

Departamento de Microbiología y Genética

Instituto de Biología Funcional y Genómica



**VNiVERSiDAD
D SALAMANCA**

ACETILTRANSFERASAS DE HISTONAS EN
Candida albicans:
ANÁLISIS DEL PERFIL TRANSCRIPCIONAL

Memoria presentada por D^a. Rosa María Dégano Blázquez para optar al
grado de Doctor en Biología

2011

Dr. Ángel Domínguez Olavarri Catedrático de Microbiología de la Universidad de Salamanca

CERTIFICA:

Que la Tesis Doctoral titulada: “Acetiltransferasas de histonas en *Candida albicans*: Análisis del perfil transcripcional” presentada por la Lda: Rosa María Dégano Blázquez, ha sido realizada bajo su dirección en el Departamento de Microbiología y Genética de la Universidad de Salamanca.

Y para autorizar su presentación y evaluación por el tribunal correspondiente firma este certificado en Salamanca a de de 2011.

Fdo: Dr. Ángel Domínguez Olavarri

Dr. Ángel Domínguez Olavarri, Director del Departamento de Microbiología y Genética de la Universidad de Salamanca

CERTIFICA:

Que la memoria titulada: “Acetiltransferasas de histonas en *Candida albicans*. Análisis del perfil transcripcional” presentada por la Lda. Rosa María Dégano Blázquez, para optar al grado de Doctor en Biología, ha sido realizada bajo la dirección 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 de de 2011.

Fdo: Dr. Ángel Domínguez Olavarri

Este trabajo ha sido parcialmente financiado por los proyectos:

Glycoshield: surface modulation of the fungal and host response using a genomic approach. Redes del Espacio Europeo de Investigación (esquema ERA-NET). GEN2006-27775-C2-E/PAT.

“Histona acetiltransferasas en *Candida albicans* efecto sobre dimorfismo y virulencia. Una aproximación Post-genómica” (SA 141^a08). Junta de Castilla y León.

I. INTRODUCCIÓN

1. ASPECTOS GENERALES DE LA BIOLOGÍA DE <i>Candida albicans</i> . POSICIÓN TAXONÓMICA.....	1
2. IMPORTANCIA DEL GÉNERO <i>CANDIDA</i> COMO AGENTE PATÓGENO.....	4
2.1. Tratamiento de las candidiasis.....	6
2.2. Factores de virulencia de <i>Candida albicans</i>	8
2.3. Transición dimórfica en <i>Candida albicans</i>	12
2.4. Dimorfismo en <i>Candida albicans</i>	14
3. RUTAS DE TRANSDUCCIÓN DE SEÑALES.....	17
3.1. Ruta de proteínas quinasas activada por mitógeno (ruta MAPK).....	17
3.2. Ruta de la proteína quinasa A dependiente de cAMP (ruta PKA-cAMP).....	19
3.3. Otras rutas inductoras de la filamentación.....	24
3.4. Regulación negativa de la filamentación.....	25
4. EL OVILLO DINÁMICO DE LA VIDA: LA CROMATINA.....	27
4.1. Composición estructural de la cromatina.....	28
4.2. Mecanismos de regulación transcripcional. Características generales.....	30
4.3. Papel de los procesos de acetilación-desacetilación de histonas en la regulación transcripcional.....	32
4.4. El “código histona”.....	34
4.5. Complejos acetiltransferasa de histonas (complejos HATs).....	34
4.6. Complejos acetiltransferasa de histonas multifuncionales.....	38
4.7. Acetiltransferasa de histona 1 de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> , ScHat1p.....	39
4.8. Acetiltransferasa de histona 5 de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> , ScGcn5p.....	42
4.9. Acetiltransferasas de histonas en <i>Candida albicans</i>	45
5. ANÁLISIS DE LA REGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN GÉNICA MEDIANTE MICROARRAYS.....	45

II. OBJETIVOS

1. OBJETIVOS DE ESTE TRABAJO.....	49
-----------------------------------	----

III. MATERIALES Y MÉTODOS

1. MICROORGANISMOS UTILIZADOS.....	51
1.1. Cepas de <i>Candida albicans</i>	51
1.2. Cepas de <i>Escherichia coli</i>	52

2. MEDIOS Y CONDICIONES DE CULTIVO.....	52
2.1. Medios y condiciones de cultivo de <i>Escherichia coli</i>	52
- Medio LB	
2.2. Medios y condiciones de cultivo de <i>Candida albicans</i>	52
2.2.1. Crecimiento levaduriforme.....	53
- YNB	
- YEPD	
- Medio Lee	
- Medio Mínimo (también llamado medio SD) con sorbitol 1M	
- Medio Mínimo suplementado con 5-FOA y uridina	
2.2.2. Inducción del crecimiento filamentoso en medio sólido.....	54
- Medio embebido	
- Medio SLAD	
- Medio Spider	
- Medio Lee + 4% suero	
- Medio Lee + N-Acetil-glucosamina	
2.2.3. Inducción del crecimiento filamentoso en medio líquido.....	56
- Inducción por cambio de temperatura	
- Inducción por cambio de temperatura y presencia de suero	
- Inducción por cambio de pH	
- Inducción por N-acetilglucosamina (NAcGlc) y cambio de pH	
2.2.4. Inducción de la formación de clamidosporas.....	57
2.3. Mantenimiento de los microorganismos.....	58
3. PLÁSMIDOS UTILIZADOS.....	58
3.1. Plásmidos bacterianos.....	58
- pBluescript KS+ y SK+	
- pGEM-T	
3.2. Plásmidos utilizados en <i>Candida albicans</i>	59
- Plásmido pSNC1	
- Plásmido integrativo pYPB-ADH	
- Plásmido pAG1	
4. DELECCIÓN DE GENES EN <i>Candida albicans</i>	61
5. TRANSFORMACIÓN DE MICROORGANISMOS.....	62

5.1. Transformación de <i>Escherichia coli</i>	62
5.2. Transformación de <i>Candida albicans</i>	63
5.2.1. Inducción de la pérdida del marcador <i>URA3</i> y selección con 5-FOA.....	64
6. TÉCNICAS DE MANIPULACIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS.....	65
6.1. Aislamiento de DNA plasmídico de <i>Escherichia coli</i>	65
6.2. Aislamiento de DNA genómico de levaduras.....	66
6.3. Obtención de RNA total de levadura.....	67
6.4. Determinación de la concentración de ácidos nucleicos.....	67
6.5. Digestión del DNA con endonucleasas de restricción.....	68
6.6. Electroforesis de DNA en geles de agarosa.....	68
6.7. Purificación de fragmentos de DNA.....	69
6.8. Construcción de plásmidos recombinantes.....	69
6.9. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).....	69
6.9.1. Diseño de Oligonucleótidos.....	69
6.9.2. Condiciones de la reacción de PCR.....	70
6.10. Hibridación de ácidos nucleicos.....	71
6.10.1. Preparación de sondas marcadas radiactivamente.....	71
6.10.2. Detección de secuencias de DNA específicas: hibridación DNA-DNA o <i>SOUTHERN BLOT</i>	72
6.10.3. Detección de RNA mensajero: hibridación DNA-RNA o <i>NORTHERN BLOT</i>	73
7. MICROSCOPIA.....	75
7.1. Estereomicroscopía.....	75
7.2. Microscopía óptica.....	75
7.3. Tinciones.....	75
- Tinción de pared y septos celulares con <i>calcofluor white</i>	
- Tinción con DAPI y <i>calcofluor white</i>	
- Tinción con lactofenol-azul algodón (tinción de clamidosporas)	
- Tinción con azul de metileno	
8. MICROARRAYS DE cDNA: COMPARACIÓN DE PERFILES TRANSCRIPCIONALES.....	77
8.1. Características de los microarrays de <i>Candida albicans</i>	78
8.2. Diseño experimental llevado a cabo con microarrays de <i>Candida albicans</i>	80
8.3. Aislamiento de RNA total.....	81
8.4. Obtención de cDNA marcado con fluorocromos.....	82

8.5. Purificación, cuantificación y concentración de cDNA.....	83
8.6. Hibridación y lavado de microarrays.....	84
8.7. Análisis de los datos obtenidos.....	85
8.7.1. Identificación de los genes expresados diferencialmente.....	85
8.7.2. Comparación de datos de expresión diferencial en condiciones múltiples.....	87
8.7.3. Análisis de las categorías funcionales asociadas a expresión diferencial.....	87
9. PROGRAMAS DE OBTENCIÓN Y TRATAMIENTO INFORMÁTICO DE DATOS.....	88
IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	
1. INTERRUPCIÓN DE LOS GENES <i>CaGCN5</i> , <i>CaHAT1</i> Y <i>CaHAT2</i> DE <i>C. albicans</i>	91
1.1. Genes con función acetiltransferasa de histonas de la base de datos <i>CandidaDB</i>	91
2. LA SECUENCIA NUCLEOTÍDICA DEL GEN <i>GCN5</i> DE <i>Candida albicans</i>	93
2.1. Análisis de la región 5' no codificante.....	93
2.2. Análisis de la región 3' no codificante del gen <i>GCN5</i>	96
2.3. Estudio de la región codificante del gen <i>GCN5</i>	96
2.4. Análisis de la secuencia de aminoácidos de la proteína Gcn5p.....	97
3. ESTUDIO DE LA EXPRESIÓN DEL GEN <i>GCN5</i> DE <i>Candida albicans</i>	100
4. CONSTRUCCIÓN DEL <i>CASSETTE</i> DE INTERRUPCIÓN DEL GEN <i>GCN5</i>	101
5. OBTENCIÓN DEL MUTANTE HOMOCIGÓTICO EN EL GEN <i>GCN5</i>	102
6. COMPLEMENTACION DE LA DELECIÓN DEL GEN <i>GCN5</i>	104
7. LOCALIZACIÓN DE LA PROTEÍNA Gcn5p FUSIONADA A LA PROTEÍNA GFP.....	107
8. ANÁLISIS FENOTÍPICO DE LOS MUTANTES OBTENIDOS.....	110
8.1. Efecto de la delección de <i>GCN5</i> en el crecimiento y la morfología celular a 28°C.....	110
8.2. Efecto de la delección <i>GCN5</i> en filamentación.....	112
8.2.1. Análisis de la capacidad de filamentación en medio sólido.....	112
8.2.2. Análisis de la capacidad de filamentación en medio líquido.....	114
8.2.3. Efecto de la delección de <i>GCN5</i> en la formación de clamidosporas.....	117
9. PERFIL TRANSCRIPCIONAL DE LACEPA RDG4-6 (<i>gcn5/gcn5</i>).....	120
9.1. Efecto de la delección del gen <i>GCN5</i> en la regulación de la expresión génica.....	120
9.2. Análisis del perfil transcripcional de la cepa RDG4-6 (<i>gcn5/gcn5</i>) durante el crecimiento exponencial a 28°C. Distribución de los genes expresados diferencialmente en categorías funcionales.....	122
9.3. Análisis del perfil transcripcional de la cepa RDG4-6 (<i>gcn5/gcn5</i>) durante la transición dimórfica a 37°C.....	133

10. LA SECUENCIA NUCLEOTÍDICA DEL GEN <i>HAT1</i> DE <i>Candida albicans</i>	143
10.1. Análisis de la región 5' no codificante del gen <i>HAT1</i>	145
10.2. Análisis de la región 3' no codificante del gen <i>HAT1</i>	146
10.3. Estudio de la región codificante del gen <i>HAT1</i>	146
10.4. Análisis de la secuencia de aminoácidos de la proteína Hat1p.....	147
11. ESTUDIO DE LA EXPRESIÓN DEL GEN <i>HAT1</i> DE <i>Candida albicans</i>	149
12. CONSTRUCCIÓN DEL CASSETTE DE INTERRUPCIÓN DEL GEN <i>HAT1</i>	150
13. OBTENCION DEL MUTANTE HOMOCIGÓTICO EN EL GEN <i>HAT1</i>	151
14. ANÁLISIS FENOTÍPICO DE LOS MUTANTES OBTENIDOS.....	153
14.1. Efecto de la deleción del gen <i>HAT1</i> en el crecimiento y la morfología celular a 28°C.....	153
14.2. Efecto de la deleción del gen <i>HAT1</i> en filamentación.....	157
14.2.1. Análisis de la capacidad de filamentación en medio sólido.....	157
14.2.2. Análisis de la capacidad de filamentación en medio líquido.....	159
14.2.3. Efecto de la deleción del gen <i>HAT1</i> en la formación de clamidosporas.....	162
15. PERFIL TRANSCRIPCIONAL DE LACEPA RGL4-4 (<i>hat1/hat1</i>).....	162
15.1. Efecto de la deleción del gen <i>HAT1</i> en la regulación de la expresión génica.....	163
15.2. Análisis del perfil transcripcional de la cepa RGL4-4 (<i>hat1/hat1</i>) durante el crecimiento exponencial a 28°C. Distribución de los genes expresados diferencialmente en categorías funcionales.....	164
15.3. Análisis del perfil transcripcional de la cepa RGL4-4 (<i>hat1/hat1</i>) durante la transición dimórfica a 37°C.....	169
16. LA SECUENCIA NUCLEOTÍDICA DEL GEN <i>HAT2</i> DE <i>Candida albicans</i>	175
16.1. Análisis de la región 5' no codificante del gen <i>HAT2</i>	177
16.2. Análisis de la región 3' no codificante del gen <i>HAT2</i>	178
16.3. Estudio de la región codificante del gen <i>HAT2</i>	178
16.4. Análisis de la secuencia de aminoácidos de la proteína Hat2p.....	179
17. CONSTRUCCIÓN DEL CASSETTE DE INTERRUPCIÓN DEL GEN <i>HAT2</i>	181
18. OBTENCION DEL MUTANTE HOMOCIGÓTICO EN EL GEN <i>HAT2</i>	183
19. ANÁLISIS FENOTÍPICO DE LOS MUTANTES OBTENIDOS.....	185
19.1. Efecto de la deleción del gen <i>HAT2</i> en el crecimiento y la morfología celular a 28°C.....	185
19.2. Efecto de la deleción del gen <i>HAT2</i> en filamentación.....	186
19.2.1. Análisis de la capacidad de filamentación en medio sólido.....	186

19.2.2. Análisis de la capacidad de filamentación en medio líquido.....	187
20. COMPARACIÓN DE LOS DATOS DE EXPRESIÓN DIFERENCIAL DE LAS CEPAS RGL4-4 (<i>hat1/hat1</i>) y RDG4-6 (<i>gcn5/gcn5</i>).....	191
21. VALIDACIÓN MEDIANTE <i>NORTHERN BLOT</i> DE LOS DATOS DE EXPRESIÓN DIFERENCIAL OBTENIDOS EN LOS MICROARRAYS.....	194
V. CONCLUSIONES	197
VI. BIBLIOGRAFÍA	199
VII. AGRADECIMIENTOS	219

ABREVIATURAS

A _{xnm} :	absorbancia a x nanómetros
cAMP:	adenosin monofosfato ciclico
cDNA:	DNA complementario
5-FOA:	ácido 5'-flouorótico
D.O _{600nm} :	densidad óptica a 600nm
DAPI:	4',6-diamidino-2-fenil indol diclorhidrato
DEPC:	dietilpirocarbonato
DNA:	ácido desoxirribonucleico
dNTPs :	desoxirribonucleótidos trifosfato
DTT:	ditiotreitól
EDTA:	ácido etilendiaminotetraacético
h:	hora/s
H ₂ O MilliQ:	agua ultrapura obtenida con el sistema <i>Milli-Q</i> TM de Millipore
IPTG:	isopropil tio-β-D-galactósido
kb:	kilobase
kDa:	kilodalton
ml:	mililitro
mM:	milimolar
MOPS:	ácido-3-(N-morfolino)-propanosulfónico
ng:	nanogramo
ORF:	<i>open reading frame</i> – marco de lectura abierta
pb:	pares de bases
PCR:	reacción en cadena de la polimerasa
pmoles:	picomoles
RNA:	ácido ribonucleico
SDS:	dodecil sulfato de sodio
SSC:	tampón salino sodio citrato
X-Gal:	5-bromo-4-cloro-3-indolil-β-D-galactopiranosido
μl:	microlitro

I. INTRODUCCIÓN

El reino de los hongos incluye numerosas especies distribuidas ampliamente en la naturaleza. Su aportación biológica es de gran importancia ya que por ejemplo intervienen en el reciclaje de materia orgánica y establecen relaciones simbióticas con otros organismos. En los ámbitos industrial y sanitario, numerosas especies proporcionan ácidos orgánicos, vitaminas, antibióticos, fármacos, etc. Algunos sirven de alimento al hombre o participan en procesos tradicionales de gran importancia económica, i.e. elaboración de pan, cerveza, vino y quesos.

Existen especies fúngicas que pueden causar infecciones en plantas y animales y algunas de ellas son capaces de colonizar al ser humano produciendo enfermedades denominadas micosis.

En los últimos años la incidencia de las infecciones fúngicas ha ido en aumento, siendo *Candida albicans* el principal agente etiológico aislado en estas patologías. Este hecho, junto con el desconocimiento de la fisiología y genética de *C. albicans*, ha llevado al estudio exhaustivo de este microorganismo que podemos considerar como modelo de hongo patógeno.

C. albicans es un hongo oportunista capaz de crecer adoptando diferentes morfologías según las condiciones del medio por lo que además resulta útil como modelo en estudios de diferenciación celular. La transición levadura-hifa, uno de los procesos reversibles que lleva a cabo *C. albicans*, resulta ser un buen modelo para el estudio de procesos de diferenciación a todos los niveles incluido el nivel transcripcional.

Hasta hace poco, mediante las técnicas habitualmente usadas en Biología Molecular se podían estudiar los genes, proteínas e interacciones que se establecen durante los procesos de diferenciación solamente a nivel individual. Sin embargo las técnicas de Genómica y Proteómica desarrolladas en los últimos años, nos permiten analizar cambios en la expresión de todos o casi todos los genes y proteínas de una célula a nivel global.

En *C. albicans*, el cambio dimórfico es uno de los principales factores de virulencia, por lo que resulta de gran interés su estudio. Los análisis de Genómica funcional resultan de gran utilidad para tratar de dilucidar la relación entre morfogénesis y virulencia en este patógeno.

1. ASPECTOS GENERALES DE LA BIOLOGÍA DE *Candida albicans*.

POSICIÓN TAXONÓMICA

El género *Candida* comprende unas doscientas especies de levaduras muy diferentes que comparten reproducción asexual por gemación y se diferencian por el tamaño y la morfología, que suele ser levaduriforme (blastosporas o blastoconidios), aunque también aparecen formas capaces de formar pseudomicelio por gemación a partir de blastosporas, y algunas especies, como *Candida albicans* bajo ciertas condiciones forman verdaderos micelios al emitir tubos germinativos que dan lugar a la formación de hifas septadas, que se

distinguen del pseudomicelio por el grosor y por la ausencia de constricciones intercelulares (Odds, 1988; Soll *et al.*, 1985).

Otras características de diferenciación son su capacidad para asimilar y fermentar distintos compuestos y la composición de los polisacáridos extracelulares de la pared celular (Kurtz *et al.*, 1988).

Habitualmente, las especies del género *Candida* se incluían en la clase Deuteromycetes que comprende los llamados “hongos imperfectos” por carecer de ciclo sexual conocido.

Actualmente el género *Candida* se ha incluido dentro de los ascomicetos según la clasificación que se muestra en la tabla I (Calderone, 2002).

Tabla I: Clasificación taxonómica de *Candida albicans*.

Clasificación taxonómica
Reino: Fungi
Phylum: Ascomycota
Clase: Hemiascomycetes
Familia: Candidaceae
Género: <i>Candida</i>

Esta nueva clasificación se basa principalmente en la comparación de secuencias génicas que indican una relación filogenética más estrecha con especies de hongos ascomicetos (Calderone, 2002).

La existencia de una fase sexual en algunas especies del género *Candida* ha permitido clasificarlas dentro del grupo de los ascomicetos, modificándose incluso el nombre, sin embargo otras especies sobre todo las patógenas, mantienen su designación como especies de *Candida* (ej. *C. krusei*). (Hull *et al.*, 2000)

Hasta hace algunos años, se pensaba que *C. albicans* carecía de ciclo sexual existiendo únicamente como un organismo diploide obligado, por lo que se incluía entre los “hongos imperfectos”. Sin embargo en los últimos años se han publicado trabajos sobre la existencia de ciclo sexual en esta levadura (Hull & Johnson, 1999; Hull *et al.*, 2000; Magee & Magee, 2000; Magee & Magee, 2004; Soll *et al.*, 2003).

Muchos de los genes implicados en el ciclo sexual de *Saccharomyces cerevisiae* tienen sus ortólogos en el genoma de *C. albicans*. Se ha demostrado que se forman cultivos tetraploides bajo condiciones de laboratorio y en condiciones *in vivo* en algunos mamíferos. Los análisis poblacionales de los aislados clínicos demuestran también el intercambio genético que llevan a cabo los diferentes cultivos. Aunque existen similitudes, en el ciclo sexual de *C. albicans* también aparecen diferencias importantes con *S. cerevisiae* y otros hongos. Por ejemplo, el apareamiento en *C. albicans* está regulado específicamente por el cambio fenotípico blanco-opaco, esto es, las cepas homocigotas en el locus MTL (*Mating*

Type-Like) pueden cambiar reversiblemente entre dos estados heredables conocidos como blanco y opaco y solamente la forma opaca es competente a la hora de llevar a cabo un apareamiento eficiente.

Otra característica interesante es el hecho de que aunque aún no se ha observado un mecanismo de divisiones meioticas para la reducción del contenido de DNA, sí se ha observado cómo las células tetraploides alcanzan el estado diploide mediante un mecanismo parasexual. Durante este proceso, en las células tetraploides se induce una pérdida de cromosomas de un modo aparentemente aleatorio, en el que se generan células con un contenido de DNA diploide o casi diploide. El *locus* MTL, responsable del apareamiento, segrega aleatoriamente de modo que en la progenie de células se encuentran células diploides de tipo α y de tipo α competentes (Bennett & Johnson, 2003).

Dentro del género *Candida* se encuentran especies que causan patologías infecciosas en el hombre de gran importancia, como *C. albicans* y *C. tropicalis*. y otras especies patógenas menos frecuentes como *C. glabrata*, *C. krusei* (*Issatchenkia orientalis*), *C. guilliermondii* (*Pichia guilliermondii*), *C. parapsilosis*, *C. dubliniensis*, *C. viswanathii*, *C. inconspicua*, *C. kefyr* (*Kluyveromyces marxianus*), *C. lusitaniae* (*Clavispora lusitaniae*), *C. pseudotropicalis* (*Debaryomyces hansenii*) (Calderone, 2002; Odds, 1988).

C. albicans es la especie mejor estudiada de su género, ya que es la que se aísla con mayor frecuencia en candidiasis, ocasionando más del 90 % de las micosis causadas por patógenos oportunistas en humanos. Se han establecido varios biotipos dentro de la especie basándose en similitudes fenotípicas y de DNA (Odds, 1988).

C. albicans se caracteriza por ser un microorganismo unicelular diploide y polimórfico. Mediante la técnica de separación de cromosomas en campo pulsante, CHEF, se pusieron de manifiesto las diferencias en el cariotipo entre las diferentes cepas de *C. albicans*, detectándose un número de cromosomas que variaba entre 5 y 16, estableciéndose un consenso de 8, numerándose como 1 al de mayor tamaño y 7 al de menor tamaño. El cromosoma restante contiene el ADN ribosomal por lo que se denominó R y como su tamaño puede variar, se asume su localización en distintas posiciones en una electroforesis tipo CHEF (Mahrous *et al.*, 1990).

En el año 2000 se publicó la secuencia completa del genoma de *C. albicans*, proyecto llevado a cabo por el *Stanford Genome Center* partiendo de DNA de la cepa SC5314. Dicha estirpe fue elegida por ser un aislado clínico usado habitualmente en análisis moleculares y ensayos de virulencia y poseer un cariotipo estándar. Se ha estimado que el genoma haploide de *C. albicans* comprende aproximadamente 16 Mb, siendo por tanto un 30% mayor que el de *S. cerevisiae* (Jones *et al.*, 2004). Se han realizado sucesivos ensamblajes de las secuencias que han sido publicados en la página <http://www.candidagenome.org/>.

Recientemente se ha publicado el ensamblaje 21 que describe el genoma de *Candida albicans* en 6 supercontigs alineados en los 8 cromosomas. Este ensamblaje resuelve los problemas de contaminación con secuencias de la cepa WO-1 de *C. albicans* que se produjo en el ensamblaje 20. Contiene 6109 genes incluyendo 13 ORFs mitocondriales, 352 genes con intrones en la región codificante y 156 secuencias de genes que codifican tRNA, 30 de los cuales son mitocondriales.

El mapeo óptico se basa en la comparación de mapas de restricción de genomas enteros sin necesidad de conocer la secuencia. La comparación se realiza con el programa *Optical Mapping* de la empresa <http://www.opgen.com>, que compara un mapa desconocido con otro de referencia, encontrando así los reordenamientos genómicos que se hayan podido producir, como deleciones, inserciones, translocaciones y duplicaciones. Esta es otra de las herramientas disponibles en la página <http://www.candidagenome.org> para trabajar con el ensamblaje 21 y que resultará de utilidad para detectar la variación genómica asociada a diferentes fenotipos (van het Hoog *et al.*, 2007).

La comparación del genoma de *C. albicans* con el de otras especies es de gran interés, así por ejemplo determinar qué genes se encuentran únicamente en especies fúngicas y no en mamíferos resulta muy útil a la hora de desarrollar nuevos agentes antifúngicos. El hecho de ser un organismo diploide, con un elevado grado de variación alélica, sin ciclo sexual bien establecido, y con un uso de codones diferente al de *S. cerevisiae* (el codón CUG es traducido por serina en lugar de leucina) ha dificultado los estudios a nivel molecular de *C. albicans*. A pesar de ello, en los últimos años se han desarrollado una serie de herramientas que han permitido avanzar en su estudio, por lo que actualmente existen cepas carentes de genes que sirven de marcadores, sistemas de transformación eficientes y estrategias para la deleción secuencial de genes (Fonzi & Irwin, 1993; Morschhauser *et al.*, 1999; Negredo *et al.*, 1997; Wilson *et al.*, 2000).

2. IMPORTANCIA DEL GÉNERO *CANDIDA* COMO AGENTE PATÓGENO

Candida albicans es una levadura ampliamente distribuida en la naturaleza, que se encuentra como comensal inocuo en la piel y en las mucosas de los mamíferos. Suele aislarse de la cavidad oral, en el tracto gastrointestinal formando parte de la flora normal y en la flora vaginal, donde existe en equilibrio con la microbiota y el sistema inmunitario del hospedador. En individuos sanos suele encontrarse de forma saprofita, pero bajo determinadas condiciones puede invadir cualquier tejido del cuerpo desde su hábitat normal, y manifestar carácter patógeno, por lo que es considerada como un patógeno oportunista (Hube & Naglik, 2001).

C. albicans, como patógeno oportunista, puede producir distintos tipos de patologías llamadas genéricamente candidiasis, término que se refiere a cualquier infección causada por especies del género *Candida*, siendo la especie *C. albicans* la más frecuentemente aislada en

las infecciones nosocomiales, aunque en los últimos años ha aumentado el aislamiento de otras especies.

La incidencia de las candidiasis en las últimas décadas ha aumentado considerablemente debido a la concurrencia de varios factores que hacen que hongos habitualmente saprófitos se conviertan en patógenos oportunistas. Entre estos factores se pueden citar, el empleo de materiales terapéuticos (catéteres, sondas, etc.) que favorecen la entrada del microorganismo; la utilización de antibióticos de amplio espectro que reducen la flora bacteriana intestinal normal, y al presentar escasa o nula toxicidad para los hongos, permite un mayor desarrollo de hongos potencialmente patógenos, principalmente en pacientes con defensas disminuidas; la aplicación de tratamientos inmunosupresores como las terapias anticancerosas ó las que se aplican tras realizar trasplantes de órganos, y los tratamientos con corticosteroides. Por último, otras enfermedades subyacentes (diabetes, enfermedades inflamatorias del tracto gastrointestinal, pancreatitis, quemaduras, etc.), así como el estado de inmunodepresión general inherente a ciertos cuadros clínicos y enfermedades (infección por VIH, hemopatías malignas, etc.), son factores que favorecen claramente la aparición de candidiasis (Agabian *et al.*, 1994; Bodey, 1993; Dixon *et al.*, 1996; Kurtz *et al.*, 1988; Odds, 1988).

Por tanto, la relación entre el hongo y los mecanismos de defensa del hospedador es crucial en el establecimiento de la candidiasis.

Las candidiasis o infecciones por *Candida* se clasifican en superficiales y profundas. Las candidiasis superficiales afectan a piel y mucosas e incluyen, entre otras, las candidiasis vaginal, oral y mucocutánea crónica. Las candidiasis profundas pueden ser localizadas cuando afectan a uno o más órganos, aunque generalmente van acompañadas de septicemias, denominándose entonces candidiasis diseminada o sistémica. Las infecciones sistémicas son las más peligrosas, afectando principalmente a individuos inmunocomprometidos. Tanto su diagnóstico como su tratamiento son poco eficaces (Calderone, 2002; Myskowski *et al.*, 1997; figura1).

En España, en relación con la incidencia de micosis, los datos del año 2002 reseñados en el Boletín Epidemiológico Semanal (Centro Nacional de Epidemiología del Instituto de Salud Carlos III), muestran un aumento de las micosis cutáneas, subcutáneas en mucosas y sistémicas en comparación con los años anteriores. En el caso de las micosis sistémicas, las producidas por el género *Candida* suponen un 60% de las totales, siendo un 37% las producidas por *C. albicans*.

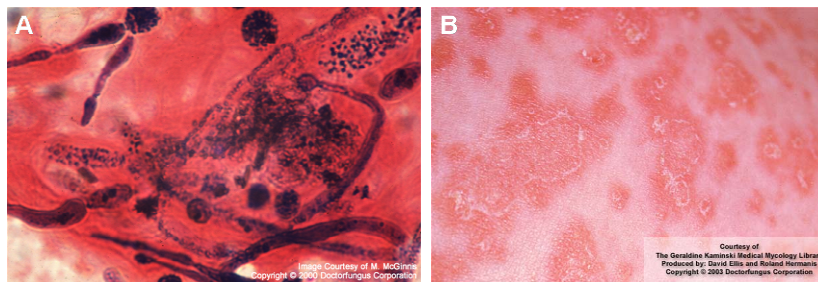


Fig.1.- Morfología de *C. albicans* en tejidos infectados. A) Preparación histológica de tejido de corazón sometida a tinción de Gram (www.doctorfungus.org). Las células de *C. albicans*, Gram +, aparecen en forma de pseudohifa y levadura. B) Imagen de lesiones cutáneas producidas por *C. albicans*. La aparición de lesiones satélite alrededor de los anillos o collares blanquecinos suele usarse para diferenciar una dermatofitosis de una candidiasis dérmica (www.doctorfungus.org).

Según el último estudio publicado en el año 2005, la tasa de mortalidad asociada a candidiasis sistémica en España es del 40.6%, valor similar al estimado en otros países (Peman *et al.*, 2005). En la tabla II se muestra una relación de los tipos de candidiasis.

Tabla II. Tipos de candidiasis

CANDIDIASIS SUPERFICIALES	CANDIDIASIS PROFUNDAS
Candidiasis mucosas	Candidiasis localizadas
Candidiasis orofaríngeas	Peritonitis candidiásica
Vulvovaginitis candidiásica	Esofagitis candidiásica
Candidiasis cutáneas	Pielitis candidiásica
Intértrigo	Candidiasis sistémicas
Foliculitis	Endocarditis candidiásica
Candidiasis ungueales	IV síndrome de abuso de drogas
Onicomycosis	Candidiasis hepatoesplénica
Paroniquia	(Candidiasis crónica diseminada)
Otras	Candidiasis sistémica asociada a
Otitis externa micótica	alimentación parental
Queratitis candidiásica	Candidiasis sistémica neonatal

2.1. Tratamiento de las candidiasis

Las candidiasis superficiales son tratadas con los fármacos antifúngicos disponibles y no suelen presentar complicaciones sin embargo, las candidiasis sistémicas requieren el empleo de altas dosis de fármacos que pueden llegar a ser tóxicas para el individuo desencadenando una depresión medular que agrava el estado de inmunosupresión de la mayoría de los pacientes.

Dada la gran similitud entre las células fúngicas y las de mamífero en su organización subcelular y molecular, el desarrollo de fármacos antifúngicos efectivos que actúen selectivamente sobre el hongo y presenten baja o nula toxicidad para el hospedador está limitado por la falta de dianas específicas siendo la búsqueda de dianas potenciales para nuevos antifúngicos un campo de gran interés.

Los agentes antifúngicos disponibles son escasos y pertenecen a un grupo limitado de clases químicas. La anfotericina B que actúa sobre el ergosterol presente en la membrana plasmática de las células fúngicas se desarrolló en la década de los 50 y todavía se considera como uno de los tratamientos más eficaces para infecciones fúngicas graves, aunque su uso está limitado a los casos en que existe amenaza de la vida del paciente debido a su alta toxicidad.

La flucitosina se empezó a utilizar en la década de los 60, resultando útil únicamente en combinación con anfotericina B. A finales de los años 70 aumentaron las opciones para el tratamiento de infecciones sistémicas con el desarrollo de los azoles miconazol y ketoconazol.

En la siguiente década se puso a punto una nueva generación de azoles: el fluconazol y el itraconazol, que son los compuestos empleados con más frecuencia en la actualidad, aunque existen muchas ocasiones en las que no resultan útiles por su falta de eficacia contra algunos patógenos y la aparición de resistencias (De Backer *et al.*, 2000).

En los últimos años se han desarrollado compuestos azólicos más potentes y ha aparecido una nueva familia de agentes antifúngicos que interfieren en la biosíntesis de la pared celular, las equinocandinas, entre las que cabe destacar la caspofungina. Este compuesto fue aprobado en 2001 por la EMEA (Agencia Europea de Evaluación del Medicamento) para el tratamiento de aspergilosis y candidiasis invasivas. Este compuesto parece ser tan eficaz como la anfotericina B y aunque tiene menos efectos secundarios, también presenta toxicidad (Carrillo-Muñoz *et al.*, 2001).

Otra equinocandina de reciente aparición es la anidulafungina. Se trata de un lipopéptido obtenido a partir de un producto de fermentación de *Aspergillus nidulans*. Anidulafungina inhibe selectivamente la enzima 1,3- β -D-glucanosintetasa impidiendo la formación de 1,3- β -D-glucano, componente esencial de la pared celular fúngica. Este compuesto ha demostrado actividad fungicida frente a especies de *Candida* y frente a *Aspergillus fumigatus*. Se utiliza principalmente para tratar las candidiasis invasivas (Sabot & Gumbo, 2008).

2.2. Factores de virulencia de *Candida albicans*

La capacidad patógena de *C. albicans* siendo comensal depende principalmente del estado fisiológico del hospedador ya que ligeras alteraciones determinan la forma de crecimiento, de modo que la frontera que separa la forma comensal inocua de la patógena es muy estrecha.

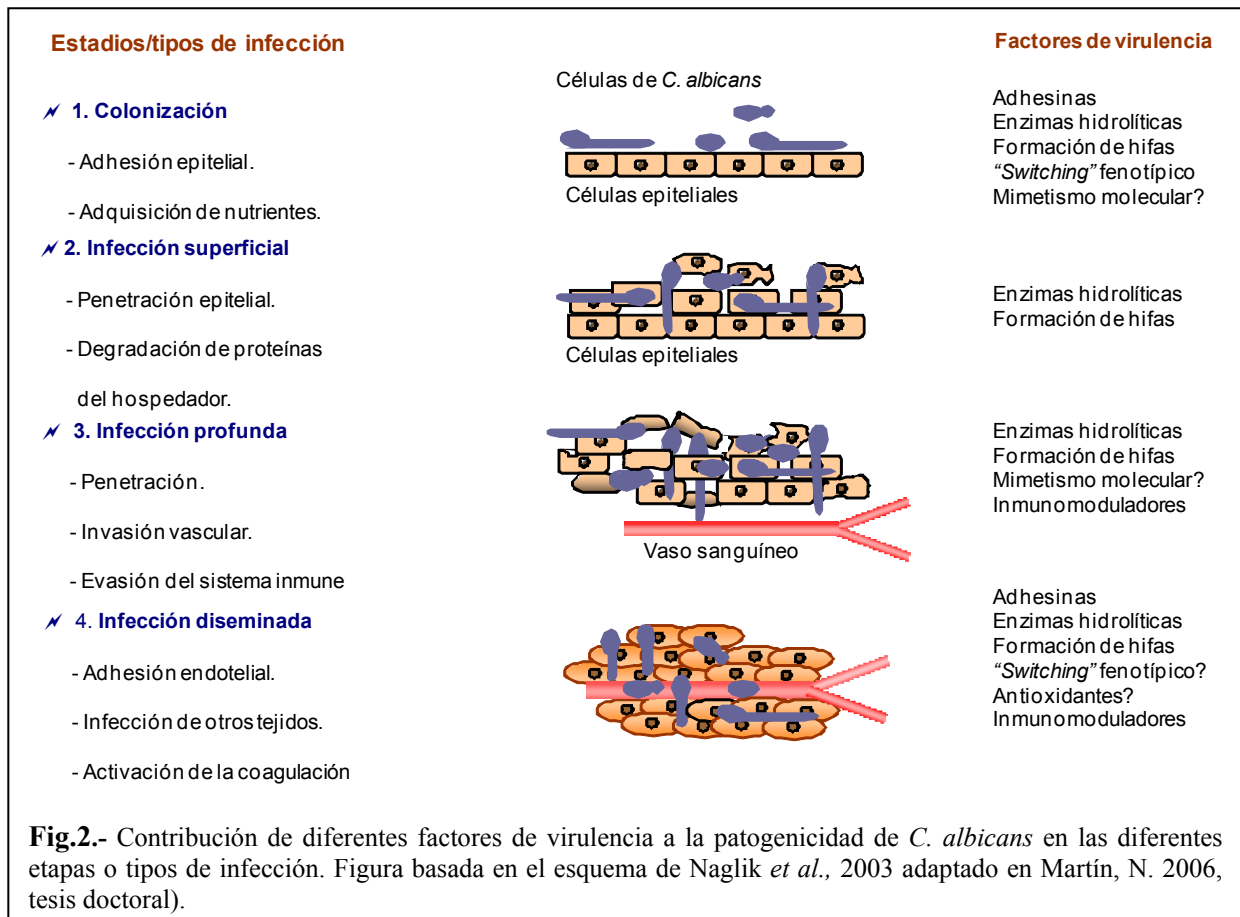
Para poder considerar una propiedad como factor de virulencia, las investigaciones que se realizan tratan de demostrar que las cepas carentes de dicha propiedad no son capaces de establecer infecciones pero si pueden vivir como comensales.

Las infecciones causadas por *C. albicans* están condicionadas por diferentes combinaciones de estos factores de virulencia, y aparecen tras varias etapas secuenciales como se muestra en la figura 2 (Naglik *et al.*, 2003).

La adhesión a la superficie de las células del hospedador inicia el proceso, facilitándose así la colonización del tejido. Se han descrito proteínas relacionadas con esta etapa de adhesión como es la familia formada por las proteínas Als1p, Als3p, Int1p y Hwp1p. Als1p y Als3p, glicoproteínas con similitud a la α -aglutinina de *Saccharomyces cerevisiae* (Calderone & Fonzi, 2001; Zhao *et al.*, 2004).

Hwp1p es una manoproteína específica de la pared celular de las hifas que podría actuar como sustrato de la trasglutaminasa, enzima que establece enlaces covalentes entre proteínas de células epiteliales, lo que significaría que la adherencia de las hifas a las células epiteliales se produce a través de uniones covalentes muy estables. Int1p presenta similitud con proteínas de unión a fibrinógeno.

La hidrofobicidad celular es una propiedad química que favorece el proceso de adhesión celular. El estudio de varias proteínas hidrofóbicas muestra un nivel de glicosilación menor que el de proteínas hidrofílicas. En relación con esto se ha observado que varios genes de la ruta de manosilación como *MNT1* y *PMT1* son esenciales para la adherencia a células del hospedador y la virulencia de *C. albicans* (Buurman *et al.*, 1998; Timpel *et al.*, 1998).



Otro factor de virulencia es la secreción de fosfolipasas y aspartilproteasas. Se ha demostrado que la fosfolipasa Plb1p, cuya actividad se localiza en el extremo de las hifas durante la invasión de los tejidos, es necesaria para la virulencia en algunos modelos de candidiasis (Calderone & Fonzi, 2001; Hube *et al.*, 1997; Hube & Naglik, 2001; Leidich *et al.*, 1998).

Las aspartilproteasas son proteínas codificadas por una familia de 10 genes que se expresan diferencialmente en condiciones *in vitro* y durante los experimentos de infección. Algunas de estas proteínas son esenciales en las infecciones sistémicas y de mucosas, estando implicadas en la adherencia y daño tisular. Se ha demostrado que algunos mutantes en genes de esta familia (*SAPI-SAP6*) son menos virulentos y la inhibición de la actividad proteínica por la pepstantina A disminuye la capacidad de invasión y adherencia de las células de *C. albicans* (Hube *et al.*, 1997; Hube & Naglik, 2001).

Otra de las características de *C. albicans* que se ha venido considerando como factor de virulencia, es su propiedad de intercambio entre la forma de crecimiento levaduriforme y la filamentosa. Se ha demostrado que mutantes que sólo pueden crecer en una morfología, ya sea levadura, hifa o pseudohifa, presentan virulencia atenuada. Algunos genes que participan en el proceso de morfogénesis y cuya mutación causa disminución de la virulencia son *EFG1*,

CPHI, *TEC1*, *RIM101* y *NRG1* (Braun & Johnson, 2000; Calderone & Fonzi, 2001; Lo *et al.*, 1997; Murad *et al.*, 2001).

La formación de hifas durante el proceso infeccioso facilita la penetración de los tejidos, al tiempo que entorpece el mecanismo de fagocitosis de los macrófagos, escapando así a la acción del sistema inmune. Además se ha demostrado que las hifas son más resistentes que las levaduras a la acción proteolítica generada por los macrófagos. Por otro lado, la forma levaduriforme parece constituir un buen sistema de diseminación a través del torrente sanguíneo (Blasi *et al.*, 1995; Cutler, 1991; Naglik *et al.*, 2003).

Otro de los cambios fenotípicos reversibles espontáneos o “*switching*” descrito en *C. albicans* es la transición blanco-opaco. Este cambio supone la alteración de varios genes relacionados con virulencia pertenecientes a la familia de las aspartilproteasas, como *SAP1* y *SAP3* característicos de la fase opaca y *SAP2* específico de la fase blanca. Este cambio va unido a cambios en la expresión de antígenos y especificidad de tejido. Los aislados de

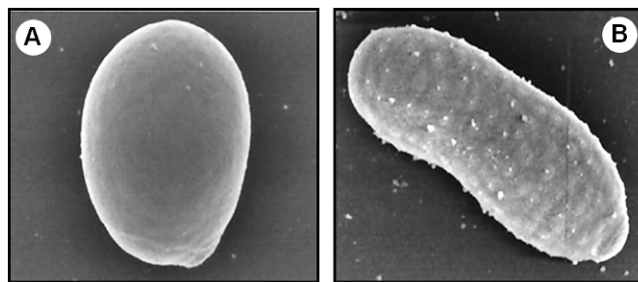


Fig.3.- Transición fenotípica blanco-opaco en *C. albicans*. A) Morfología observada con el microscopio electrónico de barrido de células de la fase blanca y B) de la fase opaca, donde puede observarse la superficie granulada característica de esta fase (Srikantha *et al.*, 2001).

pacientes infectados muestran una frecuencia del proceso de “*switching*” mayor que las cepas mantenidas en laboratorio, lo cual hace pensar en una posible relación entre el desarrollo de la enfermedad y el cambio espontáneo fenotípico (Calderone & Fonzi, 2001; figura 3).

La utilización de microarrays ha permitido identificar muchos genes cuyo nivel de expresión varía entre las fases blanco-opaco, encontrando principalmente cambios en genes que intervienen en metabolismo. El perfil transcripcional de las células en fase blanca se corresponde sobre todo con el metabolismo fermentativo, de modo que se expresan en mayor nivel genes implicados en glucólisis y transporte de azúcares. Las células en fase opaca muestran un perfil transcripcional preferentemente oxidativo ya que se sobreexpresan mayoritariamente genes del ciclo de Krebs (Lan *et al.*, 2002).

Otro factor de virulencia descrito en *C. albicans* es el tigmotropismo, esto es, la capacidad de un organismo para adaptar su crecimiento según la topografía del ambiente. En base a esto, las hifas tienden a ubicarse en las irregularidades del tejido favoreciendo su invasión (Gow *et al.*, 1994).

En el interior del hospedador, *C. albicans* puede establecer interacciones con otros microorganismos. A veces, compete con especies que comparten los mismos receptores epiteliales y en otros casos, determinadas bacterias probióticas del género *Lactobacillus*, protegen contra la candidiasis mucosa y sistémica modulando la respuesta inmune del hospedador.

Una característica muy interesante del crecimiento de *C. albicans*, es que puede crecer sobre superficies formando *biofilms* o biopelículas. Los *biofilms* son comunidades estructuradas de microorganismos en los que las células se unen firmemente a una superficie y quedan embebidas en una matriz de sustancias poliméricas extracelulares producidas por

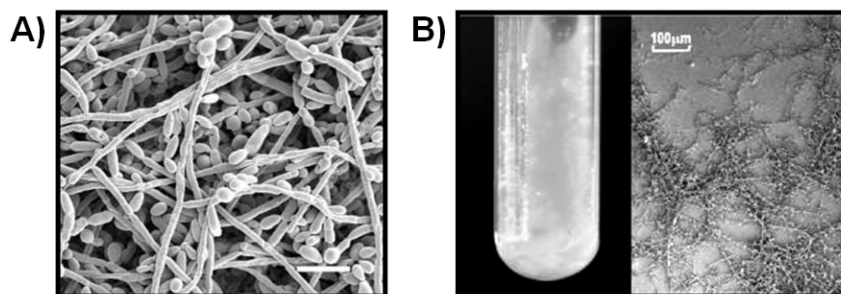


Fig.4.- Formación de *biofilms*. A) Microscopía electrónica de barrido de *biofilms* formados por células de la cepa SC5314 de *C. albicans* (Alem & Douglas, 2005) y B) sobre una lámina de plástico, dentro de un microfermentador (García-Sánchez *et al.*, 2004).

estas células. En estas comunidades se han llegado a describir relaciones de sinergismo con bacterias patógenas. Así en algunos *biofilms* se han observado interacciones físicas entre *C. albicans* y estafilococos, lo que sugiere que posiblemente las bacterias estarían impidiendo el contacto de los antifúngicos con la biopelícula, mientras que las células de *C. albicans* dificultarían el acceso de los antibióticos (Adam *et al.*, 2002; Wagner *et al.*, 1997; figura 4).

En estas comunidades celulares, *C. albicans* muestra características fenotípicas diferentes a esas mismas células creciendo planctónicamente.

Cuando la biopelícula está completamente desarrollada, exhibe una arquitectura muy heterogénea compuesta de elementos celulares y no celulares. En *C. albicans* están formados por una mezcla de levaduras, hifas y pseudohifas y una matriz extracelular constituida por polisacáridos y proteínas.

El estudio de los *biofilms* generados por *C. albicans* es de gran interés médico, ya que muchas de las candidiasis están asociadas con la formación de estas estructuras en implantes médicos, los más comunes, catéteres vasculares y urinarios, prótesis, válvulas cardíacas, marcapasos e incluso lentes de contacto y dentaduras postizas. Lo más característico además, es su marcada resistencia al tratamiento con antifúngicos (García-Sánchez *et al.*, 2004; Nett & Andes, 2006).

2.3. Transición dimórfica en *Candida albicans*

Como se ha mencionado anteriormente, *C. albicans* es un organismo polimórfico dada su variabilidad morfológica. La forma de **levadura** o **blastospora** (figura 5, A) es la forma unicelular del hongo. Son células elipsoidales con un diámetro de aproximadamente $5\mu\text{m}$, se multiplican por gemación y predomina esta morfología durante el crecimiento saprófito (Soll, 1988). Este proceso implica la aparición de una nueva célula en un punto concreto de la superficie celular, que va creciendo hasta alcanzar el tamaño de la célula madre, se produce la división nuclear y, posteriormente, se forma el septo de separación entre ambas células. Se generan así dos blastosporas indistinguibles, a no ser por la cicatriz que presenta la célula madre en el punto de gemación.

Las **hifas** (figura 5, B) son filamentos delgados cilíndricos con un diámetro aproximado de $2\mu\text{m}$, las paredes laterales se mantienen paralelas a lo largo de todo el filamento y no presentan constricciones en la zona de los septos. Se forman por elongación a partir de las blastosporas (Sudbery *et al.*, 2004).

Existen también diferencias en las **propiedades de la pared celular** de cada tipo celular, así, la pared de las hifas es más adherente que las células levaduriformes en tejidos

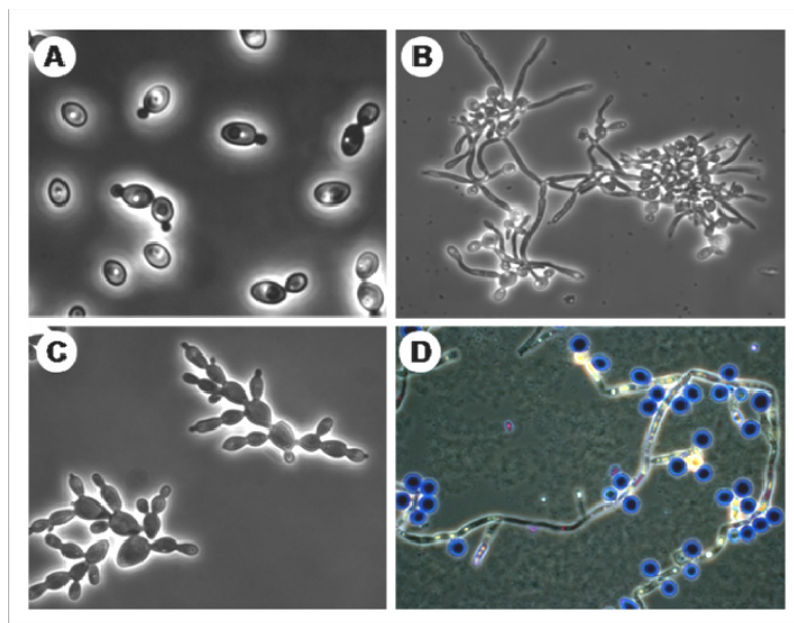


Fig.5.- Plasticidad morfológica de *C. albicans*. A) Células de *C. albicans* creciendo como levadura a 28°C , B) como hifas tras 4 horas de incubación en medio Lee a 37°C , C) formación de pseudohifas en YNB a 28°C y D) formando clamidosporas en *corn meal agar*-Tween 80 a 25°C bajo condiciones microaerófilas. Fotografías obtenidas en este trabajo.

endoteliales y epiteliales y contiene más cantidad de quitina (Bensen *et al.*, 2002).

Las **pseudohifas** (figura 5, C) están formadas por células alargadas encadenadas, que se originan por gemación pero sin que se produzca separación entre la célula madre y la célula

hija. Las paredes laterales no se mantienen paralelas, a diferencia de lo que ocurre con las hifas, son más gruesas, de diámetro bastante variable, y presentan constricciones en los septos (Odds, 1988; Sudbery *et al.*, 2004).

El aspecto más característico de las pseudohifas es que el ancho del compartimento del filamento no es constante siendo más ancho en el centro que en los extremos. El ancho mínimo de las pseudohifas es de aproximadamente $2.8\mu\text{m}$.

En algunas ocasiones resulta difícil diferenciar hifas de pseudohifas. Para distinguir entre ambas morfologías, resulta de gran utilidad la visualización del primer septo (figura 6) formado entre la célula madre y la primera célula del filamento. En el caso de hifas, el primer septo se localiza alejado de la zona de unión con la célula madre, dentro del tubo germinativo, mientras que en las pseudohifas se forma en la base del cuello de la célula madre (Gow *et al.*, 1986; Warena & Konopka, 2002).

La formación de **clamidosporas** (figura 5, D) es otra morfología casi exclusiva de *C. albicans*, compartida por *C. dubliniensis* y algunas cepas de *C. tropicalis* (Calderone, 2002; Sonneborn *et al.*, 1999).

Las clamidosporas son estructuras grandes, esféricas y de pared gruesa. El término procede del griego "*chlamys*" que significa envuelta protectora. En micología se define como una spora de pared gruesa, no caduca y asexual formada por una o más células. En *C. albicans* se forman en las extremidades o posiciones laterales de hifas y pseudohifas, al final de células suspensoras alargadas, están repletas de glucógeno y rodeadas por una gruesa membrana formada por capas superpuestas. Tienen forma redondeada con un tamaño aproximado entre 8 y $12\mu\text{m}$ de diámetro (Jansons & Nickerson, 1970).

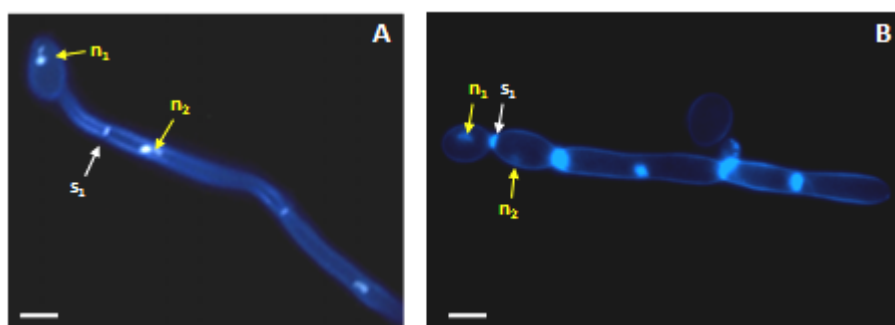


Fig.6.- Hifas y pseudohifas en *C. albicans*. A) Localización del primer septo en el desarrollo de una hifa de la cepa CAI4 de *C. albicans*. B) Pseudohifa del mutante *CaHat1* obtenido en este trabajo. s₁, septo visualizado con *calcofluor white*; n₁ y n₂, núcleos de las dos primeras células teñidos con DAPI. La imagen de CAI4 fue tomada de Martín, N. 2006, tesis doctoral. La barra equivale a $5\mu\text{m}$.

La formación de clamidosporas *in vitro* se induce en medios de cultivo sólido nutricionalmente pobres como el "*corn meal agar*", "*Zein agar*", "*potato carrot agar*", suplementados con detergentes como Tween 80, en condiciones microaerófilas y a

temperaturas entre 20°C y 30°C, mientras que su formación se inhibe en presencia de glucosa (Balish, 1973). *In vivo* rara vez se detectan estas estructuras (Cole *et al.*, 1991).

2.4. Dimorfismo en *Candida albicans*

La capacidad que presentan muchas especies fúngicas para crecer de dos formas diferentes dependiendo de las condiciones ambientales, se define en Micología como dimorfismo. Sin embargo, muchas especies englobadas bajo el término de “hongos dimórficos” son capaces de adoptar más de dos morfologías reversibles, aún así, dado que las formas de hifa y levadura son las mejor definidas, se sigue utilizando el término “dimórfico” para referirse al conjunto de hongos que realizan dichas transiciones.

Como se muestra en la figura 7, el cambio morfológico se produce por la sucesión de una serie de procesos encadenados: la percepción de un estímulo externo, la traducción de la señal percibida en un mensaje bioquímico con la consiguiente expresión génica diferencial dando lugar al desarrollo de un patrón de crecimiento polarizado (Chio, 2004).

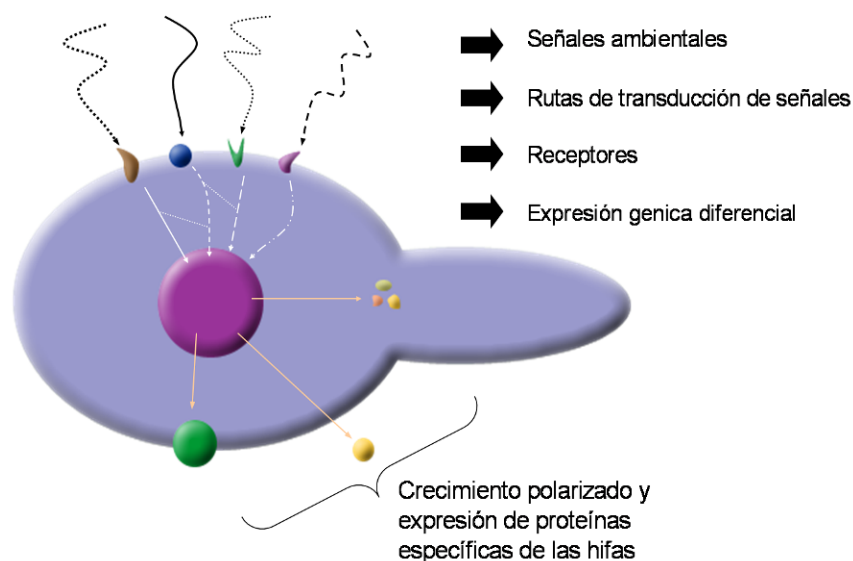


Fig. 7.- Factores que intervienen en la transición levadura-hifa. Diversos factores ambientales activan diferentes rutas de transducción de señales que pueden converger en factores de transcripción que regulan la expresión de genes diana responsables de la expresión de proteínas específicas implicadas en la formación de hifas (Ernst, 2000a).

En *C. albicans* la transición dimórfica es un proceso reversible, de modo que las hifas y pseudohifas pueden dar lugar a la morfología levaduriforme. El estudio de la regulación del dimorfismo en *C. albicans*, además de por su implicación en virulencia, es en sí mismo importante como modelo simple de diferenciación celular. La transición morfológica en *C. albicans* es un proceso multifactorial cuya regulación está aún poco caracterizada. Numerosas

señales ambientales determinan cada una de las morfologías de *C. albicans*, como puede verse recogido en la tabla III.

Por el momento, los factores ambientales inductores de la filamentación mejor caracterizados son el aumento de temperatura, el cambio de pH de ácido a neutro y la presencia y concentración de diferentes fuentes de carbono y nitrógeno.

Levaduras	Hifas	Pseudohifas
<ul style="list-style-type: none"> • T° de incubación $\leq 30^{\circ}\text{C}$, pH 4.0 • Densidad celular $> 10^7$ céls/ml • Alta concentración de glucosa ($>200\text{mM}$) • Linfocitos: γ-interferon 	<ul style="list-style-type: none"> • Medio Lee, 37°C, pH ≥ 6.8 • Presencia de suero, T° $> 34^{\circ}\text{C}$ • Cambio de pH ácido a neutro • Baja concentración de glucosa, pH 7-8, $> 37^{\circ}\text{C}$ • Baja concentración de nitrógeno (medio SLADH) • Aminoácidos: Prolina y Metionina 	<ul style="list-style-type: none"> • pH 6.0, T° $\approx 35^{\circ}\text{C}$ • Baja concentración de nitrógeno (medio SLADH) • Alta concentración de fosfatos • Carencia de aminoácidos
Morfología filamentosa aún no caracterizada		
<ul style="list-style-type: none"> • Contacto con macrófagos • Medio Spider • Infección de riñón en ratones 	<ul style="list-style-type: none"> • Crecimiento en el interior de una matriz de agar • Privación de hierro • Anoxia 	

Tabla III. Condiciones ambientales y efecto producido en la morfología celular de *C. albicans* (Chio, 2004; Hornby *et al.*, 2004; Sudbery *et al.*, 2004; Whiteway & Oberholzer, 2004; Ernst, 2000a).

En *C. albicans* la formación de hifas se produce a 37°C y el crecimiento en forma de levaduras se desarrolla a temperaturas inferiores a los 30°C . Sin embargo no solamente la temperatura determina la formación de hifas pues también influye el pH y la composición del medio. Valores de pH próximos a la neutralidad favorecen el crecimiento levaduriforme ya que el pH ácido reprime el crecimiento en forma de hifas incluso a 37°C .

Otros factores que influyen en la variación morfológica son la disponibilidad de nitrógeno y de glucosa. Las fuentes de nitrógeno fácilmente asimilables como las sales de amonio, favorecen el crecimiento levaduriforme mientras que otras, como la prolina, de difícil absorción favorecen la formación de hifas o pseudohifas (Ernst, 2000b).

Cuando en el medio de crecimiento a 37°C la glucosa se encuentra en bajas concentraciones, se induce la filamentación, proceso que se inhibe cuando la concentración aumenta. Otra fuente de carbono, el manitol, induce también la formación de hifas (Hudson *et al.*, 2004). Por otro lado, la sustitución de glucosa por N-acetilglucosamina (NAcGlc) también favorece la formación de hifas, ambos inductores parecen actuar a través de la ruta PKA-cAMP (Ernst, 2000b).

En el laboratorio, uno de los medios de cultivo habitualmente utilizado para el análisis morfológico de *C. albicans*, es el medio Lee, (Lee *et al.*, 1975). Se trata de un medio definido pobre en nutrientes de modo que variando únicamente un parámetro, bien el pH o la temperatura se puede mantener la morfología de hifa o la de levadura. En medio Lee a 37°C y pH neutro la formación de hifas se induce de forma casi inmediata, mientras que el crecimiento levaduriforme se mantiene a 28°C o a pH ácido (figura 8)

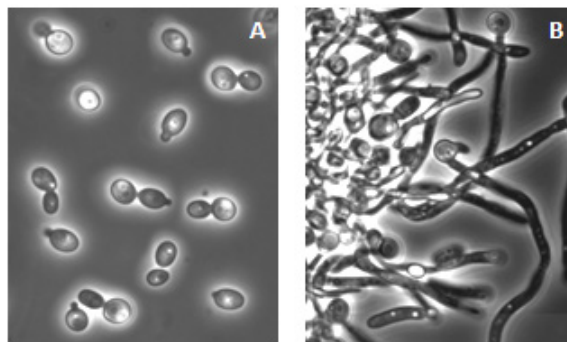


Fig.8.- Inducción de micelio en *C. albicans*. A) Células de la cepa CAI4 creciendo como levaduras en medio Lee, pH 6,8 a 28°C. B) Células de la misma cepa formando hifas en respuesta a la temperatura (37°C), en medio Lee, pH6,8.

Se ha demostrado que, cuando se induce *in vitro* la transición dimórfica, un tiempo de reposo metabólico previo favorece la formación de hifas (Ernst, 2000b).

El suero es un inductor potente de la miceliación, atenuando el efecto de la temperatura y el pH. En medios con suero a 34°C se forman hifas verdaderas, mientras que a esta misma temperatura y sin suero se forman pseudohifas. Se ha demostrado que los factores responsables de su capacidad inductora son por un lado el contenido en glucosa, y por otro lado la presencia de un componente que aún no ha podido ser identificado (Hudson *et al.*, 2004).

La adición de suero al medio Lee, a 37°C, hace que las hifas se desarrollen rápidamente, probablemente debido al componente inductor de filamentación del suero sin identificar, ya que el medio Lee contiene glucosa a una concentración mayor que la del suero. La utilización de NAcGlc como fuente de carbono también hace que la filamentación se desarrolle más rápidamente.

Las condiciones que activan la formación de pseudohifas no están tan definidas. Se ha demostrado que se desarrollan en condiciones de temperatura y pH intermedias a las que favorecen la formación de hifas o levaduras (aproximadamente 35°C y pH6,0), y que además su formación puede inducirse por una concentración alta de fosfatos (hasta 600 mM) o por carencia de aminoácidos (Hornby & Nickerson, 2004; Tripathi *et al.*, 2002).

Existen otras condiciones ambientales que promueven el desarrollo de formas filamentosas pero no se ha establecido aún si se trata de hifas o de pseudohifas: crecimiento en condiciones de anoxia dentro de una matriz de agar (probablemente debido a la limitación de oxígeno), contacto con macrófagos, medio Spider, privación de hierro o infección de riñón de ratones (tabla III) (Sudbery *et al.*, 2004).

3. RUTAS DE TRANSDUCCIÓN DE SEÑALES

La transición levadura-hifa en *Candida albicans* es un proceso multifactorial cuya regulación depende de una red de rutas de transducción de señales. Según los modelos actuales, se han descrito al menos cuatro rutas que inducen la formación de hifas:

- Ruta de las MAP Quinasas
- Ruta PKA-cAMP
- Ruta de respuesta a pH a través de Rim101p
- Ruta de respuesta a una matriz extracelular mediada por Czf1p.

Además existen varias vías represoras de la filamentación que actúan a través de Tup1p o bien a través de Rbf1p.

En cuanto a la formación de pseudohifas, los sistemas de transducción de señales no se conocen bien pero parecen compartir algunas de las rutas que controlan la formación de hifas (Berman & Sudbery, 2002; Sudbery *et al.*, 2004). Sin embargo algunas proteínas reguladoras, como el factor transcripcional Gcn4p, parecen intervenir únicamente en la formación de hifas en respuesta a carencia de aminoácidos (Tripathi *et al.*, 2002).

3.1. Ruta de proteínas quinasas activada por mitógeno (ruta MAPK)

En *Saccharomyces cerevisiae* la ruta MAPK (*mitogen activated protein kinases*) activada en respuesta a feromonas, está implicada en el proceso de conjugación, en el desarrollo de pseudohifas y en el crecimiento invasivo. En *C. albicans* se han identificado proteínas homólogas a las que participan en esta ruta en *S. cerevisiae*, comprobándose que están relacionadas con filamentación en respuesta a limitación de nutrientes (Ernst, 2000b).

La ruta de proteínas quinasas activada por mitógeno vía CaCph1p en *C. albicans* incluye a las quinasas Cst20p (Ste20p), Hst7p (Ste7p) y Cek1p (Liu, 2001). También se ha aislado el gen homólogo a *ScSTE11*, que por homología con la ruta de *S. cerevisiae*, podría actuar a continuación de Cst20p y por delante de Hst7p, pero aún no se ha podido corroborar su funcionamiento como quinasa en la ruta de *C. albicans* (Biswas *et al.*, 2007).

En *C. glabrata* el gen *STE11* está implicado en la respuesta a estrés osmótico y en filamentación inducida por escasez de nitrógeno (Calcagno *et al.*, 2005).

Al inicio de la ruta MAPK en *S. cerevisiae*, se encuentra la GTPasa ScRas2p. En *C. albicans* se ha descrito la existencia de un solo gen, CaRASI homólogo a los genes ScRAS1 y ScRAS2. Se ha demostrado que CaRas1p es una GTPasa que actúa como regulador de la filamentación, cuya delección provoca defectos en la formación de hifas, incluso bajo la inducción con suero (Feng *et al.*, 1999; Sussman *et al.*, 2004).

Otra proteína que por homología a *S. cerevisiae* podría intervenir junto a CaRas1p es CaCdc25p. La mutación en el gen que codifica esta proteína, provoca defectos en filamentación con suero y en medio sólido Spider (Enloe *et al.*, 2000; Uhl *et al.*, 2003).

CaCdc42p es una GTPasa de la familia Rho que controla múltiples vías de transducción de señales. CaCdc24p es el factor intercambiador de GTP-GDP de CaCdc42p, ambas proteínas son esenciales para el establecimiento del crecimiento polarizado durante la gemación, y en filamentación.

La expresión de un alelo hiperactivo del gen *CaCDC42* da lugar a morfologías aberrantes que parecen ser dependientes de CaCst20p pero no de CaRas1p, por lo que se ha sugerido la posibilidad de una entrada de activación de la ruta MAPK independiente de CaRas1p (Whiteway, 2000).

Al final de la ruta MAPK se encuentra el factor transcripcional CaCph1p, homólogo de la proteína ScSte12p de *S. cerevisiae* (figura 9).

Mutaciones en cualquier miembro de esta cascada o en el factor de transcripción Cph1, causan un defecto en la formación de hifas y ninguno de ellos filamta en medios sólidos con condiciones limitantes de nutrientes como Spider o SLADH, aunque si pueden filamtar en otros medios inductores.

El mutante *cph1* de *C. albicans* filamta por inducción con suero, pero presenta defectos en filamentación acusados en medios líquidos. Se ha sugerido que esta ruta controlaría la transición levadura-hifa únicamente en respuesta a la escasez de nutrientes. El hecho de que los mutantes delecionados presenten defectos parciales en miceliación se debe probablemente a la actividad de otras rutas (Ernst, 2000b; Liu, 2001).

En cuanto a la regulación negativa de la ruta MAPK, el estado de fosforilación de CaCek1p es controlado negativamente por la fosfatasa CaCpp1p. La delección de *CaCPI* supone la activación constitutiva de la ruta MAPK y provoca crecimiento filamentosos en medios sólidos a temperatura ambiente, observándose también defectos en la formación de hifas en condiciones de inducción (Csank *et al.*, 1997).

Otro elemento que regula negativamente la ruta MAPK es la proteína quinasa CaHog1p. En *S. cerevisiae* ScHog1p participa en la señalización frente al estrés osmótico. En

C. albicans sin embargo, parece que en lugar de frente a la osmolaridad, los sensores se activan frente al estrés oxidativo. Los mecanismos de defensa frente al estrés oxidativo son muy importantes en los hongos patógenos, como *C. albicans*, ya que el sistema inmune controla la infección a través de un mecanismo de oxidación (Vazquez-Torres & Balish, 1997).

CaHog1p también participa en dos procesos morfogenéticos distintos, como represor de la transición levadura-hifa y como inductor en la formación de clamidosporas (Alonso-Monge *et al.*, 1999). *CaHOG1* parece ser uno de los principales determinantes de la virulencia, pues reprime la transición levadura-hifa inducida por suero y también reprime el crecimiento filamentoso bajo otras condiciones inductoras, tales como la baja temperatura, el pH ácido o el ayuno de fuentes de nitrógeno (Eisman *et al.*, 2006). La represión mediada por CaHog1p en la transición levadura-hifa es independiente de CaEfg1p y CaCph1p. El mutante triple, *Caefg1/Cacph1/Cahog1*, es capaz de formar filamentos bajo condiciones parcialmente inductoras, siendo un fenotipo muy similar al del mutante *Cahog1*, que muestra filamentación e hiperinvasividad en medio sólido SLADH.

El mecanismo exacto por el que Hog1p reprime la formación de hifas aun no está claro pero podría implicar la activación del represor transcripcional Rbf1p.

Se ha propuesto que, al igual que ocurre en *S. cerevisiae*, CaHog1p podría disminuir la activación de la ruta de MAPK actuando por encima de CaCst20p (Alonso-Monge *et al.*, 1999).

3.2. Ruta de la proteína quinasa A dependiente de cAMP (ruta PKA-cAMP)

La ruta PKA-cAMP está implicada en crecimiento y en diferenciación celular en células eucariotas. En *C. albicans*, *S. cerevisiae* y otros hongos el control de la filamentación depende de esta ruta. El ayuno de fuentes de nitrógeno en *S. cerevisiae* da lugar a la formación de yemas elongadas llamadas pseudohifas, este proceso depende de la activación de la ruta cAMP. En *C. albicans* durante la transición levadura-hifa se produce un incremento en los niveles de cAMP y la inhibición de la cAMP fosfodiesterasa induce esta transición. Sin embargo la señal producida por el cAMP es menos pronunciada que en *S. cerevisiae*.

La carencia de nutrientes o la presencia de inductores como NacGlc o suero activan esta ruta, necesaria para la filamentación (Ernst, 2000b).

En *S. cerevisiae*, la ruta PKA-cAMP puede ser activada por el complejo formado por la proteína G, ScGpa2p y el receptor acoplado ScGpr1p independientemente de ScRas2p.

Otra proteína que interacciona con ScGpa2p es ScGpg1p, que tiene propiedades estructurales típicas de las subunidades G. La proteína G, ScGpa2p también es controlada por la proteína ScRgs2p, por lo tanto se ha propuesto que el sistema de proteína G acoplado a

receptor (GPCR, *G protein-coupled receptor*) formado por ScGpr1p, ScGpa2p y ScRgs1p actúa como un sistema receptor de glucosa para controlar la ruta cAMP. La actividad del sistema GPCR es necesaria para la inducción del crecimiento invasivo y la formación de pseudohifas y en los mutantes en los genes ScGPR1 o ScGPA2 que no pueden llevar a cabo estos dos cambios morfogénéticos, se puede suplementar con la adición de cAMP.

En *C. albicans* se han identificado genes similares a ScGPA2 y ScGPR1, pero sus funciones no están muy claras. Existen evidencias genéticas que sugieren que CaGpa2p puede funcionar aguas arriba tanto de CaCek1p de la ruta MAPK como de la ruta cAMP-PKA. La delección de CaGPA2 o CaGPR1 produce defectos parciales en la formación de hifas en medios sólidos inductores pero no en medios líquidos o bajo la inducción por suero y los niveles de expresión de CaHWPI y CaECE1, que son genes específicos de hifa cuya expresión depende de cAMP, están reducidos en ambos mutantes. Al igual que en *S. cerevisiae*, estos fenómenos pueden revertirse añadiendo exógenamente cAMP o por la sobreexpresión de componentes aguas abajo de la ruta. Diversos trabajos señalan que CaGpr1p actúa a través de CaGpa2p activando la ruta de PKA-cAMP, sin embargo aún no se sabe si es la concentración de glucosa o la presencia de determinados aminoácidos el factor que activa el módulo CaGpr1p-CaGpa2p (Biswas *et al.*, 2007; Maidan *et al.*, 2005; Miwa *et al.*, 2004; Sanchez-Martinez & Perez-Martin, 2002).

Recientemente se ha confirmado la implicación de CaGpa2p en apareamiento, lo cual sugiere una posible conexión entre CaGpa2p y la ruta MAPK mediada por CaCek1p.

CaGpa2p, parece así integrar la ruta de respuesta a nutrientes con la ruta MAPK de respuesta a feromonas proporcionando una explicación de por qué la función de esta última ruta depende fuertemente de las condiciones nutricionales (Bennett & Johnson, 2006).

Al igual que en la ruta MAPK, la GTPasa CaRas1p es una de las proteínas reguladoras que probablemente actúa al inicio de la vía en asociación con el intercambiador de GDP-GTP CaCdc25p.

La delección tanto de CaCDC25 como de CaRAS1 no produce un aumento de cAMP inducido por glucosa y suero respectivamente, por lo que se ha propuesto que sean estas dos proteínas las que determinen la respuesta a glucosa en lugar de la rama CaGpr1p-CaGpa2p (Maidan *et al.*, 2005).

En estos mutantes, el defecto que se observa en la formación de hifas puede suprimirse añadiendo cAMP exógeno, lo cual sugiere precisamente que ambas proteínas funcionen aguas arriba de la ruta cAMP-PKA. Además según la situación en *S. cerevisiae*, ScRas1p también parece funcionar aguas arriba de la ruta MAPK mediada por ScCek1p (figura 9) y del mismo modo el defecto morfogénético del mutante *ras1* puede también suprimirse por la sobreexpresión de componentes de la cascada MAPK inducida por filamentación. Otra

evidencia más es que el mutante *ras1* exhibe un defecto de filamentación similar al del mutante *efg1 cph1*.

Siguiendo el esquema de la figura 9, ambas rutas activan la adenilato ciclasa, proteína responsable del aumento de cAMP citoplasmático. *C. albicans* tiene un sólo gen homólogo al de la adenilato ciclasa de *S. cerevisiae*, (*ScCYR1/CaCDC35*). Al igual que CaRas1p, la ciclasa no es esencial para el crecimiento en *C. albicans*, pero es requerida para el crecimiento filamentosos.

En el genoma de *C. albicans* también están presentes el gen *CaSRV2* homólogo a *ScCAPI*, que codifica una proteína reguladora de la actividad de *CaCDC35* y dos fosfodiesterasas, *CaPDE1* y *CaPDE2*. *CaSrv2p* es necesaria para la formación del tubo germinativo en células de tipo silvestre y el defecto morfogénico del mutante, se recupera añadiendo cAMP.

La fosfodiesterasa *CaPde2p* también participa en morfogénesis. Cataliza la degradación de cAMP. La mutación del gen aumenta los niveles intracelulares de cAMP y la reversión de forma filamentosos a levaduriforme está afectada. Más en detalle, se ha observado que los mutantes *pde2* de *C. albicans*, al igual que en *S. cerevisiae*, muestran fenotipos que afectan a la membrana plasmática o la pared celular, tales como sensibilidad a agentes perturbadores de la membrana como el SDS o antifúngicos como la anfotericina B y una fuerte reducción en el grosor de la pared celular, causado principalmente por alteraciones en la composición en ergosterol y glucanos.

También estos mutantes, son sensibles a la falta de nutrientes, no entran en fase estacionaria y son avirulentos en un modelo de candidiasis sistémica en ratón. A diferencia de los cultivos silvestres, forman colonias rugosas y secas, formadas por una mezcla de hifas y pseudohifas. *CaPde2p* es necesaria para regular el nivel de cAMP en células y la ausencia de esta enzima da lugar a la activación constitutiva de la vía PKA.

El crecimiento y la diferenciación celular en células eucariotas dependen en gran medida de las proteínas quinasas dependientes de cAMP (PKA) que están muy conservadas estructuralmente.

En *S. cerevisiae*, la PKA es codificada por tres parálogos (*ScTPK1*, 2 y 3), mientras que solamente dos parálogos (*TPK1* y 2) están presentes en el genoma de *C. albicans*. Las dos isoformas de la proteína *Tpk* en *C. albicans* estimulan la formación de hifas pero de un modo distinto, pues la mutación de *CaTPK1* produce un defecto en la formación de hifas en medio sólido y la mutación de *CaTPK2* bloquea totalmente la formación de hifas en medio líquido.

Las subunidades reguladoras de la proteína quinasa A en *S. cerevisiae* y *C. albicans* están codificadas por *ScBCY1* y *CaBCY1*, respectivamente.

CaBCY1 codifica la subunidad reguladora de la proteína quinasa A. También es necesaria para la morfogénesis. La mutación de este gen junto con *CaTPK2*, supone la existencia de actividad proteína quinasa constitutiva, la deslocalización de la subunidad catalítica *CaPtk1p* y una menor capacidad de filamentación (Cassola *et al.*, 2004).

Por último, nos encontramos al final de la ruta PKA-cAMP con el factor de transcripción *CaEfg1p*. Presenta en su estructura un motivo bHLH (región básica hélice-giro-

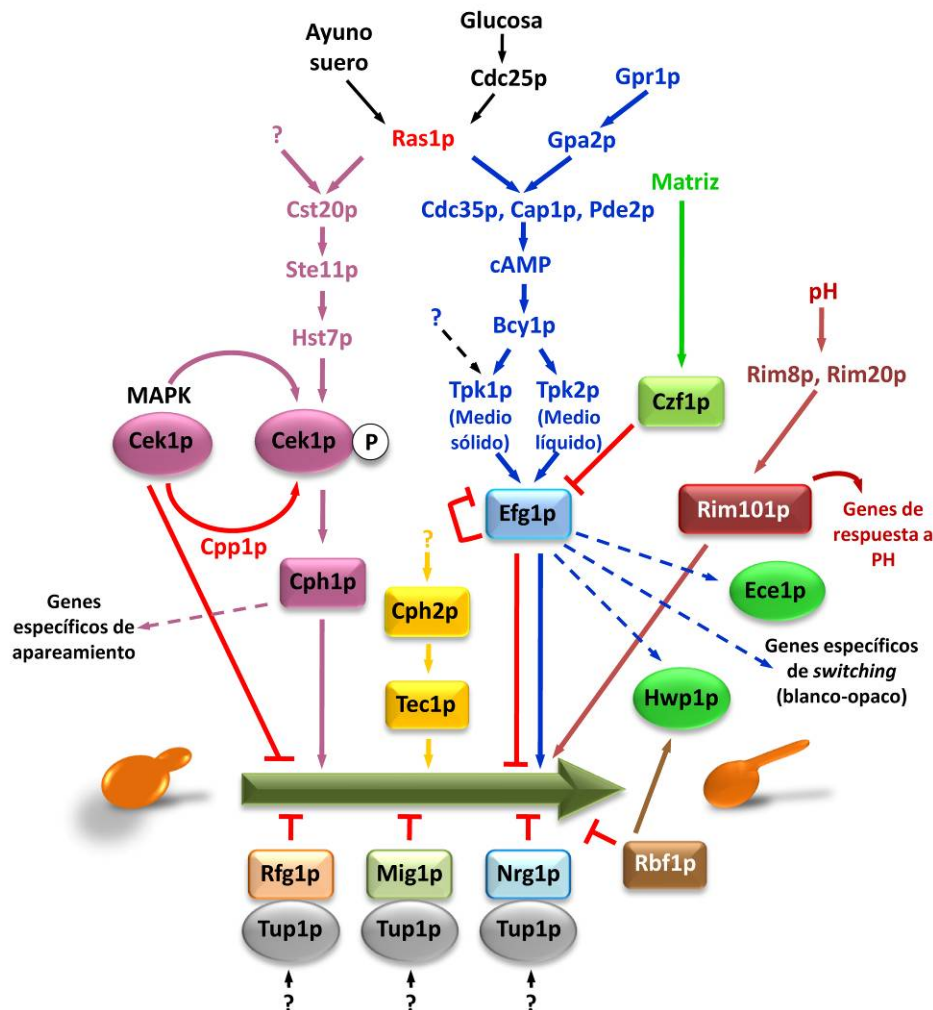


Fig.9.- Principales rutas de transducción de señales que regulan la formación de hifas en *C. albicans*. En morado se muestra la ruta de las MAP quinasas, en azul, la ruta PKA-cAMP mediada por Efg1p, en granate, la ruta de repuesta a pH, en amarillo, la ruta Cph2p/Tec1p, en verde la ruta de respuesta a matriz extracelular. Ras1p es uno de los reguladores más importantes del desarrollo de hifas y posiblemente funciona aguas arriba de ambas vías. En rojo se señalan las rutas represoras. Las conexiones no implican necesariamente interacciones directas. Tup1p es el principal regulador negativo de la transición levadura-hifa. Es atraído por Rfg1p, Nrg1p o Mig1p que al igual que Rbf1p también participan en la transición dimórfica. Los factores transcripcionales se muestran en cajas rectangulares. Esquema basado en Biswas *et al.*, 2007.

hélice) y es un regulador morfogénico muy importante. Las cepas carentes de *CaEFG1* no pueden formar hifas auténticas en los medios de inducción ensayados, salvo en condiciones de microaerofilia. La proteína CaEfg1p y su homóloga en *S. cerevisiae*, ScPhd1p, se unen a unas secuencias específicas llamadas cajas E. Estas cajas E se han localizado en promotores de genes específicos de hifas, como *CaALS8*, *CaHYR1*, *CaHWPI*, *CaALS3* (*CaALS8*) y *CaECE1* y en promotores de genes no relacionados con filamentación (Leng *et al.*, 2001).

La sobreexpresión de *CaTPK2* es incapaz de suprimir el fenotipo de la delección de *CaEFG1* mientras que la sobreexpresión de *CaEFG1* sí suprime el defecto de filamentación de un mutante *tpk2*, de modo que CaEfg1p funciona aguas abajo de PKA. En la posición 206 de la secuencia de CaEfg1p, se localiza un residuo de treonina que potencialmente puede ser fosforilado por PKA y que es esencial para la función de CaEfg1p como inductor de la filamentación pero tan sólo en algunos medios. Esto sugiere que *CaEFG1* es subexpresado por su regulador aguas arriba más inmediato que es PKA, aunque también *CaEFG1* autoregula su expresión.

De forma casi inmediata a la inducción de la filamentación, se produce una disminución en los niveles de mRNA de *CaEFG1*, a partir de los 15 minutos estos niveles aumentan gradualmente. Esta regulación es necesaria para la formación de hifas ya que la sobreexpresión del gen *CaEFG1*, así como la expresión constitutiva del gen en el mutante *Casin3*, causan la formación de pseudohifas en lugar de hifas verdaderas (Ernst, 2000b; Stoldt *et al.*, 1997; Tebarth *et al.*, 2003).

La autoregulación negativa y la subexpresión mediada por la PKA están determinadas posiblemente a través del complejo histona desacetilasa CaSin3p-CaRpd3p (Srikantha *et al.*, 2001; Tebarth *et al.*, 2003).

Muy recientemente, el grupo de Snyder publicó un detallado análisis sobre las relaciones entre los factores de transcripción implicados en la transición levadura-pseudohifa de *S. cerevisiae*. Encontraron sitios de unión para dos factores de transcripción codificados por *ScPHD1* y *ScMGAI*, aguas arriba de la mayoría de genes implicados en la formación de pseudohifas, incluido *ScFLO8* (Borneman *et al.*, 2006).

La sobreexpresión de estos dos genes induce la formación de pseudohifas, incluso bajo condiciones no inductoras. Esto indica que ScPhd1p y ScMga1p son reguladores principales en este sistema. *ScPHD1* es el homólogo de *CaEFG1*, y *ScMGAI* es homólogo al orf19.3969, aún no caracterizado en *C. albicans* (Braun *et al.*, 2005).

Recientemente se ha caracterizado el gen *FLO8* de *C. albicans*. Al igual que en *S. cerevisiae*, *CaFLO8* es necesario para el desarrollo de hifas y la expresión de genes específicos de hifa. La unión cooperativa de dos factores de transcripción diferentes también puede ocurrir en *C. albicans*, y de hecho, CaFlo8p y CaEfg1p interaccionan entre sí *in vivo*, y

como CaFlo8p controla un subgrupo de genes diana de CaEfg1p, se ha sugerido que CaFlo8p podría actuar al final de la ruta PKA-cAMP junto a CaEfg1p (Cao *et al.*, 2006).

3.3. Otras rutas inductoras de la filamentación

Como ya se ha indicado anteriormente, el cambio de pH ácido a neutro induce en *C. albicans* la formación de hifas a 37°C. En *C. albicans*, al igual que en otros hongos, existe una ruta de respuesta a pH. En *S. cerevisiae* y en *Aspergillus nidulans*, el factor de transcripción Rim101p regula la expresión de genes de respuesta a pH.

El gen *CaRIM101* es necesario para la filamentación inducida por cambio de pH, para la activación transcripcional de genes específicos de pH básico y para la represión de genes que se expresan a pH ácido. El factor transcripcional CaEfg1p es necesario para la inducción de la filamentación en respuesta a pH, pero no para la expresión de genes específicos de pH básico, por lo que se ha sugerido que CaEfg1p podría actuar por debajo de CaRim101p o bien en paralelo, regulando únicamente la filamentación por cambio de pH (figura 9) (Calderone, 2002; Liu, 2001).

C. albicans es capaz de filamentar cuando crece dentro de una matriz sólida, lo cual es considerado como un mecanismo que facilita la penetración de los tejidos del hospedador.

Como se ha descrito, los mutantes *Caefg1*, presentan un bloqueo drástico en la formación de hifas verdaderas bajo la mayoría de condiciones de inducción estándar, pero una fuente limitada de oxígeno, como ocurre bajo un cubreobjetos durante la inducción de clamidosporas, provoca hiperfilamentación en mutantes *Caefg1*.

De ello se deduce que puede existir una vía de filamentación independiente de Efg1p que es operativa bajo condiciones microaerofílicas o embebidas en *C. albicans*. La ruta que induce la formación de hifas en estas condiciones está controlada por el factor de transcripción, CaCzflp. Esta proteína contiene un dominio en dedo de Zinc, generalmente implicado en la interacción con secuencias de DNA. El gen *CaCZFI* no es necesario para la respuesta a suero, pH, NAcGlc, prolina o medio Spider pero sí estimula el crecimiento filamentoso en medios embebidos y en ciertos medios sin glucosa (Brown *et al.*, 1999; Ernst, 2000b).

CaTECI es miembro de la familia de factores de transcripción TEA/ATTS, implicada en regulación del desarrollo de hifas y virulencia en *C. albicans*. En *S. cerevisiae*, ScTec1p y ScSte12p forman un complejo que es un factor de transcripción que específicamente activa genes implicados en la formación de pseudohifas (Chou *et al.*, 2006; Ma *et al.*, 1999).

Este complejo aún no ha sido identificado en *C. albicans*. La transcripción de *CaTECI* no está regulada por el homólogo de ScSte12p, CaCph1p sino por CaCph2p y CaEfg1p. La

proteína CaCph2p de unión a DNA contiene un motivo bHLH, y participa en la regulación del desarrollo en *C. albicans* (Leberer *et al.*, 1996).

El mutante *Cacph2* no forma hifas en medios sólidos inductores y tiene reprimida la inducción de genes específicos de hifa en medio Lee líquido. CaCph2p es necesario para la inducción transcripcional de *CaTEC1*. CaCph2p se une directamente a dos elementos reguladores aguas arriba de *CaTEC1*. Además la expresión ectópica de *CaTEC1* suprime el defecto del mutante *Cacph2* durante el desarrollo de hifas. La función de CaCph2p en la formación de hifas es por lo tanto mediada en parte a través de CaTec1p (Lane *et al.*, 2001).

Los mutantes *Catec1* no filamentos en medio líquido suplementado con suero. La sobreexpresión de *CaEFG1* no suprime el defecto morfológico del mutante *Catec1*, pero la sobreexpresión de *CaTEC1* suprime parcialmente el defecto de filamentación del mutante *Caefg1*. Estos resultados junto con el hecho de que los cultivos *Caefg1* tienen un defecto severo en la formación de hifas mayor que el de los cultivos mutantes *Catec1*, sugieren que CaTec1p actúa aguas abajo de CaEfg1p y CaCph2p (Lane *et al.*, 2001; Schweizer *et al.*, 2000).

Finalmente, se ha demostrado que agentes que alteran la estabilidad y estructura de los ácidos nucleicos, como la disponibilidad de poliaminas, también afectan a la transición dimórfica. La falta de poliaminas tiene efectos pleiotrópicos en diferentes organismos y afecta considerablemente a la transición levadura-hifa en *C. albicans*. La delección del gen *CaODC* (*ScSPE1*) que codifica la primera enzima de la ruta de biosíntesis de poliaminas permite únicamente el crecimiento en forma de levaduras cuando el medio de cultivo es suplementado con baja concentración de poliaminas, incluso bajo condiciones de inducción de la filamentación, como presencia de suero y temperatura elevada o NAcGlc, tanto en medios líquidos como sólidos (Herrero *et al.*, 1999).

3.4. Regulación negativa de la filamentación

El factor de transcripción Tup1p es necesario para el mantenimiento de las células en forma de levadura en presencia de glucosa u otras condiciones no inductoras de filamentación. En *S. cerevisiae*, ScTup1p regula unos 60 genes implicados en la regulación de la glucosa, la respuesta a estrés oxidativo y daño del DNA (DeRisi *et al.*, 1997). El homólogo en *Candida*, CaTup1p, contiene siete repeticiones WD40 conservadas en el extremo C-terminal, que facilitan la interacción con proteínas de unión a DNA y un dominio N-terminal que promueve la interacción con el correpressor CaSsn6p, al igual que en *S. cerevisiae* (Keleher *et al.*, 1992; Komachi & Johnson, 1997).

La delección del gen *TUP1* provoca en *C. albicans* el crecimiento en forma de pseudohifas en todos los medios ensayados, independientemente de las condiciones de

miceliación (Braun & Johnson, 1997; Braun *et al.*, 2001; Zhao *et al.*, 2002). La expresión de *CaTUP1* a lo largo de la transición dimórfica se mantiene constante (Zhao *et al.*, 2002), por lo que posiblemente es su interacción con proteínas de unión a DNA la que está regulada; con el fin de promover o reprimir el crecimiento filamentoso.

Algunos genes reprimidos por *CaTup1p* expresados durante la filamentación de manera específica, son *CaHWPI*, *CaWAPI*, *CaRBT1*, *CaRBT5*, *CaRBT4* y *CaRBT7*. Estos genes codifican proteínas secretadas o de pared celular (Braun *et al.*, 2000; Braun & Johnson, 2000).

En *S. cerevisiae*, *ScTup1p*, forma un complejo con el represor transcripcional *ScSsn6p*, regulando un grupo de genes implicados en apareamiento, metabolismo de glucosa y daño a DNA. Este complejo ejerce su función por la unión de otras proteínas que sí se unen a DNA, como *ScMig1p*, *ScRox1p*, *ScCtr1p* y *ScNrg1p* y dirigen el complejo hacia los promotores de los genes que controla (Smith & Johnson, 2000).

La mutación de *CaSSN6* genera un patrón de crecimiento en forma de pseudohifas donde genes específicos de filamentación se encuentran desreprimidos en respuesta al incremento de temperatura pero los mutantes fallan en el desarrollo de hifas verdaderas. Por otro lado la sobreexpresión de *CaSSN6* da lugar a un incremento en filamentación y disminución del grado de virulencia. Tales defectos morfológicos no son rescatados por la sobreexpresión de *CaTUP1*, *CaCPHI* o *CaEFG1*. Datos recientes indican que *Ssn6p* no es esencial para la represión de genes específicos de hifa, al menos bajo algunas condiciones, y los mutantes *Cassn6* forman filamentos en respuesta a suero en ausencia de *CaCph1p* y *CaEfg1p*. Estos resultados sugieren que la filamentación de los mutantes *Cassn6* no es dependiente de las rutas MAPK o cAMP (García-Sánchez *et al.*, 2005)

Otra de las proteínas que en *S. cerevisiae*, interacciona con *ScTup1p* es el factor transcripcional *ScNrg1p*. Se trata de una proteína de unión a DNA que contiene un dominio en dedos de zinc muy conservado evolutivamente. *ScNrg1p* se une al complejo *ScSsn6p-ScTup1p* y lo dirige hacia determinados genes diana.

Los mutantes *Canrg1* son predominantemente filamentosos bajo condiciones no inductoras de la filamentación y muestran una virulencia atenuada. *CaNrg1p* reprime varios genes específicos de hifas que se encuentran bajo el control de *ScTup1p*, como *CaECE1* y *CaHWPI* y se caracterizan además por contener en sus promotores un sitio de respuesta a *CaNrg1p* (Biswas *et al.*, 2007).

Otra vía de regulación negativa dependiente de *CaTup1p* pero no de *CaNrg1p*, es la que se establece mediante la interacción de *CaTup1p* con la proteína de unión a DNA, *CaRfg1p* homóloga de *ScRox1p*. Esta proteína dirige a *CaTup1p* hacia genes que activan la formación de hifas.

En un análisis con microarrays de DNA, Kadosh y Johnson identificaron 61 genes específicos de hifa que se inducen en respuesta al crecimiento con suero a 37°C y mostraron que aproximadamente la mitad de los genes se encuentran bajo el control negativo de los represores transcripcionales CaRfg1p, CaNrg1p y/o CaTup1p (Kadosh & Johnson, 2005). El factor transcripcional CaRbf1p, representa otra ruta represora de la filamentación que no ha sido aún bien definida. La delección de *CaRBF1* genera un crecimiento filamentoso constitutivo en medios no inductores pero estos filamentos muestran características de pseudohifas (Ishii *et al.*, 1997).

Otros mutantes que presentan crecimiento filamentoso en medios no inductores son cepas delecionadas en los genes *CaRAD6* y *CaRAD52*, implicadas en el control de daños por radiación ultravioleta en el DNA. Se ha propuesto que la alteración de estos sistemas produce filamentación como consecuencia del desacoplamiento entre diferentes procesos del ciclo celular, como son la división del núcleo y la organización del citoesqueleto. En el caso del mutante *Carad52*, se ha observado que la filamentación requiere en parte de la actividad de la ruta cAMP-PKA, pero no de CaEfg1p (Andaluz *et al.*, 2006; Ernst, 2000b; Leng *et al.*, 2000).

Finalmente, a la vista de los datos expuestos, se pone de manifiesto que la regulación de la morfogénesis en *C. albicans* está finamente controlada por un amplio grupo de activadores y represores.

4. EL OVILLO DINÁMICO DE LA VIDA: LA CROMATINA

En las últimas décadas se han producido gran cantidad de avances en las técnicas empleadas en Biología Molecular lo cual nos ha permitido conocer en mayor medida la estructura de los cromosomas eucariotas y de qué manera la información hereditaria se organiza y es utilizada dentro de la célula. Numerosos experimentos han demostrado que el crecimiento, desarrollo y diferenciación dependen de cambios muy regulados en la forma y composición de complejos formados por proteínas y DNA en el interior del núcleo celular (Wolffe, 1998).

En organismos eucariotas el DNA de todos los cromosomas se encuentra empaquetado en una estructura compacta con la ayuda de proteínas especializadas dando lugar a una estructura de naturaleza represiva. Estas proteínas de unión a DNA se dividen a grandes rasgos en dos clases: las histonas y las proteínas cromosómicas no histonas. La estructura condensada que forman ambas clases junto con el DNA nuclear en las células eucariotas es lo que conocemos como cromatina.

Sin embargo, la cromatina no es una estructura estática y compacta sino variable y altamente dinámica.

Esta característica inherente a la estructura de la cromatina, afecta a casi todos los procesos relacionados con el DNA como son los procesos de transcripción, recombinación, reparación de DNA, replicación y formación de cinetocoros y centrómeros entre otros muchos (Li *et al.*, 2007).

4.1. Composición estructural de la cromatina

Se han descrito cinco tipos de histonas que se incluyen dentro de dos grupos principales: las histonas nucleosómicas y las histonas H1. El primer grupo, las histonas nucleosómicas, está formado por cuatro pequeñas proteínas (102-135 aminoácidos) responsables del enrollamiento del DNA para formar los nucleosomas, se denominan H2A, H2B, H3, y H4, siendo las histonas H3 y H4 las que presentan un mayor grado de conservación evolutiva. Los nucleosomas consecutivos quedan unidos entre sí por el DNA espaciador, de longitud variable según la especie y la histona H1, constituyendo el nucleofilamento. A su vez, el nucleofilamento se vuelve a plegar en estructuras de orden superior que van desde la fibra de 30nm de diámetro llamada solenoide durante la interfase, hasta alcanzar el máximo nivel en los cromosomas metafásicos durante la mitosis (Alberts *et al.*, 1996; Gregory & Hörz, 1998).

En cuanto a la histona H1, existen diferentes variantes que constituyen una compleja familia de proteínas que pueden ser específicas de tejido o del momento del desarrollo. Las variantes de H1 son parcialmente redundantes entre sí y pueden regular la actividad de la cromatina estabilizando la fibra de 30 nm y la posición de los nucleosomas o alterando la accesibilidad de factores reguladores. En el establecimiento y regulación de la estructura de la cromatina también intervienen una amplia variedad de proteínas no histónicas, poliaminas e iones metálicos divalentes (Bustin *et al.*, 2005; Khochbin, 2001).

Además de las histonas canónicas descritas, existen variantes de las histonas H1, H2A, H2B y H3, pero no de la histona H4. Los genes que codifican las histonas canónicas y que son las más abundantes suelen ser multicopia y se expresan principalmente durante la fase S del ciclo celular.

Los genes que codifican variantes de histonas suelen ser genes de copia única que se expresan durante todo el ciclo celular. Algunas variantes de histonas pueden alterar las propiedades de los nucleosomas mientras que otras además se localizan específicamente en determinadas regiones del genoma. El reemplazamiento de las histonas canónicas por variantes está relacionado con la especialización celular, la diferenciación de tejidos y la herencia epigenética (Henikoff *et al.*, 2004; Hereford *et al.*, 1981; Kamakaka & Biggins, 2005).

El nucleosoma es la unidad estructural repetitiva que forma la cromatina eucariota. Contiene un núcleo formado por dos moléculas de cada una de las cuatro histonas canónicas: H2A, H2B, H3 y H4, alrededor de este núcleo se enrollan o ensamblan 147pb de DNA. Estas ocho histonas se organizan formando un tetrámero $(H3)_2(H4)_2$ y dos dímeros H2A-H2B flanqueando el tetrámero. En la figura 10 se muestra la estructura del nucleosoma y los diferentes grados de compactación del DNA cromosómico en eucariotas.

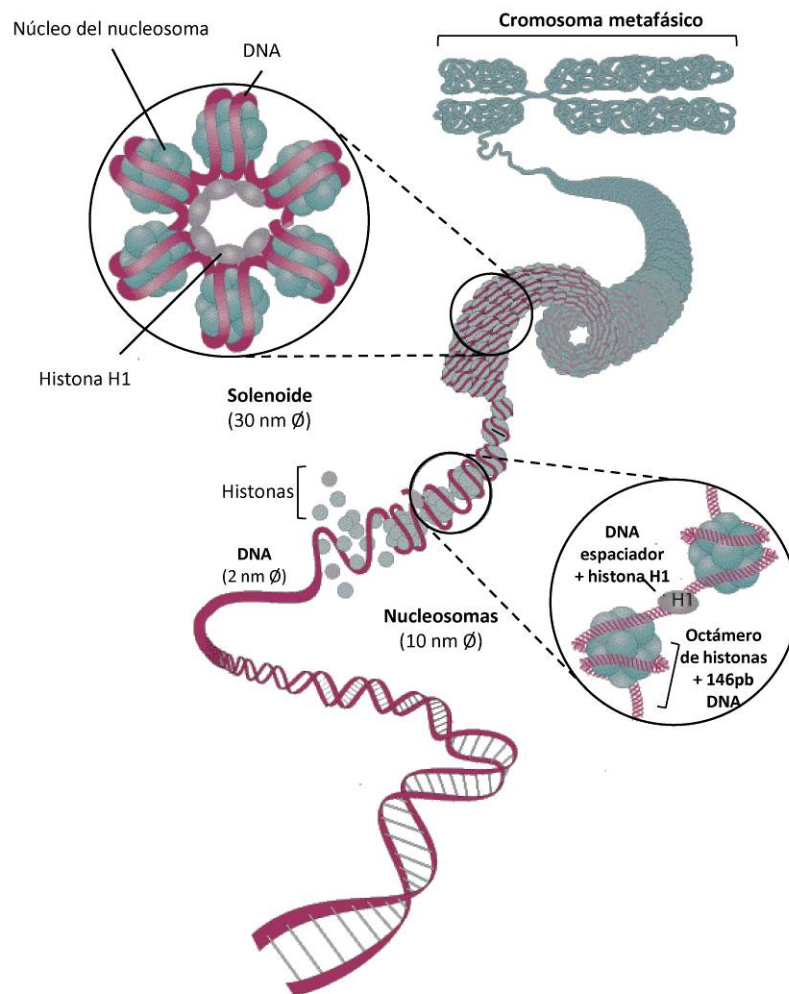


Fig.10.- Esquema de los diferentes grados de compactación del DNA cromosómico en organismos eucariotas. Basado en Klug & Cummings, 1997.

La zona más conservada de las cuatro histonas es su dominio central, compuesto estructuralmente de un dominio de plegamiento formado por tres hélices alfa separadas por dos regiones en lazo. Este dominio es hidrofóbico y está implicado en las interacciones necesarias entre las histonas y el DNA para mantener la estabilidad del octámero. El extremo

carboxilo terminal es corto e hidrofílico mientras que el extremo amino-terminal menos estructurado y más variable es muy flexible y se extiende hacia el exterior del octámero. Dicha región amino-terminal es particularmente rica en lisina y arginina, lo que la hace extremadamente básica.

Esta región es el lugar de numerosas modificaciones post-traduccionales que, se ha propuesto, modificarían la carga de la histona, alterando la accesibilidad del DNA y las interacciones proteína-proteína con el nucleosoma.

En la actualidad la regulación de la expresión génica no puede ser entendida sin tener en cuenta la estructura de la cromatina. Como se tratará más adelante, las modificaciones covalentes que se dan en los extremos amino y carboxilo terminales de las histonas jugarán un papel esencial en el control de la actividad génica.

4.2. Mecanismos de regulación transcripcional. Características generales

El grado de complejidad adquirido por el genoma eucariota durante el proceso evolutivo ha requerido el desarrollo al mismo tiempo de diversos niveles de regulación, para poder llevar a cabo la expresión genética de manera ordenada dentro de la célula y permitir el desarrollo de un organismo. Los procesos de regulación transcripcional, relacionados entre sí, pueden establecerse en tres niveles.

El primer nivel depende de la composición nucleotídica en sí de la molécula de DNA. En las regiones promotoras de todos los genes se localizan secuencias reguladoras reconocidas por la maquinaria transcripcional de la RNA polimerasa II, como son las secuencias TATA y las secuencias UAS (*upstream activating sequences*) situadas en el extremo 5'. Además, en el extremo 3' de la caja TATA se requiere la presencia del elemento iniciador, que determina el punto donde comienza la transcripción. En algunos promotores también se localizan secuencias de reconocimiento para proteínas activadoras y represoras de la transcripción y como consecuencia se produce la expresión diferencial de los genes diana de estos reguladores.

El segundo nivel implica necesariamente la modificación de la estructura de la cromatina, donde la regulación de la expresión de un gen no sólo depende de la información codificada en la secuencia de DNA, sino también de su organización en cromatina y la regulación epigenética asociada a ésta.

Se consideran procesos de regulación epigenéticos aquellos que influyen en la expresión heredable de los genes sin que ocurran cambios en la secuencia del DNA. Es decir, la información codificada por el DNA no se ve afectada y se transmite a la siguiente generación (Imhof, 2006; Lee & Workman, 2007).

En los últimos años, gran cantidad de investigaciones relacionan la importancia de los procesos epigenéticos con el desarrollo de cáncer, especialmente aquellos implicados en el silenciamiento de genes reguladores (Esteller, 2007; Jones & Baylin, 2007).

Entre los procesos que participan en la regulación epigenética en relación con la estructura de la cromatina, están las modificaciones postraduccionales de las histonas, la metilación del DNA, los complejos de remodelaje dependientes de ATP y los complejos Polycomb (PcG) y Trithorax (TrxG) descritos en *Drosophila melanogaster* que regulan genes homeóticos.

Las modificaciones postraduccionales que pueden sufrir las histonas y que influyen en la estructura local de la cromatina y en la transcripción son acetilación, fosforilación, metilación en lisinas y argininas, ubiquitinación, sumoilación, ADP ribosilación, isomerización de prolinas y deiminación. Mediante experimentos de detección con anticuerpos específicos o por espectrometría de masas se han llegado a detectar más de sesenta residuos en las histonas susceptibles de ser modificados y además muchas de estas modificaciones pueden aparecer y desaparecer en cuestión de minutos (Ekwall, 2005; Kouzarides, 2007; Kurdistani & Grunstein, 2003; Wolffe & Guschin, 2000; Zhang *et al.*, 2003).

Como se ha mencionado, la estructura de la cromatina puede ser regulada a través de complejos que utilizan la energía de la hidrólisis del ATP para alterar la interacción entre las histonas y el DNA, por ello se denominan complejos remodeladores de la cromatina dependientes de ATP, como el complejo activador SWI/SNF entre otros (Dirscherl & Krebs, 2004; Winston & Carlson, 1992). Mutaciones en componentes de este complejo juegan un papel muy importante en el desarrollo de ciertos tipos de cáncer (Jones & Baylin, 2007).

Estos complejos remodeladores intervienen en procesos como la replicación y reparación del DNA, la transcripción y la recombinación. Aunque no se conocen bien los mecanismos de actuación de estos complejos para facilitar la accesibilidad al DNA, sí se han descrito algunos de los procesos que provocan. Pueden catalizar el desplazamiento o desensamblaje de los nucleosomas, la transferencia de un octámero de histonas de un nucleosoma a una zona diferente del DNA o provocar torsiones superhelicoidales en el DNA.

Todos estos procesos actúan sobre las histonas y el DNA desencadenando el desplazamiento o desensamblaje de los nucleosomas determinando así el grado de accesibilidad de la maquinaria transcripcional al DNA (Bulger, 2005; Li *et al.*, 2007; Lusser & Kadonaga, 2003).

Por último el tercer nivel de regulación transcripcional involucra al empaquetamiento de la cromatina en estructuras de orden superior en el interior del núcleo. El estado de condensación de la cromatina no es homogéneo ni estático, sino que dentro de una misma

célula pueden diferenciarse dominios con diferente estructura que pueden ser modificados temporalmente.

De modo general, en eucariotas, el genoma está empaquetado en forma de heterocromatina y de eucromatina.

La heterocromatina, aparece compactada o condensada durante el ciclo celular. Es pobre en genes, relativamente inaccesible a los factores de unión al DNA y transcripcionalmente silenciosa. Los dominios de heterocromatina se presentan en grandes bloques principalmente cerca de las regiones centroméricas y teloméricas, y en pequeños bloques dispersos a través del genoma.

La eucromatina, solamente se condensa previamente a la mitosis y engloba la mayor parte de las regiones transcripcionalmente activas dentro del núcleo (Bulger, 2005).

4.3. Papel de los procesos de acetilación-desacetilación de histonas en la regulación transcripcional

Las primeras evidencias experimentales que demostraban que las histonas podían ser modificadas por la adición de grupos acetilo o metilo, fueron descritas por Allfrey y colaboradores en 1964 (Allfrey *et al.*, 1964). En años posteriores se publicaron gran cantidad de estudios que relacionaban el nivel de acetilación de las histonas con los niveles de expresión génica (Lee & Workman, 2007).

Como ya se ha mencionado anteriormente, en el extremo amino-terminal de las histonas se encuentran residuos de lisina susceptibles de ser acetilados de forma reversible. La posición de estos residuos de lisina se encuentra muy conservada en todos los organismos eucariotas, especialmente en el caso de las histonas H3 y H4.

Esta modificación depende de dos grupos de actividades enzimáticas, las acetiltransferasas de histonas (HATs) y las desacetilasas de histonas (HDAs).

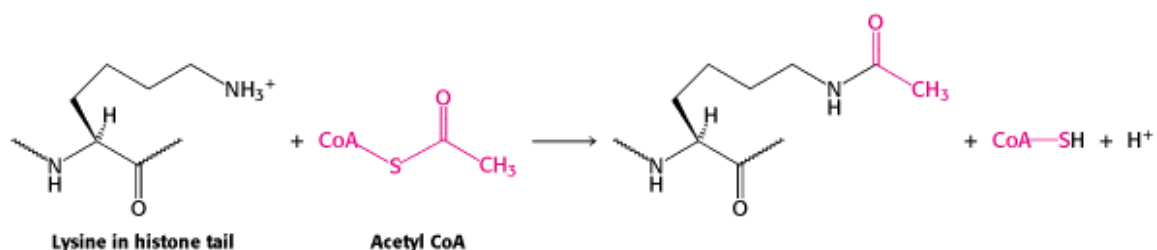


Fig. 11.- Reacción de acetilación de un residuo de Lisina. Tomado de Berg *et al.*, 2002.

En la reacción de acetilación se cataliza la transferencia de un sólo grupo acetilo al grupo epsilon-amino (ϵ -amino) de la lisina a partir de acetil coenzima A, como se muestra en la figura 11 (Berg *et al.*, 2002).

Los grupos acetilo, cargados negativamente, neutralizan la carga positiva de la lisina, alterando la unión entre el DNA y la histona y por tanto las interacciones dentro del nucleosoma y con los nucleosomas próximos. De este modo se forman estructuras abiertas que facilitan el acceso de la maquinaria transcripcional y de las proteínas reguladoras (figura 12). Siguiendo este modelo, la desacetilación provocaría el efecto contrario aumentando el empaquetamiento del DNA, dificultando así, la transcripción (Millar & Grunstein, 2006).

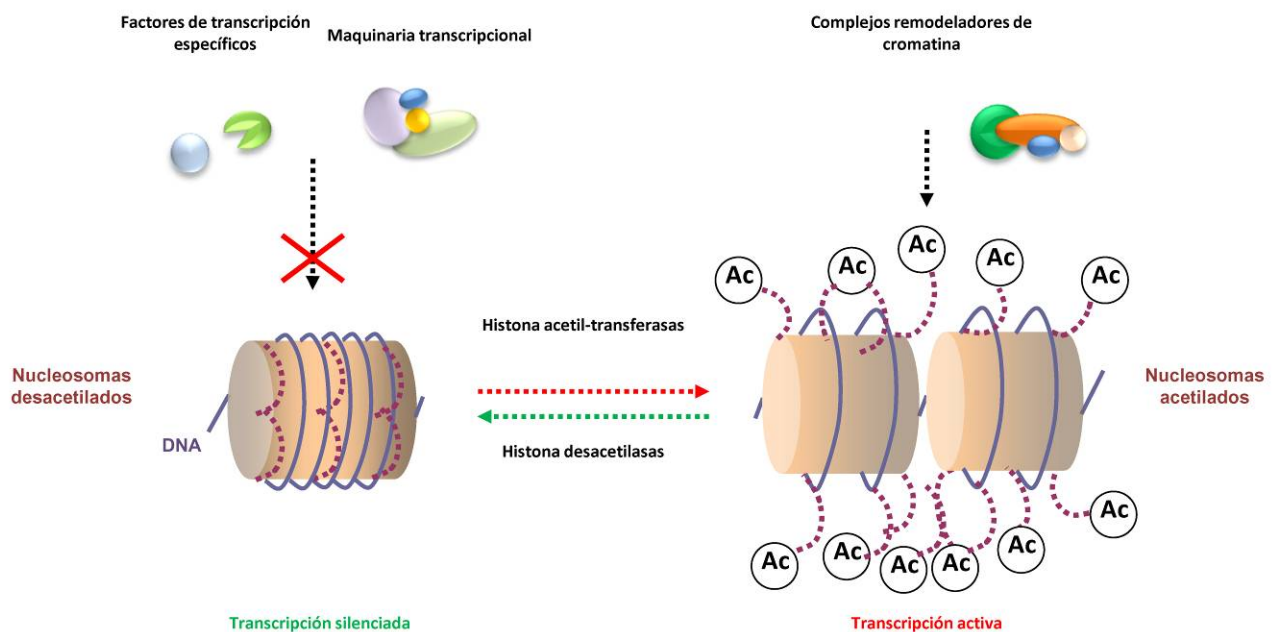


Fig. 12.- Modelo de acción de los procesos de acetilación y desacetilación de histonas sobre la estructura de la cromatina y el estado de transcripción.

También se ha sugerido que el efecto de la acetilación sobre la transcripción podría deberse a que los residuos acetilados proporcionan superficies de anclaje apropiadas para determinados componentes de la maquinaria de transcripción u otros reguladores de la expresión génica (Kurdistani & Grunstein, 2003).

Los experimentos descritos sugieren que la modificación que determina los cambios en la estructura de la cromatina no es única sino que es el resultado de la combinación de varias modificaciones que establecen una superficie topológica para la unión de proteínas diferentes determinando el tipo de proceso a desarrollar. Estas combinaciones variables proporcionan lo que se ha dado en llamar “código histona” que no es en sí un código

predecible si se considera el significado estricto del término. Incluso, una misma modificación puede tener un efecto activador o represor bajo diferentes condiciones (Kouzarides, 2007).

4.4. El “código histona”

La hipótesis del código histona propone que determinadas combinaciones de modificaciones sobre las histonas da lugar a patrones que son reconocidos por proteínas no histónicas. La unión específica de estas proteínas genera cambios de distinta naturaleza en la cromatina.

Para que se establezca el código se requiere la participación de enzimas que escriben el código por adición o eliminación de modificaciones en determinados residuos y enzimas que interpretan esas señales al interactuar específicamente con el patrón de modificaciones de las histonas. Se establece así un entramado de interacciones de elevada complejidad ya que en un mismo residuo no pueden coexistir diferentes señales a la vez (Jenuwein & Allis, 2001; Strahl & Allis, 2000).

Como ejemplo, se ha descrito que cualquier residuo de lisina si está acetilado, tiene que ser desacetilado previamente a su metilación. Estudios *in vitro* muestran que la metilación de H4 en la arginina 3 facilita la acetilación posterior del extremo amino terminal por p300 (Zhang *et al.*, 2001).

También parece que la ubiquitinación de la lisina 123 de la histona H2B es necesaria para que se metile la lisina 4 de la histona H3, activando así la transcripción, y también puede provocar la metilación de la lisina 79 en la histona H3 desreprimiendo regiones silenciadas

Las proteínas no histónicas, reconocerían esta topología química codificada en las histonas a través de dominios característicos (bromodominios, cromodominios, dominios Tudor, repeticiones WD40 y dedos PHD), ejerciendo así su función represora o activadora (Conaway *et al.*, 2002; Osley, 2004).

4.5. Complejos acetiltransferasa de histonas (complejos HATs)

En los últimos diez años se han descrito acetiltransferasas de histonas de numerosos organismos demostrándose que están evolutivamente conservadas desde levaduras hasta humanos.

El grupo de las acetiltransferasas de histonas comprende un conjunto diverso y complejo de enzimas que clásicamente se ha organizado según la **localización subcelular** en dos grandes grupos:

- Tipo A: enzimas nucleares capaces de acetilar el extremo N-terminal de las histonas ya incorporadas en los nucleosomas. Se relacionan con

enzimas de modificación de la cromatina y pueden acetilar sustratos no histónicos.

- **Tipo B:** enzimas citoplasmáticas que acetilan específicamente histonas libres previamente a su posterior incorporación en los nucleosomas.

La primera acetiltransferasa de histonas que se describió fue la proteína Hat1p de *S.cerevisiae*, siendo el único representante conocido del grupo de acetiltransferasas de histonas de tipo B por su localización citoplasmática y su especificidad de sustrato. Sin embargo, en los últimos años, se han identificado otros complejos tipo B en levaduras a partir de fracciones nucleares, de modo que el criterio de localización subcelular no resulta ser imprescindible para la clasificación de estas enzimas, y sí, el criterio de especificidad de sustrato (Parthun, 2007; Sklenar & Parthun, 2004).

En base al criterio de **especificidad de sustrato**, en las figuras 13 y 14 se muestra una

Table 1a | **Classes and substrates of histone acetyltransferases***

HAT complexes of the GNAT family											
SAGA (Sc)	SLIK (Sc)	ADA (Sc)	HAT-A2 (Sc)	SAGA (Dm)	ATAC (Dm)	PCAF (Hs)	STAGA (Hs)	TFTC (Hs)	HATB (Sc)	Elongator (Sc)	Hpa2 (Sc)
Catalytic subunit											
Gcn5	Gcn5	Gcn5	Gcn5	GCN5	GCN5	PCAF	GCN5L	GCN5L	Hat1	Elp3	Hpa2
Histones modified											
H2B/H3/H4	H2B/H3/H4	H3	H3	H3	H3/H4	H3/H4	H3/H4	H3/H4	H2A/H4	H3	H3/H4
Associated complex subunits											
Tra1	Tra1			TRA1		PAF400	TRRAP	TRRAP	Hat2	Elp1	Hpa2
Spt7	Spt7 [†]			SPT7			STAF65γ		Hif1	Elp2	
Spt8										Elp4	
Spt3	Spt3			SPT3		SPT3	SPT3	SPT3		Elp5	
Spt20	Spt20									Elp6	
Ada1	Ada1			ADA1			STAF42				
Ada2	Ada2	Ada2	Ada2	ADA2B	ADA2A	ADA2					
Ada3	Ada3	Ada3	Ada3	ADA3	ADA3	ADA3	STAF54	ADA3			
Sgf29	Sgf29	Sgf29	Sgf29	SGF29							
Sgf73	Sgf73						SCA7	SCA7			
Ubp8	Ubp8					TAF5L	TAF5L	TAF5L			
Sgf11	Sgf11					TAF6L	TAF6L	TAF6L			
Taf5	Taf5			TAF5		TAF9	TAF9	TAF9			
Taf6	Taf6			TAF6		TAF10	TAF10	TAF10			
Taf9	Taf9			TAF9		TAF12	TAF12	TAF12			
Taf10	Taf10			TAF10B				TAF2			
Taf12	Taf12			TAF12			STAF36	TAF4			
	Rtg2						STAF46	TAF5			
Chd1	Chd1							TAF6			
		Ahc1		WDA	ATAC1						
		Ahc2			HCF1						

Fig. 13.- Complejos acetiltransferasa de histonas de la familia GNAT. En la tabla, tomada de Lee & Workman, 2007, se agrupan las acetiltransferasas de histona de la familia GNAT en función del sustrato que reconocen. Estas proteínas se han aislado de numerosos organismos, desde levaduras hasta humanos. Dm, *Drosophila melanogaster*; Hs, *Homo sapiens*; Sc, *Saccharomyces cerevisiae*.

recopilación de los componentes y sustratos de las dos familias predominantes de acetiltransferasas de histonas, GNAT y MYST.

Gcn5p es el miembro fundador de la familia Gcn5 N-acetiltransferasas (GNATs) e incluye a las proteínas Gcn5, PCAF, Elp3, Hat1, Hpa2 y Nut1.

De este grupo de enzimas, Elp3p forma parte del complejo *Elongator* que se une a la RNA polimerasa II, formando parte entonces del holoenzima responsable de la elongación de la transcripción. El complejo *Elongator* acetila a las histonas H3 y H4 libres o ya incluidas en los nucleosomas (Carrozza *et al.*, 2003).

Table 1b Classes and substrates of histone acetyltransferases*							
HAT complexes of the MYST family							
NuA4 (Sc)	Pic. NuA4 (Sc)	NuA3 (Sc)	SAS (Sc)	TIP60 (Dm/Hs)	HBO1 (Hs)	MOZ/MORF (Hs)	MSL (Dm)
<i>Catalytic subunit</i>							
Esa1	Esa1	Sas3	Sas2	TIP60	HBO1	MOZ/ MORF	MOF
<i>Histones modified</i>							
H2A/H4	H2A/H4	H3	H4	H2A/H4	H3/H4	H3	H4
<i>Associated complex subunits</i>							
Tra1		Yng1	Sas4	TRRAP	ING5	ING5	MSL1
Yng2	Yng2	Taf14	Sas5	ING3	ING4	BRPF1	MSL2
Yaf9		Nto1		p400	JADE1		MSL3
Eaf1				BRD8			MLE
Eaf2				EPC1			roX RNA
Eaf3				EPC2			
Eaf5				DMAP1			
Eaf6				RUVBL1	EAF6	EAF6	
Eaf7				MRG15			
Epl1	Epl1			BAF53a			
Act1				Actin			
Arp4				GAS41			
				MRGX			
				MRGBP			
				FLJ11730			
				YL1			
				TIP49a			
				TIP49b			
				TRCp120			

Fig. 14. Complejos acetiltransferasa de histonas de la familia MYST. En la tabla, tomada de Lee & Workman, 2007, se agrupan las acetiltransferasas de histona de la familia MYST en función del sustrato que reconocen. Dm, *Drosophila melanogaster* ; Hs, *Homo sapiens*; Sc, *Saccharomyces cerevisiae*.

Nut1p forma parte del complejo multiproteico llamado *Mediator*, implicado en la regulación de la transcripción de la RNA polimerasa II, que puede unir nucleosomas. Hasta la

fecha, sólo se ha descrito que la proteína Nut1 tiene actividad acetiltransferasa de histonas *in vitro* (Roth *et al.*, 2001).

La proteína Hpa2 forma dímeros estables cuando está en solución y la estructura cristalina de Hpa2p revela la formación de un tetrámero cuando se une a acetil coenzima A. Se caracteriza por acetilar *in vitro* residuos de lisina de las histonas H3 y H4, específicamente la lisina 14 de la histona H3. También tiene capacidad para autoacetilarse pero se conoce muy poco acerca de su función fisiológica pues la delección del gen no muestra ningún fenotipo aparente en el crecimiento (Angus-Hill *et al.*, 1999; Sterner & Berger, 2000).

La familia MYST se llama así por sus miembros fundadores: Morfp, Ybf2p, Sas3p, Sas2p y Tip60p. De este grupo, las proteínas Sas2p y Sas3p (*Something About Silencing*) favorecen el silenciamiento del *locus* HML de *Saccharomyces cerevisiae* pero lo inhiben en el *locus* HMR. Por otro lado, Sas2p, promueve el silenciamiento telomérico y además se ha identificado como subunidad catalítica del complejo SAS. Este complejo se caracteriza por acetilar la lisina 16 de la histona H4 libre e *in vitro*, acetila también nucleosomas (Osada *et al.*, 2001).

La proteína Sas3p también es la subunidad catalítica del complejo NuA3 que se caracteriza por acetilar exclusivamente a la histona H3 en los nucleosomas. Además, sirve de puente entre NuA3 (*Nucleosome acetyltransferase of histone H3 type A*) y Spt16p que forma parte de un complejo que participa en la elongación de la transcripción.

Esta familia también está la proteína Esa1p. El gen *ESAI* (*essential SAS2-related acetyltransferase 1*) se identificó por homología con *SAS2* y *SAS3*. La delección de este gen bloquea el paso G2/M del ciclo celular. Esa1p es la subunidad catalítica del complejo NuA4 (*Nucleosome acetyltransferase of histone H4 type A*) y es responsable de la acetilación de las histonas H4 y H2A nucleosómicas. Cuando no forma parte del complejo, puede acetilar las histonas H3, H4 y H2A libres (Clarke *et al.*, 1999).

Aunque estas dos familias son las predominantes, otras proteínas, incluidas P-CAF (*p300/CREB-binding protein-associated factor*), Taf1 y gran número de receptores nucleares coactivadores también poseen actividad acetiltransferasa de histonas. Sin embargo como no contienen verdaderos dominios acetiltransferasa de histona consenso, representan la clase huérfana de enzimas HAT. Recientemente se ha demostrado que la proteína CLOCK del ritmo circadiano tiene un dominio HAT parecido al de la familia MYST, el cual es importante para su función.

Este grupo de enzimas tan diverso se caracteriza porque generalmente se encuentran formando parte de complejos multiproteicos, y dependiendo de las subunidades que se combinen, el complejo presentará unas características específicas. Por ejemplo, algunas subunidades tienen dominios que cooperan para dirigir al complejo a zonas concretas del genoma (Poveda *et al.*, 2004; Yang & Gregoire, 2005)

Se han descrito cinco dominios que reconocen histonas modificadas (Lee & Workman, 2007):

- Los **Bromodominios** son dominios evolutivamente muy conservados que reconocen y unen residuos de lisina acetilada. Gcn5p contiene un bromodominio que será importante para la unión, reconocimiento y retención del complejo remodelador de cromatina SAGA en los nucleosomas acetilados de los promotores.
- Los **Cromodominios** son dominios estructuralmente conservados que se unen específicamente a las lisinas metiladas de las histonas.
- Las **repeticiones WD40** son secuencias repetidas de 40-60 aminoácidos muy poco conservadas que suelen terminar con los aminoácidos triptófano (W) y ácido aspártico (D). Suelen unirse a lisinas metiladas. Varias repeticiones consecutivas de esta secuencia conforman una estructura circular compleja que se ha llamado β -hélice en la que cada eje está formado por cuatro laminas β . Este dominio se ha encontrado en proteínas multifuncionales como en el complejo HAT-B citoplasmático.
- **Dominios Tudor**, identificados por primera vez en *Drosophila melanogaster* como motivos de unión a RNA, se caracterizan por unirse a residuos de arginina y lisina metilados.
- **Dedos PHD** (*Plant Homeodomain*), motivo de unos cincuenta aminoácidos con una secuencia Cys4-His-Cys3 característica en “dedos de zinc” conservada. Suele unirse a lisinas trimetiladas de la histona H3.

Muchos complejos HAT, incluido SAGA, se componen de proteínas con dominios WD40, Tudor y dedos PHD.

Para comprender las funciones de estos dominios y de qué modo ayudan a los complejos HAT a llevar a cabo sus múltiples funciones, se requiere el estudio de dichos dominios teniendo en cuenta los complejos multiproteicos en los que se encuentran.

4.6. Complejos acetiltransferasa de histonas multifuncionales

Desde levaduras hasta humanos, las enzimas HAT en función de las proteínas con las que se asocien y según las señales celulares formarán complejos con diferentes funciones especializadas que no podrían ejercer de otro modo. Así, existen numerosos trabajos en los que se describe su participación en procesos tales como el mantenimiento de estabilidad del genoma y reparación del DNA.

Por ejemplo, las HATs de la familia GNAT funcionan en sitios NER (*Nucleotide Excision Repair*) (reparación de escisión de un nucleótido), mientras que las HATs de la familia MYST funcionan en sitios DSB (*Double-Strand Break*) (reparación de rotura de doble cadena).

No solamente modifican histonas sino que también pueden acetilar sustratos no histónicos. Por ejemplo, algunas HATs funcionan como factores transcripcionales acetiltransferasas (FATs), lo que significa que estas enzimas pueden acetilar sustratos no histónicos para regular sus actividades en la célula. Recientemente muchas investigaciones tratan de identificar funciones específicas de HATs y los mecanismos por los que llevan a cabo esas funciones (Lee & Workman, 2007).

Como se indicó en el apartado anterior, es la combinación de varias modificaciones lo que determina el reconocimiento de las zonas de unión de los complejos de remodelación de la cromatina determinando así el tipo de proceso a desarrollar.

4.7. Acetiltransferasa de histona 1 de *Saccharomyces cerevisiae*, ScHat1p

La proteína Hat1p de *S. cerevisiae* fue la primera actividad acetiltransferasa de histona identificada. Esta enzima se purificó a partir de extractos citoplasmáticos procedentes de mutantes de *S. cerevisiae* tras analizar su actividad sobre un péptido correspondiente a los aminoácidos 1 a 28 de la histona H4. En estudios posteriores se identificó *HAT1* como el gen que codifica la subunidad catalítica del complejo HAT de tipo B por su localización citoplasmática (Kleff *et al.*, 1995; Parthun *et al.*, 1996b)..

Hat1p (43.87 kDa) es una proteína muy conservada evolutivamente y se ha aislado no sólo en levaduras y humanos sino también en otros organismos como *Xenopus laevis*, *Zea mais* o *Tetrahymena thermophila*.

Formando parte de este complejo enzimático también se encuentran las proteínas Hat2 y Hif1 (*Hat1 interacting factor 1*) que sitúan la localización del complejo también en el núcleo.

Hif1p se detecta exclusivamente en el núcleo y funciona como una chaperona de histonas acompañando a los tetrámeros de histonas H3 y H4 acetilados de nueva síntesis para facilitar su incorporación en la formación de cromatina durante la replicación del DNA (Poveda *et al.*, 2004).

Hat2p (45.06 kDa) cuyo homólogo en humanos es RbAp46 (*Retinoblastoma associated protein 46*), actúa de puente entre las proteínas Hat1p y Hif1p y es necesaria para la unión específica de Hat1p con la histona H4. Además se caracteriza por presentar repeticiones WD40 que reconocen residuos de lisina metilados. RbAp46 pertenece a la familia de proteínas RbAp46/48 de mamíferos. Algunos miembros de esta familia se han

identificado en diferentes complejos que ejercen su acción sobre histonas y/o cromatina como complejos remodeladores de cromatina, en complejos con actividad histona desacetilasa como es el complejo SIN3/HDAC en mamíferos, o complejos relacionados con el ensamblaje de nucleosomas (Kleff *et al.*, 1995; Parthun *et al.*, 1996a; Verreault *et al.*, 1998).

El complejo HAT-B (Hat1p/Hat2p) ha sido el único enzima tipo B conocido durante muchos años, siendo la histona H4 libre su sustrato específico. Sklenar y Parthun en 2004, identificaron en *S. cerevisiae* otros tres complejos tipo B con localización nuclear: HAT-B3.1, HAT-B3.2 y HAT-B3.3, siendo característica su especificidad por la histona H3 libre (Sklenar & Parthun, 2004).

Las histonas H3 y H4 recién sintetizadas son inmediatamente acetiladas siguiendo un patrón muy específico. De los residuos de lisina del extremo N-terminal de la histona H4 que pueden ser acetilados (Lys5, 8, 12 y 16), se conserva la acetilación en las posiciones 5 y 12 o equivalentes pero no en las posiciones 8 y 16 según estudios realizados en diversos organismos. A este patrón de acetilación, tan conservado evolutivamente, se le han asignado las funciones de ensamblaje de la cromatina, y deposición de histonas y además coincide parcialmente con los residuos que son modificados *in vitro* por el complejo HAT-B de varias especies.

En relación con la histona H3, la acetilación de nuevas moléculas se conserva pero el patrón de acetilación puede variar entre diferentes organismos.

Una vez incorporadas en los nucleosomas, las histonas H3 y H4 son desacetiladas durante el proceso de maduración de la cromatina. Hat2p participa en la especificidad del complejo y su ausencia disminuye en 10 veces su actividad. *In vitro*, Hat2p es necesario para que la unión con la histona H4 sea estable (Parthun *et al.*, 1996a).

Resulta sorprendente que a pesar de la existencia de un patrón de acetilación tan conservado de la histona H4, la sustitución de las lisinas 5 y 12 por residuos de arginina o glutamina (no acetilables), no afecta a la formación de nucleosomas ni *in vitro* ni *in vivo* (Ma *et al.*, 1998).

Por otro lado, la delección de *HAT1* o *HAT2*, o ambos genes no causa ningún fenotipo aparente en *S. cerevisiae*. (Rosaleny *et al.*, 2005).

El silenciamiento telomérico consiste en la represión transcripcional de los genes próximos a la región de los telómeros y se caracteriza por una estructura de la cromatina diferente al resto. La delección de *HAT1* o *HAT2* en *S. cerevisiae*, combinado con mutaciones específicas del extremo amino terminal de la histona H3, resulta en un defecto significativo del silenciamiento telomérico (Kelly *et al.*, 2000). También la delección de *HIF1* muestra defectos similares en silenciamiento telomérico (Poveda *et al.*, 2004).

Otras combinaciones más drásticas, ya que resultan ser letales para las células, son la delección simultánea del extremo N-terminal de las histonas H3 y H4, o la mutación de las lisinas 5, 8 y 12 junto con la delección del extremo N-terminal de la histona H3, debido al bloqueo que provocan en el ensamblado de los nucleosomas *in vivo*. (Ling *et al.*, 1996; Ma *et al.*, 1998)

Durante la fase S del ciclo celular las células replican su DNA y de forma coordinada le incorporan las histonas parentales y las de nueva síntesis para formar la cromatina. En *S. cerevisiae*, la replicación se inicia en varios puntos de origen muy definidos y que se mantienen unidos mediante un complejo multiproteico muy conservado evolutivamente conocido como complejo de reconocimiento de origen (ORC, *origin recognition complex*). Trabajos recientes demuestran una asociación directa y estable entre el complejo Hat1p/Hat2p y el complejo ORC constitutivamente durante el ciclo celular (figura 15). Es característico el hecho de que este complejo carece de Hif1p, por lo que es de esperar que ejerza una función diferente a la del complejo remodelador de la cromatina formado por Hat1p/Hat2p/Hif1p (Suter *et al.*, 2007).

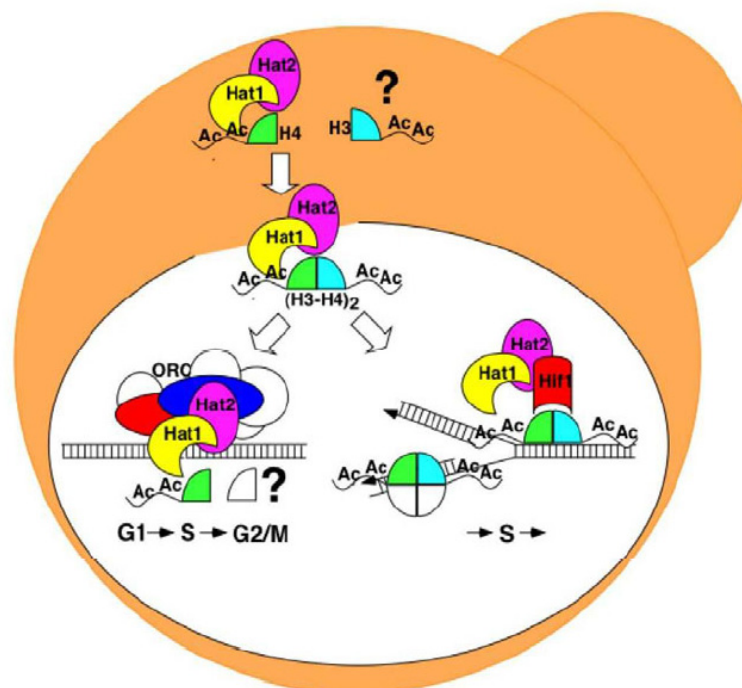


Fig. 15.- Estado actual de las diferentes asociaciones de Hat1p en la célula. Además del complejo citoplasmático Hat1p/Hat2p, el complejo nuclear Hat1p/Hat2p-Hif1p se une a la cromatina durante la fase S del ciclo celular. Un pequeño porcentaje del complejo Hat1p/Hat2p entra al núcleo y se mantiene constitutivamente unido a complejos ORC. También cabe la posibilidad de que Hat1p acetile específicamente a la histona H3 y otros sustratos. (Esquema tomado de Suter *et al.*, 2007)

Mediante el uso de microarrays de DNA se han realizado análisis de expresión en mutantes *hat1*, *hat2* y *hat1hat2* en *S. cerevisiae*. El transcriptoma del mutante *hat1* genera una

respuesta diferente a la de la delección de *HAT2* y sugiere que las proteínas Hat1p y Hat2p tienen funciones diferentes, aparte de las que comparten por formar parte del mismo complejo. El transcriptoma del mutante doble, produce resultados más coincidentes con el del mutante *hat1*, aunque el número de genes afectados y los cambios en los niveles de expresión es mayor, de modo que la delección de *HAT2*, no sólo no compensa el fenotipo transcripcional observado en el mutante *hat1*, sino que lo intensifica (Rosaleny *et al.*, 2005).

La delección de *SIR2*, gen que codifica una histona desacetilasa, produce una disminución en la esperanza de vida de las células de *S. cerevisiae*. La interrupción de otras desacetilasas de histonas en esta levadura afecta de diferente manera este proceso, así, los mutantes *rpd3* presentan un aumento en su esperanza de vida mientras que en los mutantes *hda1* el envejecimiento celular observado es como el de las cepas silvestres (Imai *et al.*, 2000; Sun & Hampsey, 1999). Teniendo en cuenta estas observaciones, estudios recientes, muestran que la delección de *HAT2* aumenta la esperanza de vida en células de levadura, entendiéndose ésta como el número de divisiones que una célula realiza antes de morir. Los mutantes *hat1* sin embargo, presentan una esperanza de vida similar a la de las cepas silvestres (Rosaleny *et al.*, 2005).

Se ha observado que el complejo Hat1p/Hat2p-Hif1p es dirigido hacia las zonas de rotura de doble cadena del DNA (*DNA double strand breaks*) al mismo tiempo que Rad52p, que forma parte de la maquinaria de reparación del DNA. La delección de *HAT1* junto con la sustitución de las lisinas 9, 18, y 27 de la histona H3 por arginina, da lugar a células más sensibles a agentes que dañan el DNA. Estos datos sugieren que Hat1p podría facilitar los procesos de reparación del DNA además de participar en la restauración de la estructura de la cromatina en *S. cerevisiae* (Qin & Parthun, 2002; Qin & Parthun, 2006).

4.8. Acetiltransferasa de histona 5 de *Saccharomyces. cerevisiae*, ScGcn5p

El gen *GCN5* (*General Control Non-repressed*) se clonó en *S. cerevisiae* como un coactivador transcripcional cuando se realizaban experimentos de rastreo genético para aislar mutantes incapaces de crecer en medios con limitación controlada de aminoácidos dependiente de *GCN4* (Georgakopoulos & Thireos, 1992; Penn *et al.*, 1983).

Inicialmente se consideró que era un regulador positivo de genes que participan en la biosíntesis de aminoácidos, posteriormente, por su similitud con la proteína p55 del ciliado *Tetrahymena*, se considera como una acetiltransferasa de histonas.

Diversos estudios genéticos mostraron la participación de *GCN5* en la regulación transcripcional de algunos genes, que junto con su capacidad para acetilar histonas supuso un descubrimiento de gran importancia al unir la regulación transcripcional con la acetilación de histonas (Kuo *et al.*, 1996).

Como ya se ha indicado, Gcn5p es el miembro fundador de la familia Gcn5 N-acetiltransferasas (GNATs). Considerando el criterio de localización subcelular, es una acetiltransferasa de histonas de tipo A, por su localización nuclear. En la figura 16 se muestran los dominios característicos de la proteína Gcn5p de *S. cerevisiae*. Entre sus dianas principales, están los residuos de lisina 11 y 16 del extremo amino terminal de la histona H2B y los residuos de lisina 9, 14, 18, 23 y 27 de la histona H3 cuando no se encuentran formando parte de los nucleosomas.

Sin embargo su especificidad varía cuando se encuentra formando parte de complejos multiproteicos de modo que puede acetilar histonas nucleosomales, sobre todo la lisina 14 de la histona H3 y en menor medida las lisinas 8 y 16 de la histona H4 (Grant *et al.*, 1997; Ruiz-García *et al.*, 1998; Suka *et al.*, 2001; Zhang *et al.*, 1998).



Fig. 16.- Esquema con los dominios característicos de GCN5 de *S. cerevisiae*. En el dominio GNAT representativo de la familia reside la actividad catalítica de transferencia del grupo acetilo del acetil coenzima A al grupo amino primario del receptor. Además, GCN5 contiene un Bromodominio implicado en la interacción con residuos de lisina acetilados y con otras proteínas para el establecimiento de complejos multiproteicos. Esta figura se obtuvo con la herramienta ScanProsite.

Hasta la fecha, se conoce la participación de Gcn5p como subunidad catalítica de 4 complejos de remodelación de la cromatina en levaduras: ADA, SAGA (*Spt-Ada-Gcn5 acetyltransferasa*), el complejo SLIK (SAGA-like) y HAT-A2. Como se muestra en la figura 13 del apartado 4.5. de este capítulo, en la composición de estos complejos participan otras proteínas aunque los cuatro contienen las proteínas Ada2p y Ada3p además de Gcn5p. (Carrozza *et al.*, 2003)

Resulta complejo enumerar aisladamente las funciones de GCN5 ya que en función del complejo multiproteico en el que se encuentre, las funciones varían. De forma general se sabe que la acetilación por Gcn5p causa desplazamiento de los nucleosomas en los promotores durante la activación transcripcional facilitando la unión de la proteína TBP (*TATA binding protein*), la RNapolimerasa II y proteínas coactivadoras. (Govind *et al.*, 2007)

Diversos trabajos demuestran la implicación de Gcn5p, en combinación con otras acetiltransferasas de histonas como Sas3p, en el desarrollo del ciclo celular y en la regulación transcripcional de genes necesarios para el final de la telofase durante la mitosis. (Howe *et al.*, 2001; John *et al.*, 2000; Krebs *et al.*, 2000).

El complejo SAGA, que contiene más de veinte subunidades conocidas, contiene 15 posibles dominios de interacción con cromatina y aunque SAGA contiene dos proteínas con

Bromodominio, Gcn5p y Spt7p, solamente el bromodominio de Gcn5p funciona en la unión a nucleosomas acetilados *in vitro*. Cuando Gcn5p forma parte de este complejo acetila específicamente las histonas H3, H2B y H4. Se sabe que el complejo SAGA al contener las proteínas Spt3, Spt8 y Spt7 reprime un grupo de genes relacionados con la biosíntesis de aminoácidos cuando las células crecen en medio rico, pero en condiciones de desrepresión actúa el complejo SLIK/SALSA (*SAGA-like/SAGA altered Spt8 absent*) que facilita la expresión de estos genes. En función de la composición proteica, el complejo puede modular positiva o negativamente determinados genes (Carrozza *et al.*, 2003; Sterner & Berger, 2000).

El complejo ADA acetila principalmente la histona H3 nucleosomal. Contiene las subunidades Ada2p, Ada3p, Sgf29p, Gcn5p, Ahc1p y Ahc2p. Se ha descrito que la subunidad Ahc1 (*ADA HAT complex component 1*), está implicada en el mantenimiento de la integridad estructural del complejo.

Gcn5p cuando forma parte del complejo ADA, controla la transición de metafase a anafase en levaduras y es necesaria para la correcta segregación de los cromosomas y la función del centrómero/cinetocoro durante la mitosis. Los mutantes *gcn5* en *S. cerevisiae* se caracterizan por un tiempo de generación más largo y una fase G2 más prolongada y además el crecimiento a 25°C y sobre todo a 37°C da lugar a células elongadas y con morfología anormal. Otro fenotipo observado en las células carentes de *GCN5* es la sensibilidad que muestran hacia drogas, como Benomil, que provocan la despolimerización de los microtúbulos. Además, en estos mutantes la distribución de los cromosomas en el núcleo es defectuosa y se produce con mayor frecuencia la pérdida de cromosomas durante la segregación cromosómica (Vernarecci *et al.*, 2008).

GCN5, está evolutivamente conservado, con ortólogos en otros organismos eucariotas. La delección de *GCN5* provoca el crecimiento defectuoso de embriones de ratón y en *Drosophila melanogaster* se bloquean los estadios iniciales de la oogénesis y la metamorfosis (Carre *et al.*, 2005).

En infección por VIH-1 en humanos, al igual que PCAF, GCN5L2p es movilizada por la proteína viral Tat. La acetilación de varios residuos de lisina en el dominio activador de Tat facilita la unión de otros factores en unas regiones específicas de los transcritos virales de modo que finalmente el complejo formado estimula la activación transcripcional de la RNA polimerasa II y por consiguiente la expresión génica del virus (Col *et al.*, 2001).

En *Arabidopsis thaliana*, la eliminación de *GCN5* provoca efectos pleiotrópicos que alteran el desarrollo de la planta y la respuesta a condiciones ambientales como la luz y el frío.

Todo esto sugiere que *GCN5* está implicado tanto en la regulación a largo plazo del panorama epigenético de la cromatina como en el control a corto plazo de los cambios transcripcionales (Benhamed *et al.*, 2008).

En una publicación reciente se muestra como Gcn5p se asocia físicamente con los orígenes de replicación de DNA facilitando la replicación mientras que en células *gcn5* se observa condensación de la cromatina en esas zonas (Espinosa *et al.*, 2010).

4.9. Acetiltransferasas de histonas en *Candida albicans*

En nuestro laboratorio se han caracterizado los genes de *C. albicans* homólogos a los genes *HAT1*, *HAT2* y *GCN5* de *S. cerevisiae* que codifican acetiltransferasas de histonas y se ha analizado su papel durante la morfogénesis.

Hasta la fecha no se ha publicado ningún trabajo donde se estudien estos genes en esta levadura.

5. ANÁLISIS DE LA REGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN GÉNICA MEDIANTE MICROARRAYS

En la última década hemos asistido a un importante avance en el desarrollo y accesibilidad de las técnicas de manipulación genética. La secuenciación de ADN se ha convertido en una técnica rutinaria en cualquier laboratorio y la participación conjunta de muchos laboratorios en proyectos de secuenciación ha permitido conocer la secuencia completa del genoma de numerosas especies rápidamente.

El siguiente reto que se nos plantea es la búsqueda de los mecanismos implicados en la regulación y expresión de los genes y cómo interaccionan funcionalmente entre sí. Este es el objeto de estudio de la genómica funcional. La información que se genera en cualquier estudio a escala genómica es tan abundante que ha implicado el desarrollo en paralelo de potentes herramientas bioinformáticas para el análisis y el correcto almacenamiento de dicha información.

La expresión de los genes de un organismo, varía de unas células a otras, del momento del desarrollo en que se encuentren y en función de las condiciones ambientales. Una de las herramientas ampliamente utilizada en genómica funcional son los microarrays de DNA. Se pueden definir como una colección de moléculas de DNA de cadena sencilla ordenadas sobre un sustrato sólido, de manera que forman una matriz de secuencias bidimensional. Esta herramienta permite el análisis de la expresión y la variabilidad genética de muchos genes, bajo diferentes condiciones, en un sólo experimento.

Estos fragmentos de material genético pueden ser secuencias cortas llamadas oligonucleótidos, o de mayor tamaño, cDNA (DNA complementario, sintetizado a partir de mRNA), o bien productos de PCR. A menudo estas moléculas de DNA de una sola hebra, inmovilizadas sobre el soporte, se denominan sondas. Los ácidos nucleicos de las muestras en

estudio se marcan por diferentes métodos (enzimáticos, fluorescencia, etc.) y se incuban sobre el conjunto de sondas del microarray para permitir la hibridación de secuencias homólogas. Posteriormente se adquiere una imagen del microarray con un escáner especial y junto con herramientas bioinformáticas se procede a la interpretación y análisis de los datos obtenidos (López *et al.*, 2002, Genoma España/CIBT-FGUAM, 2002).

Desde sus orígenes, la aplicación más habitual en la que se han empleado los microarrays de DNA es en la monitorización de los patrones de expresión génica. Actualmente se utilizan ampliamente en el área biosanitaria para la detección de mutaciones y variaciones del genoma, para el diagnóstico molecular, en caracterización del perfil genético de enfermedades o en farmacogenómica (búsqueda de nuevos fármacos y su validación).

También se han desarrollado microarrays en los que el material fijado no es DNA sino proteínas o tejidos.

La vasta cantidad de resultados obtenidos con microarrays y la variabilidad de los mismos ha requerido la puesta en común de los investigadores para la estandarización de los protocolos utilizados y el tratamiento de la información con el objetivo de que tan valiosa información sea productiva a la hora de desarrollar procedimientos y aplicaciones fiables para la práctica clínica.

Por estas razones en 1999 surgió una iniciativa internacional conocida como MGED (*Microarray Gene Expression Data Society*, <http://www.mged.org>) para determinar la información mínima que debe contener un experimento con microarrays para que los datos puedan ser fácilmente interpretados y los resultados puedan ser reproducidos independientemente. Dichas pautas se recogen en el documento MIAME, (*Minimal Information About a Microarray Experiment*) (Brazma *et al.*, 2001).

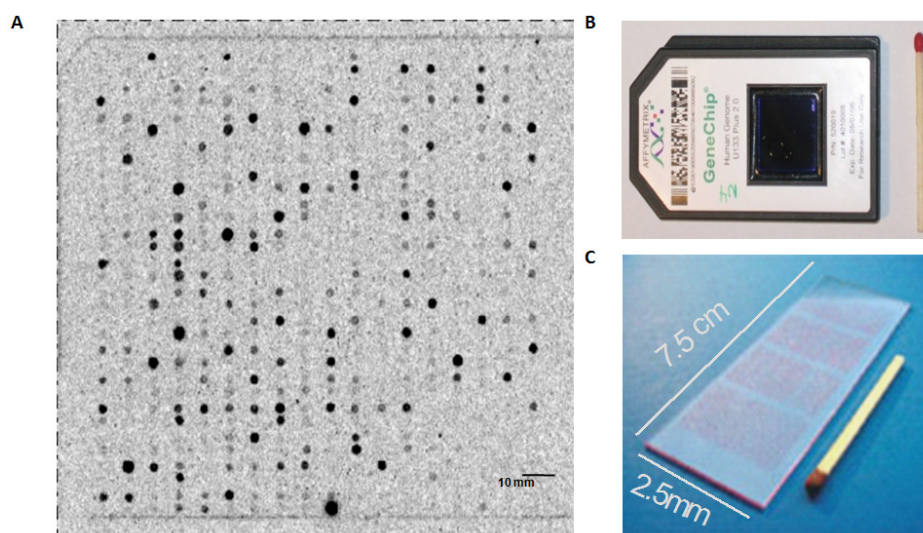


Fig. 17.- Tipos de arrays. A) Tamaño y aspecto de un macroarray; B) microarray de DNA comercializado por Affimetrix; C) microarray de cDNA sobre superficie de vidrio.

La disponibilidad de la secuencia completa del genoma de *C. albicans* desde el año 2000, ha conducido rápidamente al empleo de la técnica de los microarrays para la realización de estudios de expresión génica. Al principio, como se muestra en la figura 17A, se utilizaban membranas de Nylon (macroarrays) para la inmovilización de un número bastante limitado de sondas, que representaban apenas una tercera parte del genoma de *C. albicans*. Posteriormente, aparecieron en el mercado los microarrays de la empresa Affimetrix que utiliza métodos de fotolitografía combinada con una química especial de síntesis de DNA (Lipshutz *et al.*, 1999).

El desarrollo de microarrays de cDNA sobre superficie de vidrio con la totalidad de genes de *C. albicans* y con un coste inferior al de los microarrays de Affimetrix, ha supuesto un aumento del número de estudios sobre la regulación de la expresión génica mediante el uso de microarrays en *C. albicans*.

II. OBJETIVOS

1. OBJETIVOS DE ESTE TRABAJO

Una de las líneas de investigación en nuestro grupo se centra en el estudio y caracterización de genes implicados en procesos de remodelación de la cromatina y como se ve afectada por ellos la transición levadura-hifa en *C. albicans*.

Se están estudiando exhaustivamente las rutas de señalización que regulan la formación de hifas en este patógeno pero se carece de datos que relacionen la conexión entre rutas metabólicas, elongación celular y cambios de expresión génica en el contexto de la cromatina durante la transición dimórfica.

Teniendo en cuenta que los procesos de acetilación y desacetilación de histonas constituyen un mecanismo importante en la regulación de la expresión génica en organismos eucariotas, en el presente trabajo nos planteamos los objetivos siguientes:

- 1- Caracterizar los genes *GCN5*, *HAT1* y *HAT2* de *Candida albicans* que codifican acetiltransferasas de histonas.
- 2- Determinar bajo condiciones de inducción habituales de cambios morfológicos si las proteínas CaGcn5p, CaHat1p y CaHat2p son necesarias para el desarrollo de los mismos.
- 3- Analizar si CaGcn5p y CaHat1p, o los complejos en los que intervienen, participan en la regulación de la expresión de genes que codifican factores de transcripción o genes estructurales implicados en el proceso de transición levadura-hifa.
- 4- Estudiar la contribución de las proteínas CaGcn5p y CaHat1p al perfil de transcripción de *C. albicans*, durante el crecimiento como levadura y durante la transición dimórfica. Establecer qué genes están regulados por ambas proteínas y comparar ambos transcriptomas.

III. MATERIALES Y MÉTODOS

1. MICROORGANISMOS UTILIZADOS

1.1. Cepas de *Candida albicans*

En este trabajo se han utilizado las cepas de *C. albicans* que se detallan en la tabla I con su genotipo y procedencia.

Tabla I.- Cepas de *C. albicans*

CEPAS	GENOTIPO	CEPA PARENTAL	PROCEDENCIA
SC5314	Aislado clínico	---	(Guillum <i>et al.</i> , 1984)
CAI4	$\Delta ura3::imm434/\Delta ura3::imm434$	SC5314	(Fonzi & Irwin, 1993)
RGL1	$\Delta hat1::hisG-URA3-hisG/HAT1$ $\Delta ura3::imm434/\Delta ura3::imm434$	CAI4	Este trabajo
RGL2	$\Delta hat1::hisG/HAT1$ $\Delta ura3::imm434/\Delta ura3::imm434$	RGL1	Este trabajo
RGL3	$\Delta hat1::hisG/\Delta hat1::hisG-URA3-hisG$ $\Delta ura3::imm434/\Delta ura3::imm434$	RGL2	Este trabajo
RGL4	$\Delta hat1::hisG/\Delta hat1::hisG$ $\Delta ura3::imm434/\Delta ura3::imm434$	RGL3	Este trabajo
RDH1	$\Delta hat2::hisG-URA3-hisG/HAT2$ $\Delta ura3::imm434/\Delta ura3::imm434$	CAI4	Este trabajo
RDH2	$\Delta hat2::hisG/HAT2$ $\Delta ura3::imm434/\Delta ura3::imm434$	RDH1	Este trabajo
RDH3	$\Delta hat2::hisG/\Delta hat2::hisG-URA3-hisG$ $\Delta ura3::imm434/\Delta ura3::imm434$	RDH2	Este trabajo
RDH4	$\Delta hat2::hisG/\Delta hat2::hisG$ $\Delta ura3::imm434/\Delta ura3::imm434$	RDH3	Este trabajo
RDG1	$\Delta gcn5::hisG-URA3-hisG/GCN5$ $\Delta ura3::imm434/\Delta ura3::imm434$	CAI4	Este trabajo
RDG2	$\Delta gcn5::hisG/GCN5$ $\Delta ura3::imm434/\Delta ura3::imm434$	RDG1	Este trabajo
RDG3	$\Delta gcn5::hisG/\Delta gcn5::hisG-URA3-hisG$ $\Delta ura3::imm434/\Delta ura3::imm434$	RDG2	Este trabajo
RDG4	$\Delta gcn5::hisG/\Delta gcn5::hisG$ $\Delta ura3::imm434/\Delta ura3::imm434$	RDG3	Este trabajo
RDG5	$\Delta gcn5::hisG/\Delta gcn5::hisG$ $\Delta ura3::imm434/\Delta ura3::imm434$ Cepa transformada con el plásmido pADG3 que contiene la secuencia ADHp-GCN5 y el genURA3.	RDG4	Este trabajo
RDG6	$\Delta gcn5::hisG/\Delta gcn5::hisG$ $\Delta ura3::imm434/\Delta ura3::imm434$ Cepa transformada con el plásmido pAGG8 que contiene la secuencia GCN5-GFP3 y el genURA3.	RDG4	Este trabajo

1.2. Cepas de *Escherichia coli*

Cepa de *E. coli* empleada en este trabajo, tabla II.

Tabla II.- Cepa de *E. coli*.

CEPAS	GENOTIPO	PROCEDENCIA
DH5 α	<i>F, Φ80, lac4M15, recA1, endA1, gyrA96, thi1, supE44, relA1, deoR, ΔU169</i>	(Hanahan, 1985)

2. MEDIOS Y CONDICIONES DE CULTIVO

2.1. Medios y condiciones de cultivo de *Escherichia coli*

Los cultivos de *E. coli* se llevaron a cabo a una temperatura de incubación de 37°C, usando LB como medio de cultivo:

- **LB:** medio descrito por Luria y Bertani (Sambrook & Russell, 2002).

Composición	Concentración (g/L)
Extracto de levadura	5
Bacto triptona	10
NaCl	10
Agar	13,5

El pH final se ajustó con NaOH a un valor de 7,5. Para obtener medio sólido se añadió agar al 1,35%. Para la selección de clones resistentes a ampicilina, ésta se añadió a los medios a una concentración final de 50 μ g/ml.

2.2. Medios y condiciones de cultivo de *Candida albicans*

Los medios se prepararon con agua MilliQ y se esterilizaron en autoclave o con microondas. Los medios sólidos se prepararon añadiendo agar al 2% de concentración final. El crecimiento en medio líquido se determinó midiendo la absorbancia en un espectrofotómetro a una longitud de onda de 600nm, o mediante recuento de células en una cámara Thoma-Zeiss.

Los cultivos en medio líquido de *C. albicans* se llevaron a cabo en matraces *Erlenmeyer* de vidrio con un volumen de medio no superior a un tercio del volumen total del matraz. Las incubaciones se llevaron a cabo en agitadores orbitales Kühner modelo ISF-1-W a 250 rpm con temperatura controlada.

Para el crecimiento de las cepas Ura- todos los medios se suplementaron con uridina a una concentración final de 1 mM.

2.2.1. Crecimiento levaduriforme

- **YNB:** Medio mínimo. Base nitrogenada de levadura sin aminoácidos (YNB w/o aa' de Difco). La glucosa se añadió tras esterilizar el medio en el autoclave para evitar su caramelización. Se empleó una solución estéril al 40%.

- **YEPD:** Medio rico empleado rutinariamente para el cultivo de levaduras.

Composición	Concentración (g/L)
Extracto de levadura	10
Glucosa	20
Bactopeptona	20

- **Medio Lee:** Medio mínimo (Lee *et al.*, 1975).

Composición	Concentración (g/L)
SO ₄ (NH ₄) ₂	5
MgSO ₄ · 7H ₂ O	0,2
K ₂ HPO ₄ anhidro	2,5
NaCl	5
Glucosa	12,5
Prolina	0,5
Biotina	0,01

El pH final se ajustó con una solución de HCl 37% a un valor de 6,8. En el presente trabajo este medio siempre se esterilizó por microondas.

- **Medio Mínimo (también llamado medio SD) con sorbitol 1M:** (Sherman *et al.*, 1986). Se trata del medio selectivo de recuperación de los protoplastos.

Tras esterilizar en autoclave, se añadió sorbitol a partir de una solución concentrada para llegar a una concentración final de 1 M. Del mismo modo, se añadió la glucosa al medio a partir de una solución estéril al 40%. En este trabajo, este medio sólo se utilizó en fase sólida añadiendo agar a una concentración final del 2%.

Composición	Concentración (g/L)
YNB w/o αα'	6,7
Glucosa	10
Sorbitol	182,17

- **Medio Mínimo suplementado con 5-FOA y uridina:** (Boeke *et al.*, 1987; Fonzi & Irwin, 1993).

Composición	Concentración (g/L)
YNB w/o $\alpha\alpha'$	6,7
Glucosa	10
Agar	20
5'-FOA	0,626
Uridina	0,1

El medio YNB y la solución de 5-FOA (ácido 5'-flouorótico) se preparan por separado. El medio se esteriliza en autoclave y se deja atemperar, añadiéndole a continuación la glucosa, a partir de una solución concentrada previamente esterilizada.

La preparación del 5-FOA se hace en agua MilliQ, ajustando el pH a 7.0 con NaOH 1M para que se disuelva completamente. La uridina se prepara en un pequeño volumen de agua MilliQ y se añade a la solución de 5-FOA. Esta solución se esteriliza por filtración añadiéndose en su totalidad al medio atemperado que se mezcla suavemente y se reparte a razón de 30 ml por placa.

2.2.2. Inducción del crecimiento filamentoso en medio sólido

Los medios que se describen a continuación se utilizaron para la observación del crecimiento filamentoso en superficie sólida.

- **Medio embebido:** Descrito por (Brown *et al.*, 1999), induce la formación de hifas dentro de una matriz. El agar que se utiliza en este medio está libre de impurezas tales como pigmentos y sales que podrían interferir en la formación de hifas y se utiliza al 1% de concentración final.

Para su preparación se mezclaron suavemente 25 ml de medio atemperado a 50°C con diferentes diluciones de células de cada cepa a estudiar a razón de 50 - 100 ufc por placa y se vertieron en placas que fueron incubadas a 28°C durante 5 días. Tras este período, se tomaron fotografías de las colonias resultantes con una lupa *Zeiss* que llevaba acoplada una cámara réflex *KODAK*.

Composición	Concentración (g/L)
Extracto de levadura	10
Glucosa	20
Bactopeptona	20
Bacto Agar (<i>Difco</i>)	10

- **Medio SLADH:** (Gimeno *et al.*, 1992). Se trata de un medio con bajo contenido en nitrógeno. Se preparan los distintos componentes por separado, tal como se describe a continuación.

Composición	Concentración
YNB w/o $\alpha\alpha'$, w/o $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$	6,7 g/L
L-Histidina	0,2M
$\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$	0,05mM
Glucosa	20 g/L
Agar	20 g/L

La base nitrogenada de levadura sin aminoácidos ni sulfato de amonio (YNB w/o $\alpha\alpha'$, w/o $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$, de *DIFCO*), se preparó concentrada 4 X y se esterilizó por filtración. Se prepararon soluciones madre de sulfato de amonio 0,1 M y de L-histidina 0,5 M esterilizadas del mismo modo. El agar de uso normal para otros medios, se preparó al 2% de concentración final pero 4 veces concentrado y se lavó varias veces antes de esterilizarlo en autoclave con agua MilliQ estéril, de este modo se eliminaron muchas impurezas del agar y las placas se mantenían frescas por más tiempo. Las placas se inocularon con células de cada cepa a estudiar a razón de 50 a 100ufc por placa y se incubaron a 37°C durante 7 días al cabo de los cuales se tomaron fotografías con una lupa *Zeiss* que llevaba acoplada una cámara réflex *KODAK*.

- **Medio SPIDER:** Descrito por (Liu *et al.*, 1994)

Composición	Concentración (g/L)
Manitol	10
Nutrient Broth (<i>British Pharmacopeia</i>)	10
K_2HPO_4	2
Agar	13,5

- **Medio Lee + 4% suero:** Se trata de medio Lee, pH 6,8 al que tras esterilizar en autoclave se le añadió suero bovino fetal (*GIBCO-BRL*) a una concentración final del 4%. Este medio en su composición contiene agar al 2% de concentración final.

- **Medio Lee + N-acetilglucosamina:** Se trata de medio Lee, pH 6,8 modificado ya que se preparó sin glucosa y una vez esterilizado se le añadió como fuente de carbono N-acetilglucosamina a una concentración final de 1,25%. Al igual que el medio anterior, contiene agar al 2% de concentración final.

2.2.3. Inducción del crecimiento filamentoso en medio líquido

En esta memoria, la transición dimórfica de levadura a hifa se llevó a cabo en medio líquido bajo cuatro condiciones diferentes:

- Inducción por cambio de temperatura

Las células se incubaron en matraces tipo *Erlenmeyer* con medio Lee, pH 6,8 a 28°C y agitación a 200 rpm hasta crecimiento exponencial (de 16 a 22 horas según la cepa utilizada). Tras comprobar con el microscopio la morfología levaduriforme y la ausencia de contaminación, las células se colectaron por centrifugación, se lavaron dos veces con agua MilliQ estéril y se resuspendieron en un matraz con agua MilliQ estéril a la concentración de 2×10^7 células/ml. Se incubaron durante dos horas a 28°C con agitación a 200 rpm de modo que la mayoría de las células completaran un ciclo de división deteniéndose en G1. En estas condiciones, se mantuvieron en reposo metabólico de 24 a 48 horas a 4°C. Las células se recogieron por centrifugación a 4°C y se inocularon a razón de 10^7 células/ml en 2 matraces con medio Lee pH 6.8, en uno de ellos precalentado a 39°C y el otro a 28°C e inmediatamente se incubaron a 37°C y 28°C respectivamente, con agitación a 200 rpm. Al cabo de una hora de incubación se observaron tubos germinativos incipientes e hifas a las tres horas en el cultivo a 37°C, mientras que para estos mismos tiempos, las células se mantuvieron levaduriformes en el cultivo a 28°C, siendo indicativo de que la formación de hifas se daba en respuesta a las condiciones ensayadas.

- Inducción por cambio de temperatura y presencia de suero

Las células recibieron el mismo tratamiento que para la inducción por temperatura, pero con la diferencia de que el medio Lee pH 6.8, fue suplementado con un 4% de suero bovino fetal (*GIBCO/BRL*). La presencia de suero acelera la formación de hifas a 37°C.

- Inducción por cambio de pH

En *C. albicans* el pH ácido favorece el crecimiento en forma de levaduras, mientras que valores de pH neutro estimulan la formación de hifas. Para inducir la formación de hifas in vitro en respuesta al cambio de pH, se inocularon matraces con medio Lee a pH 4.5 con células de *C. albicans* y se incubaron a 37°C de 12 a 14 horas. Tras este período, las levaduras se recogieron por centrifugación, se lavaron y trataron del mismo modo que para la inducción por cambio de temperatura. Así, tras el reposo metabólico a 4°C, las células se inocularon a una concentración de 10^7 células/ml en medio Lee pH 6.8 y se incubaron a 37°C con agitación. Como control, se inoculó la misma concentración de células en un matraz con medio Lee pH 4.5 comprobando que las células no formaban hifas tras ser incubadas a 37°C.

- Inducción por N-acetilglucosamina (NAGlc) y cambio de pH.

Las células se trataron del mismo modo que en la inducción por cambio de pH, con la diferencia de que el medio Lee en el que fueron inoculadas tras el reposo metabólico, contenía N-acetilglucosamina en lugar de glucosa como fuente de carbono. Para comprobar que la formación de hifas se debía a las condiciones del ensayo, se inocularon e incubaron células en medio Lee pH 4.5 con glucosa a 37°C.

El crecimiento en medio líquido con NAGlc como fuente de carbono supone, al igual que la presencia de suero, también en medio líquido, una de las condiciones de inducción de la transición dimórfica más potentes (Ernst, 2000).

2.2.4. Inducción de la formación de clamidosporas

Las clamidosporas son estructuras grandes (8-16 μm), esféricas y de pared gruesa. El término procede del griego "*chlamys*" que significa envuelta protectora. Solamente algunas especies del género *Candida*, como *C. albicans*, *C. dubliniensis* y algunas cepas de *C. tropicalis* se caracterizan por su capacidad de formar clamidosporas.

En *C. albicans* se forman en las extremidades de las hifas, pseudohifas o previa formación de células suspensoras alargadas en los extremos filamentosos. Están rodeadas por una gruesa pared que consiste en una capa externa y delgada transparente a los electrones, continuación de la pared de la célula suspensora y otra capa interna, gruesa y densa a los electrones que se incrementa a medida que envejece la clamidospora (Jansons & Nickerson, 1970). La producción de clamidosporas, se usa como método de diagnóstico clínico para identificar aislados de *Candida* (Balish, 1973).

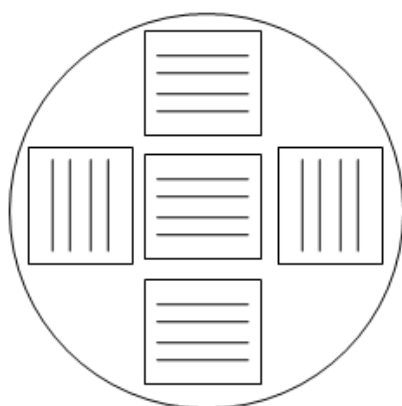


Fig. 1.- Esquema de inoculación en placa para la inducción de clamidosporas.

En *C. albicans* la formación de clamidosporas tiene lugar cuando se inocula en medios de cultivo nutricionalmente pobres, como el "corn meal agar", "Zein agar", "potato carrot agar", etc., a los que se añade Tween 80. (Walker & Huppert, 1960) En este trabajo se empleó "Corn meal agar" (DIFCO) al 1,7%.

Tras disolver y esterilizar el medio en autoclave, se añadió Tween 80 (SIGMA) a una concentración final del 0,33%. A partir de colonias de las diferentes cepas de *C. albicans* se hicieron

tres o cuatro estrías paralelas, como se muestra en la figura 1 y sobre ellas se colocaron portaobjetos (esterilizados con la llama del mechero de alcohol), de este modo se proporciona un ambiente de crecimiento bajo en oxígeno. Las placas se incubaron a 25°C en oscuridad durante 14 días, pero se tomaron muestras a los 5, 7, 10 y 14 días de crecimiento. Para la visualización de las clamidosporas con el microscopio óptico las muestras tomadas fueron teñidas con lactofenol-azul algodón (apartado 7.3. de Materiales y Métodos).

2.3. Mantenimiento de los microorganismos

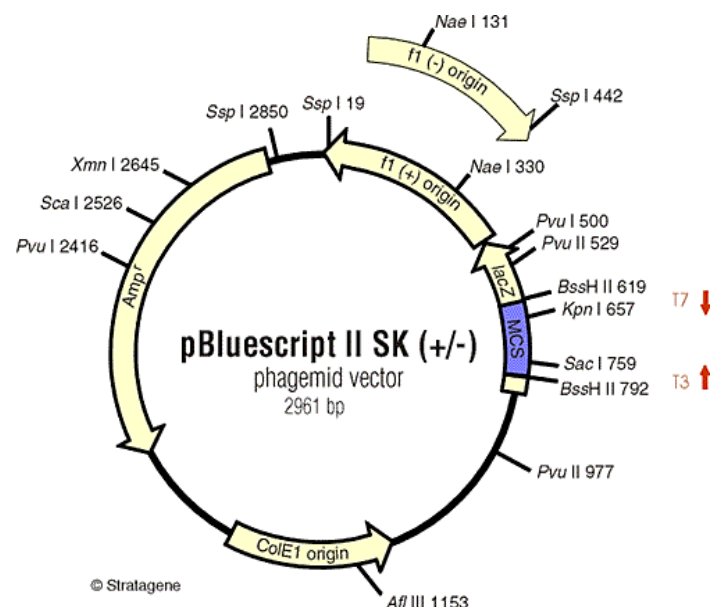
Todos los microorganismos empleados en este trabajo se conservaron mediante resiembras periódicas en placas de medio sólido. Las placas inoculadas con cepas de *C. albicans* se incubaron a 28°C durante 48 horas y se conservaron posteriormente a 4°C. En el caso de *E. coli*, las placas se incubaron a 37°C. Con el fin de mantener los microorganismos viables durante largos periodos de tiempo, las cepas se almacenaron en viales con glicerol al 50% en el caso de levaduras y al 30% para bacterias conservándose a -80°C de temperatura.

3. PLÁSMIDOS UTILIZADOS

3.1. Plásmidos bacterianos

- pBluescript KS+ y SK+

Plásmidos bacterianos auto-replicativos (Short *et al.*, 1988) de 2,95 kb derivados de pUC19. Poseen el gen de resistencia a ampicilina, el origen de replicación relajada colE1, un fragmento del operón *lac* de *E. coli* que codifica el péptido α de la β -galactosidasa (*lac Z*) y un sitio de clonación de 108 pares de bases, con 21 sitios de restricción para endonucleasas específicas, insertado en la fase de lectura abierta del péptido α sin alterarla (la única diferencia entre el KS+ y el SK+ es la orientación de esta secuencia).

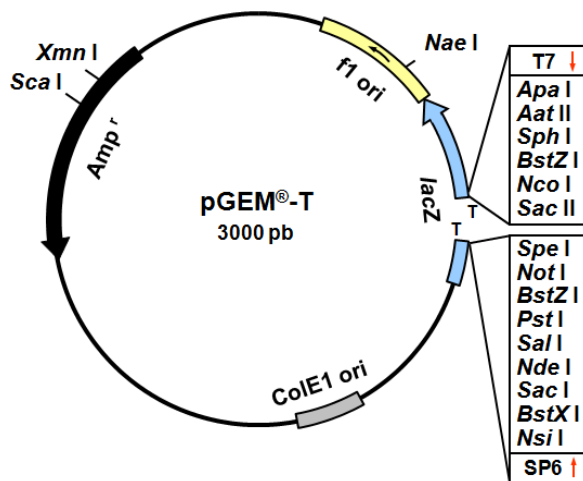


Ambos plásmidos poseen los promotores de las RNA polimerasas T3 y T7 que flanquean el sitio de clonación múltiple y que permiten la síntesis de RNA *in vitro*. Además

contiene un fragmento de 454 pares de bases de la región intergénica del fago f1 que codifica para las funciones requeridas para la replicación y el empaquetamiento del fago, esto permite rescatar el vector como ADN circular monocatenario una vez infectada una población de células adecuada portadora de alguno de éstos plásmidos con el fago modificado M13K07.

El IPTG del medio induce la expresión del péptido α de la β -Galactosidasa codificado por el gen *lacZ*. Este péptido hidroliza el sustrato X-Gal dando lugar a un producto de color azul. Si las colonias transformantes incorporan un plásmido con un inserto, se rompe la pauta de lectura del gen *lacZ* dando lugar a colonias blancas.

- pGEM-T



Vector linearizado de 3,0 kb preparado por la casa comercial *PROMEGA* mediante la digestión con *EcoRV* del vector pGEM-5Z f(+) (semejante al pGEM-T pero circular) y posterior adición de una timidina en posición 3' en cada uno de los extremos generados. Al contener estas dos bases se aumenta la eficiencia de ligación de productos de PCR en el vector, debido a que la mayoría de polimerasas

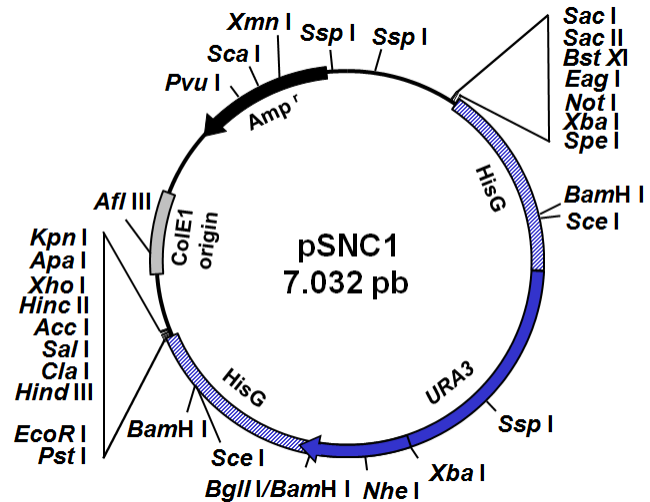
termoestables incorporan una desoxiadenosina no dependiente de molde en los extremos 5' del fragmento de DNA amplificado. pGEM-T contiene el gen de resistencia a ampicilina, el origen de replicación del fago f1, los promotores de las RNA polimerasas T7 y SP6 y, del mismo modo que en el vector pBluescript II, un sitio de clonación múltiple que aparece insertado en la pauta de lectura abierta del gen *lacZ* que codifica el péptido α de la β -galactosidasa, lo que permite la identificación directa de los clones por ausencia de color azul en las placas de LB con X-Gal e IPTG.

3.2. Plásmidos utilizados en *Candida albicans*

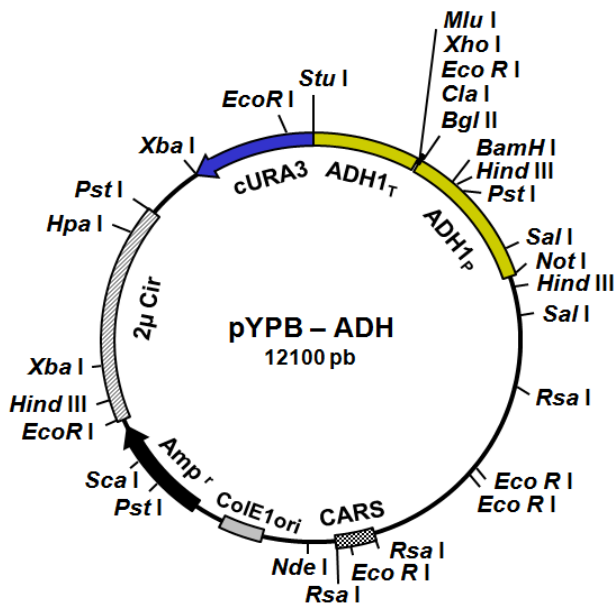
- Plásmido pSNC1

Plásmido autoreplicativo de 7,032 Kb funcional en *E. coli* y construido por la Dra. Freida Monterola (2002). Procede de pMB7 (Fonzi & Irwin, 1993). Se obtuvo cortando el fragmento que contiene el *cassette* de interrupción *HisG-URA3-HisG* con las enzimas *BglIII* y

*Pst*I del plásmido pMB7 y se ligó en pBluescript KS+ en los sitios *Bam*HI (compatible con *Bg*II) y *Pst*I con el fin de incrementar el número de sitios de clonación flanqueando dicho *cassette*. El *cassette* contiene el gen *URA3* como marcador de selección de las cepas Ura- de *C. albicans* transformadas. Está flanqueado por secuencias repetidas del gen *hisG* de *Salmonella typhimurium*. En cada una de las secuencias *hisG* se encuentra insertado un sitio de corte para la endonucleasa *Sce*I que permite, tras la digestión con esta enzima, deducir la posición en el cromosoma de las secuencias integradas y por lo tanto también la localización del gen interrumpido. A ambos lados del *cassette*, los sitios de restricción para diferentes endonucleasas permiten la clonación de fragmentos de DNA con secuencias homólogas a las regiones flanqueantes del gen a deleccionar.



- Plásmido integrativo pYPB-ADH



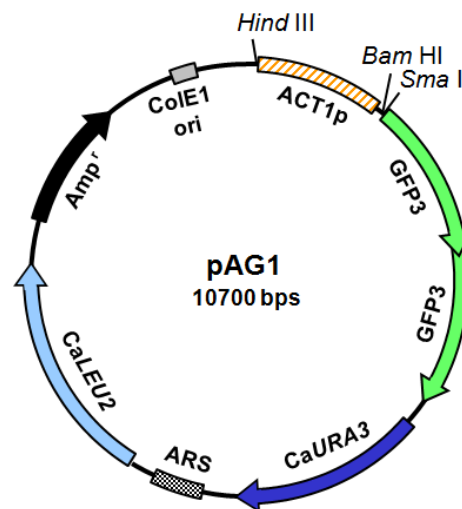
Plásmido cedido amablemente por el laboratorio del Dr. Rafael Sentandreu (Universidad de Valencia) y que a su vez fue proporcionado por el Dr. A. Brown de la Universidad de Aberdeen, Escocia. Este plásmido fue utilizado para la sobreexpresión de genes en *C. albicans*. Contiene las secuencias promotora y terminadora del gen de la alcohol deshidrogenasa (*ADH1*) de *C. albicans* (Bertram *et al.*, 1996). Entre ambas secuencias se encuentra un sitio de clonación múltiple.

- Plásmido pAG1

Plásmido autoreplicativo en *E. coli* y *C. albicans* de 10.7 kb cedido amablemente por el grupo del Dr. Miguel Sánchez de la Universidad de Salamanca. Fue construido a partir del vector pIR4 en el que se clonó el gen que codifica la GFP o proteína verde fluorescente

procedente de la medusa *Aequorea victoria* (Gonzalez-Novo *et al.*, 2004). La secuencia *GFP3* insertada se amplificó a partir del plásmido pYGFP3 en el que la secuencia original del gen ha sido modificada para optimizar su uso en *C. albicans* (Cormack *et al.*, 1997). La proteína Gfp3p original con 238 aminoácidos, absorbe energía a 395 nm y emite fluorescencia a 507 nm. La secuencia modificada posee estas mismas características pero el único codón CTG presente en la ORF ha sido sustituido por TTG para que el aminoácido correspondiente en la secuencia traducida sea Leucina al igual que en la proteína original, evitando así problemas por el uso de codones no convencional de *C. albicans*.

La secuencia *GFP3* fue clonada en el sitio *SmaI*, localizado detrás del promotor del gen que codifica la actina de *C. albicans* (ACT1p). En el proceso de clonación se insertaron dos copias del gen *GFP3* en tándem sin que 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* *URA3* y *LEU2* 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 que se pretende fusionar en su extremo carboxilo a Gfp3p.



4. DELECIÓN DE GENES EN *Candida albicans*

La metodología utilizada habitualmente para la interrupción de genes en *C. albicans* se basa en el uso del *cassette URA-blaster* adaptado por (Fonzi & Irwin, 1993) que consiste en la integración de un *cassette* formado por el gen *URA3* de *C. albicans* flanqueado por dos secuencias homólogas del gen *hisG* de *S. typhimurium* en cada uno de los alelos del gen a deletar, utilizando una cepa de *C. albicans* auxótrofa para el gen *CaURA3*. Las secuencias *hisG* en el *cassette* actúan como espaciadores no específicos mientras que el gen *CaURA3* codifica la orotidina descarboxilasa, implicada en la síntesis de uracilo en *C. albicans*. En este trabajo se utilizó siempre la cepa CAI4 (Fonzi & Irwin, 1993), que carece del gen *CaURA3* y que deriva de la silvestre SC5314 (Gillum *et al.*, 1984).

Los mutantes positivos para la delección de la primera copia del gen, se seleccionan por su capacidad de crecimiento en placas de medio mínimo sin uridina. A continuación, se

provoca la eliminación espontánea del marcador *CaURA3* por recombinación homóloga de las secuencias *hisG* y las colonias positivas se seleccionan por su capacidad de crecimiento en medio mínimo suplementado con uridina y ácido 5-fluoroorótico (5-FOA), ya que este compuesto se convierte en un metabolito tóxico para aquellas células que no pierden el marcador *CaURA3*.

Obtenida la interrupción de la primera copia del gen, se repite de nuevo el proceso para delecionar la segunda copia del mismo.

Para dirigir la integración del *cassette* en el *locus* adecuado, se requiere la construcción de un plásmido en el que el *cassette hisG-URA3-hisG* quede flanqueado por secuencias homólogas al gen a delecionar (de un tamaño aproximado de 400-500pb).

Otros métodos para interrumpir genes en *C. albicans* son, la disrupción en un sólo paso utilizando cepas con varios marcadores o auxotrofías, (Negredo *et al.*, 1997), la disrupción basada en técnicas de PCR (Wilson *et al.*, 1999) y la supresión génica (De Backer *et al.*, 2001) entre otros.

En este trabajo se ha utilizado el plásmido pSNC1 descrito en la sección 3.2 de este capítulo y que contiene el *cassette hisG-URA3-hisG* para la delección de genes en *C. albicans*.

5. TRANSFORMACIONES DE MICROORGANISMOS

5.1. Transformación de *Escherichia coli*

En el presente trabajo se transformaron células competentes de *E. coli* con plásmidos purificados y mezclas de ligación. El método de transformación empleado se describe a continuación (Hanahan, 1985).

Las células competentes se descongelaron suavemente sobre hielo y se añadieron a la solución que contenía el DNA, manteniendo la mezcla en hielo durante 30 min. Pasado este tiempo, las células fueron sometidas a un choque térmico, que en el caso de *E. coli* (cepa DH5 α) fue de 2 minutos a 42°C e inmediatamente después, se mantuvieron en hielo durante unos minutos. Mediante este procedimiento el DNA exógeno entra en las células competentes. Posteriormente, se adicionó 1 ml de LB al tubo con las células que habían sido transformadas y la mezcla se incubó a 37°C durante 1 hora con el fin de que las células transformadas expresaran la resistencia a la ampicilina. Tras este tiempo, las bacterias se recogieron por centrifugación (3500 x g, 5 min), se resuspendieron en 300 μ l de LB y se repartieron (a razón de 50 μ l, 100 μ l y 150 μ l) en placas de medio sólido LB con ampicilina con el fin de seleccionar colonias transformantes aisladas tras su crecimiento a 37°C.

En el caso de que se pudiera realizar una selección por color, las placas de LB-ampicilina se suplementaron con 0,1 M IPTG y 20 mg/ml X-Gal.

5.2. Transformación de *Candida albicans*

El protocolo para la transformación de la levadura *C. albicans*, consistió en la adición del DNA correspondiente, bien plasmídico (transformación replicativa) o lineal (transformación integrativa) a protoplastos de esta levadura. En todos los experimentos de transformación realizados en este trabajo se utilizó el gen *CaURA3* como marcador de selección de modo que todas las cepas utilizadas para este fin fueron Ura-.

Los protoplastos se obtuvieron previamente a cada transformación siguiendo el protocolo de (Kurtz *et al.*, 1986) con algunas modificaciones. La composición de las soluciones utilizadas durante el proceso se recoge en la tabla III.

Se inocularon células en 50 ml de YEPD y se incubaron a 28°C hasta fase exponencial temprana ($2-4 \times 10^7$ células/ml). Se recogieron por centrifugación y se realizaron dos lavados con 20 ml de agua destilada estéril y sorbitol 1 M respectivamente durante 4 minutos a 3000 x g. A continuación se resuspendieron en 20 ml de la solución de formación de protoplastos que contenía 1,5 mg de Zimoliasa 20T de *Arthrobacter luteus* (SEIKAGAKU CORPORATION, Tokyo, Japón), y se incubaron a 32°C con agitación muy suave (100 rpm) en un agitador orbital. Transcurridos 10-15 minutos se comprobó la formación de protoplastos observando una muestra en el microscopio óptico. Cuando la población de protoplastos superó el 70% (normalmente a los 15-20 minutos), éstos se recogieron mediante centrifugación a baja velocidad (300 x g) a 4°C, se resuspendieron muy suavemente y se lavaron una vez con 20 ml de sorbitol 1 M y otra con 18 ml de STC durante 4 minutos, ambas soluciones se mantuvieron en hielo hasta el momento de su uso. Finalmente los protoplastos se resuspendieron cuidadosamente en 1-2 ml de STC.

Para cada transformación se usaron alícuotas de 100 µl de protoplastos a los que se añadieron desde 5 µg hasta 20 µg del DNA (en un volumen máximo de 20 µl) correspondiente a cada experimento y 5 µg de DNA de esperma de salmón (CLONTECH). La mezcla se incubó durante 10 minutos a temperatura ambiente y posteriormente se centrifugó durante 4 minutos a 200-300 x g, se decantó el sobrenadante y se resuspendieron los protoplastos suavemente en 1 ml de solución PEG. Esta suspensión se incubó durante 10 minutos a temperatura ambiente y transcurrido este tiempo se centrifugó durante 4 minutos a 200-300 x g, se decantó el sobrenadante y se resuspendieron los protoplastos en 150 µl de medio líquido SOS, manteniéndose en esta solución 30 minutos en un baño a 30°C con agitación suave. Por último se inocularon las células en placas con medio mínimo suplementado con sorbitol 1M para permitir la selección de los clones Ura+. Normalmente se detectaron colonias en las placas a los 3-4 días de incubación a 28°C.

Tabla III. Composición de las soluciones utilizadas para la formación de protoplastos en esta memoria.

Solución	Composición
Solución de formación de protoplastos:	1M sorbitol, 10mM fosfato sódico pH 7,5, 10mM EDTA, 30mM 2-β-mercaptoetanol, 1,5 mg de Zimoliasa 20T. (-)
STC	1M sorbitol, 10mM TrisHCl pH 7,5, 10mM CaCl ₂
Solución PEG	20% polietilenglicol 8000, 10mM Tris-HCl pH 7,5; 10mM CaCl ₂
Medio SOS	1M sorbitol, 6,5 mM CaCl ₂ , 0,25% extracto de levadura, 0,5% bactopectona.
Medio Mínimo selectivo con Sorbitol 1 M (Medio SD)	Ver apartado 2.2.1. de Materiales y Métodos

(*) La Zimoliasa y el 2-β-mercaptoetanol son lo último que se añade a la solución antes de resuspender las células.

El 2-β-mercaptoetanol es un agente reductor fuerte, se incluye para proteger de la inactivación el sitio catalítico de la Zimoliasa por la formación de puentes disulfuro.

5.2.1. Inducción de la pérdida del marcador *URA3* y selección con 5-FOA

En el primer paso de interrupción de un gen de *C. albicans* mediante la técnica del “*URA blaster*”, tras la transformación, las colonias que se obtienen se caracterizan por su crecimiento en un medio mínimo sin uridina tras haber integrado el gen *URA3* del *cassette*.

En este trabajo, la ubicación correcta del *cassette* se comprobó mediante PCR y en las colonias que resultaron positivas se indujo la pérdida del marcador *URA3* para así poder usarlo de nuevo en la interrupción del segundo alelo del gen. Para inducir la pérdida del gen *URA3*, se inocularon colonias Ura⁺ aisladas en tubos con 10 ml de medio líquido YEPD suplementado con Uridina, se incubaron durante 24h a 28°C. A partir de estos cultivos saturados se inocularon 100 ul de cultivo en 10 ml de medio líquido YEPD suplementado con Uridina repitiendo las condiciones de incubación. Durante el crecimiento en presencia de uridina, el gen *URA3* resulta ser inservible para la célula que lo pierde por cruzamiento de las regiones *HisG* del *cassette*.

Tras este proceso, se inocularon placas de medio mínimo (YNB-5-FOA) suplementadas con uridina 1 mM a razón de 10⁷ células por placa. La preparación de las placas de medio mínimo con 5-FOA se describe en el apartado 2.2.1. de este capítulo.

El 5-FOA es un compuesto tóxico para aquellas células que puedan sintetizar la enzima orotidina-5'-fosfato descarboxilasa (OMP descarboxilasa) producto del gen *URA3*, ya

que convierte el 5-FOA presente en el medio en una sustancia tóxica análoga a la uridina 5'-monofosfato; esto es, la 5'- fluorouridina monofosfato, que limita severamente el crecimiento de la célula. (Bartel & Fields, 1997)

Por el contrario, las células carentes del gen *URA3*, utilizan la uridina presente en el medio y crecen formando colonias Ura-, que son aisladas posteriormente en placas de medio mínimo YNB suplementado con y sin uridina 1mM con el fin de asegurar que las colonias aisladas son Ura-.

Tras comprobar mediante PCR la pérdida del marcador *URA3* estas colonias pueden someterse a otra ronda de transformación con el *cassette* de interrupción.

6. TÉCNICAS DE MANIPULACIÓN DE ÁCIDOS NUCLÉICOS

6.1. Aislamiento de DNA plásmidico de *Escherichia coli*

Para el aislamiento de DNA plasmídico de *E. coli* en pequeña cantidad, (cultivos de 1 a 3 ml de LB-ampicilina) se siguió el método de lisis alcalina descrito por Birnboim y Doly (1979). El sedimento de células se resuspendió a temperatura ambiente en 0.3 ml de **solución P1**. A continuación se añadieron 0.3 ml de **solución P2**, la mezcla se agitó por inversión y se incubó a temperatura ambiente durante 5 minutos. Esta mezcla alcalina se neutralizó añadiendo 0.3 ml de **solución P3**, se dejó 15 minutos a 4°C y se centrifugó durante 20 minutos a 13000 rpm. Se recogió entonces el sobrenadante libre de restos celulares y DNA cromosómico y se trató con 0,8 volúmenes de isopropanol para precipitar el DNA plasmídico. El precipitado se lavó con etanol al 70% y se centrifugó durante 20 minutos a 4°C. Por último, el DNA precipitado se dejó secar a temperatura ambiente y se resuspendió en agua o en tampón TE 1X. En la siguiente tabla se muestra la composición de las soluciones empleadas.

Solución	Composición
P1	50mM Tris HCl, 10mM EDTA, 20 µg/ml RNAsa A
P2	200mM NaOH, 1% SDS
P3	2.5 M KAc pH 4.8
TE 1X	10mM Tris-HCl pH 7,5; 1mM EDTA

La obtención de DNA plasmídico de alta calidad a pequeña escala se realizó utilizando el kit "*Wizard® plus SV minipreps*" de *PROMEGA*, siguiendo las indicaciones de la casa comercial. Para el aislamiento de DNA plasmídico a gran escala (50-100 ml de cultivo) y de gran pureza se emplearon las columnas de intercambio iónico "*Qiagen Plasmid Midi Kit*" (*QIAGEN*) según las indicaciones del fabricante.

6.2. Aislamiento de DNA genómico de levaduras

La obtención de DNA de alto peso molecular de *C. albicans* se realizó según el protocolo de (Hoffman & Winston, 1987) con algunas modificaciones.

Se recogieron células procedentes de un cultivo de 10 ml de YEPD, incubadas a 28°C hasta una concentración de 5×10^7 - 10^8 células/ml. Se centrifugaron las células en tubos *Eppendorf* y se resuspendieron en 0,5 ml de agua MilliQ estéril, volviéndose a centrifugar unos segundos para eliminar el sobrenadante. Inmediatamente las células se congelaron en nitrógeno líquido, y a continuación se molieron en un mortero de cerámica, previamente esterilizado en horno Pasteur y bien enfriado con nitrógeno líquido, se transfirió el polvo resultante a tubos *Eppendorf* que contenían 0,2 ml de tampón de extracción, 0,2 ml de una mezcla 1:1 de fenol:cloroformo y 0,2 ml de TE 1X. Se centrifugaron 5 minutos a 10000 x g, la fase acuosa se transfirió a otros tubos *Eppendorf* y se añadieron 0,2 ml de fenol:cloroformo repitiéndose el proceso.

Tras recoger de nuevo la fase acuosa, se añadieron 0,2 ml de cloroformo para eliminar posibles restos de fenol. Se recuperó la fase acuosa tras centrifugar 5 minutos y se transfirió a nuevos tubos *Eppendorf* y el DNA presente en la misma se precipitó con 1 ml de etanol absoluto previamente enfriado en hielo. La mezcla se agitó por inversión y se mantuvo a -20°C durante un mínimo de 30 minutos y después de centrifugar a la máxima velocidad durante 5 minutos a 4°C, se eliminó el sobrenadante y el precipitado se secó en una estufa a 60°C.

Seguidamente el DNA precipitado se resuspendió en 400 µl de TE 1X y se añadieron 5 µl de una solución de RNasa A (10 mg/µl) para eliminar el RNA. Una vez incubada la muestra a 37°C durante 5 minutos, se añadieron 10 µl de NH₄Ac 4 M y 1 ml de etanol absoluto para precipitar de nuevo el DNA. Por último tras centrifugar la mezcla, el precipitado se lavó con etanol al 70%, y una vez seco se resuspendió en 50 µl de agua MilliQ estéril TE 1X. En la siguiente tabla se recoge la composición de las soluciones empleadas.

Solución	Composición
Tampón de extracción	2% Tritón; 1% SDS; 100mM NaCl; 10mM Tris-HCl pH 8,0; 1mM EDTA
TE 1X	10mM Tris-HCl pH 7,5; 1mM EDTA

6.3. Obtención de RNA total de levadura

Se recogieron células de *C. albicans* a los tiempos correspondientes por centrifugación, se repartieron en tubos *Eppendorf* e inmediatamente se congelaron en nitrógeno líquido y se conservaron hasta el momento de ser procesadas a -80°C . Para la extracción de RNA total se utilizó el *kit* "RNeasy[®]" de la casa comercial *QIAGEN*, siguiendo el protocolo comercial con algunas modificaciones.

Las células se rompieron manualmente por abrasión en nitrógeno líquido utilizando un mortero de cerámica (esterilizado previamente en horno Pasteur), enfriándolo durante todo el proceso con nitrógeno líquido. Las células pulverizadas se añadieron a tubos *Eppendorf* con 350 μl de tampón RLT (contiene isotiocianato de guanidina) para homogeneizar la muestra e inactivar las RNAsas ya que es un agente altamente desnaturalizante que también contiene β -mercaptoetanol para este fin.

La mezcla se agitó en *vortex* y se añadió el mismo volumen de etanol al 70% para facilitar la unión del RNA a la membrana de silica gel que contienen las columnas facilitadas con este *kit*. Mediante centrifugación y tras varios lavados de la columna con los tampones RW1 y RPE se eluyó el RNA con 50-100 μl de agua ultrapura libre de RNAsas proporcionada con el *kit*.

6.4. Determinación de la concentración de ácidos nucleicos

La concentración de DNA de doble cadena y de RNA se determinó midiendo la absorbancia a 260 nm en un espectrofotómetro GeneQuant (*PHARMACIA*). El cálculo se hizo teniendo en cuenta que una $D.O._{260\text{ nm}}$ de 1 equivale a 50 mg/ml de DNA o a 40 mg/ml de RNA, (Maniatis *et al.*, 1982).

En algunos casos se estimó la concentración de DNA comparando la fluorescencia emitida en un gel de agarosa con bromuro de etidio (0,5 $\mu\text{g/ml}$) irradiado con luz ultravioleta, con la emitida por fragmentos de DNA de concentración conocida tratados del mismo modo.

El bromuro de etidio es un fluorocromo que se intercala entre las bases de los ácidos nucleicos y hace que éstos sean visibles ya que absorbe la luz ultravioleta a 300 nm y emite a 590 nm en la región rojo-anaranjado del espectro visible.

6.5. Digestión del DNA con endonucleasas de restricción

El análisis de las moléculas de DNA se llevó a cabo mediante el tratamiento con endonucleasas de restricción que permite la elaboración de mapas físicos de fragmentos de DNA, los cuales son muy importantes para la construcción de moléculas recombinantes.

Las condiciones empleadas para el uso de las enzimas de restricción fueron las recomendadas por las casas comerciales (*ROCHE, PROMEGA Y FERMENTAS*). El análisis de los fragmentos resultantes se realizó mediante electroforesis en geles de agarosa con bromuro de etidio.

6.6. Electroforesis de DNA en geles de agarosa

La separación e identificación de los fragmentos de DNA en función de su tamaño se llevó a cabo mediante electroforesis en geles de agarosa. La movilidad de fragmentos lineales de DNA depende de su tamaño, siendo independiente de la composición en bases. Los geles de agarosa se usaron a una concentración entre 0.7-1.2%, dependiendo de los tamaños del DNA a separar, de acuerdo con las condiciones descritas por (Maniatis *et al.*, 1982).

En general, los geles se prepararon en tampón TAE (Tris-acetato 40 mM, EDTA 1 mM) y los fragmentos se separaron aplicando un voltaje constante (entre 50 y 100 V) en una cubeta de electroforesis que contenía el mismo tampón. Para visualizar las bandas de DNA en los geles se añadió bromuro de etidio a una concentración final de 0,5 µg/ml.

Antes de realizar la electroforesis, la muestra con el DNA a estudiar se mezcló en una proporción 5:1 con una solución de azul de bromofenol 0.25% p/v, xileno cianol 0.25% p/v y glicerol 30% v/v en agua destilada (para visualizar el frente de la electroforesis y aumentar la densidad de la muestra). Paralelamente se resolvió también una muestra de marcadores de peso molecular conocido (marcador “*1Kb-Plus DNA ladder*” de *INVITROGEN*).

Las fotografías de los geles se tomaron tras exponerlos en un transiluminador de luz ultravioleta (360 nm) con una cámara digital acoplada de *BIORAD*, posteriormente fueron analizadas con el programa Quantity One 4.4.0 de *BIORAD* y se imprimieron en papel térmico.

6.7. Purificación de fragmentos de DNA

El aislamiento y purificación de fragmentos específicos de DNA, de entre 0,2 y 5 kb, se realizó cortando la banda de agarosa que contenía el fragmento de interés, a partir del gel sobre un transiluminador de luz ultravioleta. El DNA presente en dicha banda se purificó usando el sistema "*Gene-Clean II*" (*BIO 101*, La Jolla, California) según las indicaciones del fabricante. Básicamente consiste en la fusión a 60°C del fragmento de agarosa que contiene el DNA en una solución de yoduro de sodio, se añade una matriz de sílice que se une al DNA para recuperarlo de la suspensión y después se libera en condiciones controladas.

Para productos de PCR de banda única, se utilizó el mismo sistema pero sin necesidad del paso por gel de agarosa, ya que la matriz de sílice se añadió directamente al producto de PCR diluido en yoduro de sodio y se procedió del mismo modo.

6.8. Construcción de plásmidos recombinantes

Los plásmidos recombinantes se obtuvieron mediante ligación de fragmentos de DNA purificados (uno de ellos era el DNA plasmídico).

En las reacciones de ligación que se llevaron a cabo durante toda la noche a 16°C o bien durante 2 horas a temperatura ambiente, se utilizó la enzima DNA ligasa del fago T4 de *FERMENTAS*. Los plásmidos recombinantes se recuperaron en *E. coli* después de transformar células competentes con la mezcla de ligación. Se obtuvo el DNA plasmídico de las colonias resultantes y se analizó mediante digestión con endonucleasas de restricción.

6.9. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

6.9.1. Diseño de oligonucleótidos

Para el diseño de oligonucleótidos específicos se siguieron las recomendaciones de (Saiki *et al.*, 1988). Se definieron secuencias de 18-21 nucleótidos, con un 50% de guanina (G, dGTP) y citosina (C, dCTP) aproximadamente. En la tabla IV se describen los oligonucleótidos empleados en este trabajo, los nucleótidos subrayados corresponden a secuencias específicas de corte de endonucleasas de restricción.

Tabla IV. - Información relativa a los oligonucleótidos diseñados en este trabajo. La primera línea de cada celda se refiere al oligo directo y la segunda línea al oligo reverso, ambos en dirección 5' - 3'.

Nombre	Secuencia	Sitio de corte	Aplicación
RD24 RD17	GCGGCCGCCACAAGAAT GGTGACAAACTAGTTC AATGC	Not I Spe I	Amplifican región 5' "promotora" de <i>HAT1</i> , 459pb. RD17 anilla aprox. a +100pb dentro del ORF respecto del ATG
RD18 RD19	GCTTATCAAGCTTTGGAAG CCACTCGAGACGTAATGG	Hind III Xho I	Amplifican región 3' "terminadora" de <i>HAT1</i> , 494pb. RD18 anilla aprox. a -96pb dentro del ORF respecto del codon de parada.
RD38 RD39	GGTTGTTAATGCACCAAGAGA CTCTTGTTCTCCAACTGC	- -	Permiten comprobar que la interrupción se ha dado en el locus del gen <i>HAT1</i> . Son los llamados "oligos externos".
RD41 RD40	CAATTTACCAAGGTCAAGGC GTTCTTGTTCAATTGAATCG	- -	Anillan dentro del ORF de <i>HAT1</i> . Permiten comprobar delección de la 1ª y 2ª copia del gen.
RD46 RD47	TCATTGAGCTCGGGCAGTT TCATTTCCACTAGTGGTCTC	Sac I Spe I	Amplifican región 5' "promotora" de <i>HAT2</i> ,
RD48 RD49	GTATAGTACTGCAGTTGGCT CCAACTCGAGCAACCCTC	Pst I Xho I	Amplifican región 3' "terminadora" de <i>HAT2</i>
RD51 RD50	CATCGCTAGTAGTTCTGACT GGTCAAAGGTACCAACAGATT	- Kpn I	Permiten comprobar que la interrupción se ha dado en el locus del gen <i>HAT2</i> . Son los llamados "oligos externos".
RD52 RD53	TGACACATTGAGCTCTCTAG TCCGCGGCCGCTATTGCT	Sac I Not I	Amplifican región 5' "promotora" de <i>GCN5</i>
RD54 RD55	ATTGAAAGACTGCAGTTTTGT CTTATTCTCGAGCAATGCTT	Pst I Xho I	Amplifican región 3' "terminadora" de <i>GCN5</i>
RD56 RD57	TATCCATTGTCCAGGTGGTT ACTGAAGTAGACTTCCCACT	- -	Permiten comprobar que la interrupción se ha dado en el locus del gen <i>GCN5</i> . Son los llamados "oligos externos".
RD58 RD59	CATAGCTATTCAGAAATCAGG CTCCATGGTTTCCCAAGACAA	- -	Amplifican la región <i>HisG</i> del cassette de interrupción " <i>URA blaster</i> "
RD63 RD62	GGAAGAGATCCAGATATTGA GGATACTATCAAACAAGAGG	- -	RD63 anilla al final de la región 3' de <i>URA3</i> del cassette de interrupción y RD62 al inicio del extremo 5'. Combinados con los oligos externos permiten comprobar los transformantes Ura+.
RD65 RD64	GTGAGGGCAACATCTCCAA TTCAGTTGACGAGATAGCAC	- -	Anillan dentro del ORF de <i>GCN5</i> . Permiten comprobar delección de la 1ª y 2ª copia del gen.
RD66 RD67	CTCGAGATGGTTGACAGAAA ACGCGTCTATACAAAACACTAC	Xho I Mlu I	Amplifican la ORF <i>GCN5</i> para su clonación en YPB1-ADHpL.
ADH1	ATCCCTGGTCTTATCTTCTC	-	Oligo directo que anilla en el promotor de <i>ADH1</i> , para comprobar la construcción en YPB1-ADHpL (pADG3) por secuenciación.
RD70 RD71	GCGGATCCATGGTTGACAGA CCC GGGTACAAAACACTACAGTC	Bam HI Sma I	Amplifican la ORF <i>GCN5</i> para su posterior clonación en el plásmido de expresión de <i>GFP3</i> (pAGG8).

6.9.2. Condiciones de la reacción de PCR

La amplificación de DNA mediante "Reacción en Cadena de la Polimerasa" (PCR), se empleó con algunas modificaciones del protocolo general (Maniatis *et al.*, 1982). Este protocolo consiste en preparar una mezcla tamponada, generalmente de 50 µl que contiene 10-50 ng de DNA molde, MgCl₂ 2,5 mM; 200 mM de una mezcla de los cuatro desoxiribonucleótidos (dATP, dCTP, dGTP, dTTP); 1,5 unidades de enzima Taq polimerasa (*PROMEGA*) y 300 nM de los dos oligonucleótidos específicos.

También en el laboratorio usamos el kit "*Pure Taq TM Ready-To-Go PCR beads*" (*AMERSHAM PHARMACIA Biotech Inc*). Contiene el tampón, MgCl₂, los dNTPs y la enzima

ya mezclados y liofilizados de manera que basta con añadir agua MilliQ estéril para reconstituir la mezcla (25 μ l), el DNA molde y los oligonucleótidos.

En cualquiera de los casos, la mezcla de reacción se sometió a una serie de ciclos que se programaron en un termociclador (*PERKIN ELMER o EPPENDORF*).

En general, como se muestra en la figura 2, los ciclos fueron los siguientes: una primera etapa de desnaturalización del DNA (1-5 minutos a 95°C), una segunda etapa de 30 ciclos normalmente, cada uno de los cuales consistió en: desnaturalización (30 segundos a 95°C), anillamiento de los oligos (30 segundos a 42°C) y elongación del DNA durante 1 minuto a 72°C. En una tercera y última etapa los productos amplificados se sometieron a un nuevo ciclo de elongación (7 minutos a 72°C).

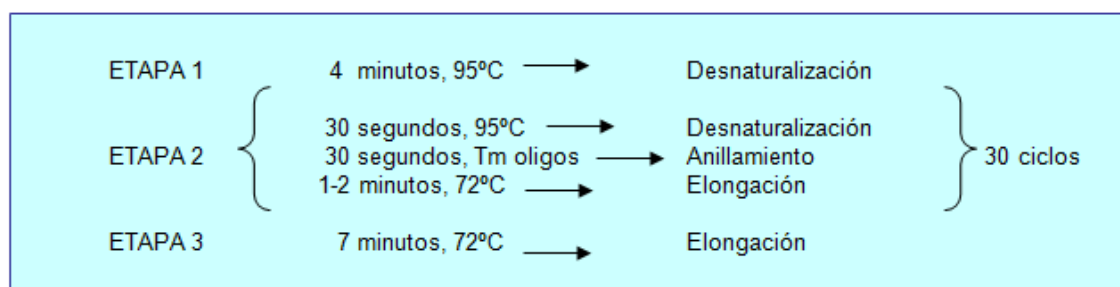


Fig. 2.- Condiciones generales del programa de PCR.

Las variaciones de este protocolo se dieron en la temperatura de anillamiento de los oligonucleótidos (T_m), que dependió de la especificidad de los oligos con respecto al DNA molde y de la temperatura de fusión de los mismos y en el tiempo de elongación que se modificó según la longitud del fragmento a amplificar (30 segundos por cada 500 pb).

6.10. Hibridación de ácidos nucleicos

6.10.1. Preparación de sondas marcadas radiactivamente

El marcaje radiactivo de fragmentos de DNA se llevó a cabo mediante el procedimiento de marcaje al azar, para ello se utilizó el kit de marcaje *Rediprime II™ DNA Labelling System (AMERSHAM-GE)* y un nucleótido marcado radiactivamente [α - 32 P]dCTP (actividad específica > 3000 Ci/mmol) y se siguió el protocolo de la casa comercial.

El método, descrito por (Feinberg & Vogelstein, 1984), consiste en utilizar una mezcla al azar de hexaoligonucleótidos para sintetizar pequeños fragmentos del DNA molde con el fragmento *Klenow* de la DNA polimerasa. En la reacción se sustituye un nucleótido no

radiactivo (en este caso, dCTP) por su equivalente marcado radioactivamente obteniendo así sondas de nueva síntesis marcadas radioactivamente.

6.10.2. Detección de secuencias de DNA específicas: Hibridación DNA-DNA o *SOUTHERN BLOT*

Las hibridaciones de DNA-DNA se realizaron siguiendo el protocolo descrito por Southern en 1975. Tras digerir el DNA genómico de *C. albicans* (15-20 µg) con las enzimas de restricción adecuadas, los fragmentos de DNA junto con un marcador de peso molecular se separaban mediante electroforesis en geles de agarosa (0,7-0,8%) en TAE. El DNA separado y visualizado por la presencia de bromuro de etidio (0,5 µg/ml), se fotografió junto con una regla fluorescente para tener referencia del tamaño de las bandas.

Posteriormente el gel se trató con HCl 0,25N durante 15 minutos para romper los fragmentos de DNA de mayor tamaño (proceso de DEPURINIZACIÓN). Después se desnaturalizó con una solución NaOH 0,5N/NaCl 1,5M durante 30 minutos (proceso de DESNATURALIZACIÓN), seguido de otros 30 minutos en una solución neutralizante NaOH 0,5N/trizma base, (proceso de NEUTRALIZACIÓN). Seguidamente se realizó la transferencia de los fragmentos de DNA a una membrana de *Nylon* (Hybond-N⁺, AMERSHAM-GE) durante 12 horas con 20 XSSC a temperatura ambiente, tal como se representa en la figura 3.

Realizada la transferencia, el DNA se fijó covalentemente tras exponer la membrana a luz ultravioleta en una cámara de emisión ultravioleta UV Stratalinker™ 2400, STRATAGENE con 1200 kJulios.

Las membranas se prehibridaron con una solución que contenía: 50% formamida desionizada (SIGMA), 4XSSC, 5X reactivo de Denhardt (0,02% ficoll, 0,02% polivinilpirrolidona y 0,02% seroalbúmina bovina), 0,1% SDS y 100 µg/ml de DNA de esperma de salmón. Las prehibridaciones se llevaron a cabo durante periodos de al menos dos horas a 42°C, en hornos de hibridación con soporte rotatorio y contenedores cilíndricos de AMERSHAM -GE Healthcare.

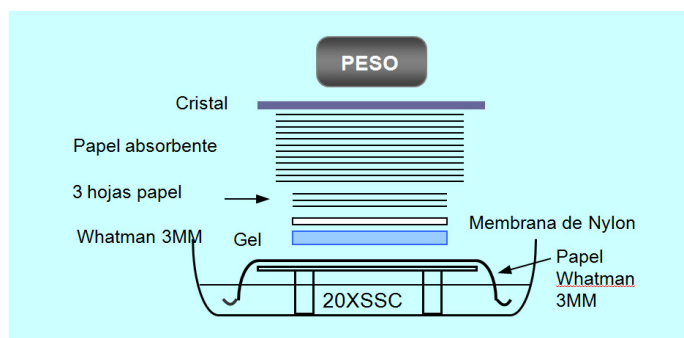


Fig. 3.- Esquema representativo del método de transferencia a membrana de ácidos nucleicos utilizado en esta memoria.

La hibridación se llevó a cabo en una solución de igual composición que la de prehibridación pero carente de DNA de esperma de salmón, a la que se añadió la sonda radiactiva desnaturalizada (tras calentar durante 5 minutos a 100°C y enfriar en hielo). Después de al menos 12 horas de hibridación a 42°C, las membranas se lavaron varias veces con distintas soluciones: 10 minutos con 2XSSC a temperatura ambiente, 2 lavados de 15 minutos con 2 XSSC/0,5% SDS a 42°C y por último 15 minutos con 0,1X SSC/0,1% SDS a 65°C. Estos tiempos de lavado se modificaron en función de la radiación emitida por la membrana la cual fue monitorizada usando un contador *geiger*.

La detección de fragmentos de DNA con los que hibridaba específicamente la sonda marcada, se realizó de dos formas, en un primer análisis las membranas se pusieron en contacto con pantallas especiales de *FUJIFILM* compuestas por cristales de fósforo fotosensibles durante un tiempo variable (1-24 h). A continuación la superficie de la pantalla fue explorada usando el sistema de captación y análisis de imagen *BAS-1500 Storage Phosphor Imaging System (FUJIFILM)*. El segundo método utilizado consistió en exponer película fotográfica Kodak (*X-OMAT, AR*) a la radiación emitida por las membranas durante periodos de tiempo que oscilaron entre 1 y 15 días según la intensidad de la señal radiactiva, obteniéndose así una imagen de mayor nitidez.

6.10.3. Detección de RNA mensajero: hibridación DNA-RNA o *NORTHERN BLOT*

Los análisis mediante hibridación DNA-RNA o de *Northern Blot* se realizaron siguiendo el protocolo que a continuación se describe (Thomas, 1980).

Tras obtener las muestras de RNA total de *C. albicans* según el protocolo del apartado 6.3 de materiales y métodos y calculada la concentración de las mismas por espectrofotometría, se tomaron 5µg de cada muestra, se añadieron 5µl de tampón

desnaturalizante 5X (50% formamida, 16,2% formaldehído, 1XMOPS en H₂O MilliQ-DEPC), se incubaron en hielo durante 20 minutos y se calentaron a 65°C durante 10 minutos para desnaturalizar las estructuras secundarias formadas por el RNA. Después se pusieron en hielo y se añadieron 2µl de tampón de carga 6X (azul de bromofenol 0.25% p/v, xileno cianol 0.25% p/v y glicerol 30% v/v en agua MilliQ tratada con DEPC (Maniatis *et al.*, 1982).

A continuación las muestras se sometían a electroforesis en geles de agarosa al 1,2% preparados con tampón MOPS-Formaldehído (MOPS 1X, 1% formaldehído) y bromuro de etidio (0,5 mg/ml). Como tampón de carrera se utilizó MOPS 1X (0,04 M ácido 3-(N-morfolino) propanolsulfónico pH 7; 0,01 M acetato sódico y 1 mM EDTA) en H₂O MilliQ-DEPC.

Las electroforesis se llevaron a cabo aplicando una corriente constante de 5 a 7 voltios/cm durante unas 4 horas aproximadamente. Junto con las muestras de RNA de *C albicans* se sometió a electroforesis una muestra del marcador de peso molecular de RNA "0.24-9.5 RNA Ladder" (INVITROGEN).

Posteriormente el RNA se transfirió por capilaridad a membranas de nylon *Hybond-N⁺* (AMERSHAM-GE) de forma similar a la descrita para los experimentos de hibridación DNA-DNA (*Southern Blot*) (apartado 6.10.2. Materiales y Métodos, figura 3) durante al menos 12 horas con 20 XSSC a temperatura ambiente.

Completada la transferencia, el RNA se fijó a las membranas mediante exposición a 1200 kJulios de luz ultravioleta en una cámara de emisión ultravioleta *UV StratalinkerTM 2400, STRATAGENE*.

Las membranas de 9 x 14cm se prehibridaron durante 4 horas a 42°C con 10 ml de solución de prehibridación (50% formamida desionizada, 10 X reactivo de Denhardt, 50 mM Tris-HCl pH 7,5; 1 M NaCl, 0,1% de pirofosfato sódico, 1% SDS, 10% dextransulfato y 0,1 mg/ml de DNA de esperma de salmón desnaturalizado por calor).

Para la hibridación, que se llevó a cabo durante 12-16 horas a 42°C, se utilizaron 3 ml de la misma solución de prehibridación pero sin dextransulfato y DNA de esperma de salmón, a la que se añadió la sonda radiactiva previamente desnaturalizada. Del mismo modo que para el Southern, las sondas se marcaron usando el *kit "Rediprime IITM DNA Labelling System"* (AMERSHAM-GE).

El lavado de las membranas se realizó con varias soluciones: 10 minutos a temperatura ambiente con 2 X SSC, dos lavados de 15 minutos a 42°C con 2 X SSC/1% SDS, y 15 minutos a 42°C con 2 X SSC/0.1% SDS. Estos tiempos de lavado se variaron según la

radiación emitida por la membrana tras cada lavado, el control de la emisión se realizó con un contador *geiger*.

Las membranas se analizaron con el sistema de captación de imágenes *BAS-1500 Storage Phosphor Imaging System (FUJIFILM)*.

La impresión causada por la radiación en las diferentes muestras se cuantificó con el programa *Image Gauge V.4.0. (FUJIFILM)* permitiendo así análisis comparativos de la expresión de un gen entre diferentes cepas o bajo condiciones de crecimiento diferentes. Así mismo, al igual que en los análisis tipo *Southern Blot*, las membranas se expusieron a una película fotográfica Kodak (X-OMAT, AR) durante períodos de tiempo que oscilaron entre 1 y 14 días con el fin de obtener una imagen de mayor calidad.

7. MICROSCOPIA

7.1. Estereomicroscopía

La morfología de las colonias de *C. albicans* se examinó con un estereomicroscopio *ZEISS Stemi SV-6* acoplado a un sistema de fotografía réflex Kodak que permitió obtener imágenes de las colonias de interés. Se utilizó película de diapositivas Kodak Ektachrome 160T.

7.2. Microscopía óptica

La observación y fotografía de los microorganismos se realizó empleando un microscopio Zeiss (modelo Zeiss Axiophot 2) acoplado a un sistema de fotografía digital. Para obtener fotografías en color, se utilizó un microscopio Leica semiautomático con una fuente de luz UV Leica ebq100, acoplado a una cámara digital y un sistema informático de tratamiento de imagen.

7.3. Tinciones

- Tinción de pared y septos celulares con *calcofluor white M2R*

El *calcofluor white M2R (SIGMA)* es un fluorocromo que se une a la quitina de la pared celular y septos de separación de los hongos y permite su visualización ya que emite fluorescencia tras ser irradiado con luz ultravioleta. Para las tinciones de muestras de *C. albicans*, se preparó una solución madre de *calcofluor white* a 10 mg/ml añadiendo 10 M KOH hasta su completa disolución, se esterilizó por filtración y se hicieron alícuotas que se conservaron a 4°C. Las células de los diferentes cultivos

se recogieron por centrifugación, se resuspendieron en un pequeño volumen (100-200 μ l) de solución diluida (1mg/ml) de *calcofluor white* y se mantuvieron en oscuridad durante periodos de tiempo comprendidos entre 10 y 15 minutos a temperatura ambiente. A continuación se centrifugaron, se lavaron dos veces en agua destilada estéril y se resuspendieron en 200 μ l de agua MilliQ estéril. Finalmente se observaron al microscopio de epifluorescencia (Forbes, 1988).

- Tinción con DAPI y *calcofluor white*

La tinción de núcleos celulares de *C. albicans* se realizó usando el colorante fluorescente DAPI (4',6-diamidino-2-fenil-indol) que se une específicamente al DNA. En combinación con la tinción de *calcofluor white* nos permitió visualizar los septos intercelulares y los núcleos al mismo tiempo en una sola preparación.

Se preparó una solución madre de DAPI (*SIGMA-ALDRICH*) a 1 mg/ml en agua MilliQ estéril, se hicieron pequeñas alícuotas y se conservaron a -20°C. A partir de una de estas alícuotas se hicieron diluciones frescas del orden 1/100 y 1/1000 en agua. Se recogió 1 ml de células en fase exponencial o durante la transición dimórfica, se lavaron dos veces con agua MilliQ estéril, se centrifugaron y se resuspendieron en 200 μ l de una solución de *calcofluor white* muy diluida (0.01 μ g/ μ l en agua) para evitar que su fluorescencia enmascare la emitida por el DAPI.

A partir de esta suspensión, se depositaron 4 μ l sobre un portaobjetos, se extendieron suavemente con un palillo estéril y tras secarse se añadieron 4 μ l de cualquiera de las diluciones 1/100 y 1/1000 de DAPI. A continuación se colocó un cubreobjetos, se selló con esmalte de uñas transparente y se observó al microscopio de epifluorescencia (*LEICA*).

- Tinción con lactofenol-azul algodón (tinción de clamidosporas)

El lactofenol-azul algodón es un colorante que se usa para la fijación y tinción de hongos. El lactofenol mata las células e inactiva las enzimas líticas impidiendo la lisis celular y el azul algodón es un colorante ácido que tiñe la quitina presente en la pared celular de los hongos.

En esta solución se resuspendieron muestras tomadas con palillo estéril a partir de las placas donde se había inducido la formación de clamidosporas (apartado 2.2.4. de Materiales y Métodos). En la siguiente tabla se muestra la composición de las soluciones madre utilizadas.

Solución	Composición
lactofenol	20% v/v ácido láctico, 20% p/v fenol, 40% v/v glicerol
azul algodón	10% glicerol, saturar con azul algodón

Estas dos soluciones se mezclan en relación 1:1 en el momento de la tinción

- Tinción con azul de metileno

El azul de metileno es un policromo, es decir que está formado por varios compuestos que dan distintas coloraciones. Resulta ser un buen colorante de contraste con propiedades reductoras y se disuelve fácilmente en agua. Este colorante junto con la eosina tiñe la cromatina de rojo quedando el citoplasma de color azul. Se puede usar para teñir material vivo o muerto.

Las células levaduriformes que están muertas, se tiñen de un color azul profundo mientras que las vivas permanecen refringentes. En esta memoria, se preparó una solución de azul de metileno (*SIGMA*) al 1% en agua destilada estéril y las tinciones con este colorante se hicieron añadiendo 4µl de muestra celular en un portaobjetos, se dejó secar ligeramente y a continuación se añadió la misma cantidad de colorante, observando a continuación la preparación con un microscopio Zeiss (modelo Zeiss Axiophot 2) acoplado a un sistema de fotografía digital.

8. MICROARRAYS DE cDNA: COMPARACIÓN DE PERFILES TRANSCRIPCIONALES

Desde mediados de los años noventa, el diseño y uso de microarrays de DNA ha permitido monitorizar simultáneamente el nivel de expresión de miles de genes en un conjunto de células. El funcionamiento de los microarrays de cDNA se basa en la capacidad de hibridación de las moléculas complementarias de DNA.

Brevemente, el proceso consiste en lo siguiente: sobre una superficie de cristal y con ayuda de robots muy precisos, se depositan ordenadamente las moléculas diana, esto es, pequeñas cantidades de DNA correspondientes a los genes cuya expresión se desea analizar.

A continuación se obtiene RNA total a partir de los dos tipos celulares a comparar, uno de ellos será el control y el otro el problema. Se obtiene el DNA complementario (cDNA) mediante una reacción de transcripción reversa, con el aliciente de que estas moléculas de cDNA (sondas) están marcadas con un fluorocromo, como se muestra en la figura 4.

Las dos muestras a comparar se mezclan y se depositan sobre la superficie del microarray. Cada molécula de cDNA marcada se moverá por difusión hacia la diana que contenga su molécula complementaria para hibridar con ella y quedar fijada en ese punto.

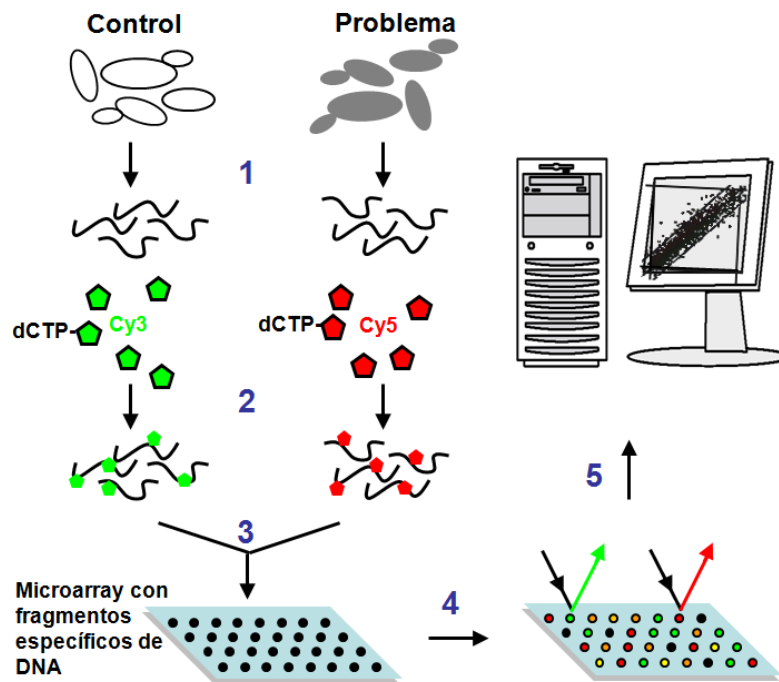


Fig. 4.- Esquema de la metodología utilizada para el análisis comparativo del transcriptoma de dos cepas de *Candida albicans* mediante microarrays de cDNA de vidrio.

1. Extracción de RNA total de las dos cepas a comparar; 2. Síntesis de cDNA marcado con fluorocromos mediante RT-PCR; 3. Hibridación competitiva en microarrays de vidrio; 4. Escaneado; 5. Análisis estadístico de los datos obtenidos.

Después de un tiempo de incubación para que se de este proceso, se lava la superficie del microarray y mediante un escáner de fluorescencia se obtiene una medida relativa de la cantidad de cDNA de las sondas que han quedado fijadas en cada diana.

8.1. Características de los microarrays de *Candida albicans*

Los microarrays de *C. albicans* fueron fabricados por la empresa *EUROGENTEC S.A.* (Ivoz-Ramet, Belgica) en colaboración con el consorcio europeo "*European Galar Fungail Group*" (www.pasteur.fr/recherche/unites/Galar_Fungail) del cual forma parte nuestro grupo de trabajo.

A continuación se describe el método de fabricación y contenido de los microarrays que pueden adquirirse en la siguiente dirección web: www.eurogentec.com.

En primer lugar se diseñaron oligonucleótidos para amplificar regiones de aproximadamente 300 pb del extremo 3' de cada una de las 6039 posibles secuencias codificantes (ORFs) del genoma de *C. albicans*, (que según la base de datos *CandidaDB*, constituyen el 98% de los genes para esta levadura) (figura5A).

La información sobre las secuencias codificantes se obtuvo de la base de datos *CandidaDB* (<http://genolist.pasteur.fr/CandidaDB>), desarrollada por el *Galar Fungail Group*

a partir de las secuencias publicadas por el *Stanford Genome Technology Center* (www-sequence.stanford.edu/group/candida) donde se ha llevado a cabo el proyecto de secuenciación del genoma de la cepa SC5314 de *C. albicans* (d'Enfert *et al.*, 2005).

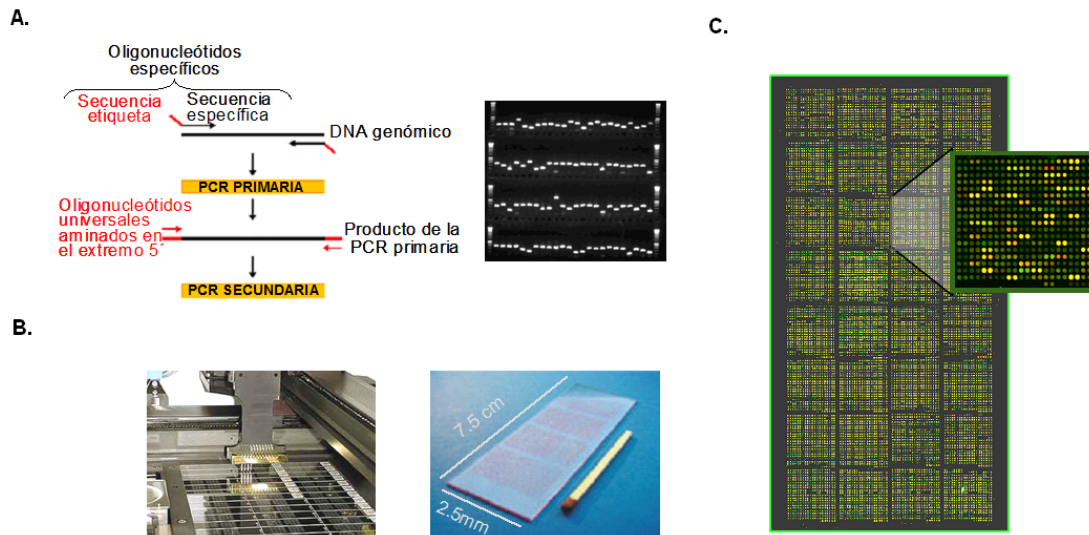


Fig. 5.- Elaboración de los microarrays de *C. albicans* utilizados en el presente trabajo.

A) Síntesis mediante PCR en dos pasos de fragmentos específicos de DNA modificados en ambos extremos por grupos amino. Electroforesis de algunos de los fragmentos de DNA utilizados (www.eurogentec.com). B) Colocación de las sondas sobre la superficie de vidrio y tamaño y aspecto de un microarray. C) Imagen de un microarray de DNA de *C. albicans* después de su hibridación. (Esquema tomado de la tesis doctoral N. Martín, 2006).

Para la obtención de las sondas que posteriormente se depositaron en el array se hicieron reacciones de PCR en dos pasos. En la primera reacción de PCR se utilizaron oligonucleótidos específicos usando como molde DNA genómico. Los oligonucleótidos contienen una secuencia etiqueta que queda integrada en las nuevas moléculas de DNA obtenidas que a su vez van a servir como molde en la segunda reacción de PCR, en la cual se utiliza una pareja de oligonucleótidos universales aminados en su extremo 5' que anillan específicamente con esta secuencia etiqueta.

Los amplicones obtenidos con su extremo 5' aminado se purificaron y unieron covalentemente a una superficie de vidrio del tamaño de un portaobjetos recubierta de grupos aldehído.

En el microarray se encuentran representados por duplicado 6039 genes de *C. albicans*. También se han incluido sondas de genes mitocondriales, controles para detectar problemas de degradación de RNA, contaminación con secuencias de DNA genómico o diferencias debidas a hibridación no uniforme en la superficie del microarray. Se pueden encontrar también sondas correspondientes a marcadores de selección usados habitualmente en biología molecular como *KAN*, *LEU2* o *Lac Z*, otras sondas depositadas son el gen que codifica la proteína verde fluorescente (GFP), el gen *LuxA* que se puede usar para la normalización de los datos, 5 genes de *S. cerevisiae* y 2 genes de *H. sapiens* para detectar

hibridación cruzada. La configuración del robot utilizado para la colocación de las sondas genera 32 bloques formados por 20x20 puntos cada uno (figura 5B).

8.2. Diseño experimental llevado a cabo con microarrays de *Candida albicans*

En el presente trabajo se ha comparado el perfil transcripcional de dos cepas de *C. albicans* delecionadas cada una de ellas en un gen con el de una cepa silvestre (control) creciendo en diferentes condiciones.

En cada comparación se llevaron a cabo cuatro hibridaciones (replicados) como se muestra en el esquema de la figura 6. Se trata de dos replicados biológicos, en los que las muestras de RNA de la cepa mutada proceden de dos cultivos diferentes, y dos experimentos de intercambio de colorante para cada uno de ellos (*dye swap*). Estos últimos replicados se realizaron con el fin de eliminar desviaciones debidas a diferencias en las características de incorporación y emisión de energía entre los dos fluorocromos utilizados, Cy3 y Cy5.

El RNA de la cepa CAI4, usado como control, se tomó siempre de una mezcla de RNA obtenido a partir de tres cultivos independientes.

La anotación utilizada en esta memoria procede inicialmente de la base de datos *Candida DB* sin embargo, como se recoge en los archivos del material suplementario, se ha incluido la nomenclatura vigente según la base de datos *Candida Genome Database* (CGD) utilizando el nombre estándar equivalente siguiendo el formato establecido para *S. cerevisiae*, y, en aquellos genes sin este tipo de asignación, se ha considerado el nombre sistemático asignado en dicha base de datos y que responde al formato "orf19.#".

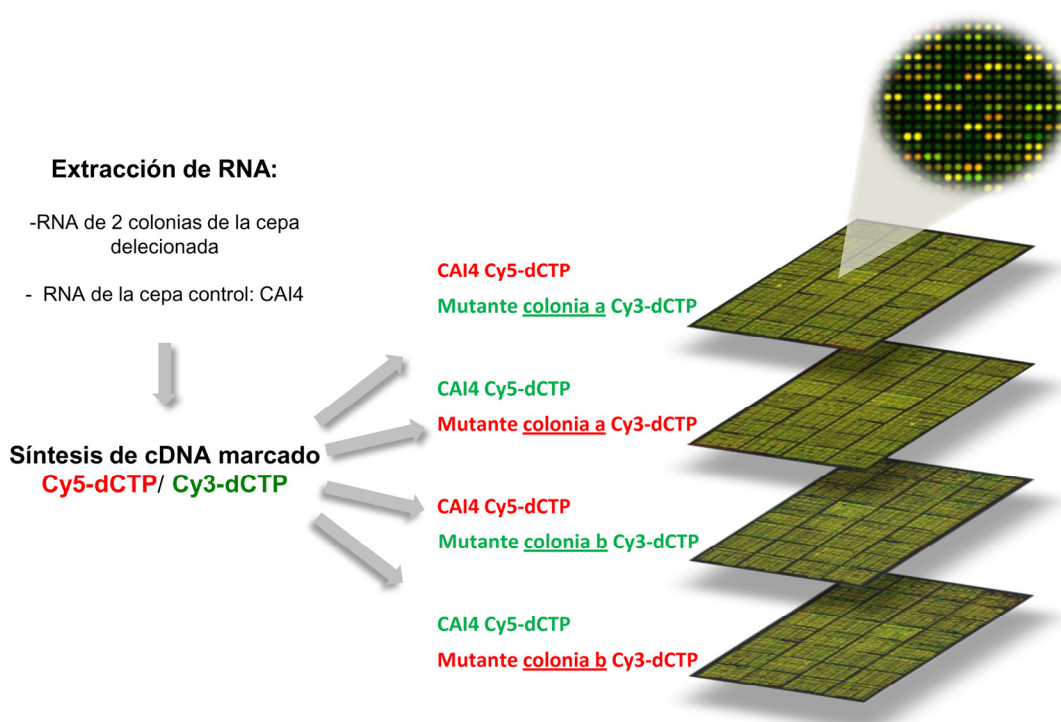


Fig. 6.- Esquema representativo de las 4 hibridaciones realizadas para cada comparación mutante vs. CAI4.

8.3. Aislamiento de RNA total

Las células de cada cepa se recogieron por centrifugación a 3000 rpm durante 5' a T^a ambiente, se eliminó el sobrenadante y el precipitado de células se resuspendió en el pequeño volumen de medio residual tras la centrifugación. A continuación el concentrado de células se congeló dejando caer gotas de unos 20 µl en *Eppendorf* que contenían nitrógeno líquido y que a su vez se mantenían flotando sobre una gradilla en un recipiente con nitrógeno líquido para evitar la descongelación de las muestras hasta su posterior procesamiento. Si las muestras no se procesaron tras ser recogidas, se conservaron a -80°C hasta su utilización.

La lisis celular se llevó a cabo de forma mecánica usando un *Micro-Dismembrator* (*BRAUN*, Melsungen) que consistió en introducir la muestra en una cámara de teflón junto con una esfera de tungsteno de 7 mm de diámetro y que se sometió a vibración durante 2 minutos a 2000 rpm logrando así la pulverización de la muestra. Durante todo el proceso, muestras, cámaras y esferas se mantuvieron en nitrógeno líquido hasta su uso.

El pulverizado celular procedente de cada muestra y aún congelado se repartió inmediatamente en dos tubos *Eppendorf* con 1 ml de reactivo Trizol[®] (*INVITROGEN*). Este reactivo es una solución monofásica de isotiocianato de guanidina y fenol que mantiene la integridad del RNA durante el proceso de extracción.

A continuación los tubos se agitaron durante 1 minuto en un vortex y se dejaron 5 minutos a temperatura ambiente permitiendo así la disociación de los complejos nucleoprotéicos, a continuación se centrifugaron a 12000 rpm durante 10 minutos. Se recogió el sobrenadante en tubos nuevos y se añadieron 0,4 volúmenes de cloroformo. Las muestras

se agitaron por inversión y tras 10 minutos de reposo a temperatura ambiente se centrifugaron a 12000 rpm durante 5 minutos.

La fase acuosa libre de proteínas y DNA, se transfirió a nuevos *Eppendorf* y se añadieron 0,5 volúmenes de isopropanol para precipitar el RNA.

Esta suspensión se incubó durante 15 minutos a temperatura ambiente y a continuación se centrifugó a 12000 rpm durante 10 minutos. El precipitado se lavó con 1ml de etanol al 70% y se dejó secar unos minutos, una vez seco se resuspendió completamente en 500µl de H₂O MilliQ-DEPC y 500 µl de tampón de cloruro de litio (LiCl 4 M, TrisHCl pH 7.4 20 mM y EDTA 10 mM) y se mantuvo a -20°C durante 24h. Tras este período de precipitación, las muestras se centrifugaron a la máxima velocidad durante 30 minutos y se lavaron dos veces con 1ml de etanol al 70% frío. El precipitado de cada tubo se secó en una centrífuga de vacío "*speed vac*" durante 5 minutos y por último se resuspendió en 30-100 µl de H₂O MilliQ-DEPC.

La calidad (integridad) del RNA se comprobó mediante electroforesis en geles de agarosa al 1% usando 1µl de RNA de cada muestra. La concentración de RNA se valoró determinando la absorbancia a 260 nm en un espectrofotómetro modelo GeneQuant (*PHARMACIA*) y se ajustó a 1,5 µg/µl.

8.4. Obtención de cDNA marcado con fluorocromos

La síntesis de cDNA marcado con fluorocromos se realizó siguiendo el protocolo proporcionado por la casa comercial *EUROGENTEC* con algunas modificaciones. Se trata de una reacción de marcaje directo en la que la retrotranscriptasa reversa sintetiza DNA complementario marcado con los dNTPs modificados Cianina 3-dCTP o Cianina 5-dCTP

En cada reacción se emplearon 15µg de RNA total a los que se añadió 1 µl de *RNAsin* (*PROMEGA*) que es un inhibidor de ribonucleasas y se completó con agua MilliQ estéril hasta un volumen final de 21 µl. Esta solución de RNA se incubó en un baño de agua a 42°C mientras se preparaba el resto de componentes de la reacción de marcaje según se indica en la tabla V.

La solución de RNA se añadió a esta mezcla, preparada en tubos *Eppendorf* cubiertos con papel de aluminio para evitar la degradación de los fluorocromos por la luz y se incubó durante 5 minutos a 65°C, seguido de otros 5 minutos a 42°C, se añadió 1µl (200U/µl) de transcriptasa reversa (*INVITROGEN*) y la mezcla se incubó durante 3 horas a 42°C añadiendo 1µl adicional de enzima transcurrida la mitad del tiempo de incubación.

Transcurrido este tiempo, se detuvo la reacción de síntesis añadiendo 5 µl de EDTA pH 8.0 y 2 µl de NaOH 10N e incubando la mezcla a 65°C durante 20 minutos. A continuación la solución se acidificó añadiendo 4 µl de ácido acético 5 M.

Tabla V. Reactivos utilizados para la síntesis de cDNA marcado con fluorocromos.

Reactivos	Volumen (μl)
5x First-strand buffer (<i>INVITROGEN</i>)	8
<i>C. albicans</i> specific primer mix (<i>EUROGENTEC</i>) (0.1 pmoles/μl)	1
Oligo dT (12-18) (<i>SIGMA</i>) (0.5 μg/μl)	1
Mezcla de dNTPs excepto dCTP (<i>SIGMA</i>) (10 mM)	3
dCTP (<i>SIGMA</i>) (1 mM)	1
Cianina 3-dCTP o Cianina 5-dCTP (1 mM) (CyDye TM Fluorescent nucleotides Cy3 o Cy5, <i>AMERSHAM-GE</i>)	1,5
DTT (0.1 M) (<i>INVITROGEN</i>)	4

8.5. Purificación, cuantificación y concentración del cDNA

La purificación de las moléculas de cDNA sintetizadas se realizó usando el kit de purificación de productos de PCR *QIA-quick PCR purification kit (QIAGEN)* siguiendo el protocolo proporcionado por la casa comercial. Se hicieron dos eluciones con 50μl de agua MilliQ y a continuación se cuantificó el cDNA recuperado en un espectrofotómetro, la cantidad de fluorocromo incorporado y la frecuencia de incorporación del mismo (F.O.I.) aplicando las fórmulas que se muestran a continuación.

Como el cDNA obtenido en cada reacción está poco concentrado, para la cuantificación no se hicieron diluciones utilizándose microcubetas (*HELLMA*) de las cuales posteriormente se recuperó toda la muestra.

- ng de cDNA obtenidos:

$$A_{260\text{nm}} \times 37 \times \text{volumen final de sonda } (\mu\text{l})$$

- pmoles de fluorocromo incorporado:

$$\text{Cy3: } A_{550\text{nm}} \times \text{volumen final de muestra} / 0.15$$

$$\text{Cy5: } A_{650\text{nm}} \times \text{volumen final de muestra} / 0.25$$

- frecuencia de incorporación F.O.I.:

Se define como el número de nucleótidos marcados por cada 1000 nucleótidos de cDNA sintetizado.

$$\text{F.O.I.} = F_1 \text{ (pmoles)} \times 324,5/\text{ng cDNA}$$

Donde, F_1 son los pmoles de fluorocromo incorporado.

Los valores óptimos de F.O.I. están entre 20 y 50 y según la casa comercial *EUROGENTEC* no se aconseja el uso de muestras con un valor de F.O.I. ≤ 10 , teniendo esto en cuenta, en nuestros experimentos sólo se dieron como válidas aquellas muestras con un valor de F.O.I. ≥ 16 .

Realizados estos cálculos, se tomó el volumen de muestra correspondiente a 65pmoles de fluorocromo incorporado y se concentró con filtros microcon-30 (*AMICON*) hasta un volumen final de entre 5 y 10 μ l.

8.6. Hibridación y lavado de microarrays

En cada hibridación se mezclaron dos muestras de cDNA (una marcada con Cy3 y otra con Cy5) procedentes de cada una de las dos cepas a comparar y 5 μ l de DNA de esperma de salmón (*SIGMA*) previamente desnaturalizado por calor. A continuación el cDNA se desnaturalizó durante 2 minutos a 95°C se enfrió en hielo y se añadió tampón de hibridación (*Dig Easy Hybridization buffer*, de *ROCHE*) hasta completar un volumen final de 60 μ l.

La mezcla se depositó centrada sobre un cubreobjetos de plástico (60x24 mm, Sigma-Aldrich), cuidadosamente el microarray se puso en contacto con la muestra por la cara que contenía el DNA y una vez que la muestra cubrió aproximadamente la mitad del cubreobjetos se dio la vuelta al microarray y se colocó inmediatamente en una cámara de hibridación (*CORNING*) hermética, que se sumergió en un baño nivelado a 42°C.

Tras 12 horas de incubación, el microarray se introdujo en una cubeta de vidrio con la primera solución de lavado (1% SDS/2X SSC) para retirar el cubreobjetos, con la ayuda de unas pinzas, se introdujo en un tubo *Falcon* con la misma solución de lavado y se incubó a temperatura ambiente con agitación ocasional durante 5 minutos, protegido de la luz con papel de aluminio. A continuación se hicieron dos pases del microarray en tubos *Falcon* con la segunda solución de lavado, 2X SSC, con el fin de eliminar los restos de SDS de la primera solución y el segundo de ellos se mantuvo 5 minutos con agitación a temperatura ambiente. Por último, para secar el microarray, éste se centrifugó a 1100 rpm a temperatura ambiente durante 5 minutos en un tubo *Falcon*.

8.7. Análisis de los datos obtenidos

8.7.1. Identificación de los genes expresados diferencialmente

En el presente trabajo se ha realizado la comparación de los perfiles transcripcionales de dos mutantes de *Candida albicans* con el de la cepa parental, CAI4, en cuatro condiciones de crecimiento, fase exponencial de crecimiento como levaduras, y tres tiempos durante la inducción de formación de hifas, (15 minutos, 1 y 3 horas), en medio Lee a 37°C.

En cada comparación entre el mutante y la cepa parental se han llevado a cabo cuatro hibridaciones correspondientes a dos replicados biológicos de manera que el RNA de la cepa mutada procede de cultivos independientes y para cada uno de ellos se hicieron dos hibridaciones en las que el cDNA se marcó de forma inversa (*dye swap*). El cDNA de la cepa parental CAI4 se obtuvo a partir de una mezcla de RNA procedente de cultivos de tres colonias aisladas de esta cepa.

En el estudio realizado con cada uno de los mutantes, RDG4 (*gcn5/gcn5*) y RGL4 (*hat1/hat1*) en total se han llevado a cabo 32 hibridaciones (4 replicados x 4 condiciones de crecimiento x 2 mutantes).

Las imágenes correspondientes a cada microarray se obtuvieron con el escáner *GenePix 4000B* y el programa asociado *GenePix Pro 4.0* (AXON INSTRUMENTS Inc.) del Servicio de Genómica del Centro de Investigación del Cáncer (Salamanca). Se llevaron a cabo varias exploraciones modificando los valores de fotomultiplicación (PMTs) asociados a cada fluorocromo para obtener una imagen en la que el valor medio de la relación de intensidades de los dos canales (Cy5/Cy3) estuviera en torno a 1.

Obtenidas las imágenes con el programa *GenePix Pro 4.0* se ajustó la red de puntos diseñada previamente para el microarray con los puntos de la imagen para así identificar cada gen. Se revisó minuciosamente cada imagen etiquetando aquellos puntos cuya señal estaba ausente o era de baja calidad (por la falta de uniformidad o la escasa diferencia entre la intensidad de la señal y la del fondo del microarray), se obtuvo una tabla con los valores numéricos asociados a la señal de cada fluorocromo en cada gen, los valores del fondo circundante a cada punto y un informe sobre la calidad de los datos obtenidos.

Para la normalización de los datos, integración, análisis de significancia estadística y comparación de los datos de diferentes microarrays se utilizó el programa *GeneSpring 5.0* (Agilent technologies, CA) siguiendo los pasos que se describen a continuación.

A partir de la tabla de datos de cada microarray obtenida con el programa *GenePix Pro 4.0*, se importaron en *GeneSpring 5.0* (Silicon Genetics) la columna con los datos de la

mediana de los valores de intensidad de cada fluorocromo en el microarray, (columna F635 para Cy5 y F532 para Cy3) y la mediana del fondo alrededor de cada uno de ellos (columnas B635 y B532). También se importaron la columna con los códigos de identificación de cada gen, la que contiene el número del bloque en el que se encuentra cada gen dentro del microarray y la columna con las etiquetas de calidad asignadas a los datos según nuestro examen previo.

Tras cargar estos datos en el programa se aplicó un tratamiento de normalización *per spot* y *per chip* dependiente de intensidad (*Lowess*) a cada uno de los bloques del microarray. Este tratamiento permite comparar los datos de los genes dentro del microarray y entre los diferentes microarrays y como es dependiente de intensidad, corrige las variaciones no significativas que dependen del nivel de expresión propio de cada gen. Esta corrección es necesaria pues diferentes estudios basados en microarrays indican que en el caso de genes con bajo nivel de expresión, la dispersión de la relación mutante/control y el error asociado a las mediciones aumentan con respecto a los genes con mayor nivel de expresión, de esta forma, variaciones poco significativas para genes que se expresan a bajos niveles si pueden ser significativas en genes con mayor nivel de expresión.

Dado que el proceso de normalización se ha aplicado a cada uno de los bloques del microarray (normalización por bloques de impresión) permite corregir variaciones debidas a defectos en la homogeneidad del microarray.

Los genes expresados diferencialmente en el mutante en cada una de las condiciones del estudio, se obtuvieron aplicando el test estadístico de comparación de grupos “*Wilcoxon-Mann-Whitney*” y la corrección para test de comparación múltiple “*Benjamini and Hochberg FDR*” con un valor de $p \leq 0.02$ de modo que la probabilidad de error sobre el total de genes que pasen el test es de un 2%. El análisis de significación solamente se aplicó a los genes que presentaban un factor de variación mínimo de 1.5 en al menos una hibridación, este límite se introdujo para controlar la rigidez del factor de corrección aplicado (*Benjamini and Hochberg FDR*), influenciado por el número de genes. (García-Sánchez *et al.*, 2004).

Considerando que para cada condición se hibridaron cuatro microarrays y que en cada uno de ellos las sondas de cada gen se encuentran depositadas por duplicado, para la mayoría de los genes se analizaron 8 datos para cada condición.

Entre los genes seleccionados por el test se consideraron para análisis posteriores solamente aquellos que presentaran un factor de expresión diferencial mutante *vs.* control ≥ 1.5 , considerando la media de los 4 replicados. Finalmente, los genes que pasaron este filtro se separaron en genes sobreexpresados y subexpresados, en el mutante respecto a la cepa control.

Este procesamiento de los datos equivale a realizar el análisis con el programa SAM (*Significance Analysis of Microarrays*) que evalúa si el logaritmo de la relación mutante/control difiere significativamente de 0 en los replicados (Tusher *et al.*, 2001) y posteriormente filtrar los genes que presentan un factor de variación mínimo de 1.5.

En algunas ocasiones, especialmente en genes que codifican factores transcripcionales u otras proteínas reguladoras, se han tenido en cuenta genes que presentan valores de expresión diferencial menores de 1.5, tales genes se han indicado en el correspondiente apartado.

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 *CandidaDB* (<http://genolist.pasteur.fr/CandidaDB/>).

8.7.2. Comparación de datos de expresión diferencial en condiciones múltiples

Para delimitar los grupos de genes expresados diferencialmente entre las distintas condiciones (distintos mutantes o condiciones de crecimiento), los genes se clasificaron con diagramas de Venn.

Con el análisis de grupos (tipo *cluster*) se agruparon los experimentos según la similitud de los resultados obtenidos (*Experiment tree*) o los genes según los patrones de expresión diferencial a lo largo de diferentes condiciones (*Gene tree* y *K-means*).

Todos los análisis se realizaron con las herramientas de cálculo disponibles en *GeneSpring* versión 5.0. (*Agilent technologies*, CA).

8.7.3. Análisis de las categorías funcionales asociadas a expresión diferencial

En la página web de la base de datos CGD (*Candida Genome Data Base*, <http://www.candidagenome.org>), se encuentran herramientas para realizar la clasificación de los genes expresados diferencialmente en categorías funcionales según la terminología *GO* (*Gene Ontology*) que proporciona un vocabulario estandarizado para facilitar la clasificación funcional de un gen independientemente de la especie. En nuestros análisis se ha utilizado la herramienta *GO Term Finder* que determina los términos *GO* más significativos compartidos por un grupo de genes de *C. albicans*.

Otro de los programas utilizados para analizar los datos de expresión obtenidos es *T-profiler* (<http://studentst.bio.columbia.edu/t-profiler/top.html>, Boorsma *et al.*, 2005), basado también en la clasificación *GO*. Con esta aplicación, no se precisa un filtrado previo de los genes diferencialmente expresados pues se analizan los datos de todos los genes. Para cada comparación se importaron los datos de expresión de todos los genes como \log_2 de la relación (mutante/control), considerando dicha relación (mutante/control) como el valor medio de las 4 relaciones normalizadas (mutante/control) correspondientes a cada uno de los cuatro microarrays realizados por experimento.

El programa *T-profiler* aplica un test *t*, de modo que partiendo del valor del \log_2 (mutante/control) correspondiente a cada gen, calcula para cada grupo de la clasificación *GO* un valor *t*. Simplificando, en este cálculo se tienen en cuenta la media y la varianza del grupo que se está evaluando y las compara con la media y la varianza del conjunto total de genes que no forman parte de dicha categoría. El valor *t* refleja la diferencia entre ambas medidas y nos indica si la categoría *GO* analizada está asociada significativamente a sobreexpresión o subexpresión. Solamente se consideran grupos regulados aquellos con un valor de error *E* tras la corrección de Bonferroni ≤ 0.05 (Boorsma *et al.*, 2005).

9. PROGRAMAS DE OBTENCIÓN Y TRATAMIENTO INFORMÁTICO DE DATOS

El análisis de secuencias nucleotídicas se llevó a cabo con el paquete informático *DNASTARTM* (Ltd. Abacus House[®], MANOR RD., West Ealing London W130 AS Reino Unido).

Los esquemas de la mayoría de los plásmidos utilizados en este trabajo se diseñaron con el programa *Clone Manager[®] 5.02* (Scientific and Educational Software).

Las comparaciones de secuencias de nucleótidos y de aminoácidos se llevaron a cabo *on-line* con los programas *FASTA* (Genetics Computer Group, Madison, WI) y *BLAST* (National Center for Biotechnology Information), herramientas disponibles a través del servidor del *European Bioinformatics Institute* (<http://www.ebi.ac.uk/>).

La búsqueda de dominios funcionales se ha realizado en las bases de datos *PROSITE* (<http://www.expasy.org/tools/scanprosite>) usando la herramienta *ScanProsite* y *Pfam* (<http://pfam.sanger.ac.uk/>).

Para el anillamiento múltiple de secuencias se utilizó el programa *ClustalW* (<http://www.ebi.ac.uk/clustalw>).

A continuación se mencionan las bases de datos y direcciones más consultadas para obtener información sobre los genes y proteínas de este estudio:

- *CandidaDB* (<http://genolist.pasteur.fr/CandidaDB/>)
- CGD: *The Candida Genome Database* (<http://www.candidagenome.org/>), aloja la secuencia completa del genoma de *C. albicans* y herramientas de análisis.
- <http://albicansmap.ahc.umn.edu/> contiene el mapa físico de los genes de *C. albicans*.
- <http://www.sequence.stanford.edu/group/candida>
- SGD: (<http://www.yeastgenome.org/>) *The Saccharomyces Genome Database*

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

1. INTERRUPCIÓN DE LOS GENES *CaGCN5*, *CaHAT1* Y *CaHAT2* DE *C. albicans*

1.1. Genes con función acetiltransferasa de histonas de la base de datos *CandidaDB*

Dentro de la línea de investigación en la que se incluye el presente trabajo, nuestro laboratorio está llevando a cabo el análisis sistemático de la implicación de diferentes acetiltransferasa de histonas y desacetilasas de histona en la regulación de la transición levadura-hifa de *C. albicans*.

La secuenciación del genoma completo de *C. albicans*, por la Universidad de Stanford, (<http://www-sequence.stanford.edu/group/candida>), ha permitido la creación de la base de datos *CandidaDB* (<http://genolist.pasteur.fr/CandidaDB>) (d'Enfert *et al.*, 2005) en la que están representados todos los genes de este organismo. El Proyecto Europeo: *Novel approaches for the control of fungal diseases*, llevado a cabo por el *Galar Fungail Group* en el cual participó nuestro grupo, se realizó la anotación parcial del genoma de *C. albicans*, generando los *Individual Protein Files* (IPFs) que engloban las ORF (marcos de lectura abierta) de todos los genes de *C. albicans*.

En este trabajo, en primer lugar, realizamos una búsqueda *in silico* de las IPFs con función acetiltransferasa de histonas que se muestra en la tabla I y nos planteamos la delección de los genes *CaGCN5*, *CaHAT1* y *CaHAT2* de *C. albicans*.

Tabla I.- IPFs con función acetiltransferasa de histonas en *CandidaDB*.

Candida DB	Tamaño (pb)	Descripción
<i>ESA1</i>	1626	Histona acetiltransferasa (por homología)
<i>GCN5</i>	1350	Histona acetiltransferasa Tipo A (por homología)
<i>HAT1</i>	1242	Histona acetiltransferasa Tipo B (por homología)
<i>HAT2</i>	1458	Subunidad del complejo histona acetiltransferasa Tipo B (por homología)
<i>HPA1</i>	1644	Histona acetiltransferasa asociada a RNA polimerasa II (por homología)
<i>HPA3</i>	459	Acetiltransferasa de histonas y de otras proteínas (por homología)
<i>IPF11610</i>	1149	Similar a <i>HAT2</i> de <i>S. cerevisiae</i> (por homología)
<i>SPT20</i>	2256	Factor de transcripción, miembro del complejo histona acetiltransferasa SAGA (por homología)
<i>SPT5</i>	2871	Factor de elongación de la transcripción (por homología)
<i>SPT7</i>	3924	Factor de transcripción, miembro del complejo histona acetiltransferasa SAGA (por homología)

A partir de este momento y siguiendo las indicaciones en relación con la nomenclatura de los genes de *Candida albicans* indicada en la base de datos *Candida Genome Database* <http://www.candidagenome.org/Nomenclature.shtml>, se hará referencia a los genes *CaGCN5*, *CaHAT1* y *CaHAT2* como *GCN5*, *HAT1* y *HAT2* respectivamente. Sólo en caso de una posible confusión con sus homólogos en otras levaduras se usará el prefijo Ca-.

Acetiltransferasa de histonas *GCN5*

2. LA SECUENCIA NUCLEOTÍDICA DEL GEN *GCN5* DE *Candida albicans*

La secuencia del gen *GCN5* (orf19.705) se obtuvo a partir del *Contig19-10065* que forma parte de la secuencia completa del genoma de la cepa SC5314 de *C. albicans* publicada por la Universidad de Stanford (<http://www.sequence.stanford.edu/group/candida>).

Utilizando el programa BLAST la secuencia de *GCN5* se localizó por alineamiento de una secuencia EST (*expressed sequence tag*) de unos 400 nucleótidos descrita como perteneciente al gen *GCN5*, por su homología con el gen *GCN5* de *S. cerevisiae*.

Se detectó una sola fase de lectura abierta de 1350 nucleótidos que por comparación con el programa FASTA (<http://www.ebi.ac.uk/fasta33>) mostraba un porcentaje de identidad del 73,8% con la secuencia nucleotídica del gen *GCN5* de *Debaryomyces hansenii* y del 70% con el mismo gen de *S. cerevisiae*.

En la figura 1 se muestra la secuencia de nucleótidos de un fragmento de 3280 pb del *Contig19-10065* que contiene el gen *GCN5* y su traducción a aminoácidos, junto con las regiones 5' y 3' adyacentes. En dicha secuencia se pueden observar también señales reguladoras de la transcripción características de los genes de levadura.

En el mapa físico del genoma de *C. albicans* el gen *GCN5* se localiza en el cromosoma R (*The Candida albicans physical map website*, <http://albicansmap.ahc.umn.edu>). Esta información también se encuentra disponible en las bases de datos *CandidaDB* y *Candida Genome Data Base* (CGD).

2.1. Análisis de la región 5' no codificante

El análisis de esta región se inició con la búsqueda *in silico* de elementos reguladores de la transcripción, como son las secuencias promotoras, responsables de la interacción con la RNA polimerasa y las que determinan el lugar de inicio y eficiencia de la transcripción (Guarente, 1984).

Las secuencias TATA fueron los primeros elementos reguladores de la transcripción que se describieron en eucariotas por ello y dada su importancia, es un clásico buscar en las regiones promotoras secuencias de este tipo. Estas secuencias son reconocidas por la proteína TBP (*TATA binding protein*), y a través de complejos coactivadores la RNA polimerasa II se une a los promotores eucariotas. Sin embargo, tan sólo un 20% de los promotores de *S. cerevisiae* contienen una caja TATA funcional y en ese caso dependen de dicha secuencia para su expresión. Los genes que no contienen caja TATA interaccionan también con TBP, por ello se ha sugerido la existencia de diferentes mecanismos de unión de TBP a los promotores (Basehoar *et al.*, 2004).

Analizando el genoma de *S. cerevisiae*, (Basehoar *et al.*, 2004) propusieron la secuencia TATA(A/T)A(A/T)(A/G) como secuencia consenso para cajas TATA funcionales. Los genes que contienen una caja TATA funcional parecen estar sujetos a mayor regulación

-1000	ataacttgaa	gatcccgaat	gtatatccat	actcaccaat	tcttcagatt	tcttaacttt	gataggagcg	acagcttgca
-920	aaaagtcaac	catcttagcg	gcattggtttt	tttgtgcata	aaagaaatct	aacctatctt	tggtttcttg	aattgaaaca
-840	gtatcaacgt	gggcattatg	cttcaaaatc	aatgtgtcca	aatacaaaaa	ggttctctta	tgtyggactt	tttgtcttat
-760	ttgaacggta	gctctccagg	tggttggtgt	ataagatttg	gcacaatctg	gacattgcat	ggcaatcaca	acgtattcga
-680	cttcgaaatg	ttgttgaaca	atggtatttg	ccatggcttc	accttgaaca	gtgatcttaa	ttctgattct	tctggaatga
-600	ggttcgggtc	agatgaaact	ggcgtcaact	aacctcactt	tgtttaaacc	tttcaaacgt	ctaagacaca	aggctagcaa
-520	ctcacgggat	tctaattctg	ctcttatcca	ttgtccaggt	ggttgtaaaa	atctttcaca	atctctacag	aatgacacat
-440	ttgcctctct	agggatacct	tctgttatat	caacatttaa	tttaatacag	tcataacaca	ttactaatcc	cagggatcca
-360	tccattggaa	caccacaatt	acaacataat	actgttgcca	cttgagcacc	accaggctgg	ttagcggggt	ccatttgagt
-280	ataatttgac	attactagta	agttatttag	aatgttagac	cttcaaaaga	aaataacaaa	gcacaataaa	taagtattaa
-200	aagatgacaa	attgggatga	aatttttttt	ttggttaatc	tcatctctaa	attgccctcc	tctattaagg	tcacgtgatc
-120	attatttgta	ctaacaattt	ggagaacata	tttttttcaa	acaacaacaa	aaaaaacaaa	cggaaagctg	aagaacattt
-40	aaaccccaaa	caagcaat	aa	ccgatcaata	acaattc	cgta	atgggtgaca	gaaaagaac
1					M V D	R K R	T A A I	R A E
40	atgatgatga	agaaaatgac	aatgttccct	tacagaaaaa	agtgaaaaata	gaagcaaaagc	agaaaagaaga	agaggaaagt
13	D D D	E E N D	N V P	L Q K	K V K I	E A K	Q K E	E E E D
120	ggtgataagt	caggagccac	ggaaacaaa	tctgaggtga	aacaagaatc	aaaagaagaa	actactcaa	aggaanaata
40	G D K	S G A	T E T K	S E V	K Q E	S K E E	T T Q	K E N
200	tgaagaggac	gaggaagagg	aagaagagga	agatgacgaa	gaagccgaag	aagagaagaa	aagaataacc	aatttcaatt
66	N E E D	E E E	E E E	E D D E	E A E	E E K	K R I T	N F N
280	ttgatggcga	aatttacaca	ttcaaggaaa	gaccttcggt	aattgaagaa	aaagaaggca	aaatagagt	tctgtgggtg
93	F D G	E I Y T	F K E	R P S	V I E E	K E G	K I E	F R V V
360	aataatgaca	atagtcgaga	aaacttgatt	gtgctaaccg	ggtaaagaa	tattttccaa	aagcaactac	ccaagatgcc
120	N N D	N S R	E N L I	V L T	G L K	N I F Q	K Q L	P K M
440	tcgtgaatat	atctcgcggt	tggtgatga	tcgatcacat	ttgtcaatgg	cagttgtgag	aaagccatta	actgtggtag
147	P R E Y	I S R	L V Y	D R S H	L S M	A V V	R K P L	T V V
520	gtgggatcac	ataccgtcca	tttaacaacc	gtggatttgc	cgaaattgtg	ttttgtgcta	tctcgtcaac	tgaacaagtg
173	G G I	T Y R P	F N N	R G F	A E I V	F C A	I S S	T E Q V
600	cgtgggtatg	gtgcacattt	gatgaatcat	ttgaaagact	atgtgagggc	aacatctcca	atcaaatatt	tcttgcgta
200	R G Y	G A H	L M N H	L K D	Y V R	A T S P	I K Y	F L T
680	tcagataaac	tatgctattg	ggattttcaa	aaagcagggt	ttcacgaagg	aaatatcatt	agataaatcg	gtgtggatgg
226	Y A D N	Y A I	G Y F	K K Q G	F T K	E I S	L D K S	V W M
760	ggtacatcaa	ggattacgaa	gggtgtacat	tgatgcagtg	ctcagatgta	ccgtcaatat	taaggtaacct	tgatctgggt
253	G Y I	K D Y E	G G T	L M Q	C S M L	P S I	L R Y	L D S G
840	aaaatattac	ttttgcaaaa	agctgtctatt	gaaagaaaaa	tacggtctag	atctaaatca	aaaatagtg	gaccgggttt
280	K I L	L L Q	K A A I	E R K	I R S	R S K S	K I V	R P G
920	gcaagttttt	aaaaccaata	agaatgtgac	attagacccc	aaagataatc	ctggattagc	agagggcagg	tggttggaa
306	L Q V F	K T N	K N V	T L D P	K D I	P G L	A E A G	W S E
1000	aaatggataa	attagcacaa	aaaccgaaaa	gaggaccaca	ttataacttt	atggttacgc	tattcagtg	aattcagaac
333	E M D	K L A Q	K P K	R G P	H Y N F	M V T	L F S	E I Q N
1080	cacccttctg	cttgccattt	tgcaagtgga	gtcaacaaag	aaagaatgac	agattattat	cgagttattg	aacatccaat
360	H P S	A W P	F A V A	V N K	E E V	P D Y Y	R V I	E H P
1160	tgatttggca	acaatagaac	aaaaattgga	aaacaacttg	tattttaaatt	ttactgattt	tgtygatgat	ctaaaactaa
386	I D L A	T I E	Q K L	E N N L	Y L K	F T D	F V D D	L K L
1240	tgttcaacaa	ttgtcgagct	tataattcgg	aaaccacaa	atattataaa	aacgcaata	aactagaaaa	gtttatgaat
413	M F N	N C R A	Y N S	E T T	T Y Y K	N A N	K L E	K F M N
1320	aataaattga	aagactgtag	ttttgtatag	ctgtttttag	gaatatatga	tatgtgattc	ttggccgaaa	taccatagat
440	N K L	K D C	S F V	-				
1400	tactgaaatt	tggttgcttt	gagaattgtg	gggaggttat	aatgatggcg	gattttgctg	taagaacata	agacaacaca
1480	cgcgggcgag	tctcattcgc	atggttgctg	ggctctactg	tacctgaagc	aaaaagaaa	aaaaaatatt	ggagctgata
1560	aatgcagaca	agaattgac	aagcttcttt	tcaatctgat	ttaattttac	ttaagccctt	aatattcaac	atgtcaacta
1640	aagtatactc	ctactccgac	tcacaagatg	tggccaattc	agttggaaaa	tatgttattg	aacaacaaaa	caaagccatt
1720	gaagccaacg	gttcttttaa	aattgctttg	tctgttggtt	cattaggttaa	gattttgaaa	caagcattga	tcgataataa
1800	ggagattggt	tccaaggcac	aatgggataa	gtgggaagtc	tacttcagtg	atgagagatt	agtccatttg	tatcatcctg
1880	attcaaatatt	tggattgttc	aacgaaatgg	ttttaaaaaa	tttgctcaa	gagaccacaa	acatgaaatt	gcattgctatt
1960	gatcaatcat	tgcttaccgg	aaaagacgga	aaattagacg	atttagtcga	ccaagcaaa	gatcaagaaa	ttgctaaaga
2040	atacgcta	at	gggttaccaa	aacaatttga	tttgattttg	cttgggtgtg	ggccagatgg	acacacttgc
2120	acaggtcata	attattggaa	gaaagagacg	aattgatttc	atatataagt	gattctccaa	aaccaccacc	aagaagaatt
2200	cattaccact	tccagtggtt	agaaaatgcc	aaagcaattg	catttgttgc	aactgggtct	ggaaaagctc	ctgttttgcg
2280	tgaatttttc	ctgggcaaaa	gcaagttacc	atgtgcttta	gtcaacgata	taaagactgg	ggatcatgata	

Fig.1.- Región del genoma de *C. albicans* que contiene el gen *GCN5*, en la que se ha incluido la secuencia de aminoácidos deducida a partir de la secuencia de nucleótidos. En la región promotora se han señalado las posibles cajas TATA (sombreadas en naranja), varias secuencias ricas en T y en A (subrayadas en azul); las secuencias CAAT y CAAG (sombreadas en verde y en morado respectivamente). Los codones CTG que en *Candida* codifican Serina en lugar de Leucina, se han subrayado en rojo. En la región 3' no codificante se han destacado dos posibles señales de poliadenilación (subrayadas en color magenta).

transcripcional que el resto ya que su expresión es más sensible a modificaciones en la estructura de la cromatina y son coregulados por el complejo activador SAGA. Se ha observado que la mayor parte de estos genes están implicados en la respuesta a diferentes tipos de estrés.

En la región promotora de *GCN5* solamente se ha localizado una posible caja TATA en posición -415 (sombreada en naranja en la figura 1) con respecto al codón de inicio pero difiere en un nucleótido del consenso descrito en *S. cerevisiae*.

En levaduras para que el mecanismo de transcripción sea efectivo se requiere la presencia de unos elementos conocidos como cajas CAAT. Se han localizado tres de estas secuencias en posiciones -9, -15 y -26 (sombreadas en verde)

Los motivos CAAG, característicos de genes altamente expresados en *S. cerevisiae* van precedidos por regiones ricas en C (citosina) y T (timina) a 9-12 pb de dichos elementos. Se han encontrado dos motivos de estas características en posiciones -30 y -532 respecto del codon de inicio (sombreadas en malva), sin embargo no se han localizado regiones especialmente ricas en C y T precediéndolos.

Los elementos descritos en este apartado se muestran en la figura 1, donde además se han subrayado en azul regiones ricas en T y A (timina y adenina, respectivamente). Diversos autores han descrito la implicación estructural de estas regiones poli(A) y poli(T) así como la repetición de motivos TGGA, TGA, CA o TG al impedir el posicionamiento de los nucleosomas en las zonas alrededor de los elementos activadores de la expresión génica (Anderson & Widom, 2001; Struhl, 1985).

Mediante el uso de programas informáticos disponibles en la red, se llevó a cabo la búsqueda de posibles sitios de unión de factores de transcripción en la región promotora hipotética de *GCN5*.

Con el programa *MatInspector* (<http://www.genomatix.de/products/index.html>) se analizaron 1000 pb aguas arriba del ATG inicial localizándose un sitio GATA y dos motivos NIT2, ambas secuencias son características de genes implicados en el control metabólico del nitrógeno; un sitio de unión al factor PHO relacionado con el metabolismo de fosfato; cuatro motivos MAT1MC y dos sitios MCM1 relacionados todos ellos con conjugación y respuesta a feromonas en *S. cerevisiae*; una secuencia de unión al factor Ste11p implicado en la ruta de transducción de proteínas quinasas (ruta MAPK) y que requiere la unión de MAT1MC; un sitio MCB1; dos sitios de unión al factor HSF que interviene en la respuesta a choque térmico y dos sitios de unión a *GCN4*.

Analizando la misma secuencia de 1000 pb en la base de datos YEASTRACT (<http://www.yeasttract.com>) se han detectado, posibles sitios de unión a los factores de transcripción Nrg1p y Tec1p relacionados con morfogénesis; sitios de unión para Fkh1p; para

Ash1p; seis sitios para Mot3p implicado en mantenimiento de telómeros y metabolismo de ergosterol; y una secuencia de unión para Swi5p, activador transcripcional de genes expresados al final de la fase M/G1 y en G1. Dado que se trata de un análisis *in silico* y teniendo en cuenta lo descrito para *S. cerevisiae*, serían necesarios trabajos experimentales para comprobar si estos sitios son funcionales en *C. albicans*.

GCN5 se encuentra en la cadena reversa (W, Watson) y a +2409 pb aguas abajo con respecto al codón de parada se localiza el orf19.704, de función desconocida. En posición -1618 respecto al ATG de inicio de *GCN5* se encuentra el ATG inicial del gen *NMD3* (orf19.706) que por homología con *ScNMD3* codifica un transportador nuclear de la subunidad mayor de los ribosomas, se localiza en la cadena directa (C) de modo que es posible que las secuencias promotoras de estos dos genes se encuentren solapadas (Ho & Johnson, 1999; Ho *et al.*, 2000).

2.2. Análisis de la región 3' no codificante del gen *GCN5*

En la región 3' no codificante de los genes se localizan secuencias relacionadas con la terminación de la transcripción y maduración del RNA. Los extremos 3' de los mRNA de levaduras, al igual que en mamíferos se forman por digestión y adición de una cola de adeninas (poli-A). En mamíferos, las señales de poliadenilación están muy bien definidas mientras que en levaduras las secuencias que dirigen este proceso son degeneradas y redundantes (Guo & Sherman, 1996).

Utilizando el programa *HCpolya* del servidor Webgene del *Institute for Biomedical Technologies IT – CNR*, Italia) (http://125.itba.mi.cnr.it/~webgene/wwwHC_polya.html), se analizaron los 300 nucleótidos siguientes al codón de parada de *GCN5* encontrándose 2 secuencias (subrayadas en color magenta en la figura 1) que se inician en las posiciones 12 y 287 respecto del codón de terminación y que podrían constituir señales de poliadenilación.

Se requieren estudios específicos de esta región en *GCN5* para confirmar que dichas secuencias son funcionales.

2.3. Estudio de la región codificante del gen *GCN5*

El entorno del codón de inicio en levaduras presenta una secuencia consenso característica para la mayoría de los genes. En *S. cerevisiae* dicha secuencia presenta el siguiente consenso: (A/Y)A(A/Y)AATGTCT, donde Y es una pirimidina (Cigan & Donahue, 1987).

En el 75% de los genes estudiados la base más conservada es la adenina en posición -3. El entorno del codón ATG de inicio encontrado en *GCN5* presenta la estructura

CGTAATGGT, similar a la secuencia consenso de *S. cerevisiae*, sin embargo, no conserva la adenina en la posición -3 (Dobson *et al.*, 1982).

Cabe destacar la ausencia de intrones en la fase de lectura abierta de *GCN5*.

En el código genético universal, el codón CUG se traduce por leucina, sin embargo, es traducido por serina en el caso de *Candida albicans* así como en otras especies del mismo género (Ohama *et al.*, 1993; Sugiyama *et al.*, 1995; Yokogawa *et al.*, 1992).

En el marco de lectura abierto de *GCN5* se han localizado dos codones CTG, en posiciones 834 y 993 respecto del codón ATG inicial.

El contenido en A+T de la ORF del gen *GCN5*, es del 63,26%, porcentaje superior al de C+G de acuerdo a lo descrito en la mayoría de genes de *C. albicans* (Odds, 1988). La composición nucleotídica del marco de lectura abierto de *GCN5* se encuentra en la tabla II.

Tabla II.- Composición nucleotídica de *GCN5*.

Base	Nº de bases	%
A	515	38,15
G	300	22,22
C	196	14,52
T	339	25,11
A+T	843	63,26
G+C	399	36,74

2.4. Análisis de la secuencia de aminoácidos de la proteína Gcn5p

El gen *GCN5* de *C. albicans* codifica un polipéptido de 449 aminoácidos (Gcn5p) (Figura1), con una masa molecular teórica de 52155 Da y un punto isoeléctrico teórico de 5,55. En la tabla III se recogen los valores obtenidos con el programa *ProtParam* (<http://www.expasy.ch/tools/protparam.html>) (Wilkins *et al.*, 1999).

Tabla III.- Propiedades fisicoquímicas de Gcn5p.

Análisis Gcn5p		Aminoácidos	Número	%
Masa molecular	52207,16 Da	Ácidos (D, E)	79	17,59
Tamaño	449aa	Básicos (K, R)	70	15,59
Punto isoeléctrico	5,55	Hidrofóbicos (A,I,L,F,W,V)	134	29,84
Carga a pH 7.0	-8,131	Polares (N,C,Q,S,T,Y)	112	24,94

Los aminoácidos más representados en la proteína son Glu (11,6%), Lys (10,5% y Leu (7,1%). En cuanto al número total de aminoácidos, la proteína de *C. albicans* parece ser significativamente más larga que la de *S. cerevisiae* y la de *D. hansenii*, siendo la diferencia de 60 y 44 aminoácidos respectivamente.

El estudio de homología de la secuencia de aminoácidos Gcn5p (cepa SC5314) con otras proteínas se realizó con el programa *FASTA* (<http://www.ebi.ac.uk/fasta33>). El porcentaje de aminoácidos idénticos entre la proteína de *C. albicans* y *S. cerevisiae* es de un 70%, y con la proteína de humanos es del 46%. Teniendo en cuenta los cambios conservativos entre los aminoácidos, el porcentaje de similitud de Gcn5p de *C. albicans* con la de *S. cerevisiae* es del 87% y con la de *H. sapiens* del 74%.

Además, Gcn5p presenta un elevado grado de identidad con la acetiltransferasa de histonas Gcn5p de otras especies fúngicas como *Debaryomyces hansenii* (Q6BGW1), *Yarrowia lipolytica* (Q8WZM0) y *Kluyveromyces lactis* (Q6CXW4) con porcentajes de identidad del 73%, 67% y 64% respectivamente.

Con el programa *ClustalW* (<http://www.ebi.ac.uk/clustalw>) se realizó un anillamiento de las secuencias homólogas a Gcn5p de levaduras y humanos, donde puede observarse el grado de similitud entre las secuencias, el resultado se muestra en la figura 2.

La búsqueda de dominios en la secuencia de Gcn5p se realizó en la base de datos PROSITE (<http://www.expasy.org/tools/scanprosite>), mediante la herramienta *ScanProsite*. El análisis mostró la presencia de los dos dominios funcionales en la proteína de *C. albicans*.

Tanto en la proteína de *S. cerevisiae* como en la de humanos se han identificado dos dominios característicos. Uno es el dominio GNAT, característico de acetiltransferasa de histonas y que es en el que reside la actividad catalítica de transferencia de un grupo acetilo desde el acetyl coenzima A donador al grupo amino primario del receptor.

El otro dominio es un Bromodominio, comprende aproximadamente 110 aminoácidos que forman un grupo o estructura de cuatro hélices que contiene un sitio de unión a péptidos en uno de los extremos. Interacciona específicamente con las histonas acetiladas del nucleosoma y podría estar participando en el ensamblaje o actividad de complejos multiproteicos implicados en activación transcripcional (Bulger, 2005; Dyda *et al.*, 2000).

CaGcn5p	-----	
ScGcn5p	-----	
HsGcn5p	MAEPSQAPTAPAAQPRPLQSPAPAPTPTPAPSPASAPIPTP TPAPAPAPAAAPAGSTGT	60
CaGcn5p	-----	
ScGcn5p	-----	
HsGcn5p	GGPGVSGGAGSGGDFARPGLSQQQRASQRKAQVRG LPRAKK LEKLGV FSACKANETCKC	120
CaGcn5p	-----MVDKRRTAA IRAEDDD-----	16
ScGcn5p	-----MVTKHQ-----IEEDHL-----	12
HsGcn5p	NGWKNPKPPTAPRMDLQQPAANLSELCSCEHPLADHVSHLENVSEDE INRLGGMVVDVE	180
	: . : * .	
CaGcn5p	-----EENDNVPLQKKVKIEAKQKEEEE	39
ScGcn5p	-----DGATT DPEVVRKVKLENN-----	29
HsGcn5p	NLFMSVHKEEDTDTKQVYFYLFKLLRKCILQMTRPVVEGSLGSPPFKFNIEQGVLFVQ	240
	: * : : *	
CaGcn5p	DGDKSGATETKSEVKQESK-----EETTQKENNEEDEE-----	72
ScGcn5p	-----VEEIQPEQAETNK-----QEGTDKENKGFKEK-----	56
HsGcn5p	YKFSHLAPRERQTMFELSKMFLLC LNYWKLETPAQFRQRSQAEDVATYKVNYYTRWLCYCH	300
	. . : : *	
CaGcn5p	-----EEEEED-DEEAEEEKKRITNFN----	93
ScGcn5p	-----ETERIGGS EVVTDVEKGIKFE----	78
HsGcn5p	VPQSCDSLPRYETHVFGRSLLRS IFTVTRQLLEKFRVEKDKLVPEKRTLILTHFPKFL	360
	* . : . : * ..	
CaGcn5p	-----	
ScGcn5p	-----	
HsGcn5p	SMLEEEIYGANSPIWESGFTMPSPSEGTQLVPRPASVSAAVVP STPI FSP SPMGGGSNSLS	420
CaGcn5p	-----FDGEIYTFKE-----	103
ScGcn5p	-----FDGVEYTFKE-----	88
HsGcn5p	LDSAGAEMPGEKRTL PENLTLEDAKRLRVMGDIPMELVNEVMLTITD PAAMLG PETSLL	480
	: * * : *	
CaGcn5p	-----RPSVIEEKEGKTEFRVNVNDNS---REN LIVLTGLKNI FQKQLPKMPREYIS	152
ScGcn5p	-----RPSVVEENEGKTEFRVNVNDNT---KENMMVLTGLKNI FQKQLPKMPKEYIA	137
HsGcn5p	SANAARDE TARLEERRGTELFHVI GNLSLTP KANRRVLLWLVLQNVFSSHLPMPKEYIA	540
	. . : : * * * : * : * : : : * : * * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : *	
CaGcn5p	RLVYDRSHLSMAVVRKPLTVVGGI TYRPFNNRGF AE IVFCAI SSTEQVRGYGAHLMNHLK	212
ScGcn5p	RLVYDRSHLSMAVIRKPLTVVGGI TYRPFNKREFAE IVFCAI SSTEQVRGYGAHLMNHLK	197
HsGcn5p	RLVFDPKHKTALAIKD-GRVIGGI CFRMFP TQGFTE IVFCAVTSNEQVKGYGTHLMNHLK	599
	* * : * . * : : * : : * : * * : * * : : * : * * * : * : * * : * : * * : * * * * : *	
CaGcn5p	DYVRATSPIKYFLTYADNYAIGYFKKQGFT KEISLDKSVWGMGYIKDYEGGTLMQCSMLP	272
ScGcn5p	DYVRNTSNIKYFLTYADNYAIGYFKKQGFT KEITLDKS IWMGYIKDYEGGTLMQCSMLP	256
HsGcn5p	EYHIKHN-ILYFLTYADEYAIGYFKKQGFSDIKVPKSRYLGYIKDYEGATLMCELNLP	657
	: * . *	
CaGcn5p	ILRYLDGSKILLLQKAAIERKI-RSRKSKIVRPGLOVFKTNKNVT-LDPKDIPLGLAEAG	330
ScGcn5p	RIRYLDAGKILLLQEAALRKKI-RTISKSH IVRPGLQVFKDLNNIKPI DPMTIPGLKEAG	315
HsGcn5p	RIPYTELSHI IKKQKEI IKKLIERKQAQIRKVYPGLSCFKEG--VRQI PVESVPGIRETG	715
	: * : . : * : * : : * * . * * : : * * * . * * : : * : * * : * * :	
CaGcn5p	WSEEMDKLAQPKR-GPHYNFMVTLFSEIQNHPSAW PFAVAVNKEEVP DY YRVI EHPIDL	389
ScGcn5p	WTPEMDALAQRPKR-GPHDAAIQN ILTEIQNHAAA WPFLQPVNKEEVP DY YDFI KEPMDL	374
HsGcn5p	WKPLGKEKGLKDPDQLYTTLKNLLAQIK SHPSAWPFMEPVKKSEAPDY YEVIRFPIDL	775
	* * . * : : : * : * * * . * : *	
CaGcn5p	ATIEQKLENNLYLKFTDFVDDLKLMFNNCRAYNSET TTY YKN ANKLEK FMNNKLKDCSFV	449
ScGcn5p	STMEIKLESNKYQKMEDFIYDARLVFNNCRMYNGEN TSYYKYANRLEKFFNNKVKEIPEY	434
HsGcn5p	KTMTERLRSRYVTRKLFVADLQRVIANCREYNPPDSEYCR CASALEKFFYFKLKEGGLI	835
	* : : * * . . * . * : * : : * * * * * : * : * . * * * : * * :	
CaGcn5p	-----	
ScGcn5p	SHLID 439	
HsGcn5p	DK--- 837	

Fig. 2.- Comparación con el programa *ClustalW* de las secuencias codificadas por el gen *GCN5* de *S. cerevisiae*, de *H. sapiens* y *C. albicans*. Con los símbolos (*), (:) y (.) se indican los aminoácidos idénticos, las sustituciones conservadas y semiconservadas respectivamente. El dominio GNAT (PS51186) característico de acetiltransferasa de histonas se encuentra encuadrado en azul y en verde se ha destacado el bromodominio (PS50014), ambos dominios son característicos de esta familia de proteínas.

La búsqueda de los motivos funcionales de Gcn5p de *C. albicans* y otras acetiltransferasas de histona puso de manifiesto que su estructura es muy similar a las proteínas ortólogas de *S. cerevisiae*, *D. hansenii* y *Arabidopsis thaliana*.

En metazoos, las proteínas homólogas a Gcn5p son similares pero difieren de Gcn5p de levadura porque poseen una extensión en el extremo N-terminal. Mientras que la mayoría de genomas de metazoos codifican un solo gen *GCN5*, en vertebrados aparece un segundo gen que codifica la proteína P-CAF (*p300/CREB-binding protein-associated factor*), que es idéntico a *GCN5* en un 73% (Nagy & Tora, 2007; Yang *et al.*, 1996).

Como se ve en la figura 3, la estructura de CaGcn5p es diferente con respecto a la proteína homóloga de humanos GCN5L2p (Q92830).

En humanos, además existen dos isoformas de GCN5L2p, la de mayor tamaño GCN5-L (Q92830-1) se considera la forma canónica, la de menor tamaño GCN5-Sp (Q92830-2) coincide con el extremo C-terminal de la forma canónica y carece del extremo N-terminal homólogo a la proteína P-CAF, siendo más similar a Gcn5p de levaduras (Nagy & Tora, 2007).

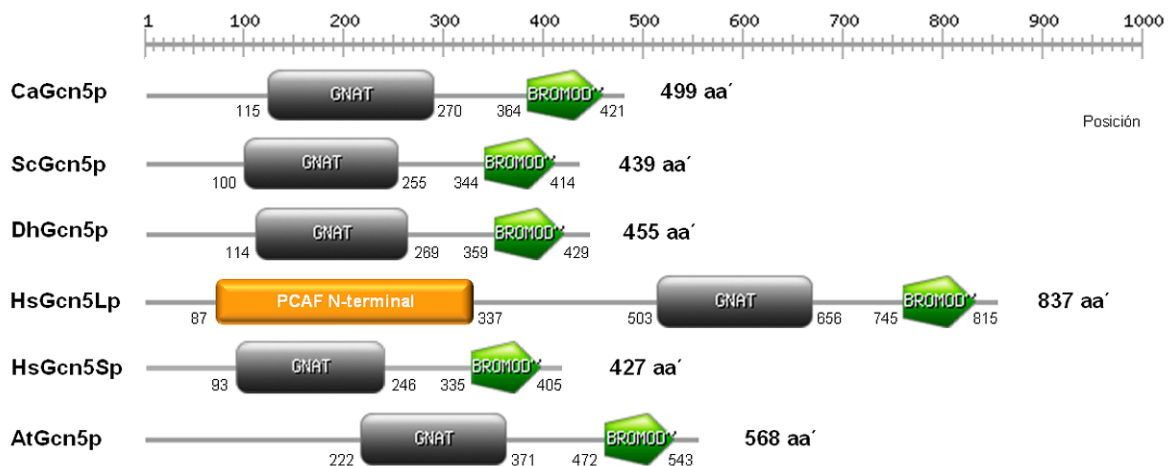


Fig. 3.- Comparación de la estructura de Gcn5p de *C. albicans* con la correspondiente a proteínas de secuencia similar en *S. cerevisiae* (ScGcn5p), *D. hansenii* (DhGcn5p), *H. sapiens* (HsGcn5Lp y HsGcn5Sp) y *A. thaliana* (AtGcn5p). La búsqueda de motivos funcionales se realizó con la herramienta ScanProsite.

3. ESTUDIO DE LA EXPRESIÓN DEL GEN *GCN5* DE *Candida albicans*

Con el objetivo de identificar el transcrito de *GCN5* para determinar si la expresión del gen es regulada durante la transición dimórfica, se realizó un análisis de tipo *Northern*. Se aisló RNA de células recogidas a diferentes tiempos de inducción de micelio en medio Lee a 37°C (apartado 6.3. de Materiales y Métodos). Para diferenciar variaciones de expresión del gen no debidas a la transición dimórfica, se aisló como control RNA de células recogidas a los mismos tiempos pero creciendo como levaduras en medio Lee a 28°C.

A partir del *Northern* se estimó que el gen *GCN5* da lugar a un único transcrito de un tamaño aproximado de 1,6 Kb, que se ajusta al tamaño de la ORF del gen (1350 pb). Como se observa en la figura 4, el nivel de expresión del gen no varía significativamente durante la transición dimórfica ni durante el crecimiento como levaduras a 28°C por lo que la expresión de *GCN5* no parece estar regulada durante la transición dimórfica en medio Lee a 37°C.

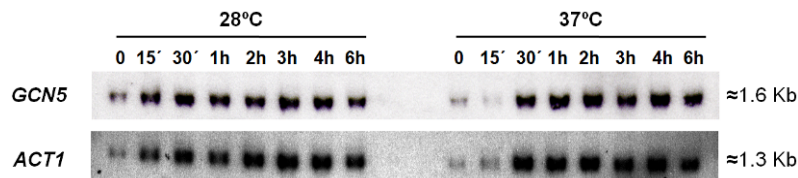


Fig. 4.- Expresión del gen *GCN5* en medio Lee durante la transición levadura-hifa a 37°C y durante el crecimiento en forma de levadura a 28°C. Como sonda se usó un fragmento de aproximadamente 700 pb de la ORF del gen. Como control de carga se utilizó la expresión del gen de la actina (*ACT1*).

Sin embargo dado que factores como Tup1p (Zhao *et al.*, 2002), necesario para la regulación transcripcional durante diversos procesos morfogénicos o Sin3p (Monterola, F., 2002, tesis doctoral), no son regulados durante la transición dimórfica a nivel transcripcional, se continuó analizando el papel de Gcn5p en dicho proceso.

4. CONSTRUCCIÓN DEL CASSETTE DE INTERRUPCIÓN DEL GEN *GCN5*

La construcción del *cassette* se realizó en dos pasos. Mediante PCR, usando los oligonucleótidos RD54 y RD55 (con sitios de restricción *Pst* I y *Xho* I respectivamente), se obtuvo un amplicón de 475 pb correspondiente a la región 3' del gen (posiciones -24 y +451 pb respecto al codón de parada). Este fragmento se subclonó en pGEM-T para dar lugar al plásmido pGT1, que fue cortado con *Pst* I y *Xho* I y el fragmento de 475 pb purificado se subclonó en pURA cortado con las mismas enzimas de restricción. La construcción resultante se denominó pCGR2.

Con los oligonucleótidos RD52 y RD53 que contienen los sitios *Sac* I y *Not* I respectivamente, se obtuvo por PCR un fragmento de 488 pb correspondiente a la región 5' del gen (posiciones -448 a +40 pb respecto al codón de inicio). Este fragmento se subclonó en pGEM-T para dar lugar al plásmido pGP1. Dicho plásmido se cortó con *Sac* I y *Not* I y el fragmento de 488pb purificado se subclonó en pCGR2 dando lugar al plásmido final, pCGR3. La secuencia de los oligonucleótidos empleados se recoge en la tabla IV del apartado 6.9.1. de Materiales y Métodos.

En la figura 5 se muestra el esquema con los diferentes pasos en la construcción del *cassette*.

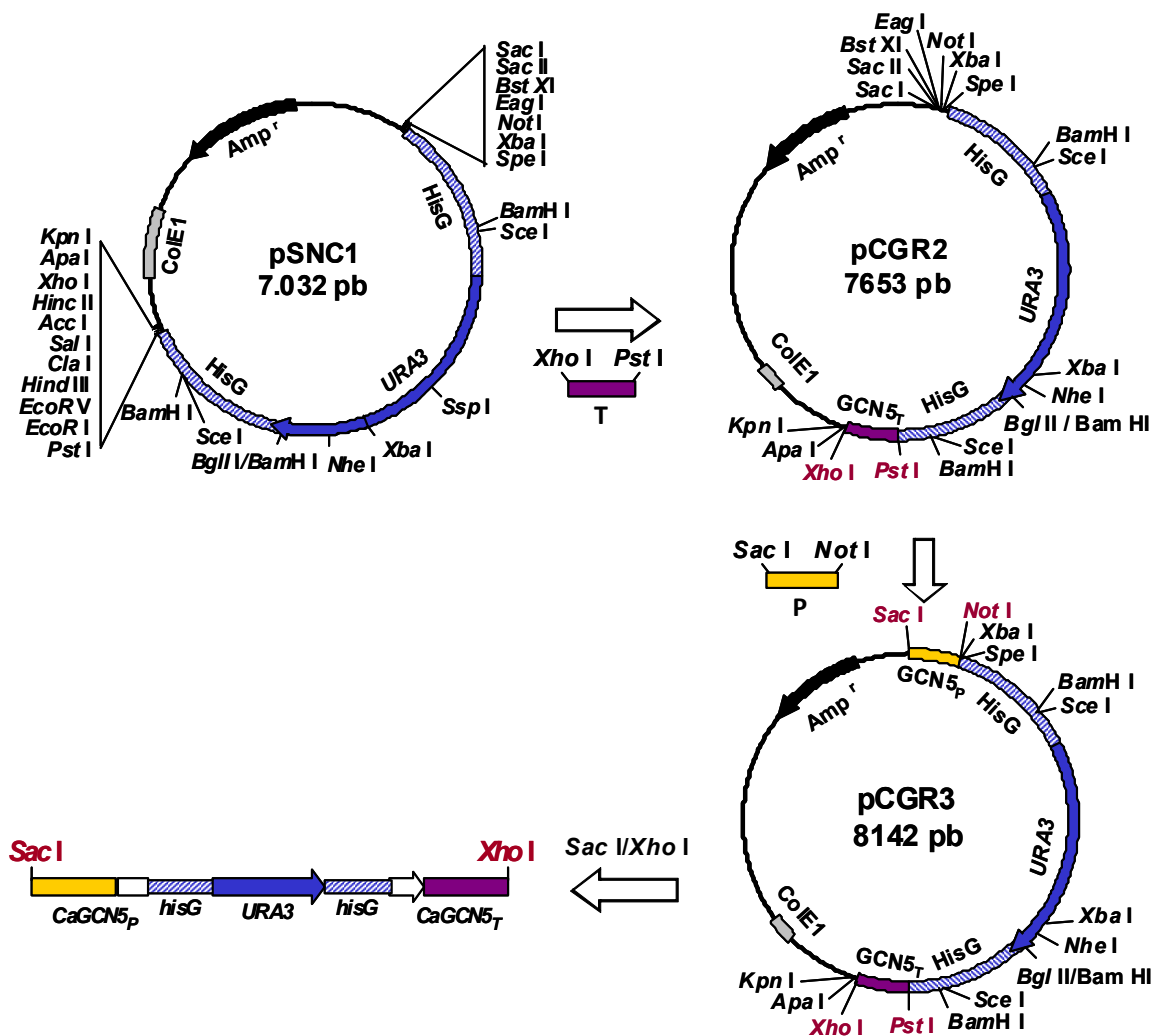


Fig. 5.- Esquema de la construcción del plásmido pCGR3 que contiene el *cassette* de interrupción *HisG-URA3-HisG* flanqueado por las regiones promotora (P) y terminadora (T) de *GCN5*. En el primer paso, se clonó el fragmento terminador en el plásmido pSNC1, obteniendo así el plásmido pCGR2, posteriormente se subclonó el fragmento promotor obteniendo el plásmido pCGR3 linealizado con las enzimas *Sac I* y *Xho I* previamente a la transformación de protoplastos.

5. OBTENCIÓN DEL MUTANTE HOMOCIGÓTICO EN EL GEN *GCN5*

Tras obtener el plásmido pCGR3 se procedió con la transformación de la cepa CAI4 de *C. albicans* mediante el método de formación de protoplastos descrito en el apartado 5.2. de Materiales y Métodos. Se emplearon 5, 10, 15 y 20 μ g de DNA del plásmido pCGR3 digerido con *Sac I* y *Xho I*, enzimas que liberan el *cassette* (Fig.5). La selección de las células que habían incorporado el *cassette* se llevó a cabo en medio mínimo suplementado con sorbitol 1M (apartado 2.2.1. de Materiales y Métodos). La correcta integración del DNA

lineal en el *locus* del gen *GCN5* se verificó en cada paso mediante PCR. Para ello se obtuvo el DNA genómico de los transformantes y de la cepa parental.

Se obtuvieron 91 transformantes Ura⁺, 49 de ellos al emplear 15 µg de DNA plasmídico. De 30 mutantes analizados por PCR, los clones 20 y 24 que fueron positivos, se nombraron RDG1-20 y RDG1-24. En la cepa RDG1-24 (*GCN5/gcn5::CaURA3*) se indujo la recombinación espontánea de las secuencias *hisG* homólogas con el objetivo de recuperar la auxotrofia para el uracilo. Para ello, la cepa RDG1-24 (Ura⁺) se inoculó en medio líquido YEPD suplementado con uridina incubándose durante 48h a 28°C.

Los clones revertientes se seleccionaron en medio mínimo suplementado con uridina y 5-FOA. A los 6 días de incubación ya se pudieron aislar colonias. De 30 colonias aisladas, 4 resultaron ser positivas en el análisis por PCR y se denominaron RDG2 (clones 13, 14, 18 y 21). Aleatoriamente, se eligió el clon RDG2-21 (*GCN5/gcn5*) para interrumpir la segunda copia del gen *GCN5*, iniciando de nuevo el proceso de transformación con el plásmido pCGR3 digerido.

Se obtuvieron 119 transformantes, 51 al utilizar 20 µg de DNA plasmídico. Se analizaron 75 mutantes por PCR, los clones 8, 19, y 74 resultaron ser positivos y se denominaron RDG3-8, RDG3-19 y RDG3-74. Para provocar la pérdida del gen *URA3* se usaron células de RDG3-8 (*gcn5/gcn5::CaURA3*), los revertientes Ura⁻ se seleccionaron en placas de medio mínimo suplementadas con uridina y 5-FOA.

A los 14 días se podían observar colonias aisladas en las placas, se aislaron 20 transformantes Ura⁻ para analizarlos por PCR y 4 de ellos resultaron positivos. Estos clones (1, 2, 6 y 10) se denominaron RDG4 (*gcn5/gcn5*) seguido del número del clon analizado.

El genotipo de todos los transformantes fue comprobado mediante hibridación DNA-DNA (*Southern Blot*) (datos no mostrados).

Se eligió un clon positivo de cada paso de transformación. El DNA genómico obtenido de las cepas CAI4, RDG1-24, RDG2-21, RDG3-8 y RDG4-6, fue digerido con *Mun* I y se utilizó como sonda el amplicón de la región 3' obtenido con los oligonucleótidos RD54 y RD55 marcado con [α -³²P]dCTP (apartado 6.10.1., Materiales y Métodos). En la figura 6 se muestra un esquema del genotipo esperado de los mutantes y la imagen del *Southern blot*.

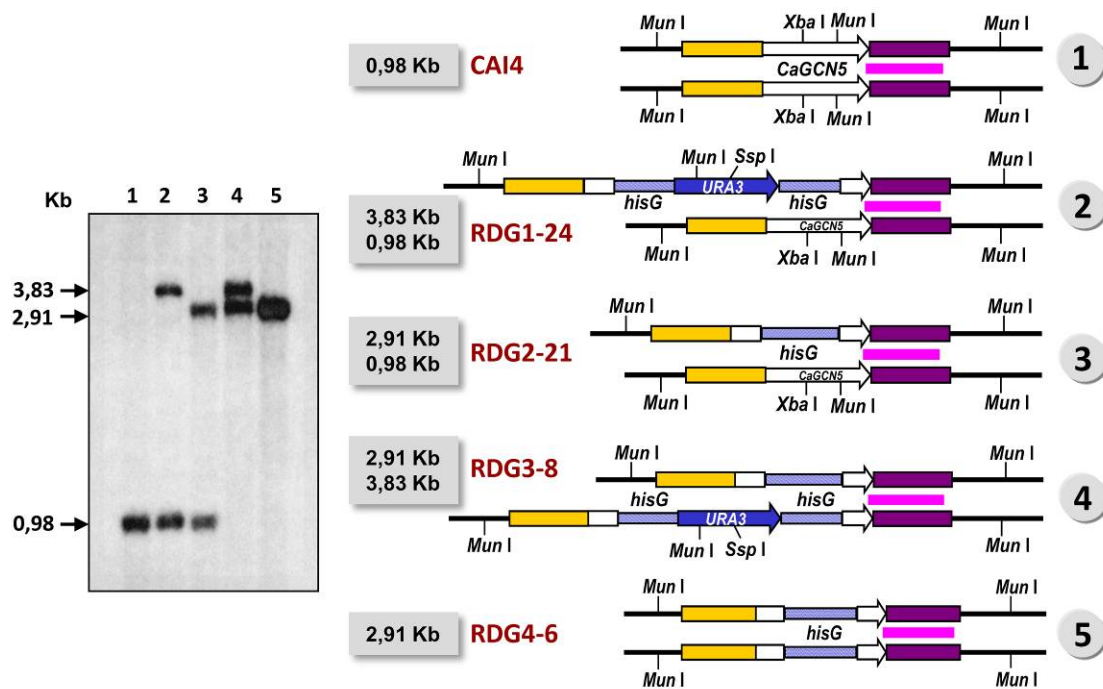


Fig. 6.- Esquema del genotipo en el locus *GCN5* en el tipo silvestre (calle1) y el genotipo esperado en los transformantes (calles 2, 3, 4 y 5) y su comprobación mediante hibridación DNA-DNA (*Southern Blot*). El DNA genómico fue digerido con la enzima de restricción *Mun* I. Se utilizó como sonda el fragmento de 475pb correspondiente a la región terminadora del gen *GCN5* amplificado con los oligonucleótidos RD54 y RD55. En las calles 1, 2 y 3 se observa una banda de 0,987 Kb correspondiente al locus silvestre del gen *GCN5*, en las calles 2 y 4 la banda de 3,83 Kb corresponde al mismo locus interrumpido por el cassette *hisG-URA3-hisG* y la banda de 2,91 Kb que se observa en las calles 3, 4 y 5 al mismo locus interrumpido únicamente por *hisG*. Las flechas señalan las bandas obtenidas y su correspondiente tamaño en Kb. RDG1-24 (*GCN5/gcn5::CaURA3*); RDG2-21 (*GCN5/gcn5*); RDG3-8 (*gcn5/gcn5::CaURA3*); RDG4-6 (*gcn5/gcn5*).

6. COMPLEMENTACION DE LA DELECIÓN DEL GEN *GCN5*

Para comprobar que el fenotipo que observamos en los mutantes en el gen *GCN5* se debía a la mutación de dicho gen y no a otros posibles eventos ocurridos durante las etapas de transformación, procedimos a realizar la clonación de la ORF del gen en el plásmido autorreplicativo pYPB-ADH. Este plásmido contiene las secuencias promotora y terminadora del gen *ADH1* (alcohol deshidrogenasa 1) de *C. albicans* (Bertram *et al.*, 1996), con un sitio de clonación múltiple entre ambas y se describe más detalladamente en el apartado 3.2. de Materiales y Métodos.

La región codificante del gen *GCN5* se amplificó por PCR utilizando los oligonucleótidos: RD66 y RD67 con los sitios de restricción *Xho* I y *Mlu* I respectivamente. En la reacción se utilizó DNA genómico de la cepa CAI4 de *C. albicans* y se usó la enzima Taq polimerasa *Expand High Fidelity* de Roche, por su bajo índice de errores y por ser más adecuada para la síntesis de fragmentos de hasta 3 kb. El fragmento resultante de 1362 pb se

clonó en pGEM-T obteniendo el vector pGCN5-4. Este plásmido se cortó con *Xho* I y *Mlu* I, se purificó la región codificante *GCN5* y se subclonó en pYPB-ADH digerido con las mismas enzimas, obteniendo así el plásmido pADG3 de 13,45 Kb (Figura 7).

Se diseñó el oligonucleótido ADH1 en la región promotora del gen *ADH1*, concretamente en la posición -100 pb respecto del codón de inicio con el fin de comprobar mediante secuenciación automática que la secuencia codificante de *GCN5* se encontraba correctamente integrada en el vector.

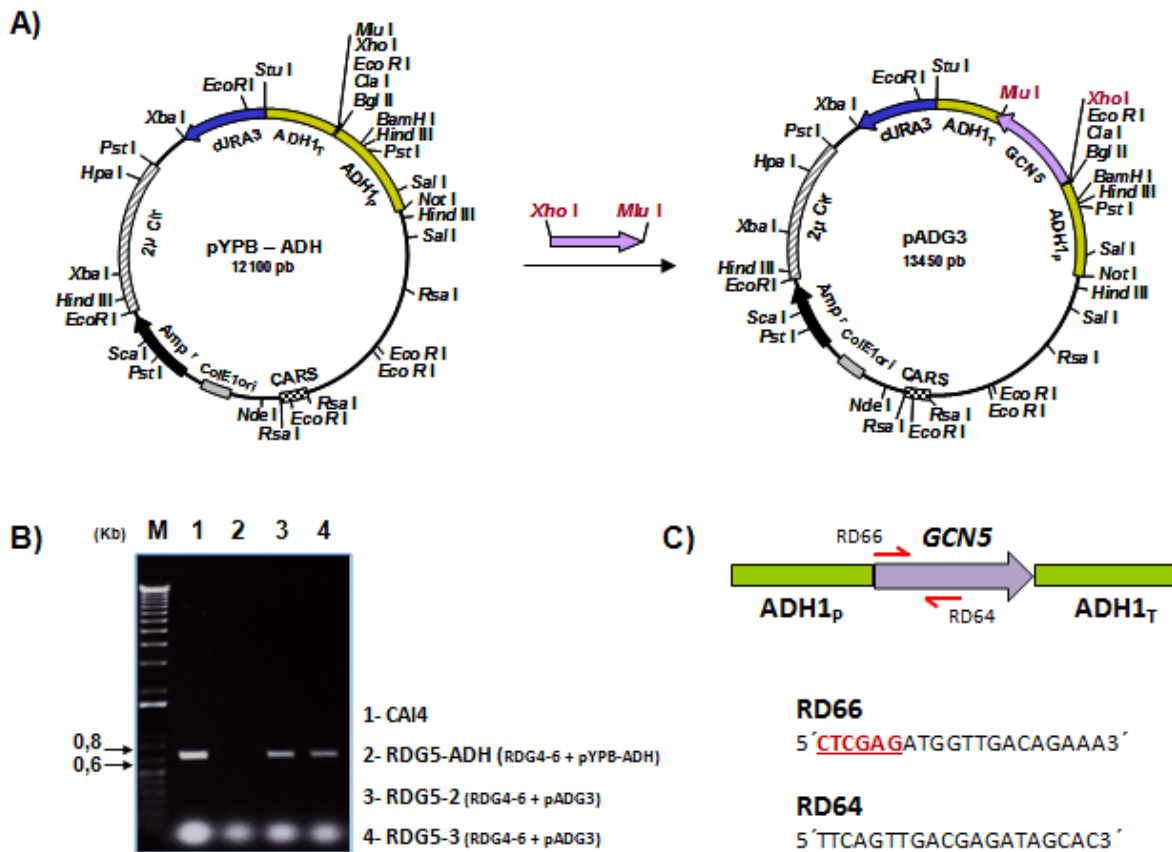


Fig. 7.- Esquema de construcción del plásmido pADG3 y mapa de restricción, A). El plásmido contiene la ORF de *GCN5* bajo la expresión del promotor del gen *ADH1* de *C. albicans*. **B).** Comprobación por PCR de la presencia de la ORF de *GCN5* en tres de los transformantes obtenidos (carriles 3, 4 y 5); como controles se incluyeron los productos de PCR obtenidos a partir de DNA de la cepa parental CAI4 (*GCN5/GCN5*) y RDG4-6 (*gcn5/gcn5*). M: marcador de peso molecular. **C).** Esquema de la zona de clonación de la ORF de *GCN5* del vector pADG3 mostrando los sitios de anillamiento de los oligonucleótidos RD66 y RD64 y su secuencia. En el oligonucleótido RD66 se ha señalado en color rojo el sitio de restricción de la enzima *Xho* I. El tamaño del producto de PCR esperado es de aproximadamente 700pb.

Comprobado esto, se realizó la transformación de protoplastos de la cepa RDG4-6 (*gcn5/gcn5*) con 10 y 15 μ g del plásmido pADG3 sin digerir. Los transformantes positivos (Ura⁺) se seleccionaron por su capacidad para crecer en medio mínimo sin uridina ya que el plásmido contiene el gen *URA3* de *C. albicans*.

Con el plásmido pADG3 se obtuvieron 34 transformantes y mediante PCR con los oligonucleótidos RD66/RD64 se amplificó un fragmento de la ORF de *GCN5* de aproximadamente 700 pb. Dos de los mutantes resultaron positivos y se denominaron RDG5-2 y RDG5-3 (figura 8).

Como control negativo, al mismo tiempo se transformaron protoplastos de RDG4-6 (*gcn5/gcn5*) con el plásmido vacío pYPB-ADH (que carece de la secuencia *GCN5*). Se obtuvieron dos clones Ura⁺ y se eligió uno de ellos al que se denominó RDG5-ADH (figura 8).

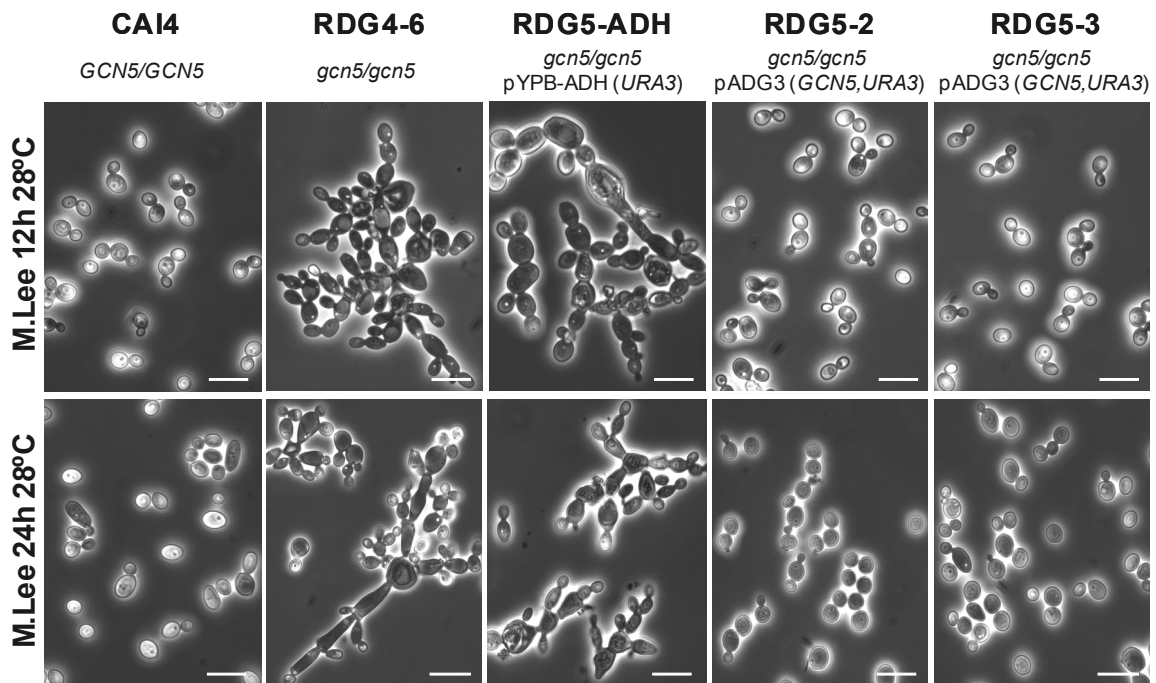


Fig. 8.- Complementación de la delección de *GCN5*. Morfología de los mutantes en medio líquido Lee, pH6, 8. Como puede apreciarse en las fotografías correspondientes a los transformantes RDG5-2 y RDG5-3, la expresión ectópica de *GCN5* suprime el fenotipo pseudofilamentoso observado en el mutante RDG4-6. La barra equivale a 10µm.

7. LOCALIZACION DE LA PROTEÍNA Gcn5p FUSIONADA A LA PROTEÍNA GFP

La localización celular de la proteína codificada por el gen *GCN5* se llevó a cabo experimentalmente fusionando dicha proteína con la proteína verde fluorescente (GFP) de la medusa *Aequorea victoria*.

La fusión se llevó a cabo utilizando el vector pAG1 descrito en el apartado 3.2 de Materiales y Métodos (Gonzalez-Novo *et al.*, 2004). La construcción se realizó según el esquema mostrado en la figura 9. El marco de lectura abierto de *GCN5* se amplificó desde el codón de inicio hasta el codón previo al de terminación utilizando una enzima *Taq* polimerasa de alta fidelidad para garantizar una copia fiel del gen. El producto de PCR fue purificado y ligado en el vector de clonación pGEM-T dando lugar al plásmido pGGC1 (no se muestra en

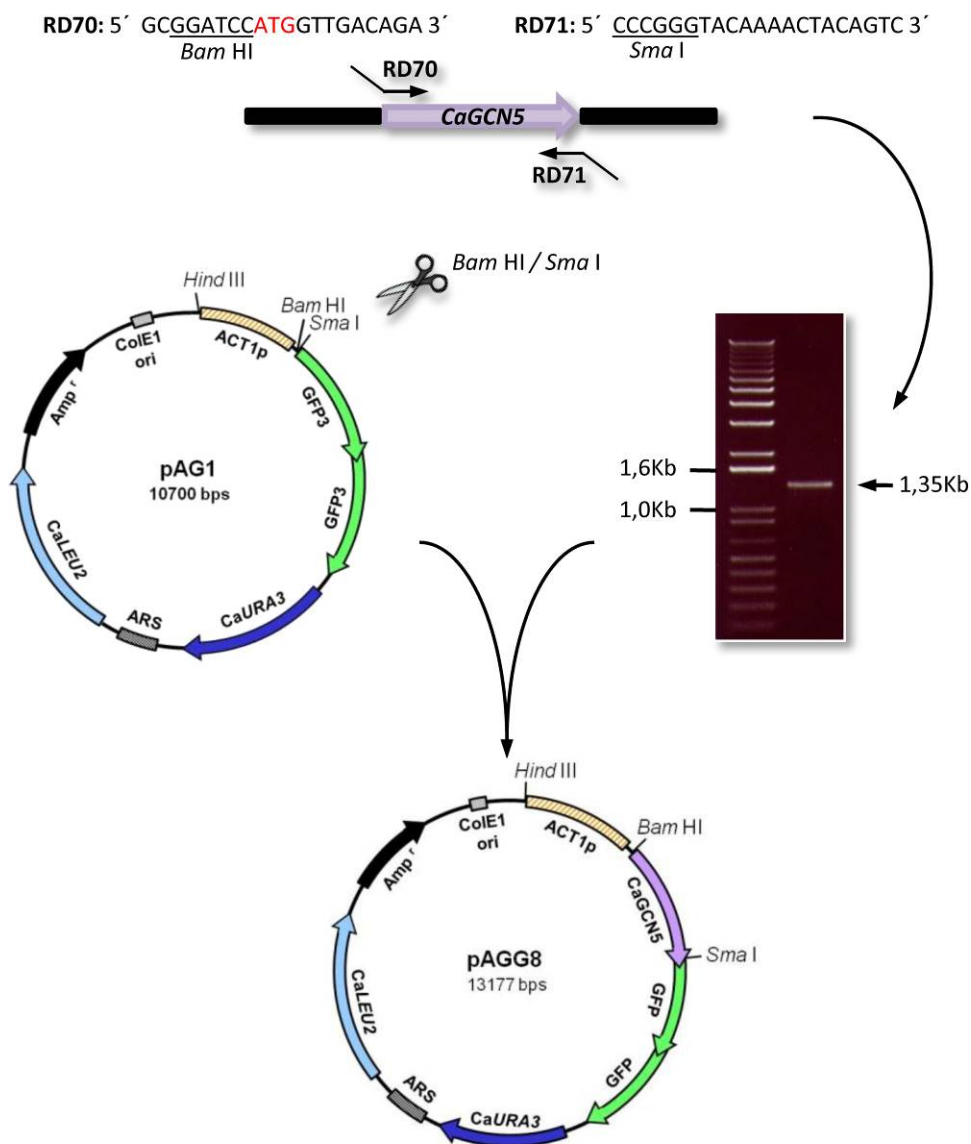


Fig. 9.- Esquema de construcción del plásmido pAGG8 y mapa de restricción. Contiene la ORF del gen *GCN5* clonada en fase con la secuencia codificante de la proteína verde fluorescente (*GFP3*). La secuencia de los oligonucleótidos empleados en la amplificación por PCR se muestra en la figura.

el esquema). En pGGC1 se secuenció la región correspondiente al gen *GCN5* para comprobar la ausencia de errores en la secuencia.

Este vector fue digerido con las enzimas *Bam* HI y *Sma* I y se ligó al vector pAG1 cortado con las mismas enzimas. De los transformantes obtenidos se seleccionó aquel en que el gen *GCN5* quedó insertado en fase con el gen *GFP3*. El plásmido resultante, pAGG8, contiene las secuencias *GCN5-GFP3* como una única fase de lectura abierta. En este vector de expresión, Gcn5p queda fusionada por su extremo carboxilo terminal, opción preferible a la fusión por el extremo amino ya que es en esta región en la que se suelen encontrar las señales de localización celular y su alteración podría dar lugar a una deslocalización de la proteína resultante.

Con el plásmido pAGG8 se transformaron células Ura- de las cepas CAI4 (*GCN5/GCN5*) y RDG4-6 (*gcn5/gcn5*) obtenida en este trabajo.

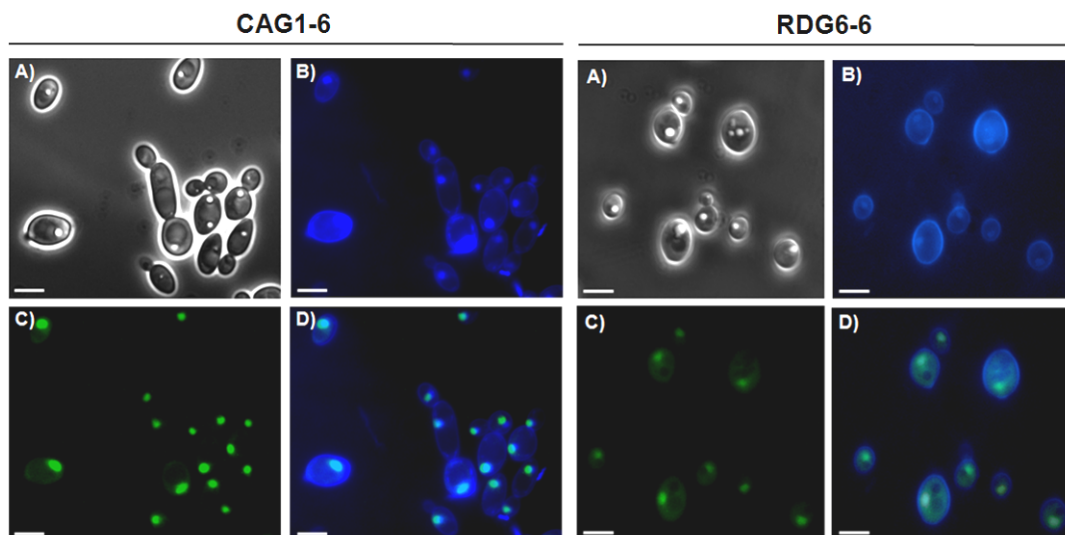


Fig. 10.- Localización de la proteína Gcn5p fusionada a Gfp3p en las cepas CAG1-6 y RDG6-6 (cepas CAI4 y RDG4-6 respectivamente, transformadas con el plásmido pAGG8 que contiene la fusión *GCN5-GFP3*). **A)** Contraste de fases; **B)** Tinción de pared celular y núcleos con calcofluor white y DAPI respectivamente; **C)** Fluorescencia emitida por la proteína Gfp3p; **D)** Mezcla de las microfotografías B y C donde puede verse que la fluorescencia emitida por la proteína Gfp3p se localiza en el núcleo. La barra equivale a 5µm.

Se eligieron tres clones de cada transformación y se dejaron crecer durante 12 horas en YNB a 28°C con agitación. Transcurrido este tiempo se diluyeron los cultivos 1/5 en YNB y se incubaron de nuevo durante 5h a 28°C. Las células se observaron en un microscopio óptico Leica con fuente UV Leica ebq100, utilizando los filtros adecuados para la visualización de la fluorescencia de Gfp3p y de los fluorocromos DAPI y *calcofluor white* cuando fue necesario.

En los tres clones analizados resultantes de la transformación de CAI4 (cepas CAG1-4, CAG1-5 y CAG1-6) y en dos de los clones analizados procedentes de la cepa RDG4-6 (cepas RDG6-6 y RDG6-20) se observó cómo la fluorescencia se localizaba en un punto

discreto dentro de cada célula. La tinción con DAPI, fluorocromo que se une al DNA, permitió discriminar que se trataba del núcleo celular (Figura 10).

Este resultado coincide con lo observado para la localización de la proteína Gcn5p de *S. cerevisiae* según la base de datos *Yeast GFP Fusion Localization Database* (<http://yeastgfp.ucsf.edu/>) donde se recogen los estudios de localización de esta levadura.

En otros organismos como *Toxoplasma gondii*, también ha sido localizada experimentalmente esta proteína en el núcleo (Bhatti & Sullivan, 2005).

8. ANÁLISIS FENOTÍPICO DE LOS MUTANTES OBTENIDOS

8.1. Efecto de la delección de *GCN5* en el crecimiento y la morfología celular a 28°C

Se analizó el efecto de la delección del gen *GCN5* en la morfología celular y en la cinética de crecimiento en medio líquido.

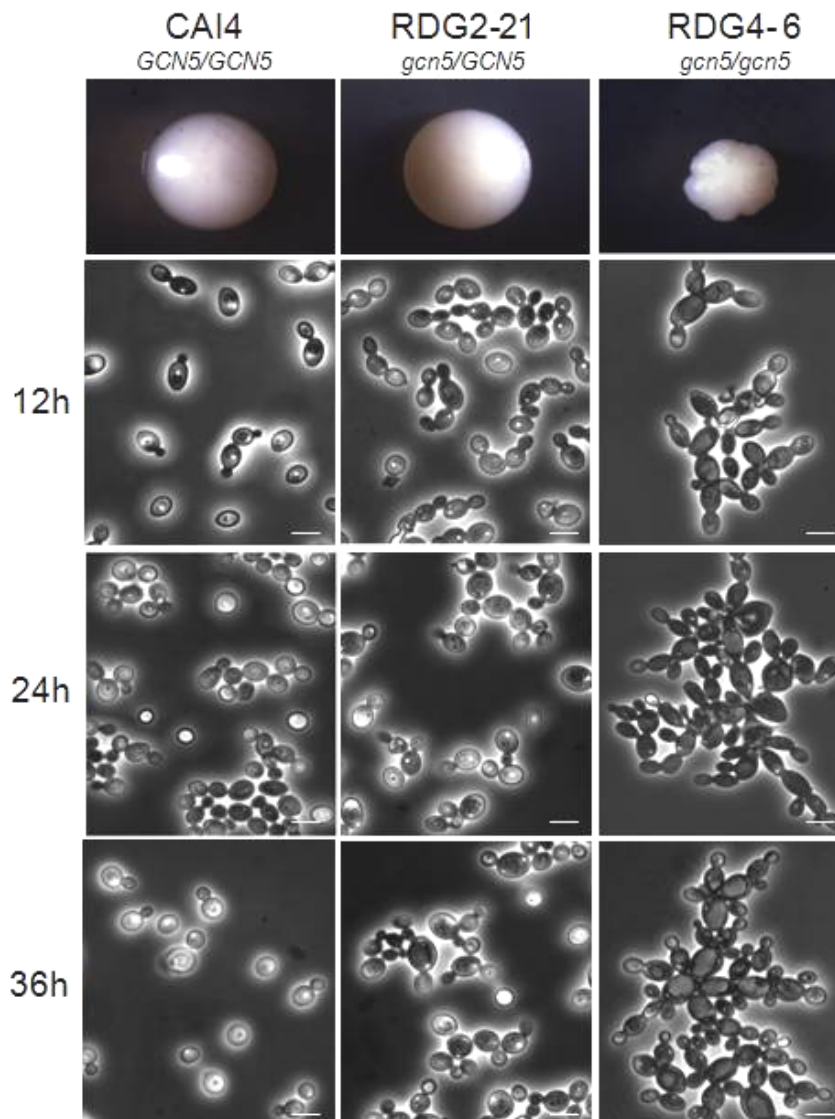


Fig. 11.- Morfología celular. A) Aspecto de las colonias formadas por los mutantes *gcn5* y la cepa parental CAI4 tras cuatro días de crecimiento a 28°C en YEPD sólido. B) Morfología celular de los mutantes *gcn5* y de la cepa parental CAI4 tras inocular 1 colonia de cada cepa. Las fotografías se tomaron tras 12, 24 y 36 horas de crecimiento en medio líquido Lee, pH 6.8 a 28°C. La barra equivale a 5 μ m.

Tras 12h de crecimiento a 28°C en medio rico (YEPD) y en medio mínimo (Lee) se observan ramificaciones o rosetas de células que se mantienen unidas, tal como puede apreciarse en la figura 11.

Resulta interesante observar que las células centrales, tienden a crecer desmesuradamente, y además, cuando se tiñe una preparación de las mismas con azul de metileno, estas células aparecen teñidas intensamente lo cual es indicativo de muerte celular (figura 12).

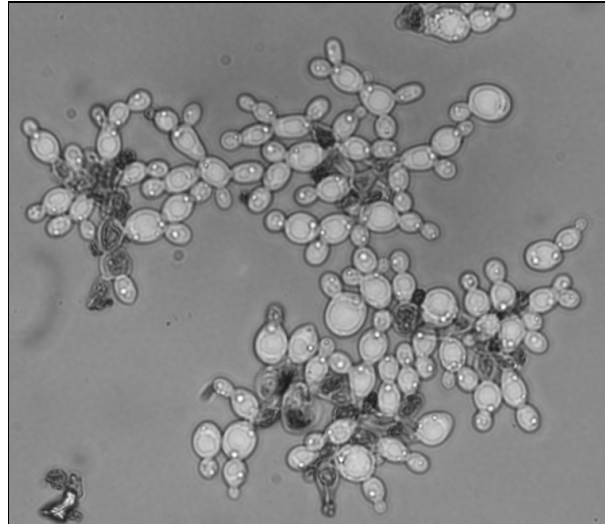


Fig. 12.- Tinción con azul de metileno de células de la cepa RDG4-6 delecionada en el gen GCN5. Las fotografías fueron tomadas con un microscopio de contraste de fases con cámara digital en blanco y negro.

Cuando una muestra de cultivo líquido se somete a pulsos suaves de sonicación, los grumos o rosetas, se separan indicando que posiblemente este mutante tenga problemas en la formación del septo o en la estructura de la pared celular.

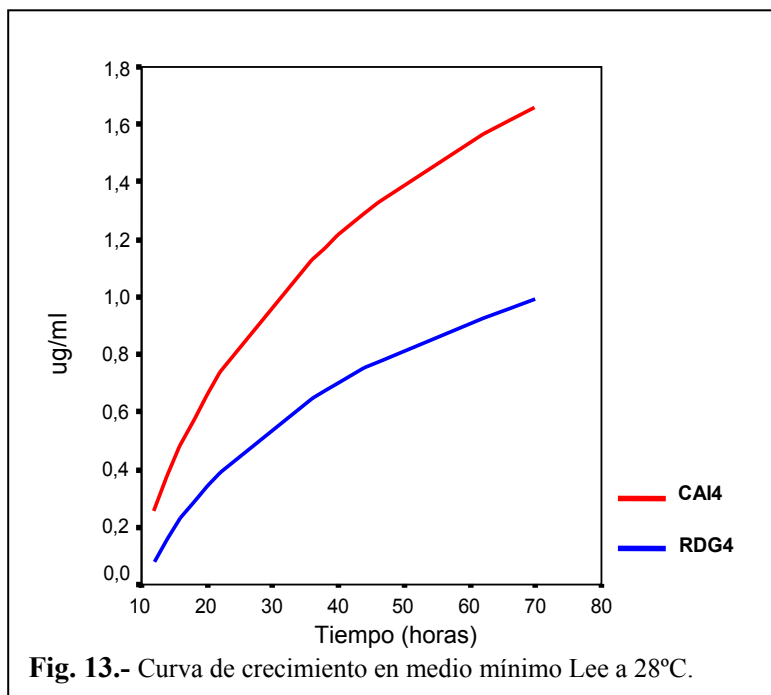


Fig. 13.- Curva de crecimiento en medio mínimo Lee a 28°C.

La curva de crecimiento se realizó en función del peso seco y no según la variación de la $D.O_{600nm}$ a lo largo del tiempo.

Las muestras (1ml por triplicado), se recogieron usando filtros de fibra de vidrio (2,5cm Ø) previamente pesados. Se realizaron tres lavados con agua sobre el filtro y se secaron a 37°C hasta peso constante.

Como se observa en la figura 13, el crecimiento de la cepa

delecionada en el gen *GCN5* es considerablemente menor con respecto a la cepa control CAI4. La mutación de este gen en *S. cerevisiae* provoca un efecto similar en la cinética de crecimiento dando lugar a tiempos de generación más largos, una fase G2 más prolongada y un crecimiento defectuoso dependiendo de la temperatura de incubación (Vernarecci *et al.*, 2008).

8.2. Efecto de la delección del gen *GCN5* en filamentación

8.2.1. Análisis de la capacidad de filamentación en medio sólido

Una aproximación generalmente utilizada para estudiar la transición morfológica en *C. albicans* es observar la morfología colonial en medio sólido.

Siguiendo los protocolos descritos en el apartado 2.2.2. de Materiales y Métodos. se inocularon células de las diferentes cepas a razón de 50 y 100 u.f.c. en placas de medios inductores: *Spider*, YEPD con suero al 4%, Lee con NAcGlc al 1,25% y SLADH. Tras siete días de incubación a 37°C se observó que las colonias de las cepas silvestres se extendían formando filamentos y mostraban el aspecto rugoso característico de cada medio inductor, mientras que las formadas por la cepa RDG4-6 (*gcn5/gcn5*) mostraban un claro defecto en la formación de hifas así como también en el grado de crecimiento. Las colonias presentaban un aspecto irregular y su tamaño era menor como puede apreciarse en la figura 14. Para ver si el defecto era solamente debido a un retraso en el grado de crecimiento de las cepas, las placas se sometieron a periodos de incubación inusualmente prolongados en este tipo de ensayos (25 días), observándose la ausencia de filamentos en los mutantes *gcn5* (datos no mostrados).

Las cepas heterocigotas *GCN5/gcn5* mostraban un fenotipo intermedio predominando la ausencia de hifas como se aprecia en la figura 14, por lo que podría existir un efecto de dosis génica.

Resulta interesante el comportamiento de la cepa heterocigota RDG2-21 (*GCN5/gcn5*) en medio Lee suplementado con NAcGlc al 1,25%, mientras que en los demás medios inductores, la funcionalidad de un solo alelo de *GCN5* no es suficiente para que se dé una filamentación completa, en presencia de NAcGlc se observa claramente un grado de filamentación equivalente al de las cepas silvestres

Cuando células de *C. albicans* crecen embebidas dentro de una matriz de agar, se produce una rápida inducción de la miceliación incluso cuando la temperatura de incubación es de 28°C (Brown & Gow, 1999). El factor que probablemente induce este proceso es la limitación de oxígeno, condición que junto con la presencia de una matriz circundante juega un papel muy importante durante la infección de los tejidos del hospedador ya que le proporciona capacidad invasiva (Ernst, 2000b).

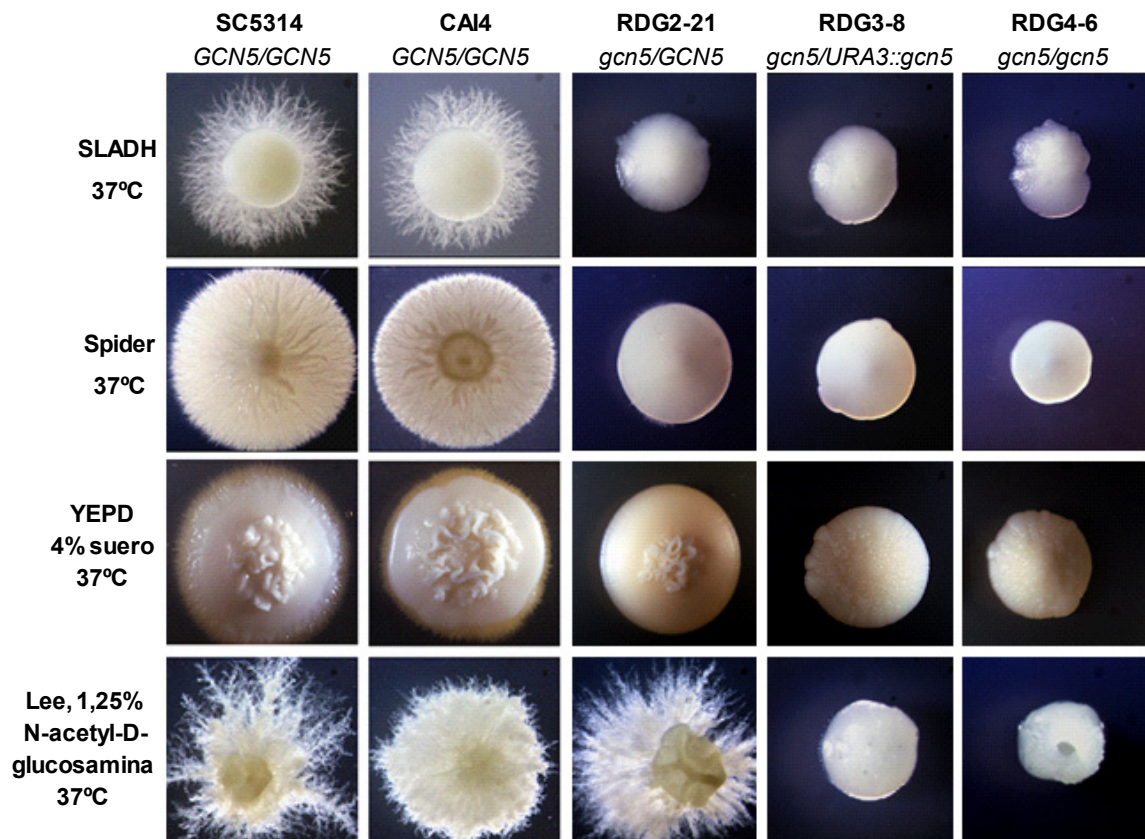


Fig. 14.- Inducción de la miceliación en medios sólidos. Morfología de las colonias de las cepas silvestres (CAI4 y SC5314), heterocigota (RDG2-21) y homocigotas para la delección del gen *GCN5* (RDG3-8 y RDG4-6) creciendo a 37 °C sobre medios sólidos inductores de la formación de micelio. Las fotografías se tomaron después de 4 días (*Spider* y Lee + suero 4%) ó 7 días de incubación (Lee-NAcGlc 1.25% y SLADH).

En la figura 15 se puede observar como la delección del gen *GCN5* causa defectos de filamentación cuando las células crecen embebidas dentro del agar. De nuevo, se aprecia cómo el mutante heterocigoto muestra un fenotipo intermedio entre las cepas silvestres y los mutantes homocigotos para la delección del gen.

El análisis fenotípico en estos medios sólidos nos permite determinar el efecto de diferentes factores inductores como son la limitación de nutrientes (medio *Spider*), la presencia de inductores fuertes (suero y NAcGlc), reducción de fuentes de nitrógeno (medio SLADH) o presencia de una matriz circundante (medio *embedded*) (Ernst, 2000b; Gimeno *et al.*, 1992; Liu *et al.*, 1994).

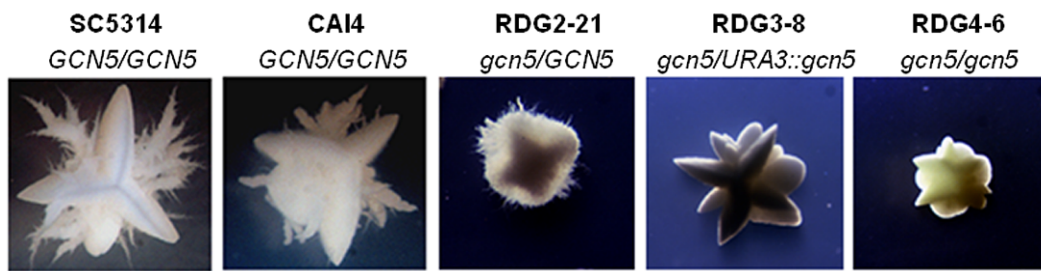


Fig. 15.- Aspecto de las colonias formadas por las cepas SC5314, CAI4, RDG2-21, RDG3-8 y RDG4-6 cuando crecen embebidas dentro de una matriz de agar.

Estos resultados indican que la delección del gen *GCN5* afecta significativamente a la morfología de las colonias de *C. albicans* y lo más interesante, anula su capacidad de filamentación en medios sólidos independientemente del estímulo inductor.

8.2.2. Análisis de la capacidad de filamentación en medio líquido

Con el objeto de analizar de forma más precisa el efecto de la delección del gen *GCN5* durante la transición levadura-hifa, se comparó el comportamiento de la cepa RDG4-6 (*gcn5/gcn5*) con el de la cepa parental CAI4 (*GCN5/GCN5*) bajo condiciones de inducción de la filamentación en diferentes medios líquidos.

La inducción se realizó siguiendo los protocolos descritos en el apartado 2.2.3. de Materiales y Métodos.

En la cepa parental, CAI4 y en la cepa RDG2-21 (*GCN5/gcn5*), heterocigota para la delección de *GCN5* se observa el inicio de formación de tubo germinativo tras una hora de incubación a 37°C y a las cuatro horas, se observan claramente agregados filamentosos, si bien en la cepa RDG2-21, los filamentos son más cortos y engrosados (figura 16).

Sin embargo, las células de la cepa RDG4-6, homocigota para la delección de *GCN5*, forman pseudohifas constitutivamente independientemente del estímulo inductor. El mismo resultado se obtuvo al inducir la filamentación en medio Lee suplementado con suero al 4% (figura 17, cambio de pH ácido a neutro (figura 18) o presencia de NAcGlc, en lugar de glucosa como fuente de carbono (figura 19).

Por lo tanto, la delección del gen *GCN5* afecta drásticamente a la capacidad de filamentación de *C. albicans* en las condiciones ensayadas.

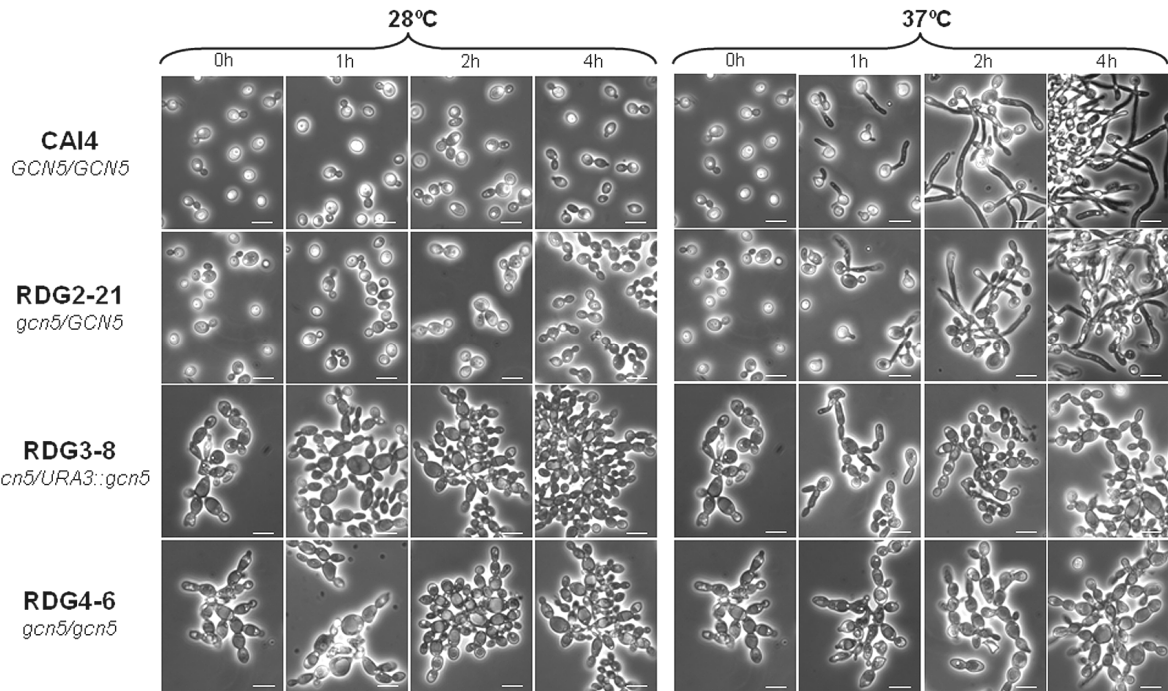


Fig. 16.- Inducción de micelio en medio líquido Lee, pH 6,8 a 37°C. La cepa parental CAI4 forma hifas en respuesta a la temperatura. Lo mismo puede observarse con la cepa heterocigota para la delección del gen *GCN5*, RDG2-21. Sin embargo, las cepas homocigotas para la delección, RDG3-8 y RDG4-6, son incapaces de llevar a cabo la transición dimórfica. La barra equivale a 10µm.

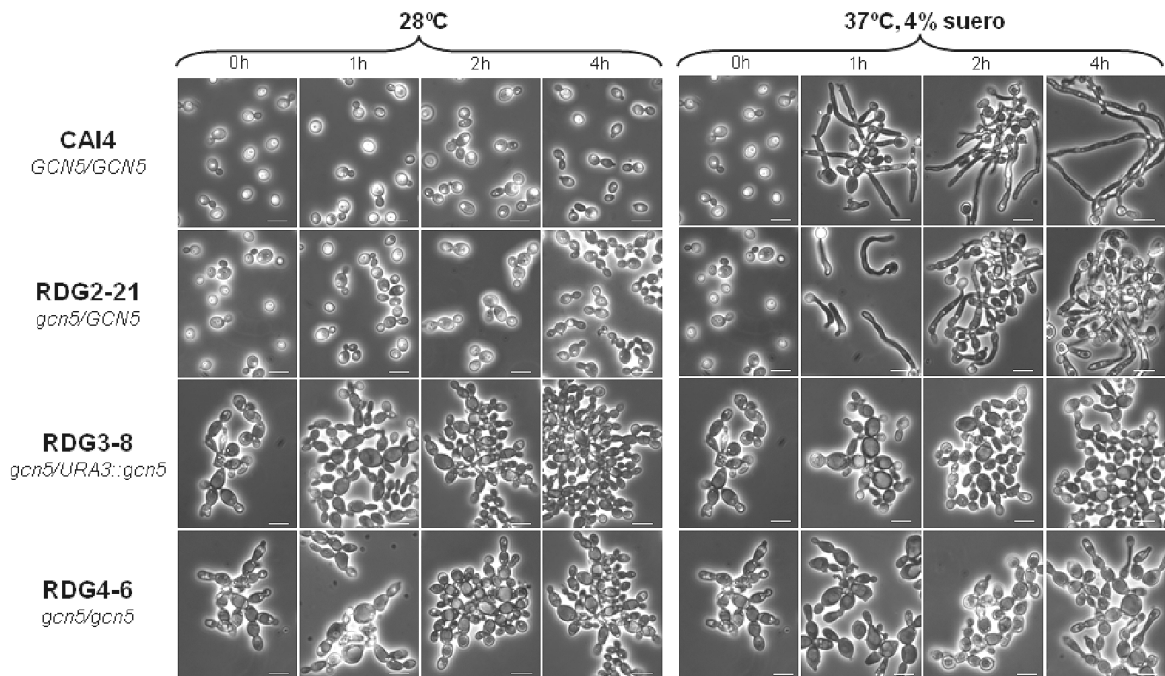


Fig. 17.- Inducción de micelio en medio líquido Lee, pH 6,8 a 37°C suplementado con suero al 4%. La cepa parental CAI4 y la cepa heterocigota para la delección del gen *GCN5*, RDG2-21 forman hifas en respuesta a la temperatura y al suero. Sin embargo, las cepas homocigotas para la delección, RDG3-8 y RDG4-6, son incapaces de llevar a cabo la transición dimórfica. La barra equivale a 10µm.

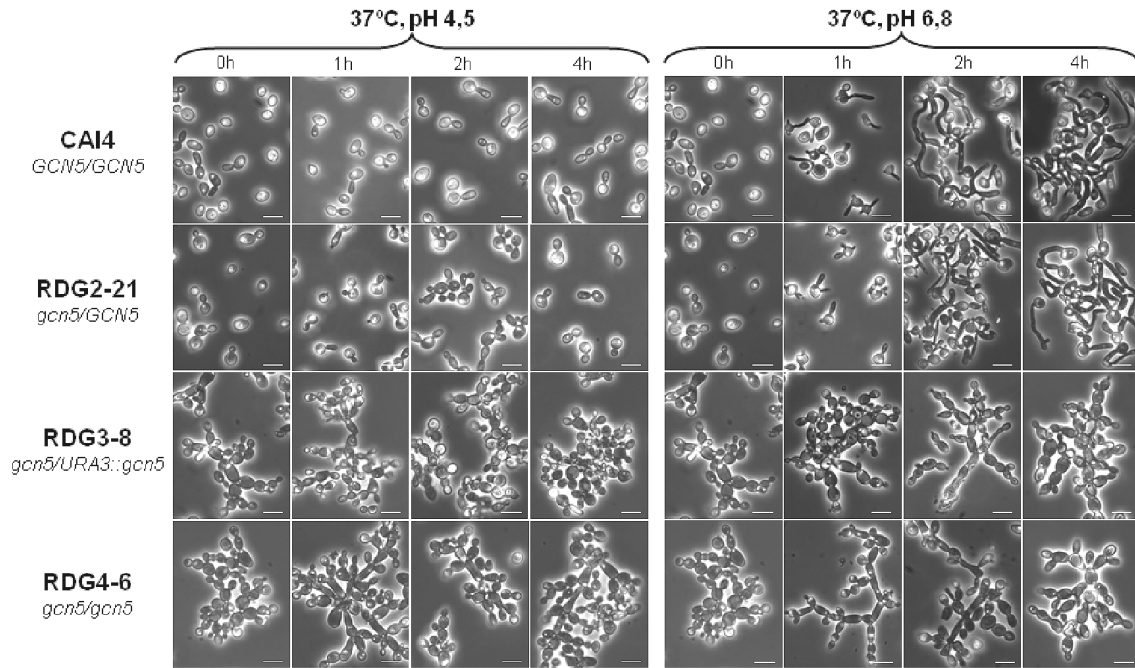


Fig. 18.- Inducción de micelio en medio líquido Lee, por cambio de pH. La cepa parental CAI4 y RDG2-21, la cepa heterocigota para la delección del gen *GCN5*, forman hifas en respuesta a pH neutro. No se observan cambios en las cepas homocigotas para la delección, RDG3-8 y RDG4-6, mostrando su incapacidad para llevar a cabo el cambio dimórfico. La barra equivale a 10 μ m.

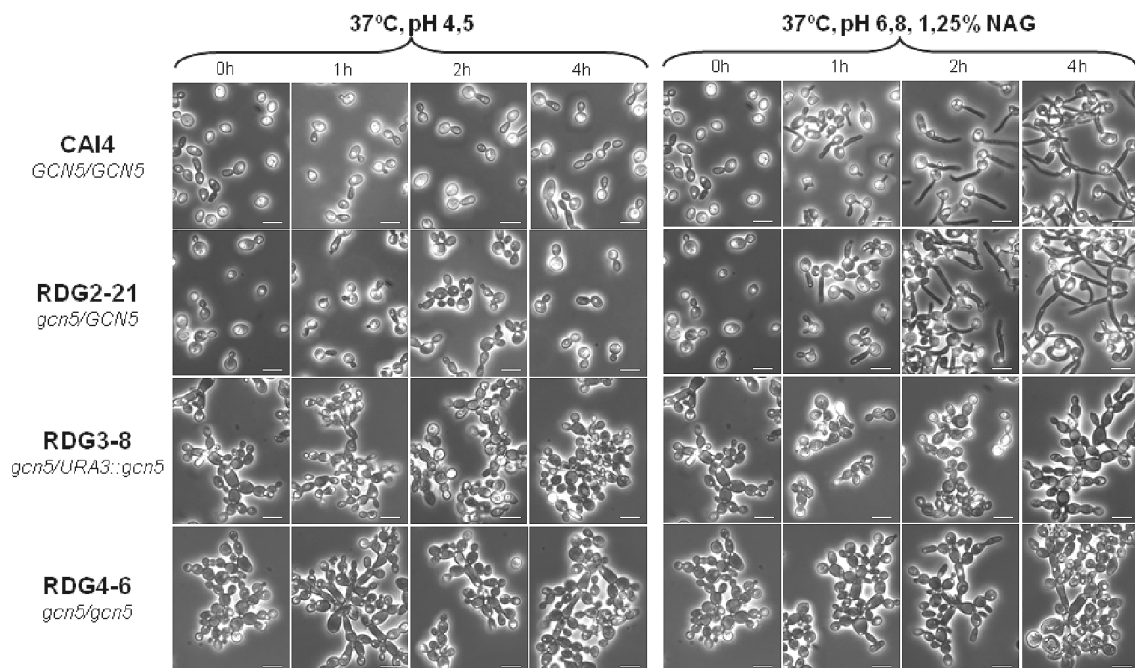


Fig. 19.- Inducción de micelio en medio líquido Lee, pH 6,8 a 37°C suplementado con 1,25% NAcGlc La cepa parental CAI4 y la cepa RDG2-21 heterocigota para la delección del gen *GCN5*, llevan a cabo la transición dimórfica, sin embargo, las cepas homocigotas para la delección, RDG3-8 y RDG4-6, no pueden formar hifas. La barra equivale a 10 μ m.

8.2.3. Efecto de la delección del gen *GCN5* en la formación de clamidosporas

En la figura 20 se muestra una tinción con *calcofluor white* de las cepas mutantes en el gen *GCN5* durante la transición levadura hifa en medio Lee a 37°C. Mientras que la cepa parental CAI4 forma hifas en respuesta al estímulo, las cepas mutantes crecen formando pseudohifas.

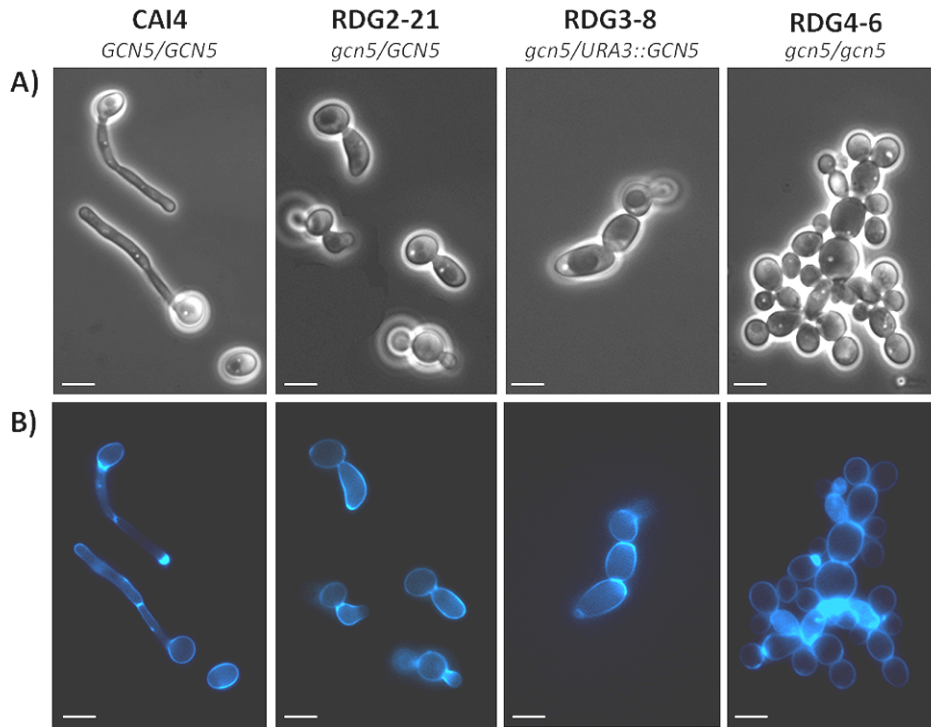


Fig. 20.- Tinción con *calcofluor white* de los mutantes *gcn5* durante la transición levadura-hifa en medio Lee, pH 6,8 a 37°C. La cepa parental CAI4 forma hifas en respuesta a la temperatura, sin embargo, la cepa heterocigota para la delección de *GCN5*, RDG2-21 y las cepas homocigotas para la delección, RDG3-8 y RDG4-6 forman pseudohifas. **A)** Contraste de fases. Las muestras se tomaron a las dos horas de inducción. **B)** Tinción de pared celular con calcofluor white. La barra equivale a 5 μm .

Solamente algunas especies del género *Candida*, como *C. albicans*, *C. dubliniensis* y algunas cepas de *C. tropicalis* se caracterizan por su capacidad de formar clamidosporas.

Estas estructuras rara vez se observan en aislados clínicos, pero sí puede inducirse su formación en el laboratorio bajo condiciones limitantes de oxígeno en medios pobres en nutrientes y a bajas temperaturas. En este trabajo se inocularon células de las diferentes cepas formando estrías en placas con medio *corn meal agar* (medio harina de maíz) suplementado con Tween 80 al 0.33% y cubriéndolas se depositaron cubreobjetos para crear condiciones microaerófilas. Las placas se incubaron durante 14 días a 25°C; a los 5, 10 y 14 días se recogieron muestras de cada una de las cepas y se examinaron con el microscopio óptico (apartado 2.2.4. de Materiales y Métodos).

Para visualizar claramente las clamidosporas, las muestras recogidas de cada placa se resuspendieron en una solución “lactofenol-azul algodón”, colorante que se une a la quitina de la pared fúngica.

En todas las preparaciones analizadas se observaron tanto levaduras como formas filamentosas. A los 5 días de incubación se empezaron a visualizar clamidosporas en la cepa parental CAI4 (*GCN5/GCN5*) y a los 10 días todos los filamentos observados presentaban estas estructuras, como se muestra en la figura 21 sin embargo, en la cepa con el gen *GCN5* delecionado no se observaron clamidosporas incluso aunque los tiempos de incubación superaron los 14 días (datos no mostrados), concluyendo por lo tanto que la cepa carente en el gen *GCN5* es incapaz de llevar a cabo este proceso de diferenciación. Además, la formación de clamidosporas por la cepa complementada RDG5-2 nos permite afirmar que el fenotipo se debe efectivamente a la ausencia del gen *GCN5*.

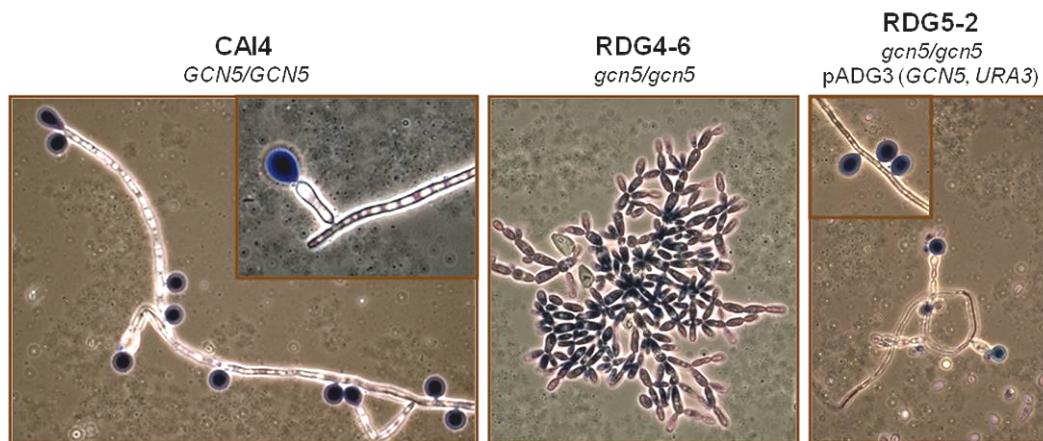


Fig. 21.- Formación de clamidosporas en “corn meal agar”. Tras 10 días de incubación a 25°C, las cepas silvestre y complementada, CAI4 y RDG5-2 respectivamente, forman clamidosporas (diferenciadas en azul oscuro mediante tinción con lactofenol-azul algodón) mientras que la cepa homocigota para la deleción del gen *GCN5*, RDG4-6 es incapaz de llevar a cabo este proceso de diferenciación.

La formación de clamidosporas, es en sí, un proceso de desarrollo poco caracterizado. El mutante *gcn5* entra a formar parte del reducido grupo de mutantes en *C. albicans* que presentan alteraciones en la formación de clamidosporas. Estos mutantes presentan alterados genes que intervienen en procesos aparentemente no relacionados por lo que resulta complicado establecer qué rutas específicas están implicadas en este proceso de diferenciación. Así, se ha demostrado que el factor transcripcional Efg1p es necesario para la diferenciación de clamidosporas en “corn meal agar” bajo condiciones microaerófilas, pero no para la filamentación en estas condiciones (Sonneborn *et al.*, 1999).

Este fenotipo también se ha observado en el mutante delecionado en *HOG1*, que codifica una MAP quinasa que interviene en regulación de morfogénesis y respuesta a estrés

oxidativo (Alonso-Monge *et al.*, 1999; Alonso-Monge *et al.*, 2003). Las rutas a través de las cuales actúan estos reguladores sobre la formación de clamidosporas no se conocen aún. También la mutación en el gen *HDA1* que codifica una histona desacetilasa, y que ha sido objeto de estudio en nuestro laboratorio (Martín, N., 2006, tesis doctoral) da lugar a defectos en la formación de clamidosporas.

En un análisis sistemático realizado por Nobile *et al.* (2003) con 214 mutantes de *C. albicans*, detectaron otros genes cuya alteración afecta al desarrollo de clamidosporas. Varios de estos genes codifican proteínas implicadas en la respuesta a pH alcalino y formación de hifas por cambio de pH. Otros genes también necesarios en este proceso de diferenciación son *SUV3*, implicado en respiración y *SCH9* que codifica una proteína quinasa que actúa como regulador general en diversos procesos.

Entre los mutantes alterados en la formación de clamidosporas también se detectó una cepa alterada en el gen *ISW2* cuyo homólogo en *S. cerevisiae*, codifica la proteína Sclw2p que forma parte de un complejo remodelador de la cromatina que actúa como represor en paralelo con el complejo Rpd3p-Sin3p de *S. cerevisiae* (Fazzio *et al.*, 2001). El efecto contrario a estos complejos represores lo encontramos en el complejo remodelador de la cromatina dependiente de ATP, SWI-SNF que junto con complejos histona acetiltransferasa que contienen a Gcn5p, funcionan cooperativamente para crear estructuras abiertas en la cromatina que favorezcan la activación transcripcional (Goldmark *et al.*, 2000). Estos datos, junto con el fenotipo de RDG4 (*gcn5/gcn5*) sugieren que los procesos de remodelación de la cromatina forman parte de los mecanismos que regulan la expresión génica responsable de la formación de clamidosporas.

NRG1, es un represor transcripcional del crecimiento filamentoso y de la formación de clamidosporas. La delección de este gen da lugar a la formación de pseudohifas de forma constitutiva en medios que inducen el crecimiento en forma de levadura y en *corn meal agar* el mutante forma clamidosporas (Murad *et al.*, 2001).

En los datos que hemos obtenido con los microarrays del mutante en el gen *GCN5*, *NRG1* se encuentra sobreexpresado tanto durante el crecimiento exponencial como durante los tres tiempos de inducción por temperatura. Este resultado podría explicar el defecto en la formación de clamidosporas en este mutante, ya que publicaciones recientes relacionan directamente la expresión de este gen con este proceso morfogénico (Staib & Morschhauser, 2005).

9. PERFIL TRANSCRIPCIONAL DE LA CEPA RDG4-6 (*gcn5/gcn5*)

La formación de hifas requiere no sólo la regulación de genes que codifican factores transcripcionales sino que además es necesaria la expresión coordinada de un gran número de genes. Muchos de ellos codifican proteínas estructurales de la pared de las hifas y otras participan en rutas de transducción de señales y en regulación del ciclo de división celular. Todos estos procesos de regulación están necesariamente relacionados con modificaciones en la cromatina pero los mecanismos responsables de estas modificaciones aún son poco conocidos.

Como ya se ha indicado, Gcn5p con función histona acetiltransferasa forma parte de complejos multiproteicos que participan en el control de la transcripción. En el presente trabajo se ha demostrado que la ausencia de esta proteína causa defectos muy drásticos en la morfogénesis de *C. albicans*.

Con el fin de obtener una aproximación global de los genes cuya expresión es regulada potencialmente por esta proteína, se llevó a cabo un análisis comparativo mediante microarrays de cDNA, del perfil transcripcional del mutante RDG4-6 (*gcn5/gcn5*) con el de la cepa parental CAI4 (*GCN5/GCN5*).

Nuestro interés se centra principalmente en el posible papel que esta proteína puede tener en el desarrollo de las hifas, por ello, el estudio se realizó durante el crecimiento exponencial como levaduras y a tres tiempos diferentes (15 minutos, 1h y 3h) durante la transición levadura-hifa en medio Lee a 37°C. El diseño experimental se describe en el apartado 8.2 del capítulo Materiales y Métodos.

9.1. Efecto de la delección del gen *GCN5* en la regulación de la expresión génica

En la figura 22 se muestra la morfología de las células en los cultivos utilizados para la

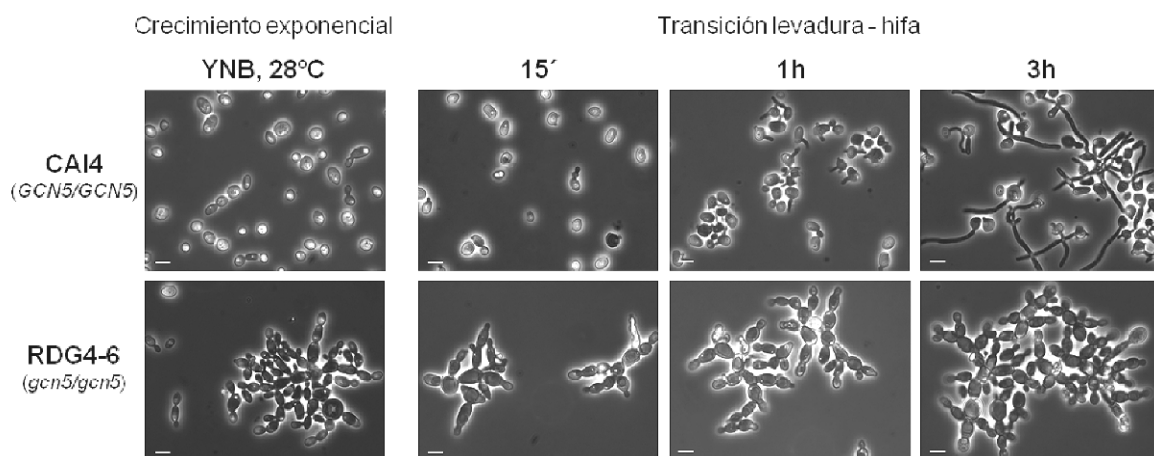


Fig. 22.- Morfología de las células recogidas para el análisis del perfil transcripcional de las cepas RDG4-6 (*gcn5/gcn5*) vs. CAI4 (*GCN5/GCN5*) en fase exponencial de crecimiento en YNB a 28°C y a diferentes tiempos durante la transición levadura – hifa a 37°C en medio Lee pH 6,8. La barra equivale a 5µm.

comparación de los perfiles transcripcionales RDG4-6 (*gcn5/gcn5*) vs. CAI4 (*GCN5/GCN5*). Como se ha indicado anteriormente, tanto a 28°C como en condiciones de inducción, el mutante *gcn5* crece formando pseudohifas. La relación de los genes expresados diferencialmente en cada condición experimental se obtuvo siguiendo los pasos que se indican a continuación y que de un modo más detallado se han descrito en el apartado 8.7. (Materiales y Métodos).

Entre los genes identificados por el test estadístico se consideraron inicialmente sólo aquellos que presentaban un factor medio de variación mutante vs. cepa parental ≥ 1.5 , filtro de expresión diferencial comúnmente empleado en publicaciones sobre microarrays (e.j. Doedt *et al.*, 2004; Nantel *et al.*, 2002). Sin embargo, en algunos casos resultó interesante realizar el estudio teniendo en cuenta valores de expresión diferencial menores, tal y como se indica en los apartados correspondientes.

En la figura 23A se indica el número de genes expresados diferencialmente en la cepa RDG4-6 (*gcn5/gcn5*) vs. CAI4 (*GCN5/GCN5*) en cada condición, siguiendo los criterios expuestos anteriormente. Se detectó que la expresión de 524 genes está alterada por la delección del gen *GCN5* en al menos una de las condiciones analizadas. El nombre y la descripción de cada uno de ellos se han incluido en el material suplementario.

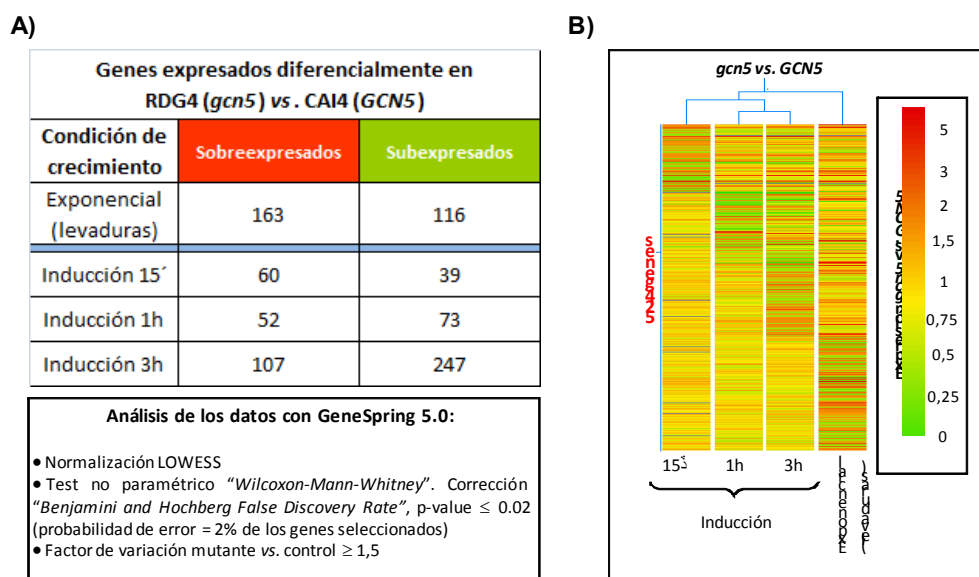


Fig. 23.- **A.** Número de genes expresados diferencialmente en la cepa RDG4-6 (*gcn5/gcn5*) vs. CAI4 (*GCN5/GCN5*) en cada una de las condiciones analizadas. **B.** Agrupación (*cluster*) de los experimentos según la similitud de los resultados de expresión, considerando los 524 genes expresados diferencialmente en el mutante *gcn5*. Cada línea representa un gen y el color refleja la variación de su expresión respecto a la cepa parental en las cuatro condiciones de crecimiento (Análisis basado en los valores de correlación estándar realizado con las herramientas del programa *GeneSpring*).

Las cuatro condiciones analizadas se agruparon por la similitud de los resultados obtenidos mediante análisis tipo *cluster* comprobándose que los experimentos se distribuyen

como cabría esperar, por un lado la comparación en exponencial y por otro los tres tiempos de inducción, estos últimos ordenados de forma cronológica (fig. 23B).

En el mutante *gcn5*, también se observan diferencias durante la inducción entre los sucesivos tiempos. Esta variación puede deberse a los ajustes de expresión que sufren numerosos genes al inicio de la formación de hifas. Nantel *et al.*, (2002) estimaron que durante la transición dimórfica la expresión de 232 genes variaba en un factor ≥ 1.5 en al menos uno de los tres tiempos analizados (30', 1h y 6h), sin embargo tan sólo 21 de estos genes aparecían expresados diferencialmente respecto a la forma de levadura en los tres tiempos.

En las condiciones de inducción analizadas en nuestro ensayo, se detectó un elevado número de genes expresados diferencialmente (338 genes), sin embargo al igual que en el estudio publicado por Nantel *et al.* (2002), tan sólo 18 genes aparecen expresados diferencialmente en los tres tiempos.

Estos resultados reflejan que la mayor parte de los genes cuya expresión varía durante la inducción de la miceliación son modulados de forma transitoria.

En un estudio realizado con microarrays de Affimetryx en mutantes de factores implicados en transcripción, se determinó que el 5% de los genes del genoma de *S. cerevisiae* dependen de la función de ScGCN5 (Holstege *et al.*, 1998).

Si tenemos en cuenta el número de genes considerados en la base de datos CGD en abril de 2009 (6431 genes), el porcentaje de genes afectados por la mutación de *GCN5* es de un 8,14%, dato que concuerda con los estudios publicados hasta la fecha.

9.2. Análisis del perfil transcripcional de la cepa RDG4-6 (*gcn5/gcn5*) durante el crecimiento exponencial a 28°C. Distribución de los genes expresados diferencialmente en categorías funcionales.

Se ha detectado la alteración de 279 genes durante el crecimiento exponencial en el mutante *gcn5* en medio mínimo YNB a 28°C.

De estos genes, 163 se encuentran sobreexpresados y 116 subexpresados con respecto a la cepa parental CAI4 (fig. 24A). La relación de todos estos genes con su función y factor de variación se recoge en el material suplementario y para facilitar el análisis de los datos obtenidos, los genes expresados diferencialmente se distribuyeron en categorías funcionales en base a los tres criterios utilizados por la terminología *GO* (*Gene Ontologies*), utilizando la herramienta *GO TermFinder* disponible en la base de datos *Candida Genome Database*. De este modo se identificaron las categorías funcionales que aparecían sobrerrepresentadas debido a la mutación de *GCN5*. Una selección de dichas categorías se muestra en la tabla IV

(genes sobreexpresados) y VI (genes subexpresados), indicándose el porcentaje de representatividad de cada grupo de genes en el estudio frente al que representan en el conjunto del genoma. Y en las tablas V y VII respectivamente, se indican los genes representativos de dichas categorías funcionales, con su función y factor de variación correspondiente.

De forma adicional se analizaron los datos obtenidos de los microarrays con el programa *T-profiler* <http://www.t-profiler.org>, (Boorsma *et al.*, 2005) que permite analizar la expresión global de *C. albicans* y *S. cerevisiae* (ver apartado 8.7.3. del capítulo Materiales y Métodos).

Como se muestra en la tabla IV, dentro del grupo de genes sobreexpresados en el mutante *gcn5*, según el proceso biológico una categoría destacada es la del **transporte de glucosa y monosacáridos** constituyendo el 4,3% de los genes del grupo frente al 0,3% que representan en el conjunto del genoma.

Categoría Go ^a	Frecuencia de la categoría GO para:		Valor-P ^d	Genes ^e
	Muestra en estudio ^b	Genoma de <i>C. albicans</i> ^c		
Transporte de glucosa (GO:0015758, P)	4,3% (7)	0,3% (22)	0.00030	<i>HGT6, HGT8, HGT7, SHA3, HXK2, HGT19, GLK1</i>
Superficie celular (GO:0009986, C)	13,0% (21)	2,6% (166)	6.31e-08	<i>PGA56, FRE10, PGA54, CRH11, PGA62, PDC11, PRA1, YWP1, PHR1, IFF6, CSH1, HSP70, TKL1, PGA31, RHD3, HSP104, PGA13, ATP1, GPH1, CHT3, orf19.822</i>
Pared celular (GO:0005618, C)	12,3% (20)	2,3% (147)	4.46e-08	<i>PIR1, orf19.2296, orf19.251, CRH11, PDC11, PRA1, YWP1, PHR1, DDR48, CSH1, HSP70, TKL1, orf19.5267, PGA31, PGA62, RHD3, CAT1, ATP1, GPH1, CHT3</i>
Pared de las hifas (GO:0030445, C)	6,8% (11)	0,7% (46)	1.03e-06	<i>orf19.251, CRH11, PDC11, PRA1, YWP1, PHR1, DDR48, CSH1, HSP70, ATP1, GPH1</i>
Actividades de óxido-reducción* (GO:0016491, F)	9,4% (28)	4,6% (298)	0.04128	<i>IFD6, FRE10, COX13, RNR22, CFL4, orf19.3175, PST2, COX15, TRP99, GRP2, GRE3, orf19.4476, CSH1, QCR8, TYR1, ARG5,6, ERO1, CYB2, OSM2, OLE1, orf19.5180, COX8, IFE2, RNR21, ALD5, CAT1, FDH3, XYL2</i>
Actividad de factores transcripcionales* (GO:0003700, F)	6,7% (20)	2,7% (171)	0.01842	<i>CPH2, orf19.1589, TBP1, HAC1, ZCF14, PPR1, orf19.4043, LEU3, ZCF2, RME1, MSN4, TYE7, orf19.4998, FGR17, ZCF32, orf19.6694, NRG1, BCR1, RIM101, STP4</i>
Actividad de factores transcripcionales específicos de RNA polimerasa II* (GO:0003704, F)	3,0% (9)	0,7% (43)	0.02013	<i>HAC1, ZCF14, ZCF20, LEU3, CUP9, MET28, NRG1, BCR1, RIM101</i>

Tabla IV.- Relación de las categorías funcionales más representadas en el grupo de genes sobreexpresados durante el crecimiento exponencial en el mutante *gen5* vs. *GCN5*. ()**

(a) Los genes sobreexpresados se clasificaron según la terminología *GO* usando la herramienta *GO Term Finder* de la base de datos CGD. En la primera columna se indica el número de acceso de la categoría *GO*, seguido del término ontológico correspondiente entre paréntesis. P, proceso biológico; C, componente celular; F, función molecular.

(b) Entre paréntesis se muestra el número de genes clasificado en cada categoría *GO*. El porcentaje se ha calculado dividiendo el número de genes clasificado en cada categoría *GO* entre el número total de genes sobreexpresados (162 genes clasificados en *GO Term Finder* de los 163 genes sobreexpresados con factor de variación $\geq 1,5$).

(c) El número de genes del genoma de *C. albicans* asociado con cada categoría *GO* se indica entre paréntesis. El porcentaje se ha calculado dividiendo ese valor entre el número total de genes anotados del genoma de *C. albicans* en la base de datos CGD en el momento de hacer este análisis (6.435 genes).

(d) Los valores de *P* para las categorías sobrerrepresentadas se han calculado automáticamente usando una distribución hipergeométrica con corrección de hipótesis múltiple, como se describe en la página web de la base de datos CGD (<http://www.candidagenome.org/help/goTermFinder.shtml>). El valor de corte de *P* en este análisis es $P \leq 0,1$. Cuanto más cercano es el valor de *P* a 0, menor es la probabilidad de que el término *GO* asignado a un grupo de genes se haya dado por azar.

(e) Los nombres de los genes siguen la nomenclatura propuesta en la base de datos CGD. Como puede observarse en la tabla, algunos genes se han asociado con más de una categoría *GO*.

* Estas categorías surgen cuando se considera un factor de variación $\leq 1,3$. Las frecuencias se han calculado en dichas categorías considerando 298 genes con un factor de variación $\leq 1,3$.

(**) La tabla muestra solamente una porción de los 163 genes sobreexpresados durante el crecimiento exponencial.

En base al componente celular, las 9 categorías que muestra el análisis GO (ver material suplementario) engloban genes relacionados con la **pared celular, la membrana plasmática y la estructura de la pared de las hifas**. Estas tres categorías, constituyen el 13%, 12,3% y 6,8% respectivamente de los genes de cada grupo frente al 2,6%, 2,3% y 0,7% que representan en el conjunto del genoma. Resulta interesante que se encuentren sobreexpresados genes relacionados con la filamentación teniendo en cuenta que el mutante *gcn5* es incapaz de formar hifas.

Nombre Común	Nombre sistemático (ORF)	Función	Factor de variación
Genes sobreexpresados			
Transporte de glucosa			
<i>HGT6</i>	orf19.2020	Posible transportador de glucosa	5,718
<i>HGT7</i>	orf19.2023	Posible transportador de glucosa	4,6
<i>HGT8</i>	orf19.2021	Posible transportador de glucosa	7,809
<i>HGT19</i>	orf19.5447	Posible transportador de glucosa y mioinositol	2,104
<i>SHA3</i>	orf19.3669	Proteína similar a ScSha3p, Ser/Thr quinasa, transporte de glucosa	3,71
<i>HXK2</i>	orf19.542	Hexoquinasa II, regulada por Efg1p y Ssn6p	1,796
<i>GLK1</i>	orf19.734	Posible glucoquinasa, regulada por Efg1p y Ssn6p	1,86
Pared celular			
<i>PGA13</i>	orf19.6420	Posible proteína con anclaje GPI, similar a mucinas	5,717
<i>PGA31</i>	orf19.5302	Posible proteína con anclaje GPI	2,516
<i>PGA54</i>	orf19.2685	Posible proteína con anclaje GPI	1,654
<i>PGA56</i>	orf19.1105.2	Posible proteína con anclaje GPI	2,442
<i>PGA62</i>	orf19.2765	Posible proteína con anclaje GPI	3,376
<i>HSP70</i>	orf19.4980	Posible chaperona de la familia de Hsp70	2,416
<i>HSP104</i>	orf19.6387	Homólogo funcional de ScHsp104p	1,75
<i>FRE10</i>	orf19.1415	Principal ferredoxina de superficie celular	1,568
<i>CRH11</i>	orf19.2706	Posible ortólogo de ScCrh1p, posible anclaje GPI	2,494
<i>IFF6</i>	orf19.4072	Posible proteína con anclaje GPI	1,587
<i>PHR1</i>	orf19.3829	Glucosidasa de superficie celular	3,198
<i>PRA1</i>	orf19.3111	Proteína intermediaria en adhesión de leucocitos	4,796
<i>CSH1</i>	orf19.4477	Aldo-ceto-reductasa	4,036
<i>YWP1</i>	orf19.3618	Dispersión en hospedador, posible proteína con anclaje GPI	2,505
<i>TKL1</i>	orf19.5112	Posible trans-cetolasa	1,927
<i>RHD3</i>	orf19.5305	Posible proteína con anclaje GPI	5,379
<i>PDC11</i>	orf19.2877	Similar a la piruvato descarboxilasa	3,056
<i>CHT3</i>	orf19.7586	Quitinasa, homólogo funcional a ScCts1p	1,538
<i>ATP1</i>	orf19.6854	Similar a la subunidad alfa de la ATP sintasa	1,514
<i>DDR48</i>	orf19.4082	Proteína asociada a estres inmunogénico	2,34
<i>GPH1</i>	orf19.7021	Posible glucógeno fosforilasa	2,624
<i>PIR1</i>	orf19.220	Proteína estructural de la pared	3,674
-	orf19.5267	Posible proteína de pared celular	2,377
-	orf19.2296	Similar a mucinas	2,51
-	orf19.822	Función desconocida	1,939
-	orf19.251	Miembro de la familia ThiJ/PfpI. Antigenica	4,405

Nombre Común	Nombre sistemático (ORF)	Función	Factor de variación
Genes sobreexpresados			
Factores transcripcionales			
<i>CUP9</i>	orf19.6514	Función desconocida	3,506
-	orf19.4043	Función desconocida	2,794
<i>NRG1</i>	orf19.7150	Represor transcripcional	2,74
<i>TYE7</i>	orf19.4941	Posible factor de transcripción con dominio hélice-bucle-hélice	2,221
-	orf19.4998	Función desconocida	2,195
<i>RIM101</i>	orf19.7247	Factor transcripcional implicado en respuesta a pH alcalino	2,075
<i>PPR1</i>	orf19.3986	Posible factor de transcripción con dominio en dedos de Zinc	1,859
<i>STP4</i>	orf19.909	Posible factor de transcripción con dominio en dedos de Zinc	1,667
<i>LEU3</i>	orf19.4225	Proteína con dominio en dedos de Zinc	1,621
<i>HAC1</i>	orf19.2432	Posible factor de transcripción implicado en respuesta a proteínas no plegadas	1,611
<i>TBP1</i>	orf19.1837	Factor de inicio de transcripción de unión a cajas TATA	1,561
<i>ZCF2</i>	orf19.431	Posible factor de transcripción con dominio en dedos de Zinc	1,514
<i>ZCF14</i>	orf19.2647	Posible factor de transcripción con dominio en dedos de Zinc	1,403
<i>ZCF20</i>	orf19.4145	Proteína con dominio en dedos de Zinc de función desconocida	1,352
<i>ZCF32</i>	orf19.5940	Proteína con dominio en dedos de Zinc de función desconocida	1,33
<i>FGR17</i>	orf19.5729	Posible factor de transcripción con dominio en dedos de Zinc	1,471
<i>MET28</i>	orf19.7046	Factor de transcripción específico de RNA polimerasa II	1,426
-	orf19.6694	Función desconocida	1,425
<i>CPH2</i>	orf19.1187	Activador transcripcional del crecimiento filamentosos	1,424
-	orf19.1589	Posible factor de transcripción	1,389
<i>RME1</i>	orf19.4438	Proteína similar al regulador meiótico ScRme1p	1,356
<i>MSN4</i>	orf19.4752	Posible factor de transcripción con dominio en dedos de Zinc	1,35
<i>BCR1</i>	orf19.723	Factor de transcripción con dedos de Zinc, necesario para la formación de Biofilms	1,348
Oxido reductasas			
-	orf19.4476	Función desconocida	2,1
-	orf19.5180	Posible cisteína peroxidasa	1,974
<i>ALD5</i>	orf19.5806	Aldehído deshidrogenasa	2,199
<i>CAT1</i>	orf19.6229	Catalasa	2,492
<i>CFL4</i>	orf19.1932	Similar a hierro-reductasas	2,217
<i>COX13</i>	orf19.1467	Función desconocida	1,682
<i>CSH1</i>	orf19.4477	Aldo-ceto reductasa	4,036
<i>CYB2</i>	orf19.5000	Proteína precursora del citocromo b2	1,56
<i>FDH3</i>	orf19.7600	Posible proteína del catabolismo de glicina, regulada por Efg1p	1,656
<i>FRE10</i>	orf19.1415	Hierro reductasa principal de superficie celular	1,568
<i>GRP2</i>	orf19.4309	Similar a ScGre2p (metil-oxal reductasa)	2,509
<i>IFD6</i>	orf19.1048	Aldo-ceto reductasa	2,339
<i>IFE2</i>	orf19.5288	Alcohol deshidrogenasa	2,653
<i>OLE1</i>	orf19.5117	Desaturasa de ácidos grasos (Esterol-CoA desaturasa), síntesis de ácido oleico	1,932
<i>QCR8</i>	orf19.4490.2	Función desconocida	1,5
<i>RNR21</i>	orf19.5801	Similar a ribonucleosido difosfato reductasa	2,064
<i>RNR22</i>	orf19.1868	Ribonucleosido difosfato reductasa	2,078
<i>TYR1</i>	orf19.4605	Posible prepefenato deshidrogenasa, biosíntesis de tirosina	1,536

Tabla V.- Relación de genes sobreexpresados de las categorías funcionales más representativas con su función y factor de variación. La tabla muestra solamente una porción de los 163 genes sobreexpresados durante el crecimiento exponencial en el mutante *gcn5*. También se han incluido los genes con factor de variación $\geq 1,3$ de las categorías factores de transcripción y óxido reductasas.

Destaca la sobreexpresión de 10 genes que codifican proteínas unidas covalentemente mediante anclaje GPI (glicosilfosfatidilinositol) a la pared celular. La función de algunas de estas proteínas no se conoce muy bien, pueden estar implicadas en la biosíntesis y remodelado de la pared celular, determinar la hidrofobicidad de la superficie celular y la antigenicidad y

se piensa que juegan un papel importante en adhesión y virulencia (Hoyer *et al.*, 2001; Klis *et al.*, 2001; Sundstrom, 2002). Otro gen sobreexpresado es *PIRI* que codifica una proteína de la pared celular que se expresa en condiciones de estrés celular, es reprimida por Rim101p y regulada por Efg1p (Chaffin, 2008).

Entre los genes sobreexpresados nos encontramos también varios factores de transcripción con un dominio característico en “dedos de zinc” que se une al DNA (Todd & Andrianopoulos, 1997). De este grupo, destaca la sobreexpresión del represor transcripcional *NRG1* y el factor de inicio de transcripción *TBPI*. Nos pareció interesante realizar el test estadístico considerando un factor medio de variación $\geq 1,3$ para ver si estaba alterada la expresión de otros factores transcripcionales. El análisis de categorías funcionales con *GO TermFinder*, se mantuvo prácticamente igual en lo que se refiere a las categorías descritas anteriormente considerando un factor medio de variación $\geq 1,5$ con la peculiaridad de que aparecieron en base al criterio de función molecular, dos nuevas categorías directamente relacionadas con la actividad transcripcional y además aumentó el número de genes de la categoría actividades de óxido-reducción.

En la categoría factores transcripcionales, se agrupan 20 genes de los cuales 11, tienen un valor medio de expresión superior a 1,5. Cabe destacar la expresión de *CPH2*, activador transcripcional del crecimiento filamentoso (Lane *et al.*, 2001) y el posible factor transcripcional *HAC1* que se sobreexpresa en situaciones de estrés en el retículo endoplasmático debido a la presencia de proteínas mal plegadas. *HAC1* juega un papel de importancia en la regulación de la morfología de *C. albicans* y en la expresión de genes que codifican proteínas de la superficie celular cuando se produce estrés en el retículo endoplasmático, factores determinantes de la virulencia de este patógeno fúngico

En estudios de expresión realizados con la cepa mutante en el gen *HAC1* de *C. albicans*, se encuentran sobreexpresados genes implicados en secreción, movimiento de vesículas, respuesta a estrés y biogénesis de la pared celular en respuesta a estrés en el retículo endoplasmático, mientras que genes relacionados con la biogénesis de los ribosomas y los procesos de traducción aparecen subexpresados (Wimalasena *et al.*, 2008).

Publicaciones recientes muestran que el proceso de acetilación realizado por Gcn5p causa desplazamiento de los nucleosomas en los promotores durante la activación transcripcional facilitando la unión de la proteína codificada por el gen *TBPI* (*TATA binding protein*), la RNAPolimerasa II y proteínas coactivadoras (Govind *et al.*, 2007). Durante el crecimiento exponencial y durante la inducción por temperatura, este gen también se encuentra sobreexpresado. Podría ser que la célula trate de compensar la ausencia de *GCN5* aumentando la expresión de *TBPI*.

Entre los genes subexpresados las categorías más significativas en base al proceso biológico son: **traducción (GO:0006412), procesos de metabolismo primario**

(GO:0044238), estructura de ribosomas (GO:0003735) (desde la biogénesis de los complejos ribonucleoproteicos hasta el ensamblado de unidades ribosomales), **metabolismo de RNA y transporte** (principalmente el transporte nuclear de RNAr y RNA en general). En el material suplementario se recoge el análisis completo y en la tabla VI se muestra una selección de las categorías más destacadas donde claramente puede apreciarse como todos los procesos de biosíntesis celular están seriamente afectados y en base a los criterios GO de función molecular y componente celular, es la constitución estructural del ribosoma el principal elemento afectado. Los genes afectados en las categorías traducción y ribosomas constituyen el 53% y 54,8% respectivamente frente al 5,8% y 2,5% que representan en el conjunto del genoma. En cuanto a la categoría metabolismo primario, los genes subexpresados constituyen el 77% del grupo frente al 2,5% que representan en el conjunto del genoma. En la tabla VII se indican los genes representativos de dichas categorías funcionales, con su función y factor de variación correspondiente.

Categoría Go ^a	Frecuencia de la categoría GO		Valor-P ^d	Genes ^e
	Muestra en estudio ^b	Genoma de <i>C. albicans</i> ^c		
Traducción (GO:0006412, P)	53% (61)	5,8% (375)	1.87e-43	SSA2, RPL3, RPL12, RPS7A, RPL38, RPS10, RPL11, RPL2, RPL82, RPS17B, RPL9B, MIS11, orf19.2930, RPL10, RPP1A, RPL13, RPS1, RPL6, RPS21B, RPS21, RPL32, ANB1, RPL10A, RPL23A, orf19.3690.2, RPL30, RPL24A, RPL43A, RPS30, RPL17B, RPL20B, RPL40B, RPL42, RPL15A, RPL14, RPL27A, RPS4A, RPS24, RPL19A, RPS15, RPL35, RPL18, RPL8B, RPL16A, orf19.6220.4, RPS14B, RPS27, RPS20, RPP2A, RPL5, RPS25B, KRS1, RPS12, RPL25, orf19.6882.1, YST1, RPP0, RPS18, RPS28B, RPP1B, RPL21A
Procesos de metabolismo primario (GO:0044238, P)	77,4% (89)	37,6% (2422)	6.30e-16	ACS2, SSA2, RPL3, RPL12, CHO2, RPS7A, HHF22, RPL38, RPS10, RPL11, RPL82, RPS17B, RPL9B, MIS11, MS13, MET6, orf19.2930, RPL10, RPP1A, RPL13, RPS1, RPL6, UBI3, HTA3, RPS21B, RPS21, ADK1, RPL32, ANB1, RPL10A, RPL23A, JEM1, orf19.3690.2, RPL30, RPL24A, MN22, RPL43A, RPS13, RPS30, CIT1, RPL17B, ALS4, RPL20B, RPS6A, RPL40B, RPL42, RPL15A, RPL14, MET3, RPL27A, RPS4A, SCL1, RPS24, MET15, RPL19A, RPS15, FAS2, RPL35, RPL18, RPL8B, RPL16A, orf19.6220.4, RPS14B, RPS27, RPS20, RPP2, CYP1, HSP90, RPL5, SAM2, PLB3, RPS25B, TPI1, KRS1, RPS12, RPL25, RPS8A, orf19.6882.1, orf19.6923, YST1, BAT22, RPP0, RPS18, RPS28B, RPP1B, orf19.779, RPL21A, MET14
Metabolismo del azufre* (GO:0006790, P)	5% (10)	1% (65)	0.01297	MET6, orf19.288, MET16, MET10, ECM17(MET5), MET3, MET15, CYS3, SAM2, MET14
Estructura de los ribosomas (GO:0003735, F)	54,8% (63)	2,5% (161)	6.51e-73	RPL3, RPL12, RPS7A, RPL38, RPS10, RPL11, RPL2, RPL82, RPS17B, RPL9B, RPL10, RPP1A, RPL13, RPS1, RPL6, orf19.3061.1, UBI3, RPS21B, RPS21, RPL32, RPL10A, RPL23A, orf19.3690.2, RPL30, RPL24A, RPL43A, RPS13, RPS30, RPL17B, RPL20B, RPS6A, RPL40B, RPL42, RPL15A, RPL14, RPL27A, RPS4A, RPS24, RPL19A, RPS15, RPL35, RPL18, RPS19A, RPL8B, RPL16A, orf19.6220.4, RPS14B, RPS27, RPS3, RPS20, RPP2A, RPL5, RPS25B, RPS12, RPL25, RPS8A, orf19.6882.1, YST1, RPP0, RPS18, RPS28B, RPP1B, RPL21A

Tabla VI.- Relación de las categorías funcionales más representadas en el grupo de genes subexpresados durante el crecimiento exponencial en el mutante *gcn5* vs. *GCN5*.()**

(a) Los genes subexpresados se clasificaron según la terminología *GO* usando la herramienta *GO Term Finder* de la base de datos CGD. En la primera columna se indica el número de acceso de la categoría *GO*, seguido del término ontológico correspondiente entre paréntesis. P, proceso biológico; C, componente celular; F, función molecular.

(b) Entre paréntesis se muestra el número de genes clasificado en cada categoría *GO*. El porcentaje se ha calculado dividiendo el número de genes clasificado en cada categoría *GO* entre el número total de genes subexpresados (116 genes, factor de variación $\leq 1,5$).

(c) El número de genes del genoma de *C. albicans* asociado con cada categoría *GO* se indica entre paréntesis. El porcentaje se ha calculado dividiendo ese valor entre el número total de genes anotados del genoma de *C. albicans* en la base de datos CGD en el momento de hacer este análisis (6.435 genes).

(d) Los valores de *P* para las categorías sobrerrepresentadas se han calculado automáticamente usando una distribución hipergeométrica con corrección de hipótesis múltiple, como se describe en la página *web* de la base de datos CGD (<http://www.candidagenome.org/help/goTermFinder.shtml>). El valor de corte de *P* en este análisis es $P \leq 0,1$. Cuanto más cercano es el valor de *P* a 0, menor es la probabilidad de que el término *GO* asignado a un grupo de genes se haya dado por azar.

(e) Los nombres de los genes siguen la nomenclatura propuesta en la base de datos CGD. Como puede observarse en la tabla, algunos genes se han asociado con más de una categoría *GO*.

* La categoría **metabolismo del azufre** surge cuando se considera un factor de variación $\leq 1,3$; pues aparecen 5 genes más (resaltados en negrita) relacionados con el metabolismo del azufre que junto a los 5 incluidos en la categoría de metabolismo primario, conforman este grupo de 10 componentes. Las frecuencias se han calculado en esta categoría considerando 204 genes con un factor de variación $\leq 1,3$.

(**) La tabla muestra solamente una porción de los 116 genes subexpresados durante el crecimiento exponencial y el grupo de genes de la categoría metabolismo del azufre considerando un factor de variación $\leq 1,3$.

Dentro de la categoría de procesos de metabolismo primario destaca la subexpresión de 5 genes relacionados con el **metabolismo del azufre (GO:0006790)**. Si hacemos el análisis considerando un factor de variación $\leq 1,3$, son 10 los genes agrupados en esta categoría (*MET6*, *orf19.288 (MET13)*, *MET16*, *MET10*, *ECM17 (MET5)*, *MET3*, *MET15*, *CYS3*, *SAM2*, *MET14*). Precisamente, los dos aminoácidos azufrados, metionina (Met) y cisteína (Cys) son los que requieren un mayor gasto energético para su biosíntesis, especialmente de NADPH. Se necesitan 4 moléculas de NADPH para la reducción del azufre y dos para la síntesis de la cadena lateral. Una disminución en la biosíntesis de estos aminoácidos podría ser un modo de ahorrar NADPH y energía bajo condiciones de estrés (Fauchon *et al.*, 2002).

En la figura 24 se muestra la ruta de biosíntesis de aminoácidos azufrados y la localización de los genes subexpresados.

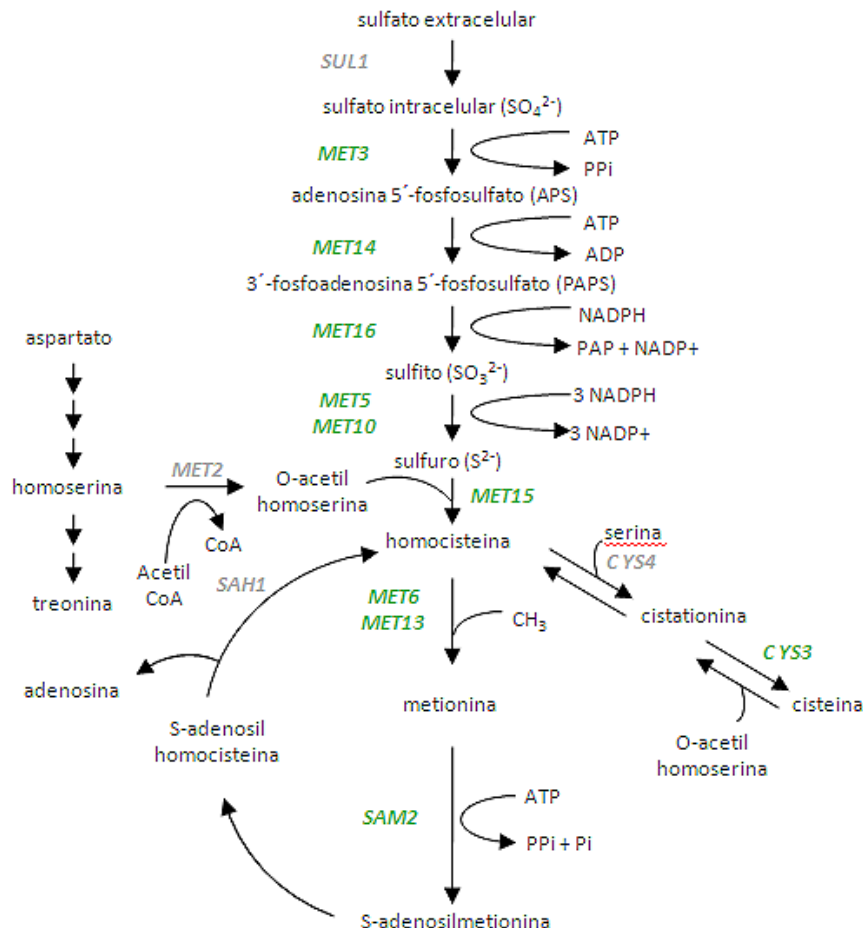


Fig. 24.- Biosíntesis de aminoácidos azufrados en *C. albicans*. En verde se indican los genes subexpresados en el mutante *gcn5* durante el crecimiento exponencial. En gris se muestran los genes que participan en la ruta pero que no han sido detectados diferencialmente en el ensayo. Ruta adaptada de Thomas & Surdin-Kerjan, 1997.

También en la categoría metabolismo primario, se encuentran subexpresados los genes *HHF1* y *HHF22* que codifican la histona H4 y el gen *HTA3* que codifica la variante F/Z de la histona H2A.

Nombre Común	Nombre sistemático (ORF)	Función	Factor de variación
Genes subexpresados			
Traducción y estructura de ribosomas			
-	orf19.3690.2	Función desconocida	0,424
-	orf19.2930	Función desconocida	0,565
-	orf19.6220.4	Función desconocida	0,621
<i>ANB1</i>	orf19.3426	Posible factor de inicio de traducción	0,607
<i>KRS1</i>	orf19.6749	Posible tRNA-Lys sintetasa	0,666
<i>MIS11</i>	orf19.2364	Posible precursor mitocondrial de C1-tetra hidrofolato sintetasa	0,64
<i>RPL10</i>	orf19.2935	Posible proteína ribosómica	0,539
<i>RPL10A</i>	orf19.3465	Posible proteína ribosómica	0,491
<i>RPL11</i>	orf19.2232	Posible proteína ribosómica	0,425
<i>RPL12</i>	orf19.1635	Posible proteína ribosómica	0,497
<i>RPL13</i>	orf19.2994	Posible proteína ribosómica	0,445
<i>RPL14</i>	orf19.4931.1	Función desconocida	0,539
<i>RPL15A</i>	orf19.493	Posible proteína ribosómica	0,364
<i>RPL16A</i>	orf19.6085	Posible proteína ribosómica	0,586
<i>RPL17B</i>	orf19.4490	Posible proteína ribosómica	0,637
<i>RPL18</i>	orf19.5982	Posible proteína ribosómica	0,396
<i>RPL19A</i>	orf19.5904	Posible proteína ribosómica	0,271
<i>RPL2</i>	orf19.2309.2	Posible proteína ribosómica	0,609
<i>RPL20B</i>	orf19.4632	Posible proteína ribosómica	0,525
<i>RPL21A</i>	orf19.840	Posible proteína ribosómica	0,289
<i>RPL23A</i>	orf19.3504	Posible proteína ribosómica	0,452
<i>RPL24A</i>	orf19.3789	Posible proteína ribosómica	0,478
<i>RPL25</i>	orf19.687.1	Posible proteína ribosómica	0,444
<i>RPL27A</i>	orf19.5225.2	Posible proteína ribosómica	0,485
<i>RPL3</i>	orf19.1601	Posible proteína ribosómica	0,572
<i>RPL30</i>	orf19.3788.1	Posible proteína ribosómica	0,465
<i>RPL32</i>	orf19.3415.1	Posible proteína ribosómica	0,559
<i>RPL35</i>	orf19.5964.2	Posible proteína ribosómica	0,436
<i>RPL38</i>	orf19.2111.2	Posible proteína ribosómica	0,542
<i>RPL40B</i>	orf19.4684.2	Posible proteína ribosómica	0,54
<i>RPL42</i>	orf19.4909.1	Posible proteína ribosómica	0,445
<i>RPL43A</i>	orf19.3942.1	Posible proteína ribosómica	0,513
<i>RPL5</i>	orf19.6541	Posible proteína ribosómica	0,373

Nombre Común	Nombre sistemático (ORF)	Función	Factor de variación
Genes subexpresados			
Traducción y estructura de ribosomas			
<i>RPL6</i>	orf 19.3003.1	Posible proteína ribosómica	0,492
<i>RPL82</i>	orf 19.2311	Posible proteína ribosómica	0,364
<i>RPL8B</i>	orf 19.6002	Posible proteína ribosómica	0,256
<i>RPL9B</i>	orf 19.236	Posible proteína ribosómica	0,452
<i>RPP0</i>	orf 19.7015	Posible proteína ribosómica	0,581
<i>RPP1A</i>	orf 19.2992	Proteína ribosómica ácida	0,478
<i>RPP1B</i>	orf 19.7188	Proteína ribosómica ácida	0,45
<i>RPP2A</i>	orf 19.6403.1	Proteína ribosómica ácida	0,496
<i>RPS1</i>	orf 19.3002	Posible proteína ribosómica	0,479
<i>RPS10</i>	orf 19.2179.2	Posible proteína ribosómica	0,627
<i>RPS12</i>	orf 19.6785	Proteína ribosómica ácida	0,255
<i>RPS14B</i>	orf 19.6265.1	Posible proteína ribosómica	0,434
<i>RPS15</i>	orf 19.5927	Posible proteína ribosómica	0,272
<i>RPS17B</i>	orf 19.2329.1	Posible proteína ribosómica	0,439
<i>RPS18</i>	orf 19.7018	Posible proteína ribosómica	0,612
<i>RPS20</i>	orf 19.6375	Posible proteína ribosómica	0,638
<i>RPS21</i>	orf 19.3334	Posible proteína ribosómica	0,365
<i>RPS21B</i>	orf 19.3325.3	Posible proteína ribosómica	0,607
<i>RPS24</i>	orf 19.5466	Posible proteína ribosómica	0,475
<i>RPS25B</i>	orf 19.6663	Posible proteína ribosómica	0,477
<i>RPS27</i>	orf 19.6286.2	Posible proteína ribosómica	0,455
<i>RPS28B</i>	orf 19.7048.1	Posible proteína ribosómica	0,444
<i>RPS30</i>	orf 19.4375.1	Posible proteína ribosómica	0,548
<i>RPS4A</i>	orf 19.5341	Posible proteína ribosómica	0,526
<i>RPS7A</i>	orf 19.1700	Posible proteína ribosómica	0,427
<i>SSA2</i>	orf 19.1065	Chaperona de la familia HSP70	0,537
<i>YST1</i>	orf 19.6975	Proteína asociada al ribosoma	0,28
-	orf 19.3061.1	Función desconocida	0,556
Metabolismo Primario			
-	orf 19.6923	Función desconocida	0,432
-	orf 19.779	Función desconocida	0,637
<i>ACS2</i>	orf 19.1064	Posible acetil-CoA sintetasa	0,542
<i>ADK1</i>	orf 19.3391	Proteína descrita como adenilato quinasa	0,578
<i>ALS4</i>	orf 19.4555	Proteína de la familia de aglutininas ALS. Posible anclaje GPI	0,446
<i>BAT22</i>	orf 19.6994	Proteína descrita como aminotransferasa de aminoácidos de cadena lateral	0,665
<i>CHO2</i>	orf 19.169	Posible fosfatidil etanolamina N-metiltransferasa	0,596
<i>CIT1</i>	orf 19.4393	Proteína descrita como citrato sintetasa	0,665
<i>CYP1</i>	orf 19.6472	Peptidil-propil cis-trans isomerasa	0,661
<i>FAS2</i>	orf 19.5949	Subunidad alfa de la sintetasa de ácidos grasos	0,59
<i>HHF22</i>	orf 19.1854	Posible histona H4	0,596
<i>HSP90</i>	orf 19.6515	Chaperona de la familia Hsp90	0,59
<i>HTA3</i>	orf 19.327	Proteína descrita como histona H2A	0,615
<i>JEM1</i>	orf 19.3592	Homólogo funcional de ScJem1p, participa en plegamiento de proteínas en el RE	0,657
<i>MNN22</i>	orf 19.3803	Proteína similar a alfa-1,2-manosiltransferasa del Golgi	0,636
<i>MSI3</i>	orf 19.2435	Proteína de la familia HSP70	0,65
<i>PLB3</i>	orf 19.6594	Posible fosfolipasa B de secreción. Posible anclaje GPI	0,657
<i>RPS13</i>	orf 19.4193.1	Posible proteína ribosómica	0,553
<i>RPS6A</i>	orf 19.4660	Posible proteína ribosómica	0,42
<i>RPS8A</i>	orf 19.6873	Posible proteína ribosómica	0,477
<i>TP1</i>	orf 19.6745	Posible triosa fosfato isomerasa implicada en glucólisis y gluconeogénesis	0,499
<i>UBI3</i>	orf 19.3087	Ubiquitina de unión a la proteína S34 de la subunidad menor del ribosoma	0,418

Nombre Común	Nombre sistemático (ORF)	Función	Factor de variación
Genes subexpresados			
Metabolismo del azufre			
CYS3	orf19.6402	Cistation gamma-licasa. Biosíntesis de aminoácidos azufrados	0,729
ECM17	orf19.4099	Sulfito reductasa, subunidad beta. Biosíntesis de aminoácidos azufrados	0,698
MET10	orf19.4076	Sulfito reductasa, subunidad alfa. Biosíntesis de aminoácidos azufrados	0,602
MET14	orf19.946	Metionina y cisteina sintetasa. O-acetil homoserina-O-acetil serina sulfidrilasa	0,407
MET15	orf19.5645	O-acetil homoserina-O-acetil serina sulfidrilasa.	0,659
MET16	orf19.3106	Posible 3'-fosfoadenilsulfato reductasa	0,708
MET3	orf19.5025	Posible ATP sulfurilasa para la asimilación del sulfato I	0,64
MET6	orf19.2551	5-metiltetrahydropteril triglutamato-homocisteina metiltransferasa	0,551
SAM2	orf19.657	S-adenosil metionina sintetasa	0,458
orf19.288	orf19.288	Función desconocida	0,734

Tabla VII.- Relación de genes subexpresados de las categorías funcionales más representativas con su función y factor de variación. La tabla muestra solamente una porción de los 116 genes subexpresados durante el crecimiento exponencial en el mutante *gcn5*. Se han incluido aquí los genes con factor de variación $\leq 1,3$ de la categoría metabolismo del azufre.

9.3. Análisis del perfil transcripcional de la cepa RDG4-6 (*gcn5/gcn5*) durante la transición dimórfica a 37°C

El análisis del perfil transcripcional del mutante *gcn5* frente a la cepa parental durante la transición dimórfica nos muestra que la ausencia del gen *GCN5* altera la expresión de al

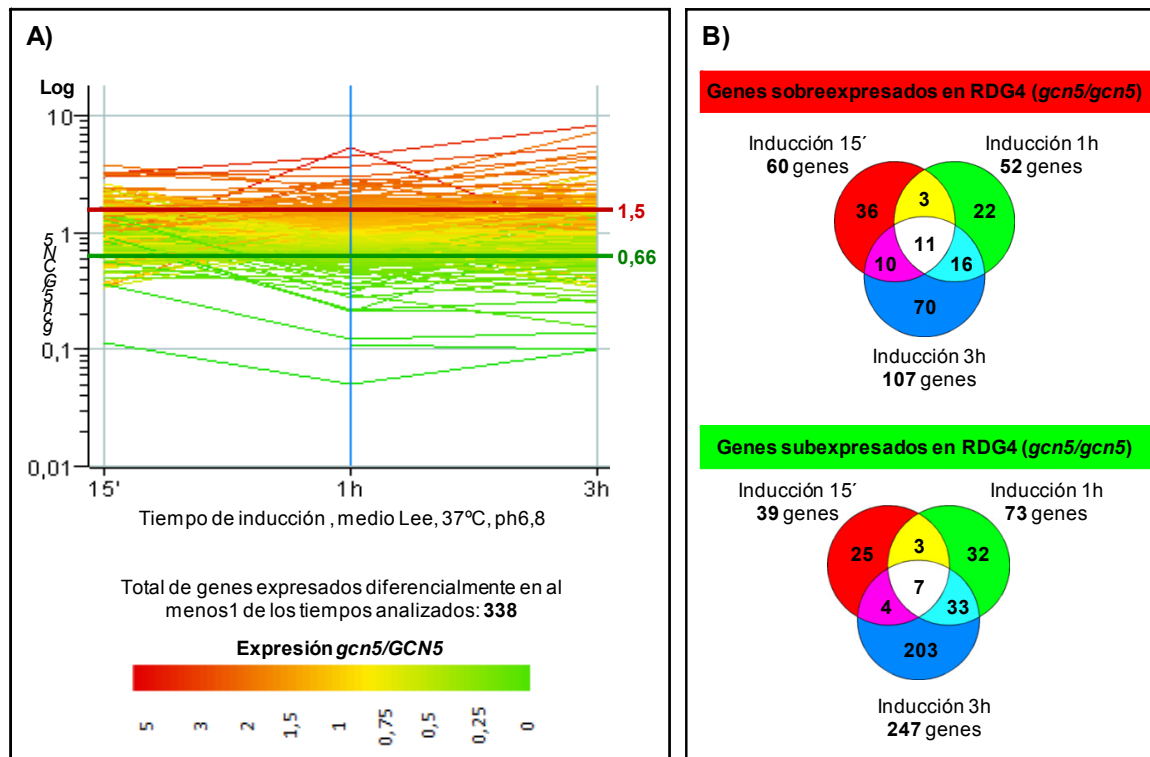


Fig. 25.- Expresión génica diferencial en la cepa RDG4-6 (*gcn5/gcn5*) durante la transición dimórfica. A) Representación gráfica del ratio de expresión *gcn5/GCN5* de los 338 genes expresados diferencialmente durante los tres tiempos de inducción analizados. Cada línea representa un gen y el color refleja la variación de la expresión a lo largo de la transición. B) Diagramas de Venn con los genes sobreexpresados y subexpresados en los tres tiempos analizados, factor de variación $\geq 1,5$.

menos 338 genes con un factor de variación $\geq 1,5$.

Los mayores niveles de variación en la expresión génica se aprecian a las 3h de inducción como puede verse en el gráfico de la figura 25A.

La intersección de los grupos de genes diferencialmente expresados en cada tiempo mediante diagramas de Venn muestra 11 genes sobreexpresados y 7 subexpresados durante los tres tiempos de la transición levadura-hifa (fig. 25B). La relación de estos genes se recoge en la tabla VIII.

Nombre Común	Nombre sistemático (ORF)	Función	Factor de variación		
			15'	1h	3h
11 Genes sobreexpresados			15'	1h	3h
<i>ADAEC</i>	orf19.868	Función des conocida	1,701	1,724	2,373
<i>IFG3</i>	orf19.944	Posible D-aminooxidasa	2,672	2,151	2,05
<i>PIR1</i>	orf19.220	Proteína estructural de la pared	3,439	2,93	4,856
<i>FRE10</i>	orf19.1415	Hierro reductasa principal de superficie celular	1,699	2,934	3,475
<i>DBP2</i>	orf19.171	Función des conocida	1,51	1,602	1,514
<i>YWP1</i>	orf19.3618	Dispersión en hospedador, posible proteína con anclaje GPI	3,75	4,55	10,695
<i>ENA2</i>	orf19.6070	Posible transportador de sodio	3,286	3,769	5,819
<i>CUP9</i>	orf19.6514	Función des conocida	2,264	1,867	2,089
<i>orf19.4400</i>	orf19.4400	Función des conocida	1,73	1,571	1,638
<i>FTR1</i>	orf19.7219	Pemeasa de alta afinidad por hierro	2,494	2,506	2,677
<i>PGA62</i>	orf19.2765	Posible proteína con anclaje GPI	3,487	2,596	3,794
7 Genes subexpresados			15'	1h	3h
<i>SAM2</i>	orf19.657	S-adenosil metionina sintetasa	0,513	0,666	0,666
<i>ALS3</i>	orf19.1816	Adhesina de la familia de aglutininas ALS.	0,339	0,121	0,121
<i>orf19.3475</i>	orf19.3475	Función des conocida	0,362	0,409	0,409
<i>RPS15</i>	orf19.5927	Posible proteína ribosómica	0,438	0,478	0,478
<i>ECE1</i>	orf19.3374	Función des conocida	0,091	0,048	0,048
<i>YST1</i>	orf19.6975	Proteína asociada al ribosoma	0,592	0,601	0,601
<i>ALS1</i>	orf19.5741	Adhesina de la familia de aglutininas ALS.	0,537	0,273	0,273

Tabla VIII. Relación de genes sobreexpresados y subexpresados durante los tres tiempos del ensayo de inducción.

El análisis de categorías funcionales estadísticamente significativas realizado con la aplicación *GO Term Finder* disponible en la base de datos CGD nos muestra que entre los genes sobreexpresados durante los tres tiempos de inducción en base al proceso biológico, es la categoría de **transporte de iones metálicos (GO: 0030001)** la que aparece más representada por los genes *FRE10*, *ENA2* y *FTR1*. En base al componente celular, 6 de los 11 genes se agrupan en la categoría **periferia celular (GO: 0071944)** (*FRE10*, *PIR1*, *PGA62*, *YWP1*, *ENA2*, *FTR1*). El mismo análisis realizado con los 7 genes subexpresados durante todo el proceso inductivo nos muestra que la categoría más representada en base al proceso biológico es **formación de biofilms (GO: 0044011)** (genes *ALS3*, *ECE1* y *ALS1*) y en base al

componente celular, es **pared celular de las hifas (GO: 0030446)** (genes *ALS3*, *ALS1*, *SAM2*).

Los 338 genes expresados diferencialmente durante el ensayo de inducción en el mutante *gcn5* se distribuyeron según la similitud de sus patrones de expresión diferencial a lo largo del tiempo mediante un análisis de tipo “*Cluster K-means*” realizado con el programa GeneSpring 5.0.

De todas las distribuciones realizadas, fue la distribución en 9 grupos la que nos permitió diferenciar patrones de expresión específicos a lo largo de la transición, como se muestra en la figura 26. En la tabla IX se recogen las categorías funcionales más representadas en los nueve grupos obtenidos.

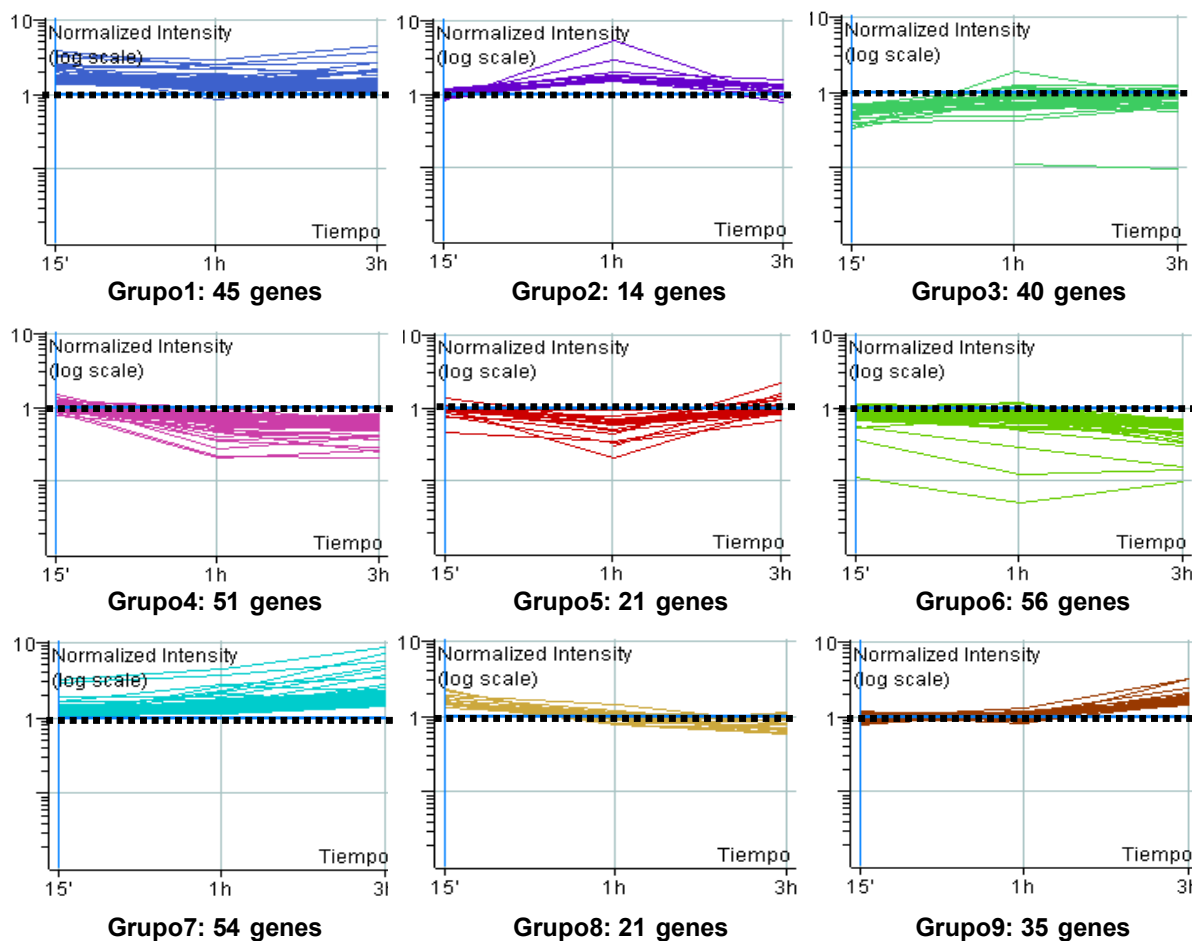


Fig. 26.- Patrones de expresión diferencial en la cepa *gcn5* vs. *GCN5* durante la transición dimórfica. Los genes expresados diferencialmente en al menos uno de los tiempos de inducción (338genes) se agruparon mediante “*cluster K-means*”. Cada línea representa un gen y la relación de su expresión mutante vs. CAI4 a lo largo de la transición dimórfica.

Las categorías más representadas a lo largo del proceso de inducción en casi todos los grupos son aquellas de genes relacionados con pared celular y superficie celular. También están afectados genes implicados en procesos de óxido-reducción, transporte iónico y homeostasis de hierro.

	Categoría Go ^a	Frecuencia de la categoría GO		Valor-P ^d	Genes ^e
		Muestra en estudio ^b	Genoma de <i>C. albicans</i> ^c		
Grupo 1 (45 genes)	Superficie celular (GO:0009986, C)	17,8% (8)	2,6% (166)	0.00061	<i>PGA62 PGA59 ENO1 KRE1 PGA31 EFT2 FTR1 INO1</i>
Grupo 2 (14 genes)	Actividad de transportadores de iones transmembrana (GO:0015075, F)	28,6% (4)	1,7% (107)	0.00165	<i>PHO89 ENA21 HSP90 PHO84</i>
Grupo 3 (39 genes)	Crecimiento filamentosos (GO:0030448, P)	25,6% (10)	2,4% (155)	1.78e-06	<i>ALS2 HWP1 GFA1 MP65 HAC1 ALS4 BEM1 MYO2 PMT1 HGC1</i>
	Interacción interespecifica (GO:0044419, P)	25,6% (10)	3,3% (213)	3.63e-05	<i>SSA2 ALS2 HWP1 MNT1 MP65 SUN41 ALS4 BEM1 PMT1 FAS2</i>
	Patogénesis (GO:0009405, P)	20,5% (8)	2,6% (167)	0.00055	<i>ALS2 HWP1 MNT1 MP65 SUN41 BEM1 PMT1 FAS2</i>
Grupo 4 (48 genes)	Pared celular fúngica (GO:0009277, C)	20,5% (8)	1,8% (115)	1.33e-05	<i>SSA2 ALS2 HWP1 TOS1 MP65 SUN41 ALS4 SAM2</i>
	Metabolismo del alcohol (GO:0006066, P)	20,8% (10)	1,3% (83)	3.66e-08	<i>ADH5 ERG25 ADH1 ERG251 IFE2 PFK2 TPI1 TDH3 PCK1 ERG3</i>
	Interacción interespecifica (GO:0044419, P)	25,6% (12)	3,3% (213)	3.52e-06	<i>orf19.1968.1 SOD5 ECM33 TPS2 ADH1 orf19.4617 FBA1 SAP5 TPI1 TDH3 TSA1 ERG3</i>
	Metabolismo de la glucosa (GO:0006006, P)	10,4% (5)	0,3% (20)	3.01e-05	<i>ADH1 PFK2 TPI1 TDH3 PCK1</i>
Grupo 5 (21 genes)	Actividad de óxido-reducción (GO:0016491, F)	22,9% (11)	3,1% (200)	5.43e-06	<i>SOD5 ADH5 ERG25 ADH1 FET34 ERG251 AOX2 IFE2 TDH3 TSA1 ERG3</i>
	Pared celular fúngica (GO:0009277, C)	20,8% (10)	1,8% (115)	5.06e-08	<i>SOD5 ECM33 ADH1 DDR48 FBA1 HYR1 TPI1 TDH3 GPH1 TSA1</i>
Grupo 6 (56 genes)	Organización de la cromatina (GO:0006333, P)	19,0% (4)	0,2% (10)	6.97e-07	<i>HHF1 HHT21 HHF22 HHT1</i>
	Nucleosoma (GO:0000786, C)	19,0% (4)	0,2% (10)	4.87e-07	<i>HHF1 HHT21 HHF22 HHT1</i>
Grupo 7 (54 genes)	Pared celular de las hifas (GO:0030446, C)	12,5% (7)	0,7% (46)	3.92e-06	<i>ALS3 orf19.251 AHP1 PRA1 PST2 CSH1 ALS1</i>
	Homeostasis del hierro (GO:0055072, P)	9,3% (5)	0,3% (21)	6.92e-05	<i>CFL2 FRE10 CFL4 RBT5 PGA10</i>
Grupo 8 (21 genes)	Pared celular fúngica (GO:0009277, C)	16,7% (9)	1,8% (115)	1.40e-05	<i>orf19.2296 CRH11 YWP1 PHR1 SIM1 RHD3 RBT5 PGA10 SSB1</i>
	Interacción con el hospedador (GO:0051701, P)	19% (4)	1,3% (85)	0.00932	<i>PGK1 EFG1 SAP9 GPM1</i>
Grupo 9 (34 genes)	Actividad peptidasa (GO:0008233, F)	23,8% (5)	1,1% (73)	4.34e-05	<i>APR1 PRE1 PRE6 SAP9 orf19.7196</i>
	Citocinesis (GO:0007109, P)	5,9% (2)	0,1% (4)	0.00792	<i>ENG1 CHT3</i>

Tabla IX.- Relación de las categorías funcionales más representadas durante la transición dimórfica en el mutante *gcn5* vs. *GCN5*.

(a) Los genes de cada uno de los nueve grupos obtenidos en el análisis “*cluster K-means*” se clasificaron según la terminología *GO* usando la herramienta *GO Term Finder* de la base de datos CGD. En la primera columna se indica el número de acceso de la categoría *GO*, seguido del término ontológico correspondiente entre paréntesis. P, proceso biológico; C, componente celular; F, función molecular.

(b) Entre paréntesis se muestra el número de genes de cada grupo clasificado en cada categoría *GO*. El porcentaje se ha calculado dividiendo el número de genes clasificado en cada categoría *GO* entre el número total de genes de cada grupo.

(c) El número de genes del genoma de *C. albicans* asociado con cada categoría *GO* se indica entre paréntesis. El porcentaje se ha calculado dividiendo ese valor entre el número total de genes anotados del genoma de *C. albicans* en la base de datos CGD en el momento de hacer este análisis (6.435 genes).

(d) Los valores de *P* para las categorías sobrerrepresentadas se han calculado automáticamente usando una distribución hipergeométrica con corrección de hipótesis múltiple, como se describe en la página *web* de la base de datos CGD (<http://www.candidagenome.org/help/goTermFinder.shtml>). El valor de corte de *P* en este análisis es $P \leq 0,1$. Cuanto más cercano es el valor de *P* a 0, menor es la probabilidad de que el término *GO* asignado a un grupo de genes se haya dado por azar.

(e) Los nombres de los genes siguen la nomenclatura propuesta en la base de datos CGD. Como puede observarse en la tabla, algunos genes se han asociado con más de una categoría *GO*.

De los 9 grupos obtenidos, el grupo 1 incluye 45 genes que se mantienen sobreexpresados durante los tres tiempos de inducción mientras que en el grupo 6, se subexpresan 56 genes a lo largo del proceso. El grupo 2 contiene 14 genes cuyo patrón de expresión aumenta desde los 15 minutos hasta 1 hora de inducción, punto a partir del cual disminuye claramente. El efecto contrario se da en los 21 genes del grupo 5, subexpresados durante ese mismo periodo del proceso inductivo.

En el grupo 3, a los 15 minutos de inducción, 40 genes están subexpresados, sus niveles de expresión aumentan ligeramente pero se mantienen subexpresados hasta el final del proceso. El grupo 4, contiene 51 genes cuyos niveles de expresión disminuyen drásticamente hasta 1h de inducción y a partir de este punto los niveles de subexpresión se mantienen constantes hasta el final.

En el grupo 7, 54 genes se sobreexpresan desde el inicio del proceso, siendo más evidente a las 3 horas de incubación. El grupo 8 incluye 21 genes que se encuentran sobreexpresados a los 15 minutos del ensayo pero sus niveles de expresión disminuyen progresivamente hasta llegar a niveles de subexpresión a las 3 horas de inducción. Por último, los 35 genes del grupo 9 están claramente sobreexpresados a las 3h de inducción.

Aunque no se encuentran localizados en un mismo grupo, al igual que en el experimento realizado con células creciendo exponencialmente, los 10 genes que codifican proteínas unidas covalentemente mediante anclaje GPI (glicosilfosfatidilinositol) a la pared celular presentan alterada su expresión durante la transición dimórfica. La mayoría de ellos se encuentran sobreexpresados en los tres tiempos o en al menos uno de ellos, como ocurre con *PGA6* y *PGA7* localizados en el grupo 5, subexpresados a 15' y 1h pero sobreexpresados a las 3h.

En el grupo 1, la categoría más representada es **superficie celular (GO: 0009986)**, tres genes, *PGA62*, *PGA59* y *PGA31*, se encuentran sobreexpresados durante todo el proceso inductivo en el mutante RDG4-6, igual que *INO1* cuyo producto de expresión está implicado precisamente en la formación de proteínas con anclaje GPI entre otros procesos intracelulares como regulación del crecimiento, estructura de membranas, osmotolerancia y transducción de señales (Chen *et al.*, 2008). Otros genes en este grupo son *ENO1* que codifica uno de los principales antígenos de superficie de *C. albicans*, *KRE1* implicado en biosíntesis de beta-1,6-D-glucano y *EFT2* que codifica el factor de elongación 2, recientemente identificado en la superficie celular como proteína inmunogénica (Martinez-Lopez *et al.*, 2008).

Entre los grupos de genes que se mantienen subexpresados a lo largo de la inducción (grupos 3, 4 y 6), destacan genes asociados a la **pared celular fúngica (GO: 0009277)** y la **pared celular de las hifas (GO: 0030446)**. *HWPI* codifica una proteína de superficie expresada solamente en las hifas, recientemente se ha demostrado que es necesaria para la formación de *biofilms* (Nobile *et al.*, 2006).

Aunque no se recogen en la tabla IX pero sí en los archivos de material suplementario, los genes *SAP4*, *SAP5* y *SAP6* que codifican aspartil proteasas también están subexpresados, y se clasifican en los grupos 4 y 5. Resulta interesante tenerlo en cuenta pues como veremos en el siguiente capítulo, en el mutante *hat1* también se ha detectado la subexpresión de estos genes tras 1h de inducción. La actividad proteolítica de estas enzimas está asociada con la invasividad y por tanto con la virulencia de *C. albicans*. Además, en concreto estos tres genes se caracterizan por expresarse durante la transición dimórfica. El triple mutante aunque no está impedido en la formación de hifas, sí muestra una capacidad invasiva mucho más reducida (Naglik *et al.*, 2003; Sanglard *et al.*, 1997).

Cuatro de los ocho genes que integran la familia de aglutininas ALS (*Agglutinin-Like Sequence*) están subexpresados en los grupos 3 y 6. *ALS2* y *ALS4* presentan un patrón de expresión similar dentro del grupo 3 y se clasifican en varias categorías, siempre relacionadas con la pared celular como puede verse en la tabla IX. *ALS1* y *ALS3* se clasifican en la categoría funcional **pared celular de las hifas**, en el grupo 6.

La mutación de estos genes disminuye en general la adherencia a diversos tipos celulares o ligandos en el hospedador, la agregación celular sin embargo no cambia, pero se retrasa la formación de hifas y en alguno de ellos disminuyen las propiedades de adherencia en la formación de *biofilms* (Chaffin, 2008).

Otros genes con patrón de expresión similar en el grupo 3 son *SSA2* que codifica una chaperona de la familia de las HSP70 localizada específicamente en la pared celular de las hifas, al igual que la proteína S-adenosil metionina codificada por *SAM2* (Lopez-Ribot *et al.*, 1996). *MP65* codifica una manoproteína localizada principalmente en el exterior de la pared de las hifas y utilizada como marcador antigénico en diagnóstico (La Valle *et al.*, 2000). Sun41p funciona como glucosidasa y está implicada en la biogénesis de la pared celular. Además, la delección de este gen impide la filamentación, una correcta citocinesis celular y disminuye la capacidad de adhesión en medios sólidos (Hiller *et al.*, 2007). Otra categoría destacada en el grupo 3 es **crecimiento filamentoso (GO: 0030448)** que engloba a varios genes ya señalados en otras categorías del grupo y los que se describen a continuación.

Otros genes con patrón de expresión similar en el grupo 3 son *SSA2* que codifica una chaperona de la familia de las HSP70 localizada específicamente en la pared celular de las hifas, al igual que la proteína S-adenosil metionina codificada por *SAM2* (Lopez-Ribot *et al.*, 1996). *MP65* codifica una manoproteína localizada principalmente en el exterior de la pared de las hifas y utilizada como marcador antigénico en diagnóstico (La Valle *et al.*, 2000). Sun41p funciona como glucosidasa y está implicada en la biogénesis de la pared celular. Además, la delección de este gen impide la filamentación, una correcta citocinesis celular y disminuye la capacidad de adhesión en medios sólidos (Hiller *et al.*, 2007). Otra categoría

destacada en el grupo 3 es **crecimiento filamentosos (GO: 0030448)** que engloba a varios genes ya señalados en otras categorías del grupo y los que se describen a continuación.

GFAI codifica glucosamina-6-fosfato sintetasa, que es la primera enzima en la ruta de síntesis de hexosaminas, en concreto glucosamina-6-fosfato. La actividad de esta enzima es clave en la ruta de síntesis de glicoproteínas y de quitina, siendo este último el principal componente de la pared fúngica. Durante la formación del tubo germinativo, se incrementa la síntesis de quitina de tres a cinco veces lo que conlleva una elevada actividad de esta enzima (Smith *et al.*, 1996).

Otra proteína subexpresada durante la inducción es la manosil transferasa 1, codificada por el gen *PMT1*. Esta enzima cataliza el primer paso en la reacción de O-glicosilación en el retículo endoplásmico. Defectos en la glicosilación de las proteínas alteran la estabilidad física de la superficie celular y los procesos de secreción de algunas proteínas. En concreto, la mutación de este gen en *C. albicans* afecta a la secreción de Als1p y quitinasa (Timpel *et al.*, 1998).

A diferencia de lo que ocurre durante el crecimiento exponencial de la cepa mutante RDG4, el posible factor transcripcional *HAC1* aparece subexpresado durante la transición dimórfica. Este gen se sobreexpresa en situaciones de estrés en el retículo endoplasmático debido a la presencia de proteínas mal plegadas. La delección del gen no impide la formación de hifas bajo condiciones de inducción, sin embargo, sí son más pequeñas y menos adherentes. Análisis de expresión realizados por (Wimalasena *et al.*, 2008) muestran que la expresión de varias adhesinas (*ALS4*, *ALS5*, *ALS2* y *ALS3*) y manosiltransferasas (*PMT1*, *PMT2* y *PMT4-6*), dependen de Hac1p durante la respuesta a estrés.

En *S. cerevisiae*, *BEM1* codifica una proteína con dominios SH3 que se une a ScCdc42p, implicada en ciclo celular. ScBem1p ayuda a establecer la polaridad celular necesaria para la formación de la yema de gemación, también se une a ScSte5p y ScSte20p componentes de la ruta de apareamiento en *S. cerevisiae* de modo que puede favorecer el reordenamiento del citoesqueleto de actina durante dicho proceso (Zhou *et al.*, 2002).

En relación con la polaridad celular en *C. albicans* otro gen subexpresado es *MYO2* que codifica la miosina de clase V. La delección de este gen impide la formación del tubo germinativo y por tanto el crecimiento filamentosos (Woo *et al.*, 2003). Otro gen implicado en polaridad es la ciclina de G1 Hgc1p. Se asocia con la quinasa dependiente de ciclinas Cdc28p que es el regulador central del ciclo celular. La delección del gen *HGCI* impide la filamentación en todas las condiciones ensayadas y una virulencia muy reducida en riñones de ratón infectados. Su expresión es co-regulada con la de *HWPI* por la vía de transducción de señales cAMP/quinasa A y el complejo represor (Zheng *et al.*, 2004).

En el grupo 4, 10 de los 48 genes afectados se agrupan en la categoría **pared celular fúngica (GO: 0009277)**. *SOD5* es uno de los 6 genes que codifican proteínas con actividad

superóxido dismutasa en *C. albicans*. Sod5p es dependiente de cobre y zinc y se localiza en la superficie celular mediante anclaje GPI (Fradin *et al.*, 2005). Sod5p convierte el O₂⁻ en oxígeno molecular y peróxido de hidrógeno. Durante la transición dimórfica se encuentra sobreexpresada y cumple funciones de detoxificación de especies oxidantes secretadas por células del sistema inmune del hospedador permitiendo así eludir la primera respuesta inmune frente al patógeno (Frohner *et al.*, 2009).

En relación con situaciones de estrés oxidativo, otra proteína importante es Tsa1p. El gen *TSA1* se sobreexpresa sobre todo cuando en el medio aumenta la concentración de peróxido de hidrógeno. Además, mientras que en la forma de levadura se localiza en el citosol, durante la transición dimórfica se localiza en la pared celular de las hifas siendo su translocación dependiente de la actividad de Efg1p (Bailey *et al.*, 1996; Urban *et al.*, 2005).

Otras dos proteínas con anclaje GPI también subexpresadas en esta categoría son Hyr1p y Ecm33p. La mutación de estos genes no impide la formación de hifas pero en el caso de la delección de *ECM33*, sí se observa una deslocalización de la adhesina Als1p además de presentar alterada la arquitectura de la pared celular (Bailey *et al.*, 1996; Martínez-Lopez *et al.*, 2006).

La enzima alcohol deshidrogenasa 1 codificada por el gen *ADH1* y el producto del gen *DDR48* participan en la formación de *biofilms* (Mukherjee *et al.*, 2006).

Ddr48p, está implicada en procesos de reparación de DNA, en situaciones de ayuno de aminoácidos su expresión depende del activador transcripcional *GCN4* y bajo condiciones inductoras de la filamentación Cph1p activa su expresión. Además contiene en su estructura repeticiones de una secuencia aminoacídica que podría estar implicada en resistencia a drogas (Dib *et al.*, 2008).

En relación con los procesos de óxido-reducción, entre los genes subexpresados durante el proceso morfogénico en el mutante *gcn5*, además de los genes ya indicados por su localización en la pared celular, en el grupo 4 aparece sobrerrepresentada la categoría **actividad de óxido-reducción (GO: 0016491)**. Los genes *SOD5*, *ADH5*, *ERG25*, *ADH1*, *FET34*, *ERG251*, *AOX2*, *IFE2*, *TDH3*, *TSA1* y *ERG3* están subexpresados. Algunos de estos genes codifican proteínas que participan en glucólisis o están relacionados con el metabolismo de la glucosa. *ADH1*, *PFK2*, *TPI1*, *TDH3* y *PCK1* se encuentran subexpresados. La obtención de energía en el mutante *gcn5* parece estar seriamente afectada probablemente debido a que el metabolismo de la glucosa está afectado.

De los 21 genes con patrón de expresión similar del grupo5, la categoría **organización de la cromatina (GO: 0006333)** es la más representada constituyendo el 19% de los genes del grupo frente al 0,2% que representan en el conjunto del genoma. Los genes *HHF1* y *HHF22* codifican la histona H4 y los genes *HHT21* y *HHT1* codifican la histona H3. Aunque

no aparecen en este grupo también los genes *HTA1* y *HTB1* que codifican las histonas *H2A* y *H2B* respectivamente se encuentran subexpresados durante todo el proceso de inducción.

Durante los primeros minutos de la filamentación la expresión de estos genes es similar a la de la cepa control, tras una hora de inducción estos niveles se reducen y vuelven a aumentar hasta alcanzar niveles similares a los del inicio. La subexpresión de estos genes podría estar relacionada en este mutante con el retraso de crecimiento que muestra esta cepa respecto a la cepa parental, como se ha sugerido en otros mutantes donde estos genes se encuentran subexpresados y muestran crecimiento más lento (Bensen *et al.*, 2002).

Los grupos 7, 8 y 9 engloban genes sobreexpresados durante la transición levadura-hifa. Está sobrerrepresentada la categoría **homeostasis del hierro (GO: 0055072)** con los genes *CFL2*, *FRE10*, *CFL4*, *RBT5* y *PGA10*, algunos de los cuales se localizan en la superficie celular y presentan en su estructura anclaje GPI. Otra categoría de nuevo representada es **pared celular (GO: 0009277)** engloba los genes *orf19.2296*, *CRH11*, *YWPI*, *PHR1*, *SIMI*, *RHD3*, *RBT5*, *PGA10* y *SSB1*.

La pared celular representa el punto inicial de interacción entre *C. albicans* y las células del hospedador. La estructura dinámica de la pared celular permite que el patógeno evite la acción del sistema inmune del hospedador además de facilitar la adhesión y penetración de los tejidos del hospedador (Singleton & Hazen, 2004). Los estudios de virulencia en ratón, llevados a cabo en nuestro grupo de investigación (Rashki, A., 2009, tesis doctoral) muestran que el mutante *gcn5* es hipovirulento.

Los resultados obtenidos, indican que la proteína Gcn5p juega un papel clave en la represión de genes implicados en la estructura de la pared celular y genes de la superficie implicados en el establecimiento de la hidrofobicidad y antigenicidad siendo ambas propiedades determinantes de la capacidad de adhesión y virulencia en *C. albicans*.

Acetiltransferasa de histonas *HAT1*

10. LA SECUENCIA NUCLEOTÍDICA DEL GEN *HAT1* DE *Candida albicans*

La secuencia del gen *HAT1* (orf19.779) se obtuvo a partir del Contig19-10073 que forma parte de la secuencia completa del genoma de la cepa SC5314 de *C. albicans* publicada por la Universidad de Stanford (<http://www.sequence.stanford.edu/group/candida>). Al igual que con el gen *GCN5*, la secuencia de *HAT1* se localizó por alineamiento con una secuencia EST (*expressed sequence tag*) de aproximadamente 400 nucleótidos descrita como perteneciente al gen *HAT1*, por su homología con el gen *HAT1* de *S. cerevisiae*, para ello, se utilizó el programa BLAST.

Se detectó una fase de lectura abierta de 1242 nucleótidos y se comparó mediante el programa BLAST <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi> mostrando un porcentaje de identidad del 66% con la secuencia XM_458769.1 de la levadura *D. hansenii* y de un 64% con la secuencia XM_001387437.1 de la levadura *Pichia stipitis*.

El análisis bioinformático de las secuencias flanqueantes permitió caracterizar las posibles regiones promotora y terminadora del gen.

En la figura 27 se muestra la secuencia de nucleótidos de un fragmento de 3242 pb del Contig19-10073 que contiene el gen *HAT1* y su traducción a aminoácidos, junto con las regiones 5' y 3' adyacentes. En dicha secuencia se indican señales reguladoras de la transcripción características de los genes de levadura.

La publicación del mapa físico del genoma de *C. albicans* ha permitido ubicar el gen *HAT1* en el cromosoma 1 (*The Candida albicans physical map website*, <http://albicansmap.ahc.umn.edu>). Esta información también se encuentra disponible en las bases de datos *CandidaDB* y *Candida Genome Data Base* (CGD).


```

-1000 tagattattg ggtaccaaat ataatccatc aagaactttt actccaaatg gtactgttgg tattggtggt aattatatgt
-920 gtatttatac catggaatca ccaggtgggt atcaatttagt tggaaggaca gttccaatttt gggataaatt gagtttaggt
-840 gaacactcac caaacactaa accatgggta ttgagtgcat tcgatcaaat tgaattttat cctgttactg aagaagaagt
-760 tgatgcattt tctgaacaaa tgaatgctgg taaattcaaa gttgatattg ttgaaatcagt tttcgatcat ggtaaatatt
-680 tggaatggat tcaagaaaac tctaaatcaa ttgaggaatt ccaacaaaac caaggagggtg agaattaga agaattcaat
-600 agattgattc aaatctcaaa cagtgaattg gaaaaactgg gaactaaagt tcaagatgac gaaaatttg atgataatgc
-520 tgaattgggtg tattctgaat attctggtag attctggaaa tcagtagttg aagttggaga taagttact gctcatcagc
-440 cattgattgt tgttgaagca atgaaaacag aaatggttgt taatgcacca agagatggta aggtgcttaa aatttaccac
-360 aagaatgggg atattggtgga ggccggtgat tttagtggttg ttttagaata atttgtaaaa tagtattgta ttataataa
-280 taaaaaattt tattgataat accatggttg tgtaaggact tagaggaaga tgttggttta acggcagttt ggataatggt
-200 gtctagattg aaagattaat gtcgtctcat agaagcacta atgtctttca ggtcgcgtgt aattttttca acttgcgtt
-120 gtgtactttt tctcgagaat ttacatgga aaaaaaagt caactcaact caaagcaaat aaaaagataa acagacaaaa
-40 ctattcttaa cagaacggca atcacatcaa gacttaatca atgtcatccg caaaagaaca aagtagtgtt acggcagcat
1
40 tgcaaccaga gcaatggacg acatcatcaa atgaagcatt gaaattgttt gtcaccaatc ctgaagcagc acttaatttc
13 L Q P E Q W T T S S N E A L K L F V T N P E A A L N F
120 caacctacat ttacttatcc aatatttggg gatgccgaaa caatctatgg gtataaagat tttagatata ttttatgttt
40 Q P T F T Y P I F G D A E T I Y G Y K D L D I F L C
200 tgatcattat acatttaaac catttttgaa tattaaatat agtgccaaat tgactgacga tccagaaatt attgatatca
66 F D H Y T F K P F L N I K Y S A K L T D D P E I I D I
280 aaaaaacat tgatgaattc ttacctaacc tgacgattttt caaagatgaa gtgaaatggg tgcattcaat aaaggaagaa
93 K K T I D E F L P K S T I F K D E V K W V D S I K E E
360 aaagataatg ggtataaaat acctggaaaa ttaatcgatt catttagtga gaatgataaa gaatacagata tttataaaat
120 K D N G Y K I P G K L I D S F S E N D K E Y D I Y K
440 tgacttgaag tcagacaatg gatatgaatt acatcaacga ttgcaaatct tagtcttatt gttcattgag gcagggtcat
147 I D L K S D N G Y E L H Q R L Q I L V L L F I E A G S
520 ttattgatgc caaagatgaa ttatggaact tgtagtgttt gtatgaaaaa gacaataaat ctacatccaa taatgaacct
173 F I D A K D E L W N L Y V L Y E K D N K S T S N N E P
600 tctatagttg ggtttaccac ggcttataat tattggaat atcctgtgtc caaaaaattc gattcaactg aacaagaact
200 S I V G F T T A Y N Y W K Y P G A K K F D S T E Q E
680 gagaatcaag atactcagtt ttataatatt accaatttac caaggcgaag gcttaggaca attattttat tcccattat
226 S R I K I S Q F I I L P I Y Q G Q G L G Q L F Y S H L
760 ttgacaagtg gttagcacia gatgatataa ttgaagtatg agttgaagac cctaagaaa gttttgatga ttttaaggat
253 F D K W L A Q D D I I E V V V E D P N E S F D D L R D
840 agagccgatt tgaagaagat aaatactagt gagcaatttg atttcaaagc tgttactccg aaagtagaca aggagtggtt
280 R A D L K R L N T S E Q F D F K A V T P K V D K E W
920 tgaaaaaaca agacgagcat taaaattaga aaagagacag tttgcaagat tgttagaaat tatatttgta tacaagtga
306 V E K T R R A L K L E K R Q F A R L L E I I L L Y K L
1000 aacatggcta tcctggatc accaagagag acgtgaggtt attcatcaaa aaaagattat atgacaagaa taaggaagga
333 K H G Y P G I T K R D V R L F I K K R L Y D K N K E G
1080 ttagccacct tagatgataa caccaagaaa gataaattac agactgctta tcaagctttg gaagatgatt attatagaat
360 L A T L D D N T K K D K L Q T A Y Q A L E D D Y Y R
1160 attgggagac ttgaagttga acattaagcg tgagaatgat gaagaggaaa ccgacaccgt ttccaaaaag caaaaagtgt
386 I L G D L K L N I K R E N D E E E T D T V S K K Q K V
1240 aagtatattt gtattattag ctagaaaact agtgataaaa aaacaacgca aatgacgta atataaaagt ttgtattttt
413 -
1320 cgaaagtaag aaataaagt ttaaacggtt gattaaggta gtaaactcga aaatccatc tgatgatgta gtttttgaaa
1400 atgaatttat cttattttta cggattgaca ttgtgtccta gtttatttagt gtgcggctat gacgtaatat ggaataatgt
1480 acttggatcat ggaattattc tacatcgtct tggacaagt gtactttttc ttttgtgtag atatgatttg ctgagaaaaa
1560 aaaaaacta taccaactta atgttgtaaa ggaaccgca ctccattacg taatgagtg ttaattgtcc tatacttttg
1640 cagtttggag aacaagagcg tttcatgac ctggcccag gaagttggta tttcggagat atttcagagg cggttattgt
1720 catattaatt ggataacgga ataactgtgc ggctctaaa tttttgacc acacatcaat cttaaacag caaaaccta
1800 ccctagtatg gaaaagtcca ctggcagaag aagaagaact tgaattttat tccgagcgtg tccattggtta caaattatta
1880 tatcgaccta attagggaaa tggcaatcca cactttttt ttttcgtcac tgatacacac attagagctt tttcatcacc
1960 agcaaaagag ttggttttgt gtaataaat tgctggagtt ttctaattg ttctgtttct ccaatttaac aatgatgta
2040 gttaaaaagc ttccactcac ttagttaaat caccgcgatt caaatcccc atccatccc taaacttgct atttgatata
2120 tttactcata caacaactct tattacctat catgagttat tttcattaat ctttatacag ataactaat aataactcaa
2200 gcaatataag tcgaacatgt aaacgaatct ctaaaaaccg ga

```

Fig. 27.- Región del genoma de *C. albicans* que contiene el gen *HATI*, en la que se ha incluido la secuencia de aminoácidos deducida a partir de la secuencia de nucleótidos. En la región promotora se ha señalado la posible caja TATA (sombreada en naranja), varias secuencias ricas en T y en A (subrayadas en azul); las secuencias CAAT y CAAG (sombreadas en verde y en morado respectivamente). Los codones CTG que en *Candida* codifican Serina en lugar de Leucina, se han subrayado en rojo. En la región 3' no codificante se han señalado las posibles señales de poliadenilación (subrayadas en magenta).

10.1. Análisis de la región 5' no codificante del gen *HATI*

Se realizó un análisis *in silico* de esta región para buscar elementos reguladores de la transcripción, como son las secuencias TATA y las secuencias que determinan el lugar de inicio y eficiencia de la transcripción (Guarente, 1984).

Teniendo en cuenta el consenso descrito para cajas TATA en *S. cerevisiae*, TATA(A/T)A(A/T)(A/G), en la secuencia promotora del gen *HATI* únicamente se ha localizado una posible caja TATA en posición -288 (sombreada en naranja) con respecto al codón de inicio pero que difiere del consenso descrito para *S. cerevisiae* en un nucleótido (Basehoar *et al.*, 2004).

Otros elementos importantes para una transcripción efectiva en levaduras son las cajas CAAT. Se han localizado seis de estas secuencias (sombreadas en verde) en posiciones -22, -422, -604, -653, -866 y -888. Otro motivo característico de genes con elevado nivel de expresión en *S. cerevisiae* es el elemento CAAG, precedido de regiones ricas en C y T a 9-12 pb de dicho elemento. Se han encontrado seis motivos de estas características a -13, -361, -392, -549, -630 y -669 (sombreadas en malva) aunque no se han encontrado regiones especialmente ricas en C y T precediéndolos.

En la figura 27 se han señalado los elementos descritos y se han subrayado en azul, varias zonas ricas en T y A (timidina y adenina, respectivamente). Según diferentes autores, las regiones poli(A) y poli(T) así como la repetición de motivos TGGGA, TGA, CA o TG favorecen la expresión de los genes que las contienen pues desestabilizarían el posicionamiento de los nucleosomas en estas zonas (Anderson & Widom, 2001; Struhl, 1985). Considerando los 1000 pb aguas arriba del codón de inicio del gen *HATI*, se realizó un análisis *in silico* para la búsqueda de motivos de unión a factores de transcripción similar al realizado con el gen *GCN5*.

Con el programa *MatInspector* (<http://www.genomatix.de/products/index.html>) se localizaron tres sitios GATA implicados en diversas funciones, entre ellas, control metabólico de nitrógeno y procesos de conjugación, dos sitios NIT2 secuencia característica también de genes relacionados con el control del metabolismo del nitrógeno; un sitio MAT1MC, los sitios MATalfa1 y 2 y MCM1, todos ellos involucrados en *S. cerevisiae* con conjugación y respuesta a feromonas; el motivo GCR1 relacionado con la activación de genes implicados en glicólisis; el sitio de reconocimiento del factor transcripcional Gcn4p que controla genes relacionados con el metabolismo de aminoácidos y la secuencia de unión para MCB relacionado con la activación transcripcional específica durante la fase G1/S del ciclo celular.

Se amplió el estudio de esta zona promotora utilizando herramientas de la base de datos YEASTRACT (<http://www.yeasttract.com>), localizando así, la secuencia de unión a Adr1p, implicado en activación de genes involucrados en la biogénesis de los peroxisomas y la utilización de carbohidratos; un motivo de unión a Tec1p relacionado con morfogénesis;

varios sitios de unión para Fkh1p relacionado con silenciamiento de cromatina en *S. cerevisiae*; un sitio de unión para Swi5p activador transcripcional de genes expresados al final de la fase M/G1 y en G1.

Serían necesarios trabajos experimentales para comprobar si estos sitios son funcionales en *C. albicans*.

En posición -310 con respecto al ATG inicial de *HATI*, se localiza el codón de terminación del gen *DURI,2*. Ambos genes se encuentran en la cadena reversa (W, Watson), de modo que es posible que la secuencia promotora de *HATI* y la secuencia terminadora de *DURI, 2* se encuentren solapadas. Además, a 1321pb respecto del codón de parada de *HATI*, se encuentra el inicio del gen *PILI*, también en la misma cadena reversa (W), codifica una proteína de unión a Equinocandina específica de la morfología hifal.

10.2. Análisis de la región 3' no codificante del gen *HATI*

En la región terminadora de los genes se encuentran secuencias de reconocimiento para la finalización del proceso de transcripción y el procesamiento del RNA mensajero.

Como ya se ha indicado anteriormente, numerosos estudios indican que en levaduras las secuencias necesarias para la poliadenilación no contienen motivos conservados (Guo & Sherman, 1996).

Siguiendo el mismo procedimiento que con el gen *GCN5*, se buscaron señales de poliadenilación en la región terminadora de *HATI* con el programa *HCpolya* del servidor Webgene (http://125.itba.mi.cnr.it/~webgene/wwwHC_polya.html), del *Institute for Biomedical Technologies ITB –CNR*, Italia). Dentro de los 300 nucleótidos siguientes al codón de parada del gen *HATI* se localizaron 3 secuencias (subrayadas en color magenta en la figura 27) que se inician en las posiciones 90, 110 y 118. Se requieren estudios específicos para confirmar que estas secuencias son funcionales.

10.3. Estudio de la región codificante del gen *HATI*

Como ya se ha expuesto anteriormente, en levaduras el entorno del codón de inicio presenta una secuencia consenso característica, que en el caso de *S. cerevisiae* se ajusta al patrón: (A/Y)A(A/Y)AATGTCT, donde Y es una pirimidina (Cigan & Donahue, 1987).

Por homología, hemos buscado dicha secuencia en la zona de inicio de *HATI*. La secuencia encontrada presenta la estructura ATCAATGTCA, similar a la secuencia consenso de *S. cerevisiae*, sin embargo, al igual que ocurre con *GCN5*, no conserva la adenina en la posición -3 (Dobson *et al.*, 1982).

Según el código genético universal, el codón CUG que se traduce por leucina, es traducido por serina en el caso de *Candida albicans* así como en otras especies del mismo género (Ohama *et al.*, 1993; Sugiyama *et al.*, 1995; Yokogawa *et al.*, 1992).

Cabe destacar la presencia del codón CTG en las posiciones 309 y 679 respecto del codón de inicio. Además, en la fase de lectura abierta de *HATI* no se han detectado intrones.

La composición nucleotídica de la ORF del gen *HATI* se encuentra en la tabla X

Tabla X.- Composición nucleotídica de *HATI*.

Base	Nº de bases	%
A	480	38,65
G	231	18,6
C	168	13,53
T	363	29,23
A+T	843	67,87
G+C	399	32,13

El contenido en A/T es de 67,87%. En *C. albicans* el contenido genómico en A/T es del 65.3%; así pues, la composición nucleotídica del gen *HATI* está en consonancia con lo descrito para la mayoría de genes de *C. albicans* (Odds, 1988).

10.4. Análisis de la secuencia de aminoácidos de la proteína Hat1p

La proteína deducida de la secuencia de nucleótidos del gen *HATI* contiene 414 aminoácidos (Figura 1), con un peso molecular teórico de 48405,8 Da y un punto isoelectrico de 5,1 según el análisis realizado con el programa *ProtParam* (<http://www.expasy.ch/tools/protparam.html>) (Wilkins *et al.*, 1999). Estos datos se muestran en la tabla XI.

Tabla XI.- Propiedades físicoquímicas de Hat1p.

Análisis Hat1p		Aminoácidos	Número	%
Masa molecular	48405,85 Da	Ácidos (D, E)	73	17,63
Tamaño	414aa'	Básicos (K, R)	62	14,97
Punto isoelectrico	5,111	Hidrofóbicos (A,I,L,F,W,V)	141	34,05
Carga a pH7.0	-10,414	Polares (N,C,Q,S,T,Y)	103	24,87

Los tres aminoácidos más representados en la proteína son Lys (11,6 %), Leu (10,4%) y Asp (9,7%); datos obtenidos con el programa *ProtParam*.

Con el programa *FASTA* <http://www.ebi.ac.uk/fasta33>, se realizó el estudio de homología de la secuencia aminoacídica Hat1p (cepa SC5314) con otras proteínas presentes en la base de datos *UniProt*, mostrando porcentajes de identidad elevados con proteínas

caracterizadas como histona acetiltransferasas de otras especies fúngicas, siendo del 62,6% con una proteína no caracterizada de la levadura *Lodderomyces elongisporus* (A5DWR3), del 58,6% con Hat1p de *Debaryomyces hansenii* (Q6BSQ1) y del 43,8% con *Saccharomyces cerevisiae* (Q12341) entre otras levaduras. Con otras especies como en el caso de humanos y ratones, la homología es muy baja siendo inferior al 27%.

Si se tienen en cuenta los cambios conservativos entre los aminoácidos, el porcentaje de similitud con la proteína de *S. cerevisiae* es del 73,8%, con la de *D. hansenii* del 80,5% y con la proteína no caracterizada de *L. elongisporus* del 85,9%.

CaHat1p	MSSAKEQSSVTAA-LQPEQWTSSNEALKLFVTNP-EAALNFQPTFTYPIFGDAETIYGY	58
DhHat1p	MSDNSPITSIITAASLQPELWTSSSNDALQIYITDSGDALNHFHPNFTYPIFGDSEQIFGY	60
ScHat1p	-----MSANDFKPELWTSANEALRVSIVGE--NAVQFSPLFTYPIYGDSEKIYGY	49
	::* ::* *:*	
CaHat1p	KLDLIFLCFDHYTFKPFLLNIKYSAKLTDDPEIIDIKKTIDEFLLPKS-TIFKDEVKVVDSI	117
DhHat1p	RDLVIFLCFDHCTFYPLNVKYSDKLNDDT-LEDPREKLLSYLPES-TIFKDEVKVVDSI	118
ScHat1p	KDLIIHLAFDSVTFKPYVNVKYSAKLGGDN-IVDVEKKLLSFLPKDDVIVRDEAKVVDCF	108
	:** *.*.** ** *:*:*.*** ** ** : * :.: :.***. .*:**.****.:	
CaHat1p	KEEKDNGYKIPGKLID--SFSENDKEYDIYKIDLKS DNGYELHQRLQIIVLLFIEAGSFI	175
DhHat1p	NKEKE-GFEIPGELVGN-IFTHGDDKFGIYKLDLKN AQGLELHKRLQIIVLLFIEAGSYI	176
ScHat1p	AEERK-THNLSDVFEKVSEYSLNGEEFVVYKSSLVDDFARMHRRVQIFSLLFIEAANYI	167
	.: .:.. : :. :. :. :. * . . :*:*:*:*:*:*:*:*:*:*. :. :*	
CaHat1p	DAKDELWNLVLYEYKDNKSTSNNEPSIVGFTTAYNYWKYPGAKKFDS-TEQESRIKISQF	234
DhHat1p	DHQDELWDIYVMY----KVTDEKTPSIIIGFCTAYNYWKYGGFEKFDN-NQQEVRKKISQF	231
ScHat1p	DETDPSWQIYWLL-----NKKTKELIGFVTTYKYWHYLGAKSDFEDIDKKFRAKISQF	220
	* * *:*: : :. :. :. :.* *	
CaHat1p	IILPIYQGQGLGQLFYSHLFDKWLQAQDDIEVVVEDPNESFDDLDRADLKRNTSEQFD	294
DhHat1p	IIVLPMYQGLKLGGRFYNKLYEYWMQDPRVIEVVVEDPSESFDDLDRDCDLTRLCQNTIKV	291
ScHat1p	LIFPPYQNGHGSCLYEAIIQSWLEDKSIITEITVEDPNEAFDDLDRNDIQRRLKLGDA	280
	::* ** . * :*. : : * : : : * :.***.*:***** * : **	
CaHat1p	FKAVTPKVDKEWVEKTRRALKLEKRQFARLLEIILLYKLGKHYPGITKRDVRLFIKKRLY	354
DhHat1p	ASVDLPLINTEWATKLRQEQKLEKRQFSRLLEMI LIYQLEHNLTNITKKQVRLFIKKRLY	351
ScHat1p	VFQKHSDLSEDFLESSRSLKLEERQFNRLVEMLLLLNNSP-----SFELKVKNRLY	332
	. . * : . * : *:*:*** *:*:*:*: : * :*:**	
CaHat1p	DKNKEGLATLDDNTKKDKLQTAYQALEDYRILGDLKLNKRENDEEETDTVSKKQKV	413
DhHat1p	EKNKEILDGLDEPTRLDKLTAYASLES DYKRILSGLSL-HKRALDSTEGSSKKS KPNV	409
ScHat1p	IKNYDALDQTDPEKAREALQNSF ILVKDDYRRIIESINK-----SQG-----	374
	** : * * . : ** :. : :.*** **: :. : . : .	

Fig. 28.- Comparación con el programa ClustalW de las secuencias codificadas por el gen *HATI* de *S. cerevisiae*, de *D. hansenii* y *C. albicans*. Con el símbolo (*) se indican los residuos idénticos, los conservados se indican con (:) y los semiconservados con el símbolo (.). El dominio histona acetiltransferasa (PF10394) se muestra encuadrado en naranja.

En la figura 28 se muestra la comparación de secuencias proteicas con el programa *CLUSTALW* (<http://www.ebi.ac.uk/clustalw>) de histona acetiltransferasas de levaduras homólogas a CaHat1p.

La búsqueda de motivos funcionales se realizó en la base de datos *Pfam* <http://pfam.sanger.ac.uk/>. El análisis mostró la presencia del motivo histona acetiltransferasa Hat1 en el extremo amino terminal de la secuencia proteica de *C. albicans*. En la figura 29 se muestra la localización del dominio en diversas proteínas. Esta región también se ha señalado en el anillamiento tipo *ClustalW* con las acetiltransferasas de histonas homólogas de *S. cerevisiae* y *D. hansenii*.

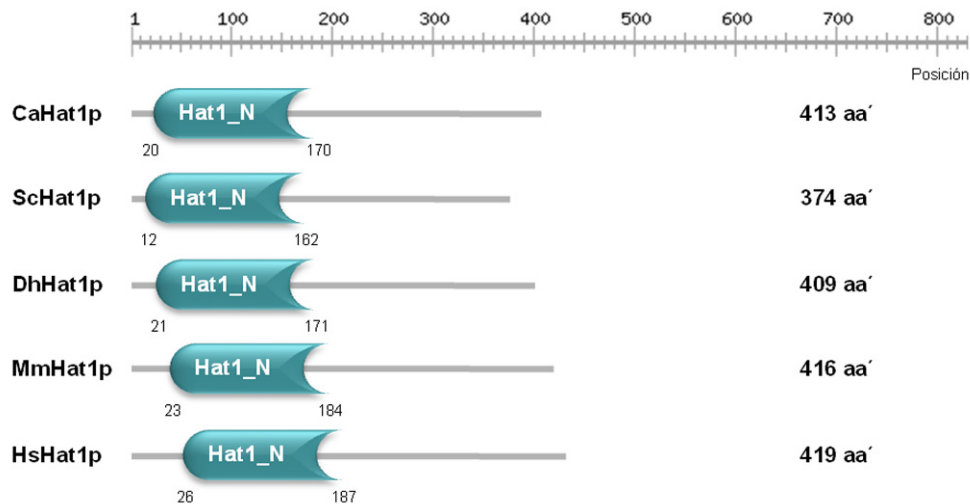


Fig. 29- Comparación de la disposición de dominios de Hat1p de *C. albicans* con la correspondiente a proteínas de secuencia similar en *S. cerevisiae* (ScHat1p), *D. hansenii* (DhHat1p), *Mus musculus* (MmHat1p) y *H. sapiens* (HsHat1p). La búsqueda de motivos funcionales se realizó en la base de datos *Pfam*.

11. ESTUDIO DE LA EXPRESIÓN DEL GEN *HAT1* DE *Candida albicans*

La expresión del gen *HAT1* durante el proceso de morfogénesis se estudió mediante *Northern Blot*. Para ello se aisló RNA de células recogidas a diferentes tiempos de inducción de micelio en medio Lee a 37°C (apartado 6.3. de Materiales y Métodos). Para diferenciar variaciones de expresión del gen no debidas a la transición dimórfica, se aisló como control RNA de células recogidas a los mismos tiempos pero creciendo como levaduras en medio Lee a 28°C.

Se observó la presencia de un RNA mensajero de aproximadamente 1,4 kb. Como se muestra en la figura 30, y al igual que ocurre con *GCN5*, la expresión del gen no parece regulada durante la transición levadura-hifa por temperatura en medio Lee a 37°C.

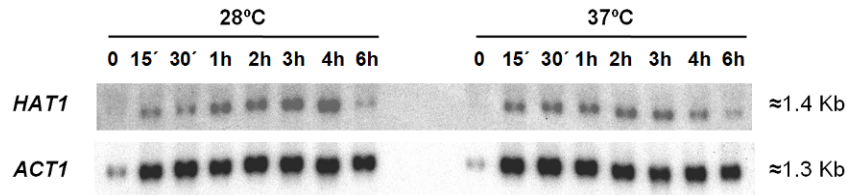


Fig. 30.- Expresión del gen *HAT1* en medio Lee durante la transición levadura-hifa a 37°C y durante el crecimiento en forma de levadura a 28°C. Como sonda se utilizó un fragmento de aproximadamente 400pb de la ORF del gen. La expresión del gen de la actina de *C. albicans* (*ACT1*) se empleó como control de carga.

12. CONSTRUCCIÓN DEL CASSETTE DE INTERRUPCIÓN DEL GEN *HAT1*

La construcción del *cassette* se realizó del mismo modo que para el gen *GCN5*. Se diseñaron los oligonucleótidos RD24 y RD17 (con los sitios de restricción *Not* I y *Spe* I respectivamente) para amplificar un fragmento de 459pb de la región promotora. Este fragmento se clonó en el vector pGEM-T (Promega), el plásmido resultante se denominó pRD2, fue digerido con las enzimas de restricción *Not* I y *Spe* I y el fragmento de 459 pb se purificó y subclonó en el plásmido pSNC1 que contiene el *cassette hisG-URA3-hisG*. El plásmido resultante se denominó pJBR2 y contiene la región 5' del gen (posiciones -364 a +95 pb respecto al codón de iniciación).

Con los oligonucleótidos RD18 y RD19 (sitios de restricción *Hind* III y *Xho* I respectivamente) se obtuvo un amplicón de 486 pb correspondiente a la región 3' (posiciones +1125 dentro de la ORF y +378 respecto del codón de parada respectivamente). Este amplicón se subclonó en pGEM-T, resultando el plásmido pRD1, el cual fue digerido con *Hind* III y *Xho* I. El fragmento obtenido se subclonó en el plásmido pJBR2 dando lugar al plásmido pJBR3. En la figura 31 se muestra el esquema con los diferentes pasos en la construcción del *cassette*. La secuencia de los oligonucleótidos empleados se recoge en la tabla IV del apartado 6.9.1. de Materiales y Métodos.

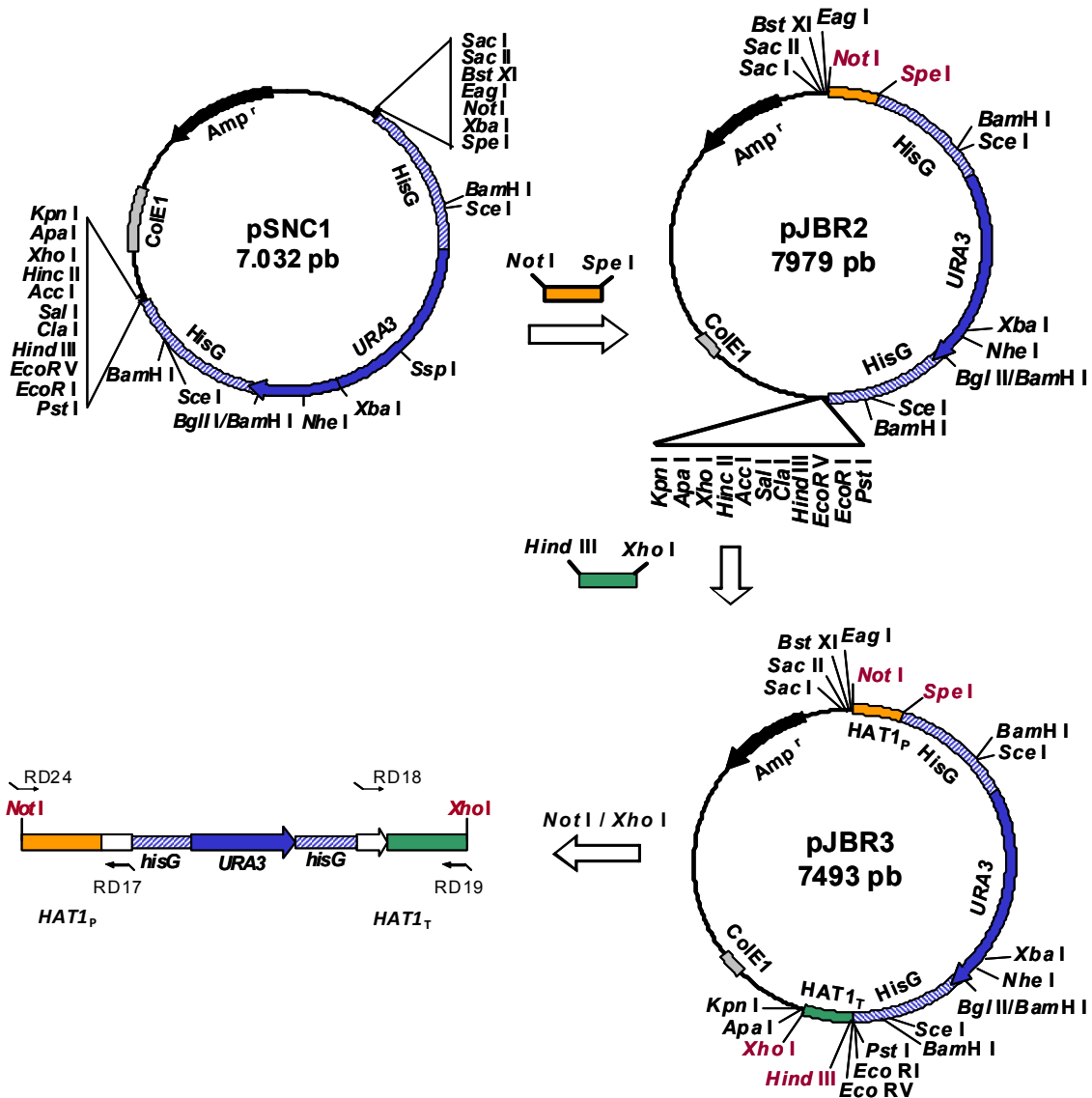


Fig. 31.- Esquema de la construcción del plásmido pJBR3 que contiene el *cassette* de interrupción *HisG-URA3-HisG* flanqueado por las regiones promotora (P) y terminadora (T) del gen *HAT1*. En el primer paso, se clonó el fragmento promotor en el plásmido pSNC1, obteniendo así el plásmido pJBR2, posteriormente se subclonó el fragmento terminador obteniendo el plásmido pJBR3 linealizado con las enzimas *Not I* y *Xho I* previamente a la transformación de protoplastos.

13. OBTENCIÓN DEL MUTANTE HOMOCIGÓTICO EN EL GEN *HAT1*

Tras la construcción del plásmido pJBR3, se procedió del mismo modo que con la interrupción del gen *GCN5*, usando la cepa CAI4 de *C. albicans* como parental.

Se obtuvieron protoplastos de CAI4 y se transformaron con 5, 10, 15 y 20 μ g de DNA del plásmido pJBR3 digerido con *Not I* y *Xho I*, enzimas que liberan el *cassette* (figura 31). La selección de las células que habían incorporado el *cassette* se llevó a cabo en medio mínimo suplementado con sorbitol 1M (apartado 2.2.1. de Materiales y Métodos). La correcta

integración del DNA lineal en el *locus* del gen *HATI* se verificó en cada paso mediante PCR. Para ello se obtuvo el DNA genómico de los transformantes y de la cepa parental.

Se obtuvieron 89 transformantes Ura⁺, 46 de ellos al emplear 15 µg de DNA plasmídico. De los primeros 20 transformantes analizados por PCR, 9 fueron positivos, se denominaron RGL1 seguido del número del clon. Se eligió al azar el clon 5 (cepa RGL1-5). A continuación se indujo la recombinación espontánea de las secuencias *hisG* homólogas para recuperar la auxotrofia para el uracilo. Para ello, la cepa RGL1-5 (Ura⁺) se inoculó en medio líquido YEPD suplementado con uridina incubándose durante 48h a 28°C.

Los revertientes se seleccionaron en medio mínimo con uridina y 5-FOA. A los 4 días de incubación ya se podían aislar colonias. De las 10 primeras colonias que se aislaron, 4 de ellas resultaron ser positivas en el análisis por PCR, se denominaron RGL2 (clones del 1 al 4). Para interrumpir el segundo alelo del gen *HATI*, se eligió el clon 1.

Con la cepa RGL2-1 se inició de nuevo el proceso de transformación con el plásmido pJBR3 digerido.

Se obtuvieron 165 transformantes, 75 de los cuales al utilizar 20 µg de DNA plasmídico. De 20 mutantes analizados por PCR, 2 resultaron ser positivos. Se seleccionó uno de estos mutantes positivos al que se denominó RGL3-14. Tras provocar la pérdida del gen *URA3* por recombinación intracromosómica en células de la cepa RGL3-14, los revertientes Ura⁻ se seleccionaron en placas de medio mínimo suplementadas con uridina y 5-FOA.

A los 8 días se podían observar colonias aisladas en las placas, se aislaron 20 transformantes Ura⁻ para su análisis por PCR y 11 de ellos resultaron positivos. Estos clones se denominaron RGL4 seguido del número de clon analizado.

Finalmente se comprobó mediante hibridación DNA-DNA (*Southern Blot*) cada etapa en el proceso de transformación. Para ello, el DNA genómico obtenido de las cepas CAI4, RGL1-5, RGL2-1, RGL3-14 y RGL4-4, fue digerido con *Ssp* I y se utilizó como sonda el amplicon de la región 5' obtenido con los oligonucleótidos RD17 y RD24 marcado con [α -³²P]dCTP (apartado 6.10.1. de Materiales y Métodos). En la figura 32 se muestra un esquema del genotipo esperado de los mutantes y la imagen del *Southern blot*.

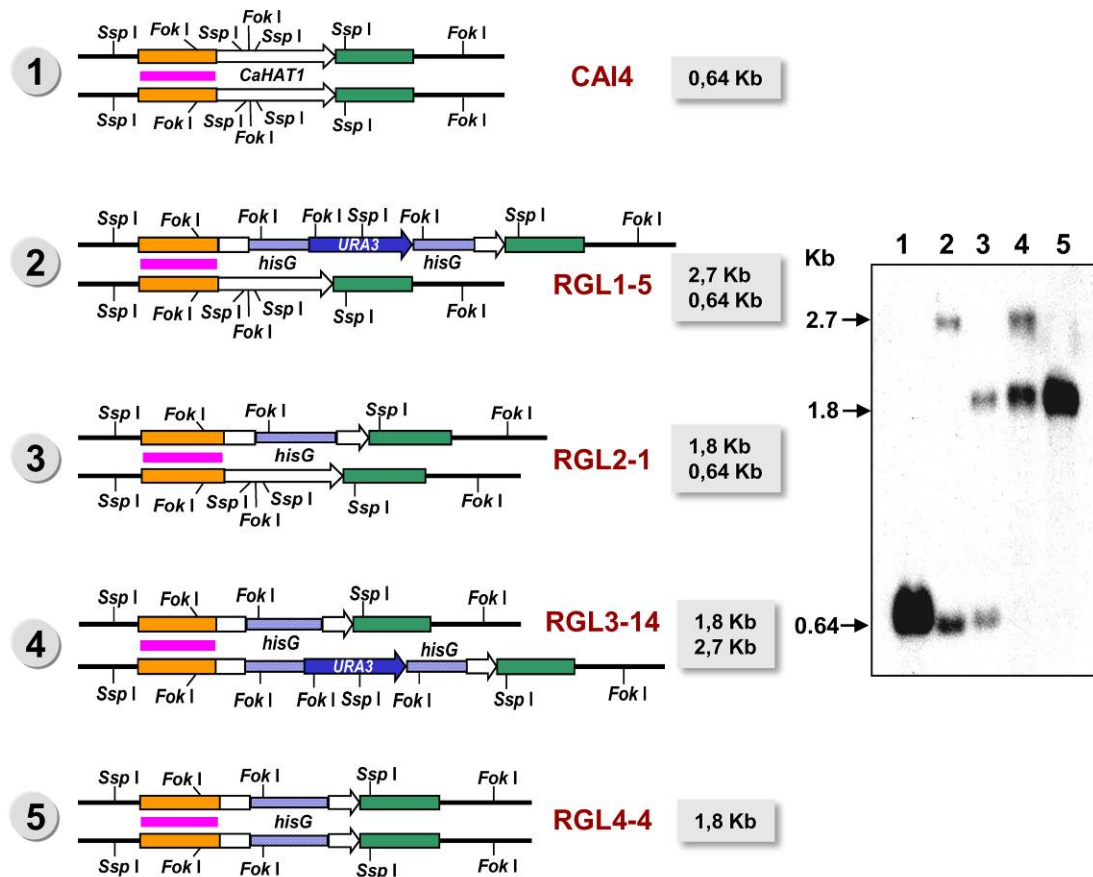


Fig. 32.- Esquema del genotipo en el locus *HAT1* en el tipo silvestre (calle1) y el genotipo esperado en los transformantes (calles 2, 3, 4 y 5) y su comprobación mediante hibridación DNA-DNA (*Southern Blot*). El DNA genómico fue digerido con la enzima de restricción *Ssp* I. La sonda empleada de 459pb corresponde al fragmento de la región promotora del gen *HAT1* amplificado con los oligonucleótidos RD24 y RD17. La banda de 0,64 kb corresponde al locus silvestre del gen *HAT1*, la de 2,7 kb al mismo locus deletado e interrumpido por el cassette *hisG-URA3-hisG* y la de 1,8 kb al mismo locus interrumpido únicamente por *hisG*. Las flechas señalan las bandas obtenidas y su correspondiente tamaño en kb.

Los estudios de localización celular realizados en nuestro laboratorio, sitúan a la proteína Hat1p en el núcleo (Rashki, Z., tesis doctoral 2009).

14. ANÁLISIS FENOTÍPICO DE LOS MUTANTES OBTENIDOS

14.1. Efecto de la delección del gen *HAT1* en el crecimiento y la morfología celular a 28°C

El crecimiento de las cepas deletadas en el gen *HAT1* (RGL2-1, RGL3-14 y RGL4-4) y de la cepa control (CAI4) en medio Lee, pH6,8 a 28°C, determinado por la medida de la D.O_{600nm} a lo largo del tiempo (figura 33), muestra que la ausencia de Hat1p, produce un ligero retraso, siendo más acusado en la cepa deletada en los dos alelos (cepa RGL4-4).

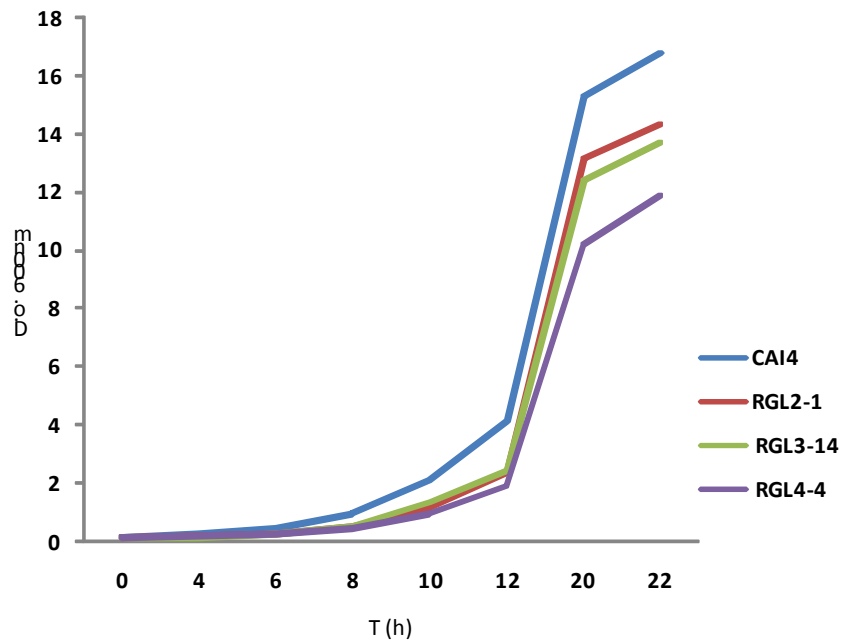


Fig. 33.- Curvas de crecimiento de la cepa parental CAI4 y de los mutantes en el gen *HAT1* en medio Lee, pH6.8 creciendo a 28°C.

La delección del gen *HAT1* en otros organismos como la levadura *S. cerevisiae* o en células DT40 de pollo no genera fenotipos apreciables ni retraso en el crecimiento (Barman *et al.*, 2006; Kleff *et al.*, 1995; Parthun *et al.*, 1996). La observación de preparaciones con el microscopio óptico durante el crecimiento a 28°C en medio mínimo (Lee), y en medio rico (YEPD) de células del mutante homocigoto RGL4-4 de *C. albicans*, nos muestra sin embargo, diferencias apreciables en la morfología celular de la cepa *hat1* como se muestra en la figura 34.

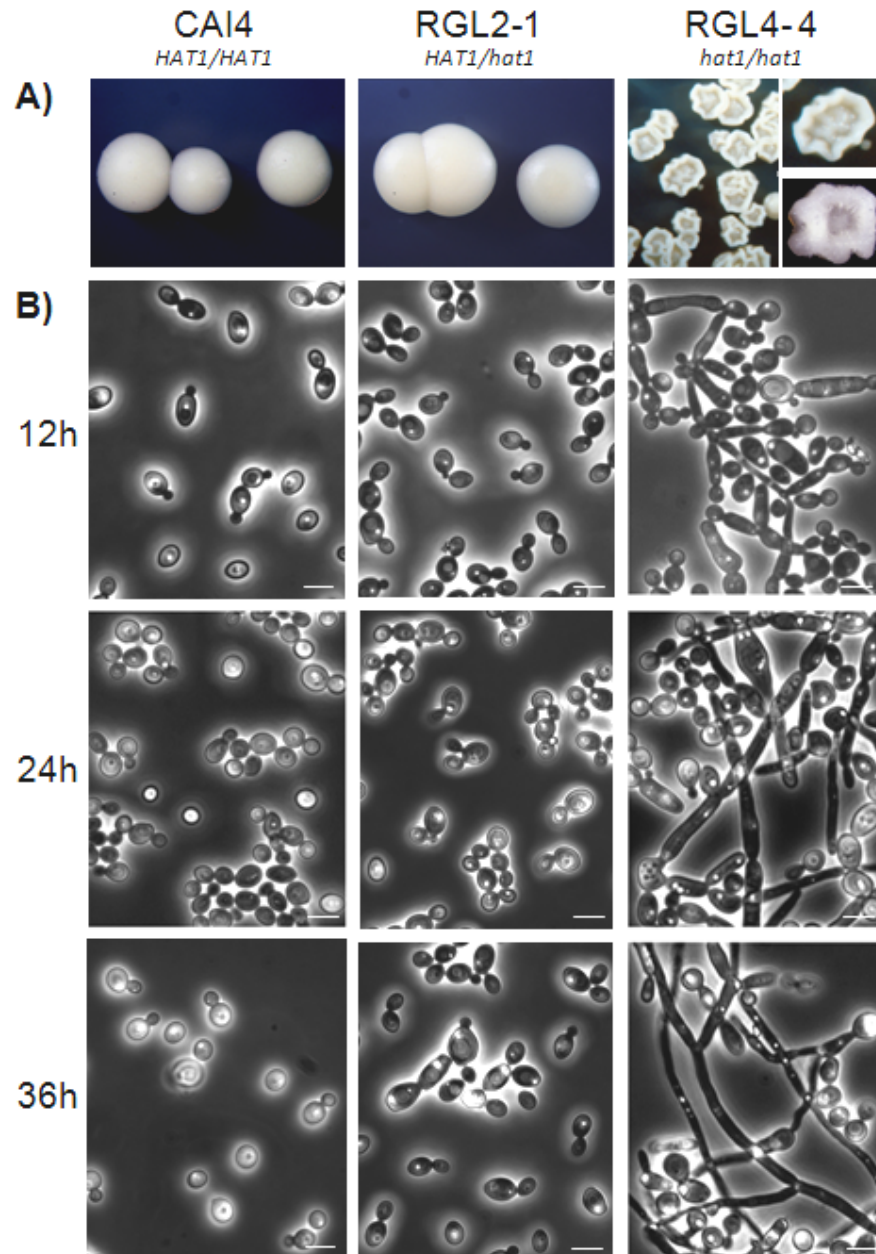


Fig. 34.- Morfología celular. **A)** Morfología de las colonias formadas por los mutantes *hat1* y la cepa parental CAI4 tras cuatro días de crecimiento a 28°C en YEPD sólido. **B)** Morfología celular de los mutantes *hat1* y de la cepa parental CAI4 tras inocular 1 colonia de cada cepa. Las fotografías se tomaron tras 12h de crecimiento en medio líquido Lee, pH 6.8 a 28°C. La barra equivale a 5 μm.

Las colonias de los mutantes homocigotos *hat1* (Fig. 34A) presentan forma irregular, están arrugadas, secas y muy tiesas, a diferencia de las colonias de cultivos silvestres que presentan un aspecto húmedo, forma redondeada, son lisas y blandas. Además, las colonias de los mutantes se estrañan con dificultad de modo que no se puede asegurar que las nuevas colonias proceden de una sola célula progenitora.

Las células de *hat1* en medio líquido tras 12h de crecimiento son levaduriformes, sin embargo se puede encontrar un alto porcentaje de células elongadas, de aproximadamente dos

veces la longitud de las células silvestres levaduriformes creciendo en similares condiciones. Tras 24h de crecimiento y sobre todo después de 36h de incubación, como puede verse en la figura 34B, muchas de estas células elongadas crecen formando gruesos filamentos, a veces bastante deformes con constricciones regulares. La morfología celular de los cultivos heterocigotos *hat1/HAT1* no se distingue de la del cultivo parental.

En la biología de *C. albicans*, una de las características que la definen es su plasticidad morfológica. Como ya se ha descrito anteriormente, podemos encontrarnos por un lado con típicas células levaduriformes y por otro, hifas de paredes paralelas y bien definidas. Entre estos dos extremos, *C. albicans* puede adoptar un conjunto muy variado de formas colectivamente conocidas como pseudohifas. En las pseudohifas, la célula hija se elonga y tras la formación del septo permanece unida a la célula madre, dando lugar a filamentos de diámetro variable formados por células elongadas con constricciones en la zona de los septos, mientras que en las hifas el septo se forma alejado de la base de la célula madre (Balish, 1973).

Con el objetivo de discernir si las células de este mutante formaban pseudohifas o filamentos verdaderos, se realizó una tinción con *calcofluor white* y DAPI para localizar los septos y los núcleos respectivamente. En la figura 35B y 35C, puede observarse que el primer septo, visualizado por la unión del *calcofluor* a la quitina, se localiza en la base de la estructura elongada, por lo tanto parece claro que el mutante *hat1* forma pseudohifas en medio líquido.

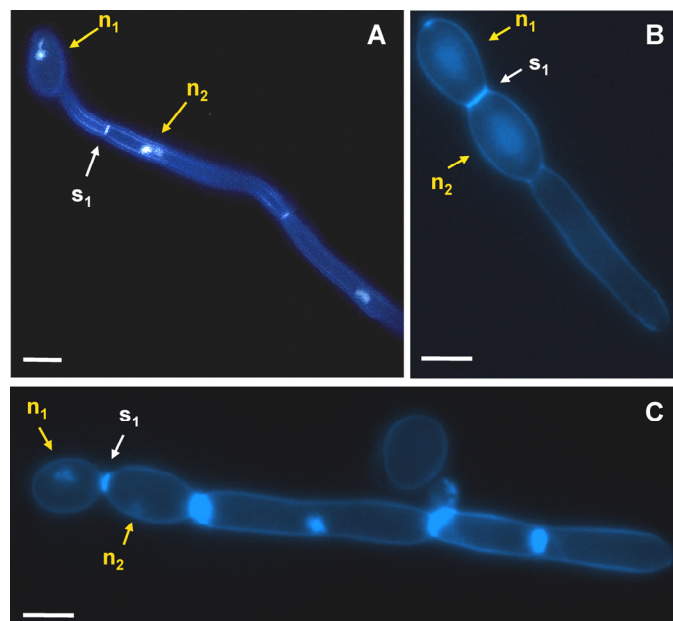


Fig. 35.- Tinción con *calcofluor white* y DAPI. A) hifas en la cepa parental CAI4 (*HAT1/HAT1*) (Martín, N. 2006, tesis doctoral); **B) y C)** células de la cepa RGL4-4 (*hat1/hat1*) recogidas tras 12h de crecimiento en YNB, pH 6.8 a 28°C. En cada imagen se ha señalado la posición de los 2 primeros núcleos (con flechas amarillas, n1 y n2) y del primer septo (con flechas blancas, s1). La barra equivale a 5µm.

14.2. Efecto de la delección del gen *HAT1* en filamentación

14.2.1. Análisis de la capacidad de filamentación en medio sólido

La observación de la morfología colonial, se realizó del mismo modo que con el mutante *gcn5*. Se inocularon células de las diferentes cepas (entre 50 y 100 ufc) en placas de diversos medios sólidos: *Spider*, YEPD con suero al 4%, Lee con NAcGlc al 1.25% y SLADH.

Tras varios días de incubación a 37°C se observó que al igual que las colonias de las cepas silvestres que se extendían formando filamentos, las cepas *hat1* filamentaban profusamente en medio SLADH y en menor medida en medio *Spider* estando ligeramente disminuido en el medio suplementado con suero, como se aprecia en la figura 36. El crecimiento bajo condiciones limitantes de nitrógeno que impone el medio SLADH induce en *S. cerevisiae* crecimiento invasivo o pseudofilamentoso (Gimeno *et al.*, 1992). En *C. albicans*, algunos mutantes defectivos en la formación de hifas en diversos medios como *sin3* filantan en este medio desarrollando pseudohifas (Monterola, F. 2002, tesis doctoral) y

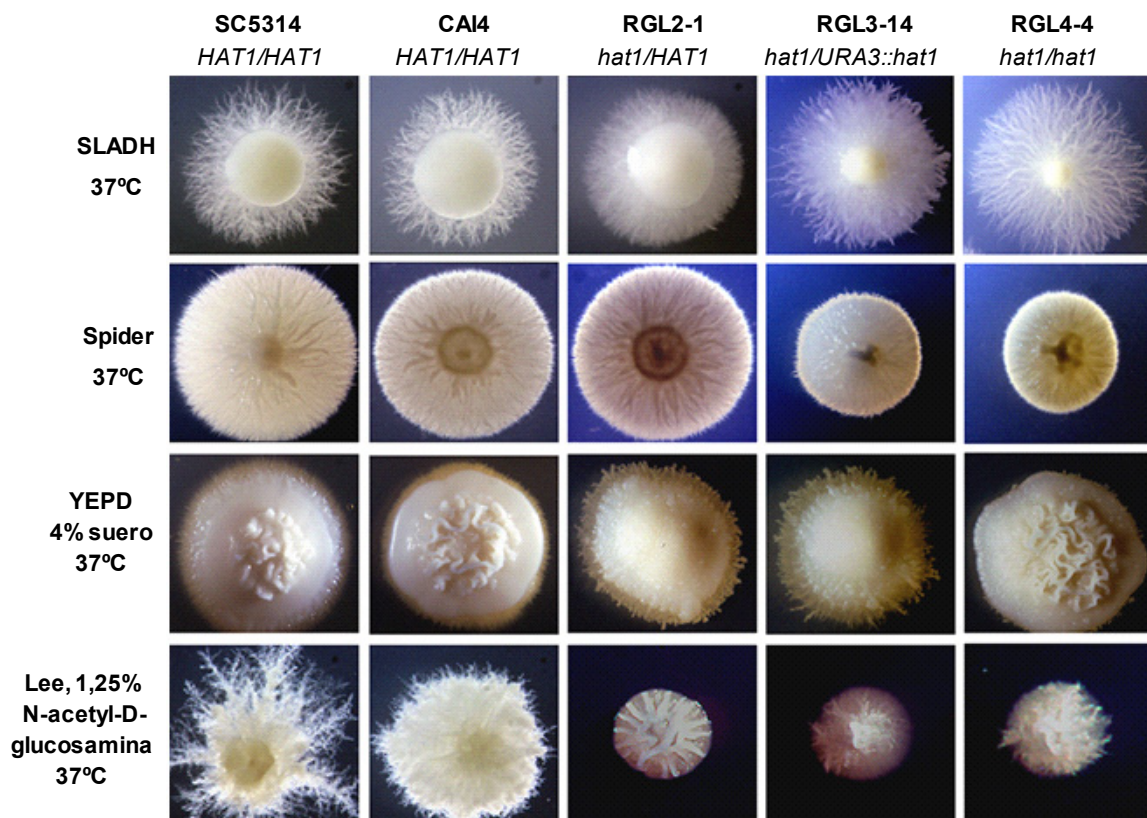


Fig. 36.- Inducción de la miceliación en medios sólidos. Morfología de las colonias de las cepas silvestres (CAI4 y SC5314), heterocigota (RGL2-1) y homocigotas para la delección de *HAT1* (RGL3-14 y RGL4-4) creciendo a 37 °C sobre medios sólidos inductores de la formación de micelio. Las fotografías se tomaron después de 4 días (*Spider* y Lee + suero 4%) ó 7 días de incubación (Lee-NAcGlc 1.25% y SLADH).

algunos se comportan como los mutantes *hat1*, presentando hiperinvasividad en medio SLADH como *ssk1* (Calera *et al.*, 2000) y *hog1* (Alonso-Monge *et al.*, 1999).

El crecimiento de *C. albicans* dentro de una matriz de agar induce una rápida filamentación (Brown & Botstein, 1999), incluso a temperaturas de incubación de 28°C, el factor inductor de este medio es probablemente la limitación de oxígeno (Ernst, 2000).

Como se muestra en la figura 37 se ha comprobado que la delección del gen *HAT1* causa también hiperfilamentación cuando las células crecen embebidas dentro del agar. La capacidad de las células de *C. albicans* de filamentar en presencia de una matriz circundante podría jugar un papel importante durante la infección de los tejidos del hospedador, ya que le proporciona capacidad de invasión (Giusani *et al.*, 2002).

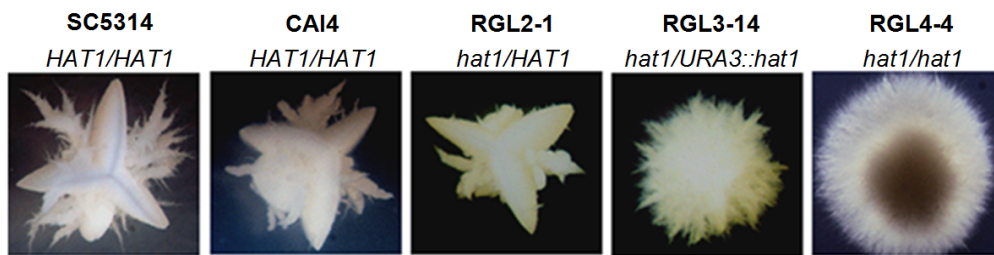


Fig. 37.- Aspecto de las colonias formadas por las cepas CAI4, SC5314, RGL2-1, RGL3-14 y RGL4-4 cuando crecen embebidas dentro de una matriz de agar.

El análisis del fenotipo en los medios mostrados en las figuras 36 y 37 permite determinar el efecto de diferentes factores de inducción sobre las cepas mutadas. Estos factores son limitación de nutrientes (medio *Spider*), presencia de inductores (suero y NAcGlc), fuente limitante de nitrógeno (medio SLADH) o presencia de una matriz circundante (*embedded*) (Ernst, 2000).

Los resultados que se muestran indican que la delección del gen *HAT1* afecta en cierto modo tanto a la morfología colonial como a la capacidad invasiva de *C. albicans*.

14.2.2. Análisis de la capacidad de filamentación en medio líquido

La siguiente aproximación experimental que llevamos a cabo fue observar la capacidad de filamentación de los mutantes, realizando un seguimiento del crecimiento en medio líquido de las distintas cepas empleando varios factores inductores de la transición levadura-hifa y comparándolo con el de la cepa parental CAI4, del mismo modo que se hizo con el mutante *gcn5*, siguiendo los protocolos descritos en el apartado 2.2.3. (Materiales y Métodos).

El seguimiento del fenómeno de filamentación de las diversas cepas, se realizó mediante observación microscópica y se tomaron fotografías a diferentes tiempos (0, 1, 2 y 4h) tras la inoculación en el medio inductor.

De las cuatro condiciones utilizadas para inducir la transición dimórfica, la temperatura parece ser el inductor más débil dado que en las fotografías que se muestran en la figura 38 se puede observar que aunque tras 1h de inducción la cepa heterocigota y las homocigotas para la delección del gen *HAT1* inician la formación de tubos germinativos al igual que la cepa parental, a medida que transcurre el tiempo, dichas cepas, no forman hifas profusamente como la cepa parental, si no que desarrollan algunas hifas y pseudohifas mayoritariamente.

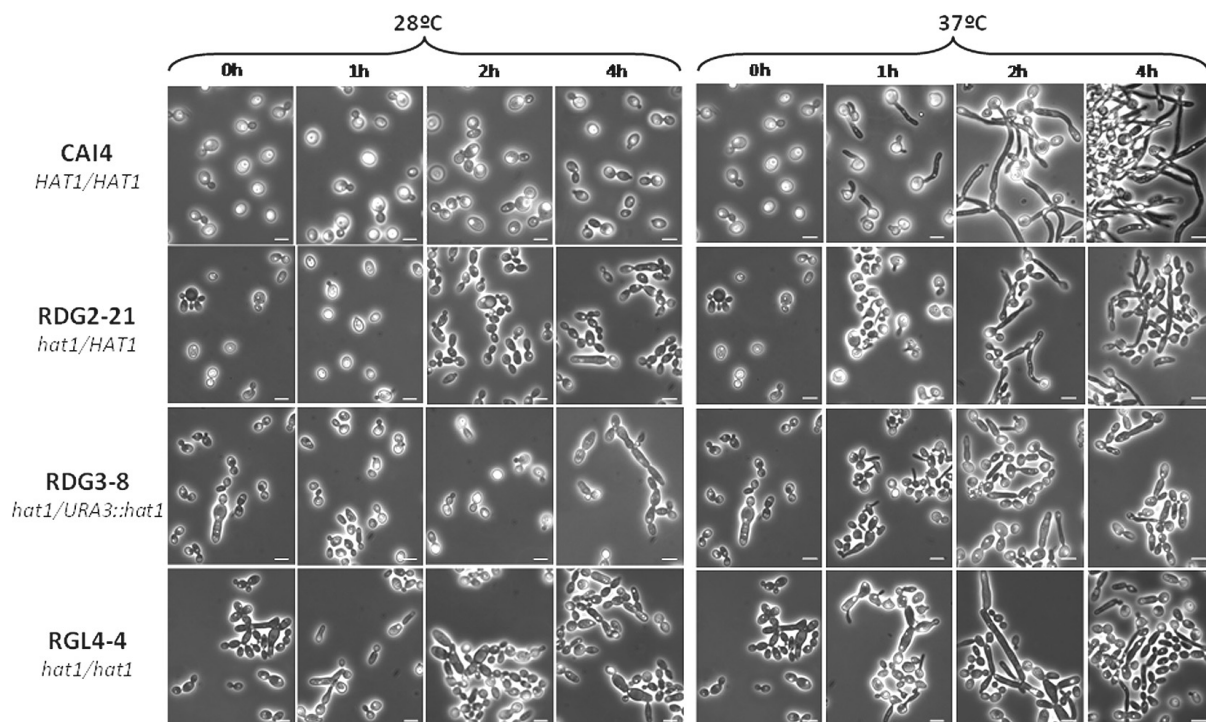


Fig. 38.- Inducción de micelio en medio líquido Lee, pH 6,8 a 37°C. Tras 1h de inducción, todas las cepas inician la formación del tubo germinativo en respuesta a la temperatura, sin embargo a medida que transcurre el tiempo, las cepas heterocigota y homocigotas para la delección del gen *HAT1* (cepas RGL2-1, RGL3-14 y RGL4-4 respectivamente) apenas forman hifas sino que desarrollan pseudohifas. La barra equivale

En las figuras 39, 40 y 41 se muestra la inducción de la transición por suero, cambio de pH y NAcGlc respectivamente. En estas condiciones la cepa heterocigota para la delección del gen *HATI*, forma hifas mientras que las cepas homocigotas para la delección, desarrollan hifas y pseudohifas. Por lo tanto, la delección de *HATI* afecta significativamente la transición levadura-hifa en las condiciones ensayadas.

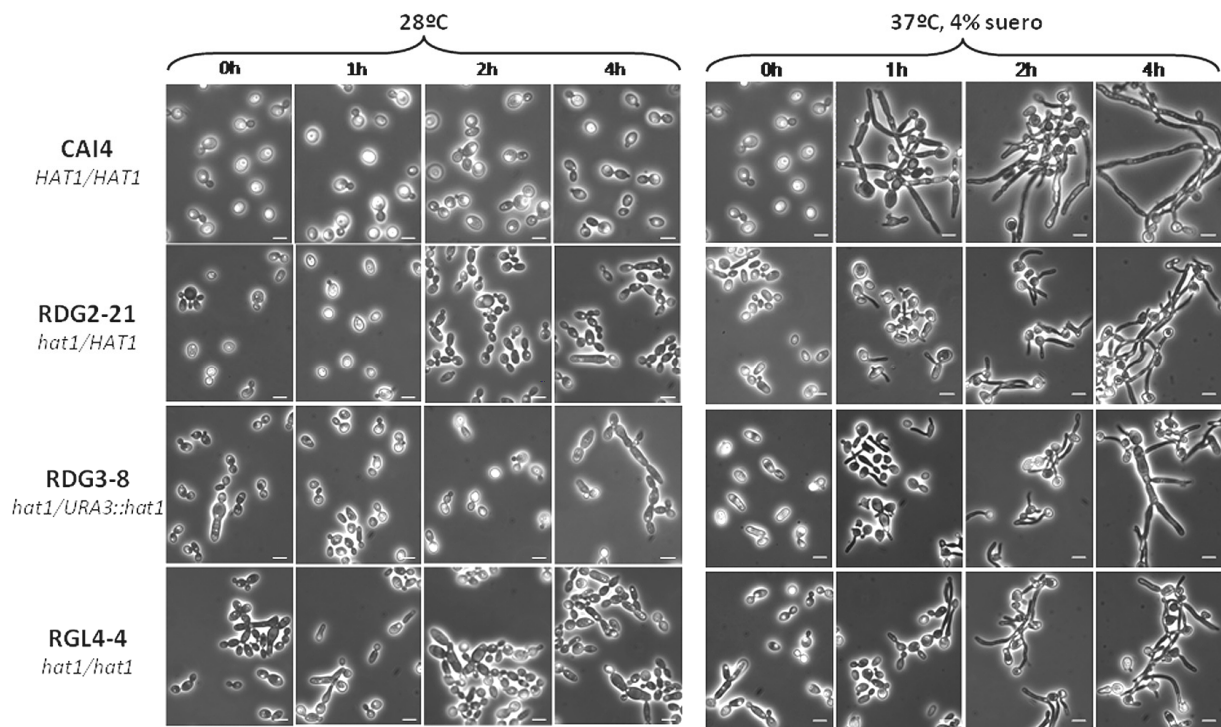


Fig. 39.- Inducción de micelio en medio líquido Lee, pH 6,8 a 37°C suplementado con suero al 4%. La cepa RGL2-1, heterocigota para la delección del gen *HATI*, forma hifas al igual que la cepa parental, en respuesta a la temperatura y al suero. Las cepas homocigotas para la delección, forman una mezcla de hifas y pseudohifas. La barra equivale a 5µm.

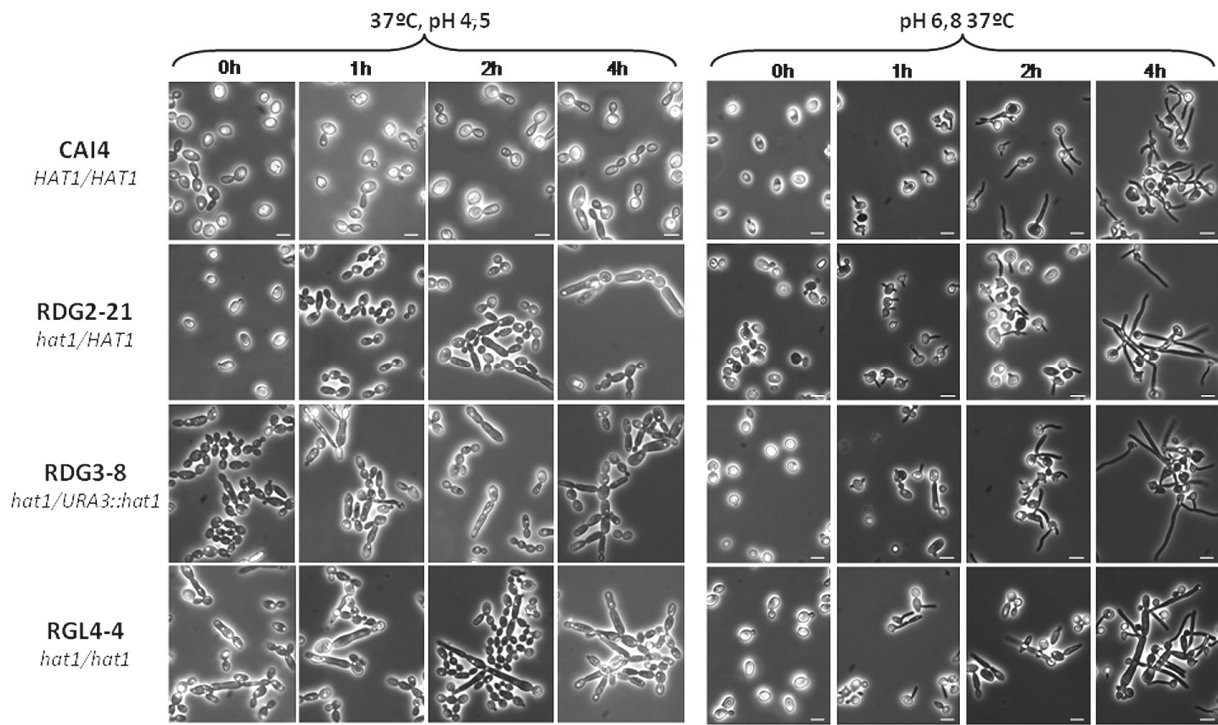


Fig. 40.- Inducción de micelio en medio líquido Lee, por cambio de pH. Al igual que la cepa parental CAI4, la cepa heterocigota para la delección del gen *HAT1* (RGL2-1) forma hifas en respuesta a pH neutro, mientras que las cepas homocigotas para la delección del gen, RGL3-14 y RGL4-4 respectivamente forman hifas y pseudohifas. La barra equivale a 5µm.

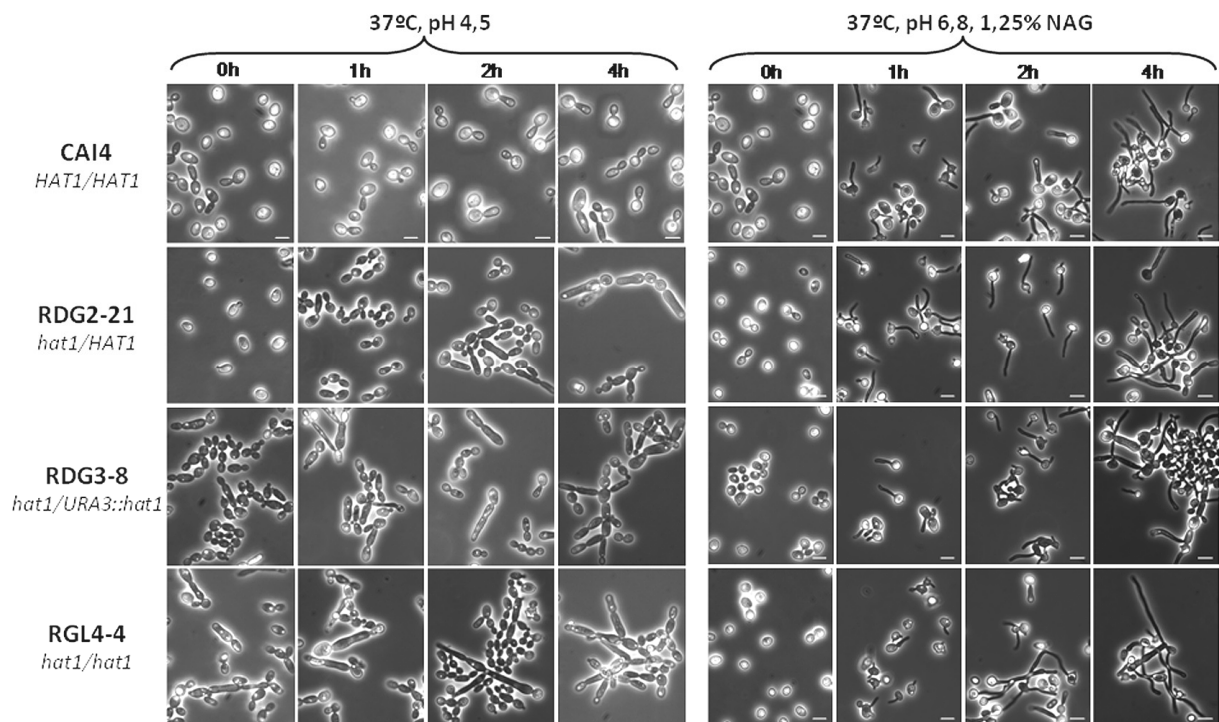


Fig. 41.- Inducción de micelio en medio líquido Lee, pH 6,8 a 37°C suplementado con 1,25% NAcGlc Tras 1h de inducción, todas las cepas inician la formación del tubo germinativo. Tras 4h de inducción las cepas mutantes muestran hifas y pseudohifas. La barra equivale a 5µm.

14.2.3. Efecto de la delección del gen *HAT1* en la formación de clamidosporas

La formación de clamidosporas en el mutante *hat1* se realizó de acuerdo al procedimiento descrito en el apartado 2.2.4 de Materiales y Métodos. Como se muestra en la figura 42 la cepa delecionada en el gen *HAT1* forma clamidosporas abundantemente. En todas las preparaciones analizadas se detectaron principalmente formas filamentosas repletas de estas estructuras. Por lo tanto, la mutación del gen *HAT1* no afecta a este proceso morfogénico en *C. albicans*.

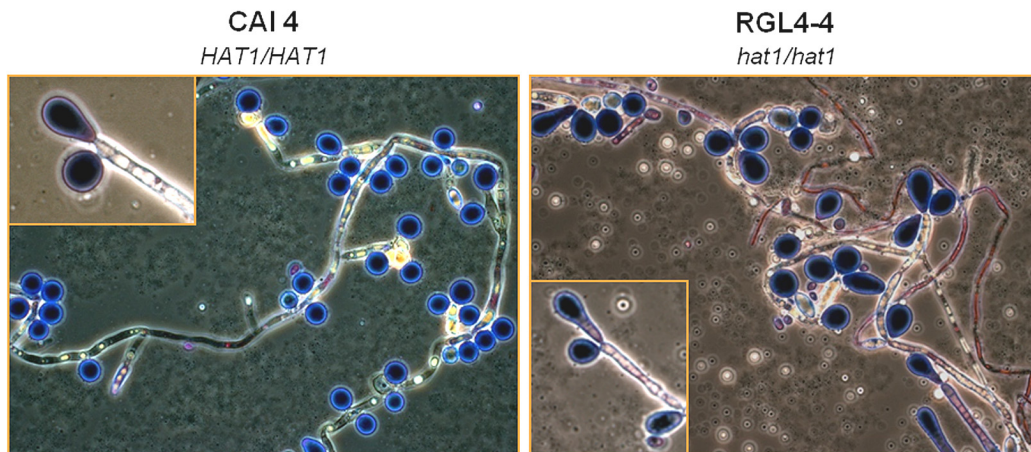


Fig. 42. Formación de clamidosporas en “corn meal agar”. Tras 10 días de incubación a 25°C, la cepa silvestre CAI4 y la delecionada en el gen *HAT1*, RGL4-4, forman clamidosporas (diferenciadas en azul oscuro mediante tinción con lactofenol-azul algodón).

15. PERFIL TRANSCRIPCIONAL DE LA CEPA RGL4-4 (*hat1/hat1*)

En el capítulo anterior, hemos mostrado cómo la ausencia de Gcn5p con función histona acetiltransferasa, causa alteraciones muy drásticas en la morfología de *C. albicans*. Como ya hemos indicado el gen *HAT1*, codifica también una proteína con función histona acetiltransferasa. Con la ausencia de esta proteína, hemos podido apreciar alteraciones en la morfología de las colonias formadas por este mutante además de que durante el crecimiento vegetativo a 28°C en medio líquido y durante la transición levadura-hifa, forma pseudohifas. Todas estas alteraciones están necesariamente relacionadas con modificaciones en la cromatina ya que todos estos procesos morfogénicos requieren de la expresión coordinada de numerosos genes.

Con el objetivo de obtener una aproximación global de los genes cuya expresión podría estar regulada por esta proteína, se llevó a cabo un análisis comparativo del perfil transcripcional de la cepa RGL4-4 (*hat1/hat1*) con el de la cepa parental CAI4 (*HAT1/HAT1*) utilizando microarrays de cDNA. El estudio se realizó durante el crecimiento exponencial

como levaduras en medio YNB a 28° y a tres tiempos diferentes (15 minutos, 1h y 3h) durante la transición levadura-hifa en medio Lee a 37°C.

15.1. Efecto de la delección del gen *HAT1* en la regulación de la expresión génica

La figura 43 muestra la morfología de las células en los cultivos utilizados para la comparación de los perfiles transcripcionales RGL4-4 (*hat1/hat1*) vs. CAI4 (*HAT1/HAT1*). Durante todo el proceso inductivo la cepa mutante RGL4-4 crece formando pseudohifas y células levaduriformes.

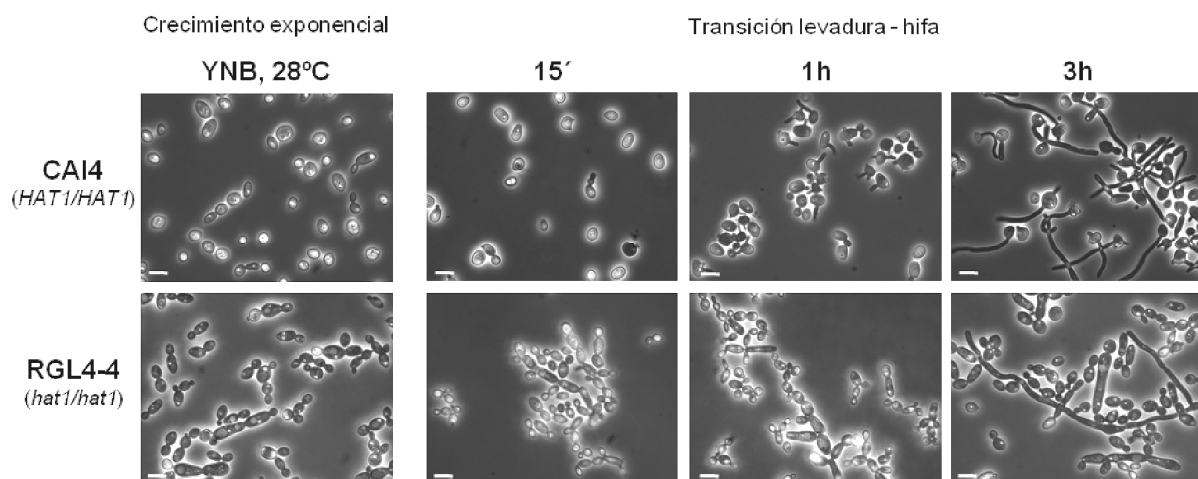


Fig. 43. Morfología de las células recogidas para el análisis del perfil transcripcional de las cepas RGL4 -4 (*hat1/hat1*) vs. CAI4 (*HAT1/HAT1*) en fase exponencial de crecimiento en YNB a 28°C y a diferentes tiempos durante la transición levadura – hifa a 37°C en medio Lee pH 6,8.

La relación de los genes expresados diferencialmente en cada condición experimental se obtuvo siguiendo los pasos que se indican en el apartado 8.7 de Materiales y Métodos.

Entre los genes identificados por el test estadístico se consideraron inicialmente sólo aquellos que presentaban un factor medio de variación mutante vs. cepa parental ≥ 1.5 , filtro de expresión diferencial comúnmente empleado en publicaciones sobre microarrays (e.j. Doedt *et al.*, 2004; Nantel *et al.*, 2002). Sin embargo, al igual que en el análisis realizado con *gcn5*, en algunos casos resultó interesante realizar el estudio teniendo en cuenta valores de expresión diferencial menores, tal y como se indica en los apartados correspondientes.

En la figura 44A se ha indicado el número de genes expresados diferencialmente en la cepa RGL4-4 (*hat1/hat1*) vs. CAI4 (*HAT1/HAT1*) en cada condición. Considerando un factor medio de variación mutante vs. cepa parental $\geq 1,5$; se detectó que la expresión de 140 genes se encuentra alterada por la delección de *HAT1* en al menos una de las condiciones analizadas. El nombre y descripción de cada uno de ellos se ha incluido en el material suplementario.

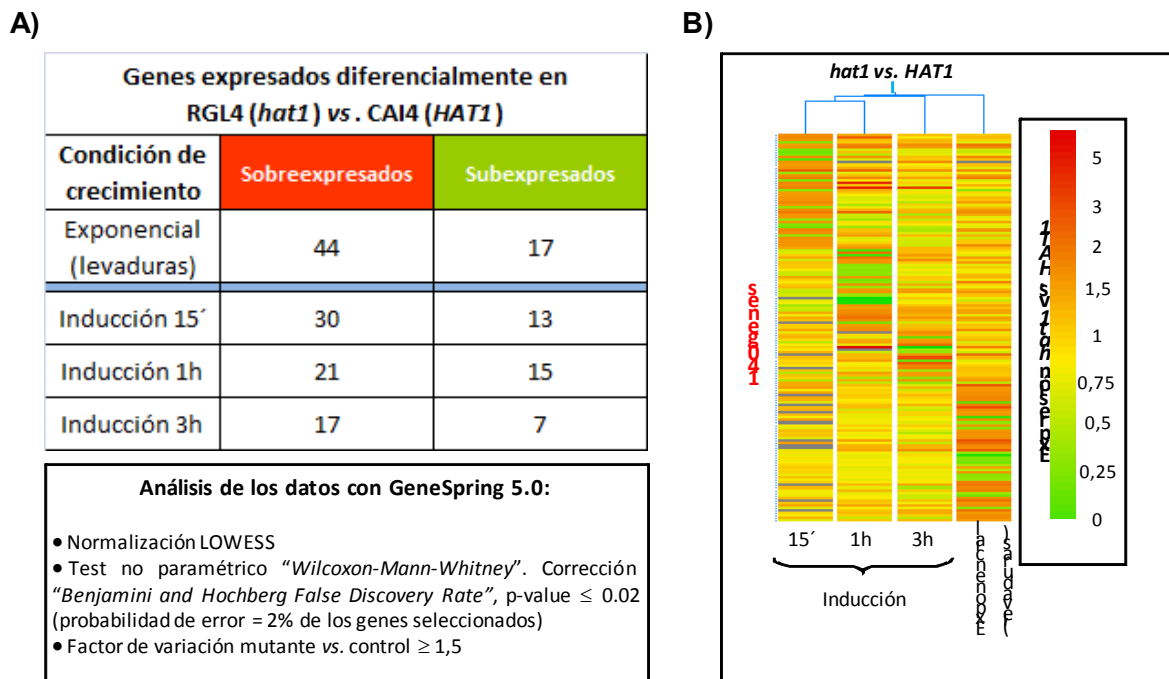


Fig. 44. **A)** Número de genes expresados diferencialmente en la cepa RGL4-4 (*hat1/hat1*) vs. CAI4 (*HAT1/HAT1*) en cada una de las condiciones analizadas. **B)** Agrupación (*cluster*) de los experimentos según la similitud de los resultados de expresión, considerando los 140 genes expresados diferencialmente en *hat1*. Cada línea representa un gen y el color refleja la variación de su expresión respecto a la cepa parental en las cuatro condiciones de crecimiento (Análisis basado en los valores de correlación estándar realizado con las herramientas del programa *GeneSpring* 5.0).

Las cuatro condiciones analizadas se agruparon por la similitud de los resultados obtenidos mediante análisis tipo *cluster* como se muestra en la figura 44B.

15.2. Análisis del perfil transcripcional de la cepa RGL4-4 (*hat1/hat1*) durante el crecimiento exponencial a 28°C. Distribución de los genes expresados diferencialmente en categorías funcionales

Durante el crecimiento exponencial del mutante *hat1* en medio mínimo (YNB) a 28°C se ha detectado la alteración de 61 genes.

De estos genes, 44 aparecen sobreexpresados y 17 subexpresados con respecto a la cepa parental CAI4, como se muestra en la figura 44A y en el material suplementario. Utilizando los tres criterios de la terminología *GO* (*Gene Ontologies*), utilizando la herramienta *GO TermFinder* disponible en la base de datos *Candida Genome Database*, los genes expresados diferencialmente se distribuyeron en categorías funcionales, como se muestra en la tabla XII (genes sobreexpresados).

Categoría Go ^a	Frecuencia de la categoría GO para:		Valor-P ^d	Genes ^e
	Muestra en estudio ^b	Genoma de <i>C. albicans</i> ^c		
Activación transcripcional (GO:0016563, F)	11,6% (5)	1,0% (67)	0.00224	<i>CTA24, CTA2, TCC1, RIM101, CTA26</i>
Transporte transmembranal de glucosa (GO:0005355, F)	7,0% (3)	0,3% (20)	0.00879	<i>HGT6, HGT8, HGT7</i>
Nucleosoma (GO:0000786, C)	7,0% (3)	0,2% (13)	0.00319	<i>HHF1, HHT21, HHT1</i>

Tabla XII. Relación de las categorías funcionales más representadas en el grupo de genes sobreexpresados durante el crecimiento exponencial en el mutante *hat1* vs. *HAT1*. (*)

(a) Los genes sobreexpresados se clasificaron según la terminología *GO* usando la herramienta *GO Term Finder* de la base de datos CGD. En la primera columna se indica el número de acceso de la categoría *GO*, seguido del término ontológico correspondiente entre paréntesis. P, proceso biológico; C, componente celular; F, función molecular.

(b) Entre paréntesis se muestra el número de genes clasificado en cada categoría *GO*. El porcentaje se ha calculado dividiendo el número de genes clasificado en cada categoría *GO* entre el número total de genes sobreexpresados (43 genes clasificados en *GO Term Finder* de los 44 genes sobreexpresados con factor de variación $\geq 1,5$).

(c) El número de genes del genoma de *C. albicans* asociado con cada categoría *GO* se indica entre paréntesis. El porcentaje se ha calculado dividiendo ese valor entre el número total de genes anotados del genoma de *C. albicans* en la base de datos CGD en el momento de hacer este análisis (6.435 genes).

(d) Los valores de *P* para las categorías sobrerrepresentadas se han calculado automáticamente usando una distribución hipergeométrica con corrección de hipótesis múltiple, como se describe en la página *web* de la base de datos CGD (<http://www.candidagenome.org/help/goTermFinder.shtml>). El valor de corte de *P* en este análisis es $P \leq 0,1$. Cuanto más cercano es el valor de *P* a 0, menor es la probabilidad de que el término *GO* asignado a un grupo de genes se haya dado por azar.

(e) Los nombres de los genes siguen la nomenclatura propuesta en la base de datos CGD. Como puede observarse en la tabla, algunos genes se han asociado con más de una categoría *GO*.

(*) La tabla muestra solamente una porción de los 44 genes sobreexpresados durante el crecimiento exponencial.

En la tabla XIII se indican los genes representativos de dichas categorías funcionales, con su función y factor de variación correspondiente. En el caso de los 17 genes subexpresados, como no se obtuvieron categorías representativas, sólo se indican en la tabla XIV su función y factor de variación correspondiente.

Nom bre Común	Nom bre sistemático (ORF)	Función	Factor de variación
Genes sobreexpresados			
Activación transcripcional			
<i>CTA26</i>	orf19.7680	Posible activador transcripcional	2,227
<i>CTA24</i>	orf19.4054	Posible activador transcripcional	1,906
<i>CTA21</i>	orf19.6112	Posible activador transcripcional	2,154
<i>TCC1</i>	orf19.6734	Proteína implicada en regulación del crecimiento filamentoso y en virulencia	1,535
<i>RIM101</i>	orf19.7247	Factor transcripcional implicado en respuesta a pH alcalino	1,675
<i>TLO34*</i>	orf19.2661	Miembro no telomérico de una familia de genes teloméricos, función desconocida	2,364
<i>TLO9*</i>	orf19.362	Miembro de una familia de genes teloméricos, función desconocida	2,485
<i>TLO10*</i>	orf19.3074	Miembro de una familia de genes teloméricos, función desconocida	1,857
<i>TLO4*</i>	orf19.7276.1	Miembro de una familia de genes teloméricos, función desconocida	1,569
<i>TLO11*</i>	orf19.5700	Miembro de una familia de genes teloméricos, función desconocida	3,084
Transporte de glucosa			
<i>HGT6</i>	orf19.2020	Posible transportador de glucosa	1,983
<i>HGT7</i>	orf19.2023	Posible transportador de glucosa	2,76
<i>HGT8</i>	orf19.2021	Posible transportador de glucosa	3,117
Nucleosoma			
<i>HHT1</i>	orf19.6791	Posible histona H3	1,843
<i>HHT21</i>	orf19.1061	Posible histona H3	1,964
<i>HHF1</i>	orf19.1059	Posible histona H4	1,739

Tabla XIII.- Relación de genes sobreexpresados de las categorías funcionales más representativas con su función y factor de variación. La tabla muestra solamente una porción de los 44 genes sobreexpresados durante el crecimiento exponencial.

(*) genes sobreexpresados que pertenecen a la familia de genes TLO pero que no han sido clasificados por la herramienta *GO Term Finder* en la categoría indicada.

De este modo, se pusieron de manifiesto las categorías funcionales más representadas debido a la mutación del gen *HAT1*. Al igual que con los datos obtenidos con el mutante *gcn5*, los datos obtenidos con los microarrays de *hat1*, se analizaron con el programa *T-profiler* <http://www.t-profiler.org> (Boorsma *et al.*, 2005) que permite analizar la expresión global de *C. albicans* y *S. cerevisiae* (ver apartado 8.7.3. de Materiales y Métodos).

Nombre Común	Nombre sistemático (ORF)	Función	Factor de variación
Genes subexpresados			
Sin categoría funcional asignada			
-	orf19.6957.3	Función des conocida	0,757
-	orf 19.3610	Función des conocida	0,701
<i>DAL7</i>	orf 19.5023	Posible alantoato permeasa	0,639
-	orf 19.5701	Función des conocida	0,581
-	orf 19.7042	Función des conocida	0,555
-	orf 19.872	Función des conocida	0,643
-	orf 19.7675	Función des conocida	0,601
-	orf 19.1995	Función des conocida	0,63
<i>MNS1</i>	orf 19.1036	alfa-1,2-manosidasa	0,586
-	orf 19.1007	Posible factor transcripcional con motivo de union a bZIP en DNA	0,524
<i>NDH51</i>	orf 19.4495	adenina dinucleótido deshidrogenasa, subunidad del complejo I	0,638
-	orf 19.6315	Función des conocida	0,542
<i>ERG24</i>	orf 19.1598	C-14 esteroles reductasa	0,519
-	orf 19.1890	Función des conocida	0,375
-	orf 19.6246	Función des conocida	0,619
<i>PGA26</i>	orf 19.2475	Posible proteína GPI de función desconocida	0,163
-	orf 19.811	Función des conocida	0,239

Tabla XIV.- Relación de genes subexpresados de las categorías funcionales más representativas con su función y factor de variación.

Entre los genes sobreexpresados durante el crecimiento exponencial de este mutante, las categorías que aparecen sobrerrepresentadas son **activación transcripcional** (GO: 0016563) y **transporte transmembranal de glucosa** (GO: 0005355) según el criterio de función molecular y en función del componente celular, la categoría más representada es **nucleosoma** (GO: 0000786).

En la categoría activación transcripcional, se engloban los genes *CTA24*, *CTA2*, *TCC1*, *RIM101* y *CTA26*. Los genes *CTA24* (*TLO12*), *CTA2* (*TLO3*) y *CTA26* (*TLO2*) pertenecen a una familia de 15 genes casi exclusiva de *C. albicans* llamada TLO (*TeLQmerase-associated genes*) por la localización de sus miembros en 14 de los 16 telómeros de *C. albicans*. Resulta interesante tener en cuenta que aunque la herramienta *GO Term Finder* no los ha clasificado dentro de esta categoría debido posiblemente a que no hay homólogos en otros organismos y su función no está clara, también aparecen sobreexpresados otros 5 miembros de esta familia: *TLO34*, *TLO9*, *TLO10*, *TLO4* y *TLO11*. Sin tener en cuenta estos 5 genes, la categoría concentra el 11,6% de los genes del grupo frente al 1,0% que representan en el conjunto del

genoma, por lo que los procesos de activación transcripcional relacionados con esta familia de genes son los más afectados en el mutante *hat1*.

El primer gen de esta familia, *CTA2* fue identificado en un rastreo de dominios proteicos de *C. albicans* por su capacidad trans-activadora en *S. cerevisiae* (Kaiser *et al.*, 1999), sin embargo, la función de estos genes en *C. albicans*, aún no se ha determinado. Solamente hay 2 genes en la secuencia de *C. dubliniensis* con similitud a la familia TLO (*CdTLO1* y *CdTLO2*) y sólo uno de ellos tiene localización subtelomérica. En un estudio muy reciente, se construyó el mutante nulo en el gen *CdTLO1* en *C. dubliniensis*, observándose una reducción en la formación de hifas en presencia de suero y la posterior complementación con los genes *CaTLO11* y *CaCTA24* subsanó dicho defecto. Puesto que hay diferencias significativas en la virulencia entre *C. albicans* y *C. dubliniensis*, podría plantearse un posible papel de los genes de esta familia en patogénesis y morfogénesis (Jackson *et al.*, 2009; van het Hoog *et al.*, 2007).

Varios genes de la familia TLO se encuentran desregulados en otros trabajos basados en el análisis de microarrays de *C. albicans*. En el mutante *sin3*, nueve secuencias se encuentran sobreexpresadas (Martín, N., 2006, tesis doctoral) y en el mutante *efg1* los genes *CTA21*, *CTA24* y *CTA26* también se encuentran sobreexpresados con respecto a la cepa silvestre (Doedt *et al.*, 2004). En la cepa WO-1 el gen *CTA26* se encuentra sobreexpresado en la fase opaca respecto a la fase blanca, mientras que otros genes de la familia aparecen subexpresados en esta fase (Lan *et al.*, 2002). Resulta interesante tener en cuenta que en estos tres casos, fase opaca de la cepa WO-1, ausencia de Efg1p y ausencia de Sin3p, las células presentan una morfología alargada similar (Doedt *et al.*, 2004; Slutsky *et al.*, 1987). Como ya se ha descrito anteriormente, también el mutante *hat1* presenta alterada su morfología ya que en medio líquido la mayoría de las células aparecen elongadas.

En otro estudio, Nantel *et al.*, (2002) señalaron que la expresión del gen *CTA2* se incrementa durante la transición levadura-hifa, por lo que esta familia de genes podría estar relacionada con la regulación de la morfogénesis en *C. albicans*.

Otros dos genes sobreexpresados en este mutante son *RIM101* y *TCC1*, ambos son activadores transcripcionales de la filamentación.

La segunda categoría sobrerrepresentada engloba tres genes implicados en el transporte de glucosa: *HGT6*, *HGT7* y *HGT8*. La sobreexpresión de estos genes concuerda con estudios fisiológicos que demuestran que en *C. albicans* se produce una transición desde la respiración aeróbica hacia la glucólisis anaeróbica y la fermentación cuando se induce el cambio dimórfico (Land *et al.*, 1975).

Por último cabe destacar la categoría que afecta al nucleosoma, con la sobreexpresión de los genes *HHF1* y *HHT1* que codifican la histona H3 y el gen *HHT21* que codifica la histona H4.

Entre los genes subexpresados, (tabla XIV), no aparece ninguna categoría significativa, incluso tras realizar el análisis con un mayor número de genes tras considerar un factor de variación de 1,3. De los 17 genes subexpresados considerando un factor de variación de 1,5; 12 no tienen función asignada en la base de datos CGD.

15.3. Análisis del perfil transcripcional de la cepa RGL4-4 (*hat1/hat1*) durante la transición dimórfica a 37°C

El análisis del perfil transcripcional del mutante *hat1* frente a la cepa parental durante la transición dimórfica nos muestra que la ausencia del gen *HAT1* altera la expresión de al menos 100 genes con un factor de variación $\geq 1,5$.

Los mayores niveles de variación se observaron a los 15 minutos de inducción como puede verse en el gráfico de la figura 45A.

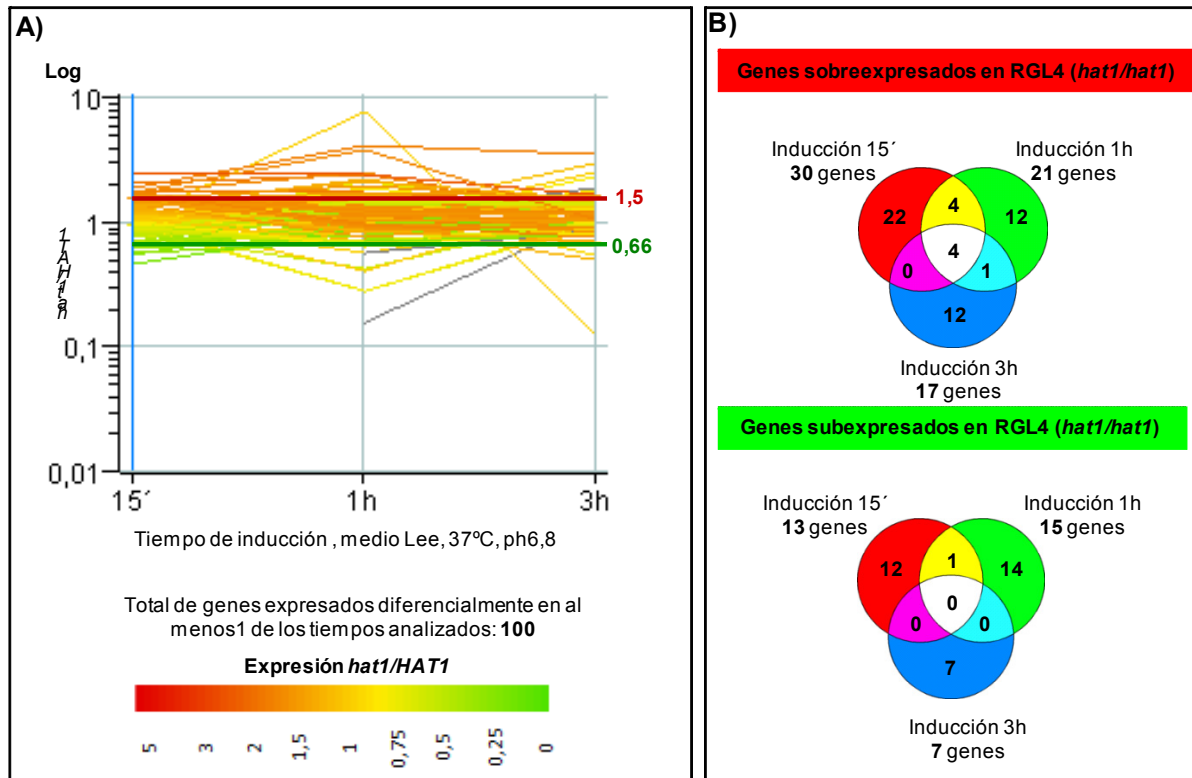


Fig. 45.- Expresión génica diferencial en la cepa RGL4 (*hat1/hat1*) durante la transición dimórfica. A) Representación gráfica del ratio de expresión *hat1/HAT1* de los 100 genes expresados diferencialmente durante los tres tiempos de inducción analizados. Cada línea representa un gen y el color refleja la variación de la expresión a lo largo de la transición. **B)** Diagramas de Venn con los genes sobreexpresados y subexpresados en los tres tiempos analizados, factor de variación $\geq 1,5$.

La intersección de los grupos de genes diferencialmente expresados en cada tiempo mediante diagramas de Venn muestra 4 genes sobreexpresados durante los tres tiempos de la transición levadura-hifa (fig. 45B). La relación de estos genes se recoge en la tabla XV.

Nombre Común	Nombre sistemático (ORF)	Función	Factor de variación		
			15'	1h	3h
4 Genes sobreexpresados			15'	1h	3h
<i>YWP1</i>	orf19.3618	Dispersión en hospedador, posible proteína con anclaje GPI	1,9	4,59	5,31
<i>HHT21</i>	orf19.1061	Posible histona H3	1,525	1,755	1,754
<i>HHF1</i>	orf19.1059	Posible histona H4	2,507	2,472	1,741
<i>PGA62</i>	orf19.2765	Posible proteína con anclaje GPI	1,59	2,013	1,573

Tabla XV. Relación de genes sobreexpresados durante los tres tiempos del ensayo de inducción.

Del mismo modo que en el análisis del perfil transcripcional del mutante *gcn5*, los genes expresados diferencialmente en el mutante *hat1* durante la transición dimórfica (100 genes) se distribuyeron según la similitud de sus patrones de expresión diferencial a lo largo del tiempo mediante un análisis de tipo “*Cluster K-means*” realizado con el programa GeneSpring 5.0.

De esta forma se analizaron por separado aquellos grupos cuya expresión respecto a la cepa parental variaba de forma similar a lo largo de la transición. Se realizaron diferentes distribuciones en un número variable de grupos, y se observó que la distribución en 6 grupos mostrada en la figura 46, permite diferenciar patrones de expresión específicos a lo largo de la transición. El análisis de categorías funcionales estadísticamente significativas se realizó con la aplicación *GO Term Finder* disponible en la base de datos CGD. Las categorías funcionales más representativas se indican en la tabla XVI.

Los nombres y la descripción de los genes que constituyen cada uno de los grupos se han incluido en la carpeta “*Cluster K-means* de la cepa RGL4” de material suplementario.

De los 6 grupos obtenidos, como se observa en la figura 46, el grupo 1 incluye 20 genes que se encuentran sobreexpresados durante los tres tiempos de inducción mientras que en el grupo 4 se mantienen subexpresados 22 genes a lo largo del proceso.

El grupo 2 contiene 20 genes cuyo nivel de expresión disminuye gradualmente hasta 1 hora de inducción punto a partir del cual su expresión disminuye muy lentamente hasta el final. El grupo 3 contiene 7 genes que a los 15 minutos se encuentran sobreexpresados y cuyos niveles de expresión disminuyen antes de transcurrida una hora de inducción, manteniéndose subexpresados hasta el final del proceso. El efecto contrario se da en los 15

genes del grupo 5, subexpresados durante ese mismo periodo del proceso inductivo y que se mantienen sobreexpresados hasta el final. El grupo 6 está formado por 4 genes inicialmente subexpresados y cuyos niveles de expresión aumentan hasta 1h de inducción, punto a partir del cual, de nuevo disminuyen.

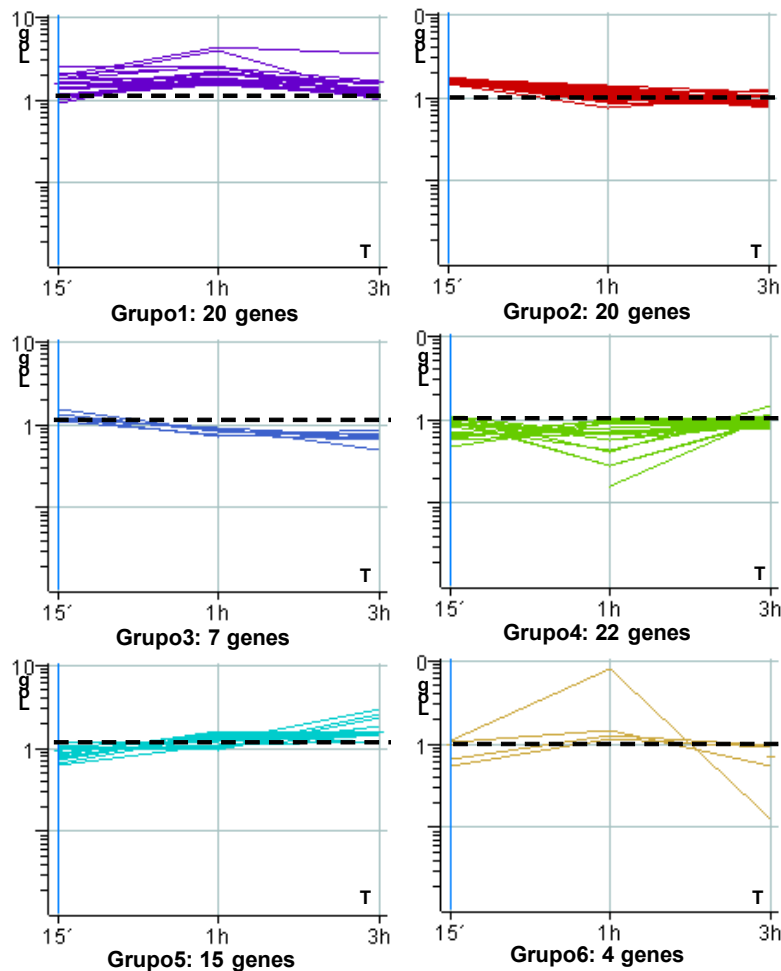


Fig. 46.- Patrones de expresión diferencial en la cepa *hat1* vs. *HAT1* durante la transición dimórfica. Los genes expresados diferencialmente en al menos uno de los tiempos de inducción (100genes) se agruparon mediante “cluster K-means”. Cada línea representa un gen y la relación de su expresión mutante vs. CAI4 a lo largo de la transición dimórfica.

Como se muestra en la tabla XVI, en general, las categorías más representadas a lo largo del proceso de inducción implican principalmente a genes relacionados con el nucleosoma y la superficie celular como son los procesos de interacción entre células. Entre los genes sobreexpresados durante todo el proceso inductivo, en el grupo 1 destacan dos categorías, una de ellas es el **nucleosoma (GO: 0000786)** constituyendo el 20% de los genes del grupo frente al 0,2% que representan en el conjunto del genoma. Los genes *HHF1* y *HHF22* codifican la histona H4 y los genes *HHT21* y *HHT1* codifican la histona H3. Si se considera un factor de variación $\geq 1,3$ los genes *HTA1* y *HTB1* que codifican las histonas *H2A* y *H2B* respectivamente se encuentran sobreexpresados a los 15'.

La otra categoría destacada es **superficie celular (GO: 0009986)**, constituyendo el 45% de los genes del grupo frente al 2,6% que representan en el conjunto del genoma. De los 9 genes sobreexpresados, *ALS2* y *ALS4* codifican aglutininas de la familia ALS (*Agglutinin-Like Sequence*) y *PGA62* y *PGA13* proteínas unidas covalentemente mediante anclaje GPI (glicosilfosfatidilinositol) a la pared celular. *YWPI* codifica una proteína que se secreta a la pared celular y que también tiene anclaje GPI, la mutación de este gen produce un aumento de la capacidad de adhesión de las células y favorece la formación de *biofilms* (Granger *et al.*, 2005).

Los genes *FRE10* y *FTRI* están directamente relacionados con el metabolismo del hierro. La disponibilidad de hierro determina la virulencia en una infección sistémica ya que en humanos el hierro se encuentra unido a proteínas como la transferrina por lo que se requiere un sistema de reducción y captación eficiente. *FRE10* codifica la principal proteína con actividad hierro-reductasa de la superficie celular, necesaria para la reducción del hierro. *FTRI* codifica una de las permeasas del complejo encargado de capturar los iones de hierro reducidos. Los mutantes en el gen *FTRI* son incapaces de establecer una infección sistémica en ratón (Knight *et al.*, 2005).

En el grupo 4 recaen genes que se mantienen subexpresados durante todo el proceso inductivo. Las categorías más representadas según el proceso biológico son **adhesión al hospedador (GO: 0044406)**, **patogénesis (GO: 0009405)**, **formación de *biofilms* (GO: 0042710)** y **región extracelular (GO: 0005576)**, agrupan genes que codifican proteínas implicadas en procesos que se dan en la superficie celular. En las tres primeras categorías indicadas aparece *HWPI* que codifica una proteína de superficie expresada solamente en las hifas, recientemente se ha demostrado que es necesaria para la formación de *biofilms* (Nobile *et al.*, 2006).

Otra proteína con función glucosidasa en la pared celular y que es importante en la formación de *biofilms* es Sun41p. La delección de este gen impide la filamentación, una correcta citocinesis celular y disminuye la capacidad de adhesión en medios sólidos (Hiller *et al.*, 2007).

ECM33 codifica otra proteína con anclaje GPI. La delección de este gen no impide la formación de hifas pero provoca una deslocalización de la adhesina Als1p además de presentar alterada la arquitectura de la pared celular (Martinez-Lopez *et al.*, 2006). Otra proteína subexpresada durante la inducción es la manosil transferasa 1, codificada por el gen *PMT1*. Esta enzima cataliza el primer paso en la reacción de O-glicosilación en el retículo endoplásmico. Defectos en la glicosilación de las proteínas alteran la estabilidad física de la superficie celular y los procesos de secreción de algunas proteínas. En concreto, la mutación de este gen en *C. albicans* afecta a la secreción de Als1p y quitinasa (Timpel *et al.*, 1998).

	Categoría Go ^a	Frecuencia de la categoría GO		Valor-P ^d	Genes ^e
		Muestra en estudio ^b	Genoma de <i>C. albicans</i> ^c		
Grupo 1 (20 genes)	Nucleosoma (GO:0000786, C)	20% (4)	0,2% (13)	1.81e-06	<i>HHF1 HHT21 HHF22 HHT1</i>
	Superficie celular (GO:0009986, C)	45% (9)	2,6% (166)	2.05e-08	<i>ALS2 FRE10 PGA62 YWP1 ALS4 HSP70 PGA13 HSP90 FTR1</i>
Grupo 2 (20 genes)	Catabolismo de la glucosa (GO:0006007, P)	25% (5)	0,4% (28)	1.99e-06	<i>PDC11 ENO1 PDC12 TDH3</i>
	Metabolismo del piruvato (GO:0006090, P)	20% (4)	1,7% (107)	6.01e-05	<i>PDC11 ENO1 PDC12 TDH3</i>
	Fracción soluble (GO:0005625, C)	30% (6)	1,7% (110)	2.99e-05	<i>GYP2 PDC11 ENO1 ADH1 TDH3 HSP60</i>
Grupo 3 (7 genes)	Adhesión entre células (GO:0016337, P)	28,6% (2)	0,3% (17)	0.00233	<i>PRA1 AAF1</i>
Grupo 4 (22 genes)	Adhesión al hospedador (GO:0044406, P)	31,8% (7)	0,6% (39)	3.09e-09	<i>HWP1 ALS3 ECM33 SUN41 SAP6 SAP5 SAP4</i>
	Patogénesis (GO:0009405, P)	40,9% (9)	2,8% (177)	3.07e-07	<i>HWP1 ALS3 SOD5 ECM33 SUN41 PMT1 SAP6 SAP5 SAP4</i>
	Formación de biofilms (GO:0042710, P)	22,7% (5)	0,8% (51)	6.92e-05	<i>HWP1 ALS3 SUN41 PMT1 CDR1</i>
	Región extracelular (GO:0005576, C)	27,3% (6)	0,9% (56)	9.77e-07	<i>TOS1 ALS3 SUN41 SAP6 SAP5 SAP4</i>
Grupo 5 (15 genes)	Preribosoma (GO:0030684, C)	20% (3)	2% (126)	0.09844	<i>orf19.2917 RPS16A NOP1</i>
Grupo 6 (4 genes)	Transporte transmembranal activo (GO:0022804, F)	50% (2)	2,3% (147)	0.01812	<i>orf19.2397 SEC61</i>

Tabla XVI.- Relación de las categorías funcionales más representadas durante la transición dimórfica en el mutante *hat1* vs. *HAT1*.

(a) Los genes de cada uno de los seis grupos obtenidos en el análisis “*cluster K-means*” se clasificaron según la terminología *GO* usando la herramienta *GO Term Finder* de la base de datos CGD. En la primera columna se indica el número de acceso de la categoría *GO*, seguido del término ontológico correspondiente entre paréntesis. P, proceso biológico; C, componente celular; F, función molecular.

(b) Entre paréntesis se muestra el número de genes de cada grupo clasificado en cada categoría *GO*. El porcentaje se ha calculado dividiendo el número de genes clasificado en cada categoría *GO* entre el número total de genes de cada grupo.

(c) El número de genes del genoma de *C. albicans* asociado con cada categoría *GO* se indica entre paréntesis. El porcentaje se ha calculado dividiendo ese valor entre el número total de genes anotados del genoma de *C. albicans* en la base de datos CGD en el momento de hacer este análisis (6.435 genes).

(d) Los valores de *P* para las categorías sobrerrepresentadas se han calculado automáticamente usando una distribución hipergeométrica con corrección de hipótesis múltiple, como se describe en la página *web* de la base de datos CGD (<http://www.candidagenome.org/help/goTermFinder.shtml>). El valor de corte de *P* en este análisis es $P \leq 0,1$. Cuanto más cercano es el valor de *P* a 0, menor es la probabilidad de que el término *GO* asignado a un grupo de genes se haya dado por azar.

(e) Los nombres de los genes siguen la nomenclatura propuesta en la base de datos CGD. Como puede observarse en la tabla, algunos genes se han asociado con más de una categoría *GO*.

Todos estos genes, también se encuentran subexpresados durante la inducción en el mutante *gcn5*.

Los genes *SAP4*, *SAP5* y *SAP6* codifican aspartil proteasas y también están subexpresados. La actividad proteolítica de aspartil proteasas (Saps) secretadas por *C. albicans* está asociada con la invasión de tejidos y por tanto con la capacidad virulenta de este patógeno. Estas isoenzimas están codificadas por una familia de genes que cuenta con al menos 10 miembros y su regulación transcripcional es variable. Sap4p, Sap5p y Sap6p forman un subgrupo dentro de la familia que se caracteriza por su expresión durante la transición dimórfica. El triple mutante aunque no está impedido en la formación de hifas, sí muestra una capacidad invasiva mucho más reducida (Naglik *et al.*, 2003; Sanglard *et al.*, 1997). Estudios de virulencia en ratón, realizados en nuestro grupo de investigación (Rashki, Z., 2009, tesis doctoral) muestran que el mutante *hat1* es hipovirulento.

La subexpresión de estos genes implicados en invasividad, adhesión e interacciones célula-célula podría indicar un posible papel de *HAT1* en la virulencia de *C. albicans*.

En el grupo 2, de las categorías más representadas, dos están relacionadas con la glucólisis (**catabolismo de la glucosa GO: 0006007**) y el metabolismo del piruvato (**metabolismo del piruvato GO: 0006090**). La expresión de los genes *PDC11*, *ENO1*, *PDC12* y *TDH3*, inicialmente sobreexpresados, disminuye gradualmente desde los 15' hasta las 3 horas de inducción.

TDH3 codifica la proteína gliceraldehído-3-fosfato-deshidrogenasa que es una enzima de la glucólisis que además de ejercer su función citosólica se localiza también en la superficie de células levaduriformes e hifas como antígeno de superficie (Gil-Navarro *et al.*, 1997). Otra enzima que participa en la glucólisis es la 2-fosfo-D-glicerato hidrolasa, codificada por el gen *ENO1*. Esta proteína altamente inmunogénica se une a proteínas abundantes del plasma sanguíneo como la plasmina y el plasminógeno facilitando la invasión de los tejidos del hospedador (Jong *et al.*, 2003; Yang *et al.*, 2006). *PDC11* y *PDC12* codifican proteínas similares a la piruvato descarboxilasa, enzima que participa en la transformación del piruvato en etanol durante la fermentación alcohólica. La subexpresión de todos estos genes en el mutante *hat1* podría explicar la atenuación de la virulencia observada en el modelo murino de infección sistémica.

Acetiltransferasa de histonas *HAT2*

16. LA SECUENCIA NUCLEOTÍDICA DEL GEN *HAT2* DE *Candida albicans*

La secuencia del gen *HAT2* (orf19.7185) se obtuvo a partir del *Contig* 19-2506 que forma parte de la secuencia completa del genoma de la cepa SC5314 de *C. albicans* publicada por la Universidad de Stanford (<http://www.sequence.stanford.edu/group/candida>). La localización de la región codificante se hizo del mismo modo que con los genes *GCN5* y *HAT1*, mediante alineamiento con una secuencia EST (*expressed sequenced tag*) de unos 400 nucleótidos descrita como perteneciente al gen *HAT2*, por su homología con el gen *HAT2* de *S. cerevisiae*.

El análisis de la secuencia de nucleótidos puso de manifiesto una única fase de lectura abierta de 1458 nucleótidos que por comparación con el programa FASTA mostraba un porcentaje de identidad del 63,2% con una secuencia del cromosoma 2 de la levadura *Pichia stipitis* (CP000496) y del 60,4% con una secuencia del cromosoma G de la levadura *Debaryomyces hansenii* (CR382139). En la figura 47 se muestra la secuencia de nucleótidos de un fragmento de 3458 pb del *Contig* 19-2506 que contiene el gen *HAT2* y su traducción a aminoácidos, junto con las regiones 5' y 3' adyacentes. En dicha secuencia se pueden observar también señales reguladoras de la transcripción características de los genes de levadura.

La publicación del mapa físico del genoma de *C. albicans* ha permitido ubicar el gen *HAT2* en el cromosoma 7 (*The Candida albicans physical map website*, <http://albicansmap.ahc.umn.edu>). Esta información también se encuentra disponible en las bases de datos *CandidaDB* y *Candida Genome Data Base* (CGD).

```

-1000 ggtggtggtg gaacatcatt tttggatgat gaaattgtaa ttattctagg tttgagtatt tcagaatagg cgttcattgt
-920 gtttggcttg gtaggttttg gattgaatac taaagtgggt ccatgtaact tttttgtcgg ccatagtcatt ttttttcttc
-840 ctctgcattt tgtaaatgag atttttttta tctccttgcg ttcacccaaa tttccttgac ttcctgttac tttgattcct
-760 tcaccatctc agctgaacaa aggtctaata gacactact caatgtgtca accccaaaca gttggaagct acttgaacac
-680 ttccaagg ctattcattt ttttatcctt tattgtctgg ctcacgattg atgaattcaa ctcaaacatt ttcgtatctc
-600 caaagaaacc cttaaacaa aattattgggt ctttcagtaa ttctatcggt tgggtttctt ttggaatat tagcaggaat
-520 atatggaat tggtttctta ttataattgg catttatatt gcagtgccac atttgccggt ggcaatact aaaaacatcg
-440 ctagtatttc tgactatgat ttcaattttg attctacaac caccaactcc agggctatca ttgagattgg gcagtttttg
-360 acggctttct tattgggtgag tgggtgttat ttgcctattc tattaacca ctctttgata ttgacgaaaa cagctatggt
-280 cttgacaata gtgggcggt tgggtgttta tggcactgtg tatacgttta gtcactattt tgatgagcca caagaagagg
-200 atggcttggc tgacctcgga ggaggtgtta ttaagaaat ttatgaatat ataagcttat atacttgagt attggctgta
-120 gtaggagggt ctctttctat catttactag actcattgag ttaatggcac ctctggctc tacattagtt gggaagcta
-40 gaaatattct actttaagta aaggcaata taccgatcca atgtttctga gaccattaga ggaaatgagc aaagagcaag
1 M F S R P L E E M S K E Q
40 atatgacaaa agaaaaaaaa atggactaca aaacaaataa ttttcgcaaa actatatctc aacatcttct ctgttccgt
13 D M T K E K K M D Y K T N N F R K T I S Q H L L S F R
120 taccaacaa ttcacatcat gccatcatca actaacgagt ttgccaagc cgaaagggaa ttggtagagg agcagcaatt
40 Y Q Q L H I M P S S T N E F A K A E R E L V E E Q Q
200 acaagaaaa atcgtaaat aagagttaa gatttggaaa aaaactgtgc ctttgcttta cgactttata cacacatttg
66 L Q E K I V N E E F K I W K K T V P L L Y D F I H T F
280 cgttgataa ccttctcttg gtgttcaat ggttgccaac taccagcgtat tctcaatcag atttggagct caaattttta
93 A L D N P S L V F Q W L L P T T S V S Q S D L E L K F L
360 atagggacaa attgcaatcaa taaatctgaa wattattga aactaacttc aataagcttg ccttcgactt tgggtggcgc
120 I G T N A I N K S E N Y L K L T S I S L P S T L V G
440 aaccgatagt attcctgttc caagtgatgg tatagatatt tcaaaactta aagtgttac tcagtggaag caaacctcag
147 A T D S I P V P S D G I D T S N F K V V T Q W K Q T Q
520 aaataacaa attgaaagt tcaacaaatg gaagtctagc tgtggggttc agtgccgatg gtgttatctg tagttataat
173 E I N K L K V S P N G S L A V G F S A D G V I R S Y N
600 ttggacaact ttgattctgt tgattataag taccacaagc aaggtgggat agcattagac tgggtggata ataattgatt
200 L D N F D S V D Y K Y H K Q G G I A L D W V D N N G
680 ctatctggg tccaatgat cacagattgc gttatggcaa gttgacaaat catctactcc attgcaattg ttcaagggac
226 F L S G S N D A Q I A L W Q V D K S S T P L Q L F K G
760 accatgggtc tattaatgat atctcttcta tcaagaaaa acacttgttt ggatctgta gtgatgattc tactaccag
253 H H G A I N D I S S I K E K H L F G S V S D D S T T Q
840 tttcacgata caagagttaa tgccacggat atcaatctgt tgataacggt tgaaaacagt cacattcaa attgtattca
280 F H D T R V N A T D I N P V I T V E N S H I Q N C I
920 gtttctcct gatatacaaa cattgtacgc aactgggtgt aaagataatg tggtttctgt gtatgatata agaaactata
306 Q F H P D I Q T L Y A T G G K D N V V S L Y D I R N Y
1000 gcactccttt cagaaagttt tatggtcata atgacagtgt cagacaattg caatgggact ggaacaaccc tgatattcct
333 S T P F R K F Y G H N D S V R Q L Q W D W N N P D I L
1080 gtatcttctg gattggataa gagaattata ttttggatt tgaaaaatct cgatgaggat ttcactatc ctgatgcaac
360 V S C G L D K R I I F W D L K N L D E D F T Y P D A
1160 gtctaattgg aaagatcaga actcaaagag aaacaagcg gtcaagactg atccatgctt gaaatattgt cacggtggtc
386 T S N A G K D T N S K R K Q A V K T D P C L K Y V H G G
1240 ataccagaag acaaacgat ttcgatattc atccaaatg caagaatatt tttggtagtg ttggtagta taaattattg
413 H T R R T N D F D I H P K V K N I F G S V G D D K L L
1320 gaaatctgga aaccaaagtc tttaccaggt gatgagccag aacaagaatc tacagaagta caggaggatg aagagatgaa
440 E I W K P K S L P G D E P E Q E S T E V Q E D E E M
1400 agatgtcaga accaaagggt tcaaggcgg agaaggagt acaaaaatga agatttagat gtaaagagtt gaatagtttt
466 K D A E T K G V K D G E E D T K M K D -
1480 aattgtgtgt attataaaat ttataacaga tagcatatga aagtatagta tagcagttgg ctgagcctac ttaagattt
1560 gctcttctt ttatgcttgt aaaagtgtag aaaagccct gtctttgaaa gaagaattgt actagcatat actatgtttt
1640 tatattatca ttgaatcctc agtcaaaaaa ctgggtgtga aaaatattga tggataatct tttgtactga acttttaaca
1720 aaaatttgaa gaaattccta caacaacata cacatactat tcttttctta actataagcc ataaaaaa gtcaaaaaa
1800 gagcattatt acaatcagct aaacaattgc agaaaataac aactaattaa cgtaaggaa aatatttcta acaaatgagt
1880 gtaaaaaagc agaaaatttc gaagcttata aattaggagg gttgaccgag ttggtctaag gtgacagact taaggatgag
1960 gttcaaatcc ttctttacca gagtaattctg ttggtcagtt gaccgcgca gttcgaatct cgcacccttc actatttttt
2040 tggctcatct agaactaaca atattgtatt gcaatcgcta ataatttttt tttttcattt gtttttaaat ctctttgttt
2120 gaatatgttt atacgtaggc catttcattt gttttttttt ggttgttttc gttatagtca aacttgttgg ctggcaattt
2200 tagttttgtt tacgtgatgt ttctaattca caaaattttt ttttgtatag tttcgtgttt tgtttacatt ttttcagttt
2280 agtgtaattt tgagcaacgc aatgaaaaac agagatgtga gtgggtgtgg tgggtactgg ttttacttcc tataaatttc
2360 tctttcaaaa aaacaacaac acagttcaac tcaattcaga ttttctaata cactatccta cttcttctt tcttttattt
2440 gataattcta atctacat

```

Fig. 47.- Región del genoma de *C. albicans* que contiene el gen *HAT2*, en la que se ha incluido la secuencia de aminoácidos deducida a partir de la secuencia de nucleótidos. En la región promotora se han señalado las posibles cajas TATA (sombreadas en naranja), varias secuencias ricas en T y en A (subrayadas en azul); las secuencias CAAT y CAAG (sombreadas en verde y en morado respectivamente). Los codones CTG que en *Candida* codifican Serina en lugar de Leucina, se han subrayado en rojo. En la región 3' no codificante se han subrayado en color magenta dos posibles regiones de poliadenilación.

16.1. Análisis de la región 5' no codificante del gen *HAT2*

Siguiendo el mismo procedimiento descrito anteriormente para el análisis de los genes *GCN5* y *HAT1*, el análisis *in silico* de la región promotora del gen *HAT2* se inició con la búsqueda de una posible caja TATA que se ajustara a la secuencia consenso TATA(A/T)A(A/T)(A/G) descrita por Basehoar *et al* (2004).

Asimismo, en la región promotora del gen *HAT2* se ha encontrado en la posición -153 respecto del codón de inicio la secuencia TATATAAG que se ajusta a la secuencia consenso descrita para *S. cerevisiae*, y otras dos secuencias en posiciones -143 y -499 respectivamente que varían tan sólo en un nucleótido, todas ellas sombreadas en naranja en la figura 47.

Como se ha mencionado anteriormente, otros elementos importantes para una transcripción efectiva son las cajas CAAT y CAAG sombreadas en verde y morado respectivamente en la figura 47. Se han localizado cuatro secuencias del tipo CAAT (posiciones -275, -418, -458 y -720, sombreadas en verde) y dos motivos CAAG en posiciones -210 y -676 (sombreadas en malva) aunque no se han encontrado regiones especialmente ricas en C y T precediéndolos. (Dobson *et al.*, 1982).

En la figura 47 también se ha subrayado en azul, una zona rica en T y A (timidina y adenina, respectivamente). Como se ha indicado anteriormente, su presencia en las regiones promotoras según diferentes autores, junto con la repetición de motivos TGGA, TGA, CA o TG facilitan estructuralmente la expresión de los genes que las contienen impidiendo la incorporación de nucleosomas en esas zonas alrededor de los elementos que contribuyen a la activación de la expresión génica (Anderson & Widom, 2001; Struhl, 1985).

Al igual que con los genes *GCN5* y *HAT1* usando los mismos programas disponibles en la red, se ha realizado la búsqueda de secuencias de unión de determinados factores transcripcionales en la posible región promotora del gen *HAT2*. Para ello, se han tenido en cuenta los 1000 nucleótidos previos al ATG de inicio identificando con el programa *MatInspector* (<http://www.genomatix.de/products/index.html>) dos sitios MAT1MC relacionado en *S. cerevisiae* con conjugación y respuesta a feromonas; un sitio NIT2 relacionado con el metabolismo del nitrógeno; un motivo STE11 implicado en las rutas de transducción de las MAP Kinasas, tres secuencias de unión a HAP234 involucradas en la regulación del metabolismo de carbohidratos y un motivo PAC asociado con respuesta a pH.

Este análisis se amplió realizando la búsqueda de sitios de unión en la misma secuencia en la base de datos YEASTRACT (<http://www.yeasttract.com>), localizándose además varios motivos de unión para Ash1p, implicado en procesos de conjugación y desacetilación de histonas; un sitio para Gcn4p que controla genes relacionados con el metabolismo de aminoácidos; varios sitios de unión para Gcr1p relacionado con la activación de genes implicados en glicólisis; un sitio de unión para Nrg1p involucrado en morfogénesis y

varios sitios de unión para Fkh1p, relacionado con silenciamiento de cromatina en *S. cerevisiae*.

Este análisis informático requiere de datos experimentales para comprobar si estos sitios son funcionales en *C. albicans*.

En la misma cadena directa (C, Crick) a -2087pb respecto del codón de inicio de *HAT2*, se encuentra el final del orf19.7184, de función desconocida según *CandidaDB*. En la base de datos CGD no tiene función asignada, pero indican cierta relación con el gen *CaVPS55* y según las anotaciones GO, el proceso biológico en el que participa es en el transporte tardío desde el endosoma a la vacuola.

16.2. Análisis de la región 3' no codificante del gen *HAT2*

En la región terminadora de *HAT2* se buscaron señales de poliadenilación con el programa *HCpolya* del servidor Webgene (<http://www.itb.cnr.it/sun/webgene>, del Institute for Biomedical Technologies *ITB* –CNR, Italia). Dentro de los 400 nucleótidos siguientes al codón de parada de *HAT2* se localizaron 2 secuencias (subrayadas en color magenta en la figura 47) que se inician en las posiciones 35 y 323. Se requieren estudios específicos para confirmar que estas secuencias son funcionales.

16.3. Estudio de la región codificante del gen *HAT2*

En el apartado dedicado al estudio de la región codificante de *GCN5* y *HAT1*, se ha mencionado cómo en la mayoría de genes de levaduras, se conserva una secuencia consenso sobre el entorno del codón de inicio y que en *S. cerevisiae* es (A/Y)A(A/Y)AATGTCT, donde Y es una pirimidina (Cigan & Donahue, 1987).

En *HAT2* la estructura TCCAATG se ajusta al consenso descrito salvo por la citosina en posición -3 en lugar de adenina (Dobson *et al.*, 1982).

En la secuencia del marco de lectura abierta de *HAT2* no se han encontrado intrones.

Como ya se ha indicado anteriormente, el codón CUG en *Candida* se traduce por serina. (Ohama *et al.*, 1993; Sugiyama *et al.*, 1995; Yokogawa *et al.*, 1992). En la secuencia nucleotídica de *HAT2* mostrada en la figura 47 se destaca la presencia de un codón CTG en la posición 112 con respecto al ATG inicial.

El contenido en A+T de la ORF del gen *HAT2*, es del 63,37%, porcentaje superior al de C+G de acuerdo a lo descrito en la mayoría de genes de *C. albicans* (Odds, 1988).

La composición nucleotídica de la ORF del gen *HAT2* se encuentra en la tabla XVII.

Tabla XVII.- Composición nucleotídica del gen *HAT2*

Base	Nº de bases	%
A	506	34,71
G	298	20,44
C	236	16,19
T	418	28,67
A+T	924	63,37
G+C	534	36,63

16.4. Análisis de la secuencia de aminoácidos de la proteína Hat2p

A partir de la secuencia nucleotídica del gen *HAT2*, se dedujo una proteína de 485 aminoácidos, con un peso molecular teórico de 55,3 KDa y punto isoeléctrico de 5,32; según el análisis realizado con el programa *ProtParam* (<http://www.expasy.ch/tools/protparam.html>) (Wilkins *et al.*, 1999). Estos datos se recogen en la tabla XVIII.

Tabla XVIII.- Propiedades físico-químicas de Hat2p

Análisis Hat2p		Aminoácidos	Número	%
Masa molecular	55332,84 Da	Ácidos (D, E)	73	15,05
Tamaño	485aa'	Básicos (K, R)	56	11,54
Punto isoeléctrico	5,33	Hidrofóbicos (A, I, L, F, W, V)	145	29,90
Carga a pH 7.0	-14,807	Polares (N, C, Q, S, T, Y)	145	29,90

Los tres aminoácidos más representados en la proteína son Asp (9,1%), Lys (8,9%) y Ser (8,5%); datos obtenidos con el programa *ProtParam*.

El estudio de homología de la secuencia de aminoácidos deducida del gen *HAT2* con otras proteínas presentes en la base de datos *UniProt*, se realizó utilizando el programa *FASTA* <http://www.ebi.ac.uk/fasta33>. El porcentaje de identidad entre Hat2p (cepa SC5314) y una proteína no caracterizada de la levadura *Lodderomyces elongisporus* (A5E622) es del 55,4%, con la proteína Hat3p de la levadura *Pichia stipitis* (A3LPJ4) es del 59,4% y con Hat2p de *S. cerevisiae* (P39984) del 31,7%. Teniendo en cuenta los cambios conservativos, la similitud con estas tres proteínas alcanza 80,8%, 83,9% y 64,4% respectivamente.

La comparación con el programa *CLUSTALW* (<http://www.ebi.ac.uk/clustalw>) de secuencias proteicas con homología a CaHat2p se muestra en la figura 48.

CaHat2p	MFSRPLEEMSKEQDMTKEKKMDYKTNFRKTI SQHLLSFRYQQLHIMPSS	50
PsHat3p	-----MTIT	4
ScHat2p	-----	
CaHat2p	TNEFAKAERELVEEQQLQEKIVNEEFKIWKKTVPLLYDFIHTFALDNPSL	100
PsHat3p	QKDLAVAEREIVEEHQLKEKVVNEEFKIWKKTVPLLYDTIHTYVLDYPSL	54
ScHat2p	-----MENQEKPLSVDEEYDLWKS NVPLMYDFVSETRLTWPSL	38
	: : *:*:*:*:*:*:*:* : * **	
CaHat2p	VFQWLPTTSVS--QSDLELKF LIGTNAINKSENYLKLTSISLPS TLVG--	146
PsHat3p	AIKWLPDYTYSDNKN SVNVKFLIGTNTSHNSSNYLKLGSVNIPSTLAPDF	104
ScHat2p	TVQWLPTPVQELDGGFIKQELIIGTHTSGEENY LKFAEINLPKEILSNE	88
	..:*** . . : : : : ** : : . . ***** : . . : *	
CaHat2p	-----ATDSIPVPSDGID-TSNFKVVTQWKQTQEINKLKVSPNG-SLAVG	189
PsHat3p	STVNPVDVDSITVPSSVIEDTSDFRILSKWKQTSEINKLDISPNG-KKVLS	153
ScHat2p	DP--QEEAGEEYQSSLPAPRSNIRITAKYEHEEEITRARYMPQDPNIVAT	136
	. * . * : : : : : : : . ** : *	
CaHat2p	FSADGVIRSYNLDNFDSVDYKYHKQGGIALDWVDNNG--FLSGSNDAQIA	237
PsHat3p	FNSDGVVHSYDLENNDVIDYKYHKSEGYALTWFGNDS--FISGSNDSQIA	201
ScHat2p	INGQTVFLYSRSEGLQSTLKFHKDNGYALS FSTLVKGRLLSGSDDHTVA	186
	: : : * : * . . : : * : * * * : : : * * : * : *	
CaHat2p	LWQVDKSSSTPLQLFKG---HHGAINDISS-IKEKHLFGSVSDDSTTQFH	282
PsHat3p	LWSLDKPSTPIQLFKS---HNGAVNDISYNPNFVSI FGSVSDSSTTQFH	247
ScHat2p	LWEVSGSGDPTKPVRTWNDLHSDIINDNKWHNFNKDLFGTVSEDSLLKIN	236
	** : . . . * : . : * . : * * . : * * : * * * * * : : :	
CaHat2p	DTRVNATDINPVITVENSHIQNCIQFHPDIQTLYATGGKDNVVS LYDIRN	332
PsHat3p	DSRASGD--NPVIKQENQHIQMAISVHPEIETLYATGGKDNVVS LYDIRN	295
ScHat2p	DVRANNT---TIDTVKCPQPFNTLAFSHHSSNLLAAAGMDSYVYLYDLRN	283
	* * . . . : . : : : * * : * * * * * * * * * * * *	
CaHat2p	YSTPFRKFYGHNDSVRQLQWDWNNPDILVSCGLDKRIIFWDLKNLDEDF	382
PsHat3p	YKIPLRKFYGHNDSVAGIKWDVEDPRTLISWSLDKRIITWDLKDL EEEYA	345
ScHat2p	MKEPLHHMSGHEDAVNNLEFSTHVDGVVSSGSDNRLMMWDLKQIGAEQT	333
	. * : : : * * * : * * : : . . . : * . * * : : * * * : : :	
CaHat2p	YPDATSNKGD TNSKRKQAVKTDPCLYVHGGHTRRTNDFDIHPKVKNIFG	432
PsHat3p	YPDGNE----NSRRRAAVKIDPCLRFIHGGHTNRVNDFDVHPKIRSLYA	390
ScHat2p	PDDAEDG-----VPELIMVHAGHRSSVNDFDLNPQIPWLVA	369
	* . . . * * : * * * * * * * * : : : : : . .	
CaHat2p	SVGDDKLEIWKPKSLPGDEPEQESTEVQEDEEMKDAETKGVKDGEEDTK	482
PsHat3p	SVGDDNLLLEVWK-----	402
ScHat2p	SAEEENILQVWKCSHSLPIVGGPPKVNKDIIIS-----	401
	* . : : : * : * *	
CaHat2p	MKD	485
PsHat3p	---	
ScHat2p	---	

Fig. 48.- Comparación con el programa *ClustalW* de las secuencias proteicas homólogas a CaHat2p de *L. elongisporus*, de *P. stipitis* y *S. cerevisiae*. Con el símbolo (*) se indican los residuos idénticos, los conservados se indican con (:) y los semiconservados con el símbolo (.) . El dominio CAF1C H4-bd se muestra encuadrado en verde y la región donde se localizan las repeticiones del motivo WD40 se han sombreado en morado.

La búsqueda de motivos funcionales se realizó en la base de datos *Pfam* <http://pfam.sanger.ac.uk/>. El análisis mostró la presencia del motivo CAF1C H4-bd y cuatro repeticiones WD40. Los motivos de repeticiones WD40 son sitios de interacción proteína-proteína, y las proteínas que contienen repeticiones WD40 se sabe que sirven como plataformas para el ensamblado de complejos proteicos o mediadores de interacciones transitorias entre otras proteínas. La especificidad está determinada por las secuencias que se encuentran fuera de las repeticiones en sí mismas. En el caso de CaHat2p y las secuencias homólogas que se muestran en la figura 49 el motivo CAF1C H4-bd determina la especificidad de unión de esta proteína, ya que es un motivo de unión al factor de ensamblaje de la cromatina CAF1 de humanos que facilita la deposición de las histonas H3 y H4 dentro del DNA de nueva síntesis durante la replicación o reparación del DNA (Verreault *et al.*, 1998).

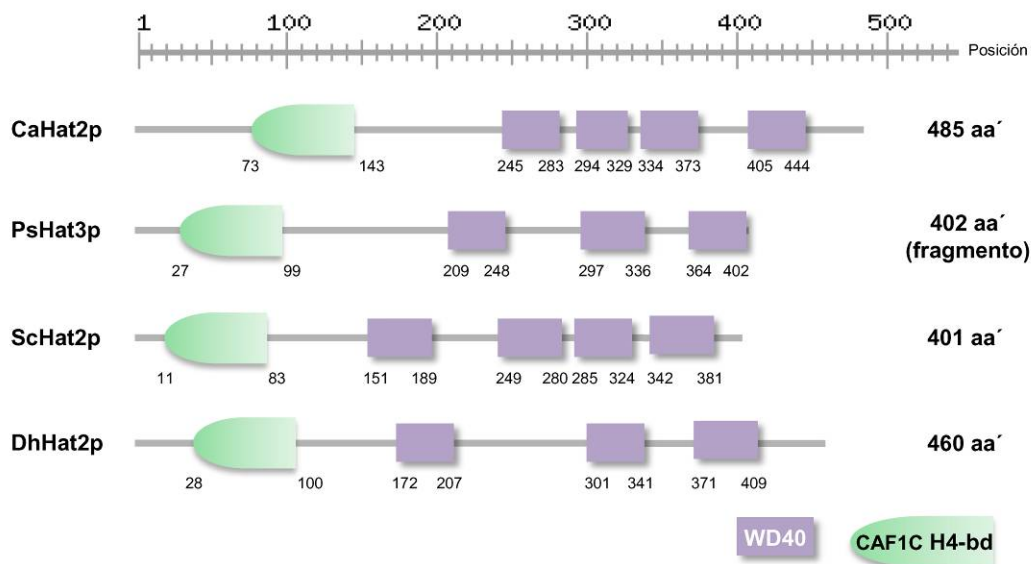


Fig. 49- Comparación de la estructura de Hat2p de *C. albicans* con la correspondiente a proteínas de secuencia similar en *P. stipitis* (PsHat3p), *S. cerevisiae* (ScHat2p) y *D. hansenii* (DhHat2p). La búsqueda de motivos funcionales se realizó en la base de datos *Pfam*.

17. CONSTRUCCIÓN DEL CASSETTE DE INTERRUPCIÓN DEL GEN *HAT2*

La construcción del *cassette* se realizó del mismo modo que para los genes *GCN5* y *HAT1*. En este caso se diseñaron los oligonucleótidos RD46 y RD47 (con sitios de restricción *Sac* I y *Spe* I respectivamente) para obtener un amplicón de 411 pb correspondiente a la región 5' del gen (posiciones -383 a +28 pb respecto al codón de inicio). Este fragmento se subclonó en pGEM-T para dar lugar al plásmido pDB1. El plásmido se cortó con *Sac* I y *Spe* I y el fragmento de 411 pb purificado se subclonó en pSNC1, la construcción resultante se denominó pRDE2.

Con los oligonucleótidos RD48 y RD49 (con sitios de *Pst* I y *Xho* I respectivamente) se obtuvo un amplicón de 413 pb. En este caso, el oligonucleótido RD48 se diseñó fuera de la ORF del gen. El fragmento amplificado fue subclonado en pGEM-T obteniendo el plásmido pDB2. Con las enzimas *Pst* I y *Xho* I se obtuvo el fragmento de 413 pb, que se purificó y ligó en pRDE2 cortado con las mismas enzimas para obtener el plásmido pRDE3. Este último fragmento se localiza entre las posiciones +65 y +478 pb respecto al codón de parada de la región 3' no codificante. En la figura 50 se muestra el esquema con los diferentes pasos en la construcción del *cassette*. La secuencia de los oligonucleótidos empleados se recoge en la tabla IV del apartado 6.9.1. de Materiales y Métodos.

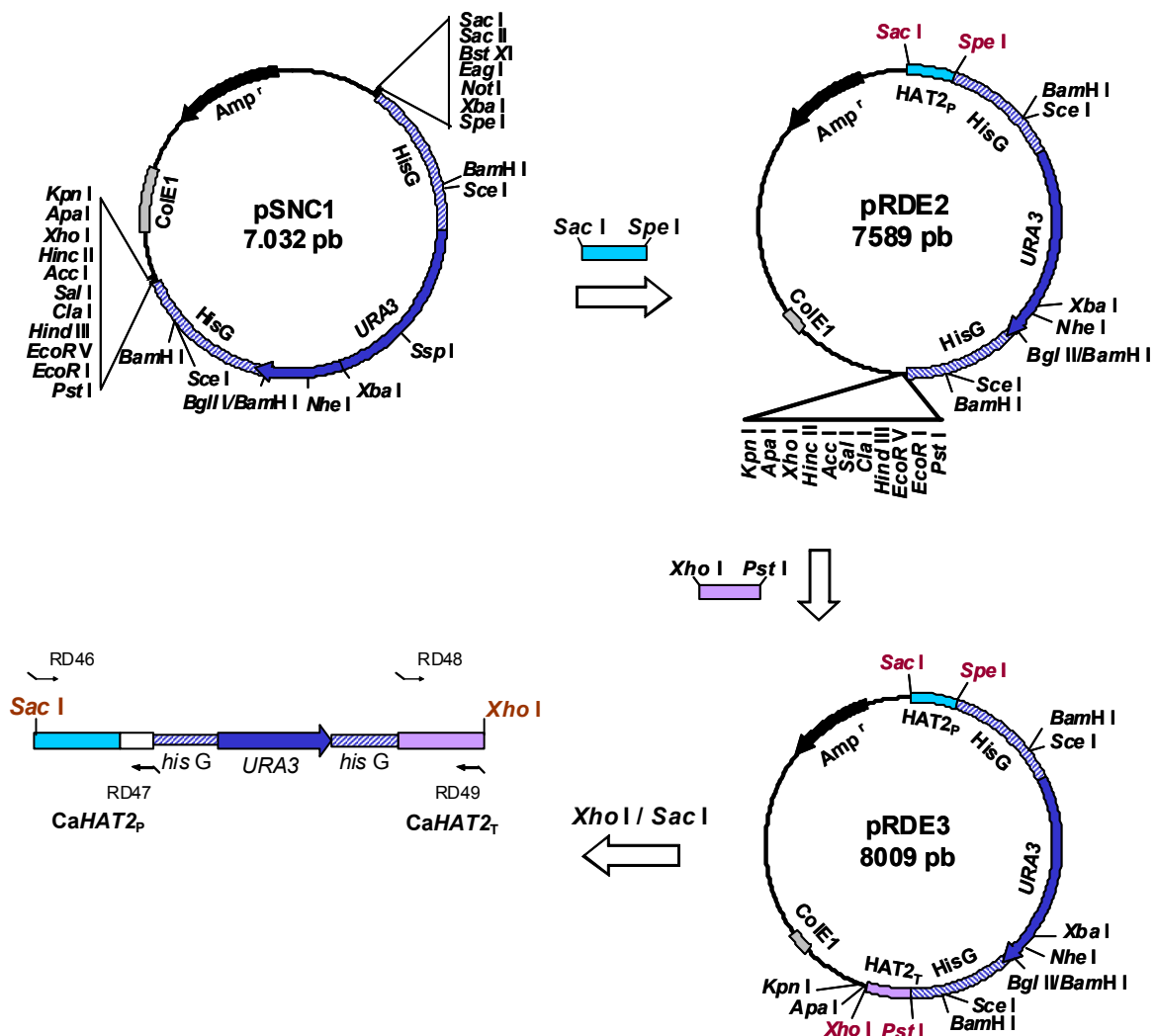


Fig. 50.- Esquema de la construcción del plásmido pRDE3 que contiene el *cassette* de interrupción *HisG-URA3-HisG* flanqueado por las regiones promotora (P) y terminadora (T) del gen *HAT2*. En el primer paso, se clonó el fragmento promotor en el plásmido pSNC1, obteniendo así el plásmido pRDE2, posteriormente se subclonó el fragmento terminador obteniendo el plásmido pRDE3 linealizado con las enzimas *Sac* I y *Pst* I previamente a la transformación de protoplastos.

18. OBTENCION DEL MUTANTE HOMOCIGÓTICO EN EL GEN *HAT2*

Tras obtener el plásmido pRDE3, se inició el proceso de interrupción del gen *HAT2* en la cepa CAI4 de *C. albicans*.

Se generaron protoplastos de CAI4 y se transformaron con 5, 10, 15 y 20 µg de DNA del plásmido pRDE3 digerido con *Sac* I y *Xho* I, enzimas que liberan el *cassette* (Figura.50). La selección de las células que habían incorporado el *cassette* se llevó a cabo en medio mínimo suplementado con sorbitol 1M (apartado 2.2.1., Materiales y Métodos). La correcta integración del DNA lineal en el *locus* del gen *HAT2* se verificó en cada paso mediante PCR. Para ello se obtuvo el DNA genómico de los transformantes y de la cepa parental.

Se obtuvieron 106 mutantes Ura⁺, 59 de ellos cuando se usaron 20µg de DNA plasmídico. Mediante PCR se comprobó la correcta integración del *cassette* en el *locus* del gen *HAT2*. Los clones 12 y 16 resultaron ser positivos tras analizar los primeros veinte clones por PCR y se denominaron RDH1-12 y RDH1-16 respectivamente.

Aleatoriamente se usó el mutante RDH1-12 para provocar la recombinación entre las regiones *hisG* y por consiguiente, la pérdida del gen *CaURA3*. Los transformantes positivos Ura⁻ se seleccionaron en medio mínimo suplementado con 5-FOA y uridina. Se observaron y aislaron colonias a los 4 días de incubación a 28°C y se obtuvo DNA genómico. Mediante PCR se comprobaron los clones potencialmente auxótrofos para uracilo.

Seis transformantes resultaron ser positivos, se nombraron como RDH2 seguido del número del clon. Se eligió el transformante RDH2-12. Con este mutante se inició de nuevo el proceso de transformación con la digestión del plásmido pRDE3 para interrumpir el segundo alelo del gen *HAT2*. A los 6 días se observaron 74 transformantes de los cuales 3 resultaron positivos y se nombraron RDH3-21, RDH3-22 y RDH3-24. Con el mutante RDH3-21 se continuó con el protocolo para provocar la pérdida del gen *CaURA3*.

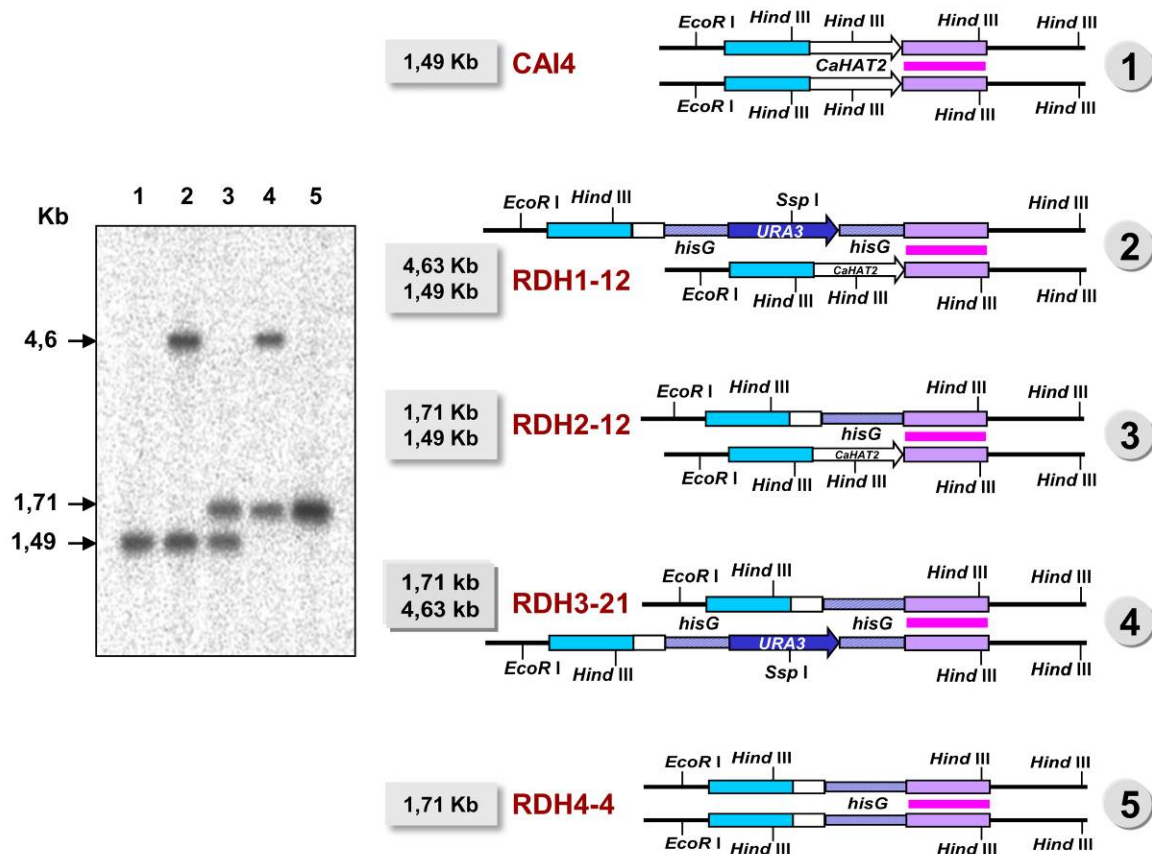


Fig. 51.- Esquema del genotipo en el locus *HAT2* en el tipo silvestre (calle1) y el genotipo esperado en los transformantes (calles 2, 3, 4 y 5) y su comprobación mediante hibridación DNA-DNA (*Southern Blot*). El DNA genómico fue digerido con la enzima de restricción *Hind* III. La sonda empleada de 482pb corresponde al fragmento de la región 3' del gen *HAT2* amplificado con los oligonucleótidos RD49 y RD50. La banda de 1,488 kb que se observa en las calles 1, 2 y 3 corresponde al locus silvestre del gen *HAT2*, la de 4,6 kb al mismo locus deleciónado por el cassette *hisG-URA3-hisG* (calles 2 y 4) y la banda de 1,709 kb (calles 3, 4 y 5) a dicho locus interrumpido únicamente por *hisG*. Las flechas señalan las bandas obtenidas y su correspondiente tamaño en kb.

Los revertientes Ura⁻ se seleccionaron en placas de medio mínimo suplementadas con uridina y 5-FOA. A los 4 días se podían observar colonias en las placas, se aislaron 20 transformantes Ura⁻ para analizarlos por PCR y 7 de ellos resultaron positivos. Estos clones se denominaron RDH4 seguido del número del clon analizado. Finalmente se eligió uno de ellos, RDH4-4 para comprobar mediante hibridación DNA-DNA (*Southern blot*) cada etapa en el proceso de transformación. El DNA genómico obtenido de las cepas CAI4, RDH1-12, RDH2-12, RDH3-21 y RDH4-4, fue digerido con *Hind* III y se utilizó como sonda el

amplicón de la región 3' obtenido con los oligonucleótidos RD48 y RD50 marcado con [α - 32 P]dCTP (apartado 6.10.1. de Materiales y Métodos).

En la figura 51 se muestra un esquema del genotipo esperado de los mutantes en cada uno de los pasos de la deleción del gen *HAT2*, y la imagen de la membrana del *Southern blot*.

Los estudios de localización celular realizados en nuestro laboratorio, sitúan a la proteína Hat2p en el núcleo (Rashki, Z., tesis doctoral 2009).

19. ANÁLISIS FENOTÍPICO DE LOS MUTANTES OBTENIDOS

19.1. Efecto de la deleción del gen *HAT2* en el crecimiento y la morfología celular a 28°C

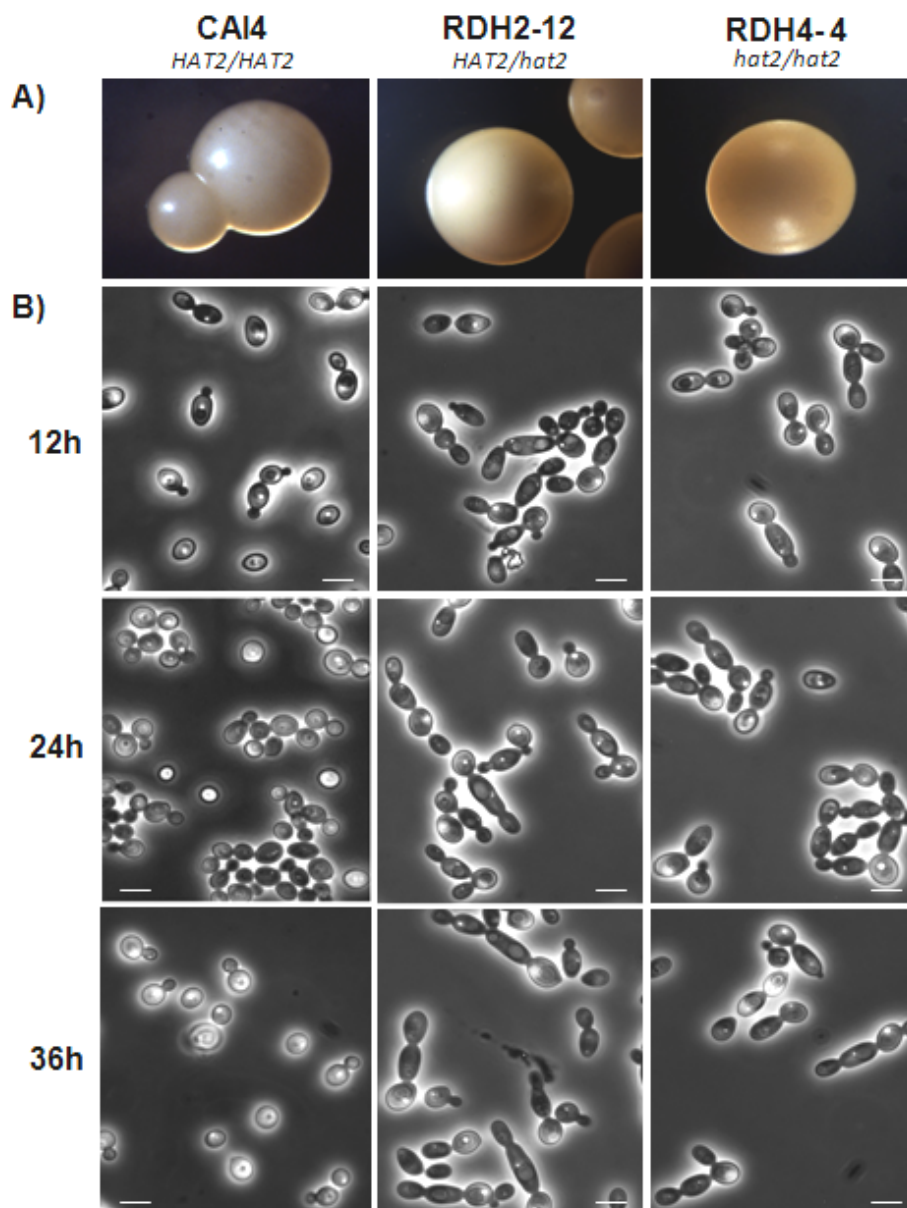


Fig. 52.- Morfología celular. A) Morfología de las colonias formadas por los mutantes *hat2* y la cepa parental CAI4 tras cuatro días de crecimiento a 28°C en YEPD sólido. B) Morfología celular de los mutantes *hat2* y de la cepa parental CAI4 tras inocular 1 colonia de cada cepa. Las fotografías se tomaron tras 12h de crecimiento en medio líquido e Lee, pH 6.8 a 28°C. La barra equivale a 5 μ m.

En *C. albicans* durante el crecimiento a 28°C en medios mínimos (YNB o Lee), y en medio rico (YEPD) del mutante homocigoto RDH4-4 (*hat2/hat2*), no muestra diferencias apreciables en la morfología.

Las colonias formadas por los mutantes *hat2* cuando crecen en medio sólido YEPD presentan al igual que las colonias de cultivos silvestres, forma regular redondeada, aspecto húmedo y son lisas y blandas como se muestra en la figura 52A.

Durante los tres tiempos de crecimiento en medio líquido que se muestran en la figura 52B, las células de la cepa heterocigota y de las homocigotas para la delección de *HAT2*, son levaduriformes no distinguiéndose de la morfología celular del cultivo parental.

19.2. Efecto de la delección del gen *HAT2* en filamentación

19.2.1. Análisis de la capacidad de filamentación en medio sólido

La observación de la morfología colonial en diversos medios sólidos, se realizó del mismo modo que con los mutantes *gcn5* y *hat1* inoculando células de las diferentes cepas

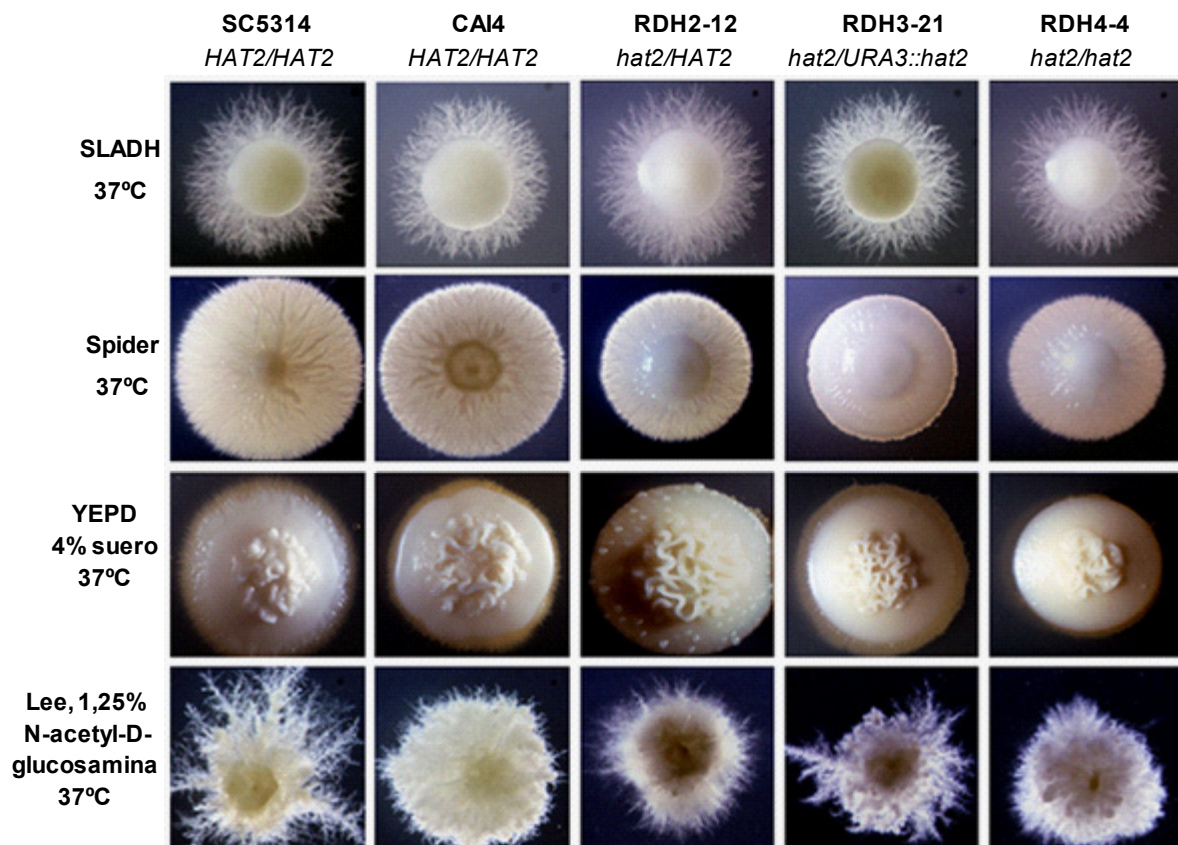


Fig. 53.- Inducción de la miceliación en medio sólido. Morfología de las colonias de las cepas silvestres (CAI4 y SC5314), heterocigota (RDH2-12) y homocigotas para la delección del gen *HAT2* (RDH3-21 y RDH4-4) creciendo a 37 °C sobre medios sólidos inductores de la formación de micelio. Las fotografías se tomaron después de 4 días (*Spider* y Lee + suero 4%) ó 7 días de incubación (Lee-NAcGlc 1.25% y SLADH).

(entre 50 y 100 ufc) en placas de medio sólido de los siguientes medios inductores: Spider, YEPD con suero al 4%, medio Lee con NAcGlc al 1,25% y SLADH. El efecto de estos inductores ya se ha expuesto en capítulos anteriores.

Tras los períodos correspondientes de incubación a 37°C, se observó que las cepas mutantes filamentaban mostrando un fenotipo similar al de las cepas silvestres, CAI4 y SC5314, (figura 53).

El crecimiento de *C. albicans* dentro de una matriz de agar induce una rápida filamentación (Brown & Botstein, 1999), incluso a temperaturas de incubación de 28°C, el factor inductor de este medio es probablemente la limitación de oxígeno (Ernst, 2000).

Como se muestra en la figura 54, la presencia de una matriz circundante, no afecta al mutante en el gen *HAT2*, pues la morfología de las colonias resulta ser muy similar a la de las cepas silvestres, si bien, podemos notar una mayor capacidad de filamentación. La capacidad de las células de *C. albicans* de filamentar en estas condiciones podría jugar un papel importante durante la infección de los tejidos del hospedador, ya que le proporciona capacidad de invasión (Giusani *et al.*, 2002).



Fig. 54.- Aspecto de las colonias formadas por las cepas SC5314, CAI4, RDH2-12, RDH3-21 y RDH4-4 cuando crecen embebidas dentro de una matriz de agar.

En cuanto a la capacidad para formar clamidosporas, estudios realizados en nuestro laboratorio, (Rashki, Z., tesis doctoral 2009) muestran que la delección del gen *HAT2* no impide la formación de dichas estructuras a diferencia de lo que ocurre con el mutante *gcn5*.

19.2.2. Análisis de la capacidad de filamentación en medio líquido

La transición levadura-hifa inducida por temperatura en medio líquido Lee pH 6,8 o por suero y temperatura, cambio de pH ácido a neutro y NAcGlc se llevó a cabo tal como se describe en el apartado 2.2.3. (Materiales y Métodos).

El seguimiento del fenómeno de filamentación de las diversas cepas, se realizó mediante observación microscópica y se tomaron fotografías a diferentes tiempos (0, 1, 2 y 4h) tras inoculación en medio inductor.

En estas condiciones la emisión del tubo germinativo se observa al igual que en la cepa parental, tras 1h de incubación. Tras 4h de incubación a 37°C se observa que el desarrollo de las hifas en las cepas heterocigota y homocigotas para la delección del gen *HAT2*, es indistinguible del de las hifas de la cepa parental CAI4 en esas mismas condiciones (figura 55).

La inducción de la transición dimórfica en presencia de suero y temperatura de las cepas mutantes (figura 56), resulta ser muy similar a la de la cepa parental. El mismo resultado se obtuvo cuando se utilizaron los inductores NAcGlc en lugar de glucosa como fuente de carbono y cambio de pH ácido a neutro (datos no mostrados).

Por lo tanto, la delección del gen *HAT2* no afecta de forma relevante a la transición levadura-hifa en dichas condiciones.

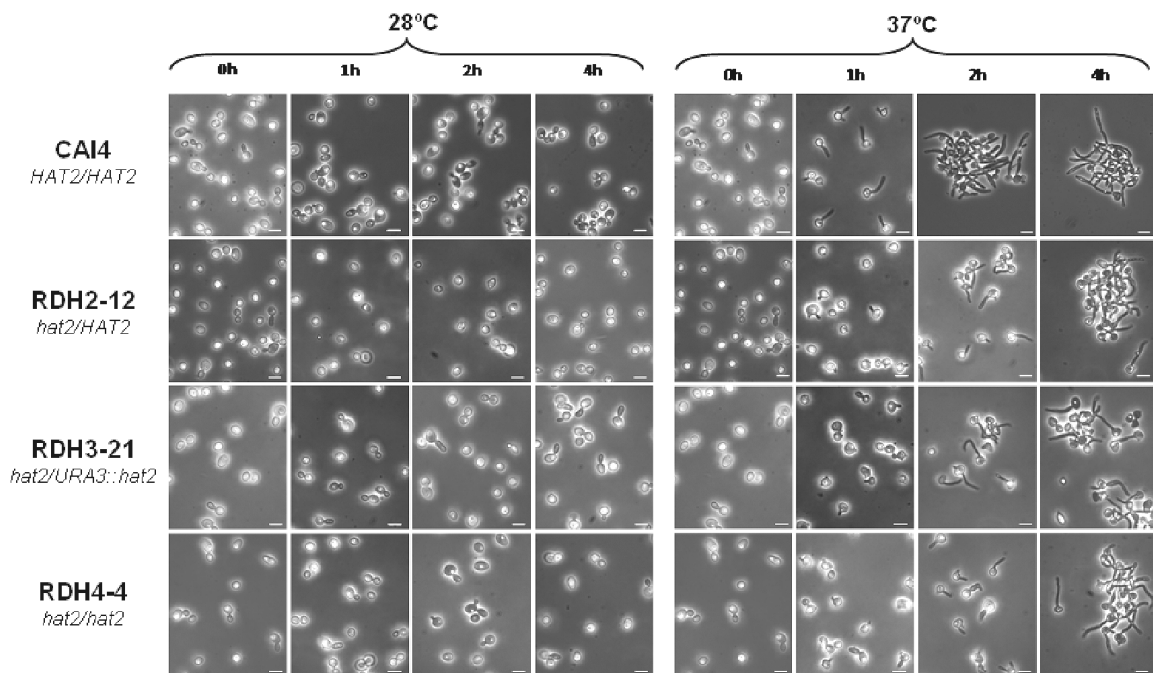


Fig. 55. Inducción de micelio en medio líquido Lee, pH 6,8 a 37°C. La cepa parental CAI4 forma hifas en respuesta a la temperatura. Lo mismo puede observarse con la cepa heterocigota RDH2-12 y las cepas homocigotas para la delección de *HAT2*, RDH3-21 y RDH4-4 respectivamente. La barra equivale a 5µm.

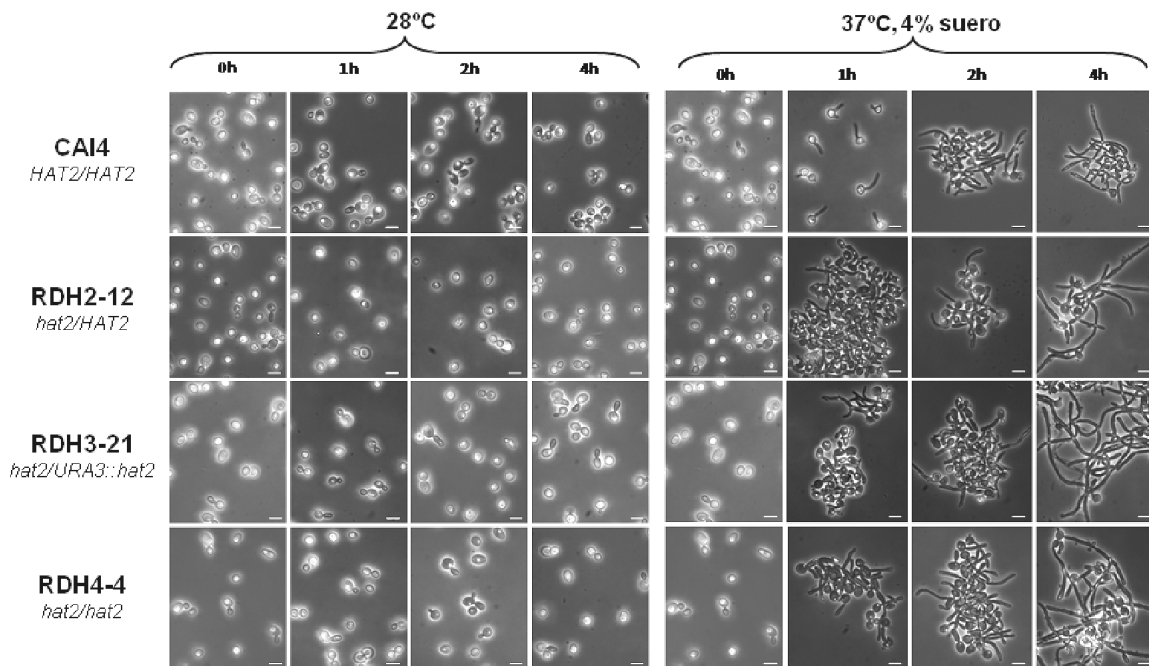


Fig. 56.- Inducción de micelio en medio líquido Lee, pH 6,8 a 37°C suplementado con suero al 4%. La cepa parental CAI4 forma hifas en respuesta a la temperatura y al suero. El mismo resultado puede observarse con la cepa heterocigota RDH2-12 y las cepas homocigotas para la delección de *HAT2*, RDH3-21 y RDH4-4 respectivamente. La barra equivale a 5µm.

**Comparación de los datos de expresión diferencial de las cepas
RGL4 (*hat1/hat1*) y RDG4 (*gcn5/gcn5*)**

20. COMPARACIÓN DE LOS DATOS DE EXPRESIÓN DIFERENCIAL DE LAS CEPAS RGL4-4 (*hat1/hat1*) y RDG4-6 (*gcn5/gcn5*)

En la memoria que se presenta, se ha abordado el estudio del papel que desempeñan Gcn5p y Hat1p, proteínas que por homología a *S. cerevisiae* forman parte de complejos con actividad acetiltransferasa de histonas. Los resultados expuestos en capítulos anteriores muestran que la delección del gen *GCN5* altera la expresión de un número mayor de genes que *HAT1* pero como se muestra en la tabla XIX, algunos grupos de genes se encuentran alterados en ambos mutantes.

	Exponencial 28°C	Inducción 37°C		
		15'	1h	3h
Sobreexpresados en ambos mutantes	20 genes <i>GRP2, STF2, OSM1, GUT1, orf19.3986, orf19.675, orf19.7568, UCF1, GPH1, HGT6, orf19.1610, FDH3, HGT8, UBI4, PGA62, PDC11, RIM101, HGT7, TCC1, orf19.6982</i>	5 genes <i>YWP1, orf19.6600, PDC11, ENO1, PGA62</i>	9 genes <i>PIR1, PGA13, FRE10, YWP1, HSP90, FTR1, SIM1, GPD2, PGA62</i>	4 genes <i>SIM1, YWP1, MET15, PGA62</i>
Subexpresados en ambos mutantes	—	10 genes <i>HAC1, YHB5, SEC61, PMT1, MYO2, SUN41, orf19.2397, TOS1, ALS3, orf19.1106</i>	11 genes <i>SAP4, SOD5, SAP5, SAP6, HWP1, UCF1, IHD1, SNZ1, ECM33, PCK1, ALS3</i>	3 genes <i>IFE2, ZRT1, PRA1</i>
Sobreexpresados en <i>gcn5</i> y subexpresados en <i>hat1</i>	—	—	—	—
Subexpresados en <i>gcn5</i> y sobreexpresados en <i>hat1</i>	1 gen <i>HHF1</i>	—	4 genes <i>HHT1, HHF1, HHT21, HHF22</i>	—

Tabla XIX.- Genes expresados diferencialmente en ambos mutantes, RDG4-6 (*gcn5/gcn5*) y RGL4-4 (*hat1/hat1*), en cada una de las condiciones analizadas.

En conjunto, 54 genes se expresan diferencialmente por la delección de cualquiera de los dos genes en al menos una de las condiciones de estudio. De éstos, 37 genes son afectados de la misma forma por la delección de cualquiera de los dos genes en al menos un tiempo de inducción, 13 genes son sobreexpresados y 23 genes subexpresados. Solamente un gen, *PGA62* se mantiene sobreexpresado en ambos mutantes en cualquiera de las 4 condiciones de estudio.

En general se puede apreciar que la delección de *GCN5* produce efectos más acusados que la de *HAT1*, ya que 24 de 27 genes regulados de forma común están regulados de forma más intensa (más sobreexpresados o más subexpresados)

Pga62p es una proteína de la pared celular con anclaje GPI que se sobreexpresa cuando *C. albicans* crece formando *biofilms*. La delección del gen que codifica esta proteína altera la estructura y estabilidad de la pared celular (Moreno-Ruiz *et al.*, 2009).

Como puede observarse en la tabla XIX, la mayor similitud entre los dos mutantes ocurre durante el crecimiento exponencial en relación con los genes sobreexpresados en ambos mutantes y a los 15 minutos y tras 1h de inducción de la transición dimórfica.

Estos genes expresados diferencialmente se distribuyeron en categorías funcionales en base a los tres criterios utilizados por la terminología *GO* (*Gene Ontologies*), utilizando la herramienta *GO TermFinder* disponible en la base de datos *Candida Genome Database*.

Entre los genes sobreexpresados en ambos mutantes durante el crecimiento exponencial, la categoría relacionada con el transporte de glucosa es la más destacada (tabla XX).

Nombre Común	Nombre sistemático	Función	Factor de variación <i>hat1</i>	Factor de variación <i>gcn5</i>
Genes sobreexpresados durante el crecimiento exponencial				
Transporte de glucosa				
<i>HGT6</i>	orf19.2020	Posible transportador de glucosa	1,983	5,718
<i>HGT7</i>	orf19.2023	Posible transportador de glucosa	2,76	4,6
<i>HGT8</i>	orf19.2021	Posible transportador de glucosa	3,117	7,809

Tabla XX.- Genes sobreexpresados diferencialmente en ambos mutantes, RDG4-6 (*gcn5/gcn5*) y RGL4-4 (*hat1/hat1*), durante el crecimiento exponencial.

Durante la transición levadura-hifa, en ambos mutantes cabe destacar la sobreexpresión de genes que codifican proteínas relacionadas con la estructura de la pared celular y la superficie celular (tabla XXI).

La sobreexpresión de *YWPI* durante todo el proceso inductivo podría estar reprimiendo la capacidad de adhesión de las células en estos dos mutantes, ya que como se indicó anteriormente, la ausencia de este gen produce un aumento de la capacidad de adhesión de las células y favorece la formación de *biofilms* (Granger *et al.*, 2005). En cualquier caso está de acuerdo con el cambio morfológico.

	Nombre Común	Nombre sistemático	Función	Factor de variación <i>hat1</i>	Factor de variación <i>gcn5</i>	
	Genes sobreexpresados					
Inducción	15'	Pared celular				
		PGA62	orf19.2765	Posible proteína con anclaje GPI	1,59	3,48
		PDC11	orf19.2877	Similar a piruvato descarboxilasa	1,6	2,43
		YWP1	orf19.3618	Posible proteína con anclaje GPI	1,9	3,75
		ENO1	orf19.395	Enolasa	1,56	2,54
	1h	Superficie celular				
		FRE10	orf19.1415	Principal reductasa férrica de superficie	2,218	2,934
		PGA62	orf19.2765	Posible proteína con anclaje GPI	2,013	2,596
		YWP1	orf19.3618	Posible proteína con anclaje GPI	4,59	4,55
		SIM1	orf19.5032	Mantenimiento de la pared celular	1,534	2,714
		PGA13	orf19.6420	Posible proteína con anclaje GPI	2,527	1,882
		HSP90	orf19.6515	Chaperona de la familia Hsp90	1,627	1,819
		FTR1	orf19.7219	Permeasa ferrica de alta afinidad	1,748	2,506
	3h	Pared celular				
		PGA62	orf19.2765	Posible proteína con anclaje GPI	1,573	3,794
YWP1		orf19.3618	Posible proteína con anclaje GPI	5,31	10,695	
SIM1		orf19.5032	Mantenimiento de la pared celular	1,736	2,356	
	MET15	orf19.5645	O-acetilhomoserina O-acetilserina sulfhidrolasa	1,58	1,62	

Tabla XXI.- Genes sobreexpresados diferencialmente en ambos mutantes, RDG4-6 (*gcn5/gcn5*) y RGL4-4 (*hat1/hat1*), durante la transición dimórfica. Se han destacado en negrita los genes *PGA62* y *YWP1*.

En la tabla XXII se recogen los genes comunes subexpresados, destacando las categorías funcionales de adhesinas y aspartil proteasas. Anteriormente ya se ha indicado cómo la actividad proteolítica de aspartil proteasas (Saps) secretadas por *C. albicans* está asociada con la invasión de tejidos y por tanto con la capacidad virulenta de este patógeno. Estudios de virulencia en ratón, realizados en nuestro grupo de investigación (Rashki, Z., 2009, y Rashki, A., tesis doctorales) muestran que ambos mutantes, *hat1* y *gcn5* son hipovirulentos. La subexpresión de estos genes entre otros, podría explicar estos resultados,

	Nombre Común	Nombre sistemático	Función	Factor de variación <i>hat1</i>	Factor de variación <i>gcn5</i>	
	Genes subexpresados					
Inducción	15'	Región extracelular				
		TOS1	orf19.1690	Posible anclaje de alfa-aglutinina	0,586	0,515
		ALS3	orf19.1816	Adhesina con anclaje GPI	0,518	0,339
		SUN41	orf19.3642	Posible glucosidasa de pared celular	0,633	0,62
	1h	Adhesión al hospedador				
		HWP1	orf19.1321	Proteína de pared celular de hifas	0,53	0,1
		ALS3	orf19.1816	Adhesina, con posible anclaje GPI	0,64	0,12
		ECM33	orf19.3010.1	Proteína de pared celular con posible anclaje GPI	0,65	0,49
		Aspartil proteasas				
		SAP6	orf19.5542	Aspartil proteasa	0,56	0,473
		SAP5	orf19.5585	Aspartil proteasa	0,374	0,265
		SAP4	orf19.5716	Aspartil proteasa	0,394	0,342
	3h	Ninguna categoría significativa				

Tabla XXII.- Genes subexpresados diferencialmente en ambos mutantes, RDG4-6 (*gcn5/gcn5*) y RGL4-4 (*hat1/hat1*), durante la transición dimórfica.

indicándonos además un papel destacado de las acetiltransferasas de histonas en la capacidad de virulencia, adhesión e interacciones célula-célula de *C. albicans*.

En cuanto a genes comunes expresados diferencialmente en ambos mutantes, encontramos la histona H3, codificada por los genes *HHT1* y *HHT21*, y la histona H4 codificada por los genes *HHF1* y *HHF22*. Estos cuatro genes se encuentran subexpresados tras 1h de inducción en el mutante *gcn5* mientras que se encuentran sobreexpresados en el mutante *hat1* en ese mismo tiempo.

También durante el crecimiento exponencial el gen *HHF1* (histona H4) está subexpresado en el mutante *gcn5* mientras que en el mutante *hat1* está sobreexpresado.

Hat1p acetila la histona H4 libre en el citoplasma y en el núcleo, siguiendo un patrón muy conservado evolutivamente. El hecho de que la expresión de los genes que codifican esta histona estén sobreexpresados durante el crecimiento exponencial y al menos en algún momento durante la inducción podría ser un mecanismo compensatorio de la célula al tratar de suplir la falta de acetilación de esta histona con un mayor número de unidades, sin olvidar que posiblemente otros complejos puedan estar realizando dicha función aunque con menor eficiencia.

En el mutante *gcn5* los procesos de traducción están seriamente afectados, la subexpresión de *HHF1* durante el crecimiento exponencial o de los genes que codifican las histonas H4 y H3 tras 1h de inducción podría responder a este defecto.

21. VALIDACIÓN MEDIANTE *NORTHERN BLOT* DE LOS DATOS DE EXPRESIÓN DIFERENCIAL OBTENIDOS EN LOS MICROARRAYS

El análisis de microarrays genera datos de expresión relativa para miles de genes. Con el fin de validar los resultados obtenidos, en el presente trabajo se analizó mediante *Northern Blot* la expresión diferencial de algunos genes relacionados con morfogénesis y/o por encontrarse alterados en los mutantes según los resultados obtenidos con los microarrays.

En la cepa RDG4-6 (*gcn5/gcn5*) se ha comprobado la subexpresión de *HWPI* y la sobreexpresión de *NRG1* durante el crecimiento exponencial y la variación de dichos genes durante la transición dimórfica.

Del mismo modo, en la cepa RGL4-4 (*hat1/hat1*) se ha confirmado la variación de la expresión de los genes *CTA2* y *HHF1*.

La señal generada por cada sonda en el *Northern Blot*, se valoró con el programa *Image Gauge V.4.0.* (FUJIFILM). Para normalizar los valores de expresión de los genes estudiados

se utilizaron los datos de expresión del gen *ACT1* que codifica actina en *C. albicans*. En las gráficas de la figura 57 se muestran los resultados obtenidos. A partir de los datos de intensidad normalizados de cada cepa se obtuvieron los valores de expresión mutante/CAI4. Estos resultados se han representado junto a los obtenidos en los microarrays.

En todos los casos en los que con microarrays se detectó expresión diferencial en la cepa mutada, respecto a la cepa parental, se ha podido observar una variación similar mediante *Northern Blot*. El valor absoluto de la variación en algunos casos es mayor en los datos obtenidos mediante *Northern Blot* que en los de microarrays. Dicha variación también se ha registrado cuando para la validación se ha utilizado la técnica de RT-PCR en tiempo real (Cheng *et al.*, 2006; Liu *et al.*, 2005). Estos datos indican que ambas técnicas son más sensibles que los microarrays, y explica que algunos de los datos obtenidos por *Northern Blot* no se hayan registrado en los datos generados de los microarrays. En cualquier caso, en todas las condiciones analizadas se ha comprobado la expresión diferencial detectada en los microarrays, por lo que se confirma la fiabilidad de los resultados obtenidos mediante esta técnica.

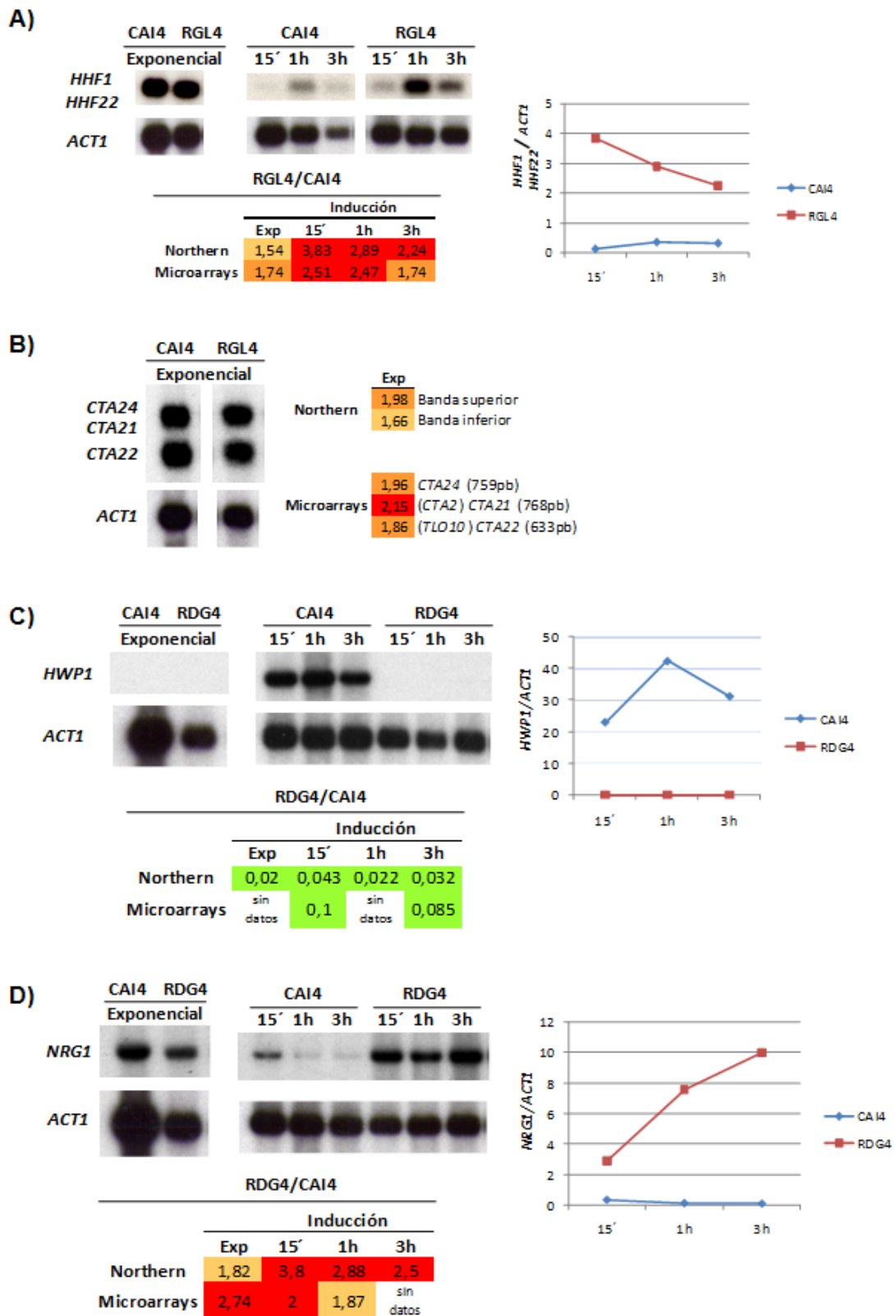


Fig. 57.- Comprobación mediante *Northern Blot* de la expresión de los genes *HHF1* (A) y *CTA2* (B) en la cepa RGL4-4 (*hat1/hat1*) vs CAI4 (*HAT1/HAT1*) y de los genes *HWP1* (C) y *NRG1* (D) en la cepa RDG4-6 (*gcn5/gcn5*) vs CAI4 (*GCN5/GCN5*). La expresión del gen *ACT1* sirvió como control de carga. En las gráficas se han representado los valores de expresión normalizados obtenidos por *Northern Blot*. La relación de expresión RGL4-4/CAI4 y RDG4-6/CAI4 para cada muestra, obtenida mediante *Northern Blot* se comparó con la obtenida a partir de los microarrays. Los colores naranja y rojo indican variaciones de sobreexpresión (mutante/CAI4 ≥ 1.5) y el verde subexpresión (mutante/CAI4 ≤ 0.66). Exp.: crecimiento exponencial en forma de levaduras.

V. CONCLUSIONES

- 1.- Se ha llevado a cabo la caracterización *in silico* de los genes *GCN5*, *HAT1* y *HAT2* de *Candida albicans*. La homología con los genes *ScGCN5*, *ScHAT1* y *ScHAT2* de *Saccharomyces cerevisiae* permite afirmar que estos genes codifican acetiltransferasas de histonas.
- 2.- Se ha llevado a cabo la delección de los genes *GCN5*, *HAT1* y *HAT2* en la cepa CAI4 de *C. albicans*. La cepa carente de *GCN5* presenta acusadas alteraciones morfogénicas en todos los medios ensayados: crecimiento vegetativo a 28°C únicamente como pseudohifas, incapacidad para filamentación en medios líquidos inductores e incapacidad para formar clamidosporas. La delección del gen *HAT1* también causa alteraciones morfogénicas importantes ya que la cepa mutante presenta formación de pseudohifas cuando crece a 28°C y en medios líquidos inductores forma hifas aberrantes con engrosamientos y ramificaciones. En medios sólidos inductores se puede observar hiperfilamentación. A diferencia de lo que ocurre con la delección de *GCN5*, no presenta alteración en la formación de clamidosporas. La delección del gen *HAT2* no afecta de forma relevante a la morfología de *C. albicans* ni a la transición levadura-hifa bajo las condiciones ensayadas.
- 3.- Se ha comparado el transcriptoma del mutante *gcn5* con el de la cepa parental CAI4, observándose que:
 - En fase exponencial de crecimiento, a 28°C, en la cepa delecionada se encuentra alterada la expresión de 279 genes, considerando un factor de variación ≥ 1.5 veces. Aparecen sobreexpresados genes relacionados con transporte de glucosa, pared celular, y membrana plasmática. Destacan la sobreexpresión de 10 genes que codifican proteínas unidas covalentemente mediante anclaje GPI (*glycophosphatidylinositol*), la sobreexpresión de genes implicados en la respuesta a estrés oxidativo y de factores de transcripción con el dominio característico en “dedos de zinc” de unión a DNA. Entre los genes subexpresados, se encuentran principalmente genes que codifican proteínas relacionadas con procesos de biogénesis de los complejos ribonucleoproteicos, ensamblado de unidades ribosomales y traducción. Cabe destacar la subexpresión de 5 genes relacionados con el metabolismo del azufre.
- 4.- Durante la transición dimórfica, aparece alterada la expresión de 338 genes. Las categorías más representadas engloban genes relacionados con pared y superficie celular; procesos de óxido-reducción, transporte iónico transmembranal y homeostasis de hierro. De nuevo, se encuentran alterados los 10 genes que codifican proteínas unidas covalentemente mediante anclaje GPI (*glycophosphatidylinositol*) a la pared celular. Se ha detectado subexpresión de 4 de los 8 genes que integran la familia de aglutininas ALS. La mutación de estos genes disminuye en general la adherencia a diversos tipos celulares o ligandos en el hospedador. Los genes *SAP4*, *SAP5* y *SAP6* que codifican aspartil proteasas también están

subexpresados, la actividad proteolítica de estas enzimas está asociada con la invasividad y por tanto con la virulencia de *C. albicans*.

5.- Dado que el mutante *gnc5* es hipovirulento, los resultados obtenidos indican que la proteína Gcn5p juega un papel clave en la represión de genes implicados en la estructura de la pared celular y genes de la superficie implicados en el establecimiento de la hidrofobicidad y antigenicidad siendo ambas propiedades determinantes de la capacidad de adhesión y virulencia en *C. albicans*.

6.- Se ha comparado el transcriptoma del mutante sencillo *hat1* con el de la cepa parental CAI4, observándose que:

- En fase exponencial de crecimiento a 28°C, en la cepa delecionada se encuentra alterada la expresión de 61 genes, considerando un factor de variación ≥ 1.5 veces. Aparecen sobreexpresados genes relacionados con activación transcripcional, transporte de glucosa y nucleosoma. Destaca la sobreexpresión de 8 genes de la familia de activadores transcripcionales TLO. La mayoría de los genes subexpresados en esta condición no tienen función asignada en la base de datos CGD.

7.- Durante la transición dimórfica, en el mutante *hat1*, aparece alterada la expresión de 100 genes. Las categorías más representadas engloban genes relacionados con el nucleosoma, superficie celular, adhesión, patogénesis, formación de *biofilms*, catabolismo de glucosa y metabolismo de piruvato. Destaca la subexpresión de genes implicados en invasividad, adhesión e interacciones célula-célula. Los genes *SAP4*, *SAP5* y *SAP6* que codifican aspartil proteasas están subexpresados en este mutante.

8.- Considerando que el mutante *hat1* es hipovirulento, los resultados obtenidos indican que la proteína Hat1p participa en la represión de genes involucrados en adhesión, patogénesis e interacción celular, procesos determinantes de la capacidad virulenta de *C. albicans*.

9.- Se ha comparado el transcriptoma de *gcn5* con el de *hat1* observándose que:

Solamente el gen *PGA62* relacionado con la estructura y estabilidad de la pared celular, se mantiene sobreexpresado en ambos mutantes en cualquiera de las 4 condiciones de estudio.

Durante la transición levadura-hifa, en ambos mutantes cabe destacar la sobreexpresión de genes que codifican proteínas relacionadas con la estructura de la pared celular y la superficie celular. La subexpresión de genes que codifican aspartil proteasas y adhesinas entre otros, podría explicar la hipovirulencia observada en ambos mutantes, indicándonos además un papel destacado de las acetiltransferasas de histonas en la capacidad de virulencia, adhesión e interacciones célula-célula de *C. albicans*.

VI. BIBLIOGRAFÍA

- Adam, B., Baillie, G. S. & Douglas, L. J. (2002).** Mixed species biofilms of *Candida albicans* and *Staphylococcus epidermidis*. *Journal of medical microbiology* **51**, 344-349.
- Agabian, N., Odds, F. C., Poulain, D., Soll, D. R. & White, T. C. (1994).** Pathogenesis of invasive candidiasis. *J Med Vet Mycol* **32 Suppl 1**, 229-237.
- Alberts, B., Bray, D., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K. & Watson, J. D. (1996).** *Molecular Biology of the cell*: Garland Science; 5 edition
- Alem, M. A. & Douglas, L. J. (2005).** Prostaglandin production during growth of *Candida albicans* biofilms. *Journal of medical microbiology* **54**, 1001-1005.
- Alonso-Monge, R., Navarro-García, F., Molero, G., Diez-Orejas, R., Gustin, M., Pla, J. & Nombela, C. (1999a).** Role of the mitogen-activated protein kinase Hog1p in morphogenesis and virulence of *Candida albicans*. *Journal of bacteriology* **181**, No. 10, 3058-3068.
- Alonso-Monge, R., Navarro-García, F., Molero, G., Diez-Orejas, R., Gustin, M., Pla, J., Sanchez, M. & Nombela, C. (1999b).** 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., Roman, E., Negredo, A. I., 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* **2**, 351-361.
- Allfrey, V. G., Faulkner, R. & Mirsky, A. E. (1964).** Acetylation and Methylation of Histones and Their Possible Role in the Regulation of Rna Synthesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **51**, 786-794.
- Andaluz, E., Ciudad, T., Gomez-Raja, J., Calderone, R. & Larriba, G. (2006).** Rad52 depletion in *Candida albicans* triggers both the DNA-damage checkpoint and filamentation accompanied by but independent of expression of hypha-specific genes. *Molecular microbiology* **59**, 1452-1472.
- Anderson, J. D. & Widom, J. (2001).** Poly(dA-dT) promoter elements increase the equilibrium accessibility of nucleosomal DNA target sites. *Molecular and cellular biology* **21**, 3830-3839.
- Angus-Hill, M. L., Dutnall, R. N., Tafrov, S. T., Sternglanz, R. & Ramakrishnan, V. (1999).** Crystal structure of the histone acetyltransferase Hpa2: A tetrameric member of the Gcn5-related N-acetyltransferase superfamily. *Journal of molecular biology* **294**, 1311-1325.
- Bailey, D. A., Feldmann, P. J., Bovey, M., Gow, N. A. & Brown, A. J. (1996).** The *Candida albicans* HYR1 gene, which is activated in response to hyphal development, belongs to a gene family encoding yeast cell wall proteins. *Journal of bacteriology* **178**, 5353-5360.
- Balish, E. (1973).** Chlamyospore production and germ-tube formation by auxotrophs of *Candida albicans*. *Applied Microbiology* **25**, No.4, 615-620.
- Barman, H. K., Takami, Y., Ono, T., Nishijima, H., Sanematsu, F., Shibahara, K. & Nakayama, T. (2006).** Histone acetyltransferase 1 is dispensable for replication-coupled chromatin assembly but contributes to recover DNA damages created following replication blockage in vertebrate cells. *Biochemical and biophysical research communications* **345**, 1547-1557.

- Bartel, P. L. & Fields, S. (1997).** *Yeast 2-Hybrid System*: Oxford University Press, New York.
- Basehoar, A. D., Zanton, S. J. & Pugh, B. F. (2004).** Identification and distinct regulation of yeast TATA box-containing genes. *Cell* **116**, 699-709.
- Benhamed, M., Martin-Magniette, M. L., Tacconnat, L. & other authors (2008).** Genome-scale Arabidopsis promoter array identifies targets of the histone acetyltransferase GCN5. *Plant J* **56**, 493-504.
- Bennett, R. J. & Johnson, A. D. (2003).** Completion of a parasexual cycle in *Candida albicans* by induced chromosome loss in tetraploid strains. *EMBO Journal* **22**, No. 10, 2505-2515.
- Bennett, R. J. & Johnson, A. D. (2006).** The role of nutrient regulation and the Gpa2 protein in the mating pheromone response of *C. albicans*. *Molecular microbiology* **62**, 100-119.
- Bensen, E. S., Filler, S. G. & Berman, J. (2002).** A forkhead transcription factor is important for true hyphal as well as yeast morphogenesis in *Candida albicans*. *Eukaryotic cell* **1**, 787-798.
- Berg, J. M., Tymoczko, J. & Stryer, L. (2002).** *Biochemistry*. New York, W.H. Freeman and Co.
- Berman, J. & Sudbery, P. E. (2002).** *Candida albicans*: a molecular revolution built on lessons from budding yeast. *Nature* **3**, 918-930.
- Bertram, G., Swoboda, R. K., Gooday, G. W., Gow, N. A. & Brown, A. J. (1996a).** Structure and regulation of the *Candida albicans* ADH1 gene encoding an immunogenic alcohol dehydrogenase. *Yeast (Chichester, England)* **12**, 115-127.
- Bertram, G., Swoboda, R. K., Gooday, G. W., Gow, N. A. R. & Brown, A. J. P. (1996b).** Structure and regulation of the *Candida albicans* ADH1 gene encoding an immunogenic alcohol dehydrogenase. *Yeast* **12**,(2), 115-127.
- Bhatti, M. M. & Sullivan, W. J., Jr. (2005).** Histone acetylase GCN5 enters the nucleus via importin-alpha in protozoan parasite *Toxoplasma gondii*. *The Journal of biological chemistry* **280**, 5902-5908.
- Birnboim, H. C. & Doly, J. (1979).** A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res* **7**, 1513-1523.
- Biswas, S., Dijck, P. V. & Datta, A. (2007).** Environmental sensing and signal transduction pathways regulating morphopathogenic determinants of *Candida albicans*. *Microbiology and molecular biology reviews* Vol. **71**, No. **2**, 348-376.
- Blasi, E., Pitzurra, L., Chimienti, A. R., Mazzolla, R., Puliti, M., Barluzzi, R. & Bistoni, F. (1995).** Differential susceptibility of yeast and hyphal forms of *Candida albicans* to proteolytic activity of macrophages. *Infection and immunity* **63**, 1253-1257.
- Bodey, G. P. (1993).** What's new in fungal infection in leukemic patients. *Leukemia & lymphoma* **11 Suppl 2**, 127-135.
- Boeke, J. D., Trueheart, J., Natsoulis, G. & Fink, G. R. (1987).** 5-Fluorootic acid as a selective agent in yeast molecular genetic. *Methods in Enzymology* **157**, 164-174.
- Boorsma, A., Foat, B. C., Vis, D., Klis, F. & Bussemaker, H. J. (2005a).** T-profiler: scoring the activity of predefined groups of genes using gene expression data. *Nucleic Acids Res* **33**, W592-595.

- Boorsma, A., Foat, B. C., Vis, D., Klis, F. & Bussemaker, H. J. (2005b).** T-profiler: scoring the activity of predefined groups of genes using gene expression data. *Nucleic acids research* **33**, W592-W595.
- Borneman, A. R., Leigh-Bell, J. A., Yu, H., Bertone, P., Gerstein, M. & Snyder, M. (2006).** Target hub proteins serve as master regulators of development in yeast. *Genes & development* **20**, 435-448.
- Braun, B. R. & Johnson, A. D. (1997).** Control of filament formation in *Candida albicans* by the transcriptional repressor TUP1. *Science (New York, NY)* **277**, 105-109.
- Braun, B. R., Head, W. S., Wang, M. X. & Johnson, A. D. (2000).** Identification and characterization of *TUP1* regulated genes in *Candida albicans*. *Genetics* **156**, 31-44.
- Braun, B. R. & Johnson, A. D. (2000).** TUP1, CPH1 and EFG1 make independent contributions to filamentation in *Candida albicans*. *Genetics* **155**, 57-67.
- Braun, B. R., Kadosh, D. & Johnson, A. D. (2001).** NRG1, a repressor of filamentous growth in *C. albicans*, is down-regulated during filament induction. *The EMBO journal* **20**, 4753-4761.
- Braun, B. R., van Het Hoog, M., d'Enfert, C. & other authors (2005).** A human-curated annotation of the *Candida albicans* genome. *PLoS genetics* **1**, 36-57.
- Brazma, A., Hingamp, P., Quackenbush, J. & other authors (2001).** Minimum information about a microarray experiment (MIAME)-toward standards for microarray data. *Nature genetics* **29**, 365-371.
- Brown, A. J. P. & Gow, N. A. R. (1999).** Regulatory networks controlling *Candida albicans* morphogenesis. *Trends in microbiology* **7**, No. 8, 333 - 338.
- Brown, D. H., Giusani, A. D., Chen, X. & Kumamoto, C. A. (1999a).** Filamentous growth of *Candida albicans* in response to physical environmental cues and its regulation by the unique *CZF1* gene. *Molecular Microbiology* **34**, 651-662.
- Brown, D. H., Jr., Giusani, A. D., Chen, X. & Kumamoto, C. A. (1999b).** Filamentous growth of *Candida albicans* in response to physical environmental cues and its regulation by the unique *CZF1* gene. *Molecular microbiology* **34**, 651-662.
- Brown, P. O. & Botstein, D. (1999).** Exploring the new world of the genome with DNA microarrays. *Nature Genetics Supplement* **21**.
- Bulger, M. (2005).** Hyperacetylated chromatin domains: lessons from heterochromatin. *The Journal of biological chemistry* **280**, No.23, 21689-21692.
- Bustin, M., Catez, F. & Lim, J. H. (2005).** The dynamics of histone H1 function in chromatin. *Molecular cell* **17**, 617-620.
- Buurman, E. T., Westwater, C., Hube, B., Brown, A. J., Odds, F. C. & Gow, N. A. (1998).** Molecular analysis of CaMnt1p, a mannosyl transferase important for adhesion and virulence of *Candida albicans*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **95**, 7670-7675.
- Calcagno, A. M., Bignell, E., Rogers, T. R., Jones, M. D., Muhlschlegel, F. A. & Haynes, K. (2005).** *Candida glabrata* Stell1 is involved in adaptation to hypertonic stress, maintenance of wild-type levels of filamentation and plays a role in virulence. *Med Mycol* **43**, 355-364.

- Calderone, R. A. & Fonzi, W. A. (2001).** Virulence factors of *Candida albicans*. *Trends in microbiology* **9**, 327-335.
- Calderone, R. A. (2002).** *Candida and candidiasis*. Washington, ASM Press.
- Calera, J. A., Zhao, X. J. & Calderone, R. (2000).** Defective hyphal development and avirulence caused by a deletion of the SSK1 response regulator gene in *Candida albicans*. *Infect Immun* **68**, 518-525.
- Cao, F., Lane, S., Raniga, P. P., Lu, Y., Zhou, Z., Ramon, K., Chen, J. & Liu, H. (2006).** The Flo8 transcription factor is essential for hyphal development and virulence in *Candida albicans*. *Molecular biology of the cell* **17**, 295-307.
- Carre, C., Szymczak, D., Pidoux, J. & Antoniewski, C. (2005).** The histone H3 acetylase dGcn5 is a key player in *Drosophila melanogaster* metamorphosis. *Molecular and cellular biology* **25**, 8228-8238.
- Carrillo-Muñoz, A., Brió, S. & Quindós, G. (2001).** Una nueva generación de fármacos antifúngicos. *Revista Iberoamericana de Micología* **18**, 2-5.
- Carrozza, M. J., Utley, R. T., Workman, J. L. & Cote, J. (2003).** The diverse functions of histone acetyltransferase complexes. *Trends Genet* **19**, 321-329.
- Cassola, A., Parrot, M., Silberstein, S., Magee, B. B., Passeron, S., Giasson, L. & Cantore, M. L. (2004).** *Candida albicans* lacking the gene encoding the regulatory subunit of protein kinase A displays a defect in hyphal formation and an altered localization of the catalytic subunit. *Eukaryotic cell* **3**, 190-199.
- Cigan, A. M. & Donahue, T. F. (1987).** Sequence and structural features associated with translational initiator regions in yeast-a review. *Gene* **59**, 1-18.
- Clarke, A. S., Lowell, J. E., Jacobson, S. J. & Pillus, L. (1999).** Esa1p is an essential histone acetyltransferase required for cell cycle progression. *Molecular and cellular biology* **19**, 2515-2526.
- Col, E., Caron, C., Seigneurin-Berny, D., Gracia, J., Favier, A. & Khochbin, S. (2001).** The histone acetyltransferase, hGCN5, interacts with and acetylates the HIV transactivator, Tat. *The Journal of biological chemistry* **276**, 28179-28184.
- Cole, G. T., Seshan, K. R., Phaneuf, M. & Lynn, K. T. (1991).** Chlamydospore-like cells of *Candida albicans* in the gastrointestinal tract of infected, immunocompromised mice. *Canadian journal of microbiology* **37**, 637-646.
- Conaway, R. C., Brower, C. S. & Conaway, J. W. (2002).** Emerging roles of ubiquitin in transcription regulation. *Science (New York, NY)* **296**, 1254-1258.
- Cormack, B. P., Bertram, G., Egerton, M., Gow, N. A., Falkow, S. & Brown, A. J. (1997).** Yeast-enhanced green fluorescent protein (yEGFP) a reporter of gene expression in *Candida albicans*. *Microbiology* **143** (Pt 2), 303-311.
- Csank, C., Makris, C., Meloche, S., Schroppel, K., Rollinghoff, M., Dignard, D., Thomas, D. Y. & Whiteway, M. (1997).** Derepressed hyphal growth and reduced virulence in a VH1 family-related protein phosphatase mutant of the human pathogen *Candida albicans*. *Molecular biology of the cell* **8**, 2539-2551.
- Cutler, J. E. (1991).** Putative virulence factors of *Candida albicans*. *Annual review of microbiology* **45**, 187-218.
- Chaffin, W. L. (2008).** *Candida albicans* cell wall proteins. *Microbiol Mol Biol Rev* **72**, 495-544.

- Chen, Y. L., Kauffman, S. & Reynolds, T. B. (2008).** *Candida albicans* uses multiple mechanisms to acquire the essential metabolite inositol during infection. *Infection and immunity* **76**, 2793-2801.
- Cheng, G., Yeater, K. M. & Hoyer, L. L. (2006).** Cellular and molecular biology of *Candida albicans* estrogen response. *Eukaryot Cell* **5**, 180-191.
- Chio, T. (2004).** *Morphogenesis in C. albicans*. In *pathogenic fungi structural biology and taxonomy* Caister Academic Press.
- Chou, S., Lane, S. & Liu, H. (2006).** Regulation of mating and filamentation genes by two distinct Ste12 complexes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular and cellular biology* **26**, 4794-4805.
- d'Enfert, C., Goyard, S., Rodriguez-Arnaveilhe, S. & other authors (2005).** *CandidaDB*: a genome database for *Candida albicans* pathogenomics. *Nucl Acids Res* **33**, 353-357.
- De Backer, M. D., Magee, P. T. & Pla, J. (2000).** Recent developments in molecular genetics of *Candida albicans*. *Annual review of microbiology* **54**, 463-498.
- De Backer, M. D., Nelissen, B., Logghe, M. & other authors (2001).** An antisense-based functional genomics approach for identification of genes critical for growth of *Candida albicans*. *Nature biotechnology* **19**, 235-241.
- DeRisi, J. L., Iyer, V. R. & Brown, P. O. (1997).** Exploring the metabolic and genetic control of gene expression on a genomic scale. *Science (New York, NY)* **278**, 680-686.
- Dib, L., Hayek, P., Sadek, H., Beyrouthy, B. & Khalaf, R. A. (2008).** The *Candida albicans* Ddr48 protein is essential for filamentation, stress response, and confers partial antifungal drug resistance. *Med Sci Monit* **14**, BR113-121.
- Dirscherl, S. S. & Krebs, J. E. (2004).** Functional diversity of ISWI complexes. *Biochemistry and cell biology = Biochimie et biologie cellulaire* **82**, 482-489.
- Dixon, D. M., McNeil, M. M., Cohen, M. L., Gellin, B. G. & La-Montagne, J. R. (1996).** Fungal infections: a growing threat *Public Health Rep* **111**, 226-235.
- Dobson, M. J., Tuite, M. F., Roberts, N. A., Kingsman, A. J., Kingsman, S. M., Perkins, R. E., Conroy, S. C. & Fothergill, L. A. (1982).** Conservation of high efficiency promoter sequences in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nucleic acids research* **10**, 2625-2637.
- Doedt, T., Krishnamurthy, S., Bockmuhl, D. P., Tebarth, B., Stempel, C., Russell, C. L., Brown, A. J. & Ernst, J. F. (2004).** APSES proteins regulate morphogenesis and metabolism in *Candida albicans*. *Mol Biol Cell* **15**, 3167-3180.
- Douglas, L. J. (2003).** *Candida* biofilms and their role in infection. *Trends in microbiology* **11**, 30-36.
- Dyda, F., Klein, D. C. & Hickman, A. B. (2000).** GCN5-related N-acetyltransferases: a structural overview. *Annu Rev Biophys Biomol Struct* **29**, 81-103.
- Eisman, B., Alonso-Monge, R., Roman, E., Arana, D., Nombela, C. & Pla, J. (2006).** The Cek1 and Hog1 mitogen-activated protein kinases play complementary roles in cell wall biogenesis and chlamyospore formation in the fungal pathogen *Candida albicans*. *Eukaryotic cell* **5**, 347-358.

- Ekwall, K. (2005).** Genome-wide analysis of HDAC function. *Trends Genet* **21**, 608-615.
- Enloe, B., Diamond, A. & Mitchell, A. P. (2000).** A single-transformation gene function test in diploid *Candida albicans*. *Journal of bacteriology* **182**, 5730-5736.
- Ernst, J. F. (2000a).** Transcription factors in *Candida albicans* - environmental control of morphogenesis. *Microbiology* **146** (Pt 8), 1763-1774.
- Ernst, J. F. (2000b).** Transcription factors in *Candida albicans* - environmental control of morphogenesis. *Microbiology (Reading, England)* **146**, 1763 - 1774.
- Ernst, J. F. (2000c).** Regulation of dimorphism in *Candida albicans*. *Contributions to microbiology* **5**, 98-111.
- Esteller, M. (2007).** Cancer epigenomics: DNA methylomes and histone-modification maps. *Nat Rev Genet* **8**, 286-298.
- Espinosa MC, Rehman MA, Chisamore-Robert P, Jeffery D, Yankulov K (2010).** GCN5 Is a Positive Regulator of Origins of DNA Replication in *Saccharomyces cerevisiae*. *PLoS ONE* **5**(1): e8964. doi:10.1371/journal.pone.0008964
- Fauchon, M., Lagniel, G., Aude, J. C. & other authors (2002).** Sulfur sparing in the yeast proteome in response to sulfur demand. *Molecular cell* **9**, 713-723.
- Fazio, T. G., Kooperberg, C., Goldmark, J. P., Neal, C., Basom, R., Delrow, J. & Tsukiyama, T. (2001).** Widespread collaboration of Isw2 and Sin3-Rpd3 chromatin remodeling complexes in transcriptional repression. *Molecular and cellular biology* **21**, 6450-6460.
- Feinberg, A. P. & Vogelstein, B. (1984).** "A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity". Addendum. *Analytical biochemistry* **137**, 266-267.
- Feng, Q., Summers, E., Guo, B. & Fink, G. (1999).** Ras signaling is required for serum-induced hyphal differentiation in *Candida albicans*. *Journal of bacteriology* **181**, 6339-6346.
- Fonzi, W. A. & Irwin, M. Y. (1993).** Isogenic strain construction and gene mapping in *Candida albicans*. *Genetics* **134**, 717-728.
- Forbes, B. A. (1988).** *Bailey and Scott's Diagnostic Microbiology, 10th ed. C.V. Mosby Company, St. Louis, MO.*
- Fradin, C., De Groot, P., MacCallum, D., Schaller, M., Klis, F., Odds, F. C. & Hube, B. (2005).** Granulocytes govern the transcriptional response, morphology and proliferation of *Candida albicans* in human blood. *Molecular microbiology* **56**, 397-415.
- Frohner, I. E., Bourgeois, C., Yatsyk, K., Majer, O. & Kuchler, K. (2009).** *Candida albicans* cell surface superoxide dismutases degrade host-derived reactive oxygen species to escape innate immune surveillance. *Molecular microbiology* **71**, 240-252.
- Garcia-Sanchez, S., Aubert, S., Iraqui, I., Janbon, G., Ghigo, J. M. & d'Enfert, C. (2004).** *Candida albicans* biofilms: a developmental state associated with specific and stable gene expression patterns. *Eukaryot Cell* **3**, 536-545.
- Garcia-Sanchez, S., Mavor, A. L., Russell, C. L., Argimon, S., Dennison, P., Enjalbert, B. & Brown, A. J. (2005).** Global roles of Ssn6 in Tup1- and Nrg1-dependent gene regulation in the fungal

pathogen, *Candida albicans*. *Molecular biology of the cell* **16**, 2913-2925.

García-Sánchez, S., Aubert, S., Iraqui, I., Janbon, G., Ghigo, J.-M. & d'Enfert, C. (2004). *Candida albicans* biofilms: a developmental state associated with specific and stable gene expression patterns. *Eukaryotic cell* **3**, No.2, 536-545.

Georgakopoulos, T. & Thireos, G. (1992). Two distinct yeast transcriptional activators require the function of the GCN5 protein to promote normal levels of transcription. *The EMBO journal* **11**, 4145-4152.

Gil-Navarro, I., Gil, M. L., Casanova, M., O'Connor, J. E., Martinez, J. P. & Gozalbo, D. (1997). The glycolytic enzyme glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase of *Candida albicans* is a surface antigen. *Journal of bacteriology* **179**, 4992-4999.

Gillum, A. M., Tsay, E. Y. & Kirsch, D. R. (1984). Isolation of the *Candida albicans* gene for orotidine-5'-phosphate decarboxylase by complementation of *S. cerevisiae* *ura3* and *E. coli* *pyrF* mutations. *Mol Gen Genet* **198**, 179-182.

Gimeno, C. J., Ljungdahl, P. O., Styles, C. A. & Fink, G. R. (1992). Unipolar cell divisions in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* lead to filamentous growth: regulation by starvation and RAS. *Cell* **68**, 1077-1090.

Giusani, A. D., Vinces, M. & Kumamoto, C. A. (2002). Invasive filamentous growth of *Candida albicans* is promoted by Czf1p-dependent relief of Efg1p-mediated repression. *Genetics* **160**, 1749-1753.

Goldmark, J. P., Fazio, T. G., Estep, P. W., Church, G. M. & Tsukiyama, T. (2000). The Isw2 chromatin remodeling complex represses early meiotic genes

upon recruitment by Ume6p. *Cell* **103**, 423-433.

Gonzalez-Novo, A., Jimenez, J., Garcia, M. J., Rios-Serrano, I., Pla, J., Jimenez, A. & Sanchez-Perez, M. (2004a). Dynamics of CaCdc10, a septin of *Candida albicans*, in living cells and during infection. In *Int Microbiol*, pp. 105-112.

Gonzalez-Novo, A., Jimenez, J., Garcia, M. J., Rios-Serrano, I., Pla, J., Jimenez, A. & Sanchez-Perez, M. (2004b). Dynamics of CaCdc10, a septin of *Candida albicans*, in living cells and during infection. *Int Microbiol* **7**, 105-112.

Govind, C. K., Zhang, F., Qiu, H., Hofmeyer, K. & Hinnebusch, A. G. (2007). Gcn5 promotes acetylation, eviction, and methylation of nucleosomes in transcribed coding regions. *Molecular cell* **25**, 31-42.

Gow, N. A., Henderson, G. & Gooday, G. W. (1986). Cytological interrelationships between the cell cycle and duplication cycle of *Candida albicans*. *Microbios* **47**, 97-105.

Gow, N. A., Perera, T. H., Sherwood-Higham, J., Gooday, G. W., Gregory, D. W. & Marshall, D. (1994). Investigation of touch-sensitive responses by hyphae of the human pathogenic fungus *Candida albicans*. *Scanning microscopy* **8**, 705-710.

Granger, B. L., Flenniken, M. L., Davis, D. A., Mitchell, A. P. & Cutler, J. E. (2005). Yeast wall protein 1 of *Candida albicans*. *Microbiology (Reading, England)* **151**, 1631-1644.

Grant, P. A., Duggan, L., Cote, J. & other authors (1997). Yeast Gcn5 functions in two multisubunit complexes to acetylate nucleosomal histones: characterization of an Ada complex and

- the SAGA (Spt/Ada) complex. *Genes & development* **11**, 1640-1650.
- Gregory, P. D. & Hörz, W. (1998).** Chromatin and transcription. How transcription factors battle with a repressive chromatin environment. *European Journal of Biochemistry* **251**, 9-18.
- Guarente, L. (1984).** Yeast promoters: positive and negative elements. *Cell* **36**, 799-800.
- Guillum, A. M., Tsay, E. Y. H. & Kirsch, D. R. (1984).** Isolation of the *Candida albicans* gene from orotidine-5'-phosphate decarboxylase by complementation of *Saccharomyces cerevisiae* *ura3* and *Escherichia coli* *pyr^F* mutations. *Molecular and General Genetics* **198**, 2100-2112.
- Guo, Z. & Sherman, F. (1996).** 3'-end-forming signals of yeast mRNA. *Trends in biochemical sciences* **21**, 477-481.
- Hanahan, D. (1985).** *Techniques for transformation of Escherichia coli*.
- Henikoff, S., Furuyama, T. & Ahmad, K. (2004).** Histone variants, nucleosome assembly and epigenetic inheritance. *Trends Genet* **20**, 320-326.
- Hereford, L. M., Osley, M. A., Ludwig, T. R., 2nd & McLaughlin, C. S. (1981).** Cell-cycle regulation of yeast histone mRNA. *Cell* **24**, 367-375.
- Herrero, A. B., Lopez, M. C., Garcia, S., Schmidt, A., Spaltmann, F., Ruiz-Herrera, J. & Dominguez, A. (1999).** Control of filament formation in *Candida albicans* by polyamine levels. *Infection and immunity* **67**, 4870-4878.
- Hiller, E., Heine, S., Brunner, H. & Rupp, S. (2007).** *Candida albicans* Sun41p, a putative glycosidase, is involved in morphogenesis, cell wall biogenesis, and biofilm formation. *Eukaryotic cell* **6**, 2056-2065.
- Ho, J. H. & Johnson, A. W. (1999).** NMD3 encodes an essential cytoplasmic protein required for stable 60S ribosomal subunits in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular and cellular biology* **19**, 2389-2399.
- Ho, J. H., Kallstrom, G. & Johnson, A. W. (2000).** Nmd3p is a Crm1p-dependent adapter protein for nuclear export of the large ribosomal subunit. *The Journal of cell biology* **151**, 1057-1066.
- Hoffman, C. S. & Winston, F. (1987).** A ten-minute DNA preparation from yeast efficiently releases autonomous plasmids for transformation of *Escherichia coli*. *Gene* **57**, 267-272.
- Holstege, F. C., Jennings, E. G., Wyrick, J. J., Lee, T. I., Hengartner, C. J., Green, M. R., Golub, T. R., Lander, E. S. & Young, R. A. (1998).** Dissecting the regulatory circuitry of a eukaryotic genome. *Cell* **95**, 717-728.
- Hornby, J. M. & Nickerson, K. W. (2004).** Enhanced production of farnesol by *Candida albicans* treated with four azoles. *Antimicrobial agents and chemotherapy* **48**, 2305-2307.
- Howe, L., Auston, D., Grant, P., John, S., Cook, R. G., Workman, J. L. & Pillus, L. (2001).** Histone H3 specific acetyltransferases are essential for cell cycle progression. *Genes & development* **15**, 3144-3154.
- Hoyer, L. L., Fundyga, R., Hecht, J. E., Kapteyn, J. C., Klis, F. M. & Arnold, J. (2001).** Characterization of agglutinin-like sequence genes from non-*albicans* *Candida* and phylogenetic analysis of the ALS family. *Genetics* **157**, 1555-1567.

- Hube, B., Sanglard, D., Odds, F. C., Hess, D., Monod, M., Schafer, W., Brown, A. J. & Gow, N. A. (1997).** Disruption of each of the secreted aspartyl proteinase genes SAP1, SAP2, and SAP3 of *Candida albicans* attenuates virulence. *Infection and immunity* **65**, 3529-3538.
- Hube, B. & Naglik, J. (2001).** *Candida albicans* proteinases: resolving the mystery of a gene family. *Microbiology (Reading, England)* **147**, 1997-2005.
- Hudson, D. A., Sciascia, Q. L., Sanders, R. J., Norris, G. E., Edwards, P. J., Sullivan, P. A. & Farley, P. C. (2004).** Identification of the dialysable serum inducer of germ-tube formation in *Candida albicans*. *Microbiology (Reading, England)* **150**, 3041-3049.
- Hull, C. M. & Johnson, A. D. (1999).** Identification of a mating type-like locus in the asexual pathogenic yeast *Candida albicans*. *Science (New York, NY)* **285**, 1271-1275.
- Hull, C. M., Raisner, R. M. & Johnson, A. D. (2000).** Evidence for mating of the "asexual" yeast *Candida albicans* in a mammalian host. *Science (New York, NY)* **289**, 307-310.
- Imai, S., Armstrong, C. M., Kaeberlein, M. & Guarente, L. (2000).** Transcriptional silencing and longevity protein Sir2 is an NAD-dependent histone deacetylase. *Nature* **403**, 795-800.
- Imhof, A. (2006).** Epigenetic regulators and histone modification. *Brief Funct Genomic Proteomic* **5**, 222-227.
- Ishii, N., Yamamoto, M., Yoshihara, F., Arisawa, M. & Aoki, Y. (1997).** Biochemical and genetic characterization of Rbf1p, a putative transcription factor of *Candida albicans*. *Microbiology (Reading, England)* **143 (Pt 2)**, 429-435.
- Jackson, A. P., Gamble, J. A., Yeomans, T. & other authors (2009).** Comparative genomics of the fungal pathogens *Candida dubliniensis* and *Candida albicans*. *Genome research* **19**, 2231-2244.
- Jansons, V. K. & Nickerson, W. J. (1970).** Induction, morphogenesis and germination of the chlamyospore of *Candida albicans*. *Journal of bacteriology* **104, No.2**, 910-921.
- Jenuwein, T. & Allis, C. D. (2001).** Translating the histone code. *Science (New York, NY)* **293**, 1074-1080.
- John, S., Howe, L., Tafrov, S. T., Grant, P. A., Sternglanz, R. & Workman, J. L. (2000).** The something about silencing protein, Sas3, is the catalytic subunit of NuA3, a γ TAF(II)30-containing HAT complex that interacts with the Spt16 subunit of the yeast CP (Cdc68/Pob3)-FACT complex. *Genes & development* **14**, 1196-1208.
- Jones, P. A. & Baylin, S. B. (2007).** The epigenomics of cancer. *Cell* **128**, 683-692.
- Jones, T., Federspiel, N. A., Chibana, H. & other authors (2004).** The diploid genome sequence of *Candida albicans*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **101**, 7329-7334.
- Jong, A. Y., Chen, S. H., Stins, M. F., Kim, K. S., Tuan, T. L. & Huang, S. H. (2003).** Binding of *Candida albicans* enolase to plasmin(ogen) results in enhanced invasion of human brain microvascular endothelial cells. *Journal of medical microbiology* **52**, 615-622.
- Kadosh, D. & Johnson, A. D. (2005).** Induction of the *Candida albicans* filamentous growth program by relief of transcriptional repression: a genome-wide analysis. *Molecular biology of the cell* **16**, 2903-2912.

- Kaiser, B., Munder, T., Saluz, H. P., Kunkel, W. & Eck, R. (1999).** Identification of a gene encoding the pyruvate decarboxylase gene regulator CaPdc2p from *Candida albicans*. *Yeast* **15**, 585-591.
- Kamakaka, R. T. & Biggins, S. (2005).** Histone variants: deviants? *Genes & development* **19**, 295-310.
- Keleher, C. A., Redd, M. J., Schultz, J., Carlson, M. & Johnson, A. D. (1992).** Ssn6-Tup1 is a general repressor of transcription in yeast. *Cell* **68**, 709-719.
- Kelly, T. J., Qin, S., Gottschling, D. E. & Parthun, M. R. (2000).** Type B histone acetyltransferase Hat1p participates in telomeric silencing. *Molecular and cellular biology* **20**, No. 19, 7051-7058.
- Khochbin, S. (2001).** Histone H1 diversity: bridging regulatory signals to linker histone function. *Gene* **271**, 1-12.
- Kleff, S., Andrulis, E. D., Anderson, C. W. & Sternglanz, R. (1995).** Identification of a gene encoding a yeast histone H4 acetyltransferase. *The Journal of biological chemistry* **270**, 24674-24677.
- Klis, F. M., de Groot, P. & Hellingwerf, K. (2001).** Molecular organization of the cell wall of *Candida albicans*. *Med Mycol* **39 Suppl 1**, 1-8.
- Knight, S. A., Vilaire, G., Lesuisse, E. & Dancis, A. (2005).** Iron acquisition from transferrin by *Candida albicans* depends on the reductive pathway. *Infection and immunity* **73**, 5482-5492.
- Komachi, K. & Johnson, A. D. (1997).** Residues in the WD repeats of Tup1 required for interaction with alpha2. *Molecular and cellular biology* **17**, 6023-6028.
- Kouzarides, T. (2007).** Chromatin modifications and their function. *Cell* **128**, 693-705.
- Krebs, J. E., Fry, C. J., Samuels, M. L. & Peterson, C. L. (2000).** Global role for chromatin remodeling enzymes in mitotic gene expression. *Cell* **102**, 587-598.
- Kuo, M. H., Brownell, J. E., Sobel, R. E., Ranalli, T. A., Cook, R. G., Edmondson, D. G., Roth, S. Y. & Allis, C. D. (1996).** Transcription-linked acetylation by Gcn5p of histones H3 and H4 at specific lysines. *Nature* **383**, 269-272.
- Kurdistani, S. K. & Grunstein, M. (2003).** Histone acetylation and deacetylation in yeast. *Nat Rev Mol Cell Biol* **4**, 276-284.
- Kurtz, M. B., Cortelyou, M. W. & Kirsch, D. R. (1986).** Integrative transformation of *Candida albicans*, using a cloned *Candida* ADE2 gene. *Molecular and cellular biology* **6**, 142-149.
- Kurtz, M. B., Kirsch, D. R. & Kelly, R. (1988).** The molecular genetics of *Candida albicans*. *Microbiological sciences* **5**, 58-63.
- La Valle, R., Sandini, S., Gomez, M. J., Mondello, F., Romagnoli, G., Nisini, R. & Cassone, A. (2000).** Generation of a recombinant 65-kilodalton mannoprotein, a major antigen target of cell-mediated immune response to *Candida albicans*. *Infection and immunity* **68**, 6777-6784.
- Lan, C. Y., Newport, G., Murillo, L. A., Jones, T., Scherer, S., Davis, R. W. & Agabian, N. (2002).** Metabolic specialization associated with phenotypic switching in *Candida albicans*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **99**, 14907-14912.

- Land, G. A., McDonald, W. C., Stjernholm, R. L. & Friedman, L. (1975).** Factors affecting filamentation in *Candida albicans*: changes in respiratory activity of *Candida albicans* during filamentation. *Infection and immunity* **12**, 119-127.
- Lane, S., Birse, C., Zhou, S., Matson, R. & Liu, H. (2001a).** DNA array studies demonstrate convergent regulation of virulence factors by Cph1, Cph2 and Efg1 in *Candida albicans*. *The Journal of biological chemistry* **276**, No.52, 48988-48996.
- Lane, S., Zhou, S., Pan, T., Dai, Q. & Liu, H. (2001b).** The basic helix-loop-helix transcription factor Cph2 regulates hyphal development in *Candida albicans* partly via TEC1. *Molecular and cellular biology* **21**, 6418-6428.
- Leberer, E., Harcus, D., Broadbent, I. D. & other authors (1996).** Signal transduction through homologs of the Ste20p and Ste7p protein kinases can trigger hyphal formation in the pathogenic fungus *Candida albicans*. *Proc Natl Acad Sci USA* **93**, 13217-13222.
- Lee, K. K. & Workman, J. L. (2007).** Histone acetyltransferase complexes: one size doesn't fit all. *Nature reviews* **8**, 284-295.
- Lee, K. L., Buckley, H. R. & Cambell, C. (1975a).** An aminoacid liquid synthetic medium for development of mycelial and yeast form of *Candida albicans*. *Sabouradia* **13**, 148-153.
- Lee, K. L., Buckley, H. R. & Campbell, C. C. (1975b).** An amino acid liquid synthetic medium for the development of mycelial and yeast forms of *Candida Albicans*. *Sabouraudia* **13**, 148-153.
- Leidich, S. D., Ibrahim, A. S., Fu, Y. & other authors (1998).** Cloning and disruption of caPLB1, a phospholipase B gene involved in the pathogenicity of *Candida albicans*. *The Journal of biological chemistry* **273**, 26078-26086.
- Leng, P., Sudbery, P. E. & Brown, A. J. (2000).** Rad6p represses yeast-hypha morphogenesis in the human fungal pathogen *Candida albicans*. *Molecular microbiology* **35**, 1264-1275.
- Leng, P., Lee, P. R., Wu, H. & Brown, A. J. (2001).** Efg1, a morphogenetic regulator in *Candida albicans*, is a sequence-specific DNA binding protein. *Journal of bacteriology* **183**, 4090-4093.
- Li, B., Carey, M. & Workman, J. L. (2007).** The role of chromatin during transcription. *Cell* **128**, 707-719.
- Ling, X., Harkness, T. A., Schultz, M. C., Fisher-Adams, G. & Grunstein, M. (1996).** Yeast histone H3 and H4 amino termini are important for nucleosome assembly in vivo and in vitro: redundant and position-independent functions in assembly but not in gene regulation. *Genes & development* **10**, 686-699.
- Lipshutz, R. J., Fodor, S. P., Gingeras, T. R. & Lockhart, D. J. (1999).** High density synthetic oligonucleotide arrays. *Nature genetics* **21**, 20-24.
- Liu, H., Kohler, J. & Fink, G. R. (1994).** Suppression of hyphal formation in *Candida albicans* by mutation of a *STE12* homolog. *Science (New York, NY)* **266**, 1723-1726.
- Liu, H. (2001).** Transcriptional control of dimorphism in *Candida albicans*. *Current opinion in microbiology* **4**, 728-735.
- Liu, T. T., Lee, R. E., Barker, K. S., Wei, L., Homayouni, R. & Rogers, P. D. (2005).** Genome-wide expression profiling of the response to azole, polyene, echinocandin, and pyrimidine antifungal

agents in *Candida albicans*. *Antimicrob Agents Chemother* **49**, 2226-2236.

Lo, H. J., Kohler, J. R., DiDomenico, B., Loebenberg, D., Cacciapuoti, A. & Fink, G. R. (1997). Nonfilamentous *C. albicans* mutants are avirulent. *Cell* **90**, 939-949.

Lopez-Ribot, J. L., Alloush, H. M., Masten, B. J. & Chaffin, W. L. (1996). Evidence for presence in the cell wall of *Candida albicans* of a protein related to the hsp70 family. *Infection and immunity* **64**, 3333-3340.

López, M., Mallorquín, P. & Vega, M. (2002). MICROARRAYS Y BIOCHIPS DE ADN Informe de Vigilancia Tecnológica. Edited by Genoma España/CIBT-FGUAM.

Lusser, A. & Kadonaga, J. T. (2003). Chromatin remodeling by ATP-dependent molecular machines. *Bioessays* **25**, 1192-1200.

Ma, P., Wera, S., Van Dijck, P. & Thevelein, J. M. (1999). The PDE1-encoded low-affinity phosphodiesterase in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* has a specific function in controlling agonist-induced cAMP signaling. *Molecular biology of the cell* **10**, 91-104.

Ma, X. J., Wu, J., Altheim, B. A., Schultz, M. C. & Grunstein, M. (1998). Deposition-related sites K5/K12 in histone H4 are not required for nucleosome deposition in yeast. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **95**, 6693-6698.

Magee, B. B. & Magee, P. T. (2000). Induction of mating in *Candida albicans* by construction of MTL α and MTL α strains. *Science (New York, NY)* **289**, 310-313.

Magee, P. T. & Magee, B. B. (2004). Through a glass opaquely: the biological

significance of mating in *Candida albicans*. *Current opinion in microbiology* **7**, 661-665.

Mahrous, M., Lott, T. J., Meyer, S. A., Sawant, A. D. & Ahearn, D. G. (1990). Electrophoretic karyotyping of typical and atypical *Candida albicans*. *Journal of clinical microbiology* **28**, 876-881.

Maidan, M. M., De Rop, L., Serneels, J., Exler, S., Rupp, S., Tournu, H., Thevelein, J. M. & Van Dijck, P. (2005). The G protein-coupled receptor Gpr1 and the Galpha protein Gpa2 act through the cAMP-protein kinase A pathway to induce morphogenesis in *Candida albicans*. *Molecular biology of the cell* **16**, 1971-1986.

Maniatis, T., Fritsch, E. & Sambrook, J. b. (1982). Molecular cloning: a laboratory manual. J, S. (ed.) New York: Cold Spring Harbor.

Martinez-Lopez, R., Park, H., Myers, C. L., Gil, C. & Filler, S. G. (2006). *Candida albicans* Ecm33p is important for normal cell wall architecture and interactions with host cells. *Eukaryotic cell* **5**, 140-147.

Martinez-Lopez, R., Nombela, C., Diez-Orejas, R., Monteoliva, L. & Gil, C. (2008). Immunoproteomic analysis of the protective response obtained from vaccination with *Candida albicans* ecm33 cell wall mutant in mice. *Proteomics* **8**, 2651-2664.

Millar, C. B. & Grunstein, M. (2006). Genome-wide patterns of histone modifications in yeast. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **7**, 657-666.

Miwa, T., Takagi, Y., Shinozaki, M., Yun, C. W., Schell, W. A., Perfect, J. R., Kumagai, H. & Tamaki, H. (2004). Gpr1, a putative G-protein-coupled receptor, regulates morphogenesis and hypha

formation in the pathogenic fungus *Candida albicans*. *Eukaryotic cell* **3**, 919-931.

Moreno-Ruiz, E., Ortu, G., de Groot, P. W. & other authors (2009). The GPI-modified proteins Pga59 and Pga62 of *Candida albicans* are required for cell wall integrity. *Microbiology (Reading, England)* **155**, 2004-2020.

Morschhauser, J., Michel, S. & Staib, P. (1999). Sequential gene disruption in *Candida albicans* by FLP-mediated site-specific recombination. *Molecular microbiology* **32**, 547-556.

Mukherjee, P. K., Mohamed, S., Chandra, J. & other authors (2006). Alcohol dehydrogenase restricts the ability of the pathogen *Candida albicans* to form a biofilm on catheter surfaces through an ethanol-based mechanism. *Infection and immunity* **74**, 3804-3816.

Murad, A. M. A., Leng, P., Straffon, M. & other authors (2001). *NRG1* represses yeast-hypha morphogenesis and hypha-specific gene expression in *Candida albicans*. *EMBO Journal* **20**, No. 17, 4742 - 4752.

Myskowski, P. L., White, M. H. & Ahkami, R. (1997). Fungal disease in the immunocompromised host. *Dermatologic clinics* **15**, 295-305.

Naglik, J. R., Challacombe, S. J. & Hube, B. (2003). *Candida albicans* secreted aspartyl proteinases in virulence and pathogenesis. *Microbiol Mol Biol Rev* **67**, 400-428, table of contents.

Nagy, Z. & Tora, L. (2007). Distinct GCN5/PCAF-containing complexes function as co-activators and are involved in transcription factor and global histone acetylation. *Oncogene* **26**, 5341-5357.

Nantel, A., Dignard, D., Bachewich, C. & other authors (2002). Transcription profiling of *Candida albicans* cells undergoing the yeast-to-hyphal transition. *Mol Biol Cell* **13**, 3452-3465.

Negredo, A., Monteoliva, L., Gil, C., Pla, J. & Nombela, C. (1997). Cloning, analysis and one-step disruption of the ARG5,6 gene of *Candida albicans*. *Microbiology (Reading, England)* **143 (Pt 2)**, 297-302.

Nett, J. & Andes, D. (2006). *Candida albicans* biofilm development, modeling a host-pathogen interaction. *Current opinion in microbiology* **9**, 340-345.

Nobile, C. J., Bruno, V. M., Richard, M. L., Davis, D. A. & Mitchell, A. P. (2003). Genetic control of chlamydospore formation in *Candida albicans*. *Microbiology* **149**, 3629-3637.

Nobile, C. J., Nett, J. E., Andes, D. R. & Mitchell, A. P. (2006). Function of *Candida albicans* adhesin Hwp1 in biofilm formation. *Eukaryotic cell* **5**, 1604-1610.

Odds, F. C. (1988a). *Candida and candidosis.*, 2nd edn. London: Bailliere Tindall.

Odds, F. C. (1988b). *Candida and candidosis.* London: Balliere-Tindall.

Ohama, T., Suzuki, T., Mori, M., Osawa, S., Ueda, T., Watanabe, K. & Nakase, T. (1993). Non-universal decoding of the leucine codon CUG in several *Candida* species. *Nucleic acids research* **21**, 4039-4045.

Osada, S., Sutton, A., Muster, N., Brown, C. E., Yates, J. R., 3rd, Sternglanz, R. & Workman, J. L. (2001). The yeast SAS (something about silencing) protein complex contains a MYST-type putative acetyltransferase and functions

- with chromatin assembly factor ASF1. *Genes & development* **15**, 3155-3168.
- Osley, M. A. (2004).** H2B ubiquitylation: the end is in sight. *Biochimica et biophysica acta* **1677**, 74-78.
- Parthun, M. R., Widom, J. & Gottschling, D. E. (1996a).** The major cytoplasmic histone acetyltransferase in yeast: links to chromatin replication and histone metabolism. *Cell* **87**, 85-94.
- Parthun, M. R., Widom, J. & Gottschling, D. E. (1996b).** The major cytoplasmic histone acetyltransferase in yeast: links to chromatin replication and histone metabolism. *Cell* **87**, 85-94.
- Parthun, M. R. (2007).** Hat1: the emerging cellular roles of a type B histone acetyltransferase. *Oncogene* **26**, 5319-5328.
- Peman, J., Canton, E. & Gobernado, M. (2005).** Epidemiology and antifungal susceptibility of *Candida* species isolated from blood: results of a 2-year multicentre study in Spain. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* **24**, 23-30.
- Penn, M. D., Galgoci, B. & Greer, H. (1983).** Identification of AAS genes and their regulatory role in general control of amino acid biosynthesis in yeast. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **80**, 2704-2708.
- Poveda, A., Pamblanco, M., Tafrov, S., Tordera, V., Sternglanz, R. & Sendra, R. (2004).** Hif1 is a component of yeast histone acetyltransferase B, a complex mainly localized in the nucleus. *Journal of Biological Chemistry* **279**, 16033-16043.
- Qin, S. & Parthun, M. R. (2002).** Histone H3 and the histone acetyltransferase Hat1p contribute to DNA double-strand break repair. *Molecular and cellular biology* **22**, No. **23**, 8353-8365.
- Qin, S. & Parthun, M. R. (2006).** Recruitment of the type B histone acetyltransferase Hat1p to chromatin is linked to DNA double-strand breaks. *Molecular and cellular biology* **26**, 3649-3658.
- Rosaleny, L. E., Antúnez, O., Ruiz-García, A. B., Perez-Ortín, J. E. & Tordera, V. (2005).** Yeast *HAT1* and *HAT2* deletions have different life-span and transcriptome phenotypes. *FEBS Letters* **579**, 4063-4068.
- Roth, S. Y., Denu, J. M. & Allis, C. D. (2001).** Histone acetyltransferases. *Annual review of biochemistry* **70**, 81-120.
- Ruiz-García, A. B., Sendra, R., Galiana, M., Pamblanco, M., Perez-Ortín, J. E. & Tordera, V. (1998).** HAT1 and HAT2 proteins are components of a yeast nuclear histone acetyltransferase enzyme specific for free histone H4. *J Biol Chem* **273**, No. **20**, 12599-12605.
- Sabol, K. & Gumbo, T. (2008).** Anidulafungin in the treatment of invasive fungal infections. *Therapeutics and clinical risk management* **4**, 71-78.
- Saiki, R. K., Gelfand, D. H., Stoffel, S., Scharf, S. J., Higuchi, R., Horn, G. T., Mullis, K. B. & Erlich, H. A. (1988).** Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science (New York, NY)* **29**, No. **239**, 487-491.
- Sambrook, J. & Russell, D. (2002).** Joy of cloning: updated recipes. Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 3rd edition. *Trends in Neurosciences* **25**, No. **11**, 594-595.
- Sanchez-Martinez, C. & Perez-Martin, J. (2002).** Gpa2, a G-protein alpha subunit

required for hyphal development in *Candida albicans*. *Eukaryotic cell* **1**, 865-874.

Sanglard, D., Hube, B., Monod, M., Odds, F. C. & Gow, N. A. (1997). A triple deletion of the secreted aspartyl proteinase genes SAP4, SAP5, and SAP6 of *Candida albicans* causes attenuated virulence. *Infection and immunity* **65**, 3539-3546.

Schweizer, A., Rupp, S., Taylor, B. N., Rollinghoff, M. & Schroppel, K. (2000). The TEA/ATTS transcription factor CaTec1p regulates hyphal development and virulence in *Candida albicans*. *Molecular microbiology* **38**, 435-445.

Sherman, F., Fink, G. R. & Hicks, J. B. (1986). Methods in Yeast Genetics. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.

Short, J. M., Fernandez, J. M., Sorge, J. A. & Huse, W. D. (1988). Lambda ZAP: a bacteriophage lambda expression vector with in vivo excision properties. *Nucleic acids research* **16**, 7583-7600.

Singleton, D. R. & Hazen, K. C. (2004). Differential surface localization and temperature-dependent expression of the *Candida albicans* CSH1 protein. *Microbiology (Reading, England)* **150**, 285-292.

Sklenar, A. R. & Parthun, M. R. (2004). Characterization of yeast histone H3-specific type B histone acetyltransferases identifies an ADA2-independent Gcn5p activity. *BMC Biochem* **5**, 11.

Slutsky, B., Staebell, M., Anderson, J., Risen, L., Pfaller, M. & Soll, D. R. (1987). "White-opaque transition": a second high-frequency switching system in *Candida albicans*. *J Bacteriol* **169**, 189-197.

Smith, R. J., Milewski, S., Brown, A. J. & Gooday, G. W. (1996). Isolation and characterization of the GFA1 gene encoding the glutamine:fructose-6-phosphate amidotransferase of *Candida albicans*. *Journal of bacteriology* **178**, 2320-2327.

Smith, R. L. & Johnson, A. D. (2000). Turning genes off by Ssn6-Tup1: a conserved system of transcriptional repression in eukaryotes. *Trends in biochemical sciences* **25**, 325-330.

Soll, D. R., Herman, M. A. & Staebell, M. A. (1985). The involvement of cell wall expansion in the two modes of mycelium formation of *Candida albicans*. *Journal of general microbiology* **131**, 2367-2375.

Soll, D. R. (1988). High-frequency switching in *Candida albicans* and its relations to vaginal candidiasis. *Am J Obstet Gynecol* **158**, 997-1001.

Soll, D. R., Lockhart, S. R. & Zhao, R. (2003). Relationship between switching and mating in *Candida albicans*. *Eukaryotic cell* **2**, 390-397.

Sonneborn, A., Bockmuhl, D. P. & Ernst, J. F. (1999). Chlamyospore formation in *Candida albicans* requires the Efg1p morphogenetic regulator. *Infection and immunity* **67**, 5514-5517.

Srikantha, T., Tsai, L., Daniels, K., Klar, A. J. S. & Soll, D. R. (2001). The histone deacetylase genes *HDA1* and *RPD3* play distinct roles in regulation of high-frequency phenotypic switching in *Candida albicans*. *Journal of bacteriology* **183**, No. 15, 4614-4625.

Staib, P. & Morschhauser, J. (2005). Differential expression of the NRG1 repressor controls species-specific regulation of chlamyospore development in *Candida albicans* and *Candida*

dublinskiensis. *Molecular microbiology* **55**, 637-652.

Sterner, D. E. & Berger, S. L. (2000). Acetylation of histones and transcription-related factors. *Microbiol Mol Biol Rev* **64**, 435-459.

Stoldt, V. R., Sonneborn, A., Leuker, Christoph., E. & Ernst, Joachim F. (1997). Efg1p, an essential regulator of morphogenesis of the human pathogen *Candida albicans*, is a member of a conserved class of bHLH proteins regulating morphogenetic processes in fungi. *EMBO J* **16**

<http://emboj.oupjournals.org/cgi/content/abstract/16/8/1982>, 1982-1991.

Strahl, B. D. & Allis, C. D. (2000). The language of covalent histone modifications. *Nature* **403**, 41-45.

Struhl, K. (1985). Naturally occurring poly(dA-dT) sequences are upstream promoter elements for constitutive transcription in yeast. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **82**, 8419-8423.

Sudbery, P., Gow, N. & Berman, J. (2004). The distinct morphogenic states of *Candida albicans*. *Trends in microbiology* **12**, 317-324.

Sugiyama, H., Ohkuma, M., Masuda, Y., Park, S. M., Ohta, A. & Takagi, M. (1995). In vivo evidence for non-universal usage of the codon CUG in *Candida maltosa*. *Yeast (Chichester, England)* **11**, 43-52.

Suka, N., Suka, Y., Carmen, A. A., Wu, J. & Grunstein, M. (2001). Highly specific antibodies determine histone acetylation site usage in yeast heterochromatin and euchromatin. *Molecular cell* **8**, 473-479.

Sun, Z. W. & Hampsey, M. (1999). A general requirement for the Sin3-Rpd3 histone deacetylase complex in regulating silencing in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* **152**, 921-932.

Sundstrom, P. (2002). Adhesion in *Candida* spp. *Cellular microbiology* **4**, 461-469.

Sussman, A., Huss, K., Chio, L. C. & other authors (2004). Discovery of cercosporamide, a known antifungal natural product, as a selective Pkc1 kinase inhibitor through high-throughput screening. *Eukaryotic cell* **3**, 932-943.

Suter, B., Pogoutse, O., Guo, X., Krogan, N., Lewis, P., Greenblatt, J. F., Rine, J. & Emili, A. (2007). Association with the origin recognition complex suggests a novel role for histone acetyltransferase Hat1p/Hat2p. *BMC biology* **5**, 38.

Tebarth, B., Doedt, T., Krishnamurthy, S., Weide, M., Monterola, F., Dominguez, A. & Ernst, Joachim F. (2003). Adaptation of the Efg1p morphogenetic pathway in *Candida albicans* by negative autoregulation and PKA-dependent repression of the *EFG1* gene. *Journal of molecular biology* **329** (5), 949-962.

Thomas, P. S. (1980). Hybridization of denatured RNA and small DNA fragments transferred to nitrocellulose. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **77**, 5201-5205.

Thomas, D. & Surdin-Kerjan, Y. (1997). Metabolism of sulfur amino acids in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol Mol Biol Rev* **61**, 503-532.

Timpel, C., Strahl-Bolsinger, S., Ziegelbauer, K. & Ernst, J. F. (1998). Multiple functions of Pmt1p-mediated protein O-mannosylation in the fungal

pathogen *Candida albicans*. *The Journal of biological chemistry* **273**, 20837-20846.

Todd, R. B. & Andrianopoulos, A. (1997). Evolution of a fungal regulatory gene family: the Zn(II)₂Cys₆ binuclear cluster DNA binding motif. *Fungal Genet Biol* **21**, 388-405.

Tripathi, G., Wiltshire, C., Macaskill, S., Tournu, H., Budge, S. & Brown, A. J. P. (2002). Gcn4 co-ordinates morphogenetic and metabolic responses to amino acid starvation in *Candida albicans*. *EMBO Journal* **21**, No. 20, 5448-5456.

Tusher, V. G., Tibshirani, R. & Chu, G. (2001). Significance analysis of microarrays applied to the ionizing radiation response. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 5116-5121.

Uhl, M. A., Biery, M., Craig, N. & Johnson, A. D. (2003). Haploinsufficiency-based large-scale forward genetic analysis of filamentous growth in the diploid human fungal pathogen *C.albicans*. *The EMBO journal* **22**, 2668-2678.

Urban, C., Xiong, X., Sohn, K., Schroppel, K., Brunner, H. & Rupp, S. (2005). The moonlighting protein Tsalp is implicated in oxidative stress response and in cell wall biogenesis in *Candida albicans*. *Molecular microbiology* **57**, 1318-1341.

van het Hoog, M., Rast, T. J., Martchenko, M. & other authors (2007). Assembly of the *Candida albicans* genome into sixteen supercontigs aligned on the eight chromosomes. *Genome biology* **8**, R52.

Vazquez-Torres, A. & Balish, E. (1997). Macrophages in resistance to candidiasis. *Microbiol Mol Biol Rev* **61**, 170-192.

Vernarecci, S., Ornaghi, P., Bagu, A., Cundari, E., Ballario, P. & Filetici, P. (2008). Gcn5p plays an important role in centromere kinetochore function in budding yeast. *Molecular and cellular biology* **28**, 988-996.

Verreault, A., Kaufman, P. D., Kobayashi, R. & Stillman, B. (1998). Nucleosomal DNA regulates the core-histone-binding subunit of the human Hat1 acetyltransferase. *Curr Biol* **8**, 96-108.

Wagner, R. D., Pierson, C., Warner, T., Dohnalek, M., Farmer, J., Roberts, L., Hilty, M. & Balish, E. (1997). Biotherapeutic effects of probiotic bacteria on candidiasis in immunodeficient mice. *Infection and immunity* **65**, 4165-4172.

Walker, L. & Huppert, M. (1960). Corn meal-Tween agar: an improved medium for the identification of *Candida albicans*. *Technical Bulletin of the Registry of Medical Technologists* **30**, 10-14.

Warendt, A. J. & Konopka, J. B. (2002). Septin function in *Candida albicans* morphogenesis. *Molecular biology of the cell* **13**, 2732-2746.

Whiteway, M. (2000). Transcriptional control of cell type and morphogenesis in *Candida albicans*. *Current opinion in microbiology* **3**, 582 - 588.

Wilkins, M. R., Gasteiger, E., Bairoch, A., Sanchez, J. C., Williams, K. L., Appel, R. D. & Hochstrasser, D. F. (1999). Protein identification and analysis tools in the ExPASy server. *Methods in molecular biology (Clifton, NJ)* **112**, 531-552.

Wilson, R. B., Davis, D. & Mitchell, A. P. (1999). Rapid hypothesis testing with *Candida albicans* through gene disruption with short homology regions. *Journal of bacteriology* **181**, 1868-1874.

- Wilson, R. B., Davis, D., Enloe, B. M. & Mitchell, A. P. (2000).** A recyclable *Candida albicans* URA3 cassette for PCR product-directed gene disruptions. *Yeast (Chichester, England)* **16**, 65-70.
- Wimalasena, T. T., Enjalbert, B., Guillemette, T., Plumridge, A., Budge, S., Yin, Z., Brown, A. J. & Archer, D. B. (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.
- Winston, F. & Carlson, M. (1992).** Yeast SNF/SWI transcriptional activators and the SPT/SIN chromatin connection. *Trends Genet* **8**, 387-391.
- Wolffe, A. P. (1998).** *Chromatin: structure and function*. California: Academic Press, Third Edition.
- Wolffe, A. P. & Guschin, D. (2000).** Review: chromatin structural features and targets that regulate transcription. *J Struct Biol* **129**, 102-122.
- Woo, M., Lee, K. & Song, K. (2003).** MYO2 is not essential for viability, but is required for polarized growth and dimorphic switches in *Candida albicans*. *FEMS microbiology letters* **218**, 195-202.
- Yang, X. J., Ogryzko, V. V., Nishikawa, J., Howard, B. H. & Nakatani, Y. (1996).** A p300/CBP-associated factor that competes with the adenoviral oncoprotein E1A. *Nature* **382**, 319-324.
- Yang, X. J. & Gregoire, S. (2005).** Class II histone deacetylases: from sequence to function, regulation, and clinical implication. *Molecular and cellular biology* **25**, 2873-2884.
- Yang, Y. L., Chen, H. F., Kuo, T. J. & Lin, C. Y. (2006).** Mutations on CaENO1 in *Candida albicans* inhibit cell growth in the presence of glucose. *Journal of biomedical science* **13**, 313-321.
- Yokogawa, T., Suzuki, T., Ueda, T. & other authors (1992).** Serine tRNA complementary to the nonuniversal serine codon CUG in *Candida cylindracea*: evolutionary implications. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **89**, 7408-7411.
- Zhang, L., Eugeni, E. E., Parthun, M. R. & Freitas, M. A. (2003).** Identification of novel histone post-translational modifications by peptide mass fingerprinting. *Chromosoma* **112**, 77-86.
- Zhang, W., Bone, J. R., Edmondson, D. G., Turner, B. M. & Roth, S. Y. (1998).** Essential and redundant functions of histone acetylation revealed by mutation of target lysines and loss of the Gcn5p acetyltransferase. *The EMBO journal* **17**, 3155-3167.
- Zhang, Y. J., Wang, X. P., Deng, J. H., Salinas, R. A., Oishi, N. & Gao, S. J. (2001).** Suppression of oncogenic viral interferon regulatory factor (vIRF) of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus by ribozyme-mediated cleavage. *Cancer gene therapy* **8**, 285-293.
- Zhao, R., Lockhart, S. R., Daniels, K. & Soll, D. R. (2002).** Roles of *TUP1* in switching, phase maintenance, and phase-specific gene expression in *Candida albicans*. *Eukaryotic cell* **1**, No. 3, 353-365.
- Zhao, X., Oh, S. H., Cheng, G., Green, C. B., Nuessen, J. A., Yeater, K., Leng, R. P., Brown, A. J. & Hoyer, L. L. (2004).** ALS3 and ALS8 represent a single locus that encodes a *Candida albicans* adhesin; functional comparisons between Als3p and Als1p. *Microbiology (Reading, England)* **150**, 2415-2428.

Zheng, X., Wang, Y. & Wang, Y. (2004). Hgc1, a novel hypha-specific G1 cyclin-related protein regulates *Candida albicans* hyphal morphogenesis. *The EMBO journal* **23**, 1845-1856.

Zhou, Z., Liu, H. P. & Chen, J. Y. (2002). [Cloning of *Candida albicans* CaBEM1 and its role in filamentous growth of *Saccharomyces cerevisiae*]. *Sheng wu hua xue yu sheng wu wu li xue bao Acta biochimica et biophysica Sinica* **34**, 553-559.

VII. AGRADECIMIENTOS

Agradecimientos

Ha llegado el momento final en este larguísimo viaje lleno de experiencias y no puedo dejar de expresar mi más sincero agradecimiento a todas las personas que de un modo u otro han hecho posible la realización de esta memoria.

En primer lugar, quiero agradecer a mi director, Ángel Domínguez la oportunidad que me dio de trabajar en su grupo. Por aquel periodo de formación (científico y personal) al otro lado “del charco”, en México y por adentrarme en el mundo de la Proteómica que es mi campo de batalla actualmente.

A todos los miembros del grupo ADO: Isabel (aquellos *play-back* con coreografía no tenían desperdicio), Nuria (cuantos momentos de desesperación con los marcajes de microarrays, pero que alegría cuando conseguíamos unos buenos puntos de colores), Lorena y Freida (nuestras latinas más fiesteras), Matías, Esperanza, Ana (nuestra técnico más valiosa, siempre dispuesta a ayudar y con paciencia extrema), Vera, Sofia, Mari Carmen, Rita, Iván, Zahra, Ahmad... y de los laboratorios vecinos: a Hugo, Rocio, Victoria, Raquel, Teresa, Elena, por las charlas de pasillo y las cenas de departamento, sé que me dejo nombres pero quizá fue con todas estas personas con las que hace años compartí penas y alegrías.

A toda la plantilla del Departamento de Microbiología, por su amabilidad y disponibilidad para que todo funcionara y siga funcionando.

Y a lo largo de todo este tiempo, muchas personas continuamente no han dejado de pedirme que siguiera adelante, que escribiera esta memoria, y el haberlo conseguido se lo debo a todos ellos por su comprensión y por todo el tiempo que no he vivido con y para ellos. A Julia, Bea y Mariachi (Maria Jesús), por aquello de “*vivo sin vivir en mí y a tan altas horas llego que casi ni os veo*” y todo lo bueno que hemos vivido juntas. A Blanca por su dulce cariño, Choni (¿cómo puedes estirar el tiempo y hacer tantas cosas?), Jesús, Mariuka y Marta por tenerme siempre en su pensamiento, por no dejar que me desanimara ni un instante.

A mi querida Martha Bibbins y su familia, por adoptarme como hermana y como una hija más en México, os llevo siempre en el corazón. A Ana, mi comprensiva compañera y amiga de aventuras y desventuras en México...creo que no dejaste ninguna “chuche” por probar.

A Pilar, duendecillo de ojos azul cielo, de espíritu verde pistacho, de sonrisa constante y fuente de energía positiva...juntas hemos aprendido lo que es la “pazciencia”, la lucha ante la adversidad...y que las levaduras de una Guinness bien fría sí son buenas para la salud.

A Rosa, (mi Floky) por ser “*un fueguito de los que arden la vida con tantas ganas que no se puede mirarlos sin parpadear, y quien se acerca, se enciende*” por tener siempre la palabra precisa, por la risoterapia y nuestras *performances*, (gracias por no tirar de un rodillazo el Almanzor), por tu ejemplo de búsqueda constante en la vida, por animarme cuando no me veía capaz de escribir ni el título de esta tesis.

Miguel, por fin, atravesé la Ciénaga de los Muertos y llegué al Monte del Destino...el paso por Moria fue demasiado duro, demasiados Orcos, demasiada oscuridad, pero el Balrog se deshizo en mil pedazos...no podía evitarlo, gracias por ser la Luz de Eärendil.

Y por que, aún no sabiendo nada “de lo que iba” mi tesis (bueno, Nieves sí), no habéis dejado de animarme día tras día en esta última etapa, gracias Carlos, Nieves, Sonia, Pablo, Diego, Ángel, Lorena...por eso y por los cafes-reloj, la acogida de las *agayetas* y los *brownies* compartidos.

A mis “cuñis”, Mirian, Nuria, Mariángeles, Maricarmen y también Santi, por entender que esto era importante para mí, por la paciencia y apoyo de estos años.

Además, puedo asegurar que esta memoria no habría visto la luz si no es por mi familia. Especialmente a mis padres les debo el apoyo constante, el haberme enseñado a volar y a no rendirme ante las dificultades, han sido y son mi ejemplo de lucha y amor incondicional. El apoyo de mis hermanos Rubén y Guillermo ha sido esencial, gracias por querer a vuestra Nana porque sí, por creer en mí y en “mis bichos”. A mi abuelita, a mis primos y a mis tíos, especialmente a tía Mari, gracias desde el corazón por motivarme a estudiar y mucho más, nunca te equivocaste. A mis sobrinos, Lucía, Irene y Samuel, que un día comprenderán todas estas palabras, por ser la mejor terapia anti-estrés y porque la risa de un niño es la mejor medicina para el alma. Soy quien soy por todos ellos.

Y al final del camino, hasta el último minuto de realización de esta tesis, Luis. Juntos hemos escalado el Monte del Destino, con todas sus dificultades, y juntos estamos preparados para escalar cimas más altas. Gracias por todos los momentos, por todo lo aprendido junto a ti en este viaje, y por ocupar una gran parte de mi corazón.

ᚠᚢᚷᚱᚲ ᚱ ᚲᚲᚲᚲ

“Hannon le”

