i>ALG9</i> está relacionada con la pérdida de una copia del cromosoma 5?	136
DISCUSIÓN	139
CONCLUSIONES	153
BIBLIOGRAFÍA	155
ABREVIATURAS	177
MATERIAL SUPLEMENTARIO	179

Introducción



1. *Candida albicans*

1.1 Posición taxonómica y características generales

El género *Candida* comprende unas doscientas especies que se caracterizan por presentar reproducción asexual por gemación y ausencia de pigmentos carotenoides. Aunque inicialmente se incluyeron dentro de la clase Deuteromycetes, actualmente se incluyen dentro de los ascomicetos siguiendo la clasificación (Calderone, 2002): Fungi (reino), Ascomycota (phylum), Hemiascomycetes (clase), Saccharomycetales (orden), Candidaceae (familia) y *Candida* (género). Entre las especies del género se encuentran patógenos importantes como *C. albicans*, *C. tropicalis* y el patógeno emergente *C. glabrata*; además de especies menos frecuentes como *C. krusei* (*Issatchenkia orientalis*), *C. guilliermondii* (*Pichia guilliermondii*), *C. parapsilosis*, *C. dubliniensis*, *C. viswanathii*, *C. inconspicua*, *C. lusitaniae* (*Clavispora lusitaniae*) y otras especies conocidas por ser capaces de crecer sobre N-alcanos o ácidos grasos como única fuente de carbono como *C. utilis* y *C. maltosa* (Calderone, 2002). *Candida albicans* es la especie más conocida del género. Se caracteriza por su capacidad para formar tubos germinativos y clamidosporas, también porque presenta un patrón en la asimilación de azúcares característico. Ha sido ampliamente estudiada debido a que es el patógeno fúngico oportunista de mayor incidencia en humanos.

1.2 El genoma de *C. albicans*

El genoma diploide de *C. albicans* tiene un tamaño total de 32 Mb repartidas en 8 cromosomas, que varían en tamaño de 4,3 a 0,98 Mb. Es, por tanto, un 30% mayor que el de *S. cerevisiae*. Los cromosomas están numerados del 1 al 7, siendo 1 el mayor y el 7 el de menor tamaño. El octavo cromosoma se conoce como cromosoma R, contiene el DNA ribosómico (rDNA), y suele ser el más largo, aunque el tamaño varía espontáneamente según el número de repeticiones de genes rDNA (Iwaguchi *et al*, 1992). Desde el año 2000 se dispone de la secuencia completa de su genoma, la secuenciación fue llevada a cabo por el *Stanford Genome Center* partiendo de DNA de la cepa SC5314. Esta cepa es un aislado clínico usado habitualmente en análisis moleculares y ensayos de virulencia. El genoma mitocondrial ha sido también secuenciado, con un tamaño total de 40,420 Kb. Una vez conocida la secuencia del genoma se ha realizado la anotación de las posibles secuencias de lectura abierta (ORFs). Considerando que codificaran una proteína de al menos 150 aa, tuvieron un homólogo en las bases de datos públicas o tuvieron una probabilidad

significativa de codificar una proteína, en total se anotaron 6354 genes. Nuestro grupo de trabajo participó en el proyecto europeo para este fin, coordinado desde el Instituto Pasteur (http://pasteur.fr/Galar_Fungail/CandidaDB) (d'Enfert *et al*, 2005).

El conocimiento de la secuencia completa de *C. albicans* puso de manifiesto una elevada heterozigosidad teniendo en cuenta que es un organismo que se reproduce fundamentalmente de forma clonal (Jones *et al*, 2004; Braun *et al*, 2005). Esta alta heterozigosidad incluye inserciones, deleciones, translocaciones y polimorfismos de un solo nucleótido (*Single Nucleotide Polimorphism, SNP*). El análisis de la secuencia del genoma de la cepa SC5314 de *C. albicans* reveló la existencia de un mínimo de 55700 *SNPs* en el genoma (Jones *et al*, 2004). Actualmente se dispone de un mapa de los *SNPs* distribuidos en los 8 cromosomas (Legrand *et al*, 2008; Muzzey *et al*, 2013). La heterozigosidad no esta distribuida de igual manera a lo largo del genoma, los cromosomas 5 y 6 son los más heterogéneos, y el 3 y el 7 los que menos. Una de las funciones de la heterozigosidad puede ser aportar variabilidad genética. Los distintos alelos pueden codificar proteínas con diferente función. En otras ocasiones parece que es necesaria la presencia de los dos alelos para llevar a cabo su función normal, debido a una cuestión de dosis génica. En estos casos, es de esperar que la deleción de uno de los dos alelos origine una célula mutante con distinto fenotipo a la célula parental.

Hasta hace poco tiempo, *C. albicans* ha sido considerado un organismo estrictamente diploide, sin ningún estado haploide. La naturaleza diploide de este microorganismo ha complicado los estudios genéticos y genómicos. Se propuso que *C. albicans* era un diploide obligado debido a la presencia de numerosas mutaciones recesivas letales en su genoma, aunque estudios de monosomía en determinados cromosomas, recombinación y mapas del haplotipo demostraron que podía encontrarse homocigosis en ciertos cromosomas (Andaluz *et al*, 2011; Forche *et al*, 2008). Además se ha descrito un ciclo parasexual diploide-tetraploide que se inicia con la transición a células opacas, éstas conjugan para formar células tetraploides, seguido por la reducción del nivel de ploidia mediante un proceso no meiótico que se conoce como “pérdida de cromosomas coordinada”, y que da lugar a una progenie diploide que generalmente contiene múltiples aneuploidías (Miller & Johnson, 2002; Soll *et al*, 2003; Bennett & Johnson, 2003). La población generada a partir de células tetraploides supone una rápida adquisición de diversidad genética lo que incrementaría la adaptación en determinadas circunstancias (Berman & Hadany, 2012).

Recientemente se han aislado células haploides de *C. albicans* (Hickman *et al*, 2013). El descubrimiento se produjo de forma casual en el transcurso de experimentos que trataban de analizar la pérdida de heterocigosidad. Encontraron una cepa homocigotica para todos los marcadores y *SNPs* analizados, y mediante citometría de flujo comprobaron que tenía la mitad de DNA que el control diploide. Además encontraron otras cepas haploides a partir de células sometidas a estrés, así como en células aisladas de modelos *in vivo* de infección en ratones. Estas células haploides, aunque son capaces de llevar a cabo procesos morfogénicos al igual que la cepa parental diploide, son más pequeñas, presentan una tasa de crecimiento menor y son avirulentas. Las células haploides pueden sufrir un proceso de auto-diploidización dando lugar a células diploides homocigoticas con un crecimiento similar a su parental haploide. Esto indica que el estado diploide *per se* no supone una ventaja en el crecimiento, sino que es la heterocigosidad lo que supone una ventaja en *C. albicans*, ya que enmascara mutaciones recesivas que reducen el crecimiento.

1.4 Plasticidad morfológica

1.4.1 Características de las diferentes morfologías

C. albicans es un organismo polimórfico, ya que puede presentar distintas formas: levadura, hifa, pseudohifa y clamidosporas. Las levaduras o blastosporas (figura 1a) tienen forma elipsoidal y un diámetro aproximado de 5 μm , se dividen por gemación y son más abundantes durante el crecimiento saprofito del hongo (Odds, 1988). Las hifas (figura 1b) tienen forma cilíndrica con un diámetro aproximado de 2 μm , las paredes laterales se mantienen paralelas a lo largo de todo el filamento y no presentan constricciones en los septos. El primer septo se localiza dentro del tubo germinativo, alejado del cuello de la célula madre (Sudbery, 2001; Sudbery *et al*, 2004). En las pseudohifas (figura 1c), a diferencia de las hifas, las paredes laterales no se mantienen paralelas por lo que el diámetro es variable. Son más gruesas, el diámetro mínimo se encuentra alrededor de 2.8 μm , y presentan constricciones en los septos. Se caracterizan porque el primer septo se localiza en el cuello de la célula madre. Las pseudohifas se originan mediante un proceso de gemación en el que no se llegan a separar la célula madre y la célula hija (Sudbery, 2001; Sudbery *et al*, 2004; Warena & Konopka, 2002). Las clamidosporas (figura 1d) son esporas asexuales, se forman mediante el recubrimiento con una pared gruesa de las células preexistentes. Tienen forma redondeada con un tamaño aproximado de 8 a 12 μm de diámetro, y aparecen en posiciones laterales o terminales de hifas y pseudohifas (Cole *et al*, 1991; Nobile *et al*, 2012).

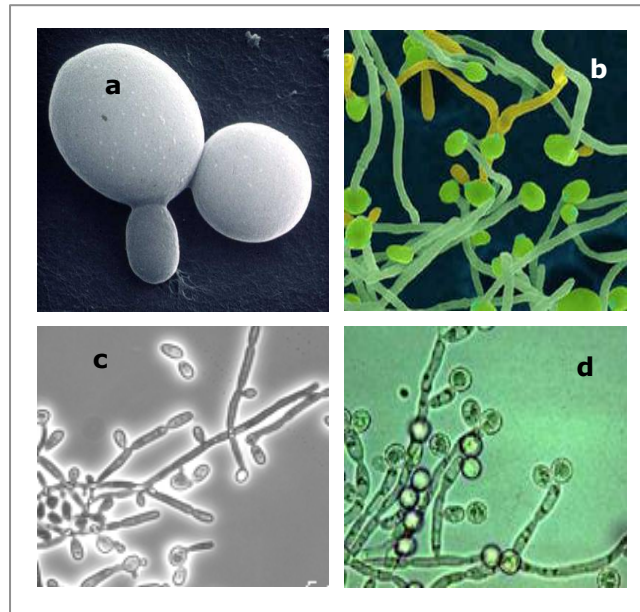


Figura 1. Morfologías que adopta *C. albicans* (fotografías realizadas a diferentes escalas). a. Levadura o blastospora. b. Hifa. c. Pseudohifa. d. Clamidosporas.

El aislado clínico WO1 presenta dos tipos de morfologías de células (Slutsky *et al*, 1987). Las células de esta cepa cambian espontáneamente entre dos fases: la fase blanca, consistente en levaduras de morfología similar a las que se encuentran en otras cepas de *C. albicans*, y la fase opaca, formada por células más grandes y alargadas, y con granulaciones en la superficie celular (figura 2a). Las colonias formadas por células opacas también presentan un aspecto característico, siendo más planas y grandes, en relación a las formadas por células blancas, y de un color grisáceo (figura 2b). Además presentan diferencias en los patrones de gemación y capacidad de formar hifas.

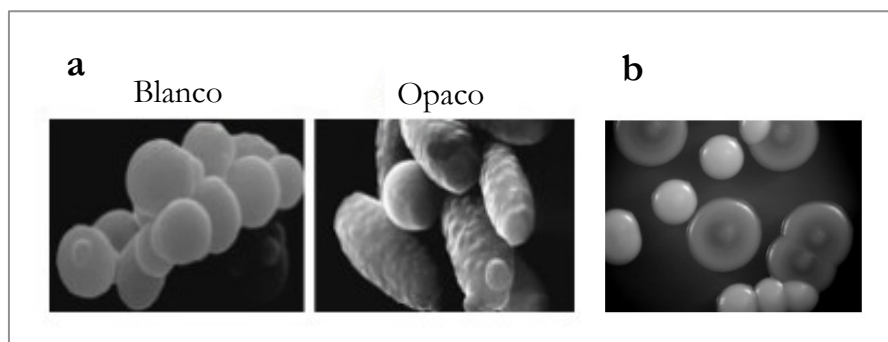


Figura 2. a. Imagen a microscopía electrónica de células blancas y de células opacas de *C. albicans*. b. Colonias formadas por células blancas y colonias formadas por células opacas.

Las células de *C. albicans* pueden agruparse en comunidades denominadas biopelículas o biofilms (figura 3). En el caso de *C. albicans*, las biopelículas están constituidas por levaduras, hifas, pseudohifas y material extracelular compuesto principalmente por polisacáridos y proteínas. Estos componentes se disponen de forma ordenada en capas. Generalmente las capas internas están constituidas mayoritariamente por levaduras, mientras que en las más externas se encuentran principalmente formas filamentosas. Debido a su formación en epitelios, catéteres y prótesis, y a su marcada resistencia a antifúngicos, la formación de biofilms se considera un factor importante en la patogenicidad del hongo (Douglas, 2003). Por ello, actualmente, la formación de biofilms es uno de los fenotipos que frecuentemente se examina en las cepas mutantes.

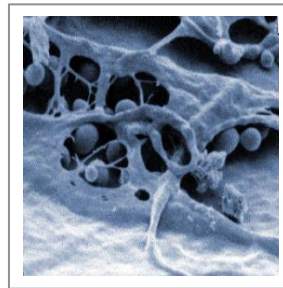


Figura 3. Imagen de microscopía electrónica de un biofilm formado por *C. albicans*.

1.4.2 Procesos morfogénéticos

C. albicans es capaz de cambiar su morfología, de entre las descritas anteriormente, mediante procesos morfogénéticos (figura 4). Los cambios morfológicos están directamente relacionados con las condiciones ambientales, y regulados por los patrones de expresión génica. A partir de células creciendo en forma de levadura, puede llevarse a cabo la transición levadura-hifa. Las células emiten un tubo germinativo que dará lugar a la formación de hifas. Estas dos formas son las que predominan durante el proceso de infección en humanos. La formación de hifas a partir de levaduras puede considerarse que depende de dos factores: En primer lugar, de la naturaleza, número e intensidad de las señales ambientales; y en segundo lugar, de la actividad de vías de señalización, incluyendo factores de transcripción (Ernst, 2000).

Las señales ambientales que inducen la filamentación que han sido mejor caracterizadas son el aumento de temperatura (de 30°C a 37°C), el cambio de pH ácido a neutro, y la exposición a distintas concentraciones de diferentes fuentes de carbono y

nitrógeno. Las fuentes de nitrógeno fácilmente asimilables, como las sales de amonio, favorecen el crecimiento en forma de levaduras, en cambio, las difíciles de asimilar, como la prolina, ayudan a la formación de hifas y pseudohifas. Por otro lado, se ha descrito que la presencia de glucosa a bajas concentraciones induce la filamentación, así como la sustitución de la glucosa por N-AcGlc o manitol como fuente de carbono. Se sabe que el suero es un potente inductor de la miceliación, debido a que está tamponado a pH 8,5 y a que contiene dos inductores, la glucosa a una determinada concentración y otro componente que no ha sido identificado, ambos activos a este pH (Hudson *et al*, 2004). Además, se ha demostrado que un reposo metabólico previo favorece la formación de hifas (Ernst, 2000). Hay que tener en cuenta que el cambio morfológico está determinado por la combinación de varios factores, de manera que para que se induzca la transición dimórfica, tanto la temperatura como el pH y la composición del medio, tienen que ser los adecuados. El crecimiento en forma de pseudohifa puede inducirse a partir de levaduras o de hifas. Las condiciones que inducen la formación de pseudohifas no están muy bien definidas, aunque se ha demostrado que se desarrollan bajo unas condiciones de temperatura y pH intermedias a las que favorecen la formación de hifas y levaduras: 35°C de temperatura y pH 6, aproximadamente. También se sabe que la formación de pseudohifas puede promoverse gracias a la presencia en el medio de altas concentraciones de fosfatos o alcanos, 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), como el crecimiento en condiciones de anoxia dentro de una matriz de agar (probablemente debido a la limitación de oxígeno), el contacto con macrófagos, medios pobres en nutrientes como el medio *Spider*, bajo privación de hierro o durante la infección en riñón de ratones (Ernst, 2000; Sudbery *et al*, 2004). Tanto el crecimiento en forma de hifa como de pseudohifa, son procesos reversibles, es decir que, a partir de estas estructuras pueden originarse levaduras. Este proceso todavía no está bien caracterizado.

Las clamidosporas únicamente aparecen en determinadas condiciones, a partir de pseudohifas (Cole *et al*, 1991). No suelen detectarse *in vivo*, se puede inducir su formación en el laboratorio cultivando las células en medios sólidos pobres en nutrientes, suplementados con detergentes, en condiciones microaerófilas y a temperaturas entre 20°C y 30°C; y su formación se reprime en presencia de glucosa (Calderone, 2002). Se conoce muy poco del programa de desarrollo de las clamidosporas a nivel molecular (Staib & Morschhäuser, 2007)

La transición blanco-opaco está regulada por el locus *MTL* (*mating type*), donde se encuentran genes ortólogos a los que regulan la reproducción sexual en *Saccharomyces cerevisiae*, y únicamente las cepas homocigotas o hemizigotas en este locus son capaces de llevar a cabo el cambio morfológico (Hull & Johnson, 1999). La mayor parte de las cepas de *C. albicans* son heterocigotas para el locus *MTL*, poseen un alelo *MTL* con los reguladores transcripcionales *MTLa1* y *MTLa2* y el otro alelo con *MTL α 1* y *MTL α 2*, por lo que no son capaces de llevar a cabo la transición blanco-opaco. Si cepas homocigotas y hemizigotas en el locus *MTL* complementarias (a y α) se mezclan, puede producirse conjugación. Son únicamente las células opacas las que son capaces de llevar a cabo la conjugación. Se sabe que *in vitro*, una temperatura cercana a 37°C induce la reversión a fase blanca, por lo que la conjugación se produce con mayor frecuencia a temperatura ambiente que a temperaturas entre 30°C y 37°C (Morschhäuser, 2010).

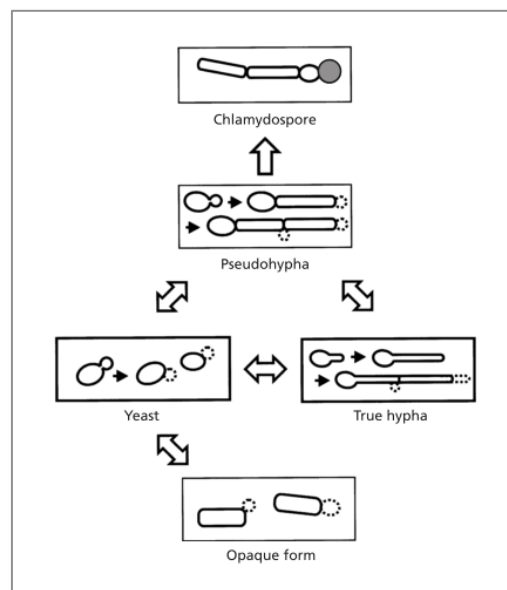


Figura 4. Cambios morfológicos que experimenta *C. albicans* (Ernst, 2000).

1.5 *C. albicans* como agente patógeno

C. albicans es un importante patógeno humano. Es uno de los patógenos fúngicos oportunistas de mayor incidencia en nuestra especie. Este microorganismo se encuentra habitualmente como comensal inocuo en la cavidad oral, tractos digestivo y genital, de humanos y de otros animales de sangre caliente (Hube & Naglik, 2005). Se cree que

pequeños desequilibrios en el sistema inmune determinan que se produzca la infección del hospedador. El amplio espectro de enfermedades que origina es debido a la capacidad del hongo a sobrevivir como comensal en multitud de tejidos, y de que es capaz de adaptar su crecimiento a condiciones fisiológicas muy diversas y extremas (Calderone & Fonzi, 2001; Cheng *et al*, 2005).

1.5.1 Factores de virulencia en *C. albicans*

El criterio que han seguido la mayoría de los investigadores para determinar cuáles son los factores de virulencia en sentido estricto, consiste en demostrar que las cepas carentes de una determinada habilidad o actividad no son capaces de establecer infecciones pero sí vivir como comensales. Según este criterio, se han descrito diversos factores que condicionan la virulencia en *C. albicans*, entre ellos, la capacidad de llevar a cabo la transición levadura-hifa, la capacidad de cambio entre diferentes fenotipos celulares, la variabilidad antigénica, la adhesión a sustratos inertes y biológicos, la secreción de enzimas hidrolíticas, y la formación de biofilms.

La capacidad de cambiar de la morfología levaduriforme a la filamentosa es considerada como un factor de virulencia (Sobel *et al*, 1984). Se ha demostrado que la formación de hifas facilita la invasión de los tejidos del hospedador, y proporciona al patógeno una forma de escapar del sistema inmune (Cutler, 1991; Blasi *et al*, 1995). La transición blanco-opaco facilita la adaptación de *C. albicans* a los distintos tejidos del hospedador. El cambio fenotípico va acompañado de cambios en la expresión de antígenos, lo cual podría proporcionar a *C. albicans* la flexibilidad necesaria para adaptarse a diferentes ambientes y escapar del sistema inmune (Calderone & Fonzi, 2001). La adhesión a superficies biológicas e inertes, como catéteres, contribuye a la capacidad virulenta, ya que permite al patógeno unirse al hospedador, ayudando a la colonización y dificultando la destrucción por parte del sistema inmune de las células de *C. albicans*. Se han descrito un gran número de proteínas que funcionan como factores de reconocimiento y adhesión, y un gran número de genes que contribuyen a estas características en *C. albicans* (Zhao *et al*, 2005; Modrzewska & Kurnatowski, 2015). Por otro lado, la secreción de enzimas hidrolíticas, como fosfolipasas y proteasas, se asocia con virulencia. *C. albicans* presenta altas capacidades hidrolíticas frente a una alta gama de sustratos. El grupo de las proteasas contribuyen a la invasión del tejido del huésped digiriendo o destruyendo las membranas celulares y degradando moléculas de la superficie (Schaller *et al*, 2005). Se ha demostrado que algunos mutantes en genes que codifican proteasas son menos virulentos, y que la

inhibición de la actividad proteásica disminuye la capacidad de invasión y adherencia de las células de *C. albicans* (Hube *et al*, 1997; Ma *et al*, 2009). Las fosfolipasas han sido relacionadas con la penetración en células del hospedador, la adhesión a células epiteliales e invasión del epitelio oral (Schaller *et al*, 2005). En varios modelos de candidiasis se ha observado que para mantener la capacidad virulenta se requiere de la presencia de un tipo de fosfolipasa, la cual se localiza en el extremo de la hifa durante la invasión (Leidich *et al*, 1998). La formación de biofilms también se considera un factor de virulencia en *C. albicans*. Pueden aislarse biofilms en superficies bióticas y abióticas dentro del hospedador, principalmente implantes y catéteres. Las células dentro del biofilm presentan una susceptibilidad reducida a antifúngicos, además son menos sensibles al sistema inmune humano (Douglas, 2003; Mathé & Van Dijck, 2013).

1.5.2 Antifúngicos contra *C. albicans*

A pesar de que el uso de antifúngicos en los tratamientos clínicos es diverso y numeroso, sólo unas pocas clases de antifúngicos son útiles para el tratamiento de las infecciones causadas por *C. albicans*. Es necesaria la búsqueda de nuevos antifúngicos o la combinación de los ya existentes debido al incremento en la resistencia de los hongos frente a los tratamientos actuales (Spampinato & Leonardi, 2013). Se han descrito mecanismos de resistencia frente a los antifúngicos más utilizados contra *C. albicans*, como son los azoles (Noël, 2012), las equinocandinas (Alexander *et al*, 2013), los polienos y los análogos de nucleósidos (Espinel-Ingroff, 2008).

Los azoles constituyen la familia más amplia de antifúngicos, su mecanismo de acción consiste en alterar la integridad de la membrana celular mediante la inhibición de la enzima lanosterol 14- α dimetilasa, implicada en la ruta del ergosterol, el componente mayoritario de las membranas celulares fúngicas. Los principales mecanismos por lo cuales se genera la resistencia a azoles son (Noël, 2012): la salida del antifúngico del interior celular debido a la sobreexpresión de genes que codifican bombas de expulsión (*CDR1*, *CDR2* o *MDR1*), la disminución de la afinidad por su sustrato debido a mutaciones puntuales del gen que codifica la lanosterol 14- α dimetilasa (*ERG11*), y la neutralización del efecto debido por ejemplo a la sobreexpresión del gen *ERG11*.

Las equinocandinas son agentes antifúngicos lipopeptídicos que llevan a la formación de una pared fúngica alterada ya que bloquean la enzima (1,3)- β -D-glucan sintasa. Se han encontrado cepas no sólo resistentes a equinocandinas, sino también a azoles y

equinocandinas de forma simultánea (Alexander *et al*, 2013). La resistencia a equinocandinas se debe a mutaciones puntuales en los genes *FKS1* y/o *FKS2* que codifican el complejo (1,3)- β -D-glucan sintasa.

Los polienos se unen al ergosterol y forman poros en la membrana plasmática alterando la permeabilidad selectiva de ésta, lo que desencadena la muerte celular. Los pocos casos de resistencia a polienos se deben a una disminución en el contenido de ergosterol de las membranas causada probablemente por mutaciones en los genes *ERG3* o *ERG6* que codifican enzimas implicadas en la síntesis de ergosterol (Espinel-Ingroff, 2008).

El mecanismo de acción de los análogos de nucleósidos se basa en la inhibición de la síntesis de DNA/RNA. El más común es la flucitosina, que es un análogo de la pirimidina (Vermees *et al*, 2000; Onishi *et al*, 2000). La resistencia a flucitosina puede deberse a mutaciones puntuales en el gen *FCY2* que codifica la citosina permeasa, lo que provoca que el antifúngico no pueda penetrar en el interior celular. Otro mecanismo de resistencia a flucitosina se basa en la neutralización de su efecto debido a mutaciones en los genes *FCY1* y *FUR1*, que codifican la citosina desaminasa y la uracilo fosforribosil transferasa, respectivamente (Espinel-Ingroff, 2008)

1.6 C. albicans como modelo de estudio

El uso de las levaduras como modelo de estudio en biología molecular y genética se debe a que son organismos eucariotas fáciles de manipular y con un crecimiento rápido. La especie de levadura más utilizada en estos ensayos es *S. cerevisiae*. La utilización de *C. albicans* en la investigación nos permite estudiar procesos como la diferenciación celular y mecanismos de virulencia, debido a su plasticidad morfológica y a que es un organismo patógeno. Las conclusiones derivadas de estos estudios pueden ayudar a comprender los mecanismos de patogenicidad de otros hongos patógenos más virulentos, y por tanto con mayor dificultad de manejo en el laboratorio. Además, aunque *S. cerevisiae* es un importante modelo de estudio eucariótico, los componentes ortólogos en otros hongos, incluyendo *Schizosaccharomyces pombe* y *C. albicans*, no siempre cumplen funciones idénticas.

El que *C. albicans* sea un organismo diploide en el que sólo en determinadas cepas se de la reproducción sexual (Soll *et al*, 2003), y que su utilización de codones sea diferente a otros organismos (el codón CTG se traduce como serina en lugar de leucina), dificulta su manipulación genética. Pero en los últimos años se han desarrollado una serie de herramientas moleculares que han facilitado su estudio. Actualmente, existen cepas

delecionadas en genes que sirven de marcadores, sistemas de transformación eficientes y estrategias para la delección secuencial de genes.

2. PARED CELULAR Y GLICOPROTEÍNAS

La pared celular en *C. albicans* es una estructura fundamental tanto para mantener la integridad celular como para su interacción con el entorno. Además desempeña un papel importante en la patogenicidad del hongo, ya que es el primer punto de contacto con el hospedador, contiene importantes determinantes antigénicos, es responsable de la adherencia del patógeno, establece interacciones con el hospedador y sirve de protección frente a los mecanismos de defensa de éste (Chaffin, 2008). La pared celular también es importante en la participación de la formación de biopelículas, que es un proceso ecológicamente importante para muchos hongos (Mathé & Van Dijck, 2013).

El esqueleto de la pared celular de la mayoría de los hongos patógenos, incluyendo a *C. albicans*, está formado por una unidad estructural de β -(1,3)-glucano unido covalentemente a β -(1,6)-glucano y a quitina (polímero de N-acetilglucosamina con uniones β -(1,4)) (figura 5). Estos polímeros se unen mediante puentes de hidrógeno a cadenas de polisacáridos adyacentes para formar una red tridimensional de microfibrillas. Muchos estudios sugieren que la quitina y el β -(1,3)-glucano, los componentes estructurales principales, se localizan hacia el interior de la pared celular; y que la capa más externa está enriquecida con glicoproteínas de pared celular que están unidas al β -(1,6)-glucano mediante restos de glicosilfosfatidilinositol (GPI), o unidas al β -(1,3)-glucano (Netea *et al*, 2008).

Las proteínas de la pared celular, conocidas como *CWPs* (*Cell Wall Proteins*), son principalmente proteínas glicosiladas. En *C. albicans* las *CWPs* están generalmente altamente glicosiladas con polisacáridos ricos en manosa (también llamado manano), los carbohidratos pueden constituir más del 90% de su masa molecular. Se han encontrado algunas proteínas no glicosiladas en la pared celular aunque no unidas de forma covalente a los polímeros de la pared (Pitarch, 2002). En *C. albicans* se han encontrado proteínas relacionadas con respuesta a estrés localizadas en la pared celular (Hsp y Ssa), o proteínas implicadas en rutas metabólicas como la 3-fosfoglicerato kinasa o la enolasa (Castillo *et al*, 2008).

Las *CWPs* más frecuentes en *C. albicans* son las proteínas unidas a GPI (Glicosilfosfatadilinositol), constituyen aproximadamente el 88% del total de las proteínas unidas covalentemente a la pared celular (Richard & Plaine, 2007). Estas proteínas se anclan a través del GPI al β -(1,6)-glucano, y se caracterizan por presentar en su extremo N-terminal la señal de exportación (péptido señal), y en el extremo C-terminal la señal de anclaje a GPI. 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 celular y se liberan de la pared mediante tratamiento alcalino suave, algunas quedan retenidas por puentes disulfuro (Garcerá *et al*, 2003). Se han identificado varias proteínas Pir en *C. albicans* (Martínez *et al*, 2004; Groot *et al*, 2004).

La pared celular no es un orgánulo estático, sino una estructura dinámica que permite la expansión de la célula, la división celular y los procesos morfogénicos. Se ha comprobado que *C. albicans* es capaz de modular la estructura y composición de su pared celular como respuesta adaptativa a cambios en su entorno (Hall, 2015). Por ejemplo, el β -(1,3)-glucano aislado a partir de hifas de *C. albicans* tiene una estructura diferente al β -(1,3)-glucano de levaduras (Lowman *et al*, 2014). La concentración de quitina también puede regularse según las condiciones ambientales, y es de resaltar que un incremento del contenido de quitina afecta a la sensibilidad a antifúngicos así como al reconocimiento por el sistema inmune innato (Mora-Montes *et al*, 2011). La síntesis de quitina está regulada a través de las rutas de señalización de Hog1, Pkc y calcio (Munro *et al*, 2007). El contenido de manano también es regulado según las condiciones ambientales y de crecimiento. Las fibrillas de manano son más largas y densas en células de levaduras que en hifas (Cheng *et al*, 2011). Además las hifas contienen un manano con una composición distinta a las levaduras (Shibata *et al*, 2007). Distintos tipos de estrés con los que se encuentra *C. albicans* durante la colonización de hospedador, como el estrés oxidativo y osmótico, también inducen cambios en la composición de manano de la pared celular (Koyama *et al*, 2009).

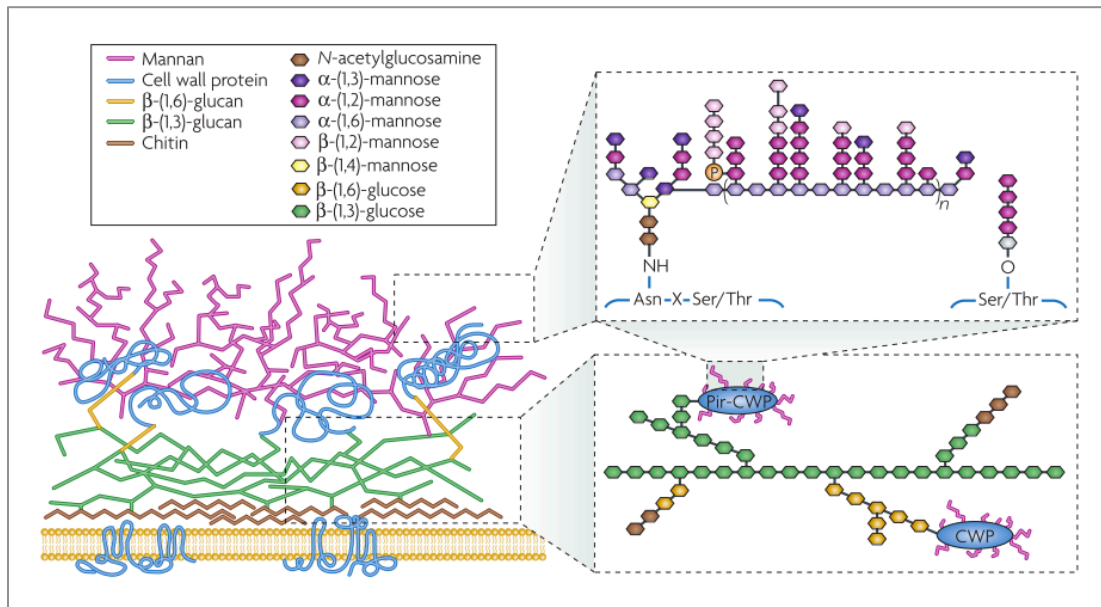


Figura 5. Esquema de la estructura de la pared celular de *C. albicans* (Netea *et al*, 2008).

2.1 Función de las glicoproteínas

Las glicoproteínas de la pared celular juegan un papel extremadamente importante en los siguientes procesos:

- Nutrición y crecimiento celular: varias enzimas de la pared celular participan en la degradación de moléculas que no pueden atravesar la pared celular, dando lugar a productos accesibles para la nutrición celular. Otras degradan polímeros de la pared o los sintetizan, lo cual es necesario para el crecimiento celular.

- Interacción celular: las glicoproteínas, principalmente manoproteínas, localizadas en la pared celular son fundamentales para la interacción del hongo con otras células o sustratos inertes. Desempeñan un papel muy importante en la adhesión del hongo a su hospedador (Gow & Hube, 2012).

- Antigenicidad: proteínas de la pared celular actúan como antígenos, como algunas glicoproteínas que se expresan de forma diferencial en levaduras e hifas (Netea *et al*, 2008; Hall & Gow, 2013).

- Patogenicidad: las proteínas de la pared celular frecuentemente constituyen factores de virulencia, influyendo en la patogenicidad directa o indirectamente (Ruiz-Herrera *et al*, 2006; Mora-Montes *et al*, 2009).

- Estructura de la pared celular y morfogénesis: algunas glicoproteínas parecen ser imprescindibles para la correcta formación de la pared celular y para llevar a cabo la respuesta morfogénica del hongo (Gow & Hube, 2012). Mutantes que carecen de estas proteínas presentan defectos en la pared celular o en la capacidad de llevar a cabo la transición dimórfica (Herrero *et al*, 2002; Mora-Montes *et al*, 2007).

3. GLICOSILACIÓN DE PROTEÍNAS

Se conoce como glicosilación de proteínas al proceso por el cual se produce la adición de carbohidratos a una proteína, dando lugar a las glicoproteínas. Éstas generalmente son secretadas o pasan a formar parte de la pared y membrana celular, aunque también existen proteínas nucleares y citosólicas que pueden estar glicosiladas. La unión de estos carbohidratos es fundamental para el correcto plegamiento de algunas proteínas en el retículo endoplásmico, así como para determinar el destino de la proteína a su compartimento intracelular o extracelular y es una diana de reconocimiento en las interacciones célula-célula.

Existen dos tipos de glicoproteínas, atendiendo al tipo de enlace: O-glicoproteínas, donde los carbohidratos se unen al hidroxilo de la cadena lateral de los aminoácidos serina y treonina, y N-glicoproteínas, en ellas el polisacárido está unido a la cadena peptídica a través del grupo amino de una asparagina.

3.1 N-Glicosilación en *S. cerevisiae*

En *S. cerevisiae* la N-glicosilación de proteínas es un proceso muy bien caracterizado, tanto a nivel bioquímico como genético (Aebi, 2013). La N-glicosilación se inicia en el retículo endoplásmico con la transferencia de un oligosacárido compuesto por dos residuos de N-acetilglucosamina, nueve manosas y tres glucosas, complejo denominado núcleo oligosacárido. Éste es sintetizado sobre un lípido isoprenoide (bactoprenol en bacterias y dolicol en arqueas y eucariotas). El lípido isoprenoide sirve como transportador para el oligosacárido, además de ubicar las reacciones de síntesis del núcleo oligosacárido en torno a la membrana del RE.

La N-glicosilación de proteínas es un proceso que tiene lugar en todos los organismos (Kaminski *et al*, 2013). Los primeros pasos de esta ruta se consideran homólogos, tienen lugar en el periplasma de la membrana plasmática de organismos procariontes o en la membrana del RE de células eucariotas. Hay que resaltar que la

incorporación del núcleo oligosacárido $\text{Glc}_3\text{Man}_9\text{GlcNac}_2$ al dolicol pirofosfato (Dol-PP), así como las reacciones iniciales que remodelan el oligosacárido tras su unión a la proteína, son procesos altamente conservados en eucariotas.

Los monosacáridos que forman parte del núcleo oligosacárido entran en la ruta biosintética de la N-glicosilación desde el metabolismo primario como azúcares activados por nucleótidos. Las glicosiltransferasas que actúan en la cara citoplasmática de la membrana del RE utilizan como sustrato UDP-NAcGlc y GDP-Man, mientras que las reacciones de síntesis del núcleo oligosacárido que tienen lugar en el lumen del RE se llevan a cabo a partir del donador dolicol fosfato unido a manosa o glucosa. El Dol-P-Man y el Dol-P-Glc se sintetizan en el citoplasma a partir de Dol-P y GDP-Man o UDP-Glc, reacción catalizada por la Dol-P-Man sintasa codificada por el gen *DPM1* (Orlean *et al*, 1988) y la Dol-P-Glc sintasa codificada por el gen *ALG5* (Heesen *et al*, 1994). El lípido donador se transloca al interior del RE mediante proteínas que no han sido identificadas todavía. La Dol-P-Man sintasa es esencial en *S. cerevisiae*, además de intervenir en la N-glicosilación de proteínas también es necesaria en O-manosilación y en la formación de proteínas unidas a GPI (Lommel & Strahl, 2009; Orlean & Menon, 2007). La Dol-P-Glc sintasa codificada por el gen *ALG5* no es esencial (Heesen *et al*, 1994).

Los mutantes *alg* (*asparagine-linked glycosylation*) en *S. cerevisiae* han sido fundamentales para dilucidar los componentes que participan en la síntesis del núcleo oligosacárido en la vía de N-glicosilación. Muchos de estos mutantes se caracterizan porque acumulan el correspondiente oligosacárido precursor unido al Dol-PP, lo que pone de manifiesto la ausencia de glicosiltransferasas redundantes específicas de cada uno de los pasos de la ruta de biosíntesis. Sin embargo, en muchos de ellos la biosíntesis del núcleo oligosacárido puede continuar originando oligosacáridos con estructuras aberrantes que son transferidos a la proteína. El núcleo oligosacárido está formado por el ensamblaje de catorce monosacáridos: dos moléculas de N-acetilglucosamina, nueve de manosa y tres de glucosa. Los siete primeros son transferidos desde nucleótidos al Dol-PP en la cara externa del RE, y el resto desde Dol-P en la cara luminal de este orgánulo (figura 6). La biosíntesis del núcleo oligosacárido comienza con la transferencia de N-AcGlc-1-P desde el UDP-NAcGlc al Dol-PP, este paso es catalizado por ScAlg7p. Esta enzima es diana de la tunicamicina, inhibidor de la N-glicosilación (Georjana *et al*, 1984). A continuación, el complejo dimerico ScAlg14p/ScAlg13p incorpora un residuo de N-AcGlc desde el UDP-NAcGlc formando un enlace β -1,4 (Bickel *et al*, 2005; Gao *et al*, 2005). La siguiente enzima

en actuar es codificada por el gen *ScALG1*, y cataliza la unión del primer residuo de manosa al núcleo oligosacárido mediante enlace β -1,6 (Huffaker & Robbins, 1982; Couto *et al*, 1984). La proteína ScAlg2p tiene una función dual, cataliza la unión del segundo y tercer residuo de manosa unidos mediante enlaces α -1,3 y α -1,6 (O'Reilly *et al*, 2006; Kämpf *et al*, 2009). A continuación otra enzima con doble función, la codificada por el gen *ScALG11*, transfiere dos residuos de α -1,2 manosa al oligosacárido unido al Dol-PP (Cipollo *et al*, 2001; O'Reilly *et al*, 2006). El heptasacárido sintetizado en la cara citosólica del RE es translocado a la cara luminal por medio de un movimiento flip-flop (Burda & Aebi, 1999).

Una vez en el lumen del RE, se adicionan cuatro residuos de manosa y tres de glucosa. Las glicosiltransferasas que median estas reacciones presentan dos diferencias fundamentales respecto a las de la cara citoplasmática: usan monosacáridos unidos a dolicol fosfato en lugar de azúcares activados por nucleótidos como donadores, y los genes que las codifican no son esenciales para la viabilidad celular (Burda & Aebi, 1999). Los mutantes que presentan deleciónados estos genes son capaces de sintetizar un núcleo oligosacárido aberrante, que puede ser transferido a la proteína, aunque con una eficiencia menor que en las cepas silvestres, ya que presentan una afinidad disminuida por el complejo oligosacáril transferasa. La acumulación del intermediario biosintético que actúa como sustrato de las enzimas que se han perdido, permite discriminar la reacción que catalizan. Estos mutantes *alg*, aunque tienen una tasa de crecimiento normal, sintetizan proteínas hipoglicosiladas (Burda & Aebi, 1999; Aebi, 2013). La proteína ScAlg3p es la primera glicosiltransferasa en actuar en el lumen del RE, transfiere un residuo de manosa desde Dol-P-Man al $\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2\text{-PP-Dol}$ mediante un enlace α -1,3 (Aebi *et al*, 1996). La enzima ScAlg9p tiene una función dual, se requiere para la adición de la séptima manosa al oligosacárido unido al Dol-PP (Burda *et al*, 1996; Cipollo & Trimble, 2000), así como para unir el noveno residuo de manosa (Frank & Aebi, 2005), ambas se unen mediante enlace α -1,2. ScAlg9p es, por lo tanto, una α -1,2 manosiltransferasa dependiente de Dol-P-manosa con una función dual. La ausencia de ScAlg9p lleva a la célula a la acumulación de $\text{Man}_6\text{GlcNAc}_2\text{-PP-Dol}$, pero puede obtenerse un anormal oligosacárido $\text{Man}_7\text{GlcNAc}_2\text{-PP-Dol}$ si se sobreexpresa *ScALG12* en la cepa mutante *Sc Δ alg9* (Burda *et al*, 1999). Los mutantes *Sc Δ alg9* y *Sc Δ alg12* presentan resistencia a calcoflúor (Lussier *et al*, 1997), característica que permitió que estas cepas fuesen aisladas. La proteína Alg12p cataliza la transferencia del tercer residuo de manosa que se transfiere dentro del retículo, esta unión es mediante un

enlace α -1,6 (Burda *et al*, 1999). La transferencia de la primera glucosa es catalizada por la enzima ScAlg6p (Reiss *et al*, 1996), y la proteína ScAlg8p transfiere el segundo resto de glucosa. Ambas glucosas se unen al oligosacárido mediante un enlace α -1,3. Finalmente, la tercera glucosa es transferida por la enzima Alg10p, y se une al oligosacárido mediante un enlace α -1,2 (Burda & Aebi, 1998).

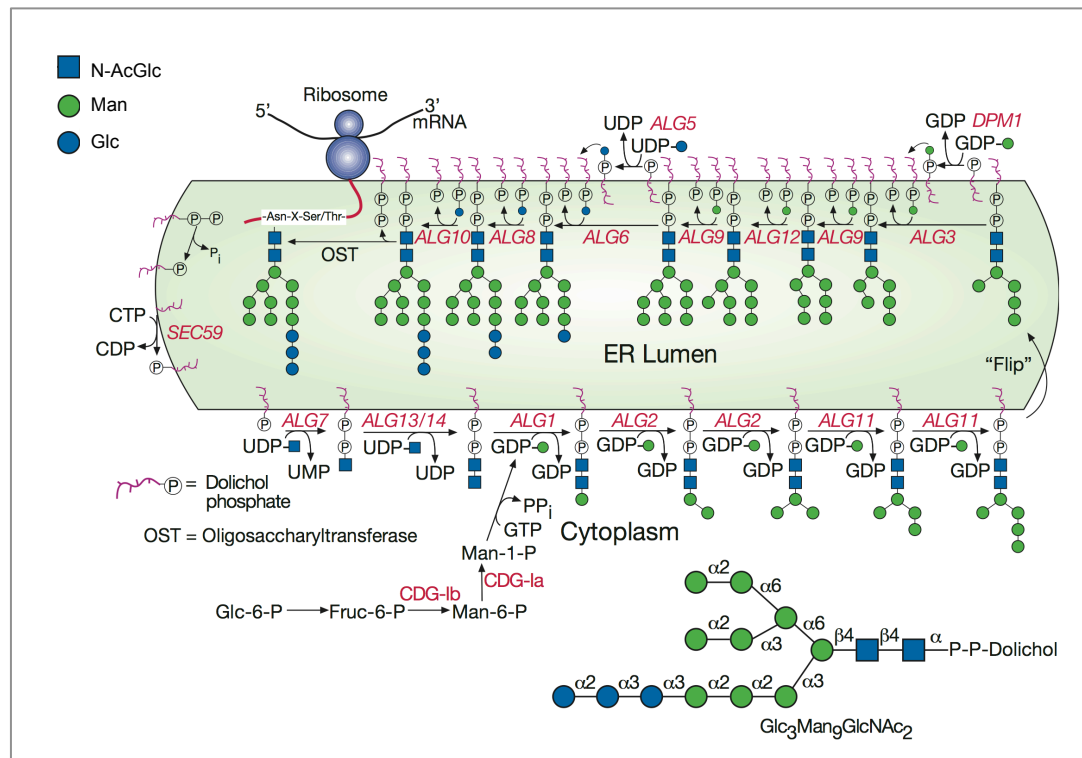


Figura 6. Síntesis del núcleo oligosacárido en el RE y transferencia a la proteína (Varki *et al*, 2009).

Una vez se ha sido sintetizado el núcleo oligosacárido, éste se transfiere como una unidad completa a un residuo de asparagina que forma parte de la secuencia Asn-X-Ser/Thr, siendo X cualquier aminoácido excepto la prolina, por el complejo oligosacaril transferasa. El oligosacárido unido ya a la proteína continúa en el lumen del retículo endoplásmico donde se eliminan tres residuos de glucosa y uno de manosa (figura 7). Este procesamiento está implicado en el control de calidad de proteínas y supone un mecanismo para asegurar el correcto plegamiento de las proteínas (Aebi *et al*, 2010; Tannous *et al*, 2014). A continuación, estas proteínas pasan al Aparato de Golgi (AG), donde sufren diversas modificaciones mediante una secuencia ordenada de reacciones. Estos procesos están poco conservados entre los eucariotas, a diferencia de lo que ocurre con los primeros

levadura-hifa. Todo ello pone de manifiesto la estrecha relación que existe entre glicosilación de proteínas y los procesos de morfogénesis y virulencia en *C. albicans*.

En *C. albicans* se han aislado algunos ortólogos a genes que intervienen en glicosilación de proteínas en la ruta de secreción, algunos de los cuales citaremos a continuación, pero no se ha caracterizado aún ninguno de los genes que participan en las síntesis del núcleo oligosacárido (genes *ALG*). Se ha comprobado que los mutantes *cwt41Δ*, *rot2Δ* y *mns1Δ*, los cuales tienen deletados los genes que codifican la α -glucosidasa I, α -glucosidasa II y α -1,2-manosidasa, respectivamente, todas ellas implicadas en el procesamiento del núcleo oligosacárido, presentan defectos en virulencia y morfogénesis, así como un descenso en la tasa de crecimiento (Mora-Montes *et al*, 2007). También se han aislado varios genes *PMT* (1, 2, 3, 4, 5 y 6), que codifican distintas isoformas de manosil transferasas implicadas en el proceso de O-glicosilación. Se ha demostrado que todas las isoformas son necesarias para la virulencia en *C. albicans* (Rouabhia *et al*, 2005). Además todos los mutantes *pmt* presentan defectos en crecimiento y morfogénesis (Prill *et al*, 2005). La proteína Mnt1p es una manosil transferasa que se requiere tanto para N-glicosilación, como para O-glicosilación. Se ha demostrado la pérdida de virulencia en los mutantes *mnt1Δ* (Buurman *et al*, 1998). El mutante *mnn5Δ*, que carece de la α 1,2-manosil transferasa del aparato de Golgi, presenta una virulencia atenuada y defectos en morfogénesis (Bai *et al*, 2006). La GDPasa codificada por *GDA1*, es importante en el transporte de GDP-man al AG y la interrupción de este gen afecta la glicosilación, altera las propiedades de la pared celular y la morfogénesis (Herrero *et al*, 2002). El mutante *och1Δ*, que carece de la enzima α 1,6-manosil transferasa del aparato de Golgi que participa en N-glicosilación, presenta defectos en virulencia y morfogénesis (Bates *et al*, 2006; Netea *et al*, 2006). El mutante *mnn9Δ*, afectado en la adición de manosas en el AG, no es capaz de formar hifas verdaderas y presenta una capacidad de virulencia atenuada (Cívicos, 2014).

3.3 *ALG5*

El gen *ALG5* fue descrito por primera vez en la levadura *S. cerevisiae* por Heesen y colaboradores, quienes demostraron que codificaba una UDP-glucosa: dolicol fosfato glucosiltransferasa que cataliza la transferencia de glucosa desde el UDP-glucosa hasta el dolicol fosfato. Observaron que el mutante *Scalg5Δ* hipoglicosila la proteína vacuolar carboxipeptidasa Y (Heesen *et al*, 1994). Mediante el análisis de la hexoglucanasa secretada por el mutante *Scalg5Δ* se ha demostrado que el mutante transfiere un oligosacárido

incompleto a la proteína, además se reduce la eficiencia de esta transferencia con respecto a la cepa silvestre (Muñoz *et al*, 1994). La enzima Alg5p transfiere glucosas al dolicol fosfato, y este es el donador de glucosas para que las enzimas Alg6p, Alg10p y Alg8p las adicionen al núcleo oligosacárido. De forma que en el mutante *Scalg5Δ* el núcleo oligosacárido no se glucosila. Los tres residuos de glucosa son posteriormente eliminados, y esta modificación es muy importante ya que interviene en el control de calidad de glicoproteínas en el RE (Aebi *et al*, 2010; Tannous *et al*, 2014).

3.4 ALG9

El gen *ALG9* fue descrito por primera vez en la levadura *S. cerevisiae*. Burda y colaboradores propusieron que codificaba una manosiltransferasa implicada en la adición del séptimo residuo de manosa al núcleo oligosacárido, ya que la delección de este gen causaba la acumulación de Man₆GlcNAc₂-PP-Dol (Burda *et al*, 1996). Experimentos en los que analizaron la glicosilación de la proteína vacuolar carboxipeptidasa Y, demostraron que en el mutante *Scalg9Δ* se transfiere un oligosacárido incompleto a la proteína, además se ve reducida la eficiencia de esta transferencia. *Scalg9Δ* no muestra defectos en el crecimiento. Más tarde demostraron que en este mutante el oligosacárido mayoritario que es transferido a la proteína es Glc₃Man₆GlcNAc₂, el cual es posteriormente procesado hasta Man₆GlcNAc₂, de manera que en el mutante sí se glucosila el núcleo oligosacárido a pesar de que no se adicionen las tres últimas manosas (Cipollo & Trimble, 2000). Posteriormente se observó que la enzima Alg9p tiene una función dual, ésta no sólo es responsable de transferir el séptimo residuo de manosa al núcleo oligosacárido, sino que también cataliza la unión del noveno residuo de manosa (Frank & Aebi, 2005). Como se ha mencionado anteriormente las últimas manosas del oligosacárido son procesadas una vez transferido el núcleo oligosacárido a la proteína y este procesamiento forma parte del control de calidad de proteínas (Aebi *et al*, 2010; Stigliano *et al*, 2011; Tannous *et al*, 2014).

3.5 Enfermedades originadas por defectos en glicosilación: CDGs

En los últimos años, varias enfermedades genéticas humanas originadas por defectos en los mecanismos de glicosilación, conocidas como *CDGs* (*Congenital Disorders of Glycosylation*), han sido relacionadas con la N-glicosilación (Hauptle & Hennet, 2009; Freeze, 2013; Ferris *et al*, 2014). Los mecanismos de N-glicosilación, sobre todo los que tienen lugar en el retículo endoplásmico, están muy conservados en los distintos eucariotas y como hemos visto anteriormente, se han estudiado al detalle en la levadura *S. cerevisiae*.

Por lo que este sistema modelo ha permitido dilucidar las bases moleculares de las patologías causadas por fallos en la N-glicosilación. Las *CDGs* están asociadas a un amplio número de síntomas (Krasnewich & Gahl, 1997). La amplia sintomatología y la variabilidad en la severidad de estas manifestaciones, dificultan el diagnóstico y hacen necesario la caracterización genética para establecer las causas de estas patologías.

Dentro de las *CDGs*, se ha descrito una patología en la que los pacientes acumulan $\text{DolPP-Man}_6\text{GlcNac}_2$ y $\text{DolPP-Man}_8\text{GlcNac}_2$, de lo que se deduce un posible defecto en los niveles de Alg9p. El gen humano ortólogo al gen *ALG9* de *S. cerevisiae* codifica una proteína de 611 aminoácidos con un 43% de identidad con la de la levadura. Se ha detectado una mutación puntual 1567G-A del gen en los pacientes con este tipo de *CDG*, que introduce el cambio aminoacídico E523K en la proteína. El cDNA del gen humano *ALG9* restaura el fenotipo de termosensibilidad en el doble mutante *ScΔalg9 wbp1-2* (mutación en el gen *ALG9* y en la oligosacariltransferasa), en cambio cuando se transforma con el gen mutado *ALG9* [E523K] se obtiene una restauración menor del crecimiento (Frank *et al*, 2004).

La alta homología entre los genes de eucariotas que regulan los primeros pasos de la N-glicosilación hace muy atractivo su estudio en eucariotas inferiores, ya que permite extrapolar los resultados a organismos superiores como el ser humano.

4. CONTROL DE CALIDAD DE GLICOPROTEÍNAS EN EL RETÍCULO ENDOPLÁSMICO

4.1 Control de calidad y glicosilación de proteínas

La eliminación de tres glucosas y alguna manosa específica en los primeros pasos de la N-glicosilación se han descrito como pasos importantes para el control de calidad de proteínas. El significado biológico de este procesamiento se ha desconocido durante mucho tiempo, manteniéndose la incógnita de por qué se sintetiza una estructura tan elaborada para ser rápidamente procesada. Estructuras específicas de los oligosacáridos que resultan de este procesamiento pueden representar un glico-código que promueve el correcto plegamiento de la proteína, mientras que estructuras distintas representarían glico-códigos que llevarían a proteínas mal plegadas a la salida desde el RE al citosol para su degradación (Roth *et al*, 2010; Tannous *et al*, 2014) (figura 8). El estado del plegamiento de una proteína es evaluado por el mecanismo de control de calidad, de forma que las

proteínas con un plegamiento correcto continúan hasta su destino final, mientras que las proteínas mal plegadas son reconocidas como productos aberrantes y son degradadas por el *Endoplasmic Reticulum Associated Degradation (ERAD)* (Ellgaard *et al*, 1999; Xie & Ng, 2010).


















Structure			Generated by		Signal for
 Native	 Misfolded	 Immature	Mammals	<i>S. cerevisiae</i>	
		 Glc_3Man_9	OST	OTase	N-glycan dependent protein folding and quality control
		 Glc_2Man_9	Glucosidase I	Gls1p	Association with malectin
		 Glc_1Man_9	Glucosidase II	Gls2p	Association with calnexin and/or calreticulin
		 $\text{Glc}_1\text{Man}_{7-9}$	UGT1	-	Re-association with calnexin and/or calreticulin
		 Man_{7-9}	Glucosidase II	Gls2p	Prevents re-association with calnexin and/or calreticulin
		Man_{8B}	ERManI	Mns1p	ER exit
		 Man_{8B}	ERManI	Mns1p	ERAD
		 Man_7	GH family 47 members	Htm1p	ERAD
		 Man_{5-6}	GH family 47 members	-	ERAD

Figura 8. Diferentes estructuras de oligosacáridos unidos a polipéptidos que actúan como glicocódigo (Aebi *et al*, 2010).

La α 1, 2 glucosa terminal (residuo “n” en la figura 9) es eliminada del núcleo oligosacárido por la glucosidasa I, inmediatamente después de su transferencia al polipéptido por el complejo oligosacariltransferasa. Esta eliminación hace que el oligosacárido no vuelva a interactuar con el complejo oligosacariltransferasa. El oligosacárido diglucosilado es el sustrato específico de la malectina, una proteína que une azúcares identificada en RE de mamíferos, la cual se induce cuando hay estrés en RE. La

unión a esta lectina afecta a la entrada de la glicoproteína de secreción en el ciclo calnexina/calreticulina (Galli *et al*, 2011). Los dos residuos de α 1, 3 glucosa (residuos “m” y “l” en la figura 8) son a continuación eliminados por la glucosidasa II, estos dos procesamientos tienen papeles opuestos (Tannous *et al*, 2014). La eliminación del primer residuo α 1, 3 glucosa (residuo “m” en la figura 8) por la glucosidasa II dando lugar a un oligosacárido mono-glucosilado permite a la glicoproteína entrar en el ciclo calnexina/calreticulina (CN/CRT). En cambio, la eliminación el segundo residuo de α 1, 3 glucosa (residuo “l” en la figura 9) por la glucosidasa II libera a la proteína del ciclo calnexina/calreticulina. Posteriormente, el destino de las glicoproteínas depende fuertemente de su conformación, las proteínas con la conformación nativa pueden salir del RE, en cambio aquellas cuya conformación no sea la nativa volverán a entrar al ciclo calnexina/calreticulina. Esta reincorporación al ciclo se debe a la UDP-glucosa:glicoprotein glucosiltransferasa (UGT), la cual se une a las proteínas con conformación no nativa. Probablemente interaccionando con regiones hidrofóbicas de la proteína que han quedado expuestas, y reglucosila la glicoproteína pudiendo entrar ésta nuevamente en el ciclo.

Tanto el estado de plegamiento de las proteínas como la eliminación de algunos residuos de manosa por manosidasas del RE parecen ser factores importantes que desencadenan la degradación de proteínas mal plegadas asociada a RE (*ER-associated degradation, ERAD*). El sustrato para la manosidasa I del RE es el oligosacárido Man9GlcNAc2 generado por las glucosidasas I y II. La manosidasa I puede eliminar uno a uno los restos de α 1, 2 manosa (residuos “k” e “i” en la figura 9). La desmanosilación progresiva del oligosacárido convierte al polipéptido en un ligando más débil para a calnexina/calreticulina (Spiro *et al*, 1996), un mejor sustrato para la enzima glucosidasa II (Totani *et al*, 2006), y un subóptimo sustrato para la enzima UDP-glucosa:glicoprotein glucosiltransferasa (UGT) (Sousa *et al*, 1992). En definitiva, facilita que se interrumpa el proceso de plegamiento de la proteína y dirige a los polipéptidos mal plegados hacia la ruta de degradación de proteínas (*ERAD*) (Molinari *et al*, 2003; Aebi *et al*, 2010). Se cree que la manera lenta de actuar de la manosidasa I funciona como un temporizador, de manera que cuando una proteína permanece durante un tiempo prolongado en el RE sin adquirir su conformación correcta tiene más posibilidades de que sus manosas sean eliminadas y por tanto, de ser reconducida hacia la *ERAD*. Se ha descrito que la α 1, 6 manosa terminal (residuo “i” en la figura 8), que queda al eliminarse una α 1, 2 manosa (residuo “k” en la figura 9) por la manosidasa Htm1p, actúa como una señal de degradación. La proteína

Yos6p se une específicamente a la α 1, 6 manosa terminal, lo que dispara la degradación proteosómica dependiente de ubiquitina (Clerc *et al*, 2009). En general se puede decir que el procesamiento de las manosas en el RE actúa controlando el destino de las proteínas, su salida al Aparato de Golgi o bien su degradación (Aebi *et al*, 2010; Stigliano *et al*, 2011).

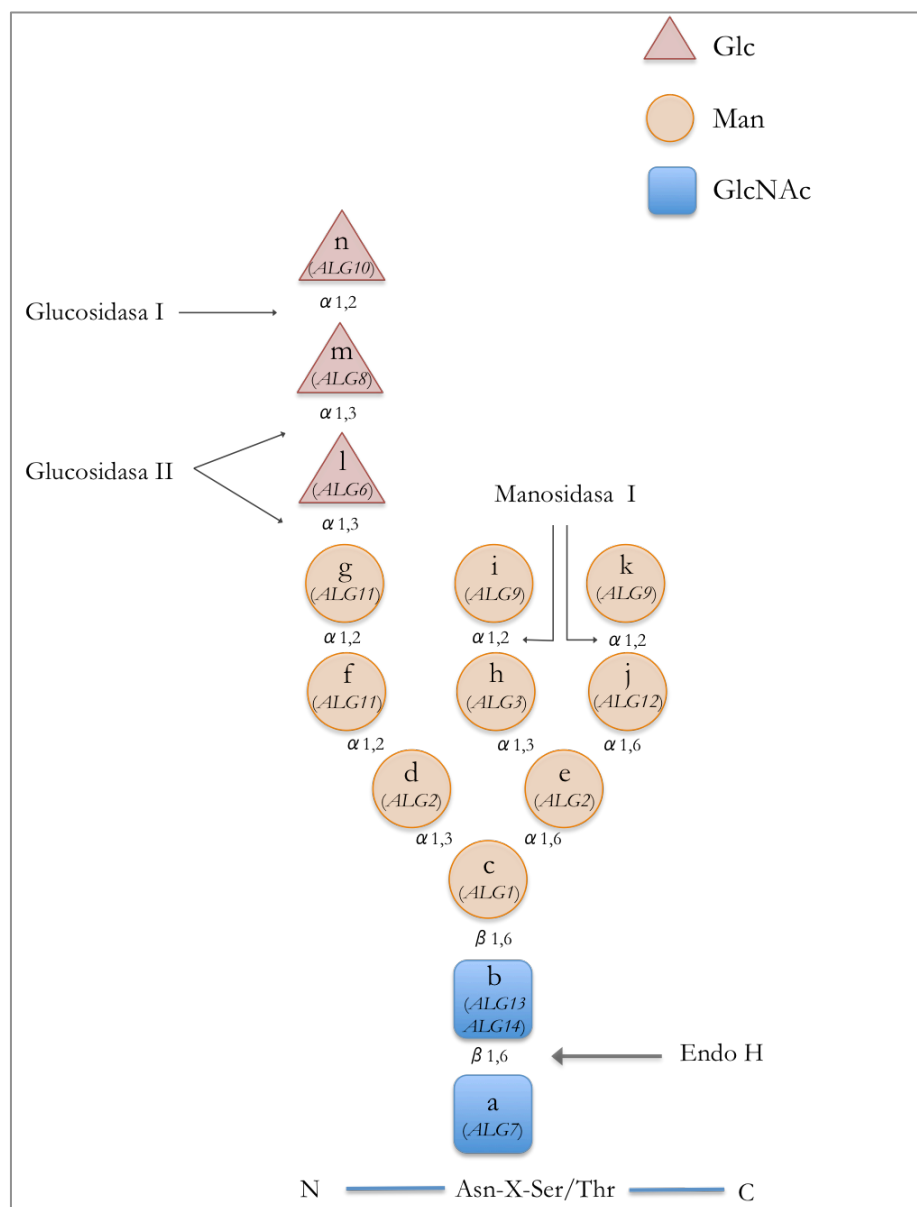


Figura 9. Esquema que representa el núcleo oligosacárido. Los cuadrados azules representan los residuos de N-acetilglucosamina, los círculos naranja los residuos de manosa y los triángulos en rojo las glucosas. Dentro de cada uno de ellos, entre paréntesis, se indica el gen que codifica la enzima implicada en la adición de cada residuo.

Tanto la formación del núcleo oligosacárido como su procesamiento en el RE son reacciones muy conservadas desde levaduras a eucariotas superiores, aunque en las reacciones de procesamiento en el RE existen algunas diferencias. Así, no se ha identificado la mannosidasa I de RE en la levadura *S.pombe*, y en la levadura *S. cerevisiae* está ausente la UDP-glucosa:glucoproteínglicosiltransferasa (UGT) que reglucosila el núcleo oligosacárido en el RE (Roth *et al*, 2010).

4.2 Respuesta celular a defectos en el plegamiento de proteínas: ERAD (*ER-associated degradation*) y UPR (*Unfolded Protein Response*)

Como acabamos de comentar, el plegamiento de las proteínas en el RE representa un paso crítico en la ruta de secreción, ya que existe un control de calidad por el que únicamente continuarán dicha ruta aquellas proteínas que estén plegadas y modificadas de forma correcta (Ellgaard *et al*, 1999). En condiciones normales, las proteínas que no logran plegarse de forma correcta en el RE son eliminadas por un mecanismo celular que se conoce como *ER-associated degradation (ERAD)* (Xie & Ng, 2010). Este mecanismo requiere que las proteínas mal plegadas o las subunidades no ensambladas sean translocadas a través de la membrana del RE hasta el citoplasma, para ser a continuación marcadas por enzimas que conjugan ubiquitina y degradadas por el 26s proteasoma (Brodsky & McCracken, 1999; Plemper & Wolf, 1999). La *ERAD* requiere de una serie de proteínas localizadas en el RE, entre las que se encuentran Der1p, Der3p/Hrd1p y Hrd3p (Hampton *et al*, 1996) (figura 10).

En condiciones de estrés en RE, cuando se incrementa la presencia de proteínas mal plegadas en el lumen de este orgánulo, se induce lo que se conoce como la *Unfolded Protein Response (UPR)* (Bernaies *et al*, 2006). En *S. cerevisiae* esta respuesta está mediada por la endonucleasa Ire1p, un sensor kinasa transmembrana del RE. Un incremento en la cantidad de proteínas mal plegadas hace que haya menos Kar2p disponible para unirse a Ire1p, lo que conduce a la dimerización de esta proteína, y esto hace que se active su actividad kinasa en el lado citoplasmático. Una vez autoactivada por fosforilación, Ire1p induce el procesamiento (*splicing*) no canónico de un intrón del mRNA de *HAC1*, el transcrito del gen que codifica para el factor de transcripción bZIP Hac1p. La eliminación del intrón y la ligación por la tRNA ligasa Rlg1p de los dos exones liberados, hace que se traduzca la proteína Hac1p. Hac1p es un factor de transcripción que contiene un dominio bZIP (*basic leucine zipper domain*), e induce la expresión de genes diana de la UPR. Además se ha descrito que en levaduras Gcn4p y su inductor Gcn2p son requeridos para la inducción

de la expresión de la mayor parte de los genes diana de la *UPR* (Patil *et al*, 2004). En los promotores de estos genes se han descrito diferentes motivos de unión a DNA conocidos como *unfolded protein response elements* (*UPREs*): *UPRE-1* (5'-CAGNGTG-3'), *UPRE-2* (5'-TACGTG-3') y *UPRE-3* (5'-AGGACAAC-3'). Hac1p forma un heterodímero con Gcn4p y puede unirse tanto al motivo *UPRE-1* como *UPRE-2*. Gcn4p por si solo puede unirse a la secuencia *UPRE-2*. Se cree que el papel del Gcn4p en la activación de la *UPR* es modular el volumen de esta respuesta así como permitir la comunicación con otras vías de respuesta a estrés en la célula. Cuando Gcn4p está presente en la célula a niveles basales es incapaz de unirse a secuencias *UPREs* en ausencia de Hac1p, pero sí cuando los niveles de Gcn4p son elevados. Además se ha observado que la expresión de diferentes genes diana de la *UPR* muestran distinta dependencia de Gcn4p (Patil *et al*, 2004).

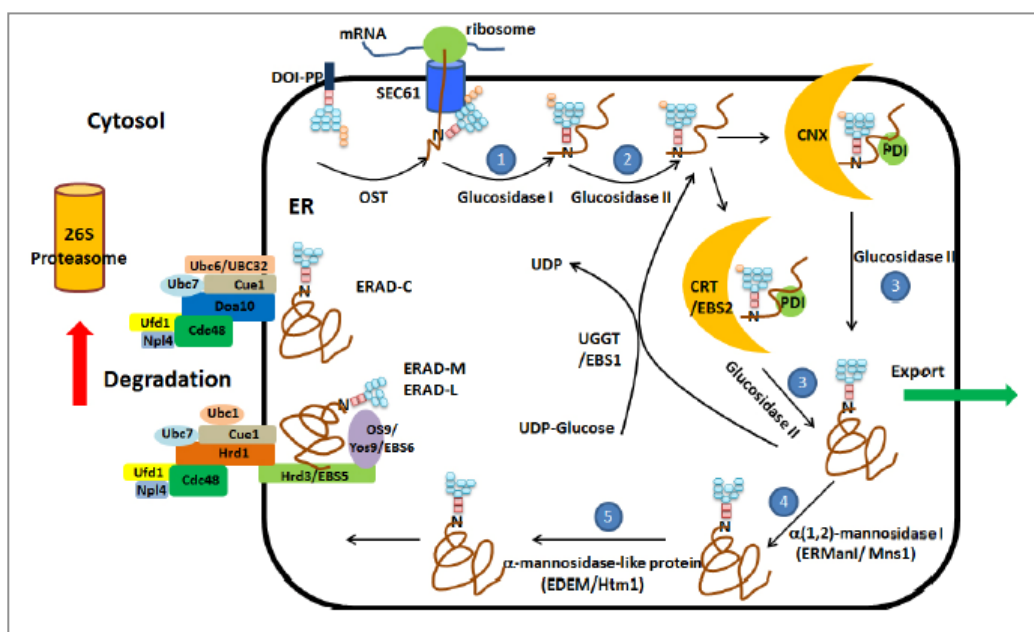


Figura 10. Control de calidad en el ciclo de plegamiento de proteínas en el RE y degradación de proteínas mal plegadas por el sistema *ERAD* (Deng *et al*, 2013).

Los genes diana de la *UPR* codifican para diversas chaperonas del RE, proteínas necesarias para el plegamiento proteico (como BiP y PDI) y enzimas implicadas en biosíntesis de lípidos. Otros genes diana son los implicados en la degradación asociada a RE de proteínas mal plegadas (*ER-associated degradation, ERAD*) (Travers *et al*, 2000; Wu *et al*, 2014). De esta forma la *UPR* y la *ERAD* están fuertemente interconectadas. De hecho, en levaduras, la pérdida de forma conjunta de la funcionalidad de la *UPR* y de la *ERAD* es

letal (Friedlander *et al*, 2000). En condiciones normales, las células son capaces de sobrellevar el estrés originado por las proteínas mal plegadas presentes en el RE mediante su degradación por el sistema *ERAD*, y no requieren la inducción de la *UPR*. Sin embargo, cuando el acúmulo de proteínas mal plegadas alcanza ciertos niveles, la *UPR* se convierte en esencial (Friedlander *et al*, 2000; Travers *et al*, 2000).

Se han llevado a cabo estudios transcripcionales mediante *microarrays* con el fin de conocer los genes cuya expresión se regula como resultado de la activación de la *UPR* en *S. cerevisiae* (Travers *et al*, 2000) y en *C. albicans* (Wimalasena *et al*, 2008). Travers y colaboradores demostraron la sobreexpresión de 381 genes inducida por un estrés en RE y dependiente de Ire1p y Hac1p. De los 208 genes con función conocida, 103 genes desempeñan un papel en la ruta de secreción. Además observaron que el perfil de expresión canónico muestra que la *UPR* es una respuesta rápida, la inducción de los genes diana se completa prácticamente a los 15 minutos de producirse el estrés (Travers *et al*, 2000). En *C. albicans* el estrés en RE induce la expresión, dependiente de *HAC1*, de 252 genes. De entre ellos, 79 genes están relacionados con la ruta de secreción (Wimalasena *et al*, 2008). 12 de estos genes también se activan en estas condiciones en *S. cerevisiae*: *SEC61*, *SEC12*, *SEC24*, *PMT1*, *PMT2*, *MCD4*, *GAA1*, *ERD2*, *IPF2532*, *SPF1*, *TRK1.3f* y *FCY21.5f*.

Estudios recientes en otros hongos patógenos, *Aspergillus fumigatus* y *Cryptococcus neoformans*, han puesto de manifiesto que los ortólogos a Ire1 y Hac1 son componentes clave de la *UPR* y se requieren durante la respuesta a estrés en RE. Además se ha comprobado que están implicados en la patogenicidad y en la resistencia fúngicas (Feng *et al*, 2011; Richie *et al*, 2011; Cheon *et al*, 2014). También se ha descrito que en *C. albicans* Hac1p e Ire1 juegan un papel importante en el desarrollo de la hifa y en la resistencia a caspofungina, respectivamente (Wimalasena *et al*, 2008; Blankenship *et al*, 2010). En *C. glabrata*, una especie patógena fúngica emergente, evolutivamente más cercana a *S. cerevisiae* que *C. albicans*, se ha descubierto que aunque Ire1 juega un papel importante en la respuesta a estrés en RE, el mecanismo de actuación es independiente de Hac1. Es decir, en esta especie, la *UPR* ha desarrollado mecanismos alternativos para el control de calidad en RE (Miyazaki *et al*, 2013).

4.3 UPR en mamíferos

En células de mamíferos, las respuestas a estrés en RE están mediadas por tres brazos paralelos de la UPR, iniciadas por los sensores de estrés en RE Ire1 (*Inositol-Requiring protein-1*), Atf6 (*Activating Transcription Factor-6*) y Perk (*Protein Kinase RNA-like ER Kinase*) (Bernal *et al*, 2006). De forma análoga a lo que ocurre en levaduras, la acumulación de proteínas mal plegadas en el RE activa Ire1p, que transmite la información a través de la membrana del RE y se induce el splicing del RNAm de *XBP1* que codifica un factor de transcripción bZIP y es ortólogo de *HAC1* (Calton *et al*, 2002). *ATF6* codifica un factor de transcripción bZIP que se sintetiza como una proteína transmembrana de RE, y cuando se activa la UPR se induce su corte proteolítico liberando un fragmento soluble que se desplaza al núcleo donde activa la expresión de genes junto a *Xbp1* (Wang *et al*, 2000). La kinasa transmembrana de RE Perk, homóloga a Gcn2p de levaduras, se activa en respuesta al acúmulo de proteínas mal plegadas y fosforila al factor de iniciación de la traducción eIF-2 α disminuyendo la síntesis global de proteínas (Harding *et al*, 2000a, 2000b). Perk permite la traducción preferencialmente de transcritos relacionados con la respuesta a estrés, incluyendo el transcrito de *ATF4*, un activador transcripcional que contribuye a la UPR en colaboración con *Xbp1* y es homóloga a Gcn4p de levaduras (Harding *et al*, 2000a).

La duración de cada una de las respuestas varía entre las distintas rutas. La respuesta iniciada por Ire1 es rápidamente atenuada a pesar de que persista el estrés; la atenuación de la respuesta que desencadena Atf6 está más retrasada; finalmente, la respuesta mediada por Perk persiste hasta que finaliza el estrés (Lin *et al*, 2007). De manera que en mamíferos se desencadenan respuestas a corto y largo plazo bajo la acumulación de proteínas mal plegadas en el RE. Como se ha comentado anteriormente, en levaduras la activación de la UPR mediada por Ire1-Hac1 es ampliamente conocida (Sidrauski & Walter, 1997; Kawahara *et al*, 1997), pero hasta la fecha no se han encontrado ortólogos en levaduras de ATF6, y no se ha hallado una relación directa entre *GCN2*, el posible ortólogo funcional de *PERK*, y el control de la UPR.

5. RUTAS MAPK Y ADAPTACIÓN A ESTRÉS EN RE

En *S. cerevisiae* la actividad del sistema Ire1p-Hac1p no explica la totalidad del programa de regulación de la expresión génica que tiene lugar como respuesta a una acumulación de proteínas mal plegadas (Travers *et al*, 2000). Desde hace varios años se está constatando

que en la respuesta de las células a estrés en RE, no sólo están implicados los sistemas de control de calidad en RE descritos anteriormente, sino también otras rutas generales encargadas de transmitir diferentes estímulos de estrés ocasionados en otras partes de la célula, como por ejemplo, en la pared celular. Así en *S. cerevisiae*, para la respuesta a estrés en RE se requieren, además de la UPR, la calcineurina y las proteínas Slt2 y Hog1 de las rutas de MAPK de integridad celular CWI y osmorregulación, respectivamente (Bonilla *et al*, 2002; Chen *et al*, 2005; Torres-Quiroz *et al*, 2010).

Las rutas de transducción de señales son las encargadas de la integración de las distintas entradas de información, y de iniciar una rápida y apropiada respuesta activando los efectores necesarios para ello. El módulo central de las rutas de transducción de señales de estímulos de estrés está muy conservado en hongos, sin embargo, los mecanismos sensores y los reguladores transcripcionales finales han divergido ampliamente (Nikolaou *et al*, 2009; Soll, 2011; Smith *et al*, 2010). La ruta de transducción SAPK activada por estrés (*Stress Activated Protein Kinase*) es la más conservada en eucariotas (figura 11), desde levaduras hasta mamíferos, y es responsable de la respuesta a varios tipos de estrés. El cómo se obtiene una respuesta específica cuando una misma ruta MAPK es activada por distintos estímulos es todavía una cuestión sin resolver. Las células han desarrollado mecanismos para lograr especificidad y evitar alteraciones en las rutas de señalización cuando se sufre algún tipo de perturbación, es lo que se conoce como robustez, por ejemplo, mediante el uso de plataformas (*scaffolds*), la activación simultánea de rutas específicas y/o la separación temporal y espacial de la activación de éstas (Krantz *et al*, 2009; Li *et al*, 2010a).

5.1 Ruta SAPK activada por estrés

La ruta de transducción de señales HOG (*High Osmolarity Glycerol*) en *S. cerevisiae* está implicada en la activación de diferentes funciones fisiológicas y mecanismos de protección en respuesta a alta osmolaridad. Además, existen evidencias de su implicación en la adaptación al estrés por calor (Winkler *et al*, 2002), bajas temperaturas (Panadero *et al*, 2006), estrés por ácidos débiles, alteración de la pared celular (García-Rodríguez *et al*, 2000), y exposición a agentes que disparan el estrés en RE (Torres-Quiroz *et al*, 2010; Bicknell *et al*, 2010; García-Marqués *et al*, 2015).

El módulo de las rutas SAPK comprende 3 proteínas kinasas (MAPKKK, MAPKK y MAPK) que se activan secuencialmente por fosforilación. La activación de la tercera, el factor de transcripción Hog1 (SAPK) incrementa su actividad kinasa y su translocación al

núcleo, lo cual permite la fosforilación de muchos sustratos, incluyendo factores de transcripción, kinasas, reguladores del ciclo celular y proteínas de membrana, disparando así una respuesta celular apropiada. Las levaduras *S. cerevisiae* y *C. albicans* contienen una única SAPK y MAPKK, Hog1 y Pbs2. Sin embargo, el número de MAPKKK varía en hongos. Así, en *S. cerevisiae*, son tres (Ssk2, Ssk22 y Ste11), mientras que en *C. albicans* es una (Ssk2) (Arana *et al*, 2005; Cheetham *et al*, 2007) (figura 11).

En *S. cerevisiae* dos rutas funcionalmente redundantes convergen en el módulo MAP Kinasas de la ruta HOG (Hohmann, 2002; Hohmann *et al*, 2007; Smith *et al*, 2010). Una de ellas está formada por un sistema sensor de dos componentes que incluye el sensor histidina kinasa osmosensible Sln1, cuya actividad es regulada según la turgencia de la membrana (Horie *et al*, 2008; Kaserer *et al*, 2009). Estos sistemas de dos componentes están conservados en bacterias, protistas como *Dictyostelium discoideum*, hongos y plantas. Una segunda rama tiene como sensor proteínas transmembrana, con dominios SH3 (como Sho1) y altamente glicosiladas, tipo mucina (como Msb2 y Hkr1), muy relacionadas con los mucinas de mamíferos (Ernst & Pla, 2011). En *S. cerevisiae*, la pérdida de turgencia inducida por alta osmolaridad inactiva Sln1, por lo que se impide la fosforilación de Ypd1 y como consecuencia tiene lugar una rápida defosforilación de Ssk1, el regulador de respuesta (Kaserer *et al*, 2009). Se ha propuesto que la forma defosforilada de Ssk1 se une a las MAPKKKs Ssk2/22 las cuales se autofosforilan transmitiendo así la señal de estrés (Posas & Saito, 1998).

En la segunda ruta (figura 11), la MAPKKK Ste11 fosforila a Pbs2 cuando es estimulada por señales de estrés osmótico desde la rama de Sho1 (Tatebayashi *et al*, 2006). Muchas proteínas están implicadas en la transmisión de la señal por esta rama desde Sho1 (Figura 11). Se ha descubierto que las proteínas transmembranales Msb2 y Hkr1 también están implicadas en la transmisión de señales de estrés. Mientras que Msb2 participa en el crecimiento filamentoso, Hkr1 juega un papel específico en la ruta HOG (Pitoniak *et al*, 1994). No está muy claro cómo el estrés oxidativo es transmitido hacia Hog1, pero Hog1, Pbs2, Sho1 y proteínas del sistema de dos componentes contribuyen a ello (Bilsland *et al*, 2004; Martin *et al*, 2015).

En *S. cerevisiae* existe un segundo regulador de respuesta, Skn7, además de Ssk1. Skn7 es un factor de transcripción que regula la expresión de genes de pared celular y genes implicados en la respuesta a estrés oxidativo (Li *et al*, 2010a; Fassler & West, 2011).

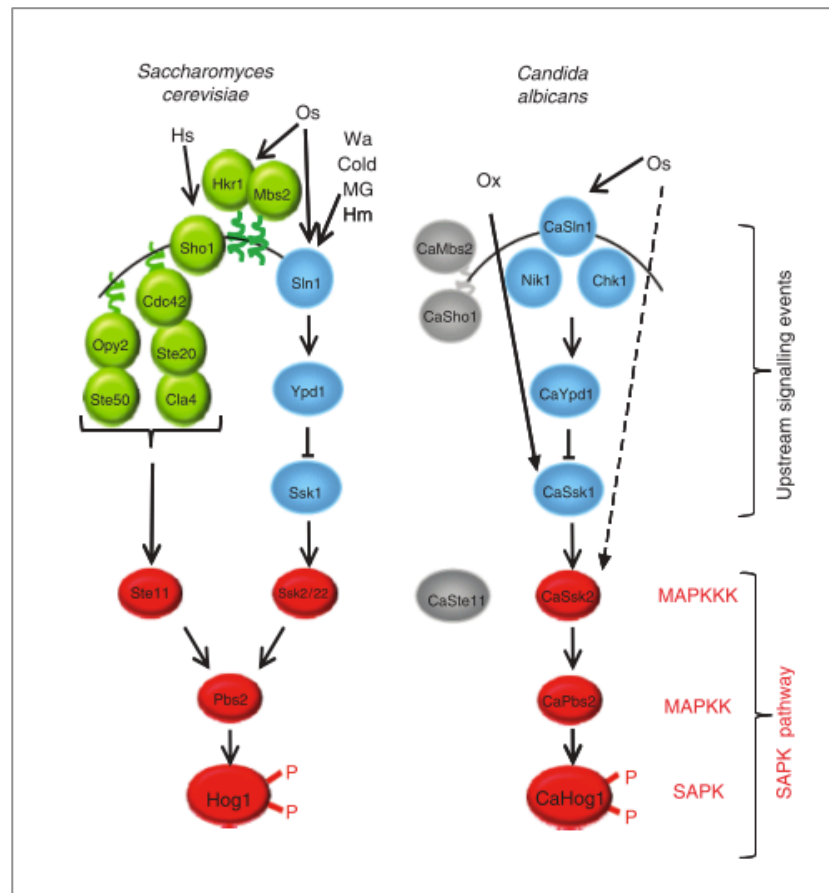


Figura 11. La ruta de transducción SAPK activada por estrés (*Stress Activated Protein Kinase*) en *S. cerevisiae* y *C. albicans* (Smith *et al*, 2010). As, estrés por arsenito; Hs, estrés por calor; Os, estrés osmótico; Ox, estrés oxidativo; Wa, ácidos débiles; MG, metilglioxil; Hm, metales pesados y Ns, estrés nutricional.

En *C. albicans* Hog1 también responde a diversas condiciones de estrés. Es activado en respuesta a estrés osmótico y oxidativo (Alonso-Monge *et al*, 2003), metales pesados y varias drogas (Smith *et al*, 2004). En *C. albicans* se han identificado ortólogos de los componentes de esta ruta HOG. Así, Sln1, Chk1 (Calera & Calderone, 1999; Calera *et al*, 1999; Torosantucci *et al*, 2002) y Nik1 son sensores de la rama de dos componentes (Foureau *et al*, 2014). Ypd1 (Calera *et al*, 2000), un intermediario sobre el que recae la fosforilación y Ssk1 y Skn7 (Calera *et al*, 2000; Singh *et al*, 2004), como reguladores de respuesta. En *C. albicans* ninguna de las histidin kinasas, ni Ssk1 son esenciales para la activación de Hog1 por estrés osmótico (Kruppa & Calderone, 2006). Tampoco parece esencial la rama de Sho1 para la transmisión del estrés osmótico (Román *et al*, 2005). No

está claro cómo se transmite en *C. albicans* la señal de estrés osmótico hasta Hog1, pero se sabe que además de esta ruta interviene la ruta de Cek1 (Herrero-de-Dios *et al*, 2014) la cual transmite también estrés en pared. En *C. albicans* se ha descrito que Hog1 interviene además de en la adaptación a diferentes tipos de estrés, en virulencia y en morfogénesis (Alonso-Monge *et al*, 1999; Cheetham *et al*, 2011; Brown *et al*, 2014).

Se están realizando avances significativos para entender cómo *C. albicans* se adapta a las distintas situaciones de estrés, atributo fundamental en este hongo patógeno oportunista ya que le permite colonizar ambientes muy diversos del hospedador y que por lo tanto, contribuye de forma importante a su capacidad virulenta. En la figura 12 se muestran rutas de transmisión de distintos tipos de estrés y los reguladores de estrés conservados en *C. albicans* (Brown *et al*, 2014).

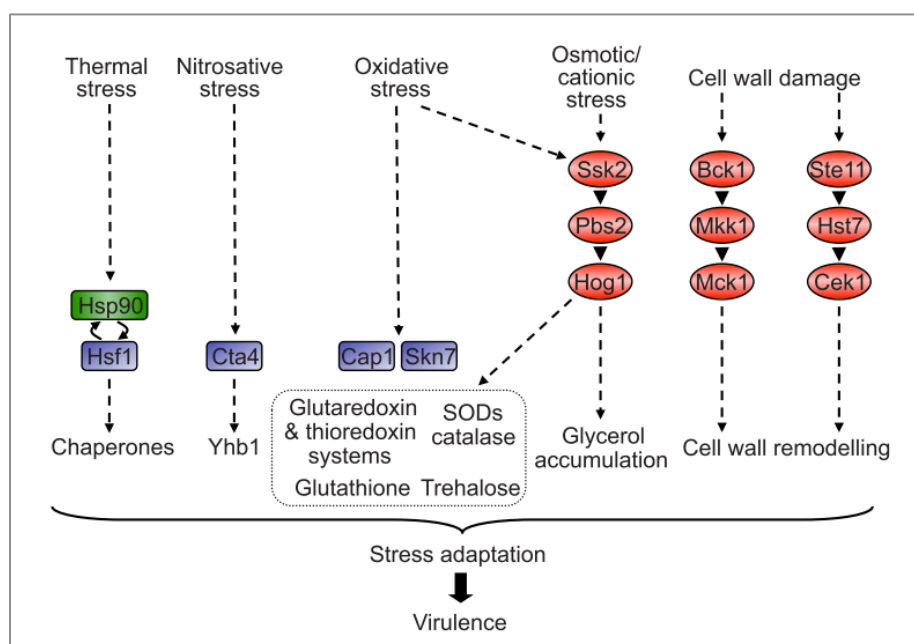


Figura 12. Reguladores de estrés en *C. albicans* (Brown *et al*, 2014). Aunque en la figura no se especifica, existe interconexión entre las distintas rutas de señalización.

5.2 Ruta HOG y estrés en RE

En *S. cerevisiae* se ha demostrado que se requiere la ruta HOG funcional para poder sobrellevar el estrés en RE causado por tunicamicina (inhibidor de la N-glicosilación) o β -mercaptoetanol (inhibidor de la formación de puentes disulfuro). Células en las que se ha deletado *PBS2* u *HOG1* son incapaces de crecer en presencia de tunicamicina, además

cuando se hiperactiva Hog1p mediante la disrupción de los genes *PTP2* y *PTP3* se incrementa la resistencia a esta droga (Torres-Quiroz *et al*, 2010). Por otro lado, se ha demostrado que la delección de *HOG1* no afecta a la activación de la UPR (basándose en la activación de genes diana de la UPR y el procesamiento de *HAC1*), y la doble delección *IRE1/HOG1* no tiene efectos epistáticos sobre el estrés en RE. Ambas rutas parecen tener diferentes dianas y mecanismos para responder al estrés en RE (Torres-Quiroz *et al*, 2010). Se ha propuesto que la ruta HOG interviene en la respuesta a largo plazo al estrés en RE, ya que la cinética de la activación de Hog1 está retrasada en el tiempo en relación a la activación de la UPR (Bicknell *et al*, 2010). En los mutantes *hog1Δ* el procesamiento de *HAC1* se mantiene durante más tiempo que en la cepa silvestre, por lo que Hog1 estaría implicada en la recuperación de la homeostasis en el RE. El mecanismo de activación de Hog1 como respuesta a estrés en RE es diferente a cuando se activa por estrés osmótico o mediante la activación de la ruta de integridad celular. Se ha descrito que el estrés prolongado en RE induce la fosforilación de Hog1 mediada por Ssk1 (no Sho1), y de forma paralela también puede activarse a través de Ire1 y Hac1 (figura 13). Una vez activado, Hog1 se dirige al núcleo donde regula la expresión de genes que se requieren para la adaptación a estrés en RE, como *HSP12*, *YMR103C* y *YPL088W*. Se ha observado que la actividad nuclear de Hog1p no es indispensable para la adaptación a estrés en RE (García-Marqués *et al*, 2015). A continuación Hog1 vuelve al citoplasma en su estado fosforilado y contribuye a la activación de la autofagia incrementando la estabilidad de Atg8 (Bicknell *et al*, 2010). En el caso de la activación por estrés osmótico, Hog1 se desfosforila al salir del núcleo (Warmka *et al*, 2001). Cuando es activado por la ruta de integridad celular, Hog1 no es importado al núcleo (Bermejo *et al*, 2008).

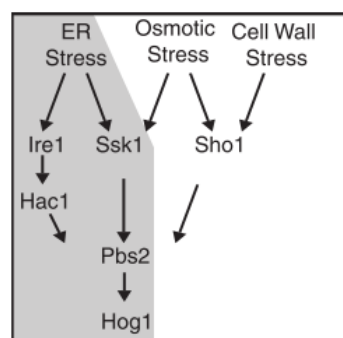


Figura 13. Esquema de la activación de la ruta HOG por estrés en RE, osmótico y en pared celular. Se marca en gris la activación por estrés en RE (Bicknell *et al*, 2010).

Los mutantes de *S. cerevisiae* con el alelo *PMA1-D378T*, expresan una H⁺-ATPasa defectuosa que se acumula en el RE debido a que no se pliega correctamente (Eraso *et al*, 2010). Estos mutantes no presentan activa la UPR (basándose en la activación de los elementos reguladores UPRE1, UPRE2 y UPRE3), pero sí muestran activación de la ruta HOG a través de la rama Sln1 (Eraso *et al*, 2011).

En *C. albicans* se ha demostrado que Hog1 se activa no sólo por estrés osmótico, sino también cuando las células son tratadas con tunicamicina, mioricina (inhibidor de la síntesis de esfingolípidos), o crecen en galactosa. Se ha descrito que la activación de Hog1 en respuesta a galactosa es dependiente de Ire1 (Adhikari & Cullen, 2014).

6. CAMBIOS EN EL NÚMERO DE CROMOSOMAS: ANEUPLOIDÍA

Se define aneuploidía como los cambios en el número de cromosomas que originan un número que no es múltiplo exacto del número haploide. Implica la pérdida o ganancia de cromosomas enteros o fragmentos de cromosomas. En levaduras, las células con aneuploidías se caracterizan por un crecimiento lento, una sensibilidad alterada a distintos tipos de estrés y un incremento de la inestabilidad genómica (Niwa *et al*, 2006; Torres *et al*, 2007; Sheltzer *et al*, 2011), a la vez que conduce a una mayor variabilidad genética a nivel poblacional y por tanto una mayor capacidad de adaptación celular a cambios en las condiciones ambientales (Pavelka *et al*, 2010b). De forma que puede suponer una ventaja adaptativa bajo una determinada presión selectiva (Selmecki *et al*, 2006).

6.1 Aneuploidía en microorganismos patógenos eucariotas como mecanismo de adaptación

Muchos patógenos eucariotas han desarrollado un genoma altamente plástico, pueden sufrir cambios cromosómicos a gran escala, como la aneuploidía y la pérdida de heterocigosidad, lo que les permite soportar distintos tipos de estrés. A diferencia de la pérdida de heterocigosidad, la aneuploidía es un estado reversible. Estos cambios suponen un rápido, aunque impreciso, mecanismo de adaptación que asegura el crecimiento y la supervivencia ante situaciones adversas producidas por cambios en el hospedador, hasta que se adquieran soluciones más refinadas (Forche, 2014).

Se sabe que el estrés celular causado por la exposición al ambiente del hospedador, el choque térmico, la transformación o el tratamiento con antifúngicos puede inducir la aneuploidía (Forche *et al*, 2009a; Selmecki *et al*, 2006; Rustchenko, 2007; Bouchonville *et al*,

2009; Janbon *et al*, 1998). La aneuploidía puede producirse mediante distintos mecanismos que incluyen fallos en la segregación de las cromátidas hermanas durante la meiosis o mitosis, y defectos en la reparación de roturas de la doble cadena de DNA (Zhu *et al*, 2012). Además, las células aneuploides pueden aparecer a partir de células tetraploides inestables que hacen de intermediario en un proceso no meiótico llamado “pérdida de cromosomas coordinada” (*concerted chromosome loss*) (Bennett & Johnson, 2003; Forche *et al*, 2008). Las células de *C. albicans* son bastante tolerantes a la aneuploidía, y pueden ser estables en su estado haploide (Hickman *et al*, 2013).

C. albicans está expuesta a una presión selectiva constante dentro del hospedador, se cree que la aneuploidía es uno de los mecanismos que permite a este patógeno adaptarse con éxito a las condiciones adversas. Un ejemplo muy ilustrativo que se utiliza a menudo para explicar cómo la aneuploidía puede suponer un mecanismo de adaptación a determinadas situaciones de estrés, es cómo se generan cepas de *C. albicans* resistentes a azoles mediante la ganancia de una copia del cromosoma 5. Selmecki *et al*. (Selmecki *et al*, 2006, 2008) demostraron que células aneuploides de *C. albicans* que contenían un isocromosoma compuesto por dos brazos izquierdos del cromosoma 5 eran resistentes a fluconazol. La resistencia a azoles es conferida a través de la activación de dos genes, *ERG11*, el gen que codifica una enzima de la ruta de biosíntesis de ergosterol que es la diana de los azoles, y *TAC1*, un regulador transcripcional de bombas transportadoras de salida de drogas, ambos localizados en el brazo izquierdo del cromosoma 5. En *C. glabrata* también demostraron que la resistencia a fluconazol se debía a un incremento en el número de copias del gen *ERG11*, debido a la duplicación del cromosoma E, que contiene este gen, y la pérdida gradual de este cromosoma cuando se llevaban a cabo sucesivos subcultivos en ausencia de fluconazol, así como la adquisición de nuevo de la sensibilidad a este compuesto (Marichal *et al*, 1997). En *C. neoformans* también se ha observado que la resistencia a fluconazol está relacionada con la disomía del cromosoma 1, que contiene el gen *ERG11* así como *AFR1*, el gen que codifica para el principal transportador de azoles (Sionov *et al*, 2010, 2013). También la disrupción del factor inductor de la apoptosis *AIF1*, incrementa la aparición de subpoblaciones con la disomía del cromosoma 1, que conlleva una mayor resistencia a fluconazol (Semighini *et al*, 2011).

Otro ejemplo en *C. albicans* que explica cómo la aneuploidía puede conferir una ventaja en ambientes adversos, es la adaptación a la utilización de L-sorbose como fuente de carbono mediada por la pérdida reversible de una de las copias del cromosoma 5. La

pérdida de dosis génica de reguladores negativos de *SOU1*, ubicados en el cromosoma 5, desencadena la sobreexpresión del gen *SOU1*, ubicado en el cromosoma 4 y que es requerido para la asimilación de L-sorbosa. (Janbon *et al*, 1998; Kabir *et al*, 2005). Estudios recientes han demostrado que el crecimiento en sorbosa induce la formación de cepas trisómicas en un híbrido de los cromosomas 4 y 7, lo que supone un incremento de dosis génica del gen *SOU1* (Kravets *et al*, 2014). Fallos en las funciones de los sistemas de vigilancia (*checkpoints*) y de recombinación incrementan de forma significativa la aparición de aneuploidías (Klein, 2001; Yoshida *et al*, 2003). En *C. albicans* se ha demostrado que *RAD52* previene la pérdida y fragmentación de cromosomas, de forma que los mutantes *rad52Δ* presentan un incremento en la inestabilidad genética que conlleva que la aparición de cepas capaces de utilizar sorbosa se produzca de forma más rápida en relación al tipo silvestre (Andaluz *et al*, 2007, 2011).

Un caso extremo de aneuploidía es lo que se conoce como células gigantes o titanes en *Cryptococcus neoformans*. Éstas se forman en respuesta al hospedador, y alcanzan un diámetro de hasta 20 veces mayor al de las células originales. El enorme tamaño de las células está correlacionado con un incremento de su ploidía, que puede ir desde un estado tetraploide hasta tener más de 64 copias del genoma. La progenie de las células gigantes tienen un tamaño normal, de forma que son capaces de diseminarse por otras partes del hospedador. Se piensa que son formas de latencia que le permiten al patógeno resistir las condiciones adversas dentro del hospedador hasta que estas sean favorables para la infección (Okagaki *et al*, 2010). Se ha demostrado que mutantes de *C. neoformans* incapaces de formar células gigantes muestran una virulencia atenuada con respecto a la cepa silvestre (Crabtree *et al*, 2012).

6.2 Respuesta fenotípica a la aneuploidía

Diversos estudios han puesto de manifiesto una serie de fenotipos representativos de la aneuploidía, entre los que se encuentran el retraso del ciclo celular en G1 (Thorburn *et al*, 2013), las alteraciones metabólicas (Li *et al*, 2010b), la inestabilidad genómica (Sheltzer *et al*, 2011; Zhu *et al*, 2012) y la proteotoxicidad (Oromendia & Amon, 2014).

La proteotoxicidad se genera cuando la maquinaria de control de calidad de proteínas no funciona o está sobrecargada, dando lugar a la acumulación de proteínas mal plegadas. La aneuploidía puede dar lugar a desequilibrios en la estequiometría de algunos complejos proteicos, ya que las proteínas de estos complejos pueden estar codificadas en genes

ubicados en alguno de los cromosomas afectados (figura 15). De manera que en células aneuploides se genera estrés proteotóxico que desencadena la activación de múltiples rutas, que incluyen la degradación de proteínas por el proteosoma mediada por ubiquitinación y el secuestro de proteínas mediado por chaperonas. Se ha propuesto que la activación de rutas de degradación de proteínas es una respuesta común a la aneuploidía (Torres *et al*, 2007; Oromendia *et al*, 2012; Oromendia & Amon, 2014). Es importante destacar que las células aneuploides, tanto humanas como de levaduras, son capaces de activar la UPR cuando son sometidas a un estrés en retículo endoplásmico, pero no tienen activa esta respuesta en condiciones normales de crecimiento (Oromendia *et al*, 2012; Stingle *et al*, 2012).

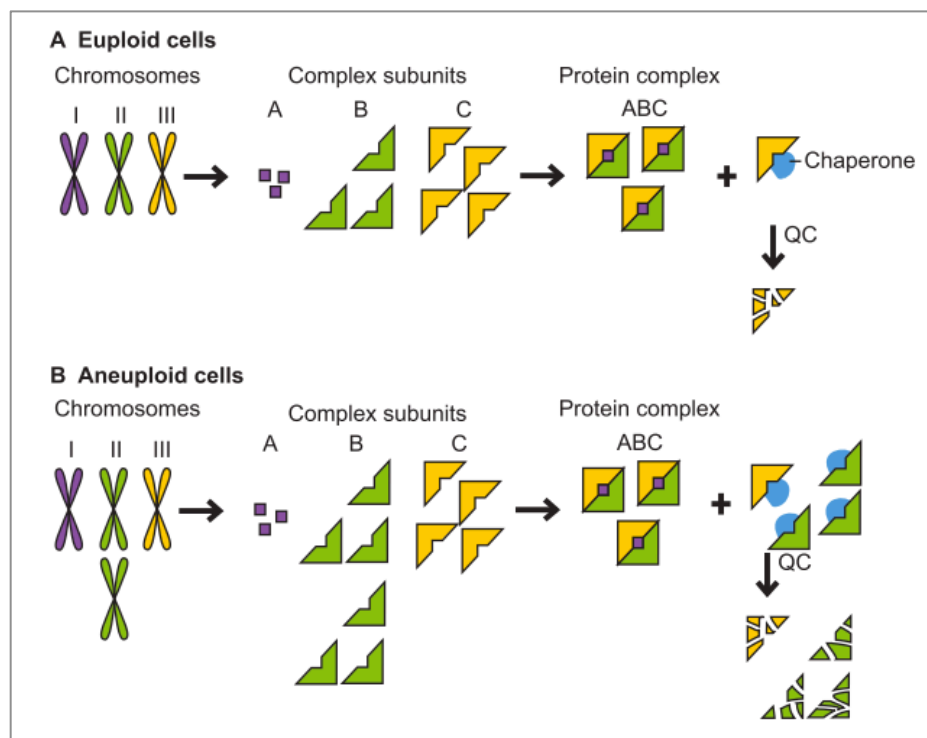


Figura 14. Esquema que representa cómo cambios en el número de cromosomas causa estrés proteotóxico (Oromendia & Amon, 2014). (QC, control de calidad).

6.3 Respuesta transcripcional a la aneuploidía

Mediante *microarrays* de expresión se ha estudiado el efecto de la aneuploidía en el transcriptoma de levaduras. Se ha visto que, en general, en células aneuploides la expresión de genes es proporcional a la dosis génica. Además se ha encontrado un patrón de expresión génica común en células de levaduras con aneuploidías (Torres *et al*, 2007). Este

mismo patrón de expresión, denominado *Environmental Stress Response* (ESR), ya se había descrito en células que crecen bajo condiciones de estrés y presentan un crecimiento lento (Gasch *et al*, 2000). Se sobreexpresan genes relacionados con el plegamiento proteico, la detoxificación de especies oxidativas reactivas y otros procesos; mientras que se subexpresan genes relacionados con el procesamiento del RNA y ribosomas.

Recientemente se ha identificado un patrón transcripcional característico en células aneuploides humanas, denominado *Aneuploidy Response Pattern* (ARP) (Dürbaum *et al*, 2014). Está definido por la sobreexpresión de genes relacionados con el retículo endoplásmico, el aparato de Golgi y los lisosomas; y la subexpresión de genes implicados en la replicación del DNA, transcripción y ribosomas.

Se ha llevado a cabo un metaanálisis a partir de datos de expresión génica de distintos organismos con aneuploidías: levaduras, plantas, ratones y humanos (Sheltzer *et al*, 2012). Se ha encontrado un patrón de expresión similar entre las diferentes especies, de forma que se sobreexpresan genes implicados en respuesta a estrés y se subexpresan genes asociados con proliferación y ciclo celular. Esta respuesta transcripcional es independiente de las variaciones cromosómicas concretas. Este mismo patrón de expresión puede ser desencadenado como respuesta a estrés o a crecimiento lento en células no aneuploides.

6.4 Aneuploidía y cáncer

La inestabilidad genética, que conlleva defectos cromosómicos tanto en número como en estructura, es característica del cáncer (Gordon *et al*, 2012). La gran mayoría de las células cancerosas son aneuploides (Weaver & Cleveland, 2006; Holland & Cleveland, 2012). Existe una fuerte evidencia sobre la preferencia de la ganancia o pérdida de determinados cromosomas en cada tipo de cáncer, lo que implica un proceso selectivo en lugar de alteraciones aleatorias (Beroukhim *et al*, 2010). Por ejemplo se ha observado la ganancia del cromosoma 8 en un 10-20% de los casos de leucemia mieloide aguda (Paulsson & Johansson, 2007). Se cree que la aneuploidía facilita una rápida evolución y la adquisición de fenotipos resistentes a las terapias en pacientes con cáncer (Coward & Harding, 2014).

Uno de los objetivos de las investigaciones en este campo se centra en conocer las ventajas que supone la aneuploidía en la tumorigénesis. En algunos casos supone la ganancia de copias adicionales de un determinado oncogén, o la pérdida de un gen que actúa como supresor tumoral (Bianchi *et al*, 1990; Zhuang *et al*, 1998; Beghini *et al*, 2000). El

estudio de los cambios fenotípicos y transcripcionales que acompañan a la aneuploidía en levaduras, así como las ventajas adaptativas que confiere bajo determinada presión selectiva, puede ayudar a entender el papel de la aneuploidía en el cáncer (Pavelka *et al*, 2010a, 2010b; Berman, 2010).

Objetivos



Candida albicans es uno de los patógenos fúngicos oportunistas de mayor incidencia en humanos. La utilización de *C. albicans* como modelo de estudio permite investigar procesos de diferenciación celular y mecanismos de virulencia, debido a su plasticidad morfológica y a que es un organismo patógeno. Las características de la pared celular contribuyen de forma importante a estos procesos ya que es una estructura dinámica que ayuda a mantener la forma de la célula y constituye el primer punto de contacto con el huésped. La parte más externa de la pared celular se encuentra enriquecida en manoproteínas las cuales, por otra parte, contribuyen a un alto porcentaje de la masa de dicha estructura.

En este trabajo nos hemos propuesto aportar nuevos datos acerca de la relevancia de los procesos de la N-glicosilación de proteínas en este patógeno. Para ello caracterizaremos dos genes, *ALG5* y *ALG9*, que codifican para enzimas implicadas en la biosíntesis de glicoproteínas en RE, y las respuestas de los respectivos mutantes carentes de estas enzimas. Los genes *ALG* (*asparagine-linked glycosylation*), que codifican enzimas implicadas en la síntesis del núcleo oligosacárido, han sido ampliamente estudiados en *S. cerevisiae*, pero hasta la fecha no se ha publicado ningún estudio sobre estos genes en *C. albicans*. En *S. cerevisiae* *ALG5* codifica una UDP-glucosa: dolicol-fosfato glucosiltransferasa que cataliza la transferencia de glucosa desde UDP-Glc al dolicol fosfato, el cual es donador de glucosas en la síntesis del núcleo oligosacárido. *ALG9* codifica una manosiltransferasa requerida para la adición de dos residuos de manosa al núcleo oligosacárido. Está descrito que ambos pasos son importantes para el control del plegamiento proteico lo que sugiere que estos mutantes podrían tener defectos en el control del procesamiento de N-glicoproteínas.

Como objetivos concretos, en este trabajo nos hemos propuesto:

1. Llevar a cabo estudios fenotípicos de los mutantes *alg5Δ* y *alg9Δ*. Su caracterización morfológica, su capacidad para llevar a cabo la transición levadura-hifa y la formación de clamidosporas, con objeto de conocer si están afectados en procesos morfogenéticos.
2. Analizar la sensibilidad de los mutantes *alg5Δ* y *alg9Δ* a agentes que afectan a la pared celular, con el fin de determinar si ésta presenta cambios que alteren la integridad celular.

3. Determinar si las glicoproteínas sintetizadas por los mutantes *alg5Δ* y *alg9Δ* se encuentran alteradas en glicosilación.
4. Llevar a cabo análisis de virulencia en un modelo murino para determinar si las cepas mutantes *alg5Δ* y *alg9Δ* presentan defectos en patogenicidad.
5. Estudiar la expresión de otros genes *ALG* en los mutantes *alg5Δ* y *alg9Δ* para profundizar en los mecanismos de control transcripcional en la síntesis del núcleo oligosacárido.
6. Realizar un análisis de la expresión global de genes en los mutantes *alg5Δ* y *alg9Δ* respecto a la cepa parental con objeto de investigar los reajustes transcripcionales que tienen lugar como respuesta a defectos en N-glicosilación de proteínas.
7. Analizar si la ausencia de las enzimas Alg5p y Alg9p desencadena la activación de rutas de MAP Kinasas implicadas en procesos de estrés.

Materiales y Métodos



1. MICROORGANISMOS Y OLIGONUCLEÓTIDOS UTILIZADOS

En la tabla 1 se muestra el genotipo más relevante, así como la procedencia, de las cepas de *Candida albicans*, *Yarrowia lipolytica* y *Escherichia coli* utilizadas en el presente trabajo.

Tabla 1. Cepas de *C. albicans*, *Y. lipolytica* y de *E. coli* utilizadas en el presente trabajo.

Cepa <i>C. albicans</i>	Genotipo	Cepa parental	Procedencia
SC5314	Aislado clínico		Gillum (1983)
CAI4	<i>ura3Δ::imm434/ura3Δ::imm434</i>	CAF 2-1	Fonzi & Irwin (1993)
CAMR	<i>ura3Δ::imm434/CaURA3</i>	CAI4	R.P.S Rodrigues y A. Domínguez (2005)
NAC2 o <i>alg5Δ/ALG5</i>	<i>alg5Δ::hisG/ALG5</i> , <i>ura3Δ::imm434/ura3Δ::imm434</i>	NAC1	N. Martín y A. Domínguez (2003)
NAC4 o <i>alg5Δ</i>	<i>alg5Δ::hisG/alg5Δ::hisG</i> , <i>ura3Δ::imm434/ura3Δ::imm434</i>	NAC3	N. Martín y A. Domínguez (2003)
NAC4-R o <i>alg5Δ Ura+ R</i>	<i>alg5Δ::hisG/alg5Δ::hisG</i> , <i>ura3Δ::imm434/CaURA3</i>	NAC4	J. Marín, M.C López y A. Domínguez (2008)
NAC4-GFP o <i>alg5Δ/ALG5-GFP</i>	Cepa transformada con el plásmido pLDP2 que contiene la secuencia <i>CaALG9-GFP3</i> y el gen <i>CaURA3</i> .	NAC4	Presente trabajo
<i>alg5Δ-SUC2</i>	Cepa transformada con el plásmido pBI-SM que contiene la secuencia del gen <i>SUC2</i> de <i>S.cerevisiae</i> bajo el control del promotor <i>PCK1</i> de <i>C. albicans</i> , fusionado en su extremo C-terminal al epítipo myc.	NAC4	Presente trabajo
CRM1 o <i>alg9Δ/ALG9 Ura+</i>	<i>alg9Δ::hisGURA3hisG/ALG9</i> , <i>ura3Δ::imm434/ura3Δ::imm434</i>	CAI4	C. Monteiro, M.C López y A. Domínguez (2008)
CRM2 o <i>alg9Δ/ALG9</i>	<i>alg9Δ::hisG/ALG9</i> , <i>ura3Δ::imm434/ura3Δ::imm434</i>	CRM1	C. Monteiro, M.C López y A. Domínguez (2008)
CRM3 o <i>alg9Δ Ura+</i>	<i>alg9Δ::hisGURA3hisG/alg9Δ::hisG</i> , <i>ura3Δ::imm434/ura3Δ::imm434</i>	CRM2	C. Monteiro, M.C López y A. Domínguez (2008)
CRM4 o <i>alg9Δ</i>	<i>alg9Δ::hisG/alg9Δ::hisG</i> , <i>ura3Δ::imm434/ura3Δ::imm434</i>	CRM3	Presente trabajo
CRM4-R o <i>alg9Δ Ura+ R</i>	<i>alg9Δ::hisG/alg9Δ::hisG</i> , <i>ura3Δ::imm434/URA3</i>	CRM4	Presente trabajo
<i>alg9Δ-SUC2</i>	Cepa transformada con el plásmido pBI-SM que contiene la secuencia del gen <i>SUC2</i> de <i>S.cerevisiae</i> bajo el control del promotor <i>PCK1</i> de <i>C. albicans</i> , fusionado en su extremo C-terminal al epítipo myc.	CRM4	Presente trabajo
<i>alg9Δ/Tetp-ALG9</i>	Cepa transformada con el plásmido pNIM que contiene la secuencia del gen <i>ALG9</i> bajo el control del promotor inducible por tetraciclina	CRM4-R	Presente trabajo

Cepa <i>Y. lipolytica</i>	Genotipo	Cepa parental	Procedencia
PO1a	<i>MatA, Δlen2-270, Δura3-302</i>	W29	Tharaud <i>et al.</i> 1992
Cepa <i>E.coli</i>	Genotipo	Cepa parental	Procedencia
DH5α	<i>F-Φ80lacZΔM15, Δ(lacZYA-argF), U169, deoR, recA1, endA1, hsdR17, phoA, supE44, (rke, mk⁺), gyrA96, Δtbi-1, gyrA96 relA.</i>	DH1	Hanahan & Meselson (1983)

En la tabla 2 se muestran los oligonucleótidos utilizados para las reacciones de PCR utilizados en este trabajo (salvo los utilizados para la PCR a tiempo real y para los experimentos de RACE, que se detallan en los apartados 15 y 16, respectivamente).

Tabla 2. Oligonucleótidos empleados en las reacciones de PCR convencional.

Oligonucleótido	Secuencia 5'-3'
AHM1	CCGAACATCAACCAATCGT
ALG3	TTATAAAGCGGCCGCACTTATAC
ALG4	ATCGTCTGAAGAGCTCAGGATTC
ALG5secF	GCTCGATCTAGTGATTGG
ALG5secR	GGTCATATGTATGGATGC
ALG9.5	GGCAAAGGAGATGCTTGAA
ALG9.6	CTTGGAATACTAAGAGGAAAC
Crom5Lf	GCGTCATCCCAAACCTGCTA
Crom5Lr	TCTGAGTTCACAGGTTGCAG
Crom5Rf	AATCCACCAGCTGCTAGACA
Crom5Rr	GTGGTAAATACCACTCCA
Crom2Rf	TCGTCCGATCTCATTCA
Crom2Rr	CGCTTAATGCCGGTTGTA
HAC1-F	AGACGCTTTTTGGAATTACCC
HAC1-R	TCAAAGTCCAACCTGAAATG
HSP12qf	GACCCITGCTGAAACAGCT
HSP12qr	GGTTTTGGCACCTTCGGTA
IP2	TTACAATCAAAGGTGGTCC
IP3	GGTACAGTTCCTCACATC
LAU1	CCCGGGATATAATTCCCATAATGA
LAU2	CCCGGGTTCCCTCTGTAAATTCGTCC
LAU4	GTAGAGCTAGTGATGCAT
PGA62qf	CCAGCTAAGAAACCACTCC
PGA62qr	AGCAACTGGGACAGCGTTAG
SUC2 qf	TAATGCTGGTCCCTGGTCTC
SUC2 qr	GGCAAAGACGGATTTGGATA
URA1	GGATACTATCAAACAAGAGG

2. PLÁSMIDOS UTILIZADOS

2.1 pAG1

Plásmido de 10,7 kb replicativo de *E. coli* y *C. albicans*, cedido amablemente por el Dr. González-Novo (González-Novo *et al*, 2004) (figura 15). 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*, modificada para su utilización en *C. albicans*. La Gfp es una proteína de 238 aminoácidos que absorbe energía a 395 nm y emite fluorescencia a 507 nm. La secuencia *GFP3* fue clonada en el sitio *SmaI*, localizado detrás del promotor del gen que codifica la actina de *C. albicans*. Se insertaron dos copias del gen *GFP3* en tándem, sin que ello afectara a la funcionalidad del plásmido. 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 carboxilo terminal a la Gfp.

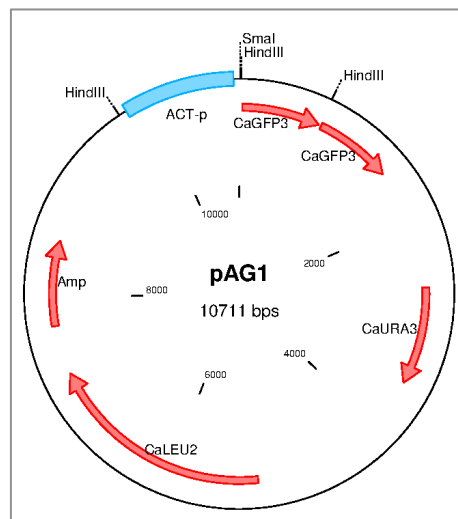


Figura 15. Esquema del plásmido pAG1.

2.2 pMR

Plásmido de 6.5 kb replicativo en *E. coli* construido por la Lda. Rita P. Rodrigues (figura 16). Se ha utilizado en el presente trabajo para la reinscripción del gen *URA3* en uno de los dos locus deletados de este gen *URA3* en los mutantes nulos *alg5Δ* y *alg9Δ*. 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 (1659 pb anteriores al ATG de inicio) y terminadora (1448 pb posteriores al codón de terminación). Las secuencias de los extremos son homólogas a las regiones flanqueantes de la secuencia *imm434* del fago λ gt10 que substituye al gen *URA3* en el genoma de CAI4. El fragmento clonado incluye la parte del gen *CaIRO1* que se deletionó junto a la secuencia *CaURA3* durante la construcción de la cepa CAI4 por lo que su re inserción permite recuperar tanto la expresión del gen *CaURA3* como la del gen *CaIRO1*.

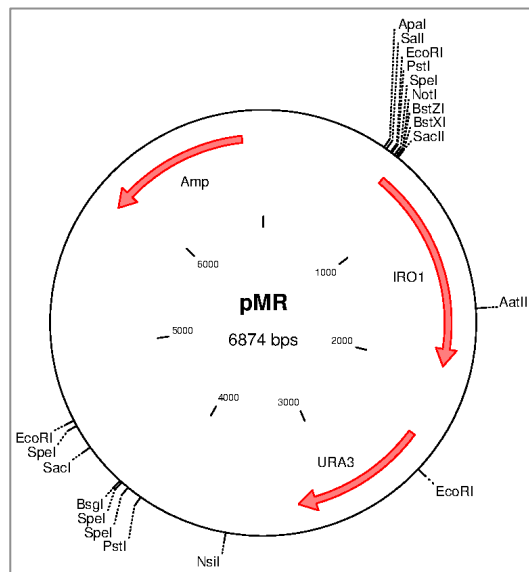


Figura 16. Esquema del plásmido pMR.

2.3 pBI-SM

Plásmido replicativo de *E. coli* y *C. albicans* de 11,9 Kb cedido amablemente por el Dr. Joaquim Ernst (figura 17). Fue construido a partir del vector pBI-1 y contiene la secuencia del gen *SUC2* de *S. cerevisiae* fusionada en su extremo C-terminal a la secuencia del gen *MYC* que codifica un epítipo que permite la detección mediante *Western blot*. Contiene el promotor de la PCK, que se induce en medio mínimo sin glucosa y con un 4% de casaminoácidos como fuente de carbono. El plásmido contiene además los genes *LEU2* y *URA3* como marcadores de selección en *C. albicans*, así como el gen de resistencia a ampicilina para su selección en *E. coli*. También contiene los sitios de replicación autónoma *ARS1* y *ARS2* de levaduras.

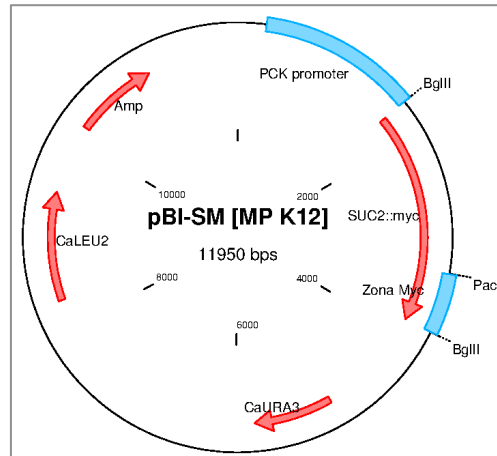


Figura 17. Esquema del plásmido pBI-SM.

2.4 pNIM

Plásmido integrativo que se utiliza para la expresión de genes en *C. albicans*, inducible por tetraciclina (Park *et al*, 2005). Contiene el gen que codifica el transactivador dependiente de tetraciclina (rtTA) bajo el control del promotor *ADH1*, el promotor dependiente de rtTA que controla la expresión del gen diana y el gen *URA3* como marcador de selección.

Además de los plásmidos descritos, para la subclonación de fragmentos amplificados por PCR se utilizó el vector pGEM-T o pGEM-T Easy de *Promega*.

3. MEDIOS DE CULTIVO Y CONDICIONES DE CRECIMIENTO

A continuación se describen los medios de cultivo empleados, todos ellos preparados con agua destilada, y esterilizados mediante calor o filtración. Para obtener los medios sólidos se añadió agar hasta una concentración final del 2%. Los cultivos sólidos se realizaron sobre placas de Petri de plástico. Y en el caso de los medios líquidos, se llevaron a cabo en matraces Erlenmeyer, el volumen del medio fue siempre un tercio del volumen del matraz, además se mantuvieron en agitación. 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. Los microorganismos se conservaron mediante resiembras periódicas en medio sólido y mantenimiento a 4°C. Y con el fin de mantener las células durante largos periodos de tiempo, los microorganismos se almacenaron en viales con glicerol al 30% ó 50% en ultracongeladores a -80°C.

3.1 Medios y condiciones de cultivo para el crecimiento de *C. albicans*

Los medios se suplementaron con uridina hasta una concentración final de 1mM para lograr el crecimiento de los auxótrofos Ura- de *C. albicans*. En algunos casos, se añadió ampicilina hasta una concentración final de 1mM.

3.1.1 Crecimiento en forma de levadura

- YNB: es un medio mínimo que contiene 0,67% de base nitrogenada de levadura sin aminoácidos (YNB w/o aa, DIFCO), y 1% de glucosa.

- YEPD: es un medio rico que contiene 1% de extracto de levadura, 1% de glucosa y 2% de bactopectona.

3.1.2 Crecimiento en forma de hifa

Con el fin de inducir el crecimiento de *C. albicans* en forma filamentosa, utilizamos los medios descritos a continuación. Las células se incubaron a 37°C, excepto en el caso del medio *embedded*, en el que la temperatura fue de 28°C.

- **LEE**: contiene 0.5% de $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$, 0,02% de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,25% de K_2HPO_4 , 0,5% de NaCl, 1,25% de glucosa y 0,05% de prolina. El pH se ajustó a 6,8 añadiendo HCl al 37% (Lee *et al*, 1975).

- **SPIDER**: contiene 1% de manitol, 1% de caldo nutritivo *Nutrient Broth* y 0,2% de K_2HPO_4 .

- **EMBEDDED**: contiene 1% de extracto de levadura, 1% de bactoagar, 2% de bactopectona y 1% de glucosa.

Para estudiar la transición levadura-hifa en un medio líquido se llevó a cabo la inducción por cambio de temperatura. Las células crecidas en placas de YEPD se inocularon a una D.O de 0,1 en matraces de 250 ml con 50 ml de medio *Lee* a 28°C. Se recogieron las células en fase exponencial de crecimiento, y se lavaron dos veces con agua destilada. A continuación, se resuspendieron en 100 ml de agua destilada, en un matraz de 500 ml, hasta una D.O aproximada de 1. El cultivo se mantuvo en agitación a 28°C durante 2 horas, con el fin de que las células completaran el ciclo de división y se mantuvieran en G1. Después se dejaron en reposo metabólico a 4°C entre 24 y 36 horas. Transcurrido este tiempo, se centrifugaron los cultivos y se resuspendieron las células a una D.O de 0,4 en 20 ml de medio *Lee*, previamente precalentado a 37°C, en matraces de 100 ml. Se incubaron

los cultivos a 37°C con agitación, y se tomaron muestras a distintos tiempos con el fin de observar al microscopio el cambio morfológico. Como control se realizaron en paralelo los mismos experimentos pero incubando las células a 28°C, comprobándose que, en estas condiciones, las células se mantenían como levaduras.

3.1.3 Crecimiento en condiciones de hipoxia

Utilizamos el kit comercial *AnaeroGen Compact* de *Oxoid*. Es un sistema que genera una atmósfera anaeróbica. Consiste en unas bolsas de plástico donde se introducen las placas de Petri y un saco de papel que contiene ácido ascórbico y carbón activado, de manera que al reaccionar los componentes con el oxígeno se libera dióxido de carbono. En el interior de la bolsa el oxígeno se reduce por debajo del 1% y la concentración de dióxido de carbono es de entre el 8 y el 14%.

Las células de las distintas cepas crecidas en YEPD hasta fase exponencial de crecimiento, fueron lavadas y resuspendidas en agua a una concentración de $5 \cdot 10^4$ células/ml. Sembramos 50 µl de esta suspensión en placas de YEPD con el fin de obtener colonias aisladas. Introdujimos las placas en las bolsas de plástico junto al saco generador de un ambiente anaeróbico, e incubamos durante 5 días. Finalmente observamos y fotografiamos las colonias bajo un microscopio óptico.

3.1.4 Inducción de la formación de clamidosporas

La formación de clamidosporas se indujo cultivando las células en medio sólido *corn meal agar* al 1,7% (DIFCO). Después de disolver y autoclavar el medio se añadió *Tween 80* (SIGMA) hasta una concentración final del 0,33%. Se sembraron en estría las células de las diferentes cepas de *C. albicans*, y sobre ellas se colocaron cubreobjetos con el fin de crear condiciones de microaerofilia. Las placas se incubaron en oscuridad a 25°C durante 14 días. Los cultivos se tiñeron con lactofenol-azul algodón con el fin de mejorar la visualización de las clamidosporas al microscopio óptico (apartado 7.2 de “Materiales y Métodos”).

3.2 Medios y condiciones de cultivo para el crecimiento de *E. coli*

Los cultivos de *E. coli* se llevaron a cabo en medio LB (Luria Bertani), elaborado con un (0,5% de extracto de levadura, 1% de bactotripton y 1% de NaCl. El pH ajustado a 7,4 con NaOH). Cuando fue necesario se añadió a las placas ampicilina (100µg/ml), IPTG (0,5mM) y X-Gal (80 µg/ml). Las células de *E. coli* se incubaron a 37°C.

4. ANÁLISIS DEL CRECIMIENTO EN PRESENCIA DE COMPUESTOS QUE PRODUCEN ALTERACIONES EN FUNCIONES CELULARES

Con el fin de valorar el crecimiento de las cepas en presencia de compuestos que se ha descrito que producen alteraciones en funciones celulares, se recogieron células crecidas hasta fase exponencial en medio YNB, se lavaron y resuspendieron en agua destilada hasta alcanzar una concentración de aproximadamente $2 \cdot 10^7$ células/ml. A partir de esta suspensión se prepararon diluciones seriadas decimales y se sembraron 5 μ l en medio YNB con el compuesto a analizar. Las diferencias en el crecimiento de las cepas se valoraron después de incubar durante 72 horas, o tiempos superiores, a 28°C.

Para valorar el crecimiento de las distintas cepas en presencia de peróxido de hidrógeno, éstas se cultivaron en YEPD líquido hasta fase exponencial de crecimiento. A continuación se recogieron las células por centrifugación y se resuspendieron en agua estéril hasta una concentración de aproximadamente $2 \cdot 10^7$ células/ml. Se añadió peróxido de hidrógeno (*SIGMA*) a una concentración final de 100 μ M. Y se extrajeron alícuotas de 5 μ l de las muestras, antes como control, y a los 5, 10, 20 y 30 minutos de haber añadido el peróxido de hidrógeno, que se depositaron sobre placas de YEPD. Las diferencias de sensibilidad a peróxido de hidrógeno se valoraron tras 3 días de incubación a 28°C.

5. ENSAYO DE AFINIDAD A *ALCIAN BLUE*

El *Alcian blue* es 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 las células a este colorante a pH ácido.

Las células incubadas en medio mínimo hasta fase exponencial se lavaron con HCl 0,02 N y se resuspendieron en esta solución a una a una concentración de $12,5 \cdot 10^6$ células/ml. 1 ml de esta muestra se centrifugó a velocidad máxima durante 3 minutos. El sedimento se resuspendió en 1,5 ml de una solución de *Alcian blue* al 0,005% disuelto en HCl 0,02 N. Además se preparó un control sin muestra de células. Tras 10 minutos de incubación a temperatura ambiente, se centrifugó y se midió la $D.O_{600nm}$ del sobrenadante. Se realizó una recta patrón que relacionaba concentraciones conocidas del colorante con su valor de $D.O_{600nm}$ correspondiente. Con objeto de conocer la concentración de *Alcian blue* de los sobrenadantes. La diferencia entre este valor en cada muestra y el valor de la

solución tratada de igual forma pero donde no se habían incluido células, nos permitió conocer la cantidad de colorante fijado por las células.

6. MICROSCOPIA

6.1 Estereomicroscopía

La morfología de las colonias se visualizó en un estereomicroscopio modelo *KL750* de *Zeiss*, acoplado a un sistema de fotografía que permitió capturar imágenes de las colonias.

6.2 Microscopía óptica

La observación de las células se llevó a cabo con un microscopio modelo *DMRXA* de *Leica* acoplado a una fuente de luz UV. Con el fin de obtener imágenes de fluorescencia de alta calidad se usó el microscopio *Delta Vision* de *Olympus*. Ambos microscopios se dirigen desde un software que permite la adquisición y procesamiento de las imágenes.

7. TINCIONES

7.1 Tinción con *Hoechst*

El colorante *Hoechst* 33258 se une al DNA por lo que tiñe núcleos celulares, además parte del colorante queda retenido en las paredes celulares de manera que tiñe también esta estructura. Es excitado por luz ultravioleta a una longitud de onda cercana a los 350 nm y emite fluorescencia azul con un máximo de emisión de alrededor de 461 nm.

Se recogieron muestras de cultivos celulares, se centrifugaron y las células se resuspendieron en 20 µl de *Hoechst* a 50 µg/ml. Posteriormente, se incubaron a temperatura ambiente durante 5 minutos en oscuridad. Se lavaron con agua estéril, y se resuspendieron en 15 µl de agua.

7.2 Tinción con lactofenol-azul algodón

Con el fin de facilitar la visualización de las clamidosporas, se tomaron células de la placa donde se había inducido su formación (apartado 3.1.4 de “Materiales y Métodos”) y se resuspendieron en una solución de lactofenol-azul algodón (50% de solución de lactofenol: 20% de ácido láctico, 20% de fenol y 40% de glicerol; y 50% de solución azul algodón: solución saturada de azul algodón diluida al 10% en glicerol). El azul algodón

(azul anilina soluble) es un colorante ácido que tiñe la quitina de las paredes fúngicas y permite visualizar mejor las clamidosporas.

8. ENSAYOS DE VIRULENCIA

La capacidad virulenta de las distintas cepas se analizó en un modelo murino. Células de cultivos de cada una de las cepas a ensayar, crecidas en YEPD hasta fase exponencial, se lavaron con PBS 1x y se resuspendieron en este tampón hasta una concentración de 5×10^8 células por ml. Se inocularon por vía intraperitoneal 10 ratones CD1, machos de aproximadamente 30 g de peso, con 200 μ l de la solución anterior (10^8 células). Se determinó la supervivencia de los ratones diariamente, a partir del día de la infección, durante el tiempo que duró el experimento. La representación gráfica de los resultados, así como el análisis estadístico de los mismos se llevó a cabo mediante el programa *GraphPad Prism* versión 6 disponible en www.graphpad.com. Para la comparación estadística de las curvas de supervivencia se aplicó el test Log-Rank (test Mantel-Cox).

9. TÉCNICAS DE MANIPULACIÓN DE PROTEÍNAS

9.1 Preparación de extractos celulares

Las células se incubaron en los medios adecuados a 28°C hasta fase exponencial. Se recogieron muestras, a las que se añadió el mismo volumen de agua a 4°C, y se centrifugaron. El sedimento de células se lavó con 1 ml de agua estéril a 4°C, y a continuación se resuspendió en 120 μ l de tampón de lisis (Tris-HCl 50 mM pH 7,5, glicerol 10%, Triton X-100 1%, SDS 0,1%, NaCl 150 mM, NaF 50 mM, ortovanadato sódico 1 mM, β -glicerol fosfato 50 mM, sodio pirofosfato 5 mM y EDTA 5 mM) conteniendo los inhibidores de proteasas (25 μ g/ml de quimostatina (*SIGMA*) y 0,5 μ g/ml de leupeptina (*SIGMA*)). Se mezcló con un volumen similar de perlas de vidrio (ballotini). A continuación las células se rompieron mediante agitación en una *fast-prep FP120* (*Savant Bio101*) aplicando tres pulsos con una potencia de 5,5 durante 20 segundos de duración cada uno, haciendo una parada de 1 minuto entre ellos. Se recuperaron los extractos celulares en un nuevo eppendorf, el cual se sometió a centrifugación durante 15 minutos a 4°C con objeto de separar los restos de paredes celulares y partículas insolubles. La

concentración de proteínas se determinó a 595 nm mediante el método de Bradford (Bradford, 1976), con el kit *Protein Assay* de *BIO-RAD*.

9.2 Detección de proteínas específicas: *Western blot*

Los extractos de proteínas fueron desnaturalizados, para ello se diluyeron en tampón de Laemli (Tris-HCl 0,0625 M pH 6,8, SDS 2%, DTT 10 mM, glicerol 10% y trazas de azul de bromofenol), se sometieron a una temperatura de 100°C y se mantuvieron posteriormente en hielo. Con el fin de separar las proteínas según su peso molecular, se cargaron en un gel de poliacrilamida preparado siguiendo el protocolo descrito por Sambrook y colaboradores (Sambrook *et al*, 1987). El gel de poliacrilamida se mantuvo en un soporte de *BIO-RAD* y se sumergió en una cubeta con tampón de electroforesis (glicina 0,2 M, tris 0,025 M y SDS 0,1%). Las muestras se sometieron a un voltaje de 25-30 mA durante aproximadamente 45-60 minutos. Las proteínas fueron transferidas desde el gel de poliacrilamida a una membrana de PVDF (*Immobilon-P Transfer Membrane* de *Millipore*), previamente embebida en tampón de transferencia (glicina 0,2 M y tris 0,025 M). La transferencia se llevó a cabo en una cubeta de electrotransferencia de *BIO-RAD* aplicando un voltaje de 350 mA durante 2 horas. A continuación se tiñó la membrana con el colorante *Ponceau S* (*SIGMA*), con el fin de visualizar las proteínas totales. Se sumergió la membrana en el colorante durante un minuto y a continuación se lavó con agua para retirar el exceso. Para evitar uniones inespecíficas con el anticuerpo, una vez transferidas las proteínas a la membrana, ésta se bloqueó incubándola durante una hora con agitación en tampón TBST (Tris-HCl 10 mM pH 8, NaCl 150 mM, Tween 20 0,1%) al que se le añadió BSA al 5%. A continuación se hicieron tres lavados con TBST de 10 minutos cada uno, para eliminar el exceso de BSA, y se sumergió la membrana en una solución de TBST que contenía el anticuerpo primario a la dilución recomendada por la casa comercial (tabla 3) y BSA al 5%, y se incubó durante una noche con agitación a 4°C. Después de lavar la membrana tres veces con TBST durante 10 minutos para retirar el anticuerpo primario libre, se incubó con el anticuerpo secundario (tabla 3) diluido en TBST y BSA al 5%, durante una hora con agitación a 4°C. Se lavó de nuevo la membrana tres veces con TBST durante 10 minutos, y se reveló. Para ello se utilizó el kit comercial *Amersham ECL Western Blotting Analysis System* de *GE Healthcare*, siguiendo las instrucciones del fabricante. Este sistema de revelado se basa en una reacción de quimioluminiscencia, la oxidación del luminol en presencia de peróxido de hidrógeno, catalizada por la peroxidasa de rábano (HRP) que está unida al anticuerpo secundario. La luz que se desprende en la reacción

enzimática es captada por una autorradiografía, lo que permite detectar la presencia de la proteína de interés.

Tabla 3. Anticuerpos utilizados en los *Western blot*.

Anticuerpo primario	Anticuerpo secundario (<i>BIO-RAD</i>)	Epítipo
c-Myc (9E10) <i>Santa Cruz Biotechnology</i>	Goat Anti-Mouse IgG (Horseradish Peroxidase Conjugate)	Myc
Phospho-p38 MAPK (Thr180/Tyr182) <i>Cell Signalling Technology</i>	Goat Anti-Rabbit IgG (Horseradish Peroxidase Conjugate)	Forma fosforilada de Hog1p
Hog1 (y-215) <i>Santa Cruz Biotechnology</i>	Goat Anti-Rabbit IgG (Horseradish Peroxidase Conjugate)	Hog1p

10. TRANSFORMACIONES

10.1 Transformación de *E. coli*

Para la transformación de células bacterianas, se utilizaron células competentes de la cepa DH α 5 de *E. coli*, que se sometieron a choque térmico en presencia del DNA (Kushner, 1988). Siguiendo el protocolo con por Sambrook y colaboradores (Sambrook *et al*, 1987).

10.2 Transformación de *C. albicans*

Para la transformación de células de levadura, se llevó a cabo el método de transformación utilizando acetato de litio (Walther & Wendland, 2003) ligeramente modificado. Se crecieron células en 25 ml de YEPD hasta fase estacionaria, se sembraron en 50 ml de YEPD a una D.O_{600nm} de 0,5, y se dejaron crecer durante 4 horas. Las células se lavaron con agua y se resuspendieron en 1,5 ml de solución de LiAc (LiAc 100 mM, Tris-HCl 10 mM pH 7,5, EDTA 1 mM). Se tomaron 100 μ l de esta suspensión de células y se mezclaron con 25 μ l de una dilución de DNA de esperma de salmón a una concentración de 10 mg/ml (*SIGMA*) previamente desnaturalizado por calor, y con distintas cantidades del DNA (plásmido o fragmento de DNA con el que se quieren transformar las células). La mezcla se incubó a 30°C durante 30 minutos. A continuación se añadieron 600 μ l de la solución PEG/LiAc (PEG 4000 al 50% en solución de LiAc). Tras incubar a 30°C durante toda la noche, se sometió la mezcla a un choque térmico de 1 hora a 42°C. A continuación se lavaron las células con agua y se resuspendieron en un pequeño volumen. Se sembraron diferentes alícuotas en placas de medio selectivo que se incubaron a 28°C durante 4 días.

11. TÉCNICAS DE MANIPULACIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS

11.1 Purificación de ácidos nucleicos

11.1.1 Purificación de DNA plasmídico de *E. coli*

La obtención de pequeñas cantidades de DNA plasmídico se realizó siguiendo el método de lisis alcalina (Birnboim & Doly, 1979), descrito por Sambrook y colaboradores (Sambrook *et al*, 1987).

En los casos en los que resultó necesario purificar DNA plasmídico a pequeña escala con alto grado de pureza se utilizó el kit *Wizard plus* de *Promega* según el protocolo proporcionado por la casa comercial. Para la obtención de DNA plasmídico a gran escala (partiendo de 30-100 ml de cultivo) con un alto grado de pureza se emplearon las columnas de intercambio iónico *Plasmid Midi Kit* de *Quiagen* siguiendo las instrucciones del fabricante.

11.1.2 Purificación de DNA genómico de levaduras

Se recogieron células de un cultivo de YEPD mediante centrifugación, se lavaron con agua y se resuspendieron en 200 μ l de tampón de extracción de DNA de levadura: Tritón X-100 2%, SDS 1%, NaCl 100 mM, Tris-HCl 10mM pH 8.0 y EDTA 1mM. A continuación, se añadieron perlas de vidrio de 425-600 μ m de diámetro (ballotini) en un volumen similar al volumen de células, y 200 μ l de una mezcla 1:1 de fenol y cloroformo. Las células se rompieron agitando los tubos en un vórtex durante 4 minutos, con un minuto de descanso en medio, y se añadieron 200 μ l de tampón TE 1X. Se centrifugó la mezcla durante 5 minutos a 13000 rpm a 4°C, y la fase acuosa que contiene los ácidos nucleicos se limpió dos veces con 500 μ l de cloroformo. Finalmente se transfirió a un nuevo tubo y se añadió 1 ml de etanol absoluto a -20°C con el fin de que precipitasen los ácidos nucleicos. La mezcla se agitó y se mantuvo a -20°C durante al menos una hora. A continuación, se centrifugó durante 5 minutos a máxima velocidad, y se eliminó el sobrenadante. El precipitado se resuspendió en 400 μ l de TE. Se añadieron 30 μ g de RNAsa A, y se incubó durante 10 minutos a 37°C. A continuación se añadió 1 ml de etanol absoluto y 10 μ l de acetato de amonio 4 M, de forma que los ácidos nucleicos precipitasen. Tras centrifugar 5 minutos a velocidad máxima, el precipitado se lavó con 500 μ l de etanol al 70%, y una vez totalmente seco se resuspendió en 30 μ l de agua.

11.1.3 Purificación de RNA total de levaduras

Se recogieron células mediante centrifugación a 4°C de las muestras de los cultivos, y se resuspendieron en un pequeño volumen del sobrenadante. Las células se congelaron dejando caer gotas de la suspensión en tubos eppendorf que contenían nitrógeno líquido. Las células congeladas se introdujeron en una cámara de teflón, junto a una esfera de tungsteno de 7 mm de diámetro, previamente enfriado en nitrógeno, y se sometió a agitación en un *Mikro-Dismembrator S* (Braun), durante 2 minutos a 2000 rpm, con el fin de que se produjese la lisis celular de forma mecánica. Para purificar el RNA se llevó a cabo el método de extracción por *Trizol*. Los restos celulares se resuspendieron en dos tubos con 1 ml de *Trizol* (SIGMA) cada uno. Se agitaron con un vórtex durante 1 minuto, se dejaron a temperatura ambiente durante 5 minutos, y se centrifugaron 10 minutos a 12000 g. Se transfirieron los sobrenadantes a un nuevo tubo que contenía 0,4 volúmenes de cloroformo. Tras agitar manualmente las muestras, se dejaron 10 minutos a temperatura ambiente, y se centrifugaron a 12000 g. A continuación, se transfirió la fase superior a un nuevo tubo con 0,5 volúmenes de isopropanol. Se dejó que los ácidos nucleicos precipitasen, manteniendo las muestras a temperatura ambiente durante 15 minutos, y se centrifugó durante 10 minutos a 12000 g. El precipitado se lavó con 1 ml de etanol al 70% a 4°C, se secó en *Speed-Vac*, y resuspendió en 500 µl de agua tratada con DEPC y 500 µl de tampón de LiCl (LiCl 4 M, TrisHCl 20 mM pH 7,4 y EDTA 10 mM). Se dejó precipitando a -20°C durante al menos 1 hora, y se centrifugó durante 30 minutos a velocidad máxima. Se lavó dos veces con etanol al 70% a 4°C, y se secaron los precipitados en *Speed-Vac*. Finalmente se resuspendió en 50 µl de agua tratada con DEPC. Se comprobó la integridad del RNA sometiendo 1 µl de cada muestra a electroforesis en un gel de agarosa al 1%, preparado con TAE y agua tratada con DEPC.

11.1.4 Purificación de fragmentos de DNA

La purificación de fragmentos de DNA, tanto a partir de geles de agarosa como de productos de PCR, fue llevada a cabo usando el kit de purificación *GFXTM PCR DNA and Gel Band Purification Kit* de *GE Healthcare*, siguiendo el protocolo que recomienda la casa comercial.

11.2 Valoración de la concentración de ácidos nucleicos

La concentración y la pureza de las muestras de DNA y RNA se determinó mediante el espectrofotómetro *nanodrop 1000* de *Thermo Scientific*, midiendo la absorbancia de a 260

nm. Además, la relación entre las absorbancias a 260 nm y 280 nm permite conocer si la muestra está contaminada con proteínas, fenol u otros contaminantes.

11.3 Reacción de amplificación de DNA (PCR)

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se llevó a cabo usando un termociclador *Master gradient* de Eppendorf, donde la mezcla de reacción se sometió a una serie de etapas, que se repitieron de forma cíclica 25-30 veces, a temperatura y duración variables:

- Desnaturalización del DNA molde: 30 segundos a 95°C.
- Anillamiento de los oligonucleótidos: 30 segundos a una temperatura variable en función de las características de los oligonucleótidos (42°C-60°C).
- Elongación del DNA: durante 30 segundos a 3 minutos, en función del tamaño del fragmento que queremos amplificar, a 72°C, que es la temperatura óptima a la que trabaja la Taq polimerasa.
- Etapa final de elongación: 7 minutos a 72°C.

La reacción se preparó a partir de una mezcla tamponada que normalmente contiene entre 0,1 y 1 µg de DNA molde, cada uno de los dos oligonucleótidos (1 µM cada uno), entre 0,75 y 1,5 unidades de Taq polimerasa, MgCl₂ (2,5 µM), dNTPs (200 µM), y agua miliQ hasta alcanzar un volumen final de 25 ó 50 µl. Las cantidades se ajustaron según cada experimento.

De forma alternativa, se usó el kit *PureTaq ready to go PCR*[®] de *GE Healthcare*, que contiene la mezcla de reacción a la que sólo es necesario añadir el DNA molde, los oligonucleótidos y agua miliQ hasta un volumen final de 25 µl.

En ocasiones se utilizaron directamente células recogidas de colonias que se resuspendieron en el tampón de PCR y fueron sometidas a un tratamiento previo a 95°C durante 15 minutos.

11.4 Electroforesis en geles de agarosa

La migración diferencial de los fragmentos de DNA en una electroforesis en un gel de agarosa, permitió separarlos en función de su tamaño. La agarosa, a distintas concentraciones según el tamaño del fragmento de DNA que se quería visualizar, se disolvió en TAE (Tris/Acetato 40 mM, EDTA 1 mM, pH 8.0), y a continuación de añadió

bromuro de etidio (0,5 µg/ml) con objeto de poder visualizar el DNA bajo la luz U.V. Las muestras de DNA o RNA se mezclaron con 1/6 volúmenes de tampón de carga (azul de bromofenol 0,25%, xileno cianol 0,25% y glicerol 30%), con el fin de darles densidad y visualizar el frente de electroforesis, y se cargaron en los pocillos correspondientes del gel. Como marcador de peso molecular se utilizaron 200 ng de *1 kb Plus DNA Lander* de *Invitrogen*. Las electroforesis se desarrollaron aplicando un voltaje de entre 60 y 120 V, en función del experimento. Finalmente, los geles fueron expuestos a luz U.V, y las imágenes fueron capturadas por una cámara digital mediante el equipo *Gel Doc 2000* de *BIORAD*.

11.5 Secuenciación de DNA

La secuenciación de moléculas de DNA se realizó en el Servicio de Secuenciación de DNA de la Universidad de Salamanca. Las secuencias obtenidas se analizaron mediante el programa *Chromas* de *Technelysium*, y mediante el programa *Seqman* de *Lasergene* se llevó a cabo el anillamiento de secuencias.

11.6 Digestión con endonucleasas de restricción y tratamiento con la fosfatasa alcalina

La digestión de DNA con las distintas enzimas de restricción se llevó a cabo teniendo en cuenta las recomendaciones, en cuanto a temperatura óptima y elección del tampón, de las casas comerciales correspondientes. Tanto el volumen de la digestión como el tiempo de incubación se determinó en función de cada experimento.

En ocasiones, para evitar la recircularización del DNA plasmídico durante la ligación, se trató éste con fosfatasa alcalina (*Roche*) con objeto de eliminar el residuo fosfato en 5'. A continuación, el DNA se purificó con el fin de eliminar de la muestra la enzima.

11.7 Ligación de fragmentos de DNA

En las reacciones de ligación se utilizó DNA ligasa del fago T4 (*Fermentas*), y se siguieron las indicaciones del fabricante, ajustándose el volumen final a 10 µl. Las reacciones se incubaron durante toda la noche a 16°C.

En el caso de querer subclonar fragmentos de DNA obtenidos mediante amplificación por PCR se utilizó como vector el plásmido *pGEM-T Easy*, y se usó para la ligación la DNA ligasa facilitada por *Promega*.

11.8 Hibridación de ácidos nucleicos

11.8.1 Marcaje radiactivo de sondas de DNA

A partir de un fragmento de PCR purificado, se llevó a cabo su marcaje siguiendo el método conocido como *Random priming* (Feinberg & Vogelstein, 1983). Éste consiste en hibridar las moléculas de DNA, previamente desnaturalizadas, con hexanucleótidos que sirven de cebadores para la síntesis de la molécula de DNA complementaria. El fragmento Klenow de la DNA polimerasa de *E. coli*, durante la elongación incorpora a la molécula uno de los 4 nucleótidos marcado radiactivamente. En nuestro caso, usamos el ($\alpha^{32}\text{P}$) dCTP, y el kit de marcaje *Rediprime II Random Prime Labelling System* de *GE Healthcare*, siguiendo el protocolo aportado por la casa comercial.

11.8.2 Detección de secuencias de DNA específicas: *Southern blot*

Se digirió el DNA genómico (entre 15 y 20 μg) con la enzima de restricción adecuada, y se separaron los fragmentos en un gel de agarosa al 0,8%. Se visualizó aplicando luz ultravioleta, y se fotografió junto a una regla para poder posteriormente determinar el tamaño de las bandas hibridadas. A continuación se trató el gel llevando a cabo los siguientes lavados: 15 minutos en agua estéril, 15 minutos en HCl 0,25 M (2 veces), 15 minutos en agua estéril, 30 minutos en solución desnaturalizante (NaOH 0,5 M, NaCl 1,5 M), 15 minutos en agua estéril y 30 minutos en solución neutralizante (Tris-HCl 1 M pH 8, NaCl 1,5 M). Después se embebió el gel en SSC 20x (NaCl 3 M, citrato- Na_3 0,3 M pH 7). La transferencia por capilaridad a una membrana de nylon *HybondTM-N* de *GE Healthcare* se llevó a cabo siguiendo el protocolo especificado por Sambrook y colaboradores (Sambrook *et al.*, 1987). Después de 12 horas de transferencia aproximadamente, se fijó el DNA a la membrana de forma covalente mediante exposición a luz ultravioleta con 120 mJ (cross-linking automático), para ello se usó una cámara con luz ultravioleta UV *Stratalinker 2400* de *Stratagene*. Finalmente se secó durante 10 minutos en un horno a 80°C. Las membranas se prehibridaron para evitar que el DNA se uniera de forma inespecífica, sumergiéndolas en la solución de prehibridación (*Dextran sulfate sodium salt* 0,2 M, SDS 1%, NaCl 1 M) junto a DNA de esperma de salmón (60 $\mu\text{g}/\text{ml}$), previamente desnaturalizado, y manteniéndolas durante al menos 2 horas a 65°C. Para la hibridación se usó una solución de la misma composición que la solución de prehibridación, pero a la que se añadió la sonda radiactiva previamente desnaturalizada. Se incubó durante 16 horas a 65°C. A continuación se lavó 2 veces con SSC 2x durante 5

minutos a temperatura ambiente, y con una mezcla de SSC 2x y SDS al 0,1 % durante 45 minutos a 65°C. Finalmente, la membrana se expuso a una película fotográfica *BioMax XAR Film* de *Kodak* durante 1-2 días a -80°C.

11.8.3 Detección de secuencias de RNA específicas: *Northern blot*

Para estos experimentos se usaron de 4 a 8 µg de RNA para cada muestra resuspendidos en 13 µl de agua tratada con DEPC. Se añadieron 5 µl de tampón desnaturizante (formamida 50%, formaldehído 16% y MOPS 5x en agua tratada con DEPC), y se dejaron 30 minutos en hielo. A continuación se desnaturizaron las muestras incubando a 65°C durante 15 minutos, e inmediatamente se dejaron en hielo. Se añadieron 2 µl de tampón de carga (azul de bromofenol 0,25%, xileno cianol 0,25% y glicerol 30% en agua tratada con DEPC). Las muestras se sometieron a electroforesis en un gel de agarosa al 1%, preparado en tampón MOPS (ácido 3-N-morfolinopropanosulfónico pH 7,0 0,04 M, acetato sódico 0,01 M, EDTA 1mM en agua tratada con DEPC) y conteniendo formaldehído (*MERCK*) al 0,7% y 1 µl de bromuro de etidio a 10 mg/ml. El tampón de carrera empleado fue MOPS 1x. Las electroforesis se mantuvieron durante aproximadamente 2 horas a una corriente constante de 68 V. Se usó un marcador de peso molecular de RNA (*RiboRuler High Range RNA Ladder* de *Invitrogen*). Al finalizar la electroforesis se visualizó el gel mediante luz UV junto a una regla. El gel se lavó con agua tratada con DEPC durante 1 hora. El RNA se transfirió por capilaridad desde el gel de agarosa a membranas de nylon (*Hybond-N* de *Amersham*) usando como solución de transferencia SSC 20x, y siguiendo el protocolo especificado por Sambrook y colaboradores (Sambrook *et al*, 1987). La transferencia se mantuvo durante toda la noche, y se fijó el RNA introduciendo las membranas en un horno al vacío a 80°C durante 3 horas. Las membranas se prehibridaron durante 3 horas a 42°C con la siguiente solución: 5 ml de formamida desionizada (*SIGMA*), 1 ml de Denhardtts 100x (Ficoll 0,4%, polivinilpirrolidona 0,4% y BSA 0,4%), 500 µl de TrisHCl 1M pH 7,5, 2 ml de NaCl 5M, 200 µl de sodio pirofosfato 5%, 1 ml de SDS 10%, 1 g de *Dextran Sulfate Sodium Salt* (*USB Corporation*), y 100 µl de una dilución de 10 mg/ml DNA de esperma de salmón (*SIGMA*) previamente desnaturizado a 95°C y mantenido en hielo. Las hibridaciones se llevaron a cabo a 42°C durante toda la noche. La sonda radiactiva fue añadida, previamente desnaturizada, junto al tampón de hibridación que contenía 2 ml de formamida desionizada (*SIGMA*), 400 µl de Denhardtts 100x, 200 µl de TrisHCl 1M pH 7,5, 80 µl de

sodio pirofosfato 5 % y 400 µl de SDS 10%. Tras la hibridación la membrana se lavó 2 veces con SSC 2x a temperatura ambiente durante 5 min, 2 veces con SSC 2x-SDS 1% a 65°C durante 45 min, y 2 veces con SSC 2x-SDS 0,1% a 65°C durante 30 min. Para comprobar que los lavados eran suficientes se midió la emisión de radiación de la membrana con un *Geiger*. Finalmente las membranas se analizaron mediante el sistema de detección de radiación *Personal Molecular Imager* de *BIO-RAD*. La impresión causada por la radiación de las diferentes muestras fue cuantificada mediante el programa *Quantity One* 4.6.6 de *BIO-RAD*. Además las membranas se expusieron a una película fotográfica *BioMax XAR Film* de Kodak durante 1 a 10 días con el fin de obtener imágenes de mayor calidad.

12. DETERMINACIÓN DEL ORIGEN Y FINAL DEL TRANSCRITO (5' Y 3' RACE)

El 5' y 3' RACE (*Rapid Amplification of cDNA Ends*) es una técnica que permite amplificar los extremos de una secuencia de cDNA obtenido a partir de un transcrito al que se le ha ligado un fragmento de secuencia conocida en uno de sus extremos. De manera que nos permite determinar las secuencias 5' y 3' UTR (*untranslated region*) de un gen. Para llevar a cabo el experimento utilizamos el kit comercial *RML-RACE FirstChoice* de Ambion, siguiendo el protocolo facilitado por la casa comercial.

12.1 5' RACE: Determinación del origen de transcripción de un gen

En primer lugar, el RNA total se trató con la fosfatasa alcalina *CIP* (*Calf Intestine Alkaline Phosphatase*) que elimina el residuo fosfato del extremo 5' de los ácidos nucleicos. La caperuza o CAP que tienen las moléculas de RNA mensajero de eucariotas en su extremo 5' las protege de esta reacción, de forma que la enzima CIP únicamente va a actuar sobre los RNA ribosomales, de transferencia y sobre los RNA mensajeros degradados en su extremo 5', así como sobre DNA genómico residual que pueda haber en la muestra. A continuación, el tratamiento con la pirofosfatasa *TAP* (*Tobacco Acid Pyrophosphatase*) hace que se libere la caperuza o CAP del extremo 5' de los RNA mensajeros. Al quedar desprovistos de esta estructura, los RNA mensajeros tienen el residuo fosfato 5' libre, y por tanto susceptible de poder sufrir una reacción de ligación en ese extremo. Después, se llevó a cabo una reacción de ligación de estos mRNA a un adaptador de RNA 45 pb de secuencia conocida. Con el fin de sintetizar DNA copia (cDNA) se llevó a cabo una reacción de retrotranscripción mediante la retrotranscriptasa *M-MLV* (*Moloney Murine*

Leukemia Virus). Se usó una mezcla de oligonucleótidos aleatorios (*random primers*) de forma que se obtuvieron fragmentos cortos de cDNA complementario a todos los RNA mensajeros de la muestra.

Una vez sintetizado el cDNA se llevaron a cabo dos PCRs anidadas (denominadas PCR externa e interna). De esta forma se consigue incrementar la especificidad, así como la cantidad de producto final. Para ello se usaron dos parejas de oligonucleótidos, de los cuales los oligonucleótidos directos se unen al adaptador, y son facilitados en el kit comercial, y los reversos, que son específicos del gen que queremos estudiar, fueron diseñados para que anillasen aguas abajo del codón de inicio de la traducción, según las recomendaciones del fabricante del kit comercial (tabla 4). Para la PCR externa se usó como molde 1 μ l de cDNA, y para la PCR interna se tomó 1 μ l de la muestra de DNA amplificado en la PCR externa. Finalmente, el producto de la PCR se purificó y se clonó en el plásmido de clonación pGEM-T o pGEM-T Easy, con el objeto de poder ser secuenciado.

Tabla 4. Oligonucleótidos específicos para la determinación del extremo 5' del transcrito de cada gen que se utilizan como cebador reverso en las reacciones de PCR externa e interna.

Gen	Oligonucleótido	Secuencia 5'-3'
<i>CaALG5</i>	Ca ALG5 (2) INNER (oligo interno 5')	TCTTGGTGGTAATGGATGTGA
	Ca ALG5 (2) OUTER (oligo externo 5')	CATTTTCCCTAATCTTTGAGTTTCA
<i>CaALG9</i>	Ca ALG9 INNER (oligo interno 5')	GGAGTATTCCCATGTTTGC
	Ca ALG9 OUTER (oligo externo 5')	GTTGACACACCTTTCCAAG
<i>YIALG5</i> (<i>YALI0D06017g</i>)	YI ALG5 INNER (oligo interno 5')	TGCTTCTCCAGAGCCACAAG
	YI ALG5 OUTER (oligo externo 5')	CGTTGTAGCAGGGCACTACC
<i>YIALG9</i> (<i>YALI0E28941g</i>)	YI ALG9 INNER (oligo interno 5')	AATGGCGTACTCGGGAGAG
	YI ALG9 OUTER (oligo externo 5')	TGAAGTACTTGGGCTGGAGAC

12.2 3' RACE: Determinación del final de transcripción de un gen

El RNA total se usó como molde para la reacción de retrotranscripción mediante la retrotranscriptasa *M-MLV* (*Moloney Murine Leukemia Virus*). A diferencia del experimento

del 5' RACE donde se usan *random primers*, en este caso se utilizan oligo(dT), de forma que la síntesis de cDNA comienza en el extremo 3' de los RNA mensajeros. Además de la secuencia de timinas, este oligonucleótido contenía una cola de 32 pb que sirvió de adaptador en el cDNA sintetizado.

Se llevaron a cabo dos PCRs anidadas, externa e interna, de forma similar al experimento del 5' RACE. Pero en este caso los oligonucleótidos reversos eran aquellos que se unían al adaptador, y los oligonucleótidos específicos de cada gen fueron los cebadores directos, diseñados según las recomendaciones del fabricante del kit comercial (tabla 5).

Tabla 5. Oligonucleótidos específicos para la determinación del extremo 3' del transcrito de cada gen que se utilizan como cebador directo en las reacciones de PCR externa e interna.

Gen	Oligonucleótido	Secuencia 5'-3'
<i>CaALG5</i>	Ca ALG5-3 INNER (oligo interno 3')	GAGATTCAATTGCCATGG
	Ca ALG5-3 OUTER (oligo externo 3')	CCCTCATATGCATACTGA
<i>CaALG9</i>	Ca ALG9-3 INNER (oligo interno 3')	TTGACCTTGAACATTGCC
	Ca ALG9-3 OUTER (oligo externo 3')	GAGCTGACGAATGTCATTG
<i>YIALG5</i> (<i>YALI0D06017g</i>)	YI ALG5-3 INNER (oligo interno 3')	GAGAAAAGGTCTGGCCATTG
	YI ALG5-3 OUTER (oligo externo 3')	GGCTTCAAGCTCTTTTCTCG
<i>YIALG9</i> (<i>YALI0E28941g</i>)	YI ALG9-3 INNER (oligo interno 3')	CTTCTCAGTGC GACTTCGTG
	YI ALG9-3 OUTER (oligo externo 3')	ACCTTCCAGGAACCTCCAGT

13. PCR CUANTITATIVA

La PCR cuantitativa o PCR a tiempo real es uno de los métodos más sensible y reproducible para cuantificar la expresión de un gen. La PCR cuantitativa se fundamenta en el hecho de que, en condiciones ideales, durante la fase exponencial la cantidad de producto es proporcional a la cantidad inicial de molde (Heid *et al*, 1996; Gibson *et al*, 1996), y la reacción puede describirse como:

$$N_n = 2^n N_0$$

Siendo N_n el número de moléculas en el ciclo n y N_0 la cantidad inicial de molde, siempre que la eficiencia de la reacción sea del 100%. La dinámica de la PCR es monitorizada con el fluorocromo *SYBR green*, que se intercala preferentemente con el DNA bicatenario, y emite luz verde. El *SYBR green* puede usarse para detectar cualquier producto amplificado independientemente de su secuencia. Además del fluoróforo reportero *SYBR Green*, el producto elegido para nuestro experimento contenía el fluoróforo de referencia pasiva ROX, éste proporciona una fluorescencia interna de referencia con la que la señal del fluoróforo reportero pueda ser normalizada.

Durante los ciclos iniciales de la PCR (*baseline*) la emisión de fluorescencia es muy pequeña y cercana a la fluorescencia de fondo. Es necesario valorar la emisión de fluorescencia en el punto en el que ésta sobrepasa el ruido de fondo. Este punto se denomina ciclo umbral o *threshold cycle* (C_t), en él la cantidad de producto amplificado se correlaciona directamente con la concentración inicial de molde:

$$N_{C_t} = N_0(1+E)^{C_t}$$

Siendo N_{C_t} el número de moléculas en el ciclo umbral, y E la eficiencia del proceso (de 0 a 1).

El C_t puede determinarse manualmente o de forma automática por el software asociado al aparato de PCR cuantitativa. Se selecciona marcando un umbral de fluorescencia (*threshold*) teniendo en cuenta que debe quedar sobre el ruido de fondo (*baseline*) y suficientemente bajo para que esté dentro de la región de crecimiento exponencial de la curva de PCR.

Llevamos a cabo la cuantificación del DNA de forma relativa. La cuantificación relativa se basa en la comparación entre la expresión de un gen problema y un gen de referencia, y en la expresión del mismo gen en una muestra problema frente a la expresión en una muestra de referencia. El modelo matemático utilizado fue el modelo de calibrado de la eficiencia (Pfaffl, 2001; Pfaffl *et al*, 2002). Además de replicados para cada reacción de PCR, las amplificaciones se llevan a cabo a partir de diluciones seriadas de la cantidad de molde, esto nos permite poder calcular la eficiencia de la reacción.

13.1 Tratamiento del RNA y síntesis de cDNA

El RNA de las diferentes cepas y en distintas condiciones de crecimiento, fue tratado en primer lugar con DNasa I (*Roche*), con el fin de eliminar DNA genómico residual. A las

muestras que contenían 8 µg de RNA se le añadieron 1 µl de DNasa I , 2 µl de tampón (se prepara mezclando acetato de sodio 1M-sulfato de magnesio 50 mM y ácido acético 1M-sulfato de magnesio 50 mM hasta alcanzar un pH de 5,0) y agua tratada con DEPC hasta alcanzar un volumen final de 20 µl. Y se incubaron a 37°C durante 30 minutos. Posteriormente, las muestras se purificaron. Para ello se añadió 1 ml de *Trizol* y 400 µl de cloroformo, mezclándose con la ayuda del vórtex. Después de centrifugar a velocidad máxima durante 10 min a 4°C se transfirió la fase acuosa a un nuevo tubo eppendorf. Se añadieron 300 µl de isopropanol, se mezcló con vórtex y se dejaron las muestras en hielo durante 20 min. A continuación se centrifugó a velocidad máxima durante 20 min a 4°C, y se retiró el sobrenadante. El precipitado se secó en una *speed vac*. Finalmente se resuspendió en 10 µl de agua tratada con DEPC dejando las muestras a 37°C durante 15 min. El RNA tratado con DNasa I y purificado se usó para sintetizar cDNA con el kit *SuperScript II Reverse Transcriptase* de Invitrogen, según el protocolo recomendado por la casa comercial. La síntesis de cDNA así como la eliminación del DNA genómico residual fueron comprobadas mediante PCR convencional.

13.2 Reacción de PCR a tiempo real

Las reacciones de PCR a tiempo real se llevaron a cabo en el modelo *ABI PRISM 7300* de *Applied Biosystem*. Y se usó el kit *Sensimix SYBR* de *Bioline* que contiene la DNA polimerasa SensiTaq, el fluorocromo *SYBR Green I* y dNTPs, además del fluorocromo de señal pasiva de referencia ROX. A 12,5 µl de esta mezcla de reacción se añadieron 5 µl de cada oligo de una solución 2,5 ó 5 µM, 5 µl de cDNA (tres diluciones decimales del cDNA sintetizado) y 6,5 µl de agua tratada con DEPC. Las distintas reacciones se distribuyeron sobre una placa de 96 pocillos libre de DNA, DNasa, RNasa e inhibidores de PCR de la casa comercial *4titude*. Las placas se sellaron con un precinto térmico adhesivo de *Bioline*.

Tras un primer paso de activación de la polimerasa, 10 min a 95°C, se llevaron a cabo 40 ciclos térmicos que consistieron en:

- Desnaturalización del DNA molde: 15 seg a 95°C.
- Anillamiento de los oligonucleótidos: 15 seg a una 60°C.
- Elongación del DNA: 15 seg a 72°C, al final de este paso el equipo lleva a cabo la adquisición de la emisión de fluorescencia.
- Etapa final de elongación: 7 minutos a 72°C.

Finalmente se somete a 95°C durante 30 minutos para obtener la curva de disociación.

En la tabla 6 se muestran los oligonucleótidos empleados en las reacciones de PCR a tiempo real. Los oligonucleótidos se diseñaron con un tamaño de entre 18 y 20 pb y para que amplificasen entre 150 y 200 pb del último tercio del gen. Es importante que el tamaño amplificado sea parecido en el gen problema y en el gen de referencia. Se diseñaron los oligonucleótidos cerca del extremo 3' del gen ya que se sintetiza el cDNA usando oligo (dT) como cebadores, por lo que es probable que algunas moléculas de cDNA esten incompletas en el extremo 5'.

Tabla 6. Oligonucleótidos empleados en las diferentes reacciones de PCR a tiempo real.

Gen	Oligonucleótido	Secuencia 5'-3'
<i>ACT1</i>	ACT1 (RT)-F	TTGGATTCTGGTGATGGTGT
	ACT1 (RT)-R	TGGACAAATGGTTGGTCAAG
<i>ALG7</i>	ALG7qf	GGTTTGATGCATCCCAGTTT
	ALG7qr	GTTTGGAACCCCTTTCCACT
<i>ALG13</i>	ALG13qf	CAAGGATAGTAGGTTTTGGAATCA
	ALG13qr	TTCTCACAAATTATCGTTTCAA
<i>ALG14</i>	ALG14qf	GTTCCCGTGGCATAACATTTT
	ALG14qr	CCACTGAGACTCAACTTGTTCAC
<i>ALG1</i>	ALG1qf	GCTGTGGCGTACCTGTTGTA
	ALG1qr	CGAGCCACTTCCTTTGTTTG
<i>ALG2</i>	ALG2qf	TTGAGGCAATGTTAGCCAAA
	ALG2qr	CCAGTTGCTTCATCGAGATT
<i>ALG3</i>	ALG3qf	TGCCTTGCCAATTTGGTTTG
	ALG3qr	TCCACCAAGTTGCACCAATAATC
<i>ALG12</i> (<i>ECM39</i>)	ALG12qf	CAATTACCCAGGCGGT
	ALG12qr	TCATACACGCTGGAACATCC
<i>ALG9</i>	ALG9qf	TCCAATAAATGTGTGCATGGGG
	ALG9qr	AAGCCATCAAAGCCACTGTC
<i>ALG11</i>	ALG11qf	ATCCCCATTGTTTCATGCTTC
	ALG11qr	AATCCACCATCAGTTTTCCA
<i>ALG6</i>	ALG6qf	TCTTATCAGGTTTCATGAAAAATCA
	ALG6qr	AAATGTCCCCACCGTATTGA
<i>ALG8</i>	ALG8qf	CGATTIGTIGGTGCCCTTAC
	ALG8qr	CAGAGCAACTAATAAAGTCATGG
<i>ALG10</i> (<i>DIE2</i>)	ALG10qf	GGCATATCATTTTTCAAGTTTCC
	ALG10qr	TGGTGATGGAATCAATGTCAA
<i>ALG5</i>	ALG5qf	GGCAAGAAATTGATGGATCA
	ALG5qr	AATTCGTCCACATTCATCCA
<i>CCT8</i>	CCT8qf	TAGTCGTAAGAGGGGCAACC
	CCT8qr	GGCACCAGGCAATAATCTGT
<i>PGA62</i>	PGA62qf	CCAGCTCAAGAAACCACTCC
	PGA62qr	AGCAACTGGGACAGCGTTAG

13.3 Análisis cuantitativo de los resultados

Los niveles de expresión de un gen problema son normalizados a partir de la expresión de un gen de referencia, en nuestro caso el gen de la actina. Se tienen en cuenta las eficiencias de la PCR para el gen problema y el gen de referencia. Calculamos los niveles de expresión relativa considerando la eficiencia de amplificación para cada experimento. Este cálculo se lleva a cabo mediante diluciones seriadas en base 10. Construimos una gráfica Ct frente a log de la cantidad de cDNA cuya pendiente es la eficiencia de la amplificación. Los datos de Ct, tres por cada gen y por cada dilución, obtenidos fijando el mismo umbral o *threshold*, fueron exportados y se calculó la media aritmética y la desviación estándar en una hoja de Excel. Finalmente, con los datos de Ct obtenidos a partir de la media aritmética del triplicado (se aceptaron sólo los valores cuya desviación estándar entre triplicados estuviera por debajo de 0,3), y la eficiencia calculada para cada gen en cada experimento, el nivel relativo del transcrito (NRT) del gen problema frente a la expresión del gen de referencia se calculó mediante la ecuación:

$$\text{NRT} = E_{\text{gen de referencia}}^{\wedge \text{Ct}_{\text{gen de referencia}}} / E_{\text{gen problema}}^{\wedge \text{Ct}_{\text{gen problema}}}$$

14. COMPARACIÓN DE PERFILES DE TRANSCRIPCIÓN MEDIANTE MICROARRAYS DE cDNA

Los *microarrays* de expresión constituyen una herramienta que permite cuantificar de forma simultánea los niveles de expresión de miles de genes. Su funcionamiento consiste básicamente en medir la hibridación entre sondas específicas, adheridas sobre una superficie sólida, y sus moléculas diana. La monitorización se realiza generalmente mediante fluorescencia, que es captada y transformada en datos que indican niveles de expresión génica. En nuestro trabajo se han utilizado *microarrays* de dos canales, en los cuales se utilizan preparaciones de cDNA obtenido a partir de dos muestras distintas. En este caso, de dos cepas distintas de *C. albicans* creciendo bajo las mismas condiciones, o de la misma cepa sometida a dos tratamientos experimentales distintos. El cDNA de cada muestra se marca con un fluorocromo diferente y las dos muestras se hibridan sobre el mismo *microarray*. Se produce por tanto una hibridación competitiva, y puede compararse la hibridación para cada sonda entre ambas muestras de cDNA. De forma que se obtiene el nivel de expresión diferencial de cada gen entre dos condiciones experimentales, pero no pueden obtenerse niveles absolutos de expresión.

14.1 Características de los *microarrays* utilizados

Los *microarrays* de *C. albicans* utilizados fueron sintetizados por la empresa *Eurogentec* en colaboración con el consorcio europeo *Galar Fungail Group* (http://www.pasteur.fr/recherche/unites/Galar_Fungail/), al cual perteneció nuestro grupo de investigación. A partir de la secuencia completa de la cepa SC5314 de *C. albicans*, publicada por el *Stanford Genome Technology Center*, se diseñaron oligonucleótidos para amplificar una región específica de cada ORF, de entre 300 y 400 pb correspondientes a la región 3' de la ORF del gen (d'Enfert *et al.*, 2005). Las sondas, sintetizadas mediante PCR en dos pasos, presentan los extremos 5' modificados con grupos amino, lo que permitió su unión covalente al soporte de vidrio cubierto de grupos aldehído. En el *microarray* se encuentran por duplicado sondas correspondientes a los genes de *C. albicans*. Además, se han incluido controles que permiten detectar problemas de degradación RNA, contaminación con DNA genómico o diferencias debidas a una hibridación no uniforme. También se encuentran sondas que detectan los marcadores de selección kan, LEU2 o lacZ, y el gen que codifica la GFP, usados frecuentemente en estudios de biología molecular. Además de sondas que pueden ser utilizadas para la normalización de los datos, y 5 sondas de *S. cerevisiae* y 2 de *Homo sapiens*, para detectar hibridación cruzada. Al fijar las sondas sobre el *microarray*, con un robot *ChipWriterPro* de *ESI*, se generan 32 bloques formados por 416 puntos cada uno.

14.2 Aislamiento de RNA total

Se cultivaron células en 100 ml de YNB, en matraces de 500 ml, hasta alcanzar una $D.O_{600nm}$ de 1,7. Se recogieron las células y se llevó a cabo la purificación del RNA total según se explica en el apartado 11.1.3.

14.3 Síntesis de cDNA marcado y purificación

Para la síntesis de cDNA marcado con los fluorocromos cianina 3-dCTP o cianina 5-dCTP, a partir del RNA extraído, se lleva a cabo una reacción de retrotranscripción en la que se incorporan los nucleótidos marcados. Para ello usamos el kit de marcaje *CyScribe First Strand cDNA Labelling Kit*, (que contiene la transcriptasa reversa, la mezcla de nucleótidos, y los oligos dT) y los nucleótidos marcados con fluorocromo *Cy5-dCTP* y *Cy3-dCTP* de *GE Healthcare*, siguiendo el protocolo proporcionado por la casa comercial. Siguiendo este mismo protocolo se degradó el RNA, incubando con NaOH y HEPES sucesivamente. Para la purificación del cDNA obtenido se usó el kit de purificación

CyScribe GFX Purification Kit de *GE Healthcare*, siguiendo las indicaciones del fabricante. Finalmente, se cuantificó el cDNA sintetizado, la cantidad de fluorocromo incorporado y se calculó la frecuencia de incorporación de los oligonucleótidos marcados (FOI). Midiendo la absorbancia a distintas longitudes de onda, y usando las fórmulas que se indican a continuación:

$$D.O_{260nm} \times 37 \times \text{volumen total } (\mu\text{l}) = \text{Cantidad de cDNA total (ng)}$$

$$D.O_{550nm} \times \text{volumen total } (\mu\text{l}) / 0,15 = \text{Cantidad de Cy3 incorporado (pmoles)}$$

$$D.O_{650nm} \times \text{volumen total } (\mu\text{l}) / 0,25 = \text{Cantidad de Cy5 incorporado (pmoles)}$$

$$\text{Cy3 ó Cy5 incorporado} \times 324,5 / \text{Cantidad de cDNA total (ng)} = \text{FOI}$$

14.4 Hibridación, lavado y escaneado de los *microarrays*

Se tomaron muestras de las dos sondas requeridas en cada experimento correspondiente a 50 pmoles de fluorocromo incorporado, y se concentraron utilizando los filtros *Microcon Centrifugal Filtration Units* de *Millipore*. Se mezclaron ambas sondas junto con 5 μl de DNA de esperma de salmón (*SIGMA*) previamente desnaturalizado, y se llevó a un volumen de 50 μl en tampón de hibridación *Dig Easy Hybridization buffer* de *Roche*. Se desnaturalizó la muestra por calor manteniéndola durante 2 minutos a 95°C y enfriándola en hielo durante otros 2 minutos. Se colocó un cubreobjetos *LifterSlip* de *Erie Scientific Company* sobre el *microarray*, asegurándonos de cubrir toda la zona donde se encuentran impresas las sondas. Y la muestra se depositó con una pipeta en uno de los bordes entre el cubreobjetos y el *microarray*, y fue difundiendo a lo largo del espacio entre estos elementos. Se controló que no se formasen burbujas. Se colocó en una cámara de hibridación *Corning*, y se sumergió en un baño a 42°C, asegurando que estuviese nivelado. Tras 12 horas de incubación, se retiró el cubreobjetos y se lavó en primer lugar con SSC 2x/SDS 1%, y a continuación, con SSC 2x. Todos los lavados se hicieron a temperatura ambiente, con agitación ocasional y en tubos falcon protegidos de la luz. El *microarray* se secó mediante centrifugación a 1000 rpm durante 5 minutos a 25°C. Finalmente, se llevó a cabo una lectura de la emisión de luz de cada uno de los fluorocromos del *microarray*. La adquisición de las imágenes correspondientes se realizó por el *Servicio de Genómica* del *Centro de Investigación del Cáncer* de Salamanca, con el escáner *GenePix4000B* y el programa asociado al mismo *GenePix Pro 6.0* de *Axon Instruments Inc*.

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, y cada gen se encuentra depositado por duplicado en cada uno de ellos, por lo que para la mayoría de genes se obtuvieron 6 datos. En total se analizaron 9 *microarrays*, tres hibridaciones para cada uno de los tres experimentos, los marcajes utilizados en cada caso y el número y lote que identifica a cada *microarray* se indican en la tabla 7.

Tabla 7. Marcajes utilizados en cada hibridación, e identificación de los 9 *microarrays* utilizados.

<i>Caalg9Δ vs CAI4</i> Crecimiento exponencial, 28°C	Cy3	Cy5
1. <i>Microarray</i> n° 33 lote B200H	<i>Caalg9Δ</i> Clon I	CAI4
2. <i>Microarray</i> n° 35 lote B200H	CAI4	<i>Caalg9Δ</i> Clon I
3. <i>Microarray</i> n° 44 lote K060H	CAI4	<i>Caalg9Δ</i> Clon II
<i>Caalg5Δ vs CAI4</i> Crecimiento exponencial, 28°C	Cy3	Cy5
1. <i>Microarray</i> n° 05 lote K060H	<i>Caalg5Δ</i> Clon I	CAI4
2. <i>Microarray</i> n° 06 lote K060H	CAI4	<i>Caalg5Δ</i> Clon I
3. <i>Microarray</i> n° 07 lote K060H	CAI4	<i>Caalg5Δ</i> Clon II
Tunicamicina <i>vs</i> DMSO Crecimiento exponencial, 28°C	Cy3	Cy5
1. <i>Microarray</i> n° 12 lote K060H	CAI4 Tm II	CAI4 DMSO
2. <i>Microarray</i> n° 13 lote K060H	CAI4 DMSO	CAI4 Tm I
3. <i>Microarray</i> n° 14 lote K060H	CAI4 DMSO	CAI4 Tm II

14.5 Análisis de los datos obtenidos

El programa informático *GenePix Pro 6.0* asignó a cada punto del *microarray* el gen correspondiente, según el diseño del *microarray*. Se inspeccionó visualmente la imagen etiquetando aquellos puntos que no tenían señal o era de baja calidad. Finalmente, se obtuvo una tabla con los valores de cada fluorocromo de cada punto del *microarray*, y el gen al que correspondía. Además de un informe sobre la calidad de los datos obtenidos.

A continuación, se utilizó el programa *GeneSpring 5.0* de *Agilent Technologies*, para normalizar, integrar, realizar análisis de significación estadística y comparar los datos de diferentes *microarrays*. A partir de las tabla de resultados facilitadas por el *GenePix Pro 6.0*, se importó en *GeneSpring 5.0* la columna de datos correspondiente a la mediana de los valores de intensidad de cada uno de los fluorocromos en cada punto, y la mediana de los valores de intensidad del fondo de cada uno de ellos. 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 según la inspección previa. Los datos se sometieron a una normalización por punto y por *microarray* dependiente de intensidad aplicada a cada uno de los bloques. Esta normalización permite comparar los datos de los diferentes genes, tanto si proceden del mismo como de diferentes *microarrays*, y al ser dependiente de intensidad, corrige las variaciones no significativas que dependen del nivel de expresión de cada gen. Esta corrección es necesaria ya que se sabe 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, las variaciones que no son significativas para genes que se expresan a bajos niveles, podrían sí serlo en genes con un alto nivel de expresión. Como la normalización se ha aplicado a cada uno de los bloques del *microarray*, ésta permite corregir variaciones debidas a defectos en la uniformidad del *microarray*. Se usó el test estadístico de comparación de grupos *Wilcoxon-Mann-Whitney* y la corrección para test múltiples *Benjamín and Hochberg FDR*, con un valor de $p \leq 0,02$, con el fin de detectar genes que se expresan de forma diferencial en el mutante en las condiciones analizadas. 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 1,5 en al menos una hibridación. Entre los genes seleccionados por el test se consideraron para análisis posteriores solamente aquellos que presentaran un factor de expresión diferencial mutante o condición *vs* control $\geq 1,5$, considerando la media de los 3 replicados. Los genes obtenidos se separaron en genes sobreexpresados y subexpresados en el mutante o condición respecto al control.

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/>).

Resultados



Discusión



C. albicans es un patógeno humano oportunista, en organismos sanos es un comensal inocuo que se encuentra en la cavidad oral y tractos digestivo y genital. Para evitar que se desencadene una candidiasis es fundamental conocer las características que facilitan su transición desde un microorganismo comensal a un agresivo patógeno. Durante el curso de la infección, *C. albicans* se encuentra con diferentes ambientes dentro del hospedador y debe adaptarse rápidamente para asegurar el crecimiento y la supervivencia. Además debe ser capaz de sobrellevar alteraciones que ocurren en los nichos donde se ha establecido durante la permanencia a largo plazo en el huésped. Por ello es fundamental el conocimiento de las rutas metabólicas, cambios transcripcionales y genómicos que aportan a *C. albicans* gran plasticidad y permiten a este microorganismo adaptarse con éxito a los grandes cambios que se producen dentro del huésped. Por otro lado, la parte más externa de la célula de este patógeno oportunista, su pared celular, está expuesta de forma continuada al ataque de antifúngicos y enzimas del huésped, por lo que ha necesitado desarrollar mecanismos de resistencia que le permiten la supervivencia en ambientes muy diversos. El profundizar en los mecanismos adaptativos frente a situaciones de estrés no sólo llevará a un mejor entendimiento de la biología de este patógeno de mayor incidencia en humanos, sino que también permitirá desarrollar nuevos antifúngicos.

Las proteínas N-glicosiladas se encuentran formando parte de las estructuras más externas de la célula y juegan papeles importantes en el mantenimiento de la integridad celular y en procesos de interacción con el huésped. Con objeto de entender las respuestas del patógeno frente alteraciones en el proceso de la biosíntesis de las N-glicoproteínas, en el presente trabajo nos hemos propuesto investigar los cambios, tanto a nivel fenotípico como transcripcional, que sufre *C. albicans* cuando se le delecionan los genes *ALG5* y *ALG9*, los cuales intervienen en los primeros pasos de este proceso. En *S. cerevisiae* *ALG5* codifica para una UDP-glucosa: dolicol-fosfato glucosiltransferasa que cataliza la transferencia de glucosa desde UDP-Glc a dolicol fosfato (Heesen *et al*, 1994). *ALG9* codifica para una manosiltransferasa requerida para la adición de dos residuos de manosa al núcleo oligosacárido en formación (Burda *et al*, 1996; Cipollo & Trimble, 2000). Está descrito que ambos pasos son importantes para el control del plegamiento proteico que tiene lugar en el lumen del RE, lo que sugiere que estos mutantes podrían tener defectos en el control del procesamiento y salida de las N-glicoproteínas del RE (Stigliano *et al*, 2011; Tannous *et al*, 2014). Es importante destacar que en *C. albicans* se han aislado algunos genes que intervienen en la N-glicosilación de proteínas (Hall & Gow, 2013), pero no se ha

caracterizado aún ninguno de los genes que participan en las síntesis del núcleo oligosacárido (genes *ALG*).

Hemos caracterizado los genes *ALG5* y *ALG9* de *C. albicans*. Las proteínas Alg5 y Alg9 que codifican presentan una identidad del 53% y 38%, respectivamente, con sus ortólogas de *S. cerevisiae*. Hemos demostrado que los mutantes *alg5Δ* y *alg9Δ* no muestran defectos en la morfología levaduriforme (apartado 5.1.2 de “Resultados”). En *S. cerevisiae* se ha descrito que las células del mutante *Scalg5Δ* son más redondeadas en comparación con las del tipo silvestre (Ni & Snyder, 2001). La cepa mutante *alg9Δ* de *C. albicans* que hemos construido presenta defectos en el crecimiento, tiene una tasa de crecimiento ligeramente menor a 28°C y 37°C, y apenas crece a 42°C. Como se indicará más adelante, durante el desarrollo de las investigaciones de este trabajo, la caracterización de la misma nos ha llevado a la conclusión de que además de la delección de las dos copias del gen *ALG9* presenta otras alteraciones en su genoma. La tasa de crecimiento a 28°C, 37°C y 42°C en el mutante *alg5Δ* es igual a la de la cepa parental CAI4 (apartado 5.1.1 de “Resultados”). En *S. cerevisiae* los mutantes *Scalg5Δ* y *Scalg9Δ* no presentan defectos en la velocidad de crecimiento (Huffaker & Robbins, 1983; Burda *et al*, 1996).

Hemos observado que las células del mutante *alg9Δ* cuando crecen en medio líquido forman agregados celulares y sedimentan (apartado 5.1.3 de “Resultados”). A este fenómeno se le conoce como floculación. Además, los mutantes *alg5Δ* y *alg9Δ* muestran un fenotipo de hiperinvasividad y adherencia a superficies de agar (apartado 5.1.3 de “Resultados”). La invasividad celular, al igual que la floculación, está relacionado con la adhesión celular. Las células de *C. albicans* poseen la capacidad de adhesión gracias a la presencia de unas proteínas de pared celular denominadas adhesinas, las cuales están codificadas por los genes *ALS*. Hemos puesto de manifiesto mediante el análisis de la expresión global de genes, que ambos mutantes sobreexpresan los genes *ALS2* y *ALS4* y el mutante *alg9Δ* también sobreexpresa *ALS1* y *ALS3* (apartado 8.1.3.3 de “Resultados”). En *C. albicans*, la delección de los genes *ALS1*, *ALS2*, *ALS3* y *ALS4* disminuye la adherencia, (Fu *et al*, 2002; Zhao *et al*, 2004, 2005). La sobreexpresión de estos genes explicaría, por lo tanto, el fenotipo de hiperinvasividad y adherencia a superficies abióticas de agar que muestran los mutantes *alg5Δ* y *alg9Δ*. También está documentado que la sobreexpresión de Als1p induce la floculación en *C. albicans* (Fu *et al*, 2002). De forma que el fenotipo de floculación que hemos observado en el mutante *alg9Δ* puede explicarse por la sobreexpresión del gen *ALS1*. Por otro lado, se ha demostrado que los genes *ALS2*,

ALS3, *ALS4* y *ALS5* se encuentran sobreexpresados cuando se induce la respuesta a proteínas mal plegadas (*Unfolded Protein Response*, UPR) en *C. albicans* (Wimalasena *et al*, 2008).

C. albicans es un organismo polimórfico, puede presentar distintas morfologías: levadura, hifa, pseudohifa y clamidosporas. Es capaz de cambiar de una morfología a otra mediante un proceso morfogenético directamente relacionado con las condiciones ambientales, y regulado por patrones de expresión génica. Se ha descrito que la interrupción de algunos genes relacionados con glicosilación en *C. albicans* origina defectos en morfogénesis (Hall & Gow, 2013). En este trabajo hemos demostrado que los mutantes *alg5Δ* y *alg9Δ* son capaces de llevar a cabo la transición levadura-hifa bajo condiciones de inducción: cambio de temperatura, suero, N-acetilglucosamina, hipoxia y baja concentración de nutrientes (apartados 5.2.1 y 5.2.2 de “Resultados”), y forman clamidosporas cuando se induce su formación (apartado 5.2.3 de “Resultados”). Hemos demostrado también que el mutante *alg9Δ* hiperfilamenta en medio *Embedded*. En este medio las células crecen embebidas en agar y la baja concentración de oxígeno es el factor que induce la filamentación (Ernst, 2000). Al cultivar las distintas cepas en condiciones de hipoxia, hemos observado que el mutante *alg9Δ* forma filamentos, en cambio, tanto la cepa parental CAI4 como el mutante *alg5Δ* forman colonias lisas (apartado 5.2.1 de “Resultados”). Aunque está descrito que bajo condiciones de hipoxia se induce la filamentación en *C. albicans* (Mulhern *et al*, 2006), probablemente la concentración de oxígeno no fue lo suficientemente baja como para inducir la filamentación en la cepa parental, aunque sí en el mutante *alg9Δ*. De forma que podemos concluir que el mutante *alg9Δ* hiperfilamenta en condiciones de hipoxia.

El mutante *alg9Δ* es más sensible a itraconazol en comparación con la cepa parental CAI4 (apartado 5.3.1 de “Resultados”). El modo de acción del itraconazol, al igual que el resto de antifúngicos de la familia de los azoles, se basa en la inhibición de la enzima lanosterol 14- α -dimetilasa codificada por el gen *ERG11*, que interviene en la ruta de biosíntesis del ergosterol. De esta forma, la exposición de los hongos a compuestos azólicos causa la inhibición de la síntesis de ergosterol, y como consecuencia se altera la membrana citoplasmática lo cual lleva a la pérdida de viabilidad celular. De manera que la causa de que algunos mutantes sean más susceptibles a tratamientos con azoles es que tienen alterada la ruta de biosíntesis de ergosterol. Los experimentos de expresión diferencial de genes que hemos realizado indican que en el mutante *alg9Δ* se sobreexpresan

varios de los genes de la ruta de biosíntesis del ergosterol: *ERG10*, *ERG11*, *ERG24*, *ERG21*, *ERG5* y *UPC2*. Por el contrario, en el mutante *alg5* Δ varios de los genes de esta ruta están sobreexpresados: *ERG251*, *ERG26*, *ERG5* y *UPC2* (apartado 8.1.3.2 de “Resultados”). La subexpresión de *ERG11*, que codifica para la diana específica de los azoles, en el mutante *alg9* Δ puede ser la causa de su mayor sensibilidad al itraconazol, ya que al haber menor cantidad de esta enzima se requiere una menor concentración del agente para inhibirla.

Los mutantes de glicosilación de *C. albicans*, aislados y caracterizados hasta el momento, están afectados en el proceso de la N-glicosilación a nivel del aparato de Golgi o en la O-glicosilación, a excepción de tres de ellos que intervienen en la eliminación de glucosas o manosas en RE. Se ha observado que estos mutantes presentan un fenotipo de sensibilidad incrementada a calcofluor white, rojo congo y cafeína, agentes que interfieren con la biosíntesis de la pared celular (Bates *et al*, 2005, 2006; Mora-Montes *et al*, 2007). Nosotros hemos puesto de manifiesto que los mutantes *alg5* Δ y *alg9* Δ son más resistentes a estos agentes (apartado 5.3.2 de “Resultados”). La resistencia a estos compuestos observada en otros mutantes de *S. cerevisiae* se ha relacionado con alteraciones en los componentes u organización de la pared celular (Ram *et al*, 1994). Por lo tanto, los fenotipos observados por nosotros de resistencia de los mutantes *alg5* Δ y *alg9* Δ de *C. albicans* parecen indicar que presentan alteraciones en la pared celular. Otra causa podría ser el que tengan activadas rutas de estrés y por ello estén mejor preparados para sobrevivir frente a estos agentes que la cepa parental. Es de resaltar que el mutante *alg9* Δ de *S. cerevisiae* es hipersensible a cafeína pero también más resistente a calcofluor white (Lussier *et al*, 1997).

Hemos demostrado que los genes *ALG5* y *ALG9* están implicados en el proceso de N-glicosilación de proteínas en *C. albicans*. Para ello, hemos introducido el gen *SUC2* de *S. cerevisiae*, que codifica la proteína N-glicosilada invertasa, en la cepa parental y en cada uno de los mutantes. La expresión heteróloga del gen *ScSUC2* en *C. albicans* da lugar a una invertasa cuyo núcleo oligosacárido no presenta las cadenas externas típicas de las N-glicoproteínas sintetizadas por el paso por el aparato de Golgi, por lo que nos ha permitido analizar, mediante *immunoblotting* si existen diferencias entre los núcleos oligosacáridos sintetizados por la cepa parental y los mutantes. Observamos que tanto el mutante *alg5* Δ como *alg9* Δ glicosilan de forma deficiente esta glicoproteína. Ambos mutantes sintetizan una invertasa de menor tamaño en comparación a la que sintetiza la cepa parental CAI4. La

invertasa sintetizada por el mutante *alg5* Δ es de menor tamaño que la sintetizada por el mutante *alg9* Δ (apartado 6.2 de “Resultados”). Estos resultados indican que las proteínas Alg5p y Alg9p de *C. albicans*, como ocurre con las proteínas homólogas en otros organismos, intervienen en la síntesis del núcleo oligosacárido, y que el núcleo oligosacárido del mutante *alg5* Δ está más expuesto que el sintetizado por el del mutante *alg9* Δ a la acción de eliminación de manosas que ocurre durante el proceso de control de calidad que tiene lugar en el interior del RE para facilitar el correcto plegamiento de proteínas.

Hemos analizado los niveles de expresión de los genes *ALG5* y *ALG9* en la cepa CAI4 durante el crecimiento levaduriforme y al inducir la filamentación (apartado 2 de “Resultados”). La transcripción del gen *ALG9* se encuentra regulada durante el proceso de transición levadura-hifa. Su expresión aumenta a los 15 minutos y 1 hora de iniciarse la inducción de la filamentación, y a las tres horas el nivel del transcrito desciende hasta alcanzar un nivel similar al que presenta durante el crecimiento levaduriforme. En cambio, los niveles del transcrito del gen *ALG5* se mantienen constantes durante la transición levadura-hifa.

El estudio de la regulación transcripcional de los genes *ALG* en los mutantes *alg5* Δ y *alg9* Δ nos ha permitido profundizar en la regulación génica de la ruta de biosíntesis y procesamiento del núcleo oligosacárido en el RE. Mediante experimentos de PCR cuantitativa hemos detectado la sobreexpresión del gen *ALG3* de forma muy significativa tanto en el mutante *alg5* Δ como en *alg9* Δ (apartado 8.2 de “Resultados”). El hecho de que la expresión de este gen esté regulada en ambos mutantes, sugiere que debe de ser un punto importante en la regulación a nivel transcripcional de los primeros pasos de la N-glicosilación. La enzima Alg3p une la primera manosa en el interior del RE (Aebi *et al*, 1996). En *S. cerevisiae*, se ha descrito el papel regulatorio del paso catalizado por Alg3p, ya que la presencia de la manosa que adiciona esta enzima proporciona información estructural que potencia la posterior adición de glucosas al núcleo oligosacárido por enzimas que transfieren glucosas a partir del Dol-P-Glc, y por tanto requieren de la actividad de Alg5p (Cipollo & Trimble, 2000). Por lo tanto la sobreexpresión de *ALG3* en el mutante *alg5* Δ podría deberse a un mecanismo compensatorio para potenciar la adición de glucosas al núcleo oligosacárido.

Mediante PCR cuantitativa hemos detectado también que el mutante *alg5* Δ sobreexpresa el gen *ALG9* y el mutante *alg9* Δ sobreexpresa el gen *ALG5* (apartado 8.2 de

“Resultados”). Teniendo en cuenta que las glucosas del núcleo oligosacárido (cuya adición depende de la actividad de Alg5p), así como las últimas manosas (transferidas por Alg9p) desempeñan papeles importantes en la entrada al ciclo calnexina/calreticulina (Aebi *et al.*, 2010; Tannous *et al.*, 2014), podemos atribuir la sobreexpresión de *ALG5* en *alg9Δ* y de *ALG9* en *alg5Δ* a un efecto compensatorio para potenciar la entrada de los glicopéptidos en este ciclo y así facilitar el correcto plegamiento de los mismos.

Se ha descrito que algunos mutantes de glicosilación en *C. albicans* presentan defectos en virulencia (Hall & Gow, 2013). En el presente trabajo demostramos que el mutante *alg9Δ* es menos virulento que la cepa parental utilizando un modelo murino de infección sistémica (apartado 7 de “Resultados”). En cambio, a pesar de que, como acabamos de comentar, hemos demostrado que la ausencia de Alg5p en *C. albicans* conlleva alteraciones en el proceso de glicosilación de proteínas (apartado 6.2 de “Resultados”), el mutante *alg5Δ* no pierde su capacidad patogénica (apartado 7 de “Resultados”). Esta atenuación de la virulencia en el mutante *alg9Δ* puede deberse a que el sistema inmune del huésped sea capaz de reconocer la presencia de las células mutantes más fácilmente que las del tipo parental. Nosotros hemos puesto de manifiesto que la superficie externa de las células de este mutante es más hidrófoba que las de la cepa parental CAI4 (apartado 6.1 de “Resultados”) lo que indica que presenta una reducción y/o alteración de las manoproteínas de la pared celular que puede ser la causa de que haya una mayor exposición de antígenos importantes para el reconocimiento del sistema inmune, como son la quitina y los glucanos. (Hall & Gow, 2013). La superficie de las células de *alg5Δ* es más parecida respecto a la hidrofobicidad a la de la cepa parental, por lo que al igual que ocurre en esta última, el enmascaramiento de estos antígenos de superficie parece protegerle del sistema inmune. Por otra parte, el hecho de que el mutante *alg9Δ* tenga un crecimiento más lento a 37°C (apartado 5.1.1 de “Resultados”) también podría afectar a su capacidad patógena.

Los análisis de expresión global de genes indican que los mutantes sufren estrés en RE, ya que encontramos un número significativo de genes desregulados que codifican proteínas implicadas en la degradación de proteínas mal plegadas del retículo endoplásmico (figura 70) (apartado 8.1.3.1 de “Resultados”). La sobreexpresión de estos genes es más significativa en el mutante *alg9Δ*, ya que en el análisis de categorías enriquecidas estadísticamente en este mutante la degradación proteosomal de proteínas es una de las categorías funcionales que encontramos sobrerrepresentada de forma muy significativa (apartado 8.1.1 de “Resultados”). El mecanismo de eliminación de las proteínas mal

plegadas, el cual depende del sistema ubiquitina-proteosoma, forma parte de la *ERAD* (*Endoplasmic Reticulum Associated Degradación*) (Xie & Ng, 2010).

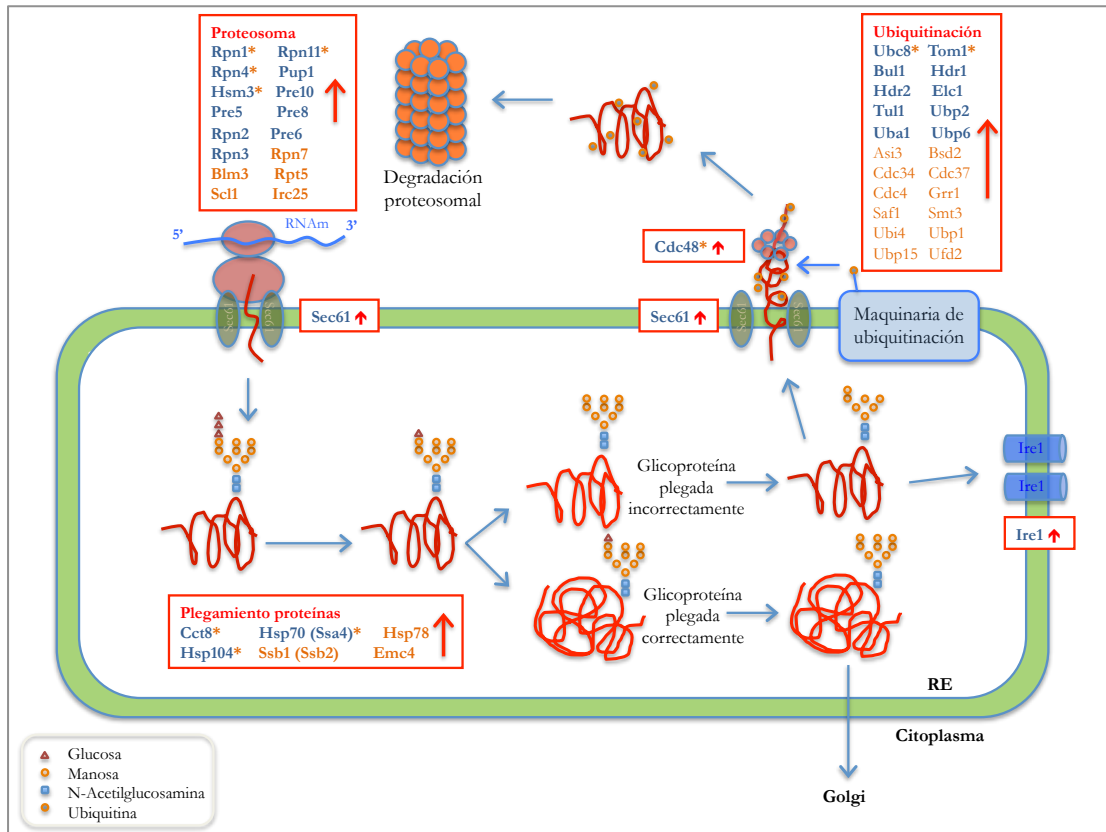


Figura 70. Proteínas codificadas por los genes sobreexpresados en el mutante *alg5Δ* (marcadas en naranja) y/o *alg9Δ* (marcadas en azul) implicadas en el plegamiento de proteínas en el RE y en la degradación proteosómica de proteínas mal plegadas. El asterisco indica las proteínas codificadas por genes sobreexpresados en ambos mutantes.

Los componentes de la *ERAD* se sobreexpresan cuando se activa *UPR* (Bernal *et al*, 2006), por lo que los mutantes podrían tener activada esta respuesta. Está descrito que la *UPR* se inicia con el *splicing* o procesamiento del transcrito del factor de transcripción *HAC1*, lo que desencadena la activación de genes que codifican diversas proteínas implicadas en el plegamiento de proteínas, así como de genes implicados en la degradación asociada a RE (Travers *et al*, 2000). Hemos analizado el transcrito de *HAC1* en los mutantes y en la cepa parental, en las mismas condiciones de crecimiento utilizadas en los *microarrays* de expresión, y no hemos detectado el procesamiento de *HAC1* en ninguna de las cepas. En cambio sí se produce el procesamiento tanto en los mutantes como en la cepa parental bajo tratamiento con tunicamicina, que está descrito que induce estrés en RE

(apartado 9.1 de “Resultados”). Este resultado pone de manifiesto que en estos mutantes, durante el crecimiento exponencial, la activación de la expresión de genes implicados en la degradación proteosomal de proteínas asociada a RE, no está mantenida por el procesamiento del transcrito de *HAC1*, como sucede cuando ocurre un estímulo de estrés puntual (como el tratamiento con agentes que perturban el RE como tunicamicina o DTT).

Hemos comparado el transcriptoma de los mutantes *alg5Δ* y *alg9Δ* con los 79 genes que está descrito que se sobreexpresan durante la inducción de la UPR en *C. albicans* (Wimalasena *et al*, 2008), y hemos encontrado únicamente 5 genes en común con el transcriptoma de *alg5Δ* y 7 con el transcriptoma de *alg9Δ* (apartado 8.1.3.1 de “Resultados”). De manera que, a pesar de que en los mutantes *alg5Δ* y *alg9Δ* se sobreexpresan genes de la *ERAD*, lo cual está descrito que sucede también cuando se activa la UPR, no se sobreexpresan en estos mutantes la mayoría de los genes que han sido descritos como dianas específicas de la UPR, ni se dispara el mecanismo canónico de activación de la misma mediante inductores químicos como la tunicamicina o el DTT. En *S. cerevisiae*, parece importante la UPR en la adaptación a defectos en glicosilación puesto que ha puesto de manifiesto que los genes *ALG5* y *ALG9* muestran letalidad sintética con los genes reguladores de la UPR, *IRE1* y *HAC1* (Costanzo *et al*, 2010). Se ha sugerido que el mecanismo de señalización Ire1p-Hac1p actúa en casos en los que se requiera una rápida activación de la UPR (por ejemplo bajo tratamiento con inductores químicos). En el caso de algunos mutantes que sufren estrés en RE de forma crónica, la activación de la UPR consigue recuperar la homeostasis celular mediante una regulación transcripcional específica que se mantiene durante generaciones (Thibault *et al*, 2011). Parece ser que el programa transcripcional activado por la UPR no es único, sino que puede ser modelado según las necesidades de la célula. Está por descubrir qué mecanismos moleculares utiliza ésta para regular la UPR en función de las necesidades de cada mutante.

En mamíferos, además del mecanismo de activación de la UPR desencadenado por Ire1 y Xbp1 (homólogo de Hac1), existen al menos dos sensores de RE más, que actúan en paralelo: Atf6 y Perk, aunque no se han encontrado ortólogos de los genes que los codifican en levaduras (Bernaes *et al*, 2006). Perk regula al activador transcripcional *ATF1* el cual contribuye a la UPR en colaboración con *XBP1* y es ortólogo a *GCN4* de levaduras (Harding *et al*, 2000a). Se ha demostrado que en levaduras Gcn4p, y su activador Gcn2p, desempeñan papeles importantes en la activación de genes de la UPR. La regulación de los niveles de Gcn4p puede suponer un mecanismo para modular la UPR (Patil *et al*, 2004), ya

que se requiere para la inducción de la expresión de la mayoría de genes implicados en la misma. Hemos demostrado que en el mutante *alg9Δ* se encuentra sobreexpresado el gen *GCN2*, y también que los mutantes *alg5Δ* y *alg9Δ* presentan un número significativo de genes desregulados que codifican proteínas implicadas en la síntesis de aminoácidos y en la unión de aminoácidos a tRNA (apartado 8.1.3.4 de “Resultados”). La sobreexpresión genes que codifican para proteínas implicadas en la síntesis de aminoácidos es característica de la respuesta a la carencia de aminoácidos (*Amino Acid Starvation Response*) mediada por Gcn4p (Tripathi *et al*, 2002). Proponemos que el factor de transcripción Gcn4p podría desempeñar un papel importante en la adaptación a estrés en los mutantes *alg5Δ* y *alg9Δ* mediando la activación de genes de la *ERAD*.

Tanto en los mutantes *alg5Δ* y *alg9Δ*, como en las células tratadas con tunicamicina, encontramos subexpresados un número significativo de genes que codifican ribosomas y proteínas implicadas en la síntesis de ribosomas (apartado 8.1.3.3 de “Resultados”). Se ha descrito que la represión de la transcripción de genes que codifican proteínas ribosómicas es una característica general de la respuesta a estrés en levaduras. Esta respuesta se conoce como *Environmental Stress Response (ESR)* (Gasch *et al*, 2000). Nuestros resultados sugieren que a pesar de que los mutantes *alg5Δ* y *alg9Δ* no presentan fenotipos muy acusados, están sometidos a un estrés celular como consecuencia de la falta de Alg5p y Alg9p, respectivamente. De nuevo se pone de manifiesto que en los mutantes *alg5Δ* y *alg9Δ* podrían estar actuando rutas de respuesta a estrés que permitirían sobrellevar el defecto en glicosilación de proteínas y mantener la homeostasis celular.

Con objeto de conocer si la ruta MAPK HOG estaba activada en estos mutantes, analizamos mediante *Western-blot* el estado de fosforilación del factor de transcripción Hog1p. Nuestros resultados indican que el mutante *alg9Δ* presenta fosforilada la proteína Hog1p de forma constitutiva (apartado 9.2 de “Resultados”). En *S. cerevisiae*, el tratamiento con agentes que perturban el retículo endoplásmico, como el DTT o la tunicamicina, desencadena la activación de la ruta HOG (*High Osmolarity Glycerol*) a través de la rama de Sln1 (Bicknell *et al*, 2010; Torres-Quiroz *et al*, 2010; García-Marqués *et al*, 2015). Se ha sugerido que Hog1p podría desempeñar un papel importante en la respuesta a estrés en RE a largo plazo, ya que la cinética de su activación está retrasada con respecto a la activación de la *UPR*. Además, en los mutantes *hog1Δ* de *S. cerevisiae* la activación de la *UPR* se mantiene durante más tiempo que en el tipo silvestre, lo que sugiere que Hog1 podría estar implicada en la recuperación de la homeostasis después de sufrir un estrés en el RE

(Bicknell *et al*, 2010). Proponemos que en el mutante *alg9Δ* la activación de Hog1p tiene lugar como respuesta al estrés en RE, y supone una respuesta a largo plazo ya que el estrés en RE que sufre el mutante no es puntual sino que permanece a lo largo del tiempo.

La localización en los cromosomas de los genes subexpresados y sobreexpresados en el mutante *alg9Δ vs* CAI4 detectados mediante *microarrays* de expresión, muestra una distribución sesgada. Principalmente encontramos que en el cromosoma 5 del mutante *alg9Δ* la mayor parte de los genes están subexpresados, lo que sugiere que el mutante podía haber perdido una copia del cromosoma 5. Mediante el análisis de dos *SNP-RFLPs* (*Single nucleotide polymorphisms-restriction fragment length polymorphisms*) localizados en el brazo izquierdo y derecho del cromosoma 5, hemos estudiado la presencia o ausencia de sitios de restricción que dependen de un polimorfismo, lo que nos ha permitido demostrar que el mutante *alg9Δ* ha perdido el homólogo “a” de dicho cromosoma. Verificamos que los dos clones transformantes obtenidos del primer paso del proceso de delección del gen *ALG9* presentaban también la pérdida del homólogo “a” del cromosoma 5 (apartados 9.3.1 y 9.3.4 de “Resultados”). Por lo tanto la aneuploidía se había adquirido en el momento de la delección del primer alelo. Estos resultados nos llevaron a relacionar la delección del gen *ALG9* con la adquisición de la aneuploidía. Repetimos de nuevo la transformación de la cepa parental con el cassette de delección para *ALG9* con objeto de analizar más transformantes. Se obtuvieron transformantes con una copia del gen *ALG9* interrumpida que no habían perdido una copia del cromosoma 5. A partir de uno de los clones Ura+ se seleccionaron los clones Ura- después de sembrar las células en placas de ácido fluoro-orótico (5'FOA), de dos clones analizados, uno de ellos había perdido el homólogo “a” del cromosoma 5. Hemos demostrado que sólo las cepas que han perdido una copia del cromosoma 5 muestran un fenotipo de retraso en el crecimiento. La complementación del mutante *alg9Δ* con el gen *ALG9* no restaura este fenotipo (apartado 9.3.3 de “Resultados”). Estos resultados ponen de manifiesto que este fenotipo está causado por la aneuploidía.

Al igual que ocurre en otras condiciones de estrés en *C. albicans* y en otras levaduras (Forche, 2014), la aneuploidía podría suponer para el mutante *alg9Δ* una ventaja adaptativa que permita a la célula sobrevivir más fácilmente ante condiciones adversas, en este caso las que conlleva la pérdida del gen *ALG9*. Proponemos que al deleccionarse el gen *ALG9* se incrementa la inestabilidad cromosómica y aparecen algunas células aneuploides. El estrés que causa la carencia de Alg9p puede suponer una presión selectiva para las células que facilita la supervivencia de aquellas que hayan perdido una copia del cromosoma 5. La

primera vez que se llevó a cabo el proceso de delección del gen *ALG9* los únicos dos clones que se comprobó que habían perdido una copia de dicho gen eran monosómicos para el cromosoma 5. Al repetirse el proceso de delección del primer alelo se obtuvieron varios clones que habían perdido un alelo del gen *ALG9* pero no habían perdido una copia del cromosoma 5. Sin embargo, después de cultivar las células de uno de estos transformantes en medio suplementado con 5'FOA, uno de los dos clones analizados había perdido dicho cromosoma. A pesar de que se ha seguido el mismo protocolo para la delección, estos resultados pueden explicarse teniendo en cuenta que pequeñas variaciones por ejemplo en la temperatura a la que se sometió a las células, pueden haber supuesto condiciones más hostiles para la célula favoreciendo un proceso de selección y el enriquecimiento en células monosómicas para el cromosoma 5 (ver esquema que proponemos de la figura 71).

En *C. albicans*, Janbon *et al.* (Janbon *et al.*, 1998) descubrieron que la adaptación a la utilización de L-sorbosa como fuente de carbono está mediada por la pérdida de uno de los homólogos del cromosoma 5, y que esta pérdida le confiere una ventaja adaptativa al aneuploide en condiciones de crecimiento en presencia de sorbosa (apartado 6.1 de “Introducción”). La sorbosa es tóxica para los hongos ya que interfiere con la síntesis de pared celular (Mishra & Tatum, 1972), y la monosomía para el cromosoma 5 induce una vía de regulación que da lugar a la remodelación de la estructura de la pared y membrana celulares, que conlleva variaciones en los niveles de quitina, 1,3 β -glucano y ergosterol (Yang *et al.*, 2013). El hecho de que se haya relacionado la pérdida de una copia del cromosoma 5 con la adaptación a estrés en pared y membrana celulares, invita a pensar que la monosomía para el cromosoma 5 del mutante *alg9* Δ puede facilitar su supervivencia frente al daño en pared celular causado por el defecto en la síntesis de N-glicoproteínas mediante la remodelación de la estructura de la pared celular.

Por otro lado, hemos demostrado que el mutante *alg9* Δ hiperfilamenta bajo condiciones de hipoxia y es más resistente a estrés oxidativo que la cepa parental (apartados 5.2.1 y 5.3.3 de “Resultados”). La adaptación a hipoxia y a estrés oxidativo se ha relacionado con la represión de los genes *ERG* y el descenso de los niveles de ergosterol en *C. albicans* (Synnott *et al.*, 2010; Montañés *et al.*, 2011). Se ha descrito que la pérdida de un homólogo del cromosoma 5 conlleva el descenso de los niveles de ergosterol (Yang *et al.*, 2013). Como ya se ha comentado, los experimentos con *microarrays* de expresión nos han permitido demostrar que en la cepa mutante *alg9* Δ construida, varios genes de la ruta de ergosterol se encuentran subexpresados (apartado 8.1.3.2 de “Resultados”). Por lo tanto, y

de acuerdo con las observaciones de otros autores, es posible que en esta cepa los bajos niveles de ergosterol debidos a la monosomía para el cromosoma 5, facilitan su adaptación a condiciones de hipoxia y frente al estrés oxidativo.

Los resultados obtenidos a partir de los *microarrays* de expresión muestran que el mutante *alg9Δ* sobreexpresa genes implicados en la ruta de degradación de proteínas por el proteosoma y subexpresa genes relacionados con ribosomas (apartados 8.1.3.1 y 8.1.3.3 de “Resultados”). Ambas alteraciones han sido relacionadas por otros autores con la respuesta a estrés en retículo endoplásmico (Travers *et al*, 2000; Wimalasena *et al*, 2008). Existen dos posibles escenarios que pueden explicar nuestros resultados. Por un lado, la delección de *ALG9* es probable que cause la acumulación de proteínas mal plegadas en el retículo endoplásmico, lo cual puede activar la UPR (*Unfolded Protein Response*) y como consecuencia se sobreexpresan genes implicados en la ERAD (*Endoplasmic Reticulum Associated Degradation*). Sin embargo, no hemos encontrado activada la UPR de forma canónica en el mutante *alg9Δ* (apartado 9.1 de “Resultados”). Una explicación alternativa es que la sobreexpresión de genes implicados en la ruta de degradación de proteínas por el proteosoma y la subexpresión de genes relacionados con ribosomas en el mutante *alg9Δ*, podría ser parte de una respuesta transcripcional común a la aneuploidía observada en este mutante. En células aneuploides se genera estrés proteotóxico, debido a que pueden existir desequilibrios en la estequiometría de algunos complejos proteicos, ya que las proteínas de estos complejos pueden estar codificadas en genes ubicados en alguno de los cromosomas afectados (Torres *et al*, 2007; Oromendía *et al*, 2012; Oromendía & Amon, 2014). Se ha descrito un patrón de expresión génica común en células de levaduras con aneuploidías (Torres *et al*, 2007): sobreexpresan genes relacionados con el plegamiento proteico y con la detoxificación de moléculas oxidativas, mientras que subexpresan genes relacionados con el procesamiento del RNA y ribosomas. También en humanos se ha identificado un patrón transcripcional característico en células aneuploides, denominado *Aneuploidy Response Pattern* (ARP) (Dürrbaum *et al*, 2014), que está definido por la sobreexpresión de genes relacionados con el retículo endoplásmico, el aparato de Golgi y los lisosomas; y la subexpresión de genes implicados en la replicación del DNA, transcripción y ribosomas.

Por otra parte, se ha relacionado la activación de la ruta HOG con la aneuploidía. Así, en *S. cerevisiae*, el tratamiento con hidroquinona induce la aparición de células aneuploides a la vez que se activa la ruta HOG. Se ha demostrado que existe una relación directa de la activación de Hog1p con la inestabilidad genética y la aneuploidía, ya que en el

mutante *bog1Δ* no se induce la aparición de aneuploidías cuando se trata con hidroquinona (Shiga *et al*, 2010). Todo esto sugiere que en *alg9Δ* el estímulo de estrés mantenido en RE debido a la acumulación de proteínas mal plegadas podría ser la causa de la activación de la ruta HOG, lo que llevaría a la inestabilidad genómica y a la aparición de células aneuploides. El estrés en pared celular que presentan las células de este mutante como consecuencia de los defectos en las glicoproteínas que sintetiza, podría propiciar la selección de cepas monosómicas para el cromosoma 5 como mecanismo de adaptación que le permitiera remodelar la organización de dicha pared celular (figura 71).

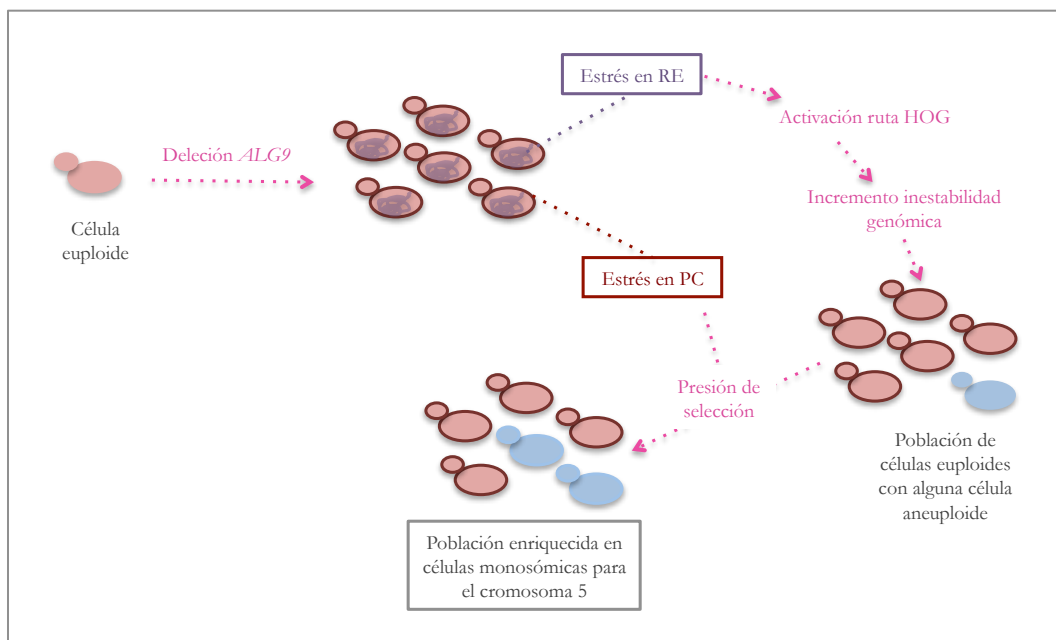


Figura 71. Esquema que representa el mecanismo propuesto que conduciría al enriquecimiento de células monosómicas para el cromosoma 5 al deletarse el gen *ALG9*. Se representan en rojo las células euploides y en azul las células aneuploides.

Conclusiones



1. Las proteínas Alg5 y Alg9 codificadas por los genes *ALG5* y *ALG9* de *C. albicans* presentan una identidad del 53% y 38%, respectivamente, con sus ortólogos de *S. cerevisiae*. Hemos demostrado que ambos genes están implicados en la N-glicosilación de proteínas en *C. albicans*, ya que los mutantes correspondientes glicosilan de forma deficiente la glicoproteína de referencia invertasa.

2. Hemos demostrado que la cepa mutante *alg9* Δ construida es menos virulenta que la cepa parental utilizando un modelo murino de infección sistémica. Las alteraciones en la pared celular que presenta esta cepa y/o el retraso en el crecimiento a altas temperaturas podrían ser la causa. En cambio, el mutante *alg5* Δ presenta una capacidad de virulencia similar a la cepa parental.

3. Los mutantes *alg5* Δ y *alg9* Δ sobreexpresan el gen *ALG3* de forma muy significativa, por lo que debe de ser un eslabón importante en la regulación a nivel transcripcional de los primeros pasos de la N-glicosilación. Por otro lado, proponemos que la sobreexpresión del gen *ALG9* en el mutante *alg5* Δ y la sobreexpresión del gen *ALG5* en el mutante *alg9* Δ supone un efecto compensatorio para potenciar el correcto plegamiento de los glicopéptidos.

4. El transcriptoma de los mutantes *alg5* Δ y *alg9* Δ refleja una situación de estrés en RE. Ambos mutantes sobreexpresan genes que codifican proteínas implicadas en la degradación proteosomal de proteínas mal plegadas del RE. No hemos detectado el procesamiento del transcrito de *HAC1* en ninguno de los mutantes, que es la vía canónica de activación de la respuesta a proteínas mal plegadas (*Unfolded Protein Response*, UPR). Concluimos que la activación de genes implicados en la degradación de proteínas asociada a RE (*Endoplasmic Reticulum Associated Degradation*, ERAD) tiene lugar en estos mutantes a través de rutas alternativas.

5. El mutante *alg9* Δ construido tiene fosforilada la proteína MAPK Hog1p de forma constitutiva. Sugerimos que la activación de la ruta HOG permite al mutante mantener una respuesta a largo plazo para aliviar el estrés en RE, y podría facilitar la aparición de aneuploidías.

6. La cepa mutante *alg9* Δ construida ha perdido el homólogo “a” del cromosoma 5. Hemos aislado 3 clones independientes que portan la delección del gen *ALG9* y han perdido este cromosoma. Por lo que proponemos que la delección del gen *ALG9* facilita la

adquisición de la monosomía en el cromosoma 5 como un mecanismo de adaptación que facilita al mutante *alg9* Δ sobrellevar el estrés en pared celular causado por el defecto en la síntesis de N-glicoproteínas.

Bibliografía



BIBLIOGRAFÍA

- Adhikari H & Cullen PJ (2014) Metabolic Respiration Induces AMPK- and Ire1p-Dependent Activation of the p38-Type HOG MAPK Pathway. *PLoS Genet.* **10**: e1004734
- Aebi M (2013) N-linked protein glycosylation in the ER. *Biochim. Biophys. Acta* **1813**: 2430–2437
- Aebi M, Bernasconi R, Clerc S & Molinari M (2010) N-glycan structures: recognition and processing in the ER. *Trends Biochem. Sci.* **35**: 74–82
- Aebi M, Gassenhuber J, Domdey H & Heesen S (1996) Cloning and characterization of the ALG3 gene of *Saccharomyces cerevisiae*. *Cloning* **6**: 439–444
- Alexander BD, Johnson MD, Pfeiffer CD, Jiménez-Ortigosa C, Catania J, Booker R, Castanheira M, Messer S a., Perlin DS & Pfaller M a. (2013) Increasing echinocandin resistance in *Candida glabrata*: Clinical failure correlates with presence of FKS mutations and elevated minimum inhibitory concentrations. *Clin. Infect. Dis.* **56**: 1724–1732
- 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* Role of the Mitogen-Activated Protein Kinase Hog1p in Morphogenesis and Virulence of *Candida albicans*. *J. Bacteriol.* **181**: 3058–3068
- Alonso-Monge R, Navarro-García F, Román E, Negredo AI, Eisman B, Nombela C & Pla J (2003) The Hog1 Mitogen-Activated Protein Kinase Is Essential in the Oxidative Stress Response and Chlamyospore Formation in *Candida albicans*. *Eukaryot. Cell*
- Andaluz E, Bellido A, Gómez-Raja J, Selmecki A, Bouchonville K, Calderone R, Berman J & Larriba G (2011) Rad52 function prevents chromosome loss and truncation in *Candida albicans*. *Mol. Microbiol.* **79**: 1462–1482
- Andaluz E, Gómez-Raja J, Hermosa B, Ciudad T, Rustchenko E, Calderone R & Larriba G (2007) Loss and fragmentation of chromosome 5 are major events linked to the adaptation of rad52- $\Delta\Delta$ strains of *Candida albicans* to sorbose. *Fungal Genet. Biol.* **44**: 789–798
- 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**: 1033–1049
- 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**: 1070–1077
- Bai C, Xu X, Chan F-Y, Raymond THL & Wang Y (2006) MNN5 Encodes an Iron-Regulated α -1, 2-Mannosyltransferase Important for Protein Glycosylation, Cell Wall Integrity, Morphogenesis, and Virulence in *Candida albicans*. *Eukaryot. Cell*
- Ballou CE (1990) Isolation, characterization, and properties of *Saccharomyces cerevisiae* mnn mutants with nonconditional protein glycosylation defects. *Methods Enzymol.* **185**: 440–470

- Bates S, Hughes HB, Munro CA, Thomas WPH, MacCallum DM, Bertram G, Atrih A, Ferguson MAJ, Brown AJP, Odds FC & Gow NAR (2006) Outer chain N-glycans are required for cell wall integrity and virulence of *Candida albicans*. *J. Biol. Chem.* **281**: 90–98
- Bates S, MacCallum DM, Bertram G, Munro CA, Hughes HB, Buurman ET, Brown AJP, Odds FC & Gow N a R (2005) *Candida albicans* Pmr1p, a secretory pathway P-type Ca²⁺/Mn²⁺-ATPase, is required for glycosylation and virulence. *J. Biol. Chem.* **280**: 23408–23415
- Beghini A, Ripamonti CB, Pierangela C, Pezzetti L, Doneda L, Cairoli R, Morra E & Larizza L (2000) Trisomy 4 Leading to Duplication of a Mutated KIT Allele in Acute Myeloid Leukemia with Mast Cell Involvement. *Cancer Genet. Cytogenet.* **119**: 26–31
- Bennett RJ & Johnson AD (2003) Completion of a parasexual cycle in *Candida albicans* by induced chromosome loss in tetraploid strains. *EMBO J.* **22**: 2505–2515
- Berman J (2010) When abnormality is beneficial. *Nature* **468**: 183–184
- Berman J & Hadany L (2012) Does stress induce (para)sex? Implications for *Candida albicans* evolution. *Trends Genet.* **28**: 197–203
- Bermejo C, Rodríguez E, García R, Rodríguez-Peña JM, Rodríguez de la Concepción ML, Rivas C, Arias P, Nombela C, Posas F & Arroyo J (2008) The Sequential Activation of the Yeast HOG and SLT2 Pathways Is Required for Cell Survival to Cell Wall Stress. *Mol. Biol. Cell* **19**: 1113–1124
- Bernales S, Papa FR & Walter P (2006) Intracellular signaling by the unfolded protein response. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **22**: 487–508
- Beroukhi R, Mermel CH, Porter D, Wei G, Raychaudhuri S, Donovan J, Barretina J, Boehm JS, Dobson J, Urashima M, Mc Henry KT, Pinchback RM, Ligon AH, Cho Y-J, Haery L, Greulich H, Reich M, Winckler W, Lawrence MS, Weir B a, et al (2010) The landscape of somatic copy-number alteration across human cancers. *Nature* **463**: 899–905
- Bianchi A B, Aldaz CM & Conti CJ (1990) Nonrandom duplication of the chromosome bearing a mutated Ha-ras-1 allele in mouse skin tumors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **87**: 6902–6906
- Bickel T, Lehle L, Schwarz M, Aebi M & Jakob C A (2005) Biosynthesis of lipid-linked oligosaccharides in *Saccharomyces cerevisiae*: Alg13p and Alg14p form a complex required for the formation of GlcNAc(2)-PP-dolichol. *J. Biol. Chem.* **280**: 34500–34506
- Bicknell A A, Tourtellotte J & Niwa M (2010) Late phase of the endoplasmic reticulum stress response pathway is regulated by Hog1 MAP kinase. *J. Biol. Chem.* **285**: 17545–17555
- Bilsland E, Molin C, Swaminathan S, Ramne A & Sunnerhagen P (2004) Rck1 and Rck2 MAPKAP kinases and the HOG pathway are required for oxidative stress resistance. *Mol. Microbiol.* **53**: 1743–1756
- Birnboim HC & Doly J (1979) A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res.* **7**: 1513–1523
- Blankenship JR, Fanning S, Hamaker JJ & Mitchell AP (2010) An extensive circuitry for cell wall regulation in *Candida albicans*. *PLoS Pathog.* **6**

- Blasi E, Pitzurra L, Chimienti AR, Mazzolla R, Puliti M, Barluzzi R, Blasi E, Pitzurra L, Chimienti AR, Mazzolla R, Puliti M, Barluzzi R & Bistoni F (1995) Differential susceptibility of yeast and hyphal forms of *Candida albicans* to proteolytic activity of macrophages. Differential Susceptibility of Yeast and Hyphal Forms of *Candida albicans* to Proteolytic Activity of Macrophages. *Infect. Immun.* **63**: 1253–1257
- Bonilla M, Nastase KK & Cunningham KW (2002) Essential role of calcineurin in response to endoplasmic reticulum stress. *EMBO J.* **21**: 2343–2353
- Bouchonville K, Forche A, Tang KES, Selmecki A & Berman J (2009) Aneuploid chromosomes are highly unstable during DNA transformation of *Candida albicans*. *Eukaryot. Cell* **8**: 1554–1566
- 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**: 248–254
- Braun BR, van het Hoog M, d'Enfert C, Martchenko M, Dungan J, Kuo A, Inglis DO, Uhl MA, Hogues H, Berriman M, Lorenz M, Levitin A, Oberholzer U, Bachewich C, H Marcus D, Marcil A, Dignard D, Iouk T, Zito R, Frangeul L, et al (2005) A human-curated annotation of the *Candida albicans* genome. *PLoS Genet.* **1**: 0036–0057
- Brodsky JL & McCracken a (1999) ER protein quality control and proteasome-mediated protein degradation. *Semin. Cell Dev. Biol.* **10**: 507–513
- Brown AJ, Bertram G, Feldmann PJ, Peggie MW & Swoboda RK (1991) Codon utilisation in the pathogenic yeast, *Candida albicans*. *Nucleic Acids Res.* **19**: 4298
- Brown AJP, Budge S, Kaloriti D, Tillmann A, Jacobsen MD, Yin Z, Ene I V, Bohovych I, Sandai D, Kastora S, Potrykus J, Ballou ER, Childers DS, Shahana S & Leach MD (2014) Stress adaptation in a pathogenic fungus. *J. Exp. Biol.* **217**: 144–155
- Burda P & Aebi M (1998) The ALG10 locus of *Saccharomyces cerevisiae* encodes the alpha-1,2 glucosyltransferase of the endoplasmic reticulum: the terminal glucose of the lipid-linked oligosaccharide is required for efficient N-linked glycosylation. *Glycobiology* **8**: 455–462
- Burda P & Aebi M (1999) The dolichol pathway of N-linked glycosylation. *Biochim. Biophys. Acta* **1426**: 239–257
- Burda P, te Heesen S, Brachat A, Wach A, Düsterhöft A & Aebi M (1996) Stepwise assembly of the lipid-linked oligosaccharide in the endoplasmic reticulum of *Saccharomyces cerevisiae*: identification of the ALG9 gene encoding a putative mannosyl transferase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **93**: 7160–7165
- Burda P, Jakob C A, Beinhauer J, Hegemann JH & Aebi M (1999) Ordered assembly of the asymmetrically branched lipid-linked oligosaccharide in the endoplasmic reticulum is ensured by the substrate specificity of the individual glycosyltransferases. *Glycobiology* **9**: 617–625
- Buurman ET, Westwater C, Hube B, Brown a J, Odds FC & Gow N A (1998) Molecular analysis of CaMnt1p, a mannosyl transferase important for adhesion and virulence of *Candida albicans*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **95**: 7670–7675
- Calderone RA (2002) *Candida and candidiasis*. ASM Press

- Calderone RA & Fonzi WA (2001) Virulence factors of *Candida albicans*. *Trends Microbiol.* **9**: 327–335
- Calera JA & Calderone RA (1999) Identification of a putative response regulator two-component phosphorelay gene (CaSSK1) from *Candida albicans*. *Yeast* **15**: 1243–1254
- Calera JA, Herman D & Calderone R (2000) Identification of YPDI, a gene of *Candida albicans* which encodes a two-component phosphohistidine intermediate protein. *Yeast* **16**: 1053–1059
- Calera JA, Zhao XJ, De Bernardis F, Sheridan M & Calderone R (1999) Avirulence of *Candida albicans* CaHK1 mutants in a murine model of hematogenously disseminated candidiasis. *Infect. Immun.* **67**: 4280–4284
- Calfon M, Zeng H, Urano F, Till JH, Hubbard SR, Harding HP, Clark SG & Ron D (2002) IRE1 couples endoplasmic reticulum load to secretory capacity by processing the XBP-1 mRNA. *Nature* **415**: 92–96
- 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**: 1115–1128
- 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**: 3871–3881
- Chaffin WL (2008) *Candida albicans* Cell Wall Proteins. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **72**: 495–544
- Cheetham J, MacCallum DM, Doris KS, da Silva Dantas A, Scorfield S, Odds F, Smith D A & Quinn J (2011) MAPKKK-independent regulation of the Hog1 stress-activated protein kinase in *Candida albicans*. *J. Biol. Chem.* **286**: 42002–16
- Cheetham J, Smith DA, Dantas S, Doris KS, Patterson MJ, Bruce CR & Quinn J (2007) A Single MAPKKK Regulates the Hog1 MAPK Pathway in the Pathogenic Fungus *Candida albicans*. **18**: 4603–4614
- Chen Y, Feldman DE, Deng C, Brown J A, De Giacomo AF, Gaw AF, Shi G, Le QT, Brown JM & Koong AC (2005) Identification of mitogen-activated protein kinase signaling pathways that confer resistance to endoplasmic reticulum stress in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cancer Res.* **3**: 669–677
- Cheng M-F, Yang Y-L, Yao T-J, Lin C-Y, Liu J-S, Tang R-B, Yu K-W, Fan Y-H, Hsieh K-S, Ho M & Lo H-J (2005) Risk factors for fatal candidemia caused by *Candida albicans* and non-*albicans* *Candida* species. *BMC Infect. Dis.* **5**: 22
- Cheng S-C, van de Veerdonk FL, Lenardon M, Stoffels M, Plantinga T, Smeekens S, Rizzetto L, Mukaremera L, Preechasuth K, Cavalieri D, Kanneganti TD, van der Meer JWM, Kullberg BJ, Joosten L a B, Gow N a R & Netea MG (2011) The dectin-1/inflammasome pathway is responsible for the induction of protective T-helper 17 responses that discriminate between yeasts and hyphae of *Candida albicans*. *J. Leukoc. Biol.* **90**: 357–366
- Cheon SA, Jung K-W, Bahn Y-S & Kang HA (2014) The unfolded protein response (UPR) pathway in *Cryptococcus*. *Virulence* **5**: 341–350

- 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**: 937–939
- Cigan AM & Donahue TF (1987) Sequence and structural features associated with translational initiator regions in yeast. *Gene* **59**: 1–18
- Cipollo JF & Trimble RB (2000) The Accumulation of Man 6 GlcNAc 2 -PP-dolichol in the *Saccharomyces cerevisiae* alg9 Mutant Reveals a Regulatory Role for the Alg3p alpha 1 , 3-Man Middle-arm Addition in Downstream Oligosaccharide-lipid and Glycoprotein Glycan Processing. *Biochemistry* **275**: 4267–4277
- Cipollo JF, Trimble RB, Chi JH, Yan Q & Dean N (2001) The yeast ALG11 gene specifies addition of the terminal alpha 1,2-Man to the Man5GlcNAc2-PP-dolichol N-glycosylation intermediate formed on the cytosolic side of the endoplasmic reticulum. *J. Biol. Chem.* **276**: 21828–21840
- Cívicos C (2014) Caracterización fenotípica y transcripcional de mutantes afectados en la N-glicosilación de proteínas en el patógeno *Candida albicans*. Tesis doctoral. Universidad de Salamanca.
- Clerc S, Hirsch C, Oggier DM, Deprez P, Jakob C, Sommer T & Aebi M (2009) Htm1 protein generates the N-glycan signal for glycoprotein degradation in the endoplasmic reticulum. *J. Cell Biol.* **184**: 159–172
- Cole GT, Seshan KR, Phaneuf M & Lynn KT (1991) Chlamyospore-like cells of *Candida albicans* in the gastrointestinal tract of infected, immunocompromised mice. *Can. J. Microbiol.* **37**: 637–646
- Costanzo M, Baryshnikova A, Bellay J, Kim Y, Spear ED, Sevier CS, Ding H, Koh JLY, Toufighi K, Mostafavi S, Prinz J, St Onge RP, VanderSluis B, Makhnevych T, Vizeacoumar FJ, Alizadeh S, Bahr S, Brost RL, Chen Y, Cokol M, et al (2010) The genetic landscape of a cell. *Science* **327**: 425–431
- Couto JR, Huffaker TC & Robbins PW (1984) Cloning and expression in *Escherichia coli* of a yeast mannosyltransferase from the asparagine-linked glycosylation pathway. *J. Biol. Chem.* **259**: 378–382
- Coward J & Harding A (2014) Size Does Matter: Why Polyploid Tumor Cells are Critical Drug Targets in the War on Cancer. *Front. Oncol.* **4**: 123
- Cox JS & Walter P (1996) A Novel Mechanism for Regulating Activity of a Transcription Factor That Controls the Unfolded Protein Response. *Cell* **87**: 391–404
- Crabtree JN, Okagaki LH, Wiesner DL, Strain AK, Nielsen JN & Nielsen K (2012) Titan cell production enhances the virulence of *Cryptococcus neoformans*. *Infect. Immun.* **80**: 3776–3785
- Cutler JE (1991) Putative virulence factors of *Candida albicans*. *Annu. Rev. Microbiol.* **45**: 187–218
- d'Enfert C, Goyard S, Rodriguez-Arnaveilhe S, Frangeul L, Jones L, Tekai 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 MC, et al (2005) CandidaDB: A genome database for *Candida albicans* pathogenomics. *Nucleic Acids Res.* **33**: 353–357

- Dean N (1999) Asparagine-linked glycosylation in the yeast Golgi. *Biochim. Biophys. Acta - Gen. Subj.* **1426**: 309–322
- Deng Y, Srivastava R & Howell SH (2013) Endoplasmic reticulum (ER) stress response and its physiological roles in plants. *Int. J. Mol. Sci.* **14**: 8188–8212
- Denic V, Quan EM & Weissman JS (2006) A Luminal Surveillance Complex that Selects Misfolded Glycoproteins for ER-Associated Degradation. *Cell* **126**: 349–359
- Douglas LJ (2003) Candida biofilms and their role in infection. *Trends Microbiol.* **11**: 30–36
- Dürubaum M, Kuznetsova AY, Passerini V, Stinge S, Stoeckl G & Storchová Z (2014) Unique features of the transcriptional response to model aneuploidy in human cells. *BMC Genomics* **15**: 139
- Ellgaard L, Molinari M & Helenius A (1999) Setting the standards: quality control in the secretory pathway. *Science (80-.)*. **286**: 1882–1888
- Eraso P, Mazón MJ & Portillo F (2010) A dominant negative mutant of PMA1 interferes with the folding of the wild type enzyme. *Traffic* **11**: 37–47
- Eraso P, Mazón MJ, Posas F & Portillo F (2011) Gene expression profiling of yeasts overexpressing wild type or misfolded Pma1 variants reveals activation of the Hog1 MAPK pathway. *Mol. Microbiol.* **79**: 1339–1352
- Ernst JF (2000) Transcription factors in *Candida albicans* - environmental control of morphogenesis. *Yeast* **146**: 1763–1774
- Ernst JF & Pla J (2011) Signaling the glycoshield: maintenance of the *Candida albicans* cell wall. *Int. J. Med. Microbiol.* **301**: 378–383
- Espinel-Ingroff A (2008) Mechanisms of resistance to antifungal agents: yeasts and filamentous fungi. *Rev. Iberoam. Micol. organo la Asoc. Esp. Espec. en Micol.* **25**: 101–106
- Fassler JS & West AH (2011) Fungal Skn7 stress responses and their relationship to virulence. *Eukaryot. Cell* **10**: 156–167
- Feinberg AP & Vogelstein B (1983) A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. *Anal. Biochem.* **132**: 6–13
- Feng X, Krishnan K, Richie DL, Amanianda V, Hartl L, Grahl N, Powers-Fletcher M V., Zhang M, Fuller KK, Nierman WC, Lu IJ, Latgé JP, Woollett L, Newman SL, Cramer R A., Rhodes JC & Askew DS (2011) HacA-independent functions of the ER stress sensor IreA synergize with the canonical UPR to influence virulence traits in *Aspergillus fumigatus*. *PLoS Pathog.* **7**
- Ferris SP, Kodali VK & Kaufman RJ (2014) Glycoprotein folding and quality-control mechanisms in protein-folding diseases. *Dis. Model. Mech.* **7**: 331–341
- Fitzpatrick D A, O’Gaora P, Byrne KP & Butler G (2010) Analysis of gene evolution and metabolic pathways using the *Candida* Gene Order Browser. *BMC Genomics* **11**: 290
- Fonzi WA & Irwin MY (1995) Isogenic strain construction and gene mapping in *Candida albicans*. *Genetics* **134**: 717–728

- Forche A (2014) Large-Scale Chromosomal Changes and Associated Fitness Consequences in Pathogenic Fungi. *Curr Fungal Infect Rep* **8**: 163–170
- Forche A, Alby K, Schaefer D, Johnson AD, Berman J & Bennett RJ (2008) The parasexual cycle in *Candida albicans* provides an alternative pathway to meiosis for the formation of recombinant strains. *PLoS Biol.* **6**: e110
- Forche A, Magee PT, Selmecki A, Berman J & May G (2009a) Evolution in *Candida albicans* populations during a single passage through a mouse host. *Genetics* **182**: 799–811
- Forche A, Steinbach M & Berman J (2009b) Efficient and rapid identification of *Candida albicans* allelic status using SNP-RFLP. *FEMS Yeast Res.* **9**: 1061–1069
- Foureau E, Clastre M, Obando Montoya EJ, Besseau S, Oudin A, Glévarec G, Simkin AJ, Crèche J, Atehortúa L, Giglioli-Guivarc'h N, Courdavault V & Papon N (2014) Subcellular localization of the histidine kinase receptors Sln1p, Nik1p and Chk1p in the yeast CTG clade species *Candida guilliermondii*. *Fungal Genet. Biol.* **65**: 25–36
- Frank CG & Aebi M (2005) ALG9 mannosyltransferase is involved in two different steps of lipid-linked oligosaccharide biosynthesis. *Glycobiology* **15**: 1156–1163
- Frank CG, Grubenmann CE, Eyaid W, Berger EG, Aebi M & Hennet T (2004) Identification and functional analysis of a defect in the human ALG9 gene: definition of congenital disorder of glycosylation type II. *Am. J. Hum. Genet.* **75**: 146–150
- Freeze HH (2013) Understanding human glycosylation disorders: Biochemistry leads the charge. *J. Biol. Chem.* **288**: 6936–6945
- Friedlander R, Jarosch E, Urban J, Volkwein C & Sommer T (2000) A regulatory link between ER-associated protein degradation and the unfolded-protein response. *Nat. Cell Biol.* **2**: 379–384
- Fu Y, Ibrahim AS, Sheppard DC, Chen YC, French SW, Cutler JE, Filler SG & Edwards JE (2002) *Candida albicans* Als1p: An adhesin that is a downstream effector of the EFG1 filamentation pathway. *Mol. Microbiol.* **44**: 61–72
- Galli C, Bernasconi R, Soldà T, Calanca V & Molinari M (2011) Malectin participates in a backup glycoprotein quality control pathway in the mammalian ER. *PLoS One* **6**
- Gao X-D, Tachikawa H, Sato T, Jigami Y & Dean N (2005) Alg14 recruits Alg13 to the cytoplasmic face of the endoplasmic reticulum to form a novel bipartite UDP-N-acetylglucosamine transferase required for the second step of N-linked glycosylation. *J. Biol. Chem.* **280**: 36254–36262
- 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**: 2137–2145
- García-Marqués S, Rande-Gil F & Prieto JA (2015) Nuclear versus cytosolic activity of the yeast Hog1 MAP kinase in response to osmotic and tunicamycin-induced ER stress. *FEBS Lett.* **589**: 2163–2168
- García-Rodríguez LJ, Durán A. & Roncero C (2000) Calcofluor antifungal action depends on chitin and a functional high-osmolarity glycerol response (HOG) pathway: Evidence for a

- physiological role of the *Saccharomyces cerevisiae* HOG pathway under noninducing conditions. *J. Bacteriol.* **182**: 2428–2437
- Gasch AP, Spellman PT, Kao CM, Carmel-Harel O, Eisen MB, Storz G, Botstein D & Brown PO (2000) Genomic expression programs in the response of yeast cells to environmental changes. *Mol. Biol. Cell* **11**: 4241–4257
- Georjiana B, Hansen WJ, Holcomb CL & Rine J (1984) Asparagine-linked glycosylation in *Saccharomyces cerevisiae*: genetic analysis of an early step. *Mol. Cell. Biol.* **4**: 2381–2388
- Gibson UE, Heid CA & Williams PM (1996) A novel method for real time quantitative RT-PCR. *Genome Res.* **6**: 995–1001
- González-Novo A, Jiménez J, García MJ, Ríos-Serrano I, Pla J, Jiménez A & Pérez MS (2004) Dynamics of CaCdc10, a septin of *Candida albicans*, in living cells and during infection. *Int. Microbiol.* **7**: 105–112
- Gordon DJ, Resio B & Pellman D (2012) Causes and consequences of aneuploidy in cancer. *Nat. Rev. Genet.* **13**: 189–203
- Gow NAR & Hube B (2012) Importance of the *Candida albicans* cell wall during commensalism and infection. *Curr. Opin. Microbiol.* **15**: 406–412
- Groot PWJ De, Boer AD De, Cunningham J, Dekker HL, Jong L De, Hellingwerf KJ, Koster C De & Klis FM (2004) Proteomic Analysis of *Candida albicans* Cell Walls Reveals Covalently Bound Carbohydrate-Active Enzymes and Adhesins. *Eukaryot. Cell* **3**: 955–965
- Guarente L (1984) Yeast Promoters : Positive and Negative Elements. *Cell* **36**: 799–800
- Haeuptle MA & Hennet T (2009) Congenital disorders of glycosylation: an update on defects affecting the biosynthesis of dolichol-linked oligosaccharides. *Hum. Mutat.* **30**: 1628–1641
- Hahn S, Hoar ET & Guarente L (1985) Each of three “TATA elements” specifies a subset of the transcription initiation sites at the CYC-1 promoter of *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **82**: 8562–8566
- Hall RA (2015) Dressed to impress: Impact of environmental adaptation on the *C. albicans* cell wall. *Mol. Microbiol.*
- Hall RA & Gow NAR (2013) Mannosylation in *Candida albicans*: Role in cell wall function and immune recognition. *Mol. Microbiol.* **90**: 1147–1161
- Hampton RY, Gardner RG & Rine J (1996) Role of 26S proteasome and HRD genes in the degradation of 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase, an integral endoplasmic reticulum membrane protein. *Mol. Biol. Cell* **7**: 2029–2044
- Harding HP, Novoa I, Zhang Y, Zeng H, Wek R, Schapira M & Ron D (2000a) Stress-Induced Gene Expression in Mammalian Cells. *Mol. Cell* **6**: 1099–1108
- Harding HP, Zhang Y, Bertolotti a, Zeng H & Ron D (2000b) Perk is essential for translational regulation and cell survival during the unfolded protein response. *Mol. Cell* **5**: 897–904

- Heesen S, Lehle L, Weissmann A & Aebi M (1994) Isolation of the ALG5 locus encoding the UDP-glucose:dolichyl-phosphate glucosyltransferase from *Saccharomyces cerevisiae*. *Eur. J. Biochem.* **224**: 71–79
- Heid C A, Stevens J, Livak KJ & Williams PM (1996) Real time quantitative PCR. *Genome Res.* **6**: 986–994
- Herrero AB, Uccelletti D, Hirschberg CB, Dominguez A & Abeijon C (2002) The Golgi GDPase of the Fungal Pathogen *Candida albicans* Affects Morphogenesis , The Golgi GDPase of the Fungal Pathogen *Candida albicans* Affects Morphogenesis , Glycosylation , and Cell Wall Properties. *Eukaryot. Cell*
- Herrero-de-Dios C, Alonso-Monge R & Pla J (2014) The lack of upstream elements of the Cek1 and Hog1 mediated pathways leads to a synthetic lethal phenotype upon osmotic stress in *Candida albicans*. *Fungal Genet. Biol.* **69**: 31–42
- 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**: 55–59
- Hohmann S (2002) Osmotic Stress Signaling and Osmoadaptation in Yeasts Osmotic. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **66**: 300–372
- Hohmann S, Krantz M & Nordlander B (2007) Yeast osmoregulation. *Methods Enzymol.* **428**: 29–45
- Holland AJ & Cleveland DW (2012) Losing balance: the origin and impact of aneuploidy in cancer. *EMBO Rep.* **13**: 501–514
- Horie T, Tatebayashi K, Yamada R & Saito H (2008) Phosphorylated Ssk1 prevents unphosphorylated Ssk1 from activating the Ssk2 mitogen-activated protein kinase kinase in the yeast high-osmolarity glycerol osmoregulatory pathway. *Mol. Cell. Biol.* **28**: 5172–5183
- 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**: 119–124
- Hube B & Naglik J (2005) *Candida albicans* proteinases: resolving the mystery of a gene family. *Microbiology* **147**: 1997–2005
- Hube B, Sanglard D, Odds FC, Hess D, Monod M, Schäfer W, Gow NA, Hube B, Sanglard D, Odds FC, Hess D, Brown AJP, Gow NAR, Monod M & Scha W (1997) Disruption of each of the secreted aspartyl *Candida albicans* attenuates virulence . Disruption of Each of the Secreted Aspartyl Proteinase Genes Attenuates Virulence. *Infect. Immun.*
- Hudson D A, Sciascia QL, Sanders RJ, Norris GE, Edwards PJB, Sullivan P a & Farley PC (2004) Identification of the dialysable serum inducer of germ-tube formation in *Candida albicans*. *Microbiology* **150**: 3041–3049
- Huffaker TC & Robbins PW (1982) Temperature-sensitive yeast mutants deficient in asparagine-linked glycosylation. *J. Biol. Chem.* **257**: 3203–3210

- Huffaker TC & Robbins PW (1983) Yeast mutants deficient in protein glycosylation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **80**: 7466–7470
- Hughes TR, Roberts CJ, Dai H, Jones AR, Meyer MR, Slade D, Dow S, Ward TR, Kidd MJ, Friend SH & Marton MJ (2000) Widespread aneuploidy revealed by DNA microarray expression profiling. **25**: 333–337
- Hull CM & Johnson AD (1999) Identification of a mating type-like locus in the asexual pathogenic yeast *Candida albicans*. *Science* **285**: 1271–1275
- Iwaguchi S, Homma M & Tanaka K (1992) Clonal variation of chromosome size derived from the rDNA cluster region in *Candida albicans*. *J. Gen. Microbiol.* **138**: 1177–1184
- Janbon G, Sherman F & Rustchenko E (1998) Monosomy of a specific chromosome determines L-sorbose utilization: a novel regulatory mechanism in *Candida albicans*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **95**: 5150–5155
- Jones T, Federspiel N A, Chibana H, Dungan J, Kalman S, Magee BB, Newport G, Thorstenson YR, Agabian N, Magee PT, Davis RW & Scherer S (2004) The diploid genome sequence of *Candida albicans*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **101**: 7329–7334
- Kabir MA, Ahmad A, Greenberg JR, Wang Y-K & Rustchenko E (2005) Loss and gain of chromosome 5 controls growth of *Candida albicans* on sorbose due to dispersed redundant negative regulators. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **102**: 12147–12152
- Kaminski L, Lurie-Weinberger MN, Allers T, Gophna U & Eichler J (2013) Phylogenetic- and genome-derived insight into the evolution of N-glycosylation in Archaea. *Mol. Phylogenet. Evol.* **68**: 327–339
- Kämpf M, Absmanner B, Schwarz M & Lehle L (2009) Biochemical characterization and membrane topology of Alg2 from *Saccharomyces cerevisiae* as a bifunctional alpha1,3- and 1,6-mannosyltransferase involved in lipid-linked oligosaccharide biosynthesis. *J. Biol. Chem.* **284**: 11900–11912
- Kaserer AO, Andi B, Cook PF & West AH (2009) Effects of osmolytes on the SLN1-YPD1-SSK1 phosphorelay system from *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochemistry* **48**: 8044–8050
- Kawahara T, Yanagi H, Yura T & Mori K (1997) Endoplasmic reticulum stress-induced mRNA splicing permits synthesis of transcription factor Hac1p/Ern4p that activates the unfolded protein response. *Mol. Biol. Cell* **8**: 1845–1862
- Klein HL (2001) Spontaneous chromosome loss in *Saccharomyces cerevisiae* is suppressed by DNA damage checkpoint functions. *Genetics* **159**: 1501–1509
- Kohno K, Normington K, Sambrook J, Gething MJ & Mori K (1993) The promoter region of the yeast KAR2 (BiP) gene contains a regulatory domain that responds to the presence of unfolded proteins in the endoplasmic reticulum. *Mol. Cell. Biol.* **13**: 877–890
- Kostova Z & Wolf DH (2003) For whom the bell tolls : protein quality control of the endoplasmic reticulum and the ubiquitin- proteasome connection. *EMBO J.* **22**: 2309–2317

- Koyama T, Makita M, Shibata N & Okawa Y (2009) Influence of oxidative and osmotic stresses on the structure of the cell wall mannan of *Candida albicans* serotype A. *Carbohydr. Res.* **344**: 2195–2200
- Krantz M, Ahmadpour D, Ottosson L-G, Warringer J, Waltermann C, Nordlander B, Klipp E, Blomberg A, Hohmann S & Kitano H (2009) Robustness and fragility in the yeast high osmolarity glycerol (HOG) signal-transduction pathway. *Mol. Syst. Biol.* **5**: 281
- Krasnewich D & Gahl WA (1997) Carbohydrate-deficient glycoprotein syndrome. *Adv. Pediatr.* **44**: 109–140
- Kravets A, Yang F, Bethlenny G, Sherman F & Rustchenko E (2014) Adaptation of *Candida albicans* to growth on sorbose via monosomy of chromosome 5 accompanied by duplication of another chromosome carrying a gene responsible for sorbose utilization. *FEMS Yeast Res.* **14**: 708–713
- Kruppa M & Calderone R (2006) Two-component signal transduction in human fungal pathogens. *FEMS Yeast Res.* **6**: 149–159
- Kushner S (1988) An improved method for transformation of *Escherichia coli* with *colEI* derived plasmid. In Genetic engineering
- Lee KL, Buckley HR & Campbell CC (1975) An amino acid liquid synthetic medium for the development of mycelial and yeast forms of *Candida Albicans*. *Sabourandia* **13**: 148–153
- Legrand M, Forche A, Selmecki A, Chan C, Kirkpatrick DT & Berman J (2008) Haplotype mapping of a diploid non-meiotic organism using existing and induced aneuploidies. *PLoS Genet.* **4**: e1
- Leidich SD, Ibrahim A S, Fu Y, Koul A, Jessup C, Vitullo J, Fonzi W, Mirbod F, Nakashima S, Nozawa Y & Ghannoum M A (1998) Cloning and disruption of *caPLB1*, a phospholipase B gene involved in the pathogenicity of *Candida albicans*. *J. Biol. Chem.* **273**: 26078–26086
- Li D, Agrellos O A. & Calderone R (2010a) Histidine kinases keep fungi safe and vigorous. *Curr. Opin. Microbiol.* **13**: 424–430
- Li M, Fang X, Baker DJ, Guo L, Gao X, Wei Z, Han S & Deursen JM Van (2010b) The ATM – p53 pathway suppresses aneuploidy- induced tumorigenesis. *PNAS* **107**: 14188–14193
- Lin JH, Li H, Yasumura D, Cohen HR, Zhang C, Panning B, Shokat KM, Lavail MM & Walter P (2007) IRE1 signaling affects cell fate during the unfolded protein response. *Science* **318**: 944–949
- Lommel M & Strahl S (2009) Protein O-mannosylation: conserved from bacteria to humans. *Glycobiology* **19**: 816–828
- Lowman DW, Greene RR, Bearden DW, Kruppa MD, Pottier M, Monteiro M A, Soldatov D V, Ensley HE, Cheng SC, Netea MG & Williams DL (2014) Novel structural features in *Candida albicans* Hyphal Glucan Provide a basis for differential Innate Immune recognition of Hyphae Versus Yeast. *J. Biol. Chem.* **289**: 3432–3443
- Lussier M, White A, Sheraton J, Paolo T, Treadwell J, Southard SB, Horenstein CI, Ram AFJ, Kapteyn JC, Roemer TW, Vo DH, Bondoc DC, Zhong WW, Sdicu A, Davies J, Klis FM,

- Robbins PW & Bussey H (1997) Large Scale Identification of Genes Involved in Cell Surface Biosynthesis and Architecture in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* **147**: 435–450
- Ma L, Xie L, Dong X & Shi W (2009) Role of extracellular phospholipase B of *Candida albicans* as a virulent factor in experimental keratomycosis. *Curr. Eye Res.* **34**: 761–768
- Maguire SL, Óhéigeartaigh SS, Byrne KP, Schröder MS, O’Gaora P, Wolfe KH & Butler G (2013) Comparative genome analysis and gene finding in *Candida* species using CGOB. *Mol. Biol. Evol.* **30**: 1281–1291
- Marichal P, Bossche H Vanden, Odds FC, Nobels G, Warnock DW, Timmerman V, Broeckhoven CVAN, Fay S & Mose-Larsen P (1997) Molecular Biological Characterization of an Azole-Resistant *Candida glabrata* Isolate. *Antimicrob. Agents Chemother.* **41**: 2229–2237
- Martin H, Shales M, Fernandez-Piñar P, Wei P, Molina M, Shokat KM, Beltrao P, Lim W & Krogan NJ (2015) Differential genetic interactions of yeast stress response MAPK pathways. *Mol. Syst. Biol.* **11**: 1–13
- 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**: 3151–3161
- Mathé L & Van Dijck P (2013) Recent insights into *Candida albicans* biofilm resistance mechanisms. *Curr. Genet.* **59**: 251–264
- Miller MG & Johnson AD (2002) White-opaque switching in *Candida albicans* is controlled by mating-type locus homeodomain proteins and allows efficient mating. *Cell* **110**: 293–302
- Mishra NC & Tatum EL (1972) Effect of L-Sorbose on Polysaccharide Synthetases of *Neurospora crassa*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **69**: 313–317
- Mitchell (2009) Possibly essential genes; no disruptants obtained by UAU1 method using the BWP17 strain. *Pers. Commun. to CGD*
- Miyazaki T, Nakayama H, Nagayoshi Y, Kakeya H & Kohno S (2013) Dissection of Ire1 Functions Reveals Stress Response Mechanisms Uniquely Evolved in *Candida glabrata*. *PLoS Pathog.* **9**: e1003160
- Modrzejewska B & Kurnatowski P (2015) Review articles Adherence of *Candida* sp . to host tissues and cells as one of its pathogenicity features 1. **61**: 3–9
- Molinari M, Calanca V, Galli C, Lucca P & Paganetti P (2003) Role of EDEM in the release of misfolded glycoproteins from the calnexin cycle. *Science (80-.).* **299**: 1397–1400
- Montañés FM, Pascual-Ahuir A & Proft M (2011) Repression of ergosterol biosynthesis is essential for stress resistance and is mediated by the Hog1 MAP kinase and the Mot3 and Rox1 transcription factors. *Mol. Microbiol.* **79**: 1008–1023
- 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 N a R (2007) Endoplasmic reticulum alpha-glycosidases of *Candida albicans* are required for N glycosylation, cell wall integrity, and normal host-fungus interaction. *Eukaryot. Cell* **6**: 2184–2193

- Mora-Montes HM, Netea MG, Ferwerda G, Lenardon MD, Brown GD, Mistry AR, Kullberg BJ, O'Callaghan CA, Sheth CC, Odds FC, Brown AJP, Munro CA & Gow NAR (2011) Recognition and blocking of innate immunity cells by *Candida albicans* chitin. *Infect. Immun.* **79**: 1961–1970
- Mora-Montes HM, Ponce-Noyola P, Villagómez-Castro JC, Gow NAR, Flores-Carreón A & López-Romero E (2009) Protein glycosylation in *Candida*. *Future Microbiol.* **4**: 1167–1183
- Mori K, Kawahara T, Yoshida H, Yanagi H & Yura T (1996) Signalling from endoplasmic reticulum to nucleus: transcription factor with a basic-leucine zipper motif is required for the unfolded protein-response pathway. *Genes to Cells* **1**: 803–817
- Morrow CA & Fraser JA (2013) Ploidy variation as an adaptive mechanism in human pathogenic fungi. *Semin. Cell Dev. Biol.* **24**: 339–46
- Morschhäuser J (2010) Regulation of white-opaque switching in *Candida albicans*. *Med. Microbiol. Immunol.* **199**: 165–172
- Mulhern SM, Logue ME & Butler G (2006) *Candida albicans* transcription factor Ace2 regulates metabolism and is required for filamentation in hypoxic conditions. *Eukaryot. Cell* **5**: 2001–2013
- Munro C A, Selvaggini S, De Bruijn I, Walker L, Lenardon MD, Gerssen B, Milne S, Brown AJP & Gow NAR (2007) The PKC, HOG and Ca²⁺ signalling pathways co-ordinately regulate chitin synthesis in *Candida albicans*. *Mol. Microbiol.* **63**: 1399–1413
- Muñoz MD, Hernández LM, Basco R, Andaluz E & Larriba G (1994) Glycosylation of yeast exoglucanase sequons in alg mutants deficient in the glucosylation steps of the lipid-linked oligosaccharide. Presence of glucotriose unit in Dol-PP-GlcNAc2Man9Glc3 influences both glycosylation efficiency and selection of N-linked . *Biochim. Biophys. Acta* **1201**: 361–366
- Muzzey D, Schwartz K, Weissman JS & Sherlock G (2013) Assembly of a phased diploid *Candida albicans* genome facilitates allele-specific measurements and provides a simple model for repeat and indel structure. *Genome Biol.* **14**: R97
- Nagawa F & Fink GR (1985) The relationship between the “TATA” sequence and transcription initiation sites at the HIS4 gene of *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **82**: 8557–8561
- 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, Meer JWM Van Der, 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**: 1642–1650
- Ni L & Snyder M (2001) A genomic study of the bipolar bud site selection pattern in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Biol. Cell* **12**: 2147–70
- Nikolaou E, Agrafioti I, Stumpf M, Quinn J, Stansfield I & Brown AJP (2009) Phylogenetic diversity of stress signalling pathways in fungi. *BMC Evol. Biol.* **9**: 44

- Niwa O, Tange Y & Kurabayashi A (2006) Growth arrest and chromosome instability in aneuploid yeast. *Yeast* **23**: 937–950
- Nobile CJ, Fox EP, Nett JE, Sorrells TR, Mitrovich QM, Hernday AD, Tuch BB, Andes DR & Johnson AD (2012) A recently evolved transcriptional network controls biofilm development in *Candida albicans*. *Cell* **148**: 126–138
- Noël T (2012) The cellular and molecular defense mechanisms of the *Candida* yeasts against azole antifungal drugs. *J. Mycol. Med.* **22**: 173–178
- O'Reilly MK, Zhang G & Imperiali B (2006) In Vitro Evidence for the Dual Function of Alg2 and Alg11 : Essential Mannosyltransferases in N-Linked Glycoprotein Biosynthesis. *Biochemistry* **14**: 9593–9603
- 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**: 186–190
- Odds FC (1988) *Candida and candidiasis*. Baillière Tindall
- Okagaki LH, Strain AK, Nielsen JN, Charlier C, Baltes NJ, Chrétien F, Heitman JH, Dromer F & Nielsen KN (2010) Cryptococcal cell morphology affects host cell interactions and pathogenicity. *PLoS Pathog.* **6**
- Onishi J, Meinz M, Thompson J, Curotto J, Dreikorn S, Rosenbach M, Douglas C, Abruzzo G, Flattery A, Kong L, Cabello A, Vicente F, Pelaez F, Diez MT, Martin I, Bills G, Giacobbe R, Dombrowski A, Schwartz R, Morris S, et al (2000) Discovery of novel antifungal (1,3)- β -D-glucan synthase inhibitors. *Antimicrob. Agents Chemother.* **44**: 368–377
- Orlean P, Albright C & Robbins PW (1988) Cloning and sequencing of the yeast gene for dolichol phosphate mannose synthase, an essential protein. *J. Biol. Chem.* **263**: 17499–14507
- Orlean P & Menon AK (2007) Thematic review series: lipid posttranslational modifications. GPI anchoring of protein in yeast and mammalian cells, or: how we learned to stop worrying and love glycospholipids. *J. Lipid Res.* **48**: 993–1011
- Oromendia AB & Amon A (2014) Aneuploidy : implications for protein homeostasis and disease Protein complex. *Dis. Model. Mech.* **7**: 15–20
- Oromendia AB, Dodgson SE & Amon A (2012) Aneuploidy causes proteotoxic stress in yeast. *Genes Dev.* **26**: 2696–2708
- Panadero J, Pallotti C, Rodríguez-Vargas S, Rande-Gil F & Prieto JA. (2006) A downshift in temperature activates the high osmolarity glycerol (HOG) pathway, which determines freeze tolerance in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* **281**: 4638–4645
- Park Y, Morschhäuser J & Morschha J (2005) Tetracycline-Inducible Gene Expression and Gene Deletion in *Candida albicans* Tetracycline-Inducible Gene Expression and Gene Deletion in *Candida albicans*. *Eukaryot. Cell* **4**: 1328–1342
- Patil CK, Li H & Walter P (2004) Gcn4p and novel upstream activating sequences regulate targets of the unfolded protein response. *PLoS Biol.* **2**: E246

- Paulsson K & Johansson B (2007) Trisomy 8 as the sole chromosomal aberration in acute myeloid leukemia and myelodysplastic syndromes. *Pathol. Biol. (Paris)*. **55**: 37–48
- Pavelka N, Rancati G & Li R (2010a) Dr Jekyll and Mr Hyde: role of aneuploidy in cellular adaptation and cancer. *Curr. Opin. Cell Biol.* **22**: 809–815
- Pavelka N, Rancati G, Zhu J, Bradford WD, Saraf A, Florens L, Sanderson BW, Hattem GL & Li R (2010b) Aneuploidy confers quantitative proteome changes and phenotypic variation in budding yeast. *Nature* **468**: 321–325
- Pfaffl MW (2001) A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res.* **29**: e45
- Pfaffl MW, Horgan GW & Dempfle L (2002) Relative expression software tool (REST) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR. *Nucleic Acids Res.* **30**: e36
- Pitarch A (2002) Sequential Fractionation and Two-dimensional Gel Analysis Unravels the Complexity of the Dimorphic Fungus *Candida albicans* Cell Wall Proteome. *Mol. Cell. Proteomics* **1**: 967–982
- Pitoniak A, Birkaya B, Dionne HM, Vadaie N & Cullen PJ (1994) The Signaling Mucins Msb2 and Hkr1 Differentially Regulate the Filamentation Mitogen-activated Protein Kinase Pathway and Contribute to a Multimodal Response. *Development* **120**: 3083–3092
- Plempner RK & Wolf DH (1999) Retrograde protein translocation: ERADication of secretory proteins in health and disease. *Trends Biochem. Sci.* **24**: 266–270
- Posas F & Saito H (1998) Activation of the yeast SSK2 MAP kinase kinase by the SSK1 two-component response regulator. *Embo J.* **17**: 1385–1394
- Prill SKH, Klinkert B, Timpel C, Gale CA, Schröppel K & Ernst JF (2005) PMT family of *Candida albicans*: Five protein mannosyltransferase isoforms affect growth, morphogenesis and antifungal resistance. *Mol. Microbiol.* **55**: 546–560
- Ram AF, Wolters A, Ten Hoopen R & Klis FM (1994) A new approach for isolating cell wall mutants in *Saccharomyces cerevisiae* by screening for hypersensitivity to calcofluor white. *Yeast* **10**: 1019–1030
- Reiss G, Heesen S, Zimmerman J, Robbins PW & Aebi M (1996) Isolation of the ALG6 locus of *Saccharomyces cerevisiae* required for glucosylation in the N-linked glycosylation pathway. *Glycobiology* **6**: 493–498
- Richard ML & Plaine A (2007) Comprehensive analysis of glycosylphosphatidylinositol-anchored proteins in *Candida albicans*. *Eukaryot. Cell* **6**: 119–133
- Richie DL, Feng X, Hartl L, Aimaniananda V, Krishnan K, Powers-Fletcher MV, Watson DS, Galande AK, White SM, Willett T, Latgé J-P, Rhodes JC & Askew DS (2011) The virulence of the opportunistic fungal pathogen *Aspergillus fumigatus* requires cooperation between the endoplasmic reticulum-associated degradation pathway (ERAD) and the unfolded protein response (UPR). *Virulence* **2**: 12–21

- Román E, Nombela C & Pla J (2005) The Sho1 Adaptor Protein Links Oxidative Stress to Morphogenesis and Cell Wall Biosynthesis in the Fungal Pathogen *Candida albicans*. **25**: 10611–10627
- Roth J, Zuber C, Park S, Jang I, Lee Y, Kysela KG, Le Fourn V, Santimaria R, Guhl B & Cho JW (2010) Protein N-glycosylation, protein folding, and protein quality control. *Mol. Cells* **30**: 497–506
- Rouabhia M, Schaller M, Corbucci C, Vecchiarelli A, Prill SKH, Giasson L & Ernst JF (2005) Virulence of the fungal pathogen *Candida albicans* requires the five isoforms of protein mannosyltransferases. *Infect. Immun.* **73**: 4571–4580
- Ruiz-Herrera J, Victoria Elorza M, 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
- Rustchenko E (2007) Chromosome instability in *Candida albicans*. *FEMS Yeast Res.* **7**: 2–11
- Saloheimo M, Valkonen M & Penttilä M (2003) Activation mechanisms of the HAC1-mediated unfolded protein response in filamentous fungi. *Mol. Microbiol.* **47**: 1149–1161
- Sambrook J, Frisch E & Maniatis T (1987) *Molecular cloning: a laboratory manual* 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press
- Schaller M, Borelli C, Korting HC & Hube B (2005) Hydrolytic enzymes as virulence factors of *Candida albicans*. *Mycoses* **48**: 365–377
- Selmecki A, Forche A & Berman J (2006) Aneuploidy and isochromosome formation in drug-resistant *Candida albicans*. *Science (80-.).* **313**: 367–370
- Selmecki A, Gerami-Nejad M, Paulson C, Forche A & Berman J (2008) An isochromosome confers drug resistance in vivo by amplification of two genes, ERG11 and TAC1. *Mol. Microbiol.* **68**: 624–641
- Selmecki AM, Dulmage K, Cowen LE, Anderson JB & Berman J (2009) Acquisition of aneuploidy provides increased fitness during the evolution of antifungal drug resistance. *PLoS Genet.* **5**: e1000705
- Semighini CP, Averette AF, Perfect JR & Heitman J (2011) Deletion of *cryptococcus neoformans* aif ortholog promotes chromosome aneuploidy and fluconazole-resistance in a metacaspase-independent manner. *PLoS Pathog.* **7**
- Sheltzer JM, Blank HM, Pfau SJ, Tange Y, George BM, Humpton TJ, Brito IL, Hiraoka Y, Niwa O & Amon A (2011) Aneuploidy drives genomic instability in yeast. *Science* **333**: 1026–1030
- Sheltzer JM, Torres EM, Dunham MJ & Amon A (2012) Transcriptional consequences of aneuploidy. *PNAS* **109**: 12644–12649
- 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**: 365–372

- Shiga T, Suzuki H, Yamamoto A, Yamamoto H & Yamamoto K (2010) Hydroquinone, a Benzene Metabolite, Induces Hog1-dependent Stress Response Signaling and Causes Aneuploidy in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Radiat. Res.* **51**: 405–415
- Sidrauski C & Walter P (1997) The transmembrane kinase Ire1p is a site-specific endonuclease that initiates mRNA splicing in the unfolded protein response. *Cell* **90**: 1031–1039
- Singh P, Chauhan N, Ghosh A, Dixon F & Calderone R (2004) SKN7 of *Candida albicans*: Mutant Construction and Phenotype Analysis. *Infect. Immun.* **72**: 2390–2394
- Sionov E, Chang YC & Kwon-Chung KJ (2013) Azole heteroresistance in *Cryptococcus neoformans*: Emergence of resistant clones with chromosomal disomy in the mouse brain during fluconazole treatment. *Antimicrob. Agents Chemother.* **57**: 5127–5130
- Sionov E, Lee H, Chang YC & Kwon-Chung KJ (2010) *Cryptococcus neoformans* overcomes stress of azole drugs by formation of disomy in specific multiple chromosomes. *PLoS Pathog.* **6**: e1000848
- Slutsky B, Staebell M, Anderson J, Risen L, Pfaller M & Soll DR (1987) “White-opaque transition”: a second high-frequency switching system in *Candida albicans*. *J. Bacteriol.* **169**: 189–197
- Smith DA, Morgan BA & Quinn J (2010) Stress signalling to fungal stress-activated protein kinase pathways. *FEMS Microbiol. Lett.* **306**: 1–8
- Smith DA, Nicholls S, Morgan BA, Brown AJP & Quinn J (2004) A Conserved Stress-activated Protein Kinase Regulates a Core Stress Response in the Human Pathogen *Candida albicans*. *PLoS Pathog.* **15**: 4179–4190
- Sobel JD, Muller G & Buckley HR (1984) Critical role of germ tube formation in the pathogenesis of candidal vaginitis. *Infect. Immun.* **44**: 576–580
- Soll DR (2011) Evolution of a new signal transduction pathway in *Candida albicans*. *Trends Microbiol.* **19**: 8–13
- Soll DR, Lockhart SR & Zhao R (2003) Relationship between Switching and Mating in *Candida albicans*. *Eukaryot. Cell* **2**: 390–397
- Sousa M, Ferrero-Garcia M & Parodi AJ (1992) Recognition of the oligosaccharide and protein moieties of glycoproteins by the UDP-Glc:glycoprotein glucosyltransferase. *Biochemistry* **31**: 97–105
- Southard SB, Specht CA, Mishra C, Robbins PW & Chen-weiner J (1999) Molecular Analysis of the *Candida albicans* Homolog of *Saccharomyces cerevisiae* MNN9, Required for Glycosylation of Cell Wall Mannoproteins. *J. Bacteriol.*
- Spampinato C & Leonardi D (2013) *Candida* infections, causes, targets, and resistance mechanisms: Traditional and alternative antifungal agents. *Biomed Res. Int.* **2013**
- Spiro RG, Zhu Q, Bhojroo V & Söling HD (1996) Definition of the lectin-like properties of the molecular chaperone, calreticulin, and demonstration of its copurification with endomannosidase from rat liver Golgi. *J. Biol. Chem.* **271**: 11588–11594

- Staab JF & Sundstrom P (2003) URA3 as a selectable marker for disruption and virulence assessment of *Candida albicans* genes. *Trends Microbiol.* **11**: 69–73
- Stagljar I, Korostensky C, Johnsson N & te Heesen S (1998) A genetic system based on split-ubiquitin for the analysis of interactions between membrane proteins in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **95**: 5187–5192
- Staib P & Morschhäuser J (2007) Chlamyospore formation in *Candida albicans* and *Candida dubliniensis* - An enigmatic developmental programme. *Mycoses* **50**: 1–12
- Stigliano ID, Alculumbre SG, Labriola CA, Parodi AJ & D'Alessio C (2011) Glucosidase II and N-glycan mannose content regulate the half-lives of monoglucosylated species in vivo. *Mol. Biol. Cell* **22**: 1810–1823
- Stingele S, Stoehr G, Peplowska K, Cox J, Mann M & Storchova Z (2012) Global analysis of genome, transcriptome and proteome reveals the response to aneuploidy in human cells. *Mol. Syst. Biol.* **8**
- Sudbery P, Gow N & Berman J (2004) The distinct morphogenic states of *Candida albicans*. *Trends Microbiol.* **12**: 317–324
- Sudbery PE (2001) The germ tubes of *Candida albicans* hyphae and pseudohyphae show different patterns of septin ring localization. *Mol. Microbiol.* **41**: 19–31
- Synnott JM, Guida A, Mulhern-Haughey S, Higgins DG & Butler G (2010) Regulation of the hypoxic response in *Candida albicans*. *Eukaryot. Cell* **9**: 1734–1746
- Tannous A, Pisoni GB, Hebert DN & Molinari M (2014) N-linked sugar-regulated protein folding and quality control in the ER. *Semin. Cell Dev. Biol.* **41**: 79–89
- Tatebayashi K, Yamamoto K, Tanaka K, Tomida T, Maruoka T, Kasukawa E & Saito H (2006) Adaptor functions of Cdc42, Ste50, and Sho1 in the yeast osmoregulatory HOG MAPK pathway. *EMBO J.* **25**: 3033–3044
- Tavazoie S, Hughes JD, Campbell MJ, Cho RJ & Church GM (1999) Systematic determination of genetic network architecture. **22**: 281–285
- Thibault G, Ismail N & Ng DTW (2011) The unfolded protein response supports cellular robustness as a broad-spectrum compensatory pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **108**: 20597–20602
- Thorburn RR, Gonzalez C, Brar GA, Christen S, Carlile TM, Ingolia NT, Sauer U, Weissman JS & Amon A (2013) Aneuploid yeast strains exhibit defects in cell growth and passage through START. *Mol. Biol. Cell* **24**: 1274–1289
- Thrower JS, Hoffman L, Rechsteiner M & Pickart CM (2000) Recognition of the polyubiquitin proteolytic signal. *EMBO J.* **19**: 94–102
- Torosantucci A, Chiani P, Bernardis F De, Cassone A, Calera JA & Calderone R (2002) Deletion of the Two-Component Histidine Kinase Gene (CHK1) of. *Infect. Immun.* **70**: 985–987

- Torres EM, Sokolsky T, Tucker CM, Chan LY, Boselli M, Dunham MJ & Amon A (2007) Effects of Aneuploidy on Cellular Physiology and Cell Division in Haploid Yeast. *Science* (80-.). **317**: 916–924
- Torres-Quiroz F, García-Marqués S, Coria R, Rande-Gil F & Prieto JA (2010) The activity of yeast Hog1 MAPK is required during endoplasmic reticulum stress induced by tunicamycin exposure. *J. Biol. Chem.* **285**: 20088–20896
- Totani K, Ihara Y, Matsuo I & Ito Y (2006) Substrate specificity analysis of endoplasmic reticulum glucosidase II using synthetic high mannose-type glycans. *J. Biol. Chem.* **281**: 31502–31508
- Travers KJ, Patil CK, Wodicka L, Lockhart DJ, Weissman JS & Walter P (2000) Functional and genomic analyses reveal an essential coordination between the unfolded protein response and ER-associated degradation. *Cell* **101**: 249–258
- 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**: 5448–5456
- Varki A, Cummings R & Esko J (2009) Essentials of Glycobiology. 2nd edition. Press CSH (NY): CSHL (ed) Cold Spring Harbor (NY): Cold Spring Harbor Laboratory Press
- Vermes A, Guchelaar HJ & Dankert J (2000) Flucytosine: a review of its pharmacology, clinical indications, pharmacokinetics, toxicity and drug interactions. *J. Antimicrob. Chemother.* **46**: 171–179
- Walther A & Wendland J (2003) An improved transformation protocol for the human fungal pathogen *Candida albicans*. *Curr. Genet.* **42**: 339–343
- Wang Y, Shen J, Arenzana N, Tirasophon W, Kaufman RJ & Prywes R (2000) Activation of ATF6 and an ATF6 DNA binding site by the endoplasmic reticulum stress response. *J. Biol. Chem.* **275**: 27013–27020
- Warenda AJ & Konopka JB (2002) Septin function in *Candida albicans* Morphogenesis. *Mol. Biol. Cell* **13**: 2732–2746
- Warmka J, Hanneman J, Lee J, Amin D & Ota I (2001) Ptc1, a type 2C Ser/Thr phosphatase, inactivates the HOG pathway by dephosphorylating the mitogen-activated protein kinase Hog1. *Mol. Cell. Biol.* **21**: 51–60
- Weaver BA & Cleveland DW (2006) Does aneuploidy cause cancer? *Curr. Opin. Cell Biol.* **18**: 658–667
- Williams BAP, Slamovits CH, Patron NJ, Fast NM & Keeling PJ (2005) A high frequency of overlapping gene expression in compacted eukaryotic genomes. *PNAS* **102**: 10936–10941
- Wimalasena TT, Enjalbert B, Guillemette T, Plumridge A, Budge S, Yin Z, Brown AJP & Archer DB (2008) Impact of the unfolded protein response upon genome-wide expression patterns, and the role of Hac1 in the polarized growth, of *Candida albicans*. *Fungal Genet. Biol.* **45**: 1235–1247
- Winkler A, Arkind C, Mattison CP, Burkholder A, Knoche K & Ota I (2002) Heat Stress Activates the Yeast High-Osmolarity Glycerol Mitogen-Activated Protein Kinase Pathway , and Protein

- Tyrosine Phosphatases Are Essential under Heat Stress Heat Stress Activates the Yeast High-Osmolarity Glycerol Mitogen-Activated Protein Kinase. *Eukaryot. Cell* **1**: 163–173
- Wu H, Ng BSH & Thibault G (2014) Endoplasmic Reticulum Stress Response in Yeast and Humans. *Biosci. Rep.* **34**: 321–330
- Xie W & Ng D'TW (2010) ERAD substrate recognition in budding yeast. *Semin. Cell Dev. Biol.* **21**: 533–539
- Yang F, Kravets A, Bethlenny G, Welle S & Rustchenko E (2013) Chromosome 5 monosomy of *Candida albicans* controls susceptibility to various toxic agents, including major antifungals. *Antimicrob. Agents Chemother.* **57**: 5026–5036
- Ye Y, Meyer HH & Rapoport TA (2003) Function of the p97-Ufd1-Npl4 complex in retrotranslocation from the ER to the cytosol: Dual recognition of nonubiquitinated polypeptide segments and polyubiquitin chains. *J. Cell Biol.* **162**: 71–84
- Yoshida J, Umezumi K & Maki H (2003) Positive and negative roles of homologous recombination in the maintenance of genome stability in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* **164**: 31–46
- Zhao X, Oh SH, Cheng G, Green CB, Nuessen JA, Yeater K, Leng RP, Brown AJP & Hoyer LL (2004) ALS3 and ALS8 represent a single locus that encodes a *Candida albicans* adhesin; functional comparisons between Als3p and Als1p. *Microbiology* **150**: 2415–2428
- Zhao X, Oh SH, Yeater KM & Hoyer LL (2005) Analysis of the *Candida albicans* Als2p and Als4p adhesins suggests the potential for compensatory function within Als family. *Microbiology* **151**: 1619–1630
- Zhu J, Pavelka N, Bradford WD, Rancati G & Li R (2012) Karyotypic determinants of chromosome instability in Aneuploid budding yeast. *PLoS Genet.* **8**: e1002719
- Zhuang Z, Park WS, Pack S, Schmidt L, Vortmeyer AO, Pak E, Pham T, Weil RJ, Candidus S, Lubensky I a, Linehan WM, Zbar B & Weirich G (1998) Trisomy 7-harboring non-random duplication of the mutant MET allele in hereditary papillary renal carcinomas. *Nat. Genet.* **20**: 66–69

Abreviaturas



ABREVIATURAS

aa	Aminoácidos
AG	Aparato de Golgi
AMPc	Adenosina 3'-5' monofosfato cíclico
Asn	Asparagina
BSA	Seroalbúmina bovina
cDNA	Ácido desoxirribonucleico copia
DEPC	Dietilpirocarbonato
DMSO	Dimetilsulfóxido
Dol-P	Dolicol fosfato
Dol-PP	Dolicol pirofosfato
Dox	Doxiciclina
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DTT	Ditiotreitol
CGD	Candida Genome Database
cDNA	Ácido desoxirribonucleico complementario
Cy3	Cianina 3-dCTP
Cy5	Cianina 5-dCTP
D.O	Densidad óptica
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
ERAD	Endoplasmic Reticulum Associated Degradation (degradación asociada a retículo endoplásmico)
<i>et al.</i>	Y colaboradores
5' FOA	Ácido 5-flouroorótico
Gal	Galactosa
Glc	Glucosa
GO	Go ontology
GPI	Glicosilfosfatadilinositol
Kb	Kilobases
M	Molar
Man	Manosa
N-AcGlc	N-Acetilglucosamina
mRNA	Ácido ribonucleico mensajero
nm	nanómetros

ORF	Marco de lectura abierto
pb	Pares de bases
PC	Pared celular
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
Pir	Protein with Internal Repeats
PP-Dol	Dolicol pirofosfato
rDNA	Ácido desoxirribonucleico ribosómico
RE	Retículo endoplásmico
RNA	Ácido ribonucleico
RNAsa	Ribonucleasa
rpm	Revoluciones por minuto
rRNA	Ácido ribonucleico ribosómico
RT-PCR	Transcripción reversa-Reacción en cadena de la polimerasa
SDS	Dodecil sulfatosódico
Ser	Serina
SNP	Single Nucleotide Polymorphisms (polimorfismo en un nucleotido)
SSC	Solución tampón de cloruro sódico y citrato de sodio
Thr	Treonina
Tris	Tris (hidroximetil) aminometano
tRNA	Ácido ribonucleico de transferencia
Tm	Tunicamicina
u.f.c	Unidades formadoras de colonias
<i>vs.</i>	<i>Versus</i> , contra
UGT	UDP-glucosa:glicoprotein glucosiltransferasa
µg	Microgramos
µl	Microlitro
µM	Micromolar
UPR	Unfolded Protein Response (respuesta a proteínas mal plegadas)
U.V	Ultravioleta

Material Suplementario



MATERIAL SUPLEMENTARIO

El material suplementario se encuentra en el disco que acompaña a esta memoria.

S I. Genes subexpresados *alg5* Δ *vs* CAI4

S II. Genes sobreexpresados *alg5* Δ *vs* CAI4

S III. Genes subexpresados *alg9* Δ *vs* CAI4

S IV. Genes sobreexpresados *alg9* Δ *vs* CAI4

S V. Genes subexpresados tunicamicina *vs* control

S VI. Genes sobreexpresados tunicamicina *vs* control

S VII. Genes que codifican proteínas ribosómicas, proteínas implicadas en biogénesis de ribosomas y biosíntesis de aminoácidos

